



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS PROTEÓMICO CUANTITATIVO DE
FRUTOS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.)
SOMETIDOS A ESTRÉS POR DAÑO MECÁNICO**

Tesis que presenta

FRANCISCO ANTONIO REYES SORIA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2021

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Francisco Antonio Reyes Soria titulado “**ANÁLISIS PROTEÓMICO CUANTITATIVO DE FRUTOS DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) SOMETIDOS A ESTRÉS POR DAÑO MECÁNICO**”, realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular del Estrés Abiótico y Transformación Genética, Unidad de Biotecnología, en la línea de Agrobiotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

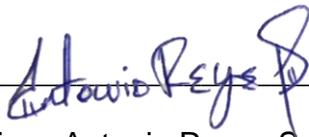


Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de enero de 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  _____
Francisco Antonio Reyes Soria

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las becas otorgadas durante el tiempo en que se llevó a cabo este trabajo cuyas adscripciones son: Beca Nacional (CVU:886878) y beca de movilidad nacional 2019-I (2019-000017-01NACF).

Agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y la coordinación del posgrado en ciencias opción biotecnología por el apoyo económico para el transporte de mi movilidad.

Agradezco a mi asesor de tesis Dr. Luis Carlos Rodríguez-Zapata por haberme recibido en el laboratorio de Fisiología molecular del estrés abiótico y transformación genética de plantas, al igual que el técnico académico Miguel Keb y mis compañeras, compañeros, amigas y amigos de laboratorio por su apoyo.

Agradezco al Instituto de Ecología A. C. (INECOL) y al Dr. Eliel Ruiz-May por el cálido apoyo y recibimiento dentro del laboratorio de proteómica. Así mismo, al técnico Miguel Elizalde y mis compañeras, compañeros, amigas y amigos residentes del mismo.

Agradezco a mi comité tutorial y de tesis por su apoyo y enseñanzas.

Agradezco a mis hermanas y hermanos de generación por todo su apoyo y camaradería. También agradezco a los compañeros, compañeras, amigos y amigas de los diferentes laboratorios del CICY.

Agradezco a mi familia y amigos por nunca soltarme, en especial a mis padres.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL ESTRÉS	3
1.1.1 ESTRÉS POR DAÑO MECÁNICO	3
1.1.2 DAÑO MECÁNICO EN FRUTOS	5
1.2 PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA EN LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS	7
1.2.1 PROTEÓMICA EN FRUTOS	8
1.3 <i>CARICA PAPAYA</i> (L.)	11
1.4 FRUTO DE PAPAYA	12
1.4.1 DAÑO MECÁNICO EN PAPAYA	13
1.5 BIOMARCADORES	14
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19

CAPÍTULO II	21
2 EVALUACIÓN DE CINCO PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DEL EXOCARPIO DEL FRUTO DE <i>CARICA PAPAYA</i> (L.) COMPATIBLE CON PROTEÓMICA LIBRE DE GEL	21
2.1 INTRODUCCIÓN	21
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.2.1 MATERIALES DE LA PLANTA	23
2.2.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	23
2.2.3 TRIZOL® /ACETATO DE AMONIO (TR-AA)	23
2.2.4 FENOL/ACETATO DE AMONIO (F-AA)	24
2.2.7 FENOL/ACETONA (F-ACN)	24
2.2.5 TCA/ACETONA/FENOL/ACETATO DE AMONIO (TCA-ACN-F-AA)	25
2.2.6 TCA/ACETONA/FENOL/ACETONA (TCA-ACN-F-ACN)	25
2.2.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	26
2.2.8 ELECTROFORESIS	27
2.2.9 SDS / PAGE	27
2.2.10 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	27
2.2.11 REDUCCIÓN	27
2.2.12 ALQUILACIÓN	27
2.2.13 DIGESTIÓN CON TRIPSINA	28

2.2.14 FRACCIONAMIENTO DE LA MUESTRA EN COLUMNAS C18-FASE REVERSA	28
2.2.15 ANÁLISIS NANO LC MS/MS	29
2.2.16 ANÁLISIS MS/MS DIRIGIDO MEDIANTE ÁRBOL DE DECISIONES (ETD, CID Y HCD)	29
2.2.17 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	30
2.2.18 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	30
2.2.19 ANOTACIÓN DE PROTEÍNAS	31
2.3 RESULTADOS	33
2.4 DISCUSIÓN	41
2.5 CONCLUSIÓN	45
CAPÍTULO III	47
3 ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO DEL DAÑO MECÁNICO EN EL EXOCARPIO DE PAPAYA (<i>CARICA PAPAYA</i> L.) DURANTE LA MADURACIÓN.	47
3.1 INTRODUCCIÓN	47
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.2.1 MATERIALES DE LA PLANTA	49
3.2.2 APLICACIÓN DE DAÑO MECÁNICO	49
3.2.3 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	49
3.2.4 MEDICIÓN DEL COLOR EN EXOCARPIO	49

3.2.5 MICROSCOPIA ÓPTICA	50
3.2.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	51
3.2.7 DIGESTIÓN Y ETIQUETADO MEDIANTE ETIQUETA DE MASA EN TÁNDEM (TMT)	52
3.2.8 FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS LC-MS/MS	52
3.2.9 ANÁLISIS MS/MS DIRIGIDO MEDIANTE ÁRBOL DE DECISIONES (ETD, CID Y HCD)	54
3.2.10 ANÁLISIS LC-SPS-MS³	54
3.2.11 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y CUANTIFICACIÓN	55
3.2.12 ANOTACIÓN DE PROTEÍNAS	56
3.3 RESULTADOS	57
3.3.1 COLORIMETRÍA	57
3.3.2 MICROSCOPIA	58
3.3.3 CONTROL DE CALIDAD	60
3.3.4 ANÁLISIS TMT LC-SPS-MS³	60
3.3.5 ANÁLISIS DE GO Y KEGG	61
3.3.6 INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA (PPI)	66
3.4 DISCUSIÓN	69
3.4.1 RESPUESTA FISIOLÓGICA	69
3.4.2 RESPUESTA DINÁMICA DEL PROTEOMA EN TIEMPO TEMPRANO (D2)	70
3.4.3 RESPUESTA DINÁMICA DEL PROTEOMA EN TIEMPO TARDÍO (D12)	72

2.4.4 RESPUESTA PERSISTENTE DEL PROTEOMA D2-D12	73
3.5 CONCLUSIÓN	75
CAPÍTULO IV	77
4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	77
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	78
4.3 PERSPECTIVAS GENERALES	79
5 BIBLIOGRAFÍA	81

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Respuesta celular ante estímulo mecánico.....	24
Figura 1.2 Estructura multiescala del fruto de tomate.....	25
Figura 1.3. Árbol de Carica papaya (L).....	30
Figura 1.4 Fruto femenino y hermafrodita de C. papaya.....	32
Figura 1.5 Estrategia experimental.....	36
Figura 2.1 Comparación estadística de los rendimientos obtenidos entre los métodos de extracción a través de la prueba de Kruskal-Wallis.....	49
Figura 2.2 Gráfica de barras mostrando la cantidad de proteínas identificadas en cada método de extracción.....	49
Figura 2.3 Diagrama de Venn que ilustra las proteínas compartidas entre los métodos de extracción.....	50
Figura 2.4 Gráfica de barras que ilustra el número de proteínas en cada localización subcelular predicha con la herramienta DeepLoc 1.0.....	52
Figura 2.5 Número de proteínas a las que fue asignada cada ontología (GO) dentro de cada método de extracción.....	53
Figura 2.6 Diagrama de Venn.....	54
Figura 2.7 Gráfica de barras que ilustra la cantidad de proteínas con péptidos señal.....	54
Figura 3.1 Cambio en la coloración del exocarpio de papaya.....	72
Figura 3.2 Micrografías de cortes transversales de exocarpio de papaya teñido con azul de toluidina después de aplicado el daño mecánico.....	73
Figura 3.3 Análisis de componentes principales (PCA) para A) D2 y B) D12.....	74
Figura 3.4 Proteínas con acumulación relativa diferencial identificadas en D2 y D12.....	75
Figura 3.5 Clases de ontología génica (GO) mayormente representadas.....	77
Figura 3.6 Mapas de rutas metabólicas KEGG.....	79

LISTADO DE CUADROS

Tabla 2.1 Promedio y desviación estándar (\pm SD) de la cuantificación de proteínas en cada método de extracción.....	48
Tabla 2.2 Predicciones del desordenamiento de cada set de proteínas extraídas con los métodos de extracción de acuerdo con el programa EZpritz 1.3.....	55
Tabla 3.1 Datos colorimétricos registrados en papayas dañadas (T) y no-dañadas (Ctrl) en 7 puntos temporales.....	71

ABREVIATURAS

1-MCP = 1-metilciclopropeno

2D-DIGE = electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones

2-DE = electroforesis en dos dimensiones

2D-PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones

2-ME = β -mercaptoetanol

AA = acetato de amonio

ABA = ácido abscísico

ACC = ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa

ACO = 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa

ACS = ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa

AFP = función de predicción automatizada

AP = potenciales de acción

ARNm = ácido ribonucleico mensajero

BP = proceso biológico

BRs = Brasinoesteroides

BSA = albúmina sérica bovina

Ca⁺² = calcio

CAD = cinamil alcohol deshidrogenasa

CaM = calmodulina

CaM-Like = tipo-calmodulina

CC = componente celular

CE = color de exocarpio

CID = disociación inducida por colisión

CPMCW = pared celular-membrana plasmática-citoesqueleto

CSC = canales catiónicos activados por estrés permeables al calcio

Ctrl = control

DPA = difenilamina

DTT = ditioneitol

ETD = disociación por transferencia de electrones

F-AA = Fenol/Acetato de amonio

F-ACN = Fenol/acetato de amonio

FC = fold change

GA = ácido giberélico

GO = ontología génica

H₂O₂ = peróxido de hidrogeno

H3K36 = histona-3-lisina-36

H3K4 = histona-3-lisina-4

HCD = disociación por colisión con alta energía

HSP = proteína de choque térmico

IAA = ácido indol-1-acético

IAM = Iodoacetamida

iTRAQ = etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta

JA = ácido jasmónico

KEGG = enciclopedia Kyoto de genes y genomas

KO = ortólogo KEGG

LC-MS/MS = cromatografía líquida acoplada a masas en tándem

MAPK = proteínas cinasas activadas por mitógeno

MCA = canales con actividad complementaria Mid1

MeOH = metanol

MF = función molecular

MRFA = Met-Arg-Phe-Ala

MS = espectrometría de masas

MS/MS = masas en tándem

MSL = canales tipo mecanosensitivos de pequeña conductancia

MW = peso molecular

N = Newton

NaCl = cloruro de sodio

PARA = proteína con acumulación relativa aumentada

PARD = proteína con acumulación relativa disminuida

PAL = fenilalanina amonio liasa

PCA = análisis de componentes principales

PCD = muerte celular programada

pI = punto isoeléctrico

PMeV = virus meleira de la papaya

PMSF = fenilmetil sulfonyl fluoruro

PPI = interacción proteína-proteína

PR = proteínas relacionadas a la patogénesis

PRSV-P = virus de la mancha anular de la papaya

RBOH = proteína D homologa de estallido respiratorio oxidasa

RLK =receptor tipo cinasa

ROS = especies reactivas de oxígeno

SAM = S-adenosilmetionina

SCX = intercambio catiónico fuerte

SD = desviación estándar

SDS = dodecilsulfato de sodio

SPS = selección de precursores sincrónicos

T = tratamiento

TCA = ácido tricloroacético

TCA-ACN-F-AA = ácido tricloroacético/acetona/fenol/acetato de amonio

TCA-ACN-F-ACN = ácido tricloroacético/acetona/fenol/acetona

TCEP = Tris (2-carboxietil) fosfina

TCH = genes inducibles al tacto

TFA = ácido trifluoroacético

TMT = etiquetas de masas en tándem

TPK = canales de dos poros de potasio

TPxI = tiorredoxina peroxidasa

TR-AA = TRlzol/acetato de amonio

RESUMEN

Carica papaya es un cultivo de importancia económica a nivel mundial, sobre todo por sus cualidades nutritivas que la hacen la tercera fruta tropical consumida en toda la población. Sin embargo, a través de la línea de producción y distribución, el cultivo puede obtener pérdidas de hasta un 100% por efectos directos e indirectos del daño mecánico. Se han utilizado diferentes métodos de mejoramiento de papaya, inclusive se vende transgénicamente en Estados Unidos, como una estrategia ante la problemática que en los años 80s y 90s atacaba la región de Hawái. Hoy en día existen diferentes herramientas de análisis masivo (ómicas) que permiten el estudio y comprensión de los mecanismos moleculares de interés en plantas modelo y no-modelo como lo es *C. papaya*. Tal es el caso de la proteómica, encargada de analizar el comportamiento de las proteínas específicas de un tejido o célula en un momento determinado. Sin embargo, hasta la fecha solo existen cuatro trabajos proteómicos directamente en fruto de papaya. Aunque dos de cuatro trabajos utilicen tecnología reciente y más sensible, ninguno aborda el tema de daño mecánico. El fruto de papaya es un fruto climatérico rico en azúcares, pero sobre todo en proteasas como la papaína, los cuales son elementos cruciales para un buen flujo de trabajo proteómico, incluyendo pasos esenciales como la digestión enzimática y el etiquetado de proteínas para un análisis cuantitativo. Este trabajo logró establecer las principales diferencias entre cinco métodos de extracción compatibles con enfoques proteómicos libre de gel y a partir de allí, la elucidación del mecanismo de defensa ante el estrés por daño mecánico a través de la maduración. Los resultados sugieren que el mecanismo del fruto de papaya es diferente a lo reportado anteriormente en otros frutos climatéricos al regular negativamente proteínas asociadas al metabolismo primario, principalmente a la fotosíntesis. Así mismo se detectó un núcleo de proteínas constantes en tiempo temprano y tardío en respuesta al daño mecánico. Lo cual pueden ser potenciales biomarcadores para establecer o dar seguimiento a la condición de estrés por daño mecánico.

ABSTRACT

Carica papaya is a crop of economic importance worldwide, especially for its nutritional qualities that make it the third tropical fruit consumed by the entire population. However, through the production and distribution line, the crop can obtain losses of up to 100% due to direct and indirect effects of mechanical damage. Different methods of improvement of papaya have been used, including it is sold transgenically in the United States, as a strategy in the face of the problem that in the 80s and 90s attacked the Hawaii region. Today there are different massive analysis tools (omics) that allow the study and understanding of molecular mechanisms of interest in model and non-model plants such as *C. papaya*. Such is the case of proteomics, capable of analyzing the behavior of the specific proteins of a tissue or cell at a specific time. However, to date there are only four proteomic works in papaya fruit. Although two out of four papers use recent and more sensitive technology, none address the issue of mechanical damage. The papaya fruit is a climacteric fruit rich in sugars, but especially in proteases such as papain, which are crucial elements for a good proteomic workflow, including essential steps such as enzymatic digestion and protein labeling for quantitative analysis. This work was able to establish the main differences between five extraction methods compatible with gel-free proteomic approaches and, from there, the elucidation of the defense mechanism against mechanical damage through maturation. The results suggest that the papaya fruit mechanism is different from that previously reported in other climacteric fruits by negatively regulating proteins associated with primary metabolism, mainly photosynthesis. Likewise, a core of constant proteins was detected in early and late time in response to mechanical damage. Which can be potential biomarkers to establish or monitor the condition of stress due to mechanical damage.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son seres vivos, en su mayoría sésiles, que se encuentran constantemente expuestas a cambios y variaciones de su entorno, así como de organismos asociados de una forma directa o indirectamente a ellas (Gaspar et al., 2002). Estas situaciones que alteran la condición fisiológica de la planta y rompen su homeostasis, se les denomina estrés (Roychoudhury y Kumar Tripathi, 2019; Jaleel et al., 2009; Gaspar et al., 2002). En particular, un factor del medioambiente que impacte de manera negativa el crecimiento sano, y normal de la planta se le conoce como estrés abiótico, como por ejemplo, el exceso o falta de agua, cambios bruscos de temperatura, toxicidad por metales pesados, entre otros (Gantait et al., 2019). Toda la planta es susceptible al estrés abiótico incluyendo flores y frutos; estos últimos son muy susceptibles al daño mecánico, en especial los frutos frescos o tropicales. Se le conoce como daño mecánico a la falla estructural causado por algún impacto, compresión, abrasión, pinchazo, o la combinación de ellas (Li y Thomas, 2014). Al momento en que la planta es expuesta al estrés abiótico, existe la recepción de una señal en particular, que desencadena una serie de sucesos generando así, una respuesta que derivará en la modificación de la expresión génica y alteraciones concurrentes metabólicas. En el caso del estrés por daño mecánico, algunas evidencias sugieren que la deformación de las moléculas mecanosensibles inducen eventos posteriores en la pared celular y sus estructuras asociadas. Lo anterior consiste en la deformación inducida mecánicamente de una proteína sensora, que podría cambiar su conformación o su apertura como canal y provocar un cambio químico, un cambio de afinidad, entre otras; causando una señal química como la exposición de un sitio de unión, entrada de iones, liberación de una molécula de señalización, entre otras.; ocurriendo así la transducción de la información física en una química, la cual será correspondida con una respuesta específica (Fruleux et al., 2019). La aclimatación al estrés está mediada por cambios en la expresión génica, lo que resulta en cambios en la composición de proteínas (proteoma) y metabolitos (metaboloma) de la planta, aunque no necesariamente exista una correlación entre sí (Kosová et al., 2011, 2018). Las proteínas desempeñan papeles clave en el desarrollo, maduración y senescencia de los frutos y están involucradas en redes y vías metabólicas esenciales relacionadas con la resistencia al estrés biótico y abiótico. En vista de lo anterior, y considerando el hecho de que no existen trabajos de enfoque proteómico que den

respuesta al mecanismo de respuesta del fruto de papaya ante el daño mecánico y reducidos protocolos optimizados para el flujo de trabajo de análisis proteómico en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución; se realizaron modificaciones a protocolos de extracción de proteínas totales de pericarpio de papaya y así proponer una alternativa que facilite la toma de decisiones a la hora de llevar a cabo este tipo de estudios. De igual forma, se logró establecer, mediante un enfoque proteómico, los mecanismos de respuesta de la papaya ante el estrés por daño mecánico.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL ESTRÉS

Las plantas son seres vivos inmóviles que se encuentran constantemente expuestas a cambios y variaciones en su entorno, así como de organismos asociados directa e indirectamente a ellas (Gaspar et al., 2002). Estas situaciones que alteran la condición fisiológica de la planta y rompen su homeostasis, se les denomina estrés (Roychoudhury y Kumar Tripathi, 2019; Jaleel et al., 2009; Gaspar et al., 2002). En particular, un factor del medioambiente que impacte de manera negativa el crecimiento sano y normal de la planta se le conoce como estrés abiótico, como por ejemplo, el exceso o falta de agua, cambios bruscos de temperatura, toxicidad por metales pesados, daño mecánico, entre otros (Gantait et al., 2019).

1.1.1 ESTRÉS POR DAÑO MECÁNICO

El estrés por daño mecánico se refiere a la deformación plástica, rotura superficial y daño de tejido causado por factores que producen efectos fisiológicos; producto de cambio o reorganización metabólica de la planta (de Godoy et al., 2010). Acorde a Li y Thomas (2014) este tipo de estrés se puede clasificar en diferentes tipos de daño mecánico: (i) por impacto, sucede cuando una superficie es golpeada con la fuerza suficiente para causar separación o rotura celular; (ii) por compresión, sucede al ejercer la suficiente fuerza para sobrepasar el umbral de una superficie causando moretones, deformaciones y hasta roturas; (iii) por abrasión, es ocasionada por la fricción de un cuerpo sobre otro logrando el desgaste y/o remoción de capas de una superficie; y por último (iv) por punción, causada al perforar una superficie. En condiciones experimentales controladas, se induce daño mecánico mediante fricciones, flexiones de partes vegetativas, contacto localizado y dispositivos de agitación, punción, compresión, entre otras, para estudiar el crecimiento y comportamiento de las plantas al imitar los efectos en entornos naturales de la tigmomorfogénesis (cambios en el desarrollo inducidos por la percepción de la fuerza mecánica) (Sparke y Wünsche, 2020; Jaffe, 1973). El modelo vegetal de respuesta celular a estímulo mecánico, propuesto por Sparke y Wünshe (2020) (Fig. 1.1), sugiere en general que los estímulos mecánicos,

generarán presión y será percibida por la interfaz pared celular-membrana plasmática-citoesqueleto (CPMCW) integrando la señal molecular específica del estímulo. Los canales con actividad complementaria Mid1 (MCA), los canales tipo mecanosensitivos de pequeña conductancia (MSL) y los canales de dos poros de potasio (TPK) facilitan el paso de iones a través de la membrana plasmática celular. Así mismo, sugiere que los canales catiónicos activados por estrés permeables al calcio (CSC) estén involucrados durante la percepción de la fuerza mecánica. La entrada de iones podría desencadenar potenciales de acción (AP), y el influjo de Ca^{2+} produce explosiones oxidativas (H_2O_2). La familia de proteínas de membrana asociadas a pared celular del receptor tipo cinasa (RLK) son influenciadas por las concentraciones de Ca^{2+} . La cascada de señalización de estímulo-específico de Ca^{2+} desencadena la expresión de genes inducibles al tacto (TCH), codificando proteínas señalizadoras de calcio tales como Calmodulina (CaM) y proteínas tipo Calmodulina (CaM-like), las cuales activan eventos de señalización río abajo como la activación enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la cinamil alcohol deshidrogenasas (CAD) dentro de la vía de los fenilpropanoides para promover la biosíntesis de lignina. Por otra parte, SDG8, es una enzima modificadora de cromatina que cataliza la trimetilación de sitios activos de histona-3-lisina-4 (H3K4) e histona-3-lisina-36 (H3K36), la cual también se encuentra involucrada en la expresión de genes TCH. El ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico sintasa (ACC) es activado e incrementa la biosíntesis de etileno. La biosíntesis de ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides (BRs) y ácidos jasmónicos (JAs) incrementa con JA jugando un papel clave en la defensa de la planta. Ácidos giberélicos (GAs) se descomponen y se reduce el transporte polar del ácido indol-1-acético (IAA). Las propiedades de la pared celular también se modifican debido al reordenamiento de los microtúbulos, los cuales se correlacionan con el movimiento de los complejos de celulosa. Todos estos cambios a nivel celular propician alteraciones morfológicas.

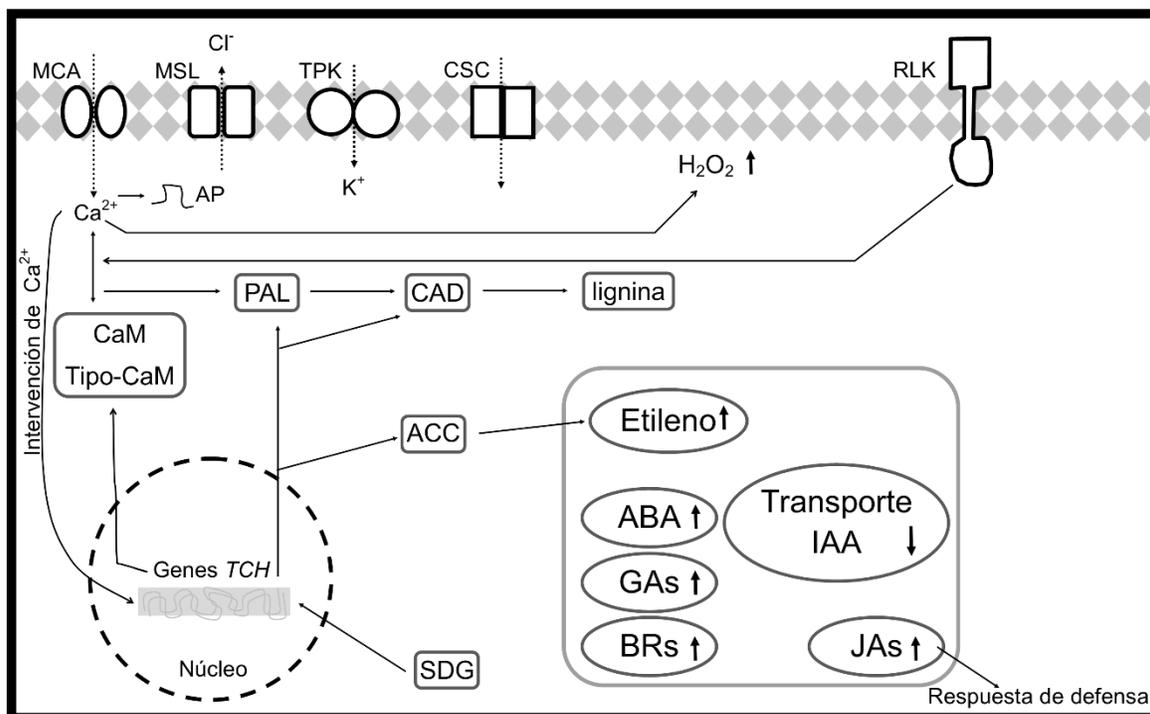


Figura 1.1 Respuesta celular ante estímulo mecánico. Tomado de Sparke y Wünsche, 2020. Licencia: 4962890521002

1.1.2 DAÑO MECÁNICO EN FRUTOS

Las frutas juegan un papel importante en el suministro de vitaminas, minerales y fibra dietética esenciales al mundo, por lo tanto, tienen una gran demanda ya que forman parte de la dieta de millones de personas (Claudius y Ludivine, 2017; Li y Thomas, 2014). El daño mecánico en frutas se produce principalmente durante las operaciones de cosecha en el campo, pero también ocurre en las líneas de clasificación/empaque, durante el transporte y en la manipulación al final de la cadena de suministro, por ejemplo, durante la exhibición y selección de productos por parte de minoristas y consumidores (Li y Thomas, 2014). Bajo el concepto de Li et al., (2014), los frutos son materiales estructurados jerárquicamente en macroescala, hablando debidamente del fruto como órgano; en mesoescala, comprendido por diferentes tejidos; y a microescala, donde se encuentra el arreglo celular altamente estructurado (Fig. 1.2). El daño mecánico es causado por la falla de células en la microescala que en consecuencia será manifestado a macroescala.

