



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“Inmunodetección de la proteína DING en diferentes
estadios de semillas y hojas de chile habanero
(*Capsicum chinense* Jacq.)”**

Tesis que presenta

DIANELI DE JESÚS MADERA PIÑA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

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 **Dianeli de Jesús Madera Piña** titulado “**Inmunodetección de la proteína DING en diferentes estadios de semillas y hojas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)**” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea de investigación planta-ambiente, en el laboratorio 06 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Ignacio Islas Flores, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, agosto de 2016.

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: _____

Nombre: I.B.Q. Dianeli de Jesús Madera Piña

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Caracterización bioquímica de una proteína DING con elevado potencial terapéutico y agroecológico, presente en la fracción proteica G10P1.7.57 de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)” CB2010/157135 bajo la dirección del Dr. Ignacio Islas Flores.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo al proyecto CB2010/157135 titulado: “Caracterización bioquímica de una proteína DING con elevado potencial terapéutico y agroecológico, presente en la fracción proteica G10P1.7.57 de semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)” y por la beca de Maestría 549976/307854, otorgada a Dianeli de Jesús Madera Piña.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por las facilidades para la realización de este trabajo de investigación, en especial a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP).

Al CICY por la beca de movilidad otorgada a Dianeli de Jesús Madera Piña, así como al proyecto CONACYT CB2010/157135. Ambos, por los apoyos económicos recibidos para acudir al XXX Congreso Nacional de Bioquímica; que se realizó del 2 al 8 de noviembre del 2014 en la Cd. de Guadalajara, Jalisco.

A los miembros del comité tutorial, Doctores Ignacio Rodrigo Islas Flores, Marco Antonio Villanueva Méndez, Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia Medrano, Dra. Ileana Echevarría Machado. Gracias por el tiempo y las contribuciones académicas con las que de manera generosa aportaron para mi formación y para la realización de este trabajo. En especial a la Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia Medrano por su asesoría y dirección mientras mi asesor principal estuvo ausente.

A mi comité revisor conformado por los Doctores Ignacio Rodrigo Islas Flores, Marco Antonio Villanueva Méndez, Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia Medrano, Dra. Ileana Echevarría Machado y Dra. Nancy Santana Buzzy, por la revisión y mejora del documento de tesis.

A la M.C, Ligia Guadalupe Brito Argáez, por todo el apoyo técnico y consejos recibidos durante la realización de este estudio y mi estancia en el laboratorio 06 de la UBBMP; así como por su amistad.

Al ingeniero Fernando Contreras Martín y al personal a su cargo, por el cuidado y riego de las plantas de chile habanero que sirvieron como materia prima para la realización de este

trabajo.

Al M.C Jacobo Pérez Pastrana, por sus consejos y ayuda en el proceso de histología.

A la M.C Ángela Kú González, por sus consejos y apoyo técnico en el proceso de histología, así como en el uso de los equipos de microscopía; en especial en el microscopio confocal.

A las doctoras Luisa Alhucema López Ochoa, Nancy Santana Buzzy, Ileana Echevarría y Teresa Hernández Sotomayor, por facilitarme el acceso a sus equipos de laboratorio para la realización de algunos de mis experimentos.

A los doctores de la UBBMP por sus conocimientos compartidos en las aulas de clases, así como fuera de ellas.

A la Unidad Académica Puerto Morelos, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, en el Estado de Quintana Roo, México; por las facilidades otorgadas durante la estancia realizada en el laboratorio 9 a cargo del Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez. Se agradece también a la M.C Patricia Cabrales Arellano, el M.C Raúl Castillo Medina y la Dra. Tania Islas Flores quienes hicieron grata la estancia.

A mis compañeros del laboratorio 06, Martha Chi, Rita Uc, Daniel Ojeda, Aarón Tamayo, Yamily Burgos, Margarita Morales, Eligio Moreno y Mildred Carrillo con quienes he compartido momentos de arduo trabajo, así como de amistad, diversión y alegrías.

A mis amigos y compañeros de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular con quienes compartí clases y cursos, por todos los buenos momentos de aprendizaje a su lado. También, a mis amigos de otras unidades de CICY con los que tuve la oportunidad de convivir.

Finalmente quiero agradecer al director del proyecto, Dr. Ignacio Islas Flores por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por sus consejos, paciencia y enseñanzas durante el proceso experimental, así como de escritura de tesis.

DEDICATORIAS

Ante todo, Gracias a **Dios** por haberme prestado vida y salud para llevar a cabo la realización de este trabajo.

Con amor para mis padres: Carmen y Mario.

Por todo el inmenso amor, la comprensión y el apoyo que he recibido de su parte para mi crecimiento profesional. Gracias por todos sus sacrificios para brindarme una mejor educación.

A Farid, Daniela y Mauricio.

Por la motivación a superarme como persona y profesionista para poder ser un ejemplo para mi sobrino Mauricio.

A mi abuelo y abuelas: Jorge, Luisa y Dely.

Por ser mi inspiración de guerreros ante las adversidades de la vida y para los cuales siempre he sido su gran orgullo.

A mis tíos y tías.

Por su incondicional apoyo y consejos para mi crecimiento profesional.

A Yasmin, Aglae, Sherel, Miguel y Mauricio.

Por inyectarle alegría a mi vida y dibujar una sonrisa en mi rostro en momentos de estrés o desánimo.

A mis amigos y amigas:

Les agradezco todo el cariño y apoyo que me brindaron durante esta etapa de mi vida, por respetar mi espacio y profesión. Gracias por estar conmigo en los buenos y malos momentos; gracias por ser parte importante de mi vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 Género <i>Capsicum</i>	5
1.2 Taxonomía del chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	8
1.2.1 Descripción de chile habanero (<i>C. chinense</i> Jacq.)	9
1.3 Uso medicinal y terapéutico de <i>C. chinense</i> Jacq.	11
1.4 Proteínas DING	12
1.4.1 Estructura de la proteína DING.....	13
1.4.2 Proteínas DING en plantas	15
1.4.3 Localización subcelular de las proteínas DING	16
PROBLEMÁTICA A RESOLVER	18
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
CAPÍTULO II	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.1 Procedencia del material biológico	25

2.1.1 Obtención de semillas y hojas de <i>C. chinense</i>	25
2.1.2 Extracción de fracciones proteicas de semillas y hojas de <i>C. chinense</i>	25
2.1.2.1 Extracción de fracciones proteicas totales, solubles y membranales de diferentes estadios fisiológicos de hojas y semillas de <i>C. chinense</i>	25
2.1.2.2 Extracción de fracciones proteicas totales, solubles y membranales de hojas senescentes y semillas de <i>C. chinense</i> de 65 dpa	26
2.1.3 Cuantificación de proteínas mediante el método de Peterson (1977).....	28
2.1.4 Electroforesis	29
2.1.5 Electrotransferencia	29
2.1.6 Western blot	30
2.1.7 Experimento “tipo competencia”	30
2.1.8 Far western blot	31
2.1.9 Actividad endógena de fosfatasa alcalina	32
2.1.10 Anticuerpo COM2 conjugado a fluoróforos.....	32
2.1.10.1 Anticuerpo COM2 conjugado a cloruro de dabsilo (COM2-DAB).....	32
2.1.10.2 Conjugación del anticuerpo COM2 a Alexa Fluor 488 (COM2-AlexaF488)	33
2.1.11 Proceso de histología	33
2.1.11.1 Fijación de las semillas de chile habanero en solución de formaldehído.....	33
2.1.11.2 Proceso de deshidratación	34
2.1.11.3 Inclusión de las semillas de chile habanero en parafina	34
2.1.11.4 Cortes histológicos.....	35
2.1.11.5 Desparafinación de muestras	35

2.1.11.6 Incubación con COM2-DAB, COM2-AlexaF488, AlexaF488 conjugado a anticuerpo secundario contra IgG de conejo y otros fluoróforos	36
2.1.11.7 Microscopía confocal	37
2.1.12 Localización de gránulos de almidón en semillas de 65 dpa (SM65).....	38
CAPÍTULO III	39
RESULTADOS.....	39
3.1 Comparación del contenido proteico en fracciones de hojas y semillas de <i>C. chinense</i>	39
3.1.1 Perfil de proteínas en geles de SDS-PAGE y detección de la proteína DING por western blot en extractos proteicos de hojas de <i>C. chinense</i> en diferentes estadios de desarrollo.....	41
3.1.2 Perfil de proteína en geles de SDS-PAGE, análisis por western blot y actividad de fosfatasa endógena en extractos de proteína de hojas senescentes de <i>C. chinense</i>	44
3.1.3 Perfil de proteína en geles de SDS-PAGE y western blot en extractos proteicos de semillas de <i>C. chinense</i> en diferentes estadios de desarrollo	47
3.1.4 Perfil de proteína en geles de SDS-PAGE, análisis por western blot y actividad de fosfatasa endógena en extractos proteicos de semillas de 65 dpa.....	50
3. 1.5 Perfiles de proteínas en geles de SDS-PAGE, análisis de “tipo competencia” y far western de extractos de hojas senescentes y de semillas de <i>C. chinense</i> 65 dpa	53
3.2 Resultados de microscopía confocal	55
3.2.1 Inmunocitlocalización de la proteína DING en semillas de 25 dpa	55
3.2.1.1 Inmunocitlocalización de la proteína DING en semillas de 25 dpa mediante el anticuerpo COM2-DAB	55
3.2.1.2 Inmunocitlocalización de la proteína DING en semillas de 25 dpa mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488	57
3.2.2 Inmunocitlocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa	59