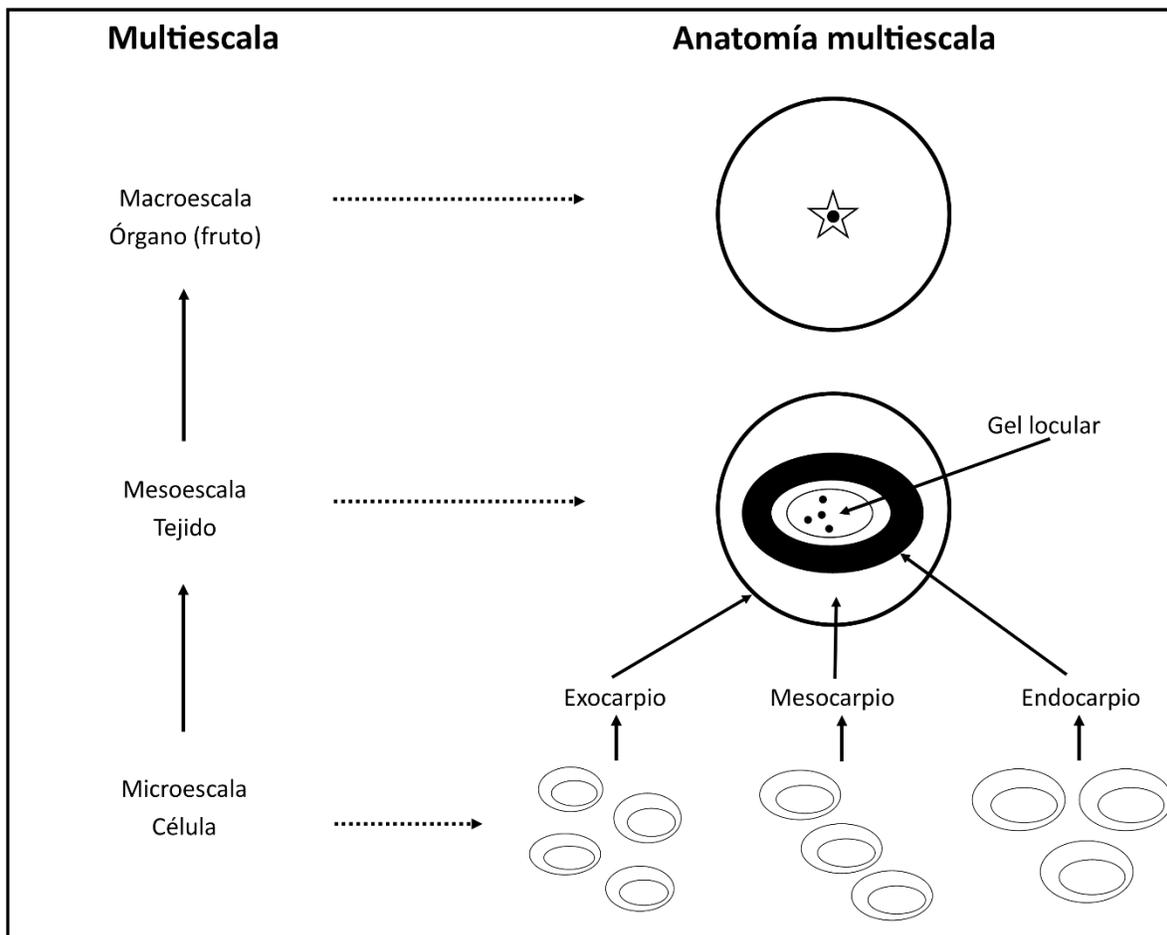


Figura 1.2 Estructura multiscale del fruto de tomate. Tomado de Li y Thomas, 2014. Licencia: 4962971085709

El daño mecánico más común en frutas es la magulladura, la cual se origina durante la cosecha, manejo y transporte. La magulladura se origina por la falla en los tejidos subcutáneos sin que la cáscara llegue a romperse, producto de la acción de fuerza externa excesiva sobre la superficie de la fruta mediante impacto, compresión o vibración contra un cuerpo rígido u otra fruta que provoque rotura celular (Hussein et al., 2018). Los cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración son críticos, pues impactan en la calidad del fruto, su vida de anaquel, aceptación del consumidor final y ganancias o pérdidas para los agricultores. Dentro de los cambios fisiológicos, se incluyen el ablandamiento debido a cambios en el metabolismo de la pared celular por la solubilización parcial de pectina y celulosa, cambio de textura debido a la acumulación de azúcares simples por degradación del almidón y aumento en la producción de compuestos volátiles (Claudius y Ludivine,

2017). El desarrollo y maduración de las frutas son procesos genéticamente programados, coordinados e irreversibles (Claudius y Ludivine, 2017; Giovannoni, 2001). A pesar de que el desarrollo y la maduración son procesos complejos y actúa de manera única en cada especie, las frutas se pueden clasificar en climatéricas y no climatéricas. Las frutas climatéricas como el tomate, el plátano, la manzana y la papaya, se caracterizan por un aumento en la respiración acompañado por una detonación de etileno al inicio de la maduración; en contraste con las frutas no climatéricas como los cítricos, la uva, la piña y la fresa, las cuales no presentan un cambio drástico en su respiración y la producción de etileno permanece a un nivel bajo (Li et al., 2017; Giovannoni, 2004). El ablandamiento de las frutas climatéricas acorta su vida de anaquel y también las hace más propensas al daño mecánico.

1.2 PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA EN LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS

El término proteómica se puede simplificar como una disciplina científica o un enfoque metodológico que se encarga del estudio de las proteínas, cuyo conjunto completo constituye el proteoma (Rey et al., 2019). El término “proteoma” fue utilizado por primera vez por Marc Wilkins en 1994 como el complemento proteico del genoma, representando todas las proteínas de un organismo en un momento específico (Kosová et al., 2018). A diferencia del genoma el cual se considera constante y que a través de la herencia define el genotipo de una planta, los cambios en el epigenoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma moldean el fenotipo de una planta en respuesta al desarrollo vegetal y estado de salud, así como el ambiente (Kosová et al., 2011, 2018; Rivera-Pastrana et al., 2010; Thiellement et al., 2007). Las proteínas se encuentran directamente involucradas en la respuesta al estrés en plantas, tanto como proteínas estructurales, así como proteínas involucradas en la regulación del epigenoma, transcriptoma y metaboloma (Kosová et al., 2018). Sin embargo las funciones de las proteínas no solo dependen de su estructura molecular, sino también de su localización celular, modificaciones postraduccionales e interacciones entre ellas (Kosová et al., 2011, 2018). El objetivo principal de la proteómica es identificar y cuantificar el mayor número de proteoformas posibles en un solo experimento; esto dependerá del sistema experimental, la estrategia de espectrometría de masas (MS), equipamiento y algoritmos empleados. Si bien los análisis proteómicos pueden emplearse de manera cualitativa para identificar miles de proteínas en células u otras

muestras biológicas, siempre se requerirá la cuantificación de estas proteínas para una comprensión de la cinética global proteica y los mecanismos moleculares de los procesos biológicos. La proteómica cuantitativa se ha convertido en un conjunto versátil de métodos en la investigación, brindando nuevas oportunidades para estudiar e identificar los mecanismos moleculares de adaptación de los organismos en respuesta a la variabilidad ambiental; como la proteómica del estrés en plantas, la cual es una disciplina dinámica enfocada al estudio del proteoma vegetal y la función biológica de las proteínas en plantas sometidas a estrés (Kosová et al., 2018). Según Lualdi y Fasano (2019), los datos generados en las ciencias, es algo que puede ser visualizado en su totalidad y las correlaciones entre datos puede ser mecánicamente analizada para resaltar relaciones de causalidad y así generar modelos, los cuales son herramientas poderosas para describir la realidad.

1.2.1 PROTEÓMICA EN FRUTOS

A nivel mundial, la maduración de las frutas ha sido uno de los enfoques principales en materia de investigación vegetal, debido a relevancia biológica y evolutiva en el desarrollo de semillas y su dispersión, además de las implicaciones que conlleva la maduración para determinar la calidad y valor nutricional (Palma et al., 2019). Durante la década de los 80s y 90s, estudios aislados de bioquímica han permitido conocer las proteínas que se encuentran involucradas en el mecanismo de señalización por daño mecánico utilizando como modelo diferentes especies de plantas. Dichos estudios, llevaron a señalar diferentes proteínas como la fenilalanina amonio liasa (PAL) o la calmodulina (CaM), como claves dentro del mecanismo de señalización (J. Chen et al., 2009; Klee et al., 1980; Camm y Towers, 1973). La implementación de la proteómica como complemento a la genómica y transcriptómica en el campo de la biología de las frutas; ha acelerado el entendimiento del desarrollo y maduración. El análisis proteómico diferencial entre estados de madurez han dado luz a diferentes procesos moleculares que ocurren durante la maduración y proveen una representación dinámica del desarrollo frutal (Claudius y Ludivine, 2017; Palma et al., 2011). A pesar de que el desarrollo y maduración de las frutas son procesos complejos y únicos para cada especie; en las frutas climatéricas, el aumento en la respiración y el estallido de la fitohormona etileno, se encuentra demostrado con el aumento en la abundancia de proteínas relacionadas a su biosíntesis (Bhuiyan et al., 2020; Y. Chen et al.,

2019), como la S-adenosilmetionina (SAM) sintetasa en papaya (Nogueira et al., 2012) y pera (*Pyrus communis* L.) (Reuscher et al., 2016), Ácido 1-Aminocicloproano-1-Carboxílico sintasa (ACS) en el kiwi (*Actinidia deliciosa* A. Chev.) (Shin et al., 2020), Ácido 1-Aminocicloproano-1-Carboxílico Oxidasa (ACO) en durazno (*Prunus persica* L.) (Prinsi et al., 2011), manzana (*Malus domestica* Borkh) (Li et al., 2016) y papaya (Jiang et al., 2019), por mencionar algunos. Este tipo de estudios durante el desarrollo y maduración proporciona nuevos conocimientos sobre la modulación de la madurez en frutas a nivel de proteínas. La calidad de un fruto en un determinado estado de maduración se ve reflejada en la aceptación de un consumidor y puede ser agrupada en cinco factores: apariencia, textura, sabor, valor nutricional y seguridad. Una baja calidad del fruto es equivalente a desperdicio de comida y pérdidas económicas (Siddiqui, 2018). Como anteriormente se ha hablado, las frutas climatéricas debido a la senescencia y deshidratación acelerada que sufren por su metabolismo, son más propensas a estrés biótico y abiótico postcosecha, como frío, calor, variaciones atmosféricas y diferentes tipos de daño mecánico por el reblandecimiento de su cáscara, afectando su calidad (Li et al., 2017; Tucker et al., 2017). Desde el siglo pasado se conocen problemas de pérdidas en frutas como la papaya en condiciones de postcosecha. En la actualidad, aún existe gran cantidad de desperdicio en postcosecha, a pesar de que disminuirla es una forma más eficiente de aumentar la seguridad alimentaria que incrementando su producción (Pedreschi, 2017; Paull et al., 1997). El desarrollo de la proteómica ha dado luz para la caracterización de muchas rutas metabólicas involucradas en la resistencia y adaptación a estrés biótico y abiótico. El caso de tomate es importante, ya que es considerado un sistema modelo para las frutas carnosas por las bases existentes tanto de su genoma como de su proteoma (Sant'Ana y Lefsrud, 2018). Iwahashi y Hosoda (2000) sometieron tomates a estrés por calor y analizaron el proteoma del pericarpio por electroforesis en dos dimensiones (2-DE), en este experimento lograron resolver 1,200 puntos de proteínas. Al compararlos con la condición de control encontraron 341 puntos que se incrementaron durante el estrés, 293 sufrieron decremento, 315 sin cambio y solo 14 puntos aparecieron en la condición de estrés; dando los primeros pasos en el entendimiento del rol en el aumento de las proteínas de choque térmico (HSP) bajo esta condición y la disminución de proteínas del fotosistema. Por otro lado, Vega-García y colaboradores (2010) sometieron tomates a estrés por frío. Interesantemente, reportaron la acumulación las proteínas relacionadas al daño por frío, tiorredoxina peroxidasa (TPxI) y proteína de unión a ARN rica en glicina (GR-RBP), en el tejido no

dañado de las frutas estresadas; sugiriendo que estas enzimas y las demás proteínas relacionadas al frío se encuentran trabajando juntas para mantener la homeostasis celular bajo este tipo de estrés. Recientemente, el grupo de trabajo de Tang y colaboradores (2020) logró comparar dos estados de madurez de tomate, verde maduro versus rojo maduro y además, tomates maduros versus tomates maduros tratados con cloruro de sodio (NaCl). Encontraron que el tratamiento con NaCl induce la expresión proteica de beta-fructofuranosidasa y lipoxigenasa, las cuales son responsables de la acumulación de azúcares y compuestos aromáticos volátiles, respectivamente. Además, el tratamiento inhibió la expresión de beta-galactosidasa, resultando en un aumento en la firmeza del fruto. Su trabajo permite el entendimiento de las bases en el mejoramiento de la calidad en tomates con substratos salinos. En el caso del cultivo del plátano (*Musa paradisiaca* L.), Ji y colaboradores (2019) sometieron plantas a estrés salino y extrajeron proteínas de sus hojas, logrando clasificar 77 proteínas con acumulación relativa aumentada (PARAs) de acuerdo a su función biológica, donde destacan principalmente: Respuesta a defensa, metabolismo de carbohidratos y energía, fotosíntesis, y, síntesis, procesamiento y degradación de proteínas. Concluyeron por primera vez que, debido a los cambios en la abundancia de las proteínas pertenecientes a diferentes categorías funcionales, *M. paradisiaca* responde a la salinidad con diferentes mecanismos, principalmente limitando el daño a un nivel reparable y manteniendo la homeostasis redox y celular gracias a las proteínas del citoesqueleto. Así mismo, el grupo de trabajo de Xiao (2019) obtuvo por primera vez el proteoma de pared celular del plátano en dos estados de madurez, logrando llevar a cabo un estudio proteómico del ablandamiento frutal. Lo anterior se espera que ayude a desarrollar estrategias para incrementar la calidad sensorial del fruto y así disminuir las pérdidas postcosecha. También se ha trabajado con papaya, Huerta-Ocampo y colaboradores (2012) trataron frutas de papaya con 1-metilciclopropeno (1-MCP), un inhibidor del etileno. Observaron inhibición de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular, así como del color y el control de la turgencia en el fruto; contribuyendo a elucidar el proceso de maduración en papaya. Du y colaboradores (2017) llevaron a cabo un estudio cuantitativo para indagar cambios proteicos en manzanas que presentan escaldaduras y los mecanismos moleculares de los efectos inhibitorios de tratamientos con difenilamina (DPA) y 1-MCP. Su contribución confirmó que el sistema redox y antioxidante, así como el metabolismo de los fenilpropanoides, están ligados al desarrollo de este desorden. El entendimiento del mecanismo de la formación de escaldaduras en manzanas

y la fisiología/bioquímica de la resistencia contribuirá a nuevas perspectivas y desarrollo de estrategias efectivas para reducir o eliminar esta condición.

1.3 *Carica papaya* (L.)

Carica papaya (papaya o papayo) pertenece a la familia Caricaceae junto a otros cinco géneros: Jarilla, Horovitzia, Jacartia, Vasconcellea y Cylicomorpha. Se desconoce con exactitud su lugar de origen; sin embargo, evidencia recopilada por algunos autores sugieren el sur de México y/o Centroamérica como lugar de origen (Badillo y Leal, 2020; Fuentes y Santamaría, 2014). Puede llegar a medir hasta 10 m. Posee tronco único y recto, semi leñoso, fistuloso en los entrenudos. Hojas amplias (40-60 cm), palmadas con número de venación variable. Es una planta dicotiledónea diploide con 18 cromosomas (Chávez-Pesqueira y Núñez-Farfán, 2017), pueden ser dioicas, con flores masculinas y femeninas en plantas separadas; monoicas, con flores masculinas y femeninas en la misma planta; o hermafroditas, con estructuras masculinas y femeninas en la misma flor. Las plantas masculinas producen inflorescencias largas. Las flores femeninas o hermafroditas son axilares al peciolo de las hojas que darán lugar al fruto (Badillo y Leal, 2020; Chávez-Pesqueira y Núñez-Farfán, 2017; Jiménez et al., 2014).



Figura 1.3. Árbol de *Carica papaya* (L). Tomada de Wikimedia Commons. Licencia: cc-by-sa-2.5-ar.

1.4 FRUTO DE PAPAYA

Mamona, lechosa, paw paw o simplemente papaya, es el nombre que recibe el fruto de *C. papaya*. La planta empieza a producir frutos a los 9-12 meses de plantación. Son bayas de diversos tamaños y formas dependiendo del tipo de flor de procedencia, si es silvestre o domesticada, y hasta del cultivar. Las papayas provenientes de flores hermafroditas generalmente son elongadas y las provenientes de flores femeninas tienden a ser redondas (Jiménez et al., 2014; Teixeira et al., 2007). Cuando están creciendo y desarrollándose en la planta, su pericarpio es verde, brillante y firme; cuando alcanzó la madurez fisiológica (estado pre climatérico), la papaya comienza a aumentar su respiración así como la aparición en el pico de etileno (estado climatérico), comenzando a tornarse de amarillo a naranja, disminuyendo su rigidez (Hewajulige y Dhekney, 2015). Es rica en vitaminas A, C, potasio, calcio y fibra (Krishna et al., 2008). Por ende, su favorable perfil nutricional junto con su rápido crecimiento desde semilla y maduración del fruto, lo convirtieron en uno de los cultivos tropicales más importantes y lucrativos (Fuentes y Santamaría, 2014). Por su metabolismo de tipo climatérico, la papaya tiene una corta vida de anaquel; por lo tanto, las pérdidas postcosecha y deterioro de calidad sucede mayormente durante el manejo, transporte y almacenamiento (Paull et al., 1997). El ablandamiento de la papaya se debe a la actividad de hidrolasas sobre los polisacáridos de la pared celular, modificando la composición de la pared celular (Yao et al., 2012). A pesar de que los patógenos de la papaya varían geográficamente y son influenciados por las variedades allí cultivadas y el clima, algunos causan grandes pérdidas económicas a nivel global desde una perspectiva de producción y exportaciones. Algunos patógenos importantes para la papaya son: *Colletotrichum gloeosporioides*, el hongo responsable de la enfermedad antracnosis; el virus meleira de la papaya (PMeV), que provoca el exudado de látex; y el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV) (Porter et al., 2014). De hecho, la papaya es conocida como el primer cultivo transgénico en el mundo, liberado para la producción en 1998 debido al impacto del PRSV en la industria de Hawái, Estados Unidos; logrando dos cultivos resistentes “SunUp” y “Rainbow” (Geetika et al., 2018; Chávez-Pesqueira y Núñez-Farfán, 2017; Gonsalves, 2014).



Figura 1.4 Fruto femenino y hermafrodita de *C. papaya*.

1.4.1 DAÑO MECÁNICO EN PAPAYA

El proceso de senectud natural y por estrés abiótico están asociados con la degradación estructural y la muerte celular; por lo tanto, la estructura celular determina la estabilidad física, química, microbiológica, y por ende la vida de anaquel (Cáez-Ramírez et al., 2018). A pesar de esto, las células de cada tejido o arreglo a microescala reportan diversas respuestas fisiológicas ante el mismo factor adverso (Li y Thomas, 2014). El estrés abiótico en la etapa climatérica de la papaya y sus pérdidas están documentados desde el siglo pasado (Paull et al., 1997). Las papayas son sensibles al frío, almacenarlas por debajo de los 10°C genera que la fruta se arrugue, aparezca necrosis, se ablande, exista fuga de electrolitos, entre otras cosas (Jiménez et al., 2014). A pesar de esto, el mayor daño que ocurre dentro de la cadena de producción es el daño mecánico, pues derivado de esto, incrementa la susceptibilidad a otros padecimientos biológicos (Velásquez-Herrera et al., 2016; Santamaría Basulto, Sauri Duch, et al., 2009; Paull et al., 1997; Quintana et al., 1993). Para reducir esta problemática, las papayas son empaquetadas en cartones, a veces envueltas en redes, dependiendo del productor y si el destino es exportación local o internacional (Hewajulige y Dhekney, 2015). Los principales daños mecánicos en papaya son el impacto de la cosecha hecha mayormente a mano; y la compresión y abrasión en el transporte y almacenamiento de la misma, manifestándose en ablandamiento, decoloración, manchas y/o moretones en la cáscara (Teixeira et al., 2007). A la fecha,

existen reducido número de estudios enfocados a determinar qué elementos de señalización se encuentran involucrados en el mecanismo de respuesta causado por daño mecánico en frutos de papaya. Por lo cual, solo existe la evidencia de una cisteína endopeptidasa y ACC oxidasa.

1.5 BIOMARCADORES

Un biomarcador es una sustancia que es expresada y puede ser medida bajo una condición específica en una muestra biológica. Un biomarcador puede ser un gen (incluyendo los cambios en ARNm), una proteína o un metabolito; que muestre correlación con las características de la condición observada (Issaq y Veenstra, 2020). Los biomarcadores son empleados como un diagnóstico preciso, herramienta de pronóstico para un estado en particular o para monitorear tratamientos. El hecho de que las proteínas son los agentes celulares activos, reafirma la naturaleza dinámica del proteoma, permitiendo la comprensión de los diferentes perfiles de acumulación relativa en diferentes condiciones como: Control versus enfermedad o tratado versus no tratado; revelando así, potenciales proteínas candidatas a biomarcadores (Oliveira et al., 2013). Los perfiles proteicos pueden diferenciarse en la concentración de proteína, modificaciones co/postraduccionales, localización celular e interacción y actividad; para lograr lo anterior, se requiere una correcta y precisa cuantificación proteómica, así como la estadística pertinente (Wang et al., 2020). Uno de los problemas en la búsqueda de biomarcadores es la no especificidad de la respuesta, sin embargo, la proteómica ayuda a cerciorar la especificidad de cada condición cuando se dispone de un estudio diseñado para diferenciar el estrés de la senescencia, por ejemplo (Bassols et al., 2017). Actualmente no existe propuesta de biomarcadores para la condición de daño mecánico en papaya.

JUSTIFICACIÓN

La papaya es una de las frutas tropicales más importantes, pues es la tercera más consumida del mundo (Valencia Sandoval et al., 2017) y México es tercer lugar en producción a nivel mundial y el primero en exportación (FAO, 2016). En países en vías de desarrollo existen pérdidas en frutas del 30-50% en postcosecha, sin embargo, en papaya se estima hasta un 100%, donde 70% representa pérdidas directa o indirectamente por daño mecánico (Paull et al., 1997; Quintana et al., 1993), lo anterior, como resultado de métodos de cosecha inapropiada y malas prácticas dentro de la cadena de producción (Teixeira et al., 2007). A pesar de que se han implementado métodos para reducir este tipo de daños, la comprensión del comportamiento del daño mecánico en papaya a nivel molecular es muy insípido (Vázquez-García et al., 2003). A nivel de frutos, la expresión génica y la acumulación de proteínas en postcosecha está siendo estudiada utilizando ciencias de frontera, como enfoques proteómicos (Mathabe et al., 2020) debido a que el proteoma es dinámico y estos productos génicos son los que se encuentran directamente involucradas en la respuesta al estrés de las plantas. La proteómica juega un papel esencial en la reducción de pérdidas postcosecha a través de la proposición de biomarcadores proteicos iniciales de calidad y también, marcadores de trastornos negativos; los cuales podrían predecir la vida de anaquel o características sensoriales deseadas y así la ejecución de sistemas como apoyo a la toma de decisiones (Mathabe et al., 2020; Pedreschi, 2017).

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los perfiles de acumulación relativa de proteínas en frutos de *C. papaya* sometidos a compresión axial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar un protocolo de extracción de proteínas totales de exocarpio de *C. papaya* compatible con cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.
- Caracterizar la dinámica del proteoma en exocarpio de *C. papaya* sometidos a compresión axial.
- Definir biomarcadores putativos relacionados con el daño mecánico en frutos de *C. papaya*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

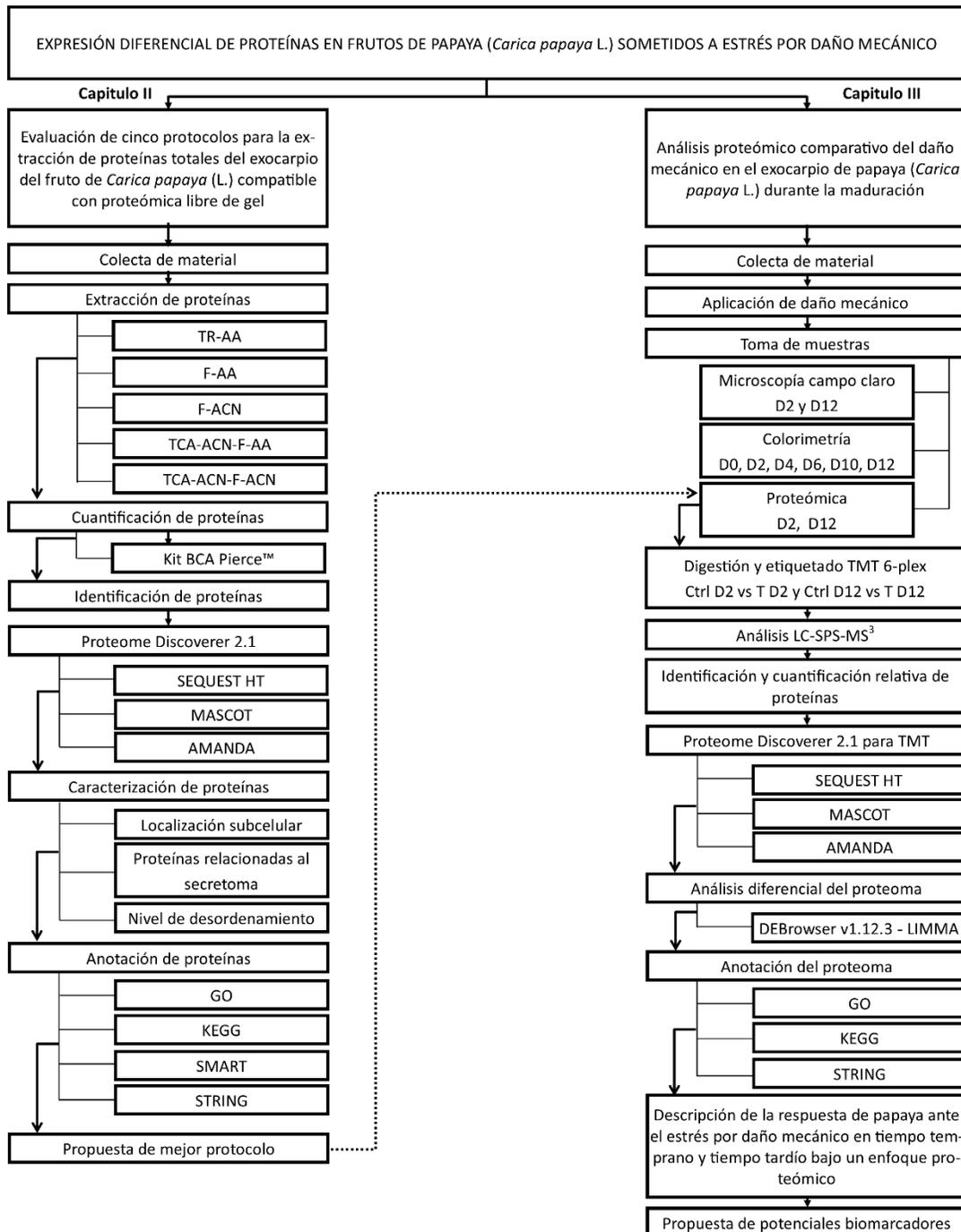


Figura 1.5 Estrategia experimental.

CAPÍTULO II

2 EVALUACIÓN DE CINCO PROTOCOLOS PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DEL EXOCARPIO DEL FRUTO DE *Carica papaya* (L.) COMPATIBLE CON PROTEÓMICA LIBRE DE GEL

2.1 INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es una de las frutas tropicales más importantes, pues es la tercera más consumida del mundo (Valencia Sandoval et al., 2017), México es tercer lugar en producción a nivel mundial y el primero en exportación (FAO, 2018). En países en vías de desarrollo existen pérdidas en frutas del 30-50% en postcosecha, sin embargo, en papaya se estima hasta un 100%, donde 70% representa pérdidas directa o indirectamente debido a daño mecánico (Paull et al., 1997; Quintana et al., 1993). Lo anterior, como resultado de métodos de cosecha inapropiada y malas prácticas dentro de la cadena de producción (Teixeira et al., 2007). A nivel de frutos, la expresión génica y la acumulación de proteínas en postcosecha está siendo estudiada utilizando ciencias de frontera, como enfoques proteómicos (Mathabe et al., 2020). La proteómica es el estudio masivo de proteínas en un organismo, tejido, célula u organelo; incluyendo identificación y cuantificación, en un tiempo específico y bajo condiciones específicas. A lo anterior, se le denomina proteoma (Rey et al., 2019; Tan et al., 2017). A diferencia del genoma que es una estructura “estática” y predispone el genotipo, el proteoma es dinámico, al igual que el epigenoma, transcriptoma y metaboloma; que moldean el fenotipo en respuesta al desarrollo y al ambiente (Kosová et al., 2018; Drabovich et al., 2013). Hoy en día la proteómica se puede realizar por medio de dos enfoques, por medio de gel (electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones, 2D-PAGE; electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones, 2D-DIGE) y libre de gel (Bottom-up, Top-down). La proteómica basada en gel es uno de los métodos más ampliamente utilizados (Chan et al., 2018). El fundamento consiste en separar una mezcla proteica en puntos individuales, en primera dimensión por su punto isoeléctrico (pI) en un gradiente de pH y en una segunda dimensión mediante su peso molecular (MW) (Min et al., 2019) Los geles 2D tienen limitaciones al querer visualizar el proteoma completo de muestras biológicas complejas, ya que se estima su capacidad en un 30 a 50%; especialmente por proteínas con bajas concentraciones o

por no poder separarlas dentro de la matriz debido a sus propiedades fisicoquímicas (p. e. proteínas hidrofóbicas) (Baggerman et al., 2005). Es por esto, que los enfoques con geles 2D han ido cediendo popularidad ante las técnicas masivas libres de gel (p. e. shotgun LC-MS/MS), donde a diferencia de separar las proteínas e identificarlas, las proteínas son escindidas en péptidos usando enzimas proteolíticas y posteriormente, los péptidos son separados y sometidos al análisis de espectrometría de masas (MS) en tándem (MS/MS). Otra de las ventajas es su base sólida de plataformas bioinformáticas con flujos de trabajo sensibles y eficientes, así como la facilidad del análisis masivo del proteoma de manera dirigida a través de métodos libre de etiqueta, por ejemplo: la cuantificación de los iones de los péptidos o el conteo de espectros; y también por medio del uso de etiquetas de masa en tándem (*tándem mass tags*, TMT), etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*; iTRAQ) o etiquetas metabólicas (Min et al., 2019; Misra, 2018). Independientemente del enfoque proteómico seleccionado, la preparación de la muestra, en este caso proteínas (extracción y solubilización), es esencial para maximizar su identificación y cuantificación (Capelo-Martínez, 2019; Jang et al., 2017). Las plantas poseen compuestos que podrían interferir con los análisis proteómicos: polifenoles, polisacáridos, almidón, lípidos y metabolitos secundarios; y en el caso de las frutas, enzimas proteolíticas como proteinasas; así como papaína en el caso de la papaya (Mathabe et al., 2020; Galazzi et al., 2019; Huerta-Ocampo et al., 2012). Los estudios proteómicos en desarrollo y maduración de frutos son escasos (Li et al., 2016, 2017; Pedreschi, 2017); en el caso de papaya, al momento de escribir este documento, existen solo 4 (Jiang et al., 2019; K. Liu et al., 2018; Huerta-Ocampo et al., 2012; Nogueira-CS et al., 2012). De lo anterior, la mitad de las publicaciones utiliza un enfoque libre de gel y la otra mitad utiliza a base de gel, sin embargo, todos utilizan urea, el cual es un desnaturalizante que permite la solubilización de proteínas, pero también carbamilación, que afecta la digestión enzimática, así como el etiquetado (iTRAQ, TMT) (Dapic et al., 2017). Aunado a lo anterior, también modifica los tiempos de retención de proteínas y péptidos en las corridas cromatográficas y reduce la ionización en MS (Alvarez y Naldrett, 2016; Sun et al., 2014). Por ende, el ofrecer alternativas de metodologías para la extracción de proteínas totales en papaya, es de suma importancia para facilitar el flujo de trabajo en este campo, así como la toma de decisiones.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIALES DE LA PLANTA

Los frutos de papaya cv. Maradol fueron elegidas en un mercado de Mérida, Yucatán, México. Los frutos fueron seleccionados de tal forma que tuvieran un tamaño uniforme, estuvieran en etapa de maduración color naranja completa y sin ningún daño físico aparente, se desinfectaron con 100 mg L⁻¹ de hipoclorito de sodio durante 15 min y secados bajo corriente de aire estéril en una campana de flujo laminar. El tejido de exocarpio (~ 0.3 cm) se obtuvo con un pelador comercial según Rivera-Pastrana et al (2010). Las muestras se pulverizaron en nitrógeno líquido utilizando mortero y pistilo. Los exocarpios separados de cuatro frutas enteras se combinaron y se tomó como una unidad, cada unidad se manejó por triplicado para cada método de extracción.

2.2.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

A cinco métodos publicados se les realizaron pequeñas modificaciones y fueron comparados. Los primeros tres métodos incluyen una primera y única extracción con fenol, además de la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) o con acetato de amonio (AA), y los otros dos métodos consisten en dos pasos de extracción, el primero en utilizarse consiste en una mezcla de ácido tricloroacético/acetona (TCA/ACN) y en un segundo paso fenol, intercambiando de igual manera la precipitación con TCA o AA.

2.2.3 TRIZOL® /ACETATO DE AMONIO (TR-AA)

La extracción total de proteínas se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) con ciertas modificaciones. Se utilizó 200 mg del polvo fino obtenido anteriormente y se resuspendieron en 1.5 mL del reactivo. Se siguió el método hasta la etapa de lavado de proteínas. Se utilizó acetato de amonio 0.1 M en MeOH frío como solución de lavado, y en lugar del lavado con etanol 100%, se utilizó acetona fría al 80%, se agitó en vórtex y centrifugó 5 min a 8,000 g y 4°C, seguida de etanol al 70% frío, se agitó con vórtex y centrifugó como se describió antes. Finalmente, la pastilla de proteínas se secó al aire libre (sin permitir que la pastilla se deshidrate) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.2.4 FENOL/ACETATO DE AMONIO (F-AA)

Este método se llevó a cabo según Faurobert y colaboradores (2007) con algunas modificaciones adaptadas para la cáscara de papaya y utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS). Se resuspendieron aproximadamente 0.6 g del polvo de la cáscara en 3 mL de búfer de extracción filtrado (Tris-HCl 500 mM, EDTA 50 mM, sacarosa 700 mM, KCl 100 mM, pH 8, benzamidina 10 mM, y cOmplete™ (Roche)) más 2% de β -mercaptoetanol (2-ME), fenilmetil sulfonil fluoruro 1 mM (PMSF) y SDS al 1% en un tubo Falcon de 15 mL, se agitó con vórtex e incubó con agitación durante 10 min en hielo. Posteriormente, se agregó 3 mL de fenol (Tris-HCl saturado, pH 8) y sonicado durante 10 min a 30°C en un baño ultrasónico modelo 3,800 (Branson, Whetersfield, CT) con una sonicación constante de 40 kHz. Para la separación de las fases acuosa y orgánica, la muestra se centrifugó durante 10 min a 8,000 g a 4°C. La fase fenólica superior se recupera en nuevos tubos, evitando cuidadosamente el contacto o alteración de la interfase; Se añadieron 4 volúmenes de solución de precipitación (acetato de amonio 0.1 M en MeOH frío). El tubo se agita por inversión. La muestra se incubó para causar la precipitación de proteínas durante la noche a -20°C. La proteína total se recuperó por centrifugación durante 5 min a 8,000 g a 4°C. Los sedimentos recuperados se lavaron primero con 3 mL de ACN fría al 80%, seguido de 3 mL de etanol frío al 70%. Después de cada lavado, las fracciones proteicas se recuperaron por centrifugación. Los pellets fueron secados a temperatura ambiente y almacenados a -80°C hasta ser procesados.

2.2.7 FENOL/ACETONA (F-ACN)

Este método se llevó a cabo según Faurobert y colaboradores (2007) con algunas modificaciones adaptadas para la cáscara de papaya y utilizando dodecilsulfato de sodio (SDS) al igual que el anterior: Se resuspendieron aproximadamente 0.6 g del polvo de la cáscara en 3 mL de búfer de extracción filtrado (Tris-HCl 500 mM, EDTA 50 mM, sacarosa 700 mM, KCl 100 mM, pH 8, benzamidina 10 mM, y cOmplete™ (Roche)) más 2% de 2-ME, PMSF 1 mM y SDS al 1% en un tubo Falcon de 15 mL, agitado con vórtex e incubado en agitación en hielo durante 10 min. Posteriormente, se agregan 3 mL de fenol (Tris-HCl saturado, pH 8) y sonicado durante 10 min a 30°C en un baño ultrasónico modelo 3,800 (Branson, Whetersfield, CT) con una sonicación constante de 40 kHz. Para la separación de las fases acuosa y orgánica, la muestra se centrifugó durante 10 min a 8,000 g a 4°C.

La fase fenólica superior se recupera en nuevos tubos, evitando cuidadosamente el contacto o alteración de la interfase; Se añadieron 4 volúmenes de solución de precipitación fría (ACN adicionado con 2-ME 0.07% v/v). El tubo se agitó por inversión. La muestra se incubó para causar la precipitación de proteínas durante toda la noche a -20°C. La proteína total se recuperó por centrifugación durante 5 min a 8,000 g y 4°C. Los sedimentos recuperados se lavaron primero con 3 mL de acetona fría al 80%, seguido de 3 mL de etanol frío al 70%. Después de cada lavado, las fracciones proteicas se recuperaron por centrifugación. Los pellets fueron secados a temperatura ambiente y almacenados a -80°C hasta ser procesados

2.2.5 TCA/ACETONA/FENOL/ACETATO DE AMONIO (TCA-ACN-F-AA)

Se llevó a cabo una modificación del método de TCA/Acetona (Méchin et al., 2007) en combinación con la extracción con fenol. Se resuspendió un total de 0.6 g del polvo en 3 mL recién hecho de 20% TCA (p:v) y 0.07% 2ME (v:v) en ACN frío y se agitó en vórtex como se describió anteriormente. La muestra se almacenó durante toda la noche a -20°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 10 min a 8,000 g a 4°C. El sedimento se resuspendió en 3 mL de búfer de extracción previamente enfriado más 2-ME, PMSF y SDS como se describió anteriormente en el método de extracción F-AA; y se sonicó durante 10 min a 30°C en un baño ultrasónico con una potencia sónica de 40 kHz. Se agregaron 3 mL de fenol (Tris-HCl saturado, pH 8), se agitó en vórtex y se centrifugó durante 10 min a 8,000 g a 4°C. Las proteínas en la capa superior de fenol fueron colectadas, transferidas a un nuevo tubo y se le añadió B-ME 0.07% (v:v) en ACN frío; se mantuvieron durante la noche a -20°C. La muestra se agitó en vórtex y se centrifugó de nuevo como antes; se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla, primero con 3 mL de ACN fría al 80%, seguido de 3 mL de etanol frío al 70% y al final secado a temperatura ambiente. Se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

2.2.6 TCA/ACETONA/FENOL/ACETONA (TCA-ACN-F-ACN)

Se llevó a cabo una modificación del método de TCA/Acetona en combinación con la extracción con fenol, la cual toma tiempo. Se resuspendió un total de 0.6 g del polvo en 3 mL de TCA en acetona y β -mercaptoetanol frío y se agitó en vórtex como se describió anteriormente. La muestra se almacenó durante la noche a -20°C. Posteriormente, la

muestra se centrifugó durante 10 min a 8,000 g a 4°C. El sedimento se resuspendió en 3 mL de búfer de extracción previamente enfriado más 2-ME, PMSF y SDS como se describió anteriormente en el método de extracción F-AA y se sonicó durante 10 min a 30°C en un baño ultrasónico con una potencia sónica de 40 kHz. Se agregaron 3 mL de fenol (Tris-HCl saturado, pH 8), se agitó en vórtex y se centrifugó durante 10 min a 8,000 g a 4°C. Las proteínas en la capa superior de fenol fueron colectadas, transferidas a un nuevo tubo y se le añadió acetato de amonio al 0.1 M en MeOH frío y se mantuvieron durante la noche a -20°C. La muestra se agitó en vórtex y se centrifugó de nuevo como antes; se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla, primero con 3 mL de acetona fría al 80%, seguido de 3 mL de etanol frío al 70% y al final secado a temperatura ambiente. Se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

2.2.7 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico utilizando el kit de proteínas BCA Pierce™ de Thermo Scientific (No. Cat. 23225, Pierce; Rockford IL). Se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) una curva de calibración con concentraciones 0, 1.8, 3, 6 y 9 µg/µL aforando con agua a 15 µL. De los extractos de proteínas se realizó una dilución 1:1 (5 µL de muestra y 5 µL de agua), de esta dilución se hicieron 3 alícuotas de 1.2, 2.4 y 3.6 µL las cuales se aforaron a 15 µL con agua MiliQ, una vez lista la placa de microelisa, se agregó a cada uno 300 µL de la mezcla de los reactivos A y B con los que cuenta el kit, en una proporción 50:1 respectivamente, posterior a esto se incubó a 37°C durante 30 min, transcurrido el tiempo de incubación se tomó cada muestra y se colocó en una placa con celdas, se llevó a cabo la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Los datos obtenidos se graficaron en Excel, con los datos de la curva de calibración se obtuvo la ecuación de la recta ($y=mx+b$), las absorbancias pertenecientes a las muestras se interpolaron en la recta, los resultados reflejaron las concentraciones de proteína de cada muestra en µg/µL.

2.2.8 ELECTROFORESIS

2.2.9 SDS / PAGE

La calidad de las proteínas totales extraídas de la cáscara de papaya obtenida de los cuatro métodos se evaluó mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (1D SDS-PAGE) en una tetra cell Mini-Protean® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Las muestras de proteínas se reconstituyeron a una concentración de 105 µg/µL por muestra más 6 µL de búfer reductor de SDS que contenía Tris-HCl 0.5 mM, pH 6.8, SDS al 10% (p/v), glicerol al 26% y azul de bromofenol al 0.5% (p/v) y calentado a 95°C durante 5 min. Posteriormente, las proteínas se cargaron en los pocillos de gel. La electroforesis se realizó a 200 V a través del gel de apilamiento (7%) y a 120 V a través del gel de resolución (12%) hasta que el frente de corrida del azul de bromofenol alcanzó 0.5 cm del fondo del gel. El gel se fijó con 100 mL de una solución compuesta de 50% MeOH y 7% de ácido acético (v/v) durante 30 min repitiendo el proceso por duplicado y se tiñó con 60 mL de SYPRO Ruby® durante toda la noche, transcurrido el tiempo se lavó con una solución de 10% (v/v) MeOH y 7% (v/v) ácido acético durante 30 min, el gel fue observado en el quipo Imager® Gel Doc™ XR System (modelo 1708195EDU, Bio-Rad®) apoyado del software Image Lab™

2.2.10 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2.2.11 REDUCCIÓN

De acuerdo con la cuantificación, se contempló 100 µg de proteínas llevando a un volumen final de 100 µL con agua en un tubo microcentrífuga, se agregó Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) a una concentración final de 10 mM. Las muestras se incubaron a 60°C durante 45 min.

2.2.12 ALQUILACIÓN

Transcurrido el tiempo se adicionó Iodoacetamida (IAM) a una concentración final de 30 mM, la mezcla se incubó por una hora a temperatura ambiente en obscuridad, después del tiempo establecido se agregó ditiotreitól (DTT) a una concentración final de 30 mM durante

10 min y se dejó reposar a temperatura ambiente, en seguida se adicionó 1 mL de ACN fría a cada tubo, dejando precipitar a -20°C durante toda la noche. Después de la precipitación (12 h aproximadamente) los tubos se centrifugaron a $10,000\text{ g}$ a 4°C durante 15 min, el sobrenadante fue decantado y los tubos se colocaron en una campana de extracción para secar el contenido, una vez seco, la pastilla se resuspendió con $150\ \mu\text{L}$ de bicarbonato de amonio 50 mM que contiene 0.1% de SDS, se sonicaron los tubos respectivos durante 15 min. Se realizó una segunda cuantificación para autenticar la cantidad de proteína que se colocó para ser digerida con la enzima seleccionada.

2.2.13 DIGESTIÓN CON TRIPSINA

La digestión con tripsina se llevó a cabo colocando en tubos de microcentrífuga $100\ \mu\text{g}$ de cada muestra de interés previamente reducida y alquilada, cada muestra se aforó a $100\ \mu\text{L}$ con agua MiliQ, se adicionó la enzima tripsina (No. Cat. V5280, Trypsin Gold, Promega, Madison WI) a cada tubo en una proporción 1:30 (tripsina/proteína) por 16 h a 37°C . Posteriormente se volvió a agregar tripsina fresca en una proporción 1:60 (tripsina/proteína) incubando 4 h a 37°C .

2.2.14 FRACCIONAMIENTO DE LA MUESTRA EN COLUMNAS C18-FASE REVERSA

Una vez terminada la digestión con la enzima, los péptidos resultantes fueron llevados a sequedad mediante la ayuda de un concentrador CentriVap (LABCONCO®) y enseguida fueron reconstituidas con 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) $0.1\text{-}0.5\%$, se corroboró que el pH fuera < 3 ajustando con ácido fórmico. Los cartuchos C18 (No. Cat. 60108-421, Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA) se acondicionaron con 2 mL de la solución de equilibrio/carga (0.1% TFA en agua v/v). La muestra se cargó haciéndose pasar lentamente a través del cartucho, a continuación, se adicionó nuevamente 1 mL de solución de equilibrio/carga. Se realizó un desalado del cartucho haciendo pasar 1 mL de la solución para desalar (MeOH 5% /agua con TFA 0.1% v/v/v). La elución del contenido de los cartuchos se realizó haciendo pasar 1 mL de la solución para eluir (50% ACN/agua con TFA 0.1% v/v/v). Se colectaron las eluciones para ser concentradas en el equipo CentriVap (LABCONCO®). Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.2.15 ANÁLISIS NANO LC MS/MS

Las muestras fueron procesadas utilizando un sistema nano UltiMate 3000 RSLC (Dionex, Sunnyvale, CA) acoplado a un espectrómetro de masa Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo-Fisher Scientific, San José, CA) conteniendo una fuente de ionización EASY espray. Cada muestra fue reconstituida con 5 μ L de una solución de 0.1% ácido fórmico e inyectada a una precolumna C18 trap (3 μ m, 75 μ m X 2 cm, Dionex) utilizando un flujo de 3 μ L min⁻¹ y posteriormente separada en una columna nano EASY espray RSLC (2 μ m, 75 μ m x 25 cm) utilizando un flujo de 300 nL min⁻¹ durante 100 min. Se utilizaron 0.1 % ácido fórmico como solvente A y 0.1 % ácido fórmico en 90% acetonitrilo como solvente B. El gradiente de elución se estableció como es indicado a continuación: Solvente A por 10 min, solvente B 7-20% en 25 min, solvente B 20% por 15 min, solvente B 20-25% por 15 min, solvente B 25-95% por 20 min, y solvente A por 8 min. El espectrómetro de masa se operó en modo positivo y el nanospray se utilizó con un voltaje de 3.5 kV y la temperatura de la fuente de ionización se programó a 280°C. Los calibradores externos utilizados fueron la cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621.

2.2.16 ANÁLISIS MS/MS DIRIGIDO MEDIANTE ÁRBOL DE DECISIONES (ETD, CID Y HCD)

El espectrómetro de masa se operó en modo de dato-dependiente y programado automáticamente para cambiar entre el análisis MS y MS/MS. El barrido completo de espectros de masa (MS) fue adquirido con el analizador Orbitrap, el rango de barrido de masa fue de 350-1500 m/z a una resolución de 120,000 (FWHM), utilizando un control automático de obtención de 4.0 e5 iones, tiempo de inyección máximo de 50 ms, exclusión dinámica de 1 a 60 s y tolerancia de masa de 10 ppm. Posteriormente una velocidad de 3 s para la velocidad de barrido para el análisis dirigido por árbol de decisiones que consiste en la disociación por transferencia de electrones (por siglas en inglés “ETD”), disociación inducida por colisión (por sus siglas en inglés “CID”) y disociación por colisión con alta energía (por sus siglas en inglés “HCD”), utilizando el analizador Orbitrap (Swaney et al., 2008; Frese et al., 2011). El umbral de señal para inducir un evento MS/MS fue de 1.0e4 y la colisión de energía normalizada de 10, 30 y 30 % para ETD, CID y HCD, respectivamente. Para las fragmentaciones se programó un control automático de obtención de 3.0e4 iones y una ventana de aislamiento de 1.6 m/z. Adicionalmente, los parámetros de ETD primera

masa como 120 m/z y un tiempo de inyección de 100 ms, CID comprendió un Q de 0.25 ms y un tiempo de inyección de 50 ms, para HCD se estableció la primera masa como 100 m/z y un tiempo de inyección de 50 ms. La programación para en análisis dirigido por árbol de decisiones se llevó a cabo como es descrito a continuación: Para CID los estados de carga de fragmentación 2 o 3 con un rango de barrido de 620-1,600 m/z, estado de carga de fragmentación 4 con un rango de barrido de 800-1600 m/z y estado de carga 5 con un rango de barrido de 900-1,600 m/z; para HCD los estados de carga de fragmentación 2 o 3 con un rango de barrido de 600-1600 m/z y para ETD estado de carga de fragmentación 2 con un rango de barrido de 300-620 m/z, estado de carga de fragmentación 4 con un rango de barrido de 300-800 m/z y estado de carga 5 con un rango de barrido de 300-900 m/z. Todos los datos se adquirieron con el programa Xcalibur 4.0.27.10 (Thermo-Fisher Scientific).