3.2.2.1 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa mediante el anticuerpo COM2-DAB	59
3.2.2.2 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488	61
3.2.2.3 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa mediante el anticuerpo COM2 y un anticuerpo secundario acoplado a AlexaF488.	65
3.3 Localización de gránulos de almidón en SM65	67
CAPÍTULO IV	69
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	69
CAPÍTULO V	79
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	79
5. CONCLUSIONES	79
5.1 PERSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFÍA.....	81

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1 Caracterización anatómica de semillas de <i>Capsicum</i> sp.	6
Figura 1. 2 Caracterización anatómica de una semilla de <i>C. annuum</i>	7
Figura 1. 3 Caracterización morfológica de un corte transversal de una semilla de <i>Capsicum</i> sp.	7
Figura 1. 4 Plantas de chile habanero creciendo en condiciones de invernadero.....	9
Figura 1. 5 Tipos de hoja de chile habanero.	10
Figura 1. 6 Morfología de <i>C. chinense</i> Jacq.	11
Figura 1. 7 Secciones macroscópicas de chile habanero.....	11
Figura 1. 8 Comparación de la estructura general de la proteína DING de <i>Pseudomonas fluorescens</i> con la proteína HPBP humana.....	14
Figura 1. 9 Estrategia para la obtención del material biológico.....	22
Figura 1. 10 Evaluación de la proteína DING en diferentes ensayos inmunológicos y enzimáticos.....	23
Figura 1. 11 Histología e inmunocitlocalización.....	24
Figura 3. 1 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína total de hojas de chile habanero con diferente grado de desarrollo.....	42
Figura 3. 2 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína soluble de hojas de chile habanero en diferente estadio de desarrollo.....	43
Figura 3. 3 Perfil de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 a partir de proteínas membranales de hojas de chile habanero en diferente estadio de desarrollo...	44

Figura 3. 4 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 de fracciones de proteína total, soluble y membranal de hojas senescentes de chile habanero.	46
Figura 3. 5 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína total de semillas de chile habanero en diferentes etapas de desarrollo.....	47
Figura 3. 6 Perfil de proteína e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína soluble de semillas de chile habanero en diferentes estadios de desarrollo..	49
Figura 3. 7 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en proteína membranal obtenida a partir de semillas de chile habanero en diferentes estadios de desarrollo.....	50
Figura 3. 8 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones proteicas de semillas de chile habanero de 65 dpa.....	52
Figura 3. 9 Patrón de proteínas y evaluación de inmunodetección con el anticuerpo COM2 en proteínas solubles de hojas senescentes y semillas de chile habanero de 65 dpa mediante western blot, ensayo “tipo competencia” y far western blot.....	54
Figura 3. 10 Inmunocitlocalización de la proteína DING mediante el anticuerpo COM2-DAB en semillas de chile habanero de 25 dpa.....	56
Figura 3. 11 Inmunocitlocalización de la proteína DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en semillas de chile habanero de 25 dpa.	58
Figura 3. 12 Inmunocitlocalización de la proteína DING con el anticuerpo COM2-DAB en semillas de chile habanero de 65 dpa.....	59
Figura 3. 13 Detección de autofluorescencia en corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65).	60
Figura 3. 14 Inmunocitlocalización mediante el anticuerpo COM2-DAB de las proteínas DING en un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65).	61

Figura 3. 15 Inmunocitocalización de la proteína DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en semillas de chile habanero de 65 dpa.	62
Figura 3. 16 Detección de autofluorescencia de un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65).	63
Figura 3. 17 Inmunocitocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en corte histológico longitudinal de semillas de chile habanero de 65 dpa (SM65).	64
Figura 3. 18 Inmunocitocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en corte histológico longitudinal de semillas de chile habanero de 65 dpa (SM65).	65
Figura 3. 19 Control de pegado inespecífico del anticuerpo secundario-AlexaF488 en semillas de 65 dpa (SM65).	66
Figura 3. 20 Inmunocitocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo primario COM2 y un anticuerpo secundario-AlexaF488, en un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65).	67
Figura 3. 21 Localización de gránulos de almidón en un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65).	68

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. 1 Taxonomía y nomenclatura de chile habanero de la Península de Yucatán (Tomada del Diario Oficial del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, 2010)..... 8

Cuadro 1. 2 Proteínas DING reportadas en plantas 15

Cuadro 3. 1 Comparación de contenido proteico en diferentes fracciones de hojas senescentes de chile habanero.....39

Cuadro 3. 2 Comparación de contenido proteico en diferentes fracciones de semillas de chile habanero de 65 dpa. 40

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius, unidad termométrica
µg	Microgramo, unidad de masa que equivale a 1×10^{-9} kg o 1×10^{-6} g
µL	Microlitro, unidad de volumen equivalente 1×10^{-6} L
BCIP	Bromo-cloro-indolil-fosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C/EBPβ	<i>CCAAT/enhancer-binding protein beta</i> , por sus siglas en inglés, es un factor de transcripción, una proteína importante en la regulación de genes implicados en las respuestas inmunes e inflamatorias
CAI	Proteína de secreción involucrada en la inhibición de la adhesión de los cristales de oxalato de calcio
cm	Centímetro, una unidad de longitud
COM2	Anticuerpo policlonal específico contra proteínas DING
COM2-AlexaF488	Anticuerpo policlonal COM2 conjugado a Alexa Fluor 488
COM2-DAB	Anticuerpo policlonal COM2 conjugado a cloruro de dabsilo
CTC	Solución compuesta por 0.1% sulfato de cobre pentahidratado, 0.2% tartrato de sodio y potasio y 10% carbonato de sodio
DING	Familia de proteínas que se caracteriza por su alta conservación de la secuencia de aminoácidos ácido aspártico (D), isoleucina (I), asparagina (N) y glicina (G) en el extremo N-terminal
DOC	Desoxicolato de sodio

dpa	Días post-antesis
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGTA	Ácido tetraacético etilenglicol
et al.	Expresión latina et alii, que significa 'y otros'
g	Gramo, unidad de masa del sistema métrico decimal, equivale a la milésima parte del kilogramo
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa (RCF) o fuerza G; es la fuerza requerida para que se produzca la separación. Las unidades de esta fuerza se expresan en número de veces el valor de la gravedad
G10P1.7.57	Fracción proteica obtenida de semillas de chile habanero, que contiene proteínas DING y denominada G10P1.7.57
h	Hora, unidad de tiempo
HJ	Hojas jóvenes de chile habanero
HM	Hojas maduras de chile habanero
HPBP	Human phosphate binding protein, por sus siglas en inglés. Es una proteína humana de unión a fosfato
HS	Hojas senescentes de chile habanero
i.e	Del latín <i>id est</i> que significa "that is" (esto es, es decir)
in de Hg	Pulgadas de mercurio, presión o magnitud que relaciona la fuerza aplicada a una superficie y el área de la misma
kDa	Unidad de masa molecular equivalente a 1.000 daltones. Un

dalton es la décima parte de la masa del átomo de carbono y equivale a $1,66 \times 10^{-24}$ g

LY	Lucifer yellow
m	Metro, unidad de longitud
min	Minutos, unidad de tiempo
mL	Mililitro, unidad de volumen
mM	Milimolar, equivalente a 10^{-3} molar, donde molaridad, se define como la cantidad de soluto (expresada en moles) por litro de disolución, o por unidad de volumen disponible de las especies
mm	Milímetro, unidad de longitud
MW	Marcador estándar de masa molecular de proteínas conocidas
NBT	Nitroazul de tetrazolio
nm	Nanómetro, unidad de longitud que equivale a un mil millonésima parte de un metro
p27^{SJ}	Proteína DING obtenida de la hierba de San Juan (<i>Hypericum perforatum</i>)
PBS	Amortiguador de fosfatos (por sus siglas en inglés “phosphate-buffered saline”)
PBSTw	PBS adicionado con 0.025% de Tween 20
pH	Coefficiente que indica el grado de acidez o basicidad de una solución acuosa
PI	Ioduro de propidio (por sus siglas en inglés Propidium Iodide)