2.2.17 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los espectros obtenidos fueron procesados con el programa de cómputo Proteome Discoverer 2.1 (PD, Thermo Fisher Scientific Inc.) acoplado con los motores de búsqueda SEQUEST HT (Eng et al., 1994), MASCOT (Matrix Science) y AMANDA (Dorfer et al., 2014). Los parámetros de búsqueda incluyeron: especificidad proteolítica con tripsina, dos cortes perdidos permitidos, modificaciones estáticas comprendiendo carbamidometilación de cisteína (+57.021 Da). Además, las modificaciones dinámicas incluyeron oxidación de metionina (+15.995 Da) y desaminación en residuos de asparagina y glutamina (+0.984 Da).

2.2.18 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La herramienta DeepLoc-1.0 (Almagro Armenteros et al., 2017) fue empleada para predecir la localización subcelular de las proteínas identificadas para cada método de extracción y para predecir a partir de su configuración primaria si las proteínas eran solubles o de membrana; la herramienta se utilizó bajo los parámetros de la matriz BLOSUM62. Para predecir las proteínas relacionadas al secretoma de papaya se utilizó el servidor SignalP-5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019) el cual predice la presencia de péptidos señal. En el caso del desordenoma, se utilizó la herramienta ESpritz 1.3 (Walsh et al., 2012) el cual predice el nivel de desorden de las proteínas a partir de redes neuronales, y además

clasifica los aminoácidos en tres categorías: con carga, sin carga e hidrofóbicos; a los cuales también asigna el nivel de desorden que pudiesen presentar. La herramienta se utilizó con una confianza del 95%.

2.2.19 ANOTACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó la herramienta bioinformática NetGO 2.0 (You et al., 2019) para asignar los números de ontologías génicas (GOs) a las proteínas extraídas siguiendo las recomendaciones de los autores. Posteriormente se utilizó la herramienta bioinformática Cytoscape (Shannon et al., 2003) como interfaz de la herramienta STRING (Szklarczyk et al., 2019) para analizar las interacciones proteína-proteína (PPI) con la más alta coincidencia (*highest confidence*: 0.900), el enriquecimiento de las rutas metabólicas de la enciclopedia Kyoto de genes y genomas (KEGG) (Kanehisa y Goto, 2000); y el enriquecimiento de dominios proteicos a través de la base de datos SMART (Letunic et al., 2015) con respecto al proteoma de papaya de STRING.

2.3 RESULTADOS

Los cinco métodos utilizados lograron extraer proteínas totales del exocarpio de frutos de *C. papaya* para su posterior análisis. Cada método extrajo una cantidad diferente de proteínas a partir del material de inicio. El rendimiento está calculado en microgramos por microlitro ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) como lo demuestra la Tabla 2.1, en donde se observa la cantidad de proteína cuantificada por cada método de extracción. A mayor cantidad, mayor rendimiento. El método F-ACN logró obtener el mayor rendimiento con $1.73 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, mientras que el peor rendimiento se obtuvo con TCA-ACN-F-AA al obtener $0.013 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Estadísticamente se encuentra una diferencia significativa entre estos tratamientos (Figura 2.1).

Tabla 2.1 Promedio y desviación estándar (\pm SD) de la cuantificación de proteínas en cada método de extracción

Tratamiento	F-ACN	TR-AA	F-AA	TCA-ACN-F-ACN	TCA-ACN-F-AA
Rendimiento $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (promedio \pm SD)	1.73 ± 0.208	1.23 ± 0.058	1.1 ± 0.1	0.083 ± 0.012	0.013 ± 0.006

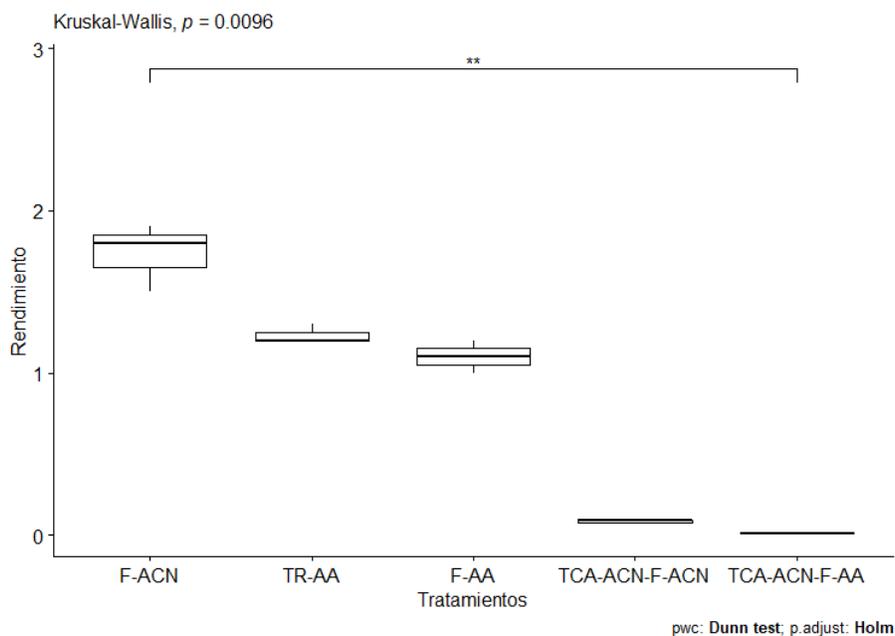


Figura 2.1 Comparación estadística de los rendimientos obtenidos entre los métodos de extracción a través de la prueba de Kruskal-Wallis. Se encontró diferencia significativa entre los tratamientos F-ACN y TCA-ACN-F-AA ($p < 0.05$).

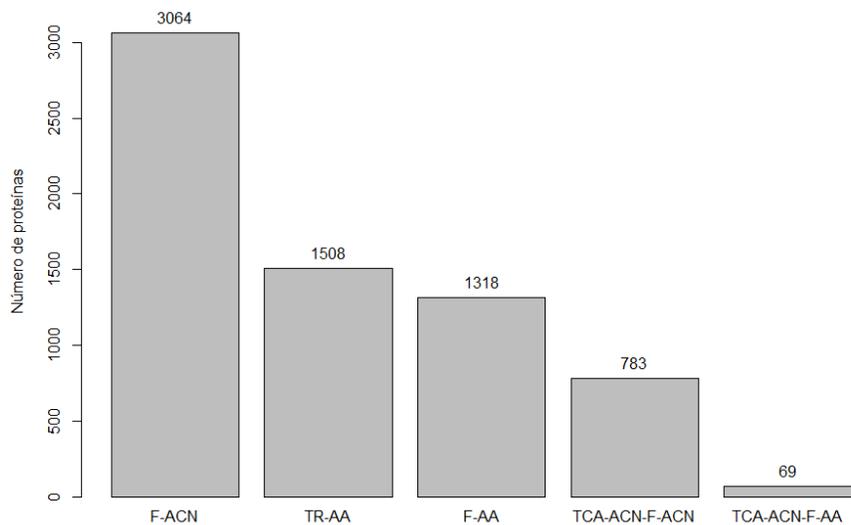


Figura 2.2 Gráfica de barras mostrando la cantidad de proteínas identificadas en cada método de extracción.

Por otra parte, en la figura 2.2 se puede observar la cantidad de proteínas identificadas para cada método después de haber combinado las repeticiones biológicas. Por lo cual, en total se identificaron 3,510 proteínas (Anexo 1). Cabe aclarar, que el tratamiento que más proteínas extrajo fue F-ACN con 3,064 y el que menor número extrajo fue TCA-ACN-F-AA con 69. Se pudo observar que entre los tratamientos 51 proteínas se compartieron; siendo el que obtuvo mayor número de proteínas únicas el método F-ACN con 1,517 y el menor fue TCA-ACN-F-AA con 3 (Figura 2.3).

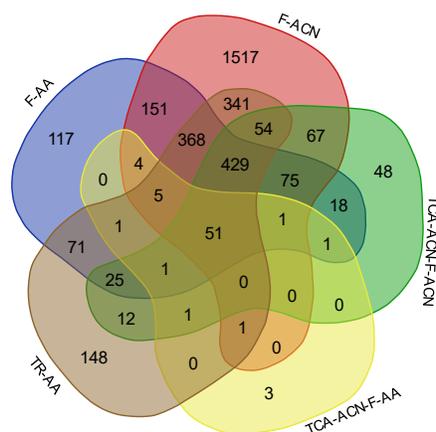


Figura 2.3 Diagrama de Venn que ilustra las proteínas compartidas entre los métodos de extracción.

Con la herramienta DeepLoc 1.0 se predijo la localización subcelular de las proteínas extraídas de cada método. Todos los tratamientos coincidieron en que la mayor parte de las proteínas son solubles y se encuentran en el citoplasma. En cambio, por las cantidades de proteínas predichas, el lugar con menor predicción de proteínas para F-AA fue lisosoma/vacuola, para F-AA, TR-AA y TCA-ACN-F-ACN fue el aparato de Golgi. Para TCA-ACN-F-AA fue el aparato de Golgi y el núcleo (Figura 2.4).

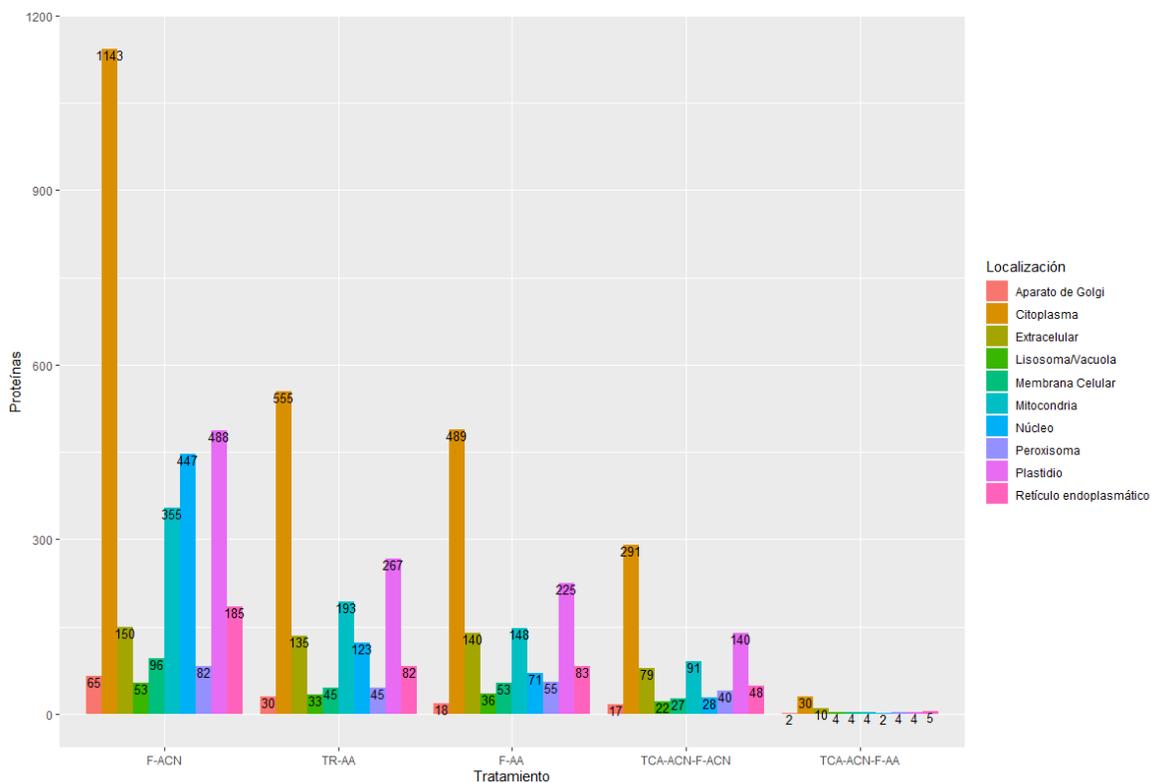


Figura 2.4 Gráfica de barras que ilustra el número de proteínas en cada localización subcelular predicha con la herramienta DeepLoc 1.0

La herramienta NetGo 2.0 logró predecir las ontologías génicas (GO) para la mayoría de las proteínas de cada método de extracción; el método en el que más números GO se identificaron fue en F-ACN con 934 repartidos en las tres ontologías y el que menor números GO identificó fue TCA-ACN-F-AA con 88 repartidos en las tres ontologías. En todos los métodos de extracción la ontología MF fue la más diversa con mayores números GO obtenidos, a excepción del método TCA-ACN-F-AA dónde la ontología BP obtuvo más números GO que MF (Figura 2.5E).

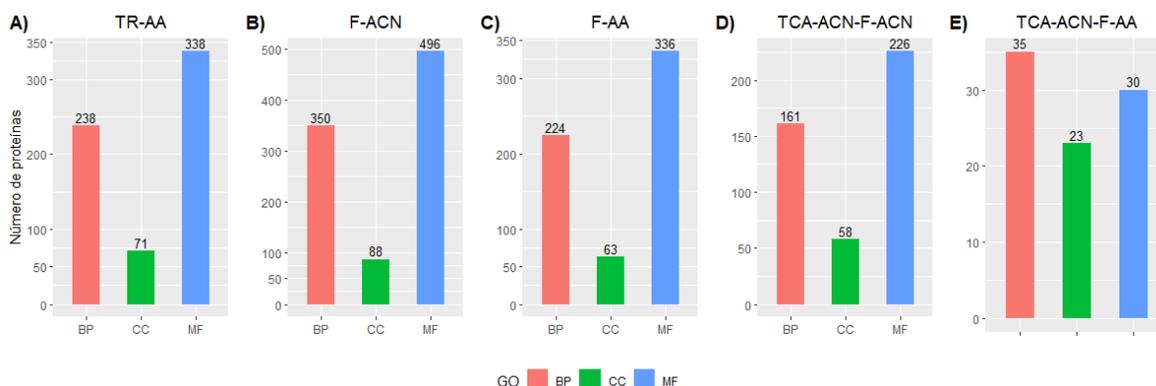


Figura 2.5 Número de proteínas a las que fue asignada cada ontología (GO) dentro de cada método de extracción. A) TR-AA, B) F-ACN, C) F-AA, D) TCA-ACN-F-ACN y E) TCA-ACN-F-AA

A través de las herramientas Cytoscape se analizaron las proteínas presentes en cada método de extracción para enriquecer las rutas metabólicas KEGG, así como los dominios de las proteínas recuperados de la base de datos SMART; ambos a través de la plataforma STRING con respecto al proteoma de papaya (Anexo 2). El método con más rutas metabólicas KEGG enriquecidas fue F-AA con 79, mientras que TCA-ACN-F-AA fue el que menor obtuvo con 24. Todas las rutas metabólicas fueron comparadas mediante un diagrama de Venn. En total se registraron 93 rutas KEGG de las cuales todas comparten 23. TCA-ACN-F-AA no tiene rutas metabólicas propias. En contraste, F-AA reportó 5, TCA-ACN-F-ACN y F-AA 4 rutas metabólicas propias para cada uno, y TR-AA solo 2 (Figura 2.6A). El enriquecimiento de los dominios SMART arrojó 43 dominios enriquecidos de los cuales únicamente 2 son compartidos entre todos los métodos de extracción; F-ACN fue quien más dominios enriquecidos propios obtuvo con 10 y los menores fueron TCA-ACN-F-ACN y TCA-ACN-F-AA con un solo dominio cada uno (Figura 2.6B). Utilizando la herramienta SignalP 5.0 se predijo las proteínas que contaban con péptidos señal y posiblemente estuvieran relacionados con el secretoma de la papaya. El método con mayor número de proteínas con péptidos señal fue F-ACN con 247 y el menor fue TCA-ACN-F-AA con 17 (Figura 2.7).

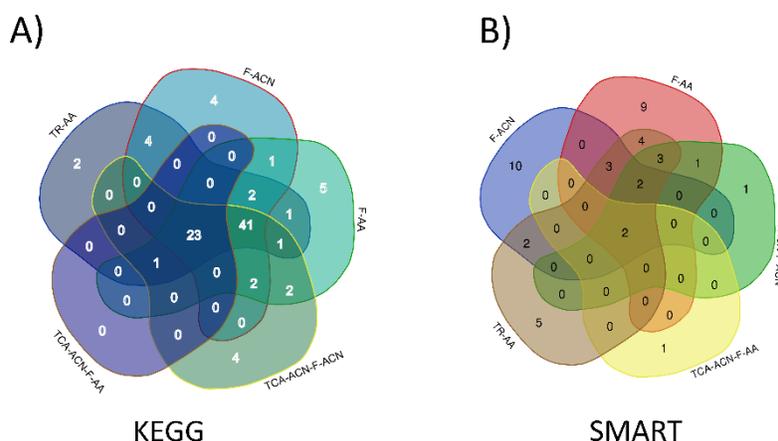


Figura 2.6 Diagrama de Venn que demuestra en **A)** el número de rutas metabólicas que comparten entre tratamientos; y en **B)** el número de dominios de la base SMART que comparten entre ellos los tratamientos.

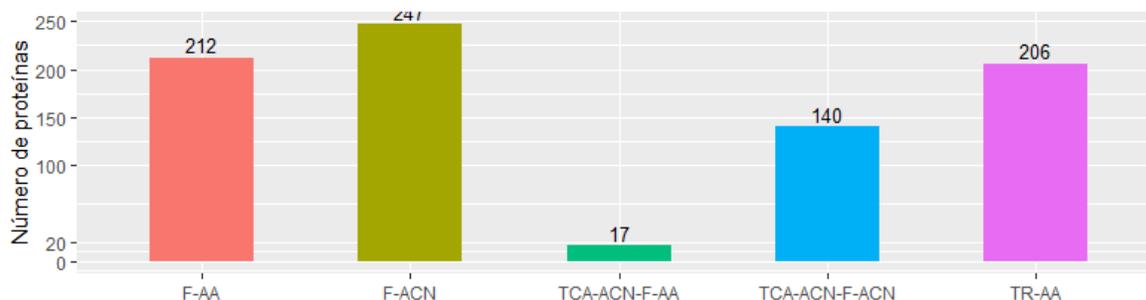


Figura 2.7 Gráfica de barras que ilustra la cantidad de proteínas con péptidos señal, predicha por el programa SignalP 5.0.

Para dar luz al desordenoma, por medio de la herramienta EZpritz 1.3 se predijo el nivel de desordenamiento de las proteínas extraídas (Anexo 2). Del total de proteínas identificadas por el método F-ACN, 8,513 segmentos fueron predichos desordenados, dando un desorden total de 14.88%; para el método F-AA, 3,052 segmentos desordenados, por ende 8.36% de desorden; TR-AA obtuvo 3,603 segmentos desordenados predicho, dando un 11.51% de desorden; TCA-ACN-F-AA obtuvo una predicción de 139 segmentos desordenados, siendo un 5.97% de desorden; y TCA-ACN-F-ACN obtuvo una predicción de 1803 segmentos desordenados, resultando en un 7.62% de desorden con respecto al total de proteínas identificadas (Tabla 2.2). Todos los tratamientos coincidieron que el mayor porcentaje de aminoácidos de las proteínas identificadas pertenecían a la categoría

hidrofóbicos y el menor porcentaje a los aminoácidos con carga. Por lo cual, EZpritz 1.3 clasificó los aminoácidos en tres categorías: con carga (DEKRH), sin carga (GSTNQYC) e hidrofóbicos (LMIVWPAF).

Tabla 2.2 Predicciones del desordenamiento de cada set de proteínas extraídas con los métodos de extracción de acuerdo con el programa EZpritz 1.3. Se resalta la columna del porcentaje de desordenamiento.

	AMINOÁCIDOS TOTALES	PROTEÍNAS TOTALES	PORCENTAJE DE DESORDEN (TOTAL)	PORCENTAJE DE AMINOÁCIDOS CARGADOS (DEKRH)	PORCENTAJE DE AMINOÁCIDOS CARGADOS DESORDENADOS	PORCENTAJE DE AMINOÁCIDOS NO-CARGADOS (GSTNQYC)	PORCENTAJE DE AMINOÁCIDOS NO-CARGADOS DESORDENADOS	PORCENTAJE DE AMINOÁCIDOS HIDROFÓBICOS (LMIVWPAF)	PORCENTAJE DE AMINOÁCIDOS HIDROFÓBICOS DESORDENADOS
F-ACN	1281513	3064	14.88	26.64	16.96	31.86	17.56	41.44	11.49
TR-AA	526704	1508	11.51	25.66	13.11	32.37	12.93	41.91	9.43
F-AA	533297	1318	8.36	24.96	9.25	32.33	9.47	42.65	7
TCA-ACN-F-ACN	323798	783	7.62	24.82	8.3	32.63	8.5	42.48	6.53
TCA-ACN-F-AA	27324	69	5.97	24.26	6.46	32.52	6.72	43.19	5.13

2.4 DISCUSIÓN

La extracción de proteínas es el primer paso en los estudios proteómicos, por lo tanto, la preparación de la muestra biológica requiere de la solubilización del mayor número de proteínas posibles, así como la eliminación de aquellos compuestos que podrían generar interferencias en los pasos siguientes (Galazzi et al., 2019; Mirzaei y Carrasco, 2016). Existen pocos trabajos proteómicos en frutos y cada laboratorio ha adaptado protocolos de acuerdo con sus necesidades para cumplir con sus objetivos, sin embargo, en papaya hasta la fecha solo existen 4 trabajos (Jiang et al., 2019; K. Liu et al., 2018; Huerta-Ocampo et al., 2012; Nogueira-CS et al., 2012). La mitad de los trabajos anteriores utilizaron un enfoque libre de gel y la otra mitad más antigua utilizaron el enfoque a base de gel. No obstante, todos estos requirieron de urea, el cual es laboriosa de preparar y es un desnaturizante que, aunque permite la solubilización de proteínas, también la carbamilación, que afecta la digestión enzimática, así como el posterior etiquetado (iTRAQ, MTM) (Dapic et al., 2017). Jian et al., (2019) lograron extraer 3,220 proteínas sin utilizar la extracción Fenol o TCA/ACN, simplemente un búfer de lisis (8 M urea, 2 mM EDTA, 10 mM DTT y 1% Protease Inhibitor Cocktail) y precipitación con 15% ACN frío; nuestro método F-ACN, logró identificar 3,064; aunque con más pasos, el tiempo en cuestión de la precipitación de las proteínas en ambos métodos es el mismo. Los cinco métodos de este trabajo utilizan de alguna forma el fenol como recurso para solubilizar y hacer disponibles las proteínas, al mismo tiempo que disuelve compuestos que pudieran interferir en el proceso de extracción y cuantificación (Faurobert et al., 2007). A diferencia de los métodos con el primer paso de fenol, los métodos que emplean en un primer paso TCA/ACN/2ME pretenden desnaturizar y precipitar las proteínas mientras previene la oxidación fenólica, para posteriormente ser solubilizadas nuevamente (Méchin et al., 2007). Una vez disponibles las proteínas en los cinco métodos, deben ser precipitadas por medio de la adición de sales o disolventes orgánicos miscibles en agua como lo es la combinación 2ME/ACN y AA/MeOH (Faurobert et al., 2007). Independientemente de las sustancias utilizadas para precipitar, los métodos con un solo paso de extracción con fenol fueron los que más proteínas identificadas lograron. F-ACN obtuvo la mayor cantidad, seguido por TR-AA y después, F-AA. Está bien documentado en proteómica de plantas que la extracción con fenol es la de mejor resultado para enfoques base gel o libre de gel, debido a que causa la separación de polisacáridos y mucopolisacáridos, ácidos nucleicos, sales y demás compuestos solubles en la base

acuosa, mientras las proteínas permanecen en la fase fenólica (Lledías et al., 2017; Al-Obaidi et al., 2016; X. Wu et al., 2014). Los métodos basados en extracción por TCA/ACN obtuvieron la menor cantidad de proteínas identificadas, aun cuando existió una segunda extracción con fenol, debido a la posible pérdida por la cantidad superior de pasos que conlleva estos métodos de extracción (X. Wu et al., 2014). La extracción por precipitación con TCA/ACN permite la solubilización en acetona de compuestos que podrían intervenir en la cadena de extracción de proteínas, como pigmentos, compuestos fenólicos, lípidos y ácidos nucleicos; removiéndolos en la fase posterior de centrifugación. Además, la adición de 2ME a la solución de TCA/ACN inhibe la formación de nuevos enlaces disulfuro (Alvarez y Naldrett, 2016). No obstante, a pesar que este método enfrenta algunos contratiempos: la pastilla generada por precipitación es difícil de disolver; es posible que precipite ácidos nucleicos mayor a 20 nucleótidos; y además, pueda el TCA hidrolizar proteínas (Galazzi et al., 2019). Otro posible inconveniente, de la extracción con TCA/ACN se pudo haber presentado debido a que la cascara de papaya contiene polisacáridos complejos, que, debido a su alto peso molecular, su solubilidad en mezclas orgánicas/acuosas es limitada a bajas temperaturas y precipitan junto a las proteínas (Lledías et al., 2017). Estadísticamente, solo se encontró diferencia significativa en el rendimiento entre los métodos F-ACN y TCA-ACN-F-AA (el que mayor proteína obtuvo contra el que menor proteínas obtuvo), por lo tanto, la caracterización de las proteínas identificadas suma valor a la hora de elegir un método de extracción con enfoques dirigidos en papaya. La predicción de la herramienta DeepLoc 1.0 predice que la mayoría de las proteínas obtenidas son solubles y no de membrana, lo cual concuerda con la difícil extracción de este tipo de proteínas por métodos convencionales. Para una mayor obtención de proteínas de membrana se requiere detergentes y/o caotrópicos en concentraciones agresivas para la espectrometría de masas (Saravanan y Rose, 2004). Todas las proteínas identificadas de todos los métodos lograron al menos un mínimo de dos proteínas predichas en alguna ubicación subcelular, dando la oportunidad de explorar ampliamente el proteoma del tejido independientemente del método. La ubicación subcelular con más proteínas predichas en todos los métodos de extracción fue el citoplasma, precedido por proteínas contenidas en los plastidios, por lo cual, en el caso de papaya, provee la oportunidad de analizar la transición en la pigmentación del fruto. La ontología génica es la estandarización de la categorización de las funciones de un producto génico, en este caso, las proteínas extraídas con los diferentes métodos (W. Liu

et al., 2018). En el caso de la ontología de proceso biológico (BP), se destacan las categorías: respuesta a estímulo abiótico, respuesta a químico, respuesta a estímulo externo, respuesta a hongo, respuesta a calor, respuesta a estímulo, respuesta a estrés y respuesta a estímulo de temperatura (GO:0009628, GO:0042221, GO:0009605, GO:0009620, GO:0009408, GO:0050896, GO:0006950 y GO:0009266, respectivamente); que comparten todos los métodos, siendo capaces de monitorear los cambios fisiológicos de la papaya como fruto climatérico durante la maduración (Jiang et al., 2019), tal como estudios en manzana (Ma et al., 2019); y también la respuesta a estreses como los trabajos de manzana en daño mecánico (Buron-Moles et al., 2014) y tratamientos salinos en tomate (Tang et al., 2020). Por otro lado, los procesos biológicos únicos de cada tratamiento dan la oportunidad de perfilarlos para un propósito en específico, por ejemplo, F-ACN logró obtener “proceso metabólico de ARNm” y “procesamiento de ARN” (GO:0016071 y GO:0006396) los cuales estarían dirigidos a la expresión génica por medio del proceso de transcripción del ADN. Las proteínas completa o parcialmente desordenadas están involucradas en procesos celulares claves que subyacen en complejas redes de interacción proteína-proteína (PPI), por ejemplo, chaperonas encontradas en procesos relacionado a estreses en plantas (Pazos et al., 2013; Kovacs et al., 2008). Todos los métodos lograron extraer proteínas con predicción de desordenamiento, F-ACN consiguió el porcentaje de desordenamiento más alto con respecto a sus proteínas extraídas con un 14.88% que se traduce en 8,513 segmentos desordenados. Para nuestro conocimiento, no existen trabajos enfocados al estudio masivo de proteínas desordenadas en frutos. El enriquecimiento de los mapas en las rutas metabólicas de la enciclopedia Kyoto de genes y genomas (KEGG) por parte de todos los métodos, fundamenta su capacidad para ser utilizados como parte de estrategias orientadas al entendimiento de las interacciones moleculares en papaya. A pesar de que todos los métodos comparten 23 mapas enriquecidos de rutas KEGG, los métodos que no utilizaron TCA/ACN en un primer paso, lograron obtener enriquecido el mapa “ruta de supervisión de ARNm” (cpap03015) el cual concuerda con lo obtenido mediante la ontología BP; y “metabolismo de vitamina B6” (cpap00750), esta última muy importante en el caso de papaya debido a que el piridoxal fosfato (forma activa de la Vitamina B6) es un cofactor en reacciones de transaminación, descarboxilación y desaminación para, por ejemplo, la formación de ACC por la ACC sintasa; dentro de la ruta del etileno en los frutos climatéricos (Vincente et al., 2014). El secretoma se refiere al estudio global de las proteínas que son secretadas por las células, a través de las rutas

secretoras (Mirzaei y Carrasco, 2016). Este tipo de proteínas cumplen un rol muy importante en la comunicación, respuesta a estrés y el desarrollo de las plantas; en el caso de las frutas carnosas como la papaya y el tomate, tienen especial importancia debido a la relación en las características químicas y mecánicas de la pared celular y, por ende, la textura de la fruta. Sin embargo, el mecanismo que permite a las plantas cambiar sus perfiles de proteínas secretadas sigue estando incompleto (Nakano et al., 2020; Sant'Ana y Lefsrud, 2018). Aunque todos los métodos lograron predecir proteínas con péptidos señal, es importante mencionar que, en relación con el total de proteínas extraídas, TR-AA es un fuerte candidato para sentar las bases del estudio cuantitativo del secretoma de papaya.

2.5 CONCLUSIÓN

Por primera vez se compararon diferentes métodos de extracción de proteínas totales de papaya compatible con proteómica libre de gel por medio del análisis y caracterización de las proteínas extraídas, logrando ser un punto de referencia para los laboratorios que deseen ahondar la investigación masiva de proteínas en papaya u otros frutos similares con un enfoque dirigido. A pesar de que todos los métodos comparten características en cuanto a procedimiento de extracción y materiales, la diferencia radica en el tipo de proteínas únicas extraídas por cada uno de ellos, permitiendo hacer adecuaciones para el enriquecimiento de proteínas con características o comportamiento de interés particular. Los trabajos proteómicos de papaya son muy escasos, principalmente por las complicaciones que representa el fruto, propio de su naturaleza y los retos que conlleva el flujo de trabajo desde la obtención de las proteínas, hasta el análisis de estas. Sin embargo, con la información aquí presentada, se espera que sea más fácil la estandarización de los protocolos para cada uno de los laboratorios.

CAPÍTULO III

3 ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO DEL DAÑO MECÁNICO EN EL EXOCARPIO DE PAPAYA (*Carica papaya* L.) DURANTE LA MADURACIÓN.

3.1 INTRODUCCIÓN

Carica papaya o simplemente papaya, es un fruto tropical de importancia económica relevante en México y en el mundo debido a que es rica en vitaminas A, C, potasio, calcio y fibra (Krishna et al., 2008). Así mismo, nuestro país es el tercer lugar en producción y el primer lugar en exportación (FAOSTAT, 2018). Sin embargo, desde finales del siglo pasado se han reportado los daños que sufre la papaya durante la cadena de producción, principalmente en la parte postcosecha (Paull et al., 1997; Quintana et al., 1993; Altisent, 1991). En países en vías de desarrollo existen pérdidas en frutas del 30-50% en postcosecha, sin embargo, en papaya se estima hasta un 100%, donde 70% representa pérdidas directa o indirectamente por daño mecánico (Paull et al., 1997; Quintana et al., 1993). El estrés por daño mecánico se refiere a la deformación plástica, rotura superficial y/o daño de tejido causado por varios factores que provocan diferentes reacciones fisiológicas. Lo anterior, como producto del cambio o reorganización metabólica de la planta (de Godoy et al., 2010). El estrés por daño mecánico puede ser clasificado en: impacto, compresión, abrasión y punción (Li y Thomas, 2014). Hoy en día se cuentan con herramientas de análisis masivo (ómicas), como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. La implementación de la proteómica como complemento a la genómica y transcriptómica en el campo de la biología de las frutas, ha acelerado el entendimiento del desarrollo y maduración. El análisis proteómico diferencial entre estados de madurez han dado luz a diferentes procesos moleculares que ocurren durante la maduración y proveen una representación dinámica del desarrollo frutal (Claudius y Ludivine, 2017; Palma et al., 2011). A pesar de que el desarrollo y maduración de las frutas son procesos complejos y únicos para cada especie; en las frutas climatéricas, el aumento en la respiración y el estallido de la fitohormona etileno, se encuentra demostrado con el aumento en la abundancia de proteínas relacionadas a su biosíntesis (Bhuiyan et al., 2020; Y. Chen et al., 2019), como la S-adenosilmetionina (SAM) sintetasa en papaya (Nogueira et al., 2012) y pera (*P. communis*) (Reuscher et al., 2016), Ácido 1-Aminocicloproano-1-Carboxílico

sintasa (ACS) en kiwi (*A. deliciosa*) (Shin et al., 2020), Ácido 1-Aminocicloproano-1-Carboxílico Oxidasa (ACO) en durazno (*P. persica*) (Prinsi et al., 2011), manzana (*M. domestica*) (Li et al., 2016) y papaya (Jiang et al., 2019), por mencionar algunos. Existen trabajos proteómicos en papaya enfocados a entender como el fruto se comporta durante la maduración (Jiang et al., 2019; Nogueira et al., 2012), inclusive bajo tratamientos inhibitorios de etileno (Huerta-Ocampo et al., 2012), así como la modificación postraduccional en proteínas-no histonas (K. Liu et al., 2018). A pesar de esto, hoy en día no existen trabajos con enfoques proteómicos orientados a la comprensión de la respuesta de la papaya al daño mecánico. Este trabajo pretende cuantificar la dinámica del proteoma del exocarpio de papaya sometidos a compresión axial a través de la maduración para desvelar el método de respuesta del fruto, así como proponer biomarcadores como candidatos a la condición de estrés como método de diagnóstico y seguimiento.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIALES DE LA PLANTA

El fruto de papaya (*C. papaya* cv. Tainung) fueron colectados en la productora Pamasur, localizada en Temozón, Yucatán. La cosecha se hizo en el estado verde-maduro y transportadas inmediatamente al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY), en Mérida, Yucatán. Las frutas fueron seleccionadas para remover aquellas que estuvieran dañadas o enfermas, las papayas seleccionadas fueron lavadas y sumergidas por 10 min en 200 ppm de hipoclorito de sodio, después fueron secadas en una campana de flujo laminar. La mitad de las frutas fueron sometidas al daño (Día 0).

3.2.2 APLICACIÓN DE DAÑO MECÁNICO

A 24 papayas se les aplicó una fuerza de compresión de 50 Newtons (N) con un disco de acero de 10 cm de diámetro. La prueba de compresión fue montada en una máquina Shimadzu AGS-X 10 Kn con una celda de carga calibrada de 1 kN (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón). La fuerza fue aplicada a una constante de 20 mm min⁻¹ hasta que los 50 N fueron alcanzados posterior al contacto con el exocarpio y mantenido por 10 s. Un impacto fue aplicado para cada fruta en la zona ecuatorial.

3.2.3 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Después del daño, las frutas fueron divididas en dos grupos, las dañadas (Tratamiento, T) y las no-dañadas (control, Ctrl). En cada grupo, las papayas fueron divididas al azar en 7 grupos, almacenadas a una temperatura de 25 ± 1°C y un ciclo luz/oscuridad de 12/12 h, la humedad fue 60-70%.

3.2.4 MEDICIÓN DEL COLOR EN EXOCARPIO

El color del exocarpio (CE) fue el indicador principal para determinar la maduración durante el almacenamiento. Las mediciones se realizaron inmediatamente después del daño (Día cero, D0), día dos (D2), día cuatro (D4), día seis (D6), día diez (D10) y día doce (D12). Para cada muestra, 4 frutas fueron utilizadas en cada determinación. La medición del CE se realizó utilizando un CR-200 Chroma Meter (Minolta, Japón) con un ángulo de visión de 0°

y una iluminación de circunferencia de 8 mm calibrado con el estándar blanco ($L^* = 97.92$; $a^* = -0.45$; $b^* = 2.12$). Las mediciones se hicieron a partir de 5 lecturas en tres diferentes puntos de la papaya: el centro, la parte posterior y la parte anterior (5 cm cerca del pedúnculo y del ápice). La escala CIEL*a*b* fue utilizada para evaluar el color, donde L^* (brillo) 0= negro y 100= blanco; a^* (-) =verde y (+) = rojo; b^* (-) = azul y (+) = amarillo. La existencia de diferencias entre los grupos (T vs Ctrl) al tomar la muestra (Prueba t de Student para muestras independientes, $\alpha = 0.05$) fueron analizadas con R.

3.2.5 MICROSCOPIA ÓPTICA

En las distintas etapas del procesamiento histológico se realizó una serie de modificaciones a las técnicas empleadas (Piven et al., 2001). Segmentos epidérmicos de papaya de aproximadamente 0.5 mm²-1cm² de área, fueron fijados en 40% de formaldehído, 95% de etanol, ácido acético glacial y agua destilada (10:5:50:35 partes, respectivamente) durante 96 horas (Berlin and Miksche, 1976). Posterior a la fijación, se lavaron los tejidos tres veces con un tiempo de una hora para cada muestra. Al término del lavado se continuó con la deshidratación con etanol (C₂H₆O) a diferentes concentraciones de manera gradual y ascendente (Ruzin, 1999). Se inició la deshidratación con etanol al 30%, luego 50% y 70%; se dejó reposar durante 24 horas las muestras en esta última concentración y al día siguiente se continuó con las concentraciones de 85%, 96% y etanol absoluto. Se realizaron dos cambios de alcohol para cada concentración con un tiempo de inmersión de una hora en cada cambio. Seguidamente los tejidos fueron embebidos en resina plástica JB-4 (Embedding Solution Polysciences. Los Angeles, California, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El embebido comenzó sumergiendo las muestras en la solución A + etanol absoluto (1:1 v/v), durante 24 horas; después fueron sumergidas en la solución A más catalizador y se mantuvieron durante 96 horas. Se elaboraron moldes que incluyeron los tejidos para su seccionamiento en sentido transversal y tangencial en un microtomo de rotación HM 325; Microm; con un espesor de 2-4 μ m. Los cortes histológicos se realizaron en serie y fueron extendidos en agua destilada y colectados sobre un portaobjetos de 26 x 76 mm. Para visualizar la organización celular mediante patrones metacromáticos, se sumergieron los cortes histológicos en el colorante azul de Toluidina 0.05%, 0.2 M, en acetato de sodio, durante 30 segundos (McManus et al., 1960), seguidamente se lavaron con agua destilada durante 30 segundos y se dejó secar los cortes

a temperatura ambiente. Se lavaron los tejidos en varias ocasiones, hasta que se observó el contraste entre los tonos azules y púrpura. Finalmente se realizaron preparaciones permanentes empleando como medio de montaje Polymount, Inc. (Polysciences. Los Angeles, California, USA). Los cortes histológicos fueron analizados y fotografiados en un microscopio óptico de epifluorescencia, marca Carl Zeiss, modelo Axio Scope A1, con cámara AxioCam acoplada; las imágenes fueron fotografiadas en aumentos de 10x y 40x en campo claro.

3.2.6 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas de las papayas dañadas y no-dañadas se efectuó en D2 y D12 de acuerdo a la metodología de Faurobert y colaboradores (2007). Muestras de exocarpio de 4 papayas por condición (dañadas y no-dañadas) fueron unidas y trituradas en N₂ utilizando mortero y pistilo. Aproximadamente 0.2 g de polvo de tejido se colocó en microtubos de 2.0 mL y resuspendidos con 1 mL de búfer de extracción frío conteniendo 500 mM Tris-base pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 700 mM sacarosa, 100 mM KCl, 2% β -mercaptoetanol (2-ME), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1% cóctel inhibidor de proteasas. La muestra fue colocada en vortex e incubada en agitación durante 5 min a 4°C. Posteriormente, se añadió 1 mL de fenol (preparado con Tris), pasado por el vortex e incubado en hielo sobre un agitador por 20 min. La muestra es separada por centrifugación 15 min a 15,000 g a 4°C. La fase fenólica que se encuentra en la parte superior del tubo se recuperó y trasladó a un nuevo microtubo cuidadosamente para evitar contacto con la interfase. Se añadió 5 volúmenes de 0.07% β -ME en acetona fría, el tubo es agitado invirtiéndolo y almacenado a -20°C durante toda la noche. Las proteínas precipitadas fueron recuperadas por centrifugación de 10,000 g por 15 min a 4°C, seguidamente de un lavado con 0.07% β -ME en acetona fría y después, acetona fría. La pastilla fue secada al vacío durante 5 min, resuspendida en 1x búfer de fosfato salino (PBS) con 1% SDS, sonicada 20 min e inmediatamente, centrifugada 15,000 g 10 min a 24°C. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80°C hasta su uso. Las muestras fueron cuantificadas utilizando el kit Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific).

3.2.7 DIGESTIÓN Y ETIQUETADO MEDIANTE ETIQUETA DE MASA EN TÁNDEM (TMT)

Las fracciones proteicas fueron reducidas por tris-(2-2carboxietil)-fosfina (TCEP) a 60°C por 45 min y alquilada con Iodoacetamida (IAM) a una concentración final de 30 mM por 1 h a temperatura ambiente y obscuridad, la reacción fue terminada con Ditiotreitól (DTT) 30 mM por 10 min. Las proteínas fueron precipitadas con acetona fría toda la noche a -20°C. Después, las muestras fueron centrifugadas 10,000 g por 15 min a 4°C y la pastilla secada al vacío durante 5 min. El paso siguiente fue re suspender con 100 µL de búfer de digestión cuyos componentes fueron bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 50 mM y 0.1% SDS, se digirieron con tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, Madison WI) relación 1:30 v/v tripsina:proteína toda la noche a 37°C. Inmediatamente después, se añadió tripsina recién preparada en una relación 1:60 v/v por 4 h a 37°C, la reacción se detuvo desnaturalizando la tripsina a 80°C. Los reactivos TMT 6-plex aplicados como etiquetas isobáricas para la cuantificación de proteínas diferenciales entre los grupos en D2: muestras no-dañadas (control) fueron asignadas las etiquetas TMT-126, TMT-127 y TMT-128; mientras que las muestras dañadas (tratamiento) fueron asignadas las etiquetas TMT-129, TMT-130 y TMT-131, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después del etiquetado, las muestras (no-dañadas y dañados) fueron combinados y secados. Lo mismo fue aplicado a las muestras de los grupos D12.

3.2.8 FRACCIONAMIENTO Y ANÁLISIS LC-MS/MS

Una vez terminada la digestión con la enzima, los péptidos trípticos fueron llevados a sequedad en un concentrador CentriVap (No. Cat. 7810016, LABCONCO®, Alemania) las muestras secas se reconstituyeron en 1 mL de amortiguador de equilibrio (constituido por una solución 1:1 de K₂HPO₄ 10mM /25% Acetonitrilo y 25% acetonitrilo/agua, se ajustó el pH a 2.5-3.0 con ácido fórmico. Para un fraccionamiento ortogonal, se utilizó un intercambio catiónico fuerte (SCX) (No. Cat. 60108-421, Thermo Scientific, Bellefonte, PA, USA) a éstos se les adicionó 2 mL de agua milli-Q, en seguida se hizo pasar 1 mL de amortiguador de elución (K₂HPO₄ 10 mM/KCl 500 mM/acetonitrilo 25% pH = 3). Continuamente se hizo pasar 2 mL de agua milliQ, seguido de 5 mL de amortiguador de equilibrio (constituido por una solución 1:1 de K₂HPO₄ 10 mM/25% acetonitrilo y 25% acetonitrilo/agua). Los péptidos trípticos se cargaron al cartucho lentamente, en seguida se adicionó 3 mL del amortiguador

de equilibrio (K_2HPO_4 5 Mm/acetonitrilo 25% pH=3), finalmente se realizó la elución con 1.5 mL del amortiguador cloruro de potasio en concentraciones de 75, 250, 500 mM respectivamente, los efluentes se colectaron en tubos de microcentrífuga para ser llevados al concentrador CentriVap (No. Cat. 7810016, LABCONCO®, Alemania). hasta sequedad. Para incrementar el número de proteínas identificadas por LC-MS/MS, se utilizó una separación fase reversa de pH alto con el Pierce™ High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit (Thermo Scientific®), de acuerdo con el protocolo del fabricante: las muestras fueron resuspendidas con 300 μ L de solución de ácido trifluoroacético 0.1%. Se prepararon soluciones como se describe en el manual del fabricante. Se acondicionaron las columnas Pierce™ High pH Reversed-phase peptide fractionation kit (No. Cat. 84868, Thermo Scientific™, Alemania) se removió de cada una de ellas la solución amortiguadora centrifugando 5000 g durante 2 min en el equipo 5424R (Eppendorf, Alemania), posteriormente se le adicionó a su contenido 300 μ L de acetonitrilo y se centrifugó nuevamente a 5000 g durante 2 min dos veces. Posteriormente se adicionaron 300 μ L de la muestra y se centrifugó a 3000 g colectando la elución en un tubo microcentrífuga, la columna se lavó con agua masas centrifugando 3000 g durante 2 min, considerando el cuadro de soluciones se realizó el fraccionamiento de cada muestra haciendo pasar por la columna 300 μ L desde la fracción 1-8, colectando por separado cada una de las fracciones. Finalmente, las eluciones fueron concentradas en el equipo Centrivap (No. Cat. 7810016, LABCONCO®, Alemania). Las nuevas 48 fracciones (24 para D2 y 24 para D12) se almacenaron hasta su uso. Las muestras fueron procesadas por un nano-LC-MS/MS acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion™ Tribrid™ (Thermo-Fisher Scientific®) equipado con una nano fuente de ion “EASY Spray” (Thermo-Fisher Scientific®) con una interfase UltiMate 3000 RSLC system (Dionex®, Sunnyvale, CA). Las muestras reconstituidas (50 μ L de ácido fórmico al 0.1 %) fue inyectado en una columna C18 nanoViper (3 μ m, 75 μ m X 2 cm, Dionex®) a un flujo de 3 μ L min⁻¹ y después separado en una columna EASY spray C18 RSL (2 μ m, 75 μ m x 25 cm) utilizando un gradiente de 100 min con una taza de flujo de 300 nL·min⁻¹, utilizando ácido fórmico 0.1% en agua grado LC-MS (disolvente A) y ácido fórmico 0.1% en 90% acetonitrilo (disolvente B). El gradiente fue el siguiente: 10 min disolvente A, 7-20% disolvente B en 25 min, 20% disolvente B 15 min, 25-95% disolvente B 20 min, y 8 min disolvente A. El espectrómetro de masas fue operado en modo ion positivo con un voltaje en nano espray de 3.5 kV y la fuente de

temperatura a 280°C. Calibradores externos incluyeron cafeína, Met253 Arg-Phe-Ala (MRFA), y Ultramark 1621 (Thermo-Fisher Scientific®).

3.2.9 ANÁLISIS MS/MS DIRIGIDO MEDIANTE ÁRBOL DE DECISIONES (ETD, CID Y HCD)

El espectrómetro de masa se operó en modo de dato-dependiente y programado automáticamente para cambiar entre el análisis MS y MS/MS. El barrido completo de espectros de masa (MS) será adquirido con el analizador Orbitrap, el rango de barrido de masa fue de 350-1500 m/z a una resolución de 120,000 (FWHM), utilizando un control automático de obtención de 4.0×10^5 iones, tiempo de inyección máximo de 50 ms, exclusión dinámica de 1 a 90 s y tolerancia de masa de 10 ppm. Posteriormente, se seleccionó un escaneo topográfico de velocidad máxima para 3s para la posterior fragmentación de CID Orbitrap basada en el árbol de decisiones o HCD (Swaney et al., 2008; Frese et al., 2011). El umbral de señal para desencadenar un evento MS/MS se estableció en 1.0×10^4 y la energía de colisión normalizada se estableció en 35 y 30% para CID y HCD, respectivamente. Se estableció el AGC de 3.0×10^4 y una ventana de aislamiento de 1.6 m/z para ambas fragmentaciones. El parámetro adicional para la activación Q incluida en el CID se estableció en 0.25 ms y el tiempo de inyección en 50 ms. Para HCD, la primera masa se ajustó a 120 m/z y el tiempo de inyección a 100 ms. Las configuraciones para el árbol de decisión fueron las siguientes: para los estados de carga de fragmentación HCD 2 o 3 se escanearon en un rango de 650- 1,200 m/z, los estados de carga 4 se escanearon en un rango de 900-1,200 m/z, y los estados de carga 5 fueron escaneados en un rango de 950-1200 m/z; Para la fragmentación CID, los estados de carga 3 se escanearon en un rango de 650-1,200 m/z, el estado de carga 4 se escaneó en un rango de 300-900 m/z, y el estado de carga 5 en el rango de escaneo de 300-950 m/z. Todos los datos fueron adquiridos con el software Xcalibur 4.0.27.10 (Thermo-Fisher Scientific).