PM	Proteína membranal
PMHS-(n)	Proteína membranal de hojas senescentes de chile habanero. Donde (n) representa el número de veces que el extracto membranal ha sido sometido a procesos de lavado o extracción
PMHSi	Proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal de hojas senescentes de chile habanero
PMHS-Ls	Fracción membranal de hojas senescentes lavada con NaCl
PMHS-LTr	Proteína membranal de hojas senescentes lavadas con Tritón X-100
PMHSrTr	Proteína membranal de hojas senescentes de chile habanero recalcitrante a Tritón X-100
PMHSTr	Proteína membranal de hojas senescentes de chile habanero recuperada con Tritón X-100
PMi	Proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal
PMrTr	Proteína de membrana recalcitrante a Tritón X-100
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PMSM65-(n)	Proteína membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa. Donde (n) representa el número de veces que el extracto membranal ha sido sometido a procesos de lavado o extracción
PMSM65i	Proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa
PMSM65-Ls	Fracción membranal de semillas de 65 dpa lavada con NaCl
PMSM65-LTr	Proteína membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa

	lavada con Tritón X-100
PMSM65rTr	Proteína membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa recalcitrante a Tritón X-100
PMSM65Tr	Proteína membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa recuperada con Tritón X-100
PMTr	Proteína de membrana recuperada con Tritón X-100
PS	Proteína soluble
PSHS	Proteína soluble de hojas senescentes de chile habanero
PSHSm	Proteína soluble de hojas senescentes de chile habanero (donde m corresponde a una concentración menor de proteína respecto a PSHS)
PSSM65	Proteína soluble de semillas de chile habanero de 65 dpa
PSSM65m	Proteína soluble de semillas de chile habanero de 65 dpa (donde m corresponde a una concentración menor de proteína respecto a PSSM65)
Pts.	Phosphate-binding protein Pts. por sus siglas en inglés. Es un componente de unión al transportador pstSACB (tipo ABC) que participan en la importación de fosfato
PT	Proteína total
PTHS	Proteína total de hojas senescentes de chile habanero
PTSM65	Proteína total de semillas de chile habanero de 65 dpa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

rpm	Revoluciones por minuto. Unidad de frecuencia que se usa también para expresar velocidad angular. En este contexto, se indica el número de rotaciones completadas cada minuto por un cuerpo que gira alrededor de un eje
s	Segundos, unidad de tiempo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SI25	Semillas de 25 dpa
SM65	Semillas de 65 dpa.
SS45	Semillas de 45 dpa
Tat	Es una proteína viral, así como gen del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El nombre de esta proteína es derivado de <i>Trans-Activator of Transcription</i> (transactivador de la transcripción genética)
TCA	Ácido tricloro acético
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato.
V	Volt, es la unidad derivada del sistema internacional para el potencial eléctrico, la fuerza electromotriz y la tensión eléctrica
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana clase 1
X-DING-CD4	Proteína DING secretada por las células CD4 ⁺ en humanos resistentes al virus del VIH-1

RESUMEN

Las proteínas DING se denominan así por su conservada secuencia de aminoácidos aspartato, isoleucina, asparagina y glicina en el extremo N-terminal; tienen un peso molecular de ~40k Da y poseen actividad de fosfatasa. Las funciones de las proteínas DING en desórdenes y procesos biológicos, como el cáncer y la inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 aún no han sido definidas. Igualmente, existe controversia acerca de la localización celular de estas proteínas. En células animales se ha reportado la presencia de proteínas DING en núcleo, citosol y membrana. En plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* e *Hypericum perforatum*, se han hallado presentes proteínas DING; sin embargo, no hay reportes acerca de su distribución celular.

En estudios previos realizados por el grupo de trabajo, se determinó que semillas de la especie *C. chinense* contienen al menos un polipéptido de 7.57 kDa, el cual fue extraído en la fracción proteica G10P1.7.57 y está relacionado con las proteínas DING. A partir de la secuenciación de aminoácidos de este polipéptido, se eligió el péptido ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK para usarlo como antígeno dada su alta conservación en proteínas DING de otras especies. Dicho péptido se sintetizó de manera comercial y contra él se produjo e inmunopurificó un anticuerpo policlonal denominado COM2. Experimentos de western blot con el anticuerpo COM2 revelaron que el anticuerpo reconoció una proteína de ~39 kDa en extractos proteicos de semillas. Una nueva secuenciación del polipéptido de ~39 kDa mostró que éste contiene al péptido ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK y que la proteína mantuvo identidad con las proteínas DING.

En este trabajo se utilizó el anticuerpo COM2 en análisis de western blot para determinar si las proteínas DING están presentes en los extractos proteicos de hojas y semillas de *C. chinense* en diferentes estadios de desarrollo. En ambos tejidos con diferente grado de madurez, el anticuerpo COM2 inmunodetectó una proteína de ~39 kDa indicando que las proteínas DING se encuentran presentes en todos los estadios fisiológicos de las hojas y las semillas, pero se presentan en mayor abundancia en los extractos de proteína soluble de hoja joven (PSHJ) y de semilla de 25 días post-antesis (dpa) (PSSI25),

respectivamente.

Por otra parte, el anticuerpo COM2 se conjugó a dos fluoróforos diferentes para establecer la localización celular de las proteínas DING en semillas de chile habanero (*C. chinense*) de diferentes etapas de madurez, por medio de microscopía confocal. Inmunocitlocalización con el anticuerpo COM2 conjugado a cloruro de dabsilo (COM-DAB) o a Alexa Fluor 488 (COM2-AlexaF488) se observó en el citosol de las células del embrión y del endospermo, lo que sugiere que la proteína DING de *C. chinense* es una proteína soluble que pudiera estar interactuando con proteínas del citoplasma.

ABSTRACT

The DING proteins are so named because they have the conserved aspartate, isoleucine, asparagine and glycine amino acid sequence at their N-terminus; they have a molecular weight of ~40 kDa and have phosphatase activity. The functions of DING proteins in disorders and biological processes, as cancer and inhibition of the replication of HIV-1 have not been defined yet. Similarly, there is a controversy about the cellular localization of these proteins. In animal cells, the presence of DING proteins has been reported in the nucleus, cytosol and membranes. In plants such as *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* and *Hypericum perforatum*, DING proteins have been found to be present; however, there are no reports about their cellular distribution.

In previous studies carried out by our group, it was determined that seeds of the *C. chinense* species contain at least a 7.57 kDa polypeptide, which was extracted from the G10P1.7.57 protein fraction and is related to the DING family of proteins. From the amino acid sequence of this polypeptide, the ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK peptide was chosen, because of its high amino acid identity with DING proteins from other species. The peptide was synthesized and a polyclonal antibody raised against it, which we called COM2. Western blot experiments with the COM2 antibody revealed that it recognized a protein of ~39 kDa on a protein extract from seeds. Amino acid sequencing of the ~39 kDa polypeptide showed that it contains the ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK peptide and the protein maintained its identity with DING proteins.

In this work, the COM2 antibody was used in western blot analyses to determine whether DING proteins are present in protein extracts from leaves and seeds of *C. chinense* at different stages of development. In both tissues with different degrees of maturity, the COM2 antibody immunodetected a protein of ~39 kDa, indicating that the DING proteins are present in all physiological stages of the leaves and seeds; however, they are present in greater abundance in the soluble protein fraction from young leaves (PSHJ) and 25 days post anthesis (dpa) seeds (PSSI25), respectively.

Moreover, the COM2 antibody was conjugated with two different fluorophores to establish the cellular localization of DING proteins in habanero pepper seeds (*C. chinense*) at

different stages of maturity, through confocal microscopy. Immunolocalization with the COM2 antibody conjugated with either dabsyl chloride (COM2-DAB) or Alexa Fluor 488 (COM2-AlexaF488) was observed in the cytosol of the cells of seed embryo and endosperm, suggesting that the DING protein in *C. chinense* is a soluble protein that could be interacting with proteins from the cytoplasm, and perhaps the cytoskeleton, nearby the plasma membrane.

INTRODUCCIÓN

El chile pertenece al género *Capsicum*, comprendido dentro de la familia *Solanaceae*. El género *Capsicum* se compone de 38 especies, de las cuales solo *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum pubescens* R. & P. y *Capsicum baccatum* L., han sido domesticadas por su importancia económica (Ibisa et al., 2010).

El chile habanero (*C. chinense* Jacq.) es una planta de ciclo anual (Moguel, 2008), sus frutos tienen la forma de una esfera elongada (Hernández, 2010a) y se le considera el más picante de los chiles cultivados en México, contiene entre 200 mil y 300 mil unidades de pungencia en la escala de Scoville (Curry et al., 1999; citado por López-Puc et al., 2009). La pungencia o “picor” del chile habanero se atribuye a un conjunto de compuestos conocidos como capsaicinoides (Castro-Concha et al., 2014; papik; <http://www.habanero-yucatan.com/sp/definicion.htm>), se sugiere que la capsaicina es un fitoquímico dietético que posee actividad quimiopreventiva (Surh et al., 1998). Estudios recientes han demostrado que las especies de chile también contienen péptidos con una fuerte actividad antimicrobiana (Moguel Salazar, et al., 2011). En semillas de chile habanero, Brito-Argáez et al., (2009), purificaron una fracción peptídica denominada G10P1.7.57; en ensayos in vitro la fracción mostró una fuerte actividad antimicrobiana contra varias bacterias patógenas de humanos y de plantas (Brito- Argáez et al., 2009). Un ejemplo de esta clase de proteínas lo constituyen las proteínas DING, una familia de proteínas que ha sido descrita en diferentes especies, tanto procariontas como eucariotas (Brito-Argáez et al., 2014; Bernier, 2013; Bookland et al., 2012).