3.2.10 ANÁLISIS LC-SPS-MS³

Se realizaron escaneos completos de MS en el analizador Orbitrap con resolución de 120,000 (FWHM), rango de escaneo 350-1500 m/z, AGC de 2.0×10^5 , tiempo de inyección máximo de 50 ms, umbral de intensidad de 5.0×10^3 , exclusión dinámica uno a 70s y 10ppm tolerancia masiva Para el análisis de MS², los 20 MS¹ más abundantes se aislaron con

estados de carga establecidos en 2-7. Parámetros de fragmentación incluidos, CID con 35% de energía de colisión y activación Q de 0.25, AGC de 1.0e4 en tiempo de inyección máximo de 50 ms, rango de masa de selección de precursores de 400-1200 m/z, ancho de exclusión de iones precursores bajo 18 m/z y alto 5 m/z, pérdida de etiqueta isobárica iTRAQ® y detección en la trampa de iones. Posteriormente, los espectros de MS³ se adquirieron como se describió anteriormente (McAlister et al., 2014a) utilizando la selección de precursores sincrónicos (SPS) de 10 muescas de aislamiento. Los precursores de MS³ fueron fragmentados por HCD con un 65% de energía de colisión y se analizaron usando el Orbitrap con una potencia de resolución de 60,000 a un rango de exploración de 120-500 m/z, una ventana de aislamiento de dos m/z, 1.0e5 AGC y un tiempo de inyección máximo de 120 ms con un microscan.

3.2.11 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y CUANTIFICACIÓN

Los datos en bruto fueron procesados con el programa Proteome Discoverer 2.1 (PD, Thermo Fisher Scientific Inc.) con el motor de búsqueda integrado Mascot (v.2.4.1, Matrix Science, Boston, MA), SEQUEST HT (Eng et al., 1994) y AMANDA (Dorfer et al., 2014). Para la identificación de proteínas se estableció una puntuación de 20. Las herramientas de búsqueda fueron enfrentadas a la base de proteínas no redundante de Carica papaya alojada en el NCBI. Los parámetros incluidos en los motores de búsqueda MASCOT, SEQUEST y AMANDA incluyeron especificidad proteolítica con tripsina, dos cortes perdidos permitidos, modificaciones estáticas comprendiendo carbamidometilación de cisteína (+57.021 Da) y TMT 6-plex N-terminal/lysine residues (+229.163 Da). Además, las modificaciones dinámicas incluyeron oxidación de metionina (+15.995 Da) y desaminación en residuos de asparagina y glutamina (+0.984 Da), se utilizó un filtro de 1% de FDR usando el algoritmo percolator (Käll et al., 2007). El método de cuantificación TMT 6-plex dentro del programa PD fue utilizado para calcular la proporción reportada con una masa de tolerancia ± 10 ppm con el centroide más seguro y un filtro de co-aislamiento precursor del 45% aplicado. Para el método SPS-MS³, la cuantificación se realizó al nivel de MS³. Sólo los espectros de péptidos que contienen todos los iones indicadores se designaron como "espectros cuantificables". Para el informe del nivel de proteínas, se habilitó la agrupación de proteínas y los valores se calcularon a partir de la mediana de todos los PSM cuantificables para cada grupo (*master proteins*). Los valores de TMT fueron reportados

como una proporción de la suma de los indicadores en cada espectro. El análisis diferencial se obtuvo utilizando DEBrowser v1.12.3 (Kucukural et al., 2019) como una interfaz gráfica para LIMMA (Ritchie et al., 2015), con parámetros LIMMA predeterminados: normalización basada en TMM y valores de p ajustados con el procedimiento de Benjamini-Hochberg.

3.2.12 ANOTACIÓN DE PROTEÍNAS

Se anotaron las proteínas utilizando la herramienta web NetGO 2.0 (You et al., 2019), la cual es capaz de desempeñar una función de predicción automatizada (AFP) a largas escalas de datos incorporando información de redes masivas de interacción proteína-proteína (PPI). La base de datos de la enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>) fue utilizada para anotar las rutas metabólicas donde se encontraban involucradas las proteínas. Primeramente, la herramienta KofamKOALA - KEGG Orthology Search (Aramaki et al., 2020) con valores máximos E de 0.01 fue utilizada para anotar la descripción KEGG de las proteínas. Después, los resultados de la anotación fueron mapeados a la base de datos de rutas metabólicas KEGG utilizando la herramienta Mapper (Kanehisa y Sato, 2020)

3.3 RESULTADOS

3.3.1 COLORIMETRÍA

Los parámetros CIE (L^* , a^* y b^*) tendieron a incrementar sobre el curso temporal del experimento (Figura 3.1). El brillo de las papayas no-dañadas (L^*) se mantuvieron en un rango mínimo de 44.9 ± 1.1 (D0) y un rango máximo de 55.5 ± 4.45 (D12), en a^* , el mínimo fue de -14.7 ± 1.5 y el máximo fue de 6.96 ± 3.71 y para b^* , 22.9 ± 1.2 y 42.2 ± 5.61 mínimo y máximo, respectivamente. En el caso de las dañadas, los valores mínimos fueron los mismos que el control, sin embargo, los valores máximos de L^* fueron 54.1 ± 5.63 , a^* 8.42 ± 3.59 , y b^* 31.3 ± 2.97 . En el caso de D10 y D12, el parámetro b^* demuestra una diferencia entre los grupos en cada toma de muestra, los valores de los frutos no-dañados son más altos, por ende, sus índices de amarillamiento son significativamente más altos comparados con el tratamiento (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Datos colorimétricos registrados en papayas dañadas (T) y no-dañadas (Ctrl) en 7 puntos temporales. Se resaltan los datos estadísticamente significativos $p < 0.05$

CIE	Tratamiento	Tratamiento					
		D0	D1	D2	D6	D10	D12
L^*	Ctrl	43.7 ± 1.1	44.9 ± 1.1	46.3 ± 2.23	53 ± 6.61	55.4 ± 4.79	55.5 ± 4.45
	T		45.3 ± 1.16	46.2 ± 3.21	51.8 ± 5.58	53.7 ± 3.83	54.1 ± 5.63
a^*	Ctrl	-14.3 ± 0.616	-14.7 ± 0.779	-14.6 ± 0.713	-13.3 ± 1.17	-4.5 ± 5.18	-6.96 ± 3.71
	T		-14.2 ± 0.588	-14.1 ± 0.656	-11.2 ± 2.98	-9.41 ± 3.49	-8.42 ± 3.59
b^*	Ctrl	22.9 ± 1.2	23.3 ± 1.43	22.4 ± 2.67	31.6 ± 3.83	$44.8 \pm 4.92^*$	$42.2 \pm 5.61^*$
	T		21.9 ± 2.11	21.8 ± 2.22	29.2 ± 4.25	$31.6 \pm 1.13^*$	$31.3 \pm 2.97^*$



Figura 3.1 Cambio en la coloración del exocarpo de papaya. **A)** papayas dañadas. **B)** papayas no-dañadas. Escala 20 cm

3.3.2 MICROSCOPIA

Micrografías transversales de la histología de los frutos de papaya fueron obtenidas. En D2, las papayas no-dañadas mostraron células de la epidermis de forma cuadrangular, isodiamétricas y células subepidérmicas de formas bulfiromes y turgentes, aumentando de tamaño conforme los estratos celulares se alejaban del daño. Las papayas dañadas mostraban células de la epidermis de forma rectangular, al igual que los primeros estratos de células subepidérmicas. Para D12, los frutos no-golpeados presentaron las células de la epidermis con aparente aumento de cutícula y las siguientes 5-8 estratos presentaron suberización, así como adelgazamiento y plasmólisis, posterior a esto se encuentran células redondeadas de gran tamaño. En las papayas golpeadas se observan células de la epidermis suberizadas y compactadas con las células subepidérmicas, las cuales también se encuentran suberizadas hasta el estrato número 50, aproximadamente. Las células poseen pared celular sinuosa debido a la plasmólisis sufrida en respuesta a su condición (Figura 3.2)

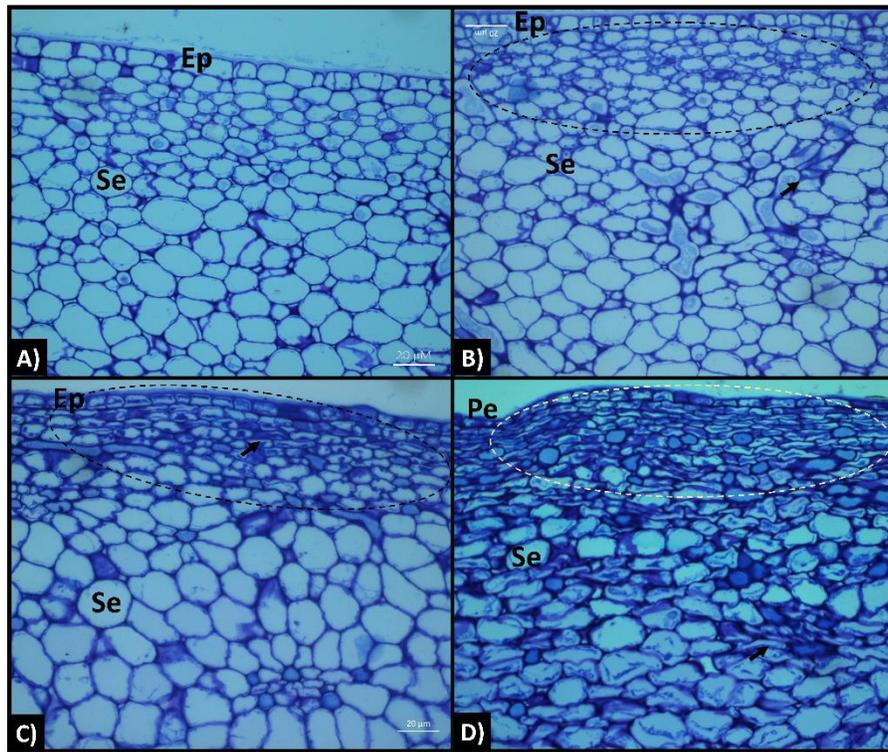


Figura 3.2 Micrografías de cortes transversales de exocarpio de papaya teñido con azul de toluidina después de aplicado el daño mecánico. **A)**, Ctrl D2; **B)**, T D2; **C)**, Ctrl D12; **D)**, T D12. **Ep** =Epidermis, **Se** =Subepidermis, **Pe** =Peridermis.

3.3.3 CONTROL DE CALIDAD

Para revisar la variabilidad de los datos entre muestras y entre grupos, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) como herramienta de análisis multivariado. En D2, los dos primeros ejes (PC1 y PC2) lograron el 95% de variabilidad y 92% para D12. El coeficiente de correlación de los dos estados con su triplicado en cada grupo indicó una repetibilidad buena de los datos MS (Figura 3.3).

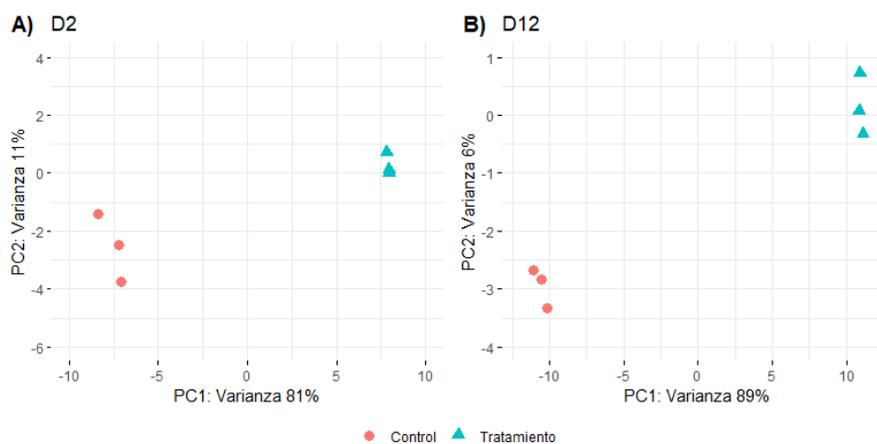


Figura 3.3 Análisis de componentes principales (PCA) para **A)** D2 y **B)** D12.

3.3.4 ANÁLISIS TMT LC-SPS-MS³

Un total de 2,465 proteínas fueron identificadas en D2, incluyendo las proteínas con acumulación relativa diferencial: 104 con acumulación relativa aumentada (PARAs) y 61 con acumulación relativa disminuida (PARDs) (Figura 3.4b). Para D12, 2,857 proteínas fueron identificadas y 536 proteínas con acumulación relativa diferencial fueron detectadas (342 PARAs y 194 PARDs) (Figura 3.4d). El top cinco de las proteínas PARA en D12 fueron: proteína del cloroplasto de *C. papaya* aún no caracterizada en *Arabidopsis thaliana* At1g26090, [6.47 *Fold Change* (FC)]; probable proteína similar a una beta-D-xilosidasa 5 (4.74 FC); proteína tipo-2 isoforma X1 asociada a tri-snRNP U4/U6.U5 (4.03 FC), proteína cloroplástica S13 del ensamblaje del complejo ribosomal 30S (3.77 FC) y subunidad 1-1 del factor de liberación de la cadena peptídica eucariota (3.68 FC). Por otro lado, el top cinco de proteínas PARD fueron: proteína tipo-MLP 43 (0.71 FC), proteína L32-1 del

complejo ribosomal 60S (0.71 FC), Protocolorofilida reductasa (0.71 FC), isoforma X1 de la proteína tipo-UPF0548 de At2g17695 (0.71 FC) y proteína mitocondrial 1 ARNt ligasa-glicina (0.7 FC). El top cinco de proteínas reguladas positivamente en D2 fueron: proteína de cubierta involucrada en el tráfico vesicular (37.88 FC); proteína PEPPER conteniendo dominio KH de unión a ARN (23.31 FC) proteína tipo-carboximetil salicilato transferasa (14.18 FC); proteína relacionada a la patogénesis tipo-1 y 1 (5.22 y 4.9 FC, respectivamente). Para las proteínas reguladas negativamente, el top cinco fueron: peroxidasa 72 (0.71 FC), fenilalanina amonio liasa (0.7 FC), proteína tipo-defensina Ec-AMP-D2 (0.7 FC); proteína aún no caracterizada LOC110826186 (0.69 FC) y ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa activasa, tipo-cloroplástica (0.69 FC). Además, D2 y D12 comparten 23 PARAs y 10 PARDs. Así mismo, 8 PARAs en D2 pasaron a ser PARDs en D12 y solamente 1 PARD en D2 pasó a ser PARA en D12.

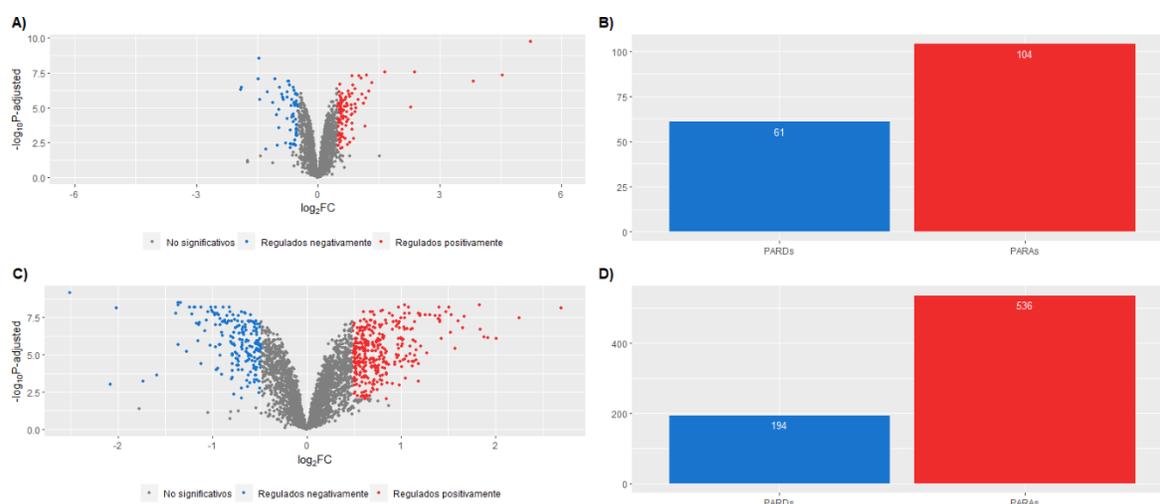


Figura 3.4 Proteínas con acumulación relativa diferencial identificadas en D2 y D12 (p -ajustada < 0.01 y $\text{Log}_2\text{FC} > 1.4$ y < 1.4). **A)** volcano plot D2. **B)** gráfica de barras con el total de proteínas con acumulación relativa aumentada (PARAs) y proteínas con acumulación relativa disminuida (PARDs) en D2. **C)** Volcano plot D12 y **D)** gráfica de barras en D12

3.3.5 ANÁLISIS DE GO Y KEGG

Las categorías de ontologías génicas (GOs) representadas se encuentran resumidas en la figura 3.5. En D2, las proteínas con acumulación relativa aumentada en la ontología de proceso biológico (BP) obtuvieron 45 anotaciones diferentes; mientras que las proteínas con acumulación relativa disminuida anotaron 29; la ontología de componente celular (CC)

en PARAs 35, y PARDs 18; y, por último, la ontología de función molecular (MF) se obtuvo una anotación de 43 y 27 para proteínas con acumulación aumentada y disminuida, respectivamente. En el caso de D12, las PARAs se lograron anotar 87, 52 y 117 para las ontologías BP, CC y MF, respectivamente. En comparación, las PARDs se lograron anotar 66, 33 y 83, para las ontologías BP, CC y MF, respectivamente. Para las rutas metabólicas de la Enciclopedia Kyoto de genes y genomas (KEGG) se lograron anotar en D2, 55 PARAs correspondientes a 55 ortólogos KEGG (KO) dentro de la base de datos de funciones moleculares de *Carica papaya* (cpap), que a su vez fueron rastreados en 37 mapas de rutas metabólicas KEGG. Las que mayor número de proteínas fueron obtenidas son las siguientes: rutas metabólicas (60), interacción planta-patógeno (44), biosíntesis de metabolitos secundarios (38) y procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico (35). Mientras que las proteínas con acumulación relativa disminuida se obtuvo 52 KO en 37 mapas de rutas metabólicas. Las mayores representadas fueron: rutas metabólicas (130), biosíntesis de metabolitos secundarios (75), biosíntesis de fenilpropanoides (56) y procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico (29). Por otro lado, las proteínas con acumulación relativa aumentada de D12 se obtuvieron 182 KO en 75 mapas de rutas metabólicas, las que mayor número de proteínas alcanzaron fueron: rutas metabólicas (197), biosíntesis de metabolitos secundarios, biosíntesis de fenilpropanoides (59) y procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico (38). Para las PARDs, se lograron anotar 143 KO en 81 mapas. Siendo las de mayor cantidad de proteínas: rutas metabólicas (254), biosíntesis de metabolitos secundarios (176), biosíntesis de fenilpropanoides (63) y metabolismo de carbono (48) (Figura 3.6).

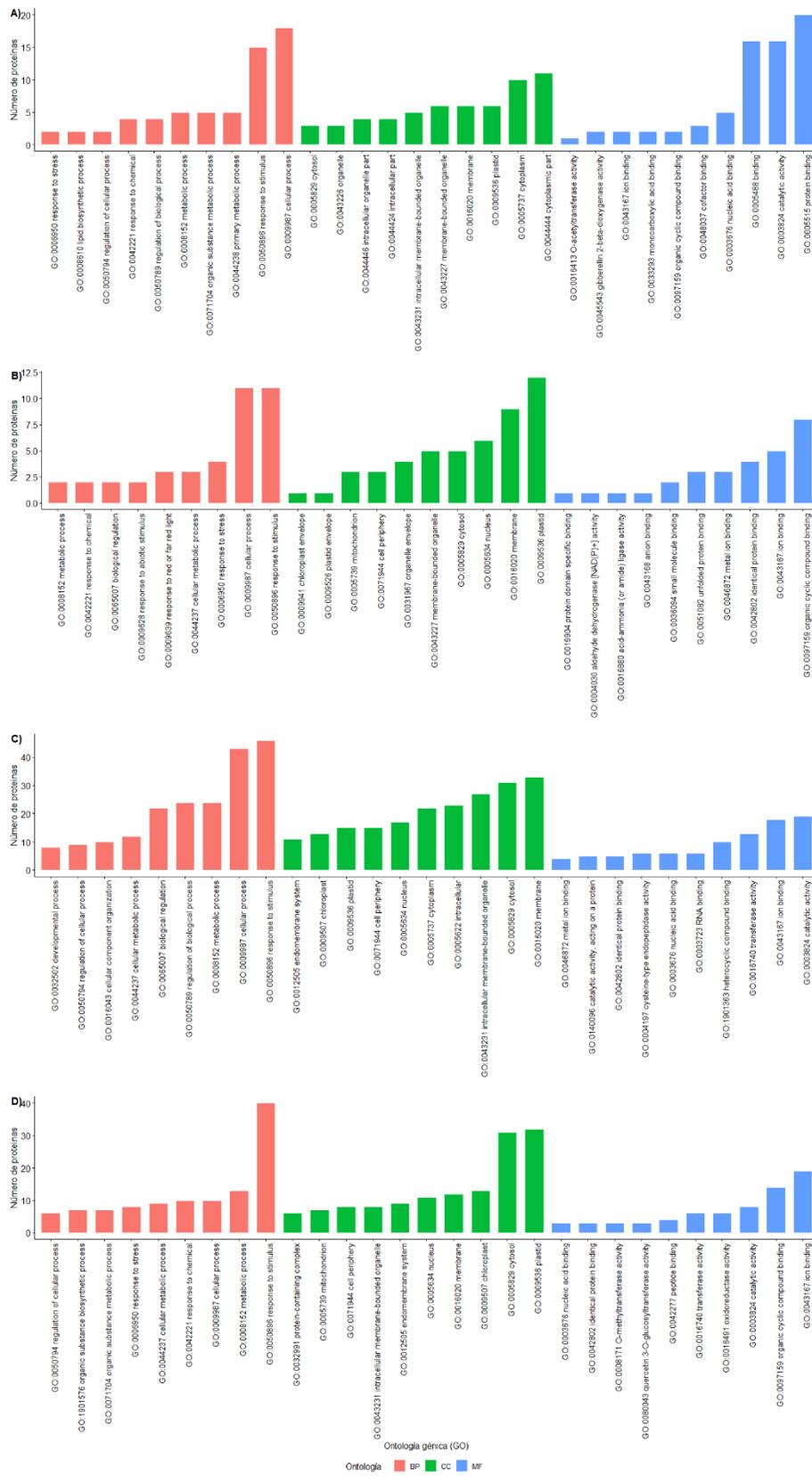


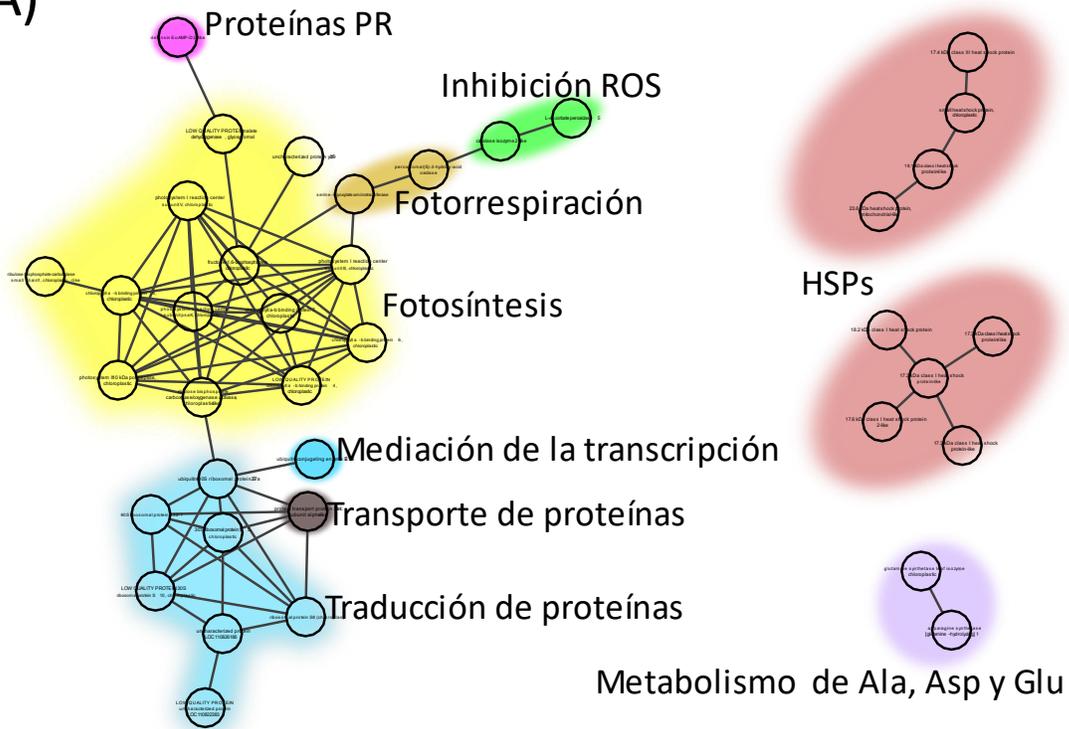
Figura 3.5 Clases de ontología génica (GO) mayormente representadas. Se muestran las 10 clases con mayores números de proteínas para cada ontología. **A)** Proteínas mayormente acumuladas en D2. **B)** Proteínas menormente acumuladas en D2. **C)** Proteínas mayormente acumuladas en D12. **D)** Proteínas menormente acumuladas en D12. Para la lista completa, el lector es referido al **Anexo 4**.