Las proteínas DING han sido descubiertas en general a través de hallazgos fortuitos, esta familia de proteínas se caracteriza por su alta conservación de la secuencia de aminoácidos aspartato, isoleucina, asparagina y glicina en el extremo N-terminal, incluso entre especies filogenéticamente distantes (Bernier, 2013); la actividad que las unifica es la de fosfatasa dado que todas ellas comparten su capacidad para unir fosfato en el sitio denominado “trampa de Venus” (Ahn et al., 2007). A pesar de la abundancia de este grupo de proteínas y su aparente importancia fisiológica, las funciones de las proteínas DING aún no están establecidas; se les asocia con desórdenes y procesos biológicos

INTRODUCCIÓN

tales como el cáncer, la inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 (Bernier, 2013) e inhibición de la formación de cálculos renales (Kumar et al., 2004).

El estudio de las proteínas DING se ha visto obstaculizado por el hecho de que la mayoría de los intentos de clonación no han tenido éxito y, para eucariotas, sólo unas pocas secuencias de genes incompletos están disponibles en las bases de datos (Bernier, 2013). Por lo anterior, los investigadores han estado implementando estrategias alternativas que les ayude a elucidar la función de las proteínas DING. Tal es el caso de la inmunocitocalización de estas proteínas mediante la microscopía de transmisión electrónica o microscopía confocal. Shah et al. (2014) por medio de microscopía de transmisión electrónica describió que la proteína DING de *P. aeruginosa* cepa PA14, colocaliza en los apéndices externos junto con PstS (una subunidad de los transportadores de fosfato tipo ABC), por lo cual se especula que las proteínas DING son de secreción (Shah et al., 2014; Ball et al., 2012) y por ello se esperaría que estuvieran asociadas al sistema endomembranal o en el exterior de las células. No obstante, actualmente existe controversia acerca de la localización celular de la familia de estas proteínas, debido a que en células animales se ha reportado que las proteínas DING están presentes en el núcleo, citosol y membrana (Collombet et al., 2010; Kumar et al., 2004). En plantas no se ha realizado algún estudio de inmunocitocalización de proteínas DING.

Por otra parte, en el grupo de trabajo, estudios por medio de secuenciación de aminoácidos de la proteína de 7.57 KDa, contenida en la fracción proteica G10P1.7.57, determinaron que la especie *C. chinense* contiene una proteína DING (datos no publicados). De dicha secuenciación de aminoácidos se eligió el péptido ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK, con alta conservación en otras proteínas DING de especies reportadas en las bases de datos; se sintetizó de manera comercial el péptido y contra él se produjo un anticuerpo policlonal denominado COM2 (datos no publicados). El anticuerpo COM2 en análisis por western blot detectó una proteína de ~39 kDa en extractos proteicos de semillas de chile habanero, y un nuevo estudio de secuenciación para la proteína de 39 kDa demostró que *C. chinense* contiene una proteína DING (datos no publicados).

En este trabajo se presenta evidencia que indica que la proteína DING de *C. chinense* es una proteína soluble presente en hojas y semillas de chile habanero en diferentes etapas de madurez. Además, por medio de microscopía confocal se determinó que en semillas de *C. chinense* la proteína DING se localiza en el citosol de las células del embrión y del endospermo; lo que apoya la propuesta de que la proteína DING de *C. chinense* es una proteína soluble.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Género *Capsicum*

Capsicum es un género de la familia *Solanaceae* y está estrechamente relacionado con otros géneros que incluyen a plantas de gran importancia económica en el mundo, tales como, la papa (*Solanum tuberosum* L.) y el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.; Hernández, 2010a). Se cree que el nombre del género *Capsicum* se deriva del griego Kapso, Kaptein igual a picar; referido al aroma pungente y penetrante que tiene el ají (Mendoza, 2006).

El descubrimiento de América y su posterior conquista por los españoles permitió que las cinco especies más cultivadas del género *Capsicum* (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. chinense* Jacq.) fueran llevadas al resto del mundo.

Dias et al. (2013) realizaron la caracterización anatómica de semillas de cuatro especies de *Capsicum*, entre las que se encuentran *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, describiendo que las cuatro especies estudiadas presentan similar estructura y forma, pero varían en relación con el tamaño. Tanto en cortes longitudinales (Figuras 1.1 A y 1.2) como en transversales (Figura 1.1 B y 1.3 A) se aprecia que las semillas de *Capsicum* están constituidas por el embrión, el endospermo, el tegumento y la testa (Figura 1.1 A y B; Dias et al., 2013), similar a lo reportado para semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y semillas de quina de São Paulo o Joá (*Solanum pseudoquina*; Castellani et al., 2008).

En un corte longitudinal se observa que el embrión se encuentra en forma circinada (Figura 1.1 A). El embrión está comprendido por los cotiledones encargados de almacenar energía, así como una radícula de la cual surgirá la primera raíz al germinar la semilla (Figura 1.2) (Dias et al., 2013; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En un corte transversal el embrión se divide en tres partes; el eje embrionario y dos capas de cotiledones (Figura 1.3 A; Dias et al., 2013).

El endospermo es abundante en las semillas y está constituido de gránulos de almidón

(Figura 1.1 A, 1.1 B y 1.3 G; Dias et al., 2013). Finch-Savage y Leubner-Metzger (2006), en una figura representativa de un corte longitudinal de semilla de *C. annum* (previamente modificada de “the American Society of Plant Biologists”) ilustran al endospermo no micropilar como tejido nutritivo (indicado en color gris) y el endospermo micropilar como un tejido de varias capas de células que restringen la germinación de las semillas (indicado en flecha color rojo en la Figura 1.2; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

El tegumento se encuentra en forma reducida en una capa interior y exterior de la epidermis, con el mesófilo plegado (Figuras 1.3 C y 1.3 F.). La capa exterior de la epidermis del tegumento está formada a partir de células más o menos espesas y onduladas compactadas de la pared celular (flecha en las Figuras 1.3 D y 1.3 F); y la capa interna de la epidermis consiste en células con formas largas, planas y rectangulares (flechas en las Figuras 1.3 E y 1.3 F; Dias et al., 2013). La testa es parte del tejido materno principalmente compuesto de células muertas y encargada de recubrir a la semilla (Figura 1.2; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

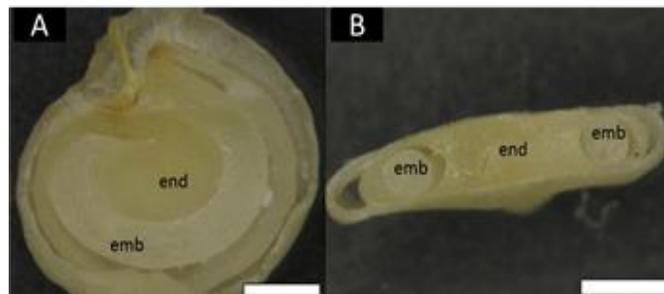


Figura 1. 1 Caracterización anatómica de semillas de *Capsicum* sp. A) Sección longitudinal de toda la semilla que muestra su forma elipsoide, alargada y ovalada. B) Sección transversal de toda la semilla que muestra su forma elíptica. Donde, end= endospermo, emb= embrión. Microscopía convencional con Axioplan microscope (ZEISS). Imagen modificada de Dias et al., 2013.

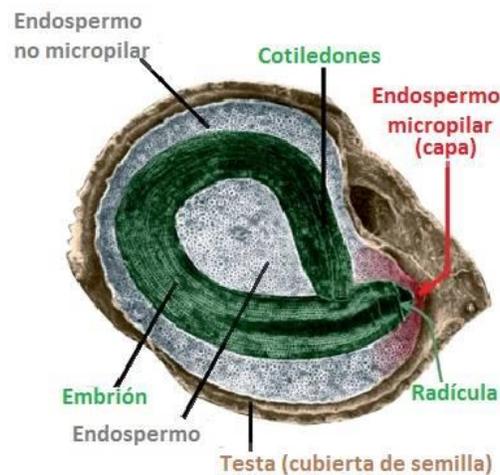


Figura 1. 2 Caracterización anatómica de una semilla de *C. annuum*. Imagen modificada de Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006.