Figura 3.6 Mapas de rutas metabólicas KEGG. Se ilustra la cantidad de KOs asignados a cada una.

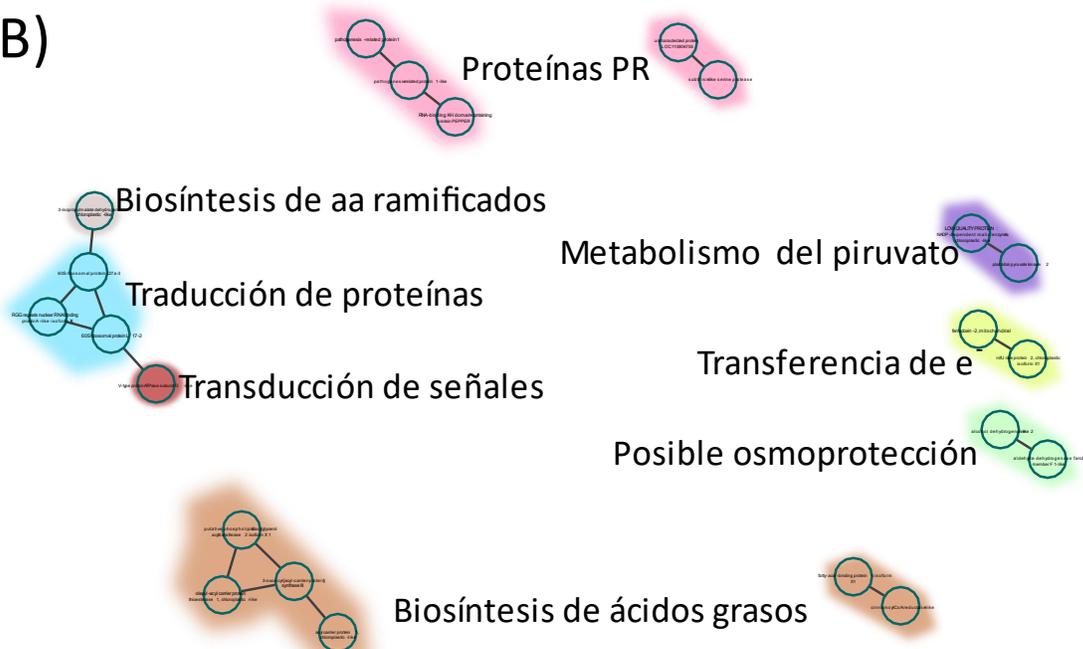
3.3.6 INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA (PPI)

En D2, posterior al análisis con STRING, las PARAs formaron 102 nodos y 7 bordes, no presentando un enriquecimiento significativo ($p > 0.05$). Por el contrario, las PARDs formaron 61 nodos y 62 bordes, logrando un enriquecimiento significativo ($p < 0.05$). En el caso de D12, las PARAs mostraron un enriquecimiento PPI con 336 nodos y 77 bordes; mientras que las PARDs también lograron enriquecimiento PPI con 188 nodos, 264 bordes.

A)



B)



3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 RESPUESTA FISIOLÓGICA

Una forma de definir el estado de maduración de los frutos es a través de su color. Santamaría y colaboradores (2009) definieron 7 estados de maduración de papaya cv Maradol a través de diversos parámetros, entre ellos, colorimetría. Nuestros valores en D0 fueron ligeramente más bajos comparados con el estado de maduración G de su trabajo ($L^*=41$, $a^*=-19.9$, $b^*=25.8$). El aspecto de las papayas no-dañadas al final de nuestro experimento son comparables con lo obtenido Zerpa-Catanho et al., (2017) con las papayas cv pocci que fueron utilizadas como control (no-tratadas) en el día 7 (D7) de su experimento ($L^*= 50.74$, $a^*=-3.32$ y $b^*= 40.07$). Las papayas dañadas de este trabajo se pueden comparar con aquellas que Zerpa-Catanho et al., obtuvieron en el día 5 (D5) de su experimento ($L^*= 47.22$, $a^*= -8.06$ y $b^*=34.03$). Por lo cual, ellos le atribuyeron el patrón de cambio de coloración a la inhibición de la degradación de la clorofila y biosíntesis de carotenoides debido al tratamiento inhibitor 1-MCP de la ruta biosintética del etileno. Nuestros datos soportan también su propuesta de que las papayas cosechadas con valores $b^* < 26$ no maduran correctamente por sí solas y es necesario la aplicación de etileno exógeno para alcanzar los estándares de calidad establecidos, así mismo, que papayas sometidas a estrés abiótico, desarrollan coloraciones irregulares (Chávez-Sánchez et al., 2013). En pepinos (*Cucumis sativus* L.) se ha demostrado que debido al daño, se incrementan los niveles de actividad de la PLD y LOX los cuales son causantes del deterioro de la fruta (Zhao et al., 2010). La maduración natural programada y la maduración asociada a estrés abiótico se encuentran relacionadas con la degradación estructural y la muerte celular. Sin embargo, aunque el factor inductor de la condición sea el mismo para el sistema, la respuesta será diferente y acorde a la naturaleza propia de cada célula en cada tejido (Cáez-Ramírez et al., 2018; Li y Thomas, 2014). En el caso de nuestro estudio con el exocarpio de papaya, las micrografías revelaron la formación de una peridermis completamente suberizada de varios estratos celulares en respuesta al daño mecánico, lo que concuerda con lo observado en el kiwi (*A. chinensis*), el cual a partir de la desdiferenciación de células de la hipodermis para inducción de meristemo, formaron células con una pared celular delgada las cuales fueron suberizadas y transitan a una muerte celular programada (PCD) para finalmente colapsar y formar la peridermis (Macnee

et al., 2020). Algo similar se encontró en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) como proceso de adaptación ante daño realizado por cortes (Chaves et al., 2009). Sin embargo, son tejidos completamente diferentes.

3.4.2 RESPUESTA DINÁMICA DEL PROTEOMA EN TIEMPO TEMPRANO (D2)

Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo sobre fruto de papaya que utiliza la tecnología TMT-SPS-MS³, la cual, comparada con MS² incrementa la señal del ion reportero y mejora la precisión de su proporción, traduciéndose en un incremento en el número de péptidos cuantificados que a su vez nos da la capacidad de medir los cambios más sutiles en el proteoma dentro del análisis proteómico multiplexado. Para D2 se lograron identificar y cuantificar 2,465 proteínas, mientras que en D12 se lograron identificar y cuantificar 2,857; el cual es un valor ligeramente superior que el reportado por Jiang et al., (2019) quienes utilizaron la tecnología TMT-MS². El etileno en la papaya juega un papel muy importante dentro de la maduración por su naturaleza de fruta climatérica (Claudius y Ludivine, 2017; López-Gómez et al., 2009). Es por eso, que se registraron proteínas con acumulación relativa diferencial relacionadas a la biosíntesis de esta fitohormona, como lo son la SAM sintasa, la proteína tipo homólogo de ACC oxidasa 4 y la ACC oxidasa inducida por maduración; a los pocos días de haber sido cosechada (D2). La respuesta temprana en D2 por parte del fruto de papaya al daño mecánico puede sugerirse debido a las proteínas con acumulación relativa aumentada: proteína 3 tipo unión a calosa en plasmodesmos y la proteína D homóloga de estallido respiratorio oxidasa (RBOH), la cual se han documentado como respuesta rápida ante ataques de patógenos y daño mecánico en plantas y recientemente publicado en hojas de *Saccharum officinarum* (L.) (Kollist et al., 2019; Pacheco-Coeto et al., 2019). RBOH se encuentra relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) una vez que detecta un cambio proveniente de las proteínas mecanosensoras (Kollist et al., 2019), ROS y Ca⁺² son señalizadores que intervienen en diferentes vías como activadores específicos. Por otro lado, la ruta KEGG de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, MAP cinasa) también se encuentra altamente representada en esta etapa del daño mecánico. Las proteínas cinasas en daño mecánico y herbivoría, son inducidas por el influjo de iones, como por ejemplo el Ca⁺², los cuales responden al cambio conformacional de las proteínas que sensan el daño mecánico (J. Wu y Baldwin, 2009). En este caso se encontró una proteína

tipo-calmodulina, las cuales han sido registrado en la ruta de transducción del estrés por daño mecánico en plantas (Sparke y Wünsche, 2020). La acumulación de proteínas en las rutas metabólicas KEGG de interacción planta-patógeno hablan de la respuesta temprana de la papaya ante el estrés a través de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) las cuales también son reguladas en parte por el etileno en daño mecánico (Sharma et al., 2019; Jain y Khurana, 2018). Este tipo de proteínas se han encontrado en manzanas sometidas a daño mecánico (Buron-Moles et al., 2014), así también en transcriptoma de duraznos sometidos a daño por frío junto con una proteína β -D-xilosidasa, la cual es una PARA en este estudio (Falara et al., 2011). Algunas proteínas PR, son necesarias para activar factores transcripción como los MYB y WRKY, los cuales a su vez se encargarán de modular la codificación, por ejemplo, de proteínas de choque térmico (HSPs) y otras PR que son necesarias para regular y recuperarse del estrés (Pedreschi, 2017). En D2, solo una HSP fue proteína con acumulación relativa aumentada y 11 fueron proteínas con acumulación relativa disminuida. Este hallazgo sugiere que en D2 la maquinaria aún no se encuentra preparada para amortiguar el estrés y que este tipo de HSPs no pertenecen a la “respuesta rápida” de la planta, sino a la “respuesta lenta” la cual puede activarse después de horas (Kollist et al., 2019). Aunado a lo anterior, Chen et al., (2009) y Tosetti et al., (2014) en sus análisis moleculares de frutos climatéricos sometidos a daño mecánico en plátano y durazno, respectivamente, durante 48 y 72 h reportaron el incremento en conjunto de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y HSPs, sin embargo, en el mismo estudio reportado por Tosetti et al., (2014), una variedad diferente de durazno mostró resultados diferentes. En nuestro estudio, PAL resultó como proteína con acumulación relativa disminuida en conjunto con una amidasa. Así mismo, PAL es pieza clave en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, ruta que también se vio diferencialmente con acumulación disminuida en el análisis KEGG. Los flavonoides han sido reportados como metabolitos secundarios capaces de interactuar en respuesta al estrés abiótico, y en papaya se han visto regulado positivamente para propiciar el correcto cambio de coloración y demás propiedades sensoriales que le dan valor añadido a la fruta (Jiang et al., 2019). No obstante, debido a la acumulación relativa disminuida de la ruta de los fenilpropanoides, la ruta de los flavonoides también se vio afectada, posiblemente provocando el tipo de coloración en las papayas obtenida en este experimento. Es importante resaltar dentro de las PARAs en D2, que la biosíntesis de lípidos puede estar posiblemente relacionada con el gran aumento de FC de la proteína de cubierta, las cuales también están relacionadas con el tráfico de lípidos y

proteínas en cloroplastos lo cual concordaría con el mapa KEGG representado de procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico (Lindquist y Aronsson, 2018; Sanderfoot y Raikhel, 1999).

3.4.3 RESPUESTA DINÁMICA DEL PROTEOMA EN TIEMPO TARDÍO (D12)

Diez días después de la primera toma de muestra, se observa en D12 un aumento sustancial en procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico para las DEPs reguladas positivamente. Lo que concuerda con la suberina observada en las imágenes de microscopía, pues ésta se sintetiza a través de los cloroplastos con intervención de la ruta de los fenilpropanoides, la cual también se encuentra altamente representada en los resultados KEGG. Así mismo, los monómeros de suberina son exportados a través de los transportadores ABC y proteínas de transferencia de lípidos (Macnee et al., 2020; Chaves et al., 2009). Dentro de este trabajo se encontraron dos proteínas ABC transportadoras y dos proteínas de transferencia de lípidos. De igual forma, el mapa de interacción SNARE en transporte vesicular se ve altamente representada, lo que se podría traducir en un alto desempeño en el secretoma de la papaya, pues las proteínas SNARE están encargadas de trazar la ruta a seguir, incluyendo aquellas que serán degradadas (Sanderfoot y Raikhel, 1999). Existen estudios en frutos climatéricos sometidos a estrés como el tomate, el mango y el plátano, que ven aumentadas sus proporciones de proteínas relacionadas a la fotosíntesis (Tang et al., 2020; Ji et al., 2019; Vega-García et al., 2010), inclusive en el mismo fruto de papaya al ser afectada por virus (Soares et al., 2017) como mecanismo de defensa ante el daño. Sin embargo, en la maduración de papaya las proteínas asociadas a fotosíntesis sufren disminución en la acumulación conforme va pasando el tiempo. En nuestro estudio, cerca de 10 PARDs relacionadas a fotosíntesis fueron registradas, posiblemente por el aumento de ROS, las cuales compiten e inhiben el aparato fotosintético (Gururani et al., 2015). Se han documentado casos como el de ataque a herbivoría donde existe la regulación negativa de expresión de genes y transcritos asociados a fotosíntesis (Bilgin et al., 2010), relacionando aún más la respuesta a daño mecánico con el estrés biótico por herbívoros. A partir de lo anterior, el metabolismo del carbono se ve de igual manera afectado negativamente como la fijación del carbono y la glicolisis/glucogénesis. Todo esto podría traducirse en la sumisión del sistema ante el estrés y la senescencia.

2.4.4 RESPUESTA PERSISTENTE DEL PROTEOMA D2-D12

Es importante hacer notar que 23 proteínas diferenciales fueron encontradas con acumulación relativa aumentada durante todo el experimento, principalmente 5 PRs pertenecientes a diferentes familias, también una HSP de clase I, así mismo se encontraron proteínas aun no caracterizadas, una proteína tipo titin, la cual es una de las proteínas más grandes encontradas en plantas (Mohanta et al., 2019) y una proteína con dominio PLAT, el cual está documentado en *Arabidopsis* como responsable de proporcionar tolerancia ante estrés abiótico. Todas las proteínas con acumulación relativa diferencial anteriores (a excepción de las proteínas aun no caracterizadas) pueden ser candidatas a biomarcadores putativos para la condición de estrés por daño mecánico en el exocarpo del fruto de *C. papaya*. Cuando las proteínas son analizadas a través de STRING, solo se forma un borde entre los nodos de proteína L17-2 de la subunidad 60s ribosomal y la proteína tipo subunidad de ATPasa con un índice de confiabilidad media (*confidence media*) (score: 0.539). Soportando la idea de que las PARAs constantes están involucradas en procesos celulares distantes y no tienen una interacción PPI relativamente entre ellas. Por otro lado, las PARDs se enriquecen en las interacciones PPI al formar 9 bordes entre 10 nodos, en este caso, la respuesta se encuentra orquestada por la constante regulación negativa del metabolismo primario, es decir aquellas relacionadas con el metabolismo del carbono incluyendo su fijación y la glicólisis/gluconeogénesis debido a la falla del fotosistema, como se habló anteriormente, en papaya (Jiang et al., 2019; Bilgin et al., 2010).

3.5 CONCLUSIÓN

Existen pocos trabajos asociados a la respuesta por daño mecánico en frutos y más aún en trabajos proteómicos que se enfoquen a responder dichas dudas a ese nivel, por lo que, para nuestro conocimiento, este es el primero trabajo en frutos de papaya que aborden este tema. Los hallazgos encontrados nos permiten proponer que la ausencia HSPs y la regulación negativa de proteínas asociadas a la maquinaria fotosintética es una forma diferente de respuesta con respecto a lo anteriormente reportado en frutos climatéricos sometidos a este estrés. Así mismo, las proteínas encontradas relacionadas al tráfico vesicular y a la ruta metabólica de los fenilpropanoides confirman lo observado en las micrografías sobre la aparición de un peridermis suberizada como medida de protección ante el daño mecánico. Anteriormente, solo existía una propuesta en el kiwi que hacía referencia a este fenómeno. La cuantificación por medio de la tecnología TMT-SPSMS³ nos permitió establecer un núcleo de proteínas que se acumulan diferencialmente ante esta condición en un tiempo temprano y en un tiempo tardío, permitiendo establecerlas como potenciales biomarcadores que permitan detectar y seguir el progreso de este estrés en específico. La perspectiva propuesta para la continuación de este trabajo consiste en la validación de los biomarcadores por medio de otras herramientas ómicas, así como la caracterización de aquellas proteínas que aún no han sido anotadas para un mejor entendimiento de la respuesta de papaya ante daño mecánico.

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Recientemente Jiang et al., (2019), reportaron el cambio del proteoma del exocarpio de papaya durante su maduración, reportando procesos activos metabólicos claves como la síntesis de flavonoides y ácidos grasos, para el entendimiento de dicho proceso, estableciendo interesantes avances en el campo. Sin embargo, como se ha hablado anteriormente, la línea de producción y la cadena de suministro de un cultivo tan importante como la papaya, es sensible a pérdidas de hasta un 100 % debido a daño mecánico (De paul et al., 1993). Hasta el día de hoy no existía algún trabajo enfocado en entender el comportamiento del cambio de proteínas en papaya cuando esta era sometida al estrés por daño mecánico. Principalmente, podría deberse a que es un cultivo difícil de tratar bajo este enfoque, debido a todos los metabolitos secundarios, ácidos nucleicos y sobre todo proteasas que componen la naturaleza de la papaya. Es por eso, que el evaluar varios métodos de extracción, es importante para ayudar a la toma de decisiones en trabajos de este perfil. Se logró corroborar que la extracción con fenol sigue siendo la adecuada para obtener una visión amplia del proteoma, con un rendimiento decente si se cuenta con poco material, pero, sobre todo, que es posible prescindir reactivos laboriosos como la urea, que, si no se maneja adecuadamente, podría dañar la muestra y hasta los equipos de detección másica. A partir de ese logro, el etiquetado de proteínas por medio de la tecnología TMT y su análisis a través de SPS-MS³ logramos sentar las bases del mecanismo distante a lo reportado por parte de *Carica papaya* y otros frutos climatéricos. Lo anterior da pie, a prestar esencial cuidado en el campo del mejoramiento genético o tradicional de este cultivo. Estudios son necesarios para reforzar el conocimiento de la respuesta a estrés por parte del fruto de papaya. No obstante, la propuesta de potenciales biomarcadores para la detección y seguimiento de la condición de daño mecánico, será un gran apoyo en ciencia básica y en un futuro, aplicada.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo sentó precedentes al ser, para nuestro conocimiento, la primera obra escrita en comparar diferentes métodos de extracción de proteínas totales en el exocarpio del fruto de papaya compatible con tecnología de vanguardia, lo cual, facilitará la toma de decisiones en proyectos relacionados a la proteómica, atendiendo los diferentes objetivos y metas trazadas. El tercer capítulo logró establecer las bases científicas de la respuesta ante el estrés por daño mecánico de frutos de papaya. Anteriores reportes en diversos frutos climatéricos establecían un grupo de proteínas y rutas metabólicas encargadas de la defensa en dicho estrés. No obstante, nuestros datos establecieron que la forma en que el fruto de papaya responde a esta condición es diferente, por ende, las formas de mejoramiento genético requieren especial cuidado en este cultivo. Es importante mencionar que el establecer un núcleo de proteínas expresadas diferencialmente que son reguladas positivamente durante todo el periodo de daño mecánico, permitió establecerlas como potenciales candidatas a biomarcadores, que serán de gran ayuda a la hora de diagnosticar o dar seguimiento a la condición. Proceso que podrá apoyar la toma de decisiones dentro de la cadena de producción y suministro del fruto.

4.3 PERSPECTIVAS GENERALES

Debido al enfoque proteómico bottom-up, la validación de los resultados obtenidos podría realizarse a través de Western Blot o identificación de compuestos por medio de metabolómica; de igual manera podrían utilizarse estrategias genómicas o transcriptómicas para lograr una correlación positiva dentro de los datos aquí presentados. Es necesaria más investigación para la caracterización de las proteínas que aún no se encuentran anotadas. Lo anterior, es un inconveniente en el estudio de organismos no modelos como la papaya que a pesar de que existe la secuenciación de su genoma, existen vacíos que pudieran provocar inconsistencias. Entre otras cosas, la posibilidad de aislar los genes encargados de codificar el núcleo de proteínas propuesta como biomarcadores y sobre expresarlos o reprimirlos en este u otro sistema, daría luz al papel que juega en la respuesta al estrés por daño mecánico.

5 BIBLIOGRAFÍA

- Al-Obaidi, J. R., Saidi, N. B., Usuldin, S. R. A., Hussin, S. N. I. S., Yusoff, N. M., y Idris, A. S. (2016). Comparison of Different Protein Extraction Methods for Gel-Based Proteomic Analysis of *Ganoderma* spp. *The Protein Journal*, 35(2), 100–106. <https://doi.org/10.1007/s10930-016-9656-z>
- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., y Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, 33(21), 3387–3395. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx431>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., y Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Altisent, M. R. (1991). Damage Mechanisms in the Handling of Fruits. *the Handling of Fruits*, 231-257.
- Alvarez, S., y Naldrett, M. J. (2016). Plant Structure and Specificity – Challenges and Sample Preparation Considerations for Proteomics. En H. Mirzaei & M. Carrasco (Eds.), *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* (pp. 63–81). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_4
- Aramaki, T., Blanc-Mathieu, R., Endo, H., Ohkubo, K., Kanehisa, M., Goto, S., y Ogata, H. (2020). KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics*, 36(7), 2251–2252. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz859>
- Badillo, V. M., y Leal, F. (2020). Taxonomy and Botany of the Caricaceae. En *Horticultural Reviews* (pp. 289–323). <https://doi.org/doi:10.1002/9781119625407.ch6>
- Baggerman, G., Vierstraete, E., De Loof, A., y Schoofs, L. (2005). Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*,

8(8), 669–677. <https://doi.org/10.2174/138620705774962490>

- Bassols, A., Bendixen, E., y Miller, I. (2017). *Chapter 9 - From Farm to Fork: Proteomics in Farm Animal Care and Food Production* (M. L. B. T.-P. in F. S. Colgrave (Ed.); pp. 145–161). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00009-6>
- Bhuiyan, F. R., Campos, N. A., Swennen, R., y Carpentier, S. (2020). Characterizing fruit ripening in plantain and Cavendish bananas: A proteomics approach. *Journal of Proteomics*, 214, 103632. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103632>
- Bilgin, D. D., Zavala, J. A., Zhu, J., Clough, S. J., Ort, D. R., y Delucia, E. H. (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, Cell and Environment*, 33(10), 1597–1613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02167.x>
- Buron-Moles, G., Torres, R., Amoako-Andoh, F., Vinas, I., Teixido, N., Usall, J., Keulemans, W., y Davey, M. W. (2014). Analysis of changes in protein abundance after wounding in ‘Golden Delicious’ apples. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.07.039>
- Cáez-Ramírez, G., Alamilla-Beltrán, L., y Gutiérrez-López, G. F. (2018). Morphometric analysis and tissue structural continuity evaluation of senescence progression in fresh cut papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Food Engineering*, 216, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.08.004>
- Camm, E. L., y Towers, G. H. N. (1973). Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, 12(5), 961–973. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)85001-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)85001-0)
- Capelo-Martínez, J.-L. (Ed.). (2019). *Emerging Sample Treatments in Proteomics* (Vol. 1073). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-12298-0>
- Chan, K.-K., Kwok, C., Sze, E., y Lee, F. (2018). Evaluation of the Use of TRIzol-Based Protein Extraction Approach for Gel-Based Proteomic Analysis of Dried Seafood Products and Chinese Tonic Foods. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1998. <https://doi.org/10.3390/ijms19071998>

- Chaves, I., Pinheiro, C., Paiva, J. A. P., Planchon, S., Sergeant, K., Renaut, J., Graça, J. A., Costa, G., Coelho, A. V., y Ricardo, C. P. P. (2009). Proteomic evaluation of wound-healing processes in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber tissue. *PROTEOMICS*, 9(17), 4154–4175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pmic.200700649>
- Chávez-Pesqueira, M., y Núñez-Farfán, J. (2017). Domestication and Genetics of Papaya: A Review. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5(DEC), 155. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00155>
- Chávez-Sánchez, I., Carrillo-López, A., Vega-García, M., y Yahia, E. M. (2013). The effect of antifungal hot-water treatments on papaya postharvest quality and activity of pectinmethylesterase and polygalacturonase. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 101–107. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0228-0>
- Chen, J., He, L., Jang, Y., Kuang, J., Lu, C., Joyce, D. C., Macnish, A., He, Y.-X., y Lu, W. (2009). Expression of PAL and HSPs in fresh-cut banana fruit. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 31–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.019>
- Chen, Y., Rofidal, V., Hem, S., Gil, J., Nosarzewska, J., Berger, N., Demolombe, V., Bouzayen, M., Azhar, B. J., Shakeel, S. N., Schaller, G. E., Binder, B. M., Santoni, V., y Chervin, C. (2019). Targeted Proteomics Allows Quantification of Ethylene Receptors and Reveals SIETR3 Accumulation in Never-Ripe Tomatoes. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1054. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01054>
- Claudius, M., y Ludivine, T. (2017). Proteomic as a Tool to Study Fruit Ripening. En M. L. Colgrave (Ed.), *Proteomics in Food Science: From Farm to Fork* (1a ed., pp. 127–141). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00008-4>
- Dapic, I., Uwugiaren, N., Jansen, P. J., y Corthals, G. L. (2017). Fast and Simple Protocols for Mass Spectrometry-Based Proteomics of Small Fresh Frozen Uterine Tissue Sections. *Analytical Chemistry*, 89(20), 10769–10775. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01937>
- de Godoy, A. E., Jacomino, A. P., Cerqueira-Pereira, E. C., Dias Gutierrez, A. D. S., Morais