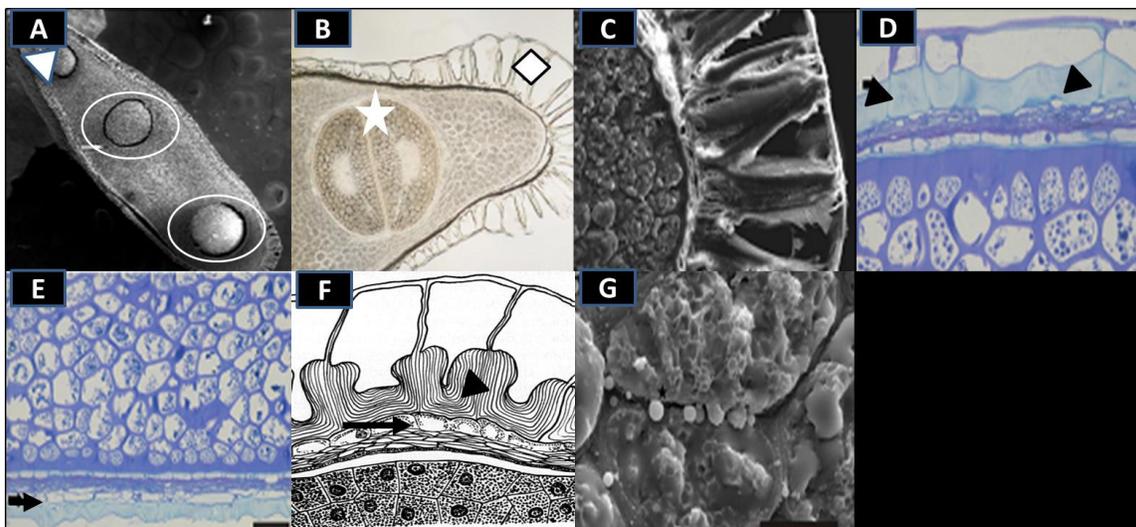


Figura 1. 3 Caracterización morfológica de un corte transversal de una semilla de *Capsicum* sp. A) Sección transversal de las semillas, se visualiza el eje embrionario (triángulo en color blanco en la Figura A) y un doble de cotiledones (círculos en la figura 1.7 A). B) Sección transversal de la semilla donde se visualiza el cotiledón (estrella blanca) y testa (rombo). C) Superficie de la epidermis exterior del tegumento con la pared anticlinal fuertemente ondulada. D) Epidermis de la capa externa del tegumento teñida con toluidina (triángulos en color negro). E) Epidermis de la capa interna del tegumento, es generalmente rectangular y con células alargadas (flecha). F) Representación de la epidermis interior (flecha) y la epidermis exterior (triángulo negro) del tegumento. G) Detalle de los gránulos de almidón en el endospermo. Figuras de A-E vistas mediante microscopía convencional (Axioplan microscope, ZEISS), Figura F vista mediante microscopía convencional (Fotomicroscopio ZEISS II) y Figura G vista mediante microscopía electrónica de barrido (ZEISS DSEM 962). (Figuras de A-E y G tomadas de Dias et al., 2013; Figura F tomada de Filippa y Bernardello., 1992).

En Yucatán el cultivo de chile habanero (*C. chinense*) surgió como una opción que permitió diversificar la actividad productiva en aquellos municipios en donde el cultivo del henequén desapareció (Moguel, 2008). Actualmente, el chile habanero es uno de los principales productos agrícolas de la Península de Yucatán. Generalmente, su fruto se comercializa en fresco para consumo directo, como materia prima para uso industrial y para la elaboración de productos terminados.

1.2 Taxonomía del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

La nomenclatura de “*C. chinense*” fue realizada por el taxónomo francés Nikolaus von Jacquin. El nombre específico *chinense*, se debe a que el taxónomo Jacquin lo nombró así, quizás porque obtuvo sus semillas de China (Moo, 2012). La descripción taxonómica de *C. chinense* se muestra en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1. 1 Taxonomía y nomenclatura de chile habanero de la Península de Yucatán (Tomada del Diario Oficial del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, 2010).

Reino	Plantae.
Subreino	Tracheobionta
División	Spermatophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Línea	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Rama	Malvales-Tubiflorae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Subfamilia	Solanoideae
Tribu	Solaneae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.

1.2.1 Descripción de chile habanero (*C. chinense* Jacq.)

C. chinense Jacq. es una planta de ciclo anual (Moguel, 2008). Se desarrolla en zonas templadas, subtropicales y tropicales (Aceves et al., 2008). El rango térmico para su desarrollo es de 17 a 29 °C (Ramírez et al., 2006; citado por Aceves et al., 2008) considerando que las temperaturas menores de 15 °C y que las mayores a 35 °C limitan el desarrollo de este cultivo (Aceves et al., 2008).

La planta de chile habanero posee una raíz de tipo pivotante, la cual se profundiza de 0.20 a 0.60 m. con raíces secundarias extendidas que varían en longitud dependiendo del tipo de suelo. La planta puede rebasar los 1.5 m. de altura cuando se cultiva en condiciones protegidas (López-Puc et al., 2009). El tallo es grueso, erecto, glabro y robusto; en general, tiene la tendencia a formar tres tallos en la primera ramificación (Figura 1.4 A y 1.4 B; Moguel, 2008). A veces puede estar cubierto de pelos o tricomas (Moo, 2012). Las hojas de la planta son de color verde oscuro brillante, de forma oval; pueden alcanzar hasta 15 cm de largo por 10 cm de ancho, y el margen ondulado es una característica distintiva de *C. chinense* (López-Puc et al., 2009). Se pueden encontrar hojas del tipo deltoide, oval y lanceolada, en la parte media de la planta, después de la primera cosecha (Figura 1.5; SAGARPA, 2013).



Figura 1. 4 Plantas de chile habanero creciendo en condiciones de invernadero. Plantas de *C. chinense* Jacq. colocadas en invernadero el 24 de febrero de 2014 (A) y su posterior crecimiento al 26 de abril de 2014 (B). (Fotografías: Madera-Piña D.).

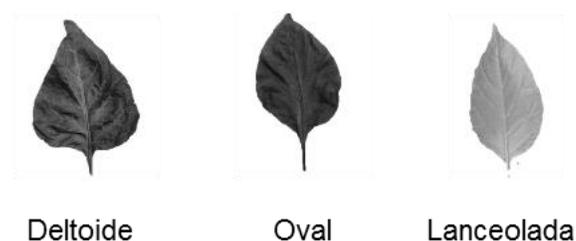


Figura 1. 5 Tipos de hoja de chile habanero (Fuente: SAGARPA, 2013).

Las flores de *C. chinense* son blancas, bisexuales, hipoginas y generalmente pentámeras con estambres fusionados. (Figura 1.6 B; Hernández, 2010b). Las flores son completas, con el cáliz, la corola, y los órganos sexuales masculinos y femeninos. González et al. (2010) señalan que *C. chinense* presenta de tres a cuatro flores en cada axila; siendo ésta una de las características que lo diferencian de la especie *C. annum*, que sólo presenta una o dos flores por axila (González et al., 2010).

El fruto de chile habanero tiene la forma de una esfera elongada similar a un pequeño trompo redondo cuyo tamaño varía de 2 a 3 cm de largo por 2 a 4 cm de ancho (Hernández, 2010a). Es de color verde dorado en su estado inmaduro-tierno y de tono salmón, rojo, café, amarillo o naranja al madurar (Long-Solís, 1998; citado por López-Puc et al., 2009; Figura 1.6 C). Se asocia el color con su madurez fisiológica, se dice que el verde después de los 40 días es de punto sazón, así como colores intermedios propios del proceso de maduración [apericado o pinto]; (Castro-Concha et al., 2014; Buczkowska et al., 2013). Los frutos del chile habanero son bayas huecas formadas por 2, 3 y 4 lóculos (Figuras 1.7 B, 1.7 C y 1.7 D respectivamente), predominando el triloculado. El pedúnculo presenta una constricción en la base; esa es otra característica distintiva de *C. chinense* (González et al., 2010). En general se reconocen tres secciones macroscópicas principales en el chile, las cuales son: pericarpio (Pe), semillas (S) y placenta (P) (Figura 1.7 A; Hernández, 2010a). Las semillas son de color paja, arrugadas e irregulares con bordes salientes y ondulados (Figura 1.3 A; Moo, 2012). Los estudios morfológicos de las semillas de *C. chinense* se describieron junto con el de otras especies de *Capsicum* en el apartado 1.1

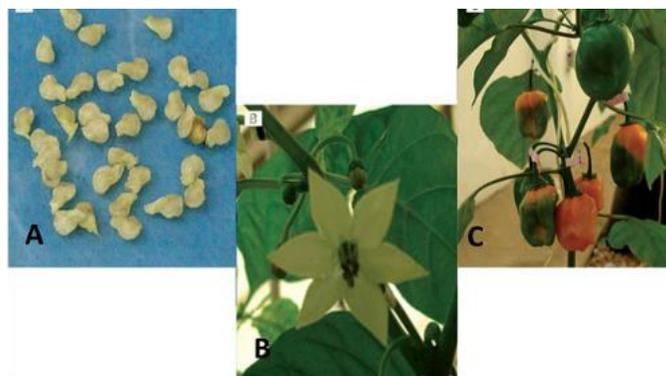


Figura 1. 6 Morfología de *C. chinense* Jacq., las semillas (A), la flor (B) y los frutos (C). (Tomado de Ruiz-Lau et al., 2011).

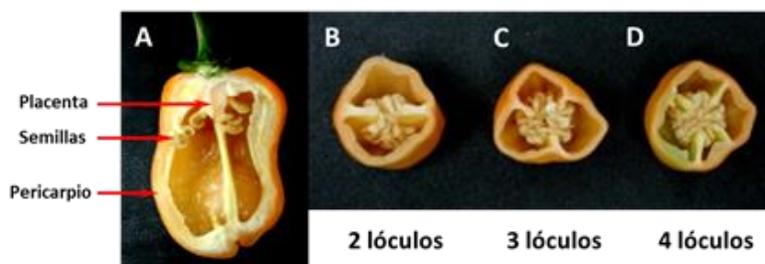


Figura 1. 7 Secciones macroscópicas de chile habanero. A) Secciones macroscópicas de un corte longitudinal del fruto. B) Lóculos que presenta el fruto de *C. chinense* Jacq. (Tomado de papik; <http://www.habanero-yucatan.com/sp/definicion.htm>)

1.3 Uso medicinal y terapéutico de *C. chinense* Jacq.

Los frutos de chile habanero contienen y aportan elementos que son benéficos para la salud humana, tales como ácido ascórbico, carotenoides (provitamina A), vitaminas (A y E), flavonoides, compuestos fenólicos y capsaicinoides (Castro-Concha et al., 2014). Estos compuestos (aparte de funcionar como antioxidantes y nutrientes) se utilizan en la medicina tradicional debido a sus propiedades medicinales (Ramchiary et al., 2014) tales como la prevención o eliminación de infecciones estomacales (Charles, 2012), la aplicación ectópica del chile se ha utilizado para tratar las molestias del reumatismo, la artritis y como antiinflamatorio (Charles, 2012). Se sabe también que la capsaicina tiene efectos anticancerígenos y antígenotóxicos lo que sugiere que este compuesto es otro fitoquímico dietético que posee actividad quimiopreventiva (Charles, 2012; Surh et al., 1998).

Estudios recientes han demostrado que las especies de Chile contienen péptidos con una fuerte actividad antimicrobiana (Moguel-Salazar et al., 2011). Texeira et al. (2006) describieron la actividad antimicrobiana de fracciones enriquecidas de péptidos (catiónicos y aniónicos) aislados a partir de hojas de Chile; contra las bacterias patógenas de las plantas *Ralstonia solanacearum* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Texeira et al., 2006). En otro estudio realizado por Brito-Argáez et al. (2009), purificaron una fracción peptídica denominada G10P1.7.57 a partir de semillas de Chile habanero. En ensayos *in vitro* la fracción mostró una fuerte actividad contra varias bacterias patógenas de humanos y de plantas (Brito-Argáez et al., 2009). Actualmente se sabe que la fracción G10P1.7.57 la constituyen proteínas DING, una familia de proteínas que ha sido descrita en diferentes especies, tanto procariontas como eucariotas (Bernier, 2013).

1.4 Proteínas DING

Las proteínas DING forman una familia de proteínas, cuyos integrantes han sido descubiertos en más de una ocasión de manera fortuita (Bernier, 2013; Bookland, 2012), y se caracterizan por tener una conservación inusualmente alta en los aminoácidos ácido aspártico (D), isoleucina (I), asparagina (N) y glicina (G) en su extremo amino terminal (Bernier, 2013; Bookland, 2012). Todos los integrantes de esta familia comparten su capacidad para unir fosfato con alta afinidad, además de mostrar una actividad intrínseca de fosfatasa (Bernier, 2013). No obstante, aún con la abundancia de este grupo de proteínas y su aparente importancia fisiológica los genes de las proteínas DING, con algunas excepciones, se encuentran ausentes en las bases de secuencias (Bernier, 2013). De acuerdo con las evidencias acumuladas, las proteínas DING tienen un peso molecular aproximado de 40 kDa, aunque se han descrito precursores potenciales con tamaños mayores; así como también putativas proteínas DING de menor tamaño (Bernier, 2013; Collombet et al., 2010; Berna et al., 2009a; Perera et al., 2008).

Las proteínas DING han sido identificadas en todos los reinos de la vida, lo que demuestra su ubicuidad celular y filogenética (Bernier, 2013; Berna et al., 2009a; Perera, 2008). En células procariontas se han ubicado en la superfamilia de proteínas que unen fosfato (Bernier, 2013). El primer grupo comprende a las “proteínas DING verdaderas” y que se caracterizan porque su extremo N-terminal comienza con la firma de aminoácidos N-terminal típica (D[I/V]NG); en contraste, las otras dos familias carecen de la secuencia y

están constituidas por la familia de la fosfatasa alcalina y la familia PstS, la cual está integrada por los miembros PstS, una subunidad de los transportadores de fosfato tipo ABC (Bernier, 2013). Algunos ejemplos de proteínas DING en células procariontas son las proteínas pfluDING de secreción en *Pseudomonas* sp. y de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PA14 (PA14DING o LapC), la proteína DING con capacidad de unión a fosfato, así como una débil afinidad de cotinina en *Pseudomonas fluorescens* (Bernier, 2013; Ball et al., 2012), una proteína DING Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa en *Sulfolobus solfataricus*, una DING con actividad de fosfatasa en *Thermus thermophilus* cepa HB8 (Berna et al., 2009b). En contraste, el descubrimiento y descripción de las proteínas DING en células eucariotas se fundamentó en la secuenciación parcial y su alta conservación de la secuencia D[I/V]NGGG de los aminoácidos del extremo N-terminal (Berna et al., 2009b). La primera proteína DING en el reino animal se purificó a partir del líquido amniótico humano y se le dio el nombre de “proteína humana de unión a fosfato (HPBP)” (Morales et al., 2006). En plantas la primera secuencia DING que se obtuvo fue en un estudio proteómico de la pared celular del frijol francés, sin embargo, para ese entonces no se tenía conocimiento de las proteínas DING ni había sido establecida como familia; por tal razón no se realizaron más estudios con dicha proteína (Robertson et al., 1997).

Actualmente en células eucariotas se conocen la proteína X-DING-CD4⁺, la cual es secretada por las células CD4⁺ en humanos resistentes al virus del VIH-1 (Lesner et al., 2009) y en plantas la proteína DING denominada p27^{SJ} (de *Hypericum perforatum*) involucrada en la interacción con proteínas regulatorias de la transcripción como lo son C/EBP β y Tat para la inhibición de la replicación del VIH-1 (Darbinian-Sarkissian et al., 2006), sólo por nombrar algunas.

1.4.1 Estructura de la proteína DING

La elucidación de la estructura terciaria de la proteína DING conocida como HPBP confirmó su capacidad para unir un ion fosfato, de manera análoga a las proteínas PstS en bacterias, donde estas proteínas secuestran fosfato en el espacio periplasmático para transferirlo al medio intracelular por medio del transportador de fosfato. Las PstS y la estructura de HPBP contienen una secuencia de aminoácidos que se ajusta a un modelo conocido como “Trampa de Venus” donde se une el fosfato. Dicha región consta de dos dominios globulares unidos entre sí por un asa en forma de bisagra. En el interior de la

“trampa” hay ocho residuos de aminoácidos conservados que permiten la formación de puentes de hidrógeno con el fosfato, con el fin de formar una estructura catalíticamente estable (Ahn et al., 2007; Morales et al., 2006).

Por otra parte, aunque de manera limitada, también se conocen secuencias parciales de nucleótidos y de aminoácidos para proteínas DING de plantas. De una secuencia aislada y clonada a partir de la hierba de San Juan (*H. perforatum*), se encontró una proteína que poseía actividad antiviral contra el VIH-1. Esta proteína se denominó p27^{SJ} y se determinó que por su estructura corresponde a una proteína DING (Ahn et al., 2007), pero con su extremo C-terminal truncado. Esto ocurre posiblemente como resultado de la proteólisis por una proteasa tipo factor Xa, que pudiera estar presente en plantas (Berna et al., 2009b).

Ahn et al. (2007) compararon las estructuras tridimensionales de la proteína HPBP y de la proteína DING de *P. fluorescens*, como resultado encontraron una estrecha similitud entre ambas (Figura 1.8).

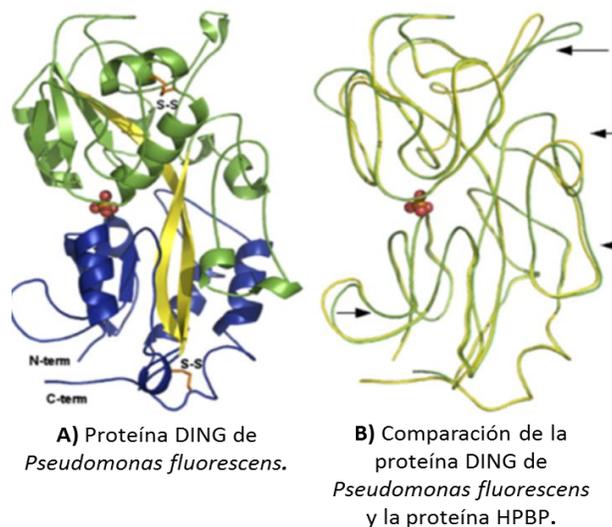


Figura 1. 8 Comparación de la estructura general de la proteína DING de *Pseudomonas fluorescens* con la proteína HPBP humana. A) Esquematación de PfluDING (*P. fluorescens*): los dos dominios de las proteínas son de color azul y verde, y la bisagra o trampa de venus se presenta en amarillo. Ambos puentes disulfuro se presentan en naranja. La molécula de fosfato se representa como una esfera en rojo (en el centro). B) Comparación estructural entre la proteína DING de *P. fluorescens* (en amarillo) y la proteína DING humana de unión a fosfato (HPBP, en verde). Imagen modificada de Ahn et al., 2007.