- Vieira, C. E., y Forato, L. A. (2010). Mechanical Injuries and the Effects on the Quality of Golden Papaya Fruits. *Revista Brasileira De Fruticultura*, 32(3), 682–691. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000086>
- Dorfer, V., Pichler, P., Stranzl, T., Stadlmann, J., Taus, T., Winkler, S., y Mechtler, K. (2014). MS Amanda, a Universal Identification Algorithm Optimized for High Accuracy Tandem Mass Spectra. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3679–3684. <https://doi.org/10.1021/pr500202e>
- Drabovich, A. P., Pavlou, M. P., Batruch, I., y Diamandis, E. P. (2013). Proteomic and Mass Spectrometry Technologies for Biomarker Discovery. En H. J. Issaq & T. D. B. T.-P. and M. A. to B. D. Veenstra (Eds.), *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery* (pp. 17–37). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394446-7.00002-9>
- Du, L., Song, J., Campbell Palmer, L., Fillmore, S., y Zhang, Z. (2017). Quantitative proteomic changes in development of superficial scald disorder and its response to diphenylamine and 1-MCP treatments in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 123, 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.005>
- Eng, J. K., McCormack, A. L., y Yates, J. R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5(11), 976–989. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(94\)80016-2](https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)80016-2)
- Falara, V., Manganaris, G. A., Ziliotto, F., Manganaris, A., Bonghi, C., Ramina, A., y Kanellis, A. K. (2011). A β -d-xylosidase and a PR-4B precursor identified as genes accounting for differences in peach cold storage tolerance. *Functional & Integrative Genomics*, 11(2), 357–368. <https://doi.org/10.1007/s10142-010-0204-1>
- Faurobert, M., Pelpoir, E., y Chaïb, J. (2007). Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. En H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, & V. Méchin (Eds.), *Plant Proteomics* (1a ed., Vol. 335, pp. 9–14). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:9>

-
- Fruleux, A., Verger, S., y Boudaoud, A. (2019). Feeling Stressed or Strained? A Biophysical Model for Cell Wall Mechanosensing in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 757. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00757>
- Fuentes, G., y Santamaría, J. M. (2014). Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production. En *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 3–15). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_1
- Galazzi, R. M., de Jesus, J. R., y Arruda, M. A. Z. (2019). Sample Preparation Focusing on Plant Omics. En J.-L. Capelo-Martínez (Ed.), *Emerging Sample Treatments in Proteomics* (pp. 161–185). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12298-0_7
- Gantait, S., Sarkar, S., y Verma, S. K. (2019). Marker-assisted Selection for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. En A. Roychoudhury & D. Tripathi (Eds.), *Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology* (pp. 335–368). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119463665.CH18>
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J. F., y Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37(3), 263–285. <https://doi.org/10.1023/A:1020835304842>
- Geetika, S., Ruqia, M., Harpreet, K., Neha, D., Shruti, K., y Singh, S. P. (2018). Genetic Engineering in Papaya. En *Genetic Engineering of Horticultural Crops* (1a ed., pp. 137–154). Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810439-2.00007-6>
- Giovannoni, J. (2001). MOLECULAR BIOLOGY OF FRUIT MATURATION AND RIPENING. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 725–749.
- Giovannoni, J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. En *Plant Cell* (Vol. 16, Número SUPPL., pp. S170–S180). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>
- Gonsalves, D. (2014). Hawaii's Transgenic Papaya Story 1978–2012: A Personal Account. En *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 115–142). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_7
-

- Gururani, M. A., Venkatesh, J., y Tran, L. S. P. (2015). Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. *Molecular Plant*, 8(9), 1304–1320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.05.005>
- Hewajulige, I. G. N., y Dhekney, S. A. (2015). Papayas. En B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 209–212). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00517-1>
- Huerta-Ocampo, J. Á., Osuna-Castro, J. A., Lino-López, G. J., Barrera-Pacheco, A., Mendoza-Hernández, G., De León-Rodríguez, A., y Barba de la Rosa, A. P. (2012). Proteomic analysis of differentially accumulated proteins during ripening and in response to 1-MCP in papaya fruit. *Journal of Proteomics*, 75(7), 2160–2169. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2012.01.015>
- Hussein, Z., Fawole, O. A., y Opara, U. L. (2018). Preharvest factors influencing bruise damage of fresh fruits – a review. En *Scientia Horticulturae* (Vol. 229, pp. 45–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.028>
- Issaq, H. J., y Veenstra, T. D. (2020). Biomarker discovery: Study design and execution. En H. J. Issaq & T. D. B. T.-P. and M. A. to B. D. (Second E. Veenstra (Eds.), *Biomarker discovery: Study design and execution* (pp. 1–16). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.00001-3>
- Iwahashi, Y., y Hosoda, H. (2000). Effect of heat stress on tomato fruit protein expression. *Electrophoresis*, 21(9), 1766–1771. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000501\)21:9<1766::AID-ELPS1766>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000501)21:9<1766::AID-ELPS1766>3.0.CO;2-K)
- Jaffe, M. J. (1973). Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation - With special reference to *Bryonia dioica*. *Planta*, 114(2), 143–157. <https://doi.org/10.1007/BF00387472>
- Jain, D., y Khurana, J. P. (2018). *Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism BT - Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction* (A. Singh & I. K. Singh (Eds.); pp. 265–281). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7371-7_12

- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, J., Somasundaram, R., y Panneerselvam, R. (2009). Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*, 11, 100–105.
- Jang, Z., Kumar, M., Padula, M. P., Pernice, M., Kahlke, T., Kim, M., y Ralph, P. J. (2017). Development of an Efficient Protein Extraction Method Compatible with LC-MS/MS for Proteome Mapping in Two Australian Seagrasses *Zostera muelleri* and *Posidonia australis*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1416. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01416>
- Ji, F. S., Tang, L., Li, Y. Y., Wang, W. C., Yang, Z., Li, X. G., y Zeng, C. (2019). Differential proteomic analysis reveals the mechanism of *Musa paradisiaca* responding to salt stress. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 1057–1068. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4564-2>
- Jiang, B., Ou, S., Xu, L., Mai, W., Ye, M., Gu, H., Zhang, T., Yuan, C., Shen, C., Wang, J., y Liu, K. (2019). Comparative proteomic analysis provides novel insights into the regulation mechanism underlying papaya (*Carica papaya* L.) exocarp during fruit ripening process. *BMC Plant Biology*, 19(1), 238. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1845-4>
- Jiménez, V. M., Mora-Newcomer, E., y Gutiérrez-Soto, M. V. (2014). Biology of the Papaya Plant. En *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 17–33). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_2
- Kanehisa, M., y Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kanehisa, M., y Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, 29(1), 28–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Klee, C. B., Crouch, T. H., y Richman, P. G. (1980). Calmodulin. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), 489–515. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.002421>
- Kollist, H., Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Nuhkat, M., Kangasjärvi, J., y Mittler, R. (2019).

- Rapid Responses to Abiotic Stress: Priming the Landscape for the Signal Transduction Network. En *Trends in Plant Science* (Vol. 24, Número 1, pp. 25–37). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.003>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T., y Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. En *Journal of Proteomics* (Vol. 74, Número 8, pp. 1301–1322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.02.006>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., Prášil, I. T., y Renaut, J. (2018). Plant abiotic stress proteomics: The major factors determining alterations in cellular proteome. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00122>
- Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., y Tompa, P. (2008). Chaperone Activity of ERD10 and ERD14, Two Disordered Stress-Related Plant Proteins. *Plant Physiology*, 147(1), 381 LP – 390. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118208>
- Krishna, K. L., Paridhavi, M., y Patel, J. A. (2008). Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* linn.). *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 7(4), 364–373. <https://doi.org/0975-6299>
- Kucukural, A., Yukselen, O., Ozata, D. M., Moore, M. J., y Garber, M. (2019). DEBrowser: interactive differential expression analysis and visualization tool for count data. *BMC Genomics*, 20(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5362-x>
- Letunic, I., Doerks, T., y Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D257–D260. <https://doi.org/10.1093/nar/gku949>
- Li, Ban, Z., Limwachiranon, J., y Luo, Z. (2017). Proteomic Studies on Fruit Ripening and Senescence. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36(2), 116–127. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1355173>
- Li, M., Li, D., Feng, F., Zhang, S., Ma, F., y Cheng, L. (2016). Proteomic analysis reveals dynamic regulation of fruit development and sugar and acid accumulation in apple. *Journal of Experimental Botany*, 67(17), 5145–5157.

<https://doi.org/10.1093/jxb/erw277>

- Li, y Thomas, C. (2014). Quantitative evaluation of mechanical damage to fresh fruits. *Trends in Food Science & Technology*, 35(2), 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.12.001>
- Lindquist, E., y Aronsson, H. (2018). Chloroplast vesicle transport. *Photosynthesis Research*, 138(3), 361–371. <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0566-0>
- Liu, K., Yuan, C., Li, H., Chen, K., Lu, L., Shen, C., y Zheng, X. (2018). A qualitative proteome-wide lysine crotonylation profiling of papaya (*Carica papaya* L.). *Scientific Reports*, 8(1), 8230. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26676-y>
- Liu, W., Liu, J., y Rajapakse, J. C. (2018). Gene Ontology Enrichment Improves Performances of Functional Similarity of Genes. *Scientific Reports*, 8(1), 12100. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30455-0>
- Lledías, F., Hernández, F., Rivas, V., García-Mendoza, A., Cassab, G. I., y Nieto-Sotelo, J. (2017). A Rapid and Reliable Method for Total Protein Extraction from Succulent Plants for Proteomic Analysis. *The Protein Journal*, 36(4), 308–321. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9720-3>
- López-Gómez, R., Cabrera-Ponce, J. L., Saucedo-Arias, L. J., Carreto-Montoya, L., Villanueva-Arce, R., Díaz-Perez, J. C., Gómez-Lim, M. A., y Herrera-Estrella, L. (2009). Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression. *Transgenic Research*, 18(1), 89–97. <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9197-0>
- Lualdi, M., y Fasano, M. (2019). Statistical analysis of proteomics data: A review on feature selection. *Journal of Proteomics*, 198, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.004>
- Ma, B., Ding, Y., Li, C., Li, M., Ma, F., y Yuan, Y. (2019). Comparative Proteomic Analysis Reveals Key Proteins Linked to the Accumulation of Soluble Sugars and Organic Acids in the Mature Fruits of the Wild *Malus* Species. En *Plants* (Vol. 8, Número 11). <https://doi.org/10.3390/plants8110488>

- Macnee, N. C., Rebstock, R., Hallett, I. C., Schaffer, R. J., y Bulley, S. M. (2020). A review of current knowledge about the formation of native peridermal exocarp in fruit. *Functional Plant Biology*, 47(12), 1019–1031.
- Mathabe, P. M. K., Belay, Z. A., Ndlovu, T., y Caleb, O. J. (2020). Progress in proteomic profiling of horticultural commodities during postharvest handling and storage: A review. En *Scientia Horticulturae* (Vol. 261). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108996>
- Méchin, V., Damerval, C., y Zivy, M. (2007). Total Protein Extraction with TCA-Acetone. En H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, & V. Méchin (Eds.), *Plant Proteomics* (1a ed., pp. 1–8). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:1>
- Min, C. W., Gupta, R., Agrawal, G. K., Rakwal, R., y Kim, S. T. (2019). Concepts and strategies of soybean seed proteomics using the shotgun proteomics approach. *Expert Review of Proteomics*, 16(9), 795–804. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1654860>
- Mirzaei, H., & Carrasco, M. (Eds.). (2016). *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications* (Vol. 919). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5>
- Misra, B. B. (2018). *Updates on resources, software tools, and databases for plant proteomics in 2016–2017*. 39(13), 1543–1557. <https://doi.org/10.1002/elps.201700401>
- Mohanta, T. K., Khan, A., Hashem, A., Abd Allah, E. F., y Al-Harrasi, A. (2019). The molecular mass and isoelectric point of plant proteomes. *BMC Genomics*, 20(1), 631. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5983-8>
- Nakano, R. T., Ishihama, N., Wang, Y., Takagi, J., Uemura, T., Schulze-Lefert, P., y Nakagami, H. (2020). *Apoplasmic Fluid Preparation from Arabidopsis thaliana Leaves Upon Interaction with a Nonadapted Powdery Mildew Pathogen BT - Plant Proteomics: Methods and Protocols* (J. V Jorrin-Novo, L. Villedor, M. A. Castillejo, & M.-D. Rey (Eds.); pp. 79–88). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0528-8_6
- Nogueira-CS, F., Palmisano, G., Schwämmle, V., Campos, F. A. P., Larsen, M. R., Domont,

- G. B., y Roepstorff, P. (2012). Performance of isobaric and isotopic labeling in quantitative plant proteomics. *Journal of Proteome Research*, 11(5), 3046–3052. <https://doi.org/10.1021/pr300192f>
- Nogueira, S. B., Labate, C. A., Gozzo, F. C., Pilau, E. J., Lajolo, F. M., y Oliveira do Nascimento, J. R. (2012). Proteomic analysis of papaya fruit ripening using 2DE-DIGE. *Journal of Proteomics*, 75(4), 1428–1439. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.015>
- Oliveira, B., Schmitt, A., y Proteomics, P. F. (2013). Is clinical proteomics heading towards to “bench to bedside”? *Translational Proteomics*, 1(1), 53–56. <https://doi.org/10.1016/J.TRPROT.2013.05.001>
- Pacheco-Coeto, R., Cárdenas-Torres, L., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J. V., y Aquino-Pérez, G. (2019). Calosa y especies reactivas de oxígeno expresadas en hojas de caña de azúcar por daño mecánico de mosca pinta. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 22, 105–114.
- Palma, J. M., Corpas, F. J., y del Río, L. A. (2011). Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. En *Journal of Proteomics* (Vol. 74, Número 8, pp. 1230–1243). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.010>
- Palma, J. M., Corpas, F. J., Freschi, L., y Valpuesta, V. (2019). Editorial: Fruit Ripening: From Present Knowledge to Future Development. *Frontiers in Plant Science*, 10, 545. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00545>
- Paull, R. E., Nishijima, W., Reyes, M., y Cavaletto, C. (1997). Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 11(3), 165–179. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00028-8)
- Pazos, F., Pietrosevoli, N., García-Martín, J., y Solano, R. (2013). Protein intrinsic disorder in plants. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, p. 363). <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00363>
- Pedreschi, R. (2017). Postharvest Proteomics of Perishables. En M. L. Colgrave (Ed.), *Proteomics in Food Science: From Farm to Fork* (pp. 3–16). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804007-2.00001-1>

- Porter, B. W., Christopher, D. A., y Zhu, Y. J. (2014). Genomics of Papaya Disease Resistance. En *Genetics and Genomics of Papaya* (pp. 277–307). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8087-7_15
- Prinsi, B., Negri, A. S., Fedeli, C., Morgutti, S., Negrini, N., Cocucci, M., y Espen, L. (2011). Peach fruit ripening: A proteomic comparative analysis of the mesocarp of two cultivars with different flesh firmness at two ripening stages. *Phytochemistry*, 72(10), 1251–1262. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.012>
- Quintana, M. E. G., Paull, R. E., y Way, M. (1993). Mechanical Injury during Postharvest Handling of ‘ Solo ’ Papaya Fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(5), 618–622.
- Reuscher, S., Fukao, Y., Morimoto, R., Otagaki, S., Oikawa, A., Isuzugawa, K., y Shiratake, K. (2016). Quantitative Proteomics-Based Reconstruction and Identification of Metabolic Pathways and Membrane Transport Proteins Related to Sugar Accumulation in Developing Fruits of Pear (*Pyrus communis*). *Plant and Cell Physiology*, 57(3), 505–518. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw004>
- Rey, M.-D., Valledor, L., Castillejo, M. Á., Sánchez-Lucas, R., López-Hidalgo, C., Guerrero-Sanchez, V. M., Colina, F. J., Escandón, M., Maldonado-Alconada, A. M., y Jorrín-Novo, J. V. (2019). *Recent Advances in MS-Based Plant Proteomics: Proteomics Data Validation Through Integration with Other Classic and -Omics Approaches* (pp. 77–101). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/124_2019_32
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., y Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47–e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rivera-Pastrana, D. M., Yahia, E. M., y González-Aguilar, G. A. (2010). Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2358–2365. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4092>

- Roychoudhury, A., & Kumar Tripathi, D. (Eds.). (2019). *Molecular plant abiotic stress: biology and biotechnology*. John Wiley & Sons.
- Sanderfoot, A. A., y Raikhel, N. V. (1999). The Specificity of Vesicle Trafficking: Coat Proteins and SNAREs. *The Plant Cell*, 11(4), 629–641. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.629>
- Sant'Ana, D. V. P., y Lefsrud, M. (2018). Tomato proteomics: Tomato as a model for crop proteomics. *Scientia Horticulturae*, 239, 224–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.041>
- Santamaría Basulto, F., Díaz Plaza, R., Sauri Duch, E., Espadas y Gil, F., Santamaría, Fernández, J. M., y Larqué Saavedra, A. (2009). Quality Characteristics in Maradol Papaya Fruits. *Agricultura Técnica en México*, 35(3), 347–353.
- Santamaría Basulto, F., Sauri Duch, E., Espadas y Gil, F., Díaz Plaza, R., Larqué Saavedra, A., y Santamaría, J. M. (2009). POSTHARVEST RIPENING AND MATURITY INDICES FOR MARADOL PAPAYA. *Interciencia*, 34(8), 583–588.
- Saravanan, R. S., y Rose, J. K. C. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *PROTEOMICS*, 4(9), 2522–2532. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300789>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., y Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Sharma, A., Kumar, V., Sidhu, G. P. S., Kumar, R., Kohli, S. K., Yadav, P., Kapoor, D., Bali, A. S., Shahzad, B., Khanna, K., Kumar, S., Thukral, A. K., y Bhardwaj, R. (2019). Abiotic Stress Management in Plants: Role of Ethylene. En *Molecular Plant Abiotic Stress* (pp. 185–208). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119463665.ch10>
- Shin, M. H., Muneer, S., Kim, Y.-H., Lee, J. J., Bae, D. W., Kwack, Y.-B., Kumarihami, H. M. P. C., y Kim, J. G. (2020). Proteomic analysis reveals dynamic regulation of fruit ripening in response to exogenous ethylene in kiwifruit cultivars. *Horticulture*,

Environment, and Biotechnology, 61(1), 93–114. <https://doi.org/10.1007/s13580-019-00209-6>

Siddiqui, M. W. (2018). *Preharvest modulation of postharvest fruit and vegetable quality* (Vol. 1). Academic Press.

Soares, E. de A., Werth, E. G., Madroñero, L. J., Ventura, J. A., Rodrigues, S. P., Hicks, L. M., y Fernandes, P. M. B. (2017). Label-free quantitative proteomic analysis of pre-flowering PMeV-infected *Carica papaya* L. *Journal of Proteomics*, 151, 275–283. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2016.06.025>

Sparke, M., y Wünsche, J. (2020). Mechanosensing of Plants. En I. Warrington (Ed.), *Horticultural Reviews* (Vol. 47, pp. 43–83). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119625407.ch2>

Sun, S., Zhou, J.-Y., Yang, W., y Zhang, H. (2014). Inhibition of protein carbamylation in urea solution using ammonium-containing buffers. *Analytical Biochemistry*, 446, 76–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.10.024>

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., y Mering, C. von. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

Tan, B. C., Lim, Y. S., y Lau, S.-E. (2017). Proteomics in commercial crops: An overview. *Journal of Proteomics*, 169, 176–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.018>

Tang, H., Zhang, X., Gong, B., Yan, Y., y Shi, Q. (2020). Proteomics and metabolomics analysis of tomato fruit at different maturity stages and under salt treatment. *Food Chemistry*, 311, 126009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126009>

Teixeira, Rashid, Z., Nhut, D. T., Sivakumar, D., Gera, A., Teixeira, M., y Tennant, P. F. (2007). Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. *Tree For Sci Biotech*,

1, 47–73.

- Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., & Méchin, V. (Eds.). (2007). *Plant Proteomics Methods and Protocols* (1a ed.). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1597452270>
- Tosetti, R., Tardelli, F., Tadiello, A., Zaffalon, V., Giorgi, F. M., Guidi, L., Trainotti, L., Bonghi, C., y Tonutti, P. (2014). Molecular and biochemical responses to wounding in mesocarp of ripe peach (*Prunus persica* L. Batsch) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *90*, 40–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.12.001>
- Tucker, G., Yin, X., Zhang, A., Wang, M., Zhu, Q., Liu, X., Xie, X., Chen, K., y Grierson, D. (2017). Ethylene and fruit softening. *Food Quality and Safety*, *1*(4), 253–267. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx024>
- Valencia Sandoval, K., Duana Ávila, D., y Hernández Gracia, T. J. (2017). Estudio del mercado de papaya mexicana: un análisis de su competitividad (2001-2015). *Suma de Negocios*, *8*(18), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.sumneg.2017.10.002>
- Vázquez-García, E., Chávez-Franco, S., Ariza-Flores, R., Yahia-Kazuz, E., Salazar-Zazueta, A., Saucedo-Veloz, C., y Colinas-León, M. T. (2003). PROPIEDADES MECÁNICAS DE FRUTOS DE PAPAYA 'MARADOL ROJA' BAJO COMPRESIÓN ESTÁTICA. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, *IX*(02), 345–350. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2000.12.088>
- Vega-García, M. O., López-Espinoza, G., Ontiveros, J. C., Caro-Corrales, J. J., Vargas, F. D., y López-Valenzuela, J. A. (2010). Changes in Protein Expression Associated with Chilling Injury in Tomato Fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *135*(1), 83–89. <https://doi.org/10.21273/JASHS.135.1.83>
- Velásquez-Herrera, J. D., Quintero-Castaño, V. D., y Lucas-Aguirre, J. C. (2016). EVALUACIÓN DE LAS PERDIDAS POSCOSECHA EN PAPAYA (*Carica Papaya* L.) VARIEDAD MARADOL. *Vitae*, *23*(1), 790–794. <https://doi.org/ISSNe 2145-2660>
- Vincente, A. R., Manganaris, G. A., Ortiz, C. M., Sozzi, G. O., y Crisosto, C. H. (2014). Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. En W. J. Florkowski, R. L. Shewfelt, B. Brueckner, & S. E. B. T.-P. H. (Third E. Prussia (Eds.)), *Postharvest Handling* (pp. 69–

- 122). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408137-6.00005-3>
- Walsh, I., Martin, A. J. M., Di Domenico, T., y Tosatto, S. C. E. (2012). ESpritz: accurate and fast prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, 28(4), 503–509. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr682>
- Wang, L., McShane, A. J., Castillo, M. J., y Yao, X. (2020). Quantitative proteomics in development of disease protein biomarkers. En H. J. Issaq & T. D. Veenestra (Eds.), *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery* (2a ed., pp. 261–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818607-7.00015-3>
- Wu, J., y Baldwin, I. T. (2009). Herbivory-induced signalling in plants: perception and action. *Plant, Cell & Environment*, 32(9), 1161–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01943.x>
- Wu, X., Gong, F., y Wang, W. (2014). Protein extraction from plant tissues for 2DE and its application in proteomic analysis. *Proteomics*, 14(6), 645–658. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300239>
- Xiao, L., Li, T., Jang, G., Jang, Y., y Duan, X. (2019). Cell wall proteome analysis of banana fruit softening using iTRAQ technology. *Journal of Proteomics*, 209, 103506. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103506>
- Yao, B. N., Tano, K., Konan, H. K., Bédié, G. K., Oulé, M. K., Koffi-Nevry, R., y Arul, J. (2012). The role of hydrolases in the loss of firmness and of the changes in sugar content during the post-harvest maturation of *Carica papaya* L. var solo 8. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 3309–3316. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0858-x>
- You, R., Yao, S., Xiong, Y., Huang, X., Sun, F., Mamitsuka, H., y Zhu, S. (2019). NetGO: improving large-scale protein function prediction with massive network information. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W379–W387. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz388>
- Zerpa-Catanho, D., Esquivel, P., Mora-Newcomer, E., Sáenz, M. V., Herrera, R., y Jiménez, V. M. (2017). Transcription analysis of softening-related genes during postharvest of papaya fruit (*Carica papaya* L. ‘Pococi’ hybrid). *Postharvest Biology and Technology*,

125, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.11.002>

Zhao, Y., Qian, C., Chen, J., Peng, Y., y Mao, L. (2010). Responses of phospholipase D and lipoxygenase to mechanical wounding in postharvest cucumber fruits. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 11(6), 443–450. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900357>