1.4.2 Proteínas DING en plantas

El descubrimiento de las proteínas DING con frecuencia ha sido un evento fortuito. Por ejemplo, en las plantas, mediante electroforesis desnaturizante e inmunoblots se ha determinado que las proteínas DING provienen de precursores de mayor masa molecular, tal es el caso de la proteína p27^{SJ} de *H. perforatum*, la cual fue inicialmente descubierta como un polipéptido de 27 kDa y que años más tarde se determinó que provenía de una proteína de 38 kDa denominada p38^{SJ} (Darbinian et al., 2009). Hasta el momento ninguna de las proteínas DING aisladas en plantas ha sido secuenciada completamente (Brito-Argáez et al., 2014).

Brito-Argáez et al. (2014) reporta una tabla previamente modificada de Bernier (2013) en donde ubica a las proteínas DING de plantas de acuerdo a su especie, el origen de la proteína, ADN o ADNc y la actividad enzimática o función que desempeña (Cuadro 1.2).

Cuadro 1. 2 Proteínas DING reportadas en plantas (tomado de Brito-Argáez et al., 2014).

Especie	Origen de: Proteína, ADN o ADNc	Actividad enzimática o función conocida	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fragmentos de ADN	No determinada	Bernier (2013)
<i>Brassica rapa</i>	Proteína de yemas florales	β-esterasa	Zhang et al. (2010)
<i>Brassica oleracea</i>	Proteína de Inflorescencia	Parte del complejo de ribonucleoproteínas	Samaha et al. (2010)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Proteína extraída de suspensiones celulares	Proteína de pared celular	Perera et al. (2008)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Proteína de hojas	Ligando de la proteína parecida a germina	Robertson et al. (1997)
<i>Ipomoea batatas</i>	Proteína de retoños	No determinada	Bernier (2013)

<i>Solanum tuberosum</i>	Proteína de tubérculo	No determinada	Bernier (2013)
<i>Triticum aestivum</i>	Proteína de hojas	No determinada	Aviramy Rosenblat (2004)
<i>Hypericum perforatum</i>	Proteína extraída de callos celulares	Fosfatasa	Darbinian et al. (2009)
<i>Helianthus tuberosum</i>	Proteína de secreción de tubérculo	Toxicidad para células tumorales	Griffaut et al. (2007)
<i>Sesbania grandiflora</i>	Proteína de flor	Inhibidor de α -glucosidasa	Laladhas et al. (2010)
<i>Capsicum chinense</i>	Proteína de semilla	Fosfatasa	Datos no publicados

En el caso de chile habanero, después de aislar y caracterizar la actividad biológica y enzimática de la fracción G10P1.7.57, así como de secuenciar los aminoácidos de un polipéptido de ~7.57 kDa se demostró que este último tenía identidad con proteínas DING (datos no publicados). Con una secuencia de los aminoácidos recién obtenidos de la proteína DING de *C. chinense*, conservada en otras proteínas DING, se sintetizó comercialmente el péptido ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK y contra él se generó e inmunopurificó el anticuerpo denominado COM2. La utilización de este anticuerpo en ensayos de western blot demostró que éste es capaz de reconocer a un polipéptido de ~39 kDa en preparaciones de hoja, flor y tallo de chile habanero (Uc-Ku, 2014; datos no publicados), lo que indicó una elevada especificidad del anticuerpo. Dicha característica representó una posibilidad para que este anticuerpo se utilizara en ensayos de inmunocitlocalización.

1.4.3 Localización subcelular de las proteínas DING

Kumar et al. (2004) describieron que la proteína DING, denominada CAI, es una proteína de secreción involucrada en la inhibición de la adhesión de los cristales de oxalato de calcio al epitelio de riñón y que ésta tiene una localización membranal, citosólica y posiblemente nuclear. Por otra parte, Collombet et al. (2010) describieron haber hallado proteínas DING en células de cerebro, piel, pulmón, corazón e hígado de ratón (B6D2F1/J). La diferencia celular entre dichos órganos afectó la localización de las proteínas DING, debido a que, en cortes histológicos del cerebro de ratón las proteínas se

localizaron en el núcleo de las neuronas, mientras que en células del hígado las proteínas se localizaron en la membrana (Collombet et al., 2010).

Shah et al. (2014) por medio de microscopía de transmisión electrónica describieron que, bajo condiciones de baja concentración de fosfatos, la proteína DING de *P. aeruginosa* cepa PA14 colocaliza en los apéndices externos junto con PsTS y que en esas condiciones ambas parecen participar en la recuperación de fosfato, pero que también podrían participar en el incremento de la virulencia de la cepa. No obstante, de esos hallazgos, hasta el momento no se ha determinado con certeza la localización celular de las proteínas DING y si el desarrollo fisiológico es un factor que influya en su distribución celular.

PROBLEMÁTICA A RESOLVER

Establecer el sitio de localización de la proteína DING en diferentes estadios de semillas y hojas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de la proteína DING en extractos proteicos de diferentes estadios de desarrollo de semillas y de hojas de chile habanero, así como su localización celular en semillas de chile habanero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar por western blot si la proteína DING se localiza en la fracción proteica soluble o membranal de los diferentes estadios fisiológicos de semillas y de hojas de chile habanero.
- Establecer si el anticuerpo COM2 conjugado a cloruro de dabsilo o Alexa Fluor 488 es funcional para detectar por medio de microscopía confocal a la proteína DING en los diferentes estadios fisiológicos de semillas.
- Inmunolocalizar con el anticuerpo COM2 conjugado a cloruro de dabsilo o Alexa Fluor 488 los sitios celulares de la proteína DING en los diferentes estadios fisiológicos de semillas de chile habanero.

JUSTIFICACIÓN

La especie *C. chinense* Jacq. contiene proteínas, que pudieran ser empleadas como base para el desarrollo de compuestos antimicrobianos naturales o de agentes con propiedades antitumorales y anticancerígenas. Este es el caso de una fracción proteica obtenida de semillas de *C. chinense*, que presentó actividad antimicrobiana contra varias bacterias patógenas de humanos y de plantas (Brito-Argáez et al., 2009), denominada fracción G10P1.7.57. Estudios de secuenciación de proteínas, presentes en dicha fracción, han mostrado que esta especie contiene al menos una proteína DING (datos no publicados).

En la literatura, se ha descrito que las proteínas DING están asociadas a eventos relacionados con cáncer, procesos inflamatorios (Berna, et al 2009), inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana VIH-1 (Bernier, 2013) e inhibición de la formación de cálculos renales (Kumar et al., 2004). Sin embargo, no se han elucidado las funciones de las proteínas DING en estos eventos. Actualmente existe controversia respecto a la localización celular de las proteínas DING, se ha reportado su localización en núcleo, citosol y membrana en células animales, y como proteínas de secreción en bacterias. Por otra parte, se ha descrito la presencia de proteínas en plantas; sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado algún estudio que establezca la localización subcelular de estas proteínas en plantas.

En años recientes la microscopía confocal ha surgido como una herramienta fundamental en el estudio de las diferentes estructuras celulares, tanto para su composición como para su distribución *in vivo* e *in situ*. Por ejemplo, Schmitt et al. (2014) por medio de dos diferentes anticuerpos acoplados a diferentes fluoróforos investigaron la localización de la proteína SUT1 en el tejido conductor de tabaco y papa, y determinaron que los transportadores estaban localizados en la zona periférica de las células acompañantes y en las células del parénquima. Por otro lado, en el trabajo publicado por Kumar et al. (2004) por medio de microscopía confocal y un anticuerpo policlonal contra la proteína inhibidora de la adhesión de los cristales de calcio (CAI, por sus siglas en inglés) se sugirió que CAI (una proteína DING) tiene una localización membranal y citosólica. Por lo tanto, las metodologías de microscopía confocal constituyen una herramienta que puede ser muy útil para establecer la localización intracelular de la proteína DING de *C. chinense*

Jacq.

Dados los antecedentes descritos previamente y a que actualmente no se ha realizado ningún estudio que establezca la localización subcelular de las proteínas DING en plantas, a que no se tienen reportes acerca de proteínas DING en *C. chinense* Jacq., y a que en el grupo de trabajo se cuenta con un anticuerpo policlonal específico contra proteínas DING, denominado COM2, entonces, en este trabajo se analizó si la proteína DING es una proteína soluble o de membrana en semillas y en hojas de chile habanero con diferente grado de desarrollo; para ello, se elaboró la estrategia experimental abajo descrita.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental seguida en este estudio se esquematiza en las Figuras 1.9, 1.10 y 1.11 y se describe a detalle en la sección de materiales y métodos. Cabe señalar que, en este estudio se realizaron extracciones de proteína en hojas y en semillas de chile habanero con diferente grado de desarrollo fisiológico, esto con el objetivo de establecer si la proteína DING está presente durante el desarrollo de hojas y de semillas. Sin embargo, el estudio de inmunocitocalización subcelular de esta proteína solo se realizó en semillas de chile habanero.



Figura 1. 9 Estrategia para la obtención del material biológico.

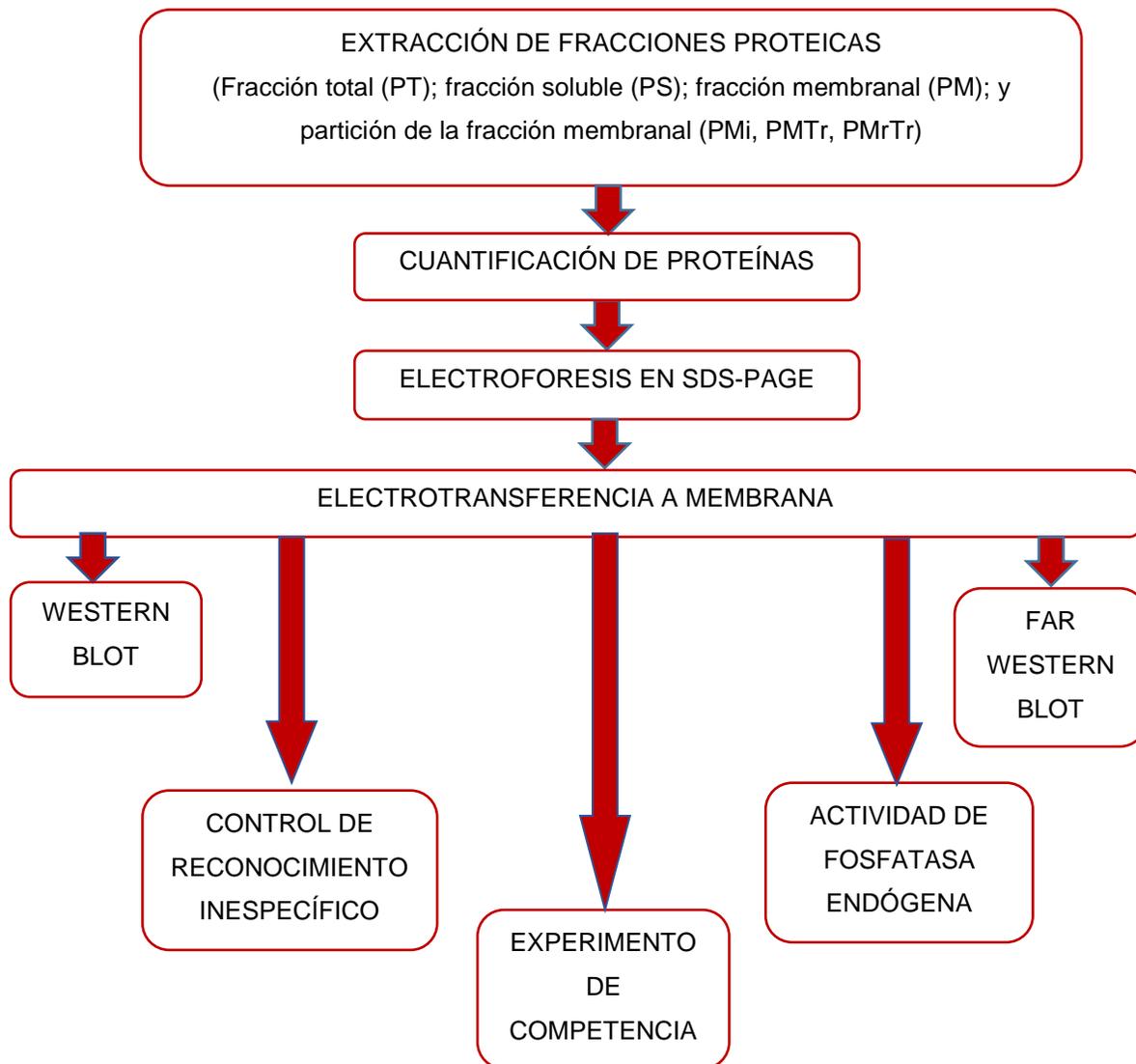


Figura 1. 10 Evaluación de la proteína DING en diferentes ensayos inmunológicos y enzimáticos.

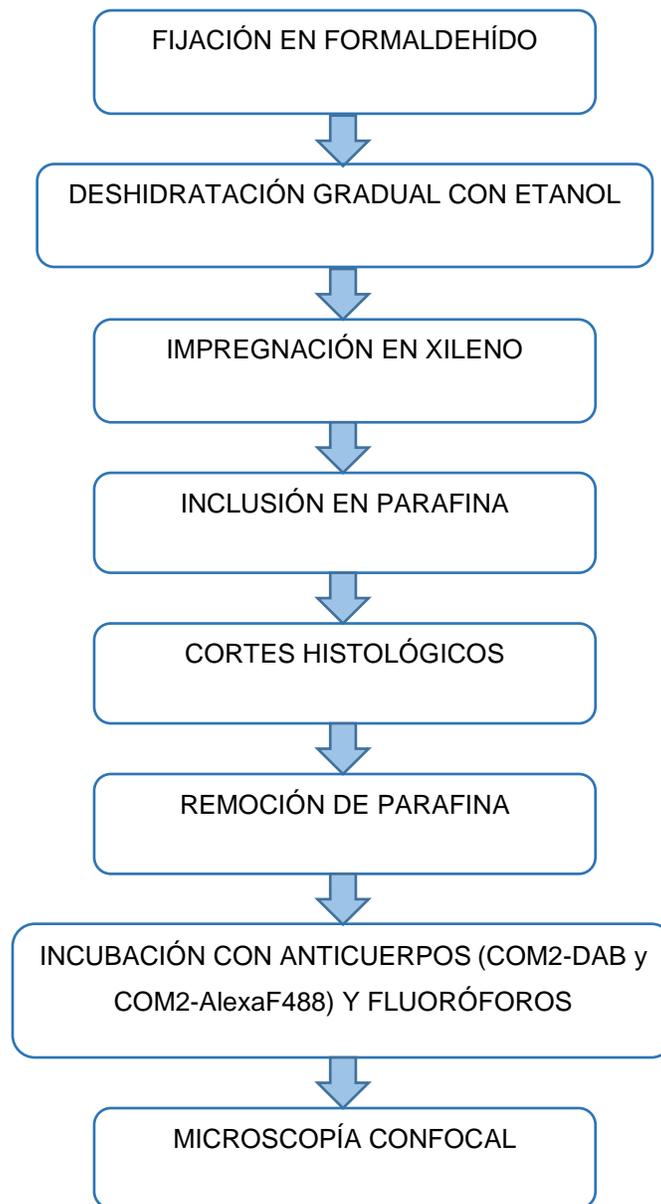


Figura 1. 11 Histología e inmunocitlocalización

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Procedencia del material biológico

Los frutos y hojas de chile habanero se obtuvieron a partir de plantas que el grupo mantiene en el invernadero del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY). Dichas plantas fueron germinadas de semillas “Seminis” lote número 332892/03.

2.1.1 Obtención de semillas y hojas de *C. chinense*

Para la obtención de semillas de chile habanero, mediante estambres de diferente color, se marcaron las flores de las plantas al inicio de cada semana, esto de acuerdo a su etapa de emergencia (en los meses de abril-junio) y se llevó el registro de inicio del desarrollo del ovario (fruto). Posteriormente, se colectaron los frutos de chile surgidos de las flores previamente marcadas, se establecieron las etapas o estadios de desarrollo de acuerdo al tiempo transcurrido después de la antesis (dpa), utilizando el siguiente criterio; inmadurez fisiológica del fruto (frutos verdes, de 25 dpa), el término medio o sazón (color amarillo-verde/naranja-verde, de 45 dpa) y el estadio maduro (color naranja, de 65 dpa). Los frutos de diferentes edades se cortaron de manera longitudinal con el propósito de exponer las semillas y retirarlas de la placenta del fruto. Las semillas se separaron de la placenta y se agruparon de acuerdo al desarrollo del fruto del cual provenían.

En cuanto a la colecta de las hojas, primeramente, se estableció un criterio de selección para determinar su grado de desarrollo (o estadio fisiológico). La selección consistió en tomar como hojas jóvenes aquellas cercanas al meristemo apical de la planta; para las hojas maduras se tomaron las hojas ubicadas por debajo de cuatro nudos del meristemo apical y, por último, para las hojas viejas se tomaron las ubicadas de 8-10 nudos por debajo del meristemo apical de la planta.

2.1.2 Extracción de fracciones proteicas de semillas y hojas de *C. chinense*

2.1.2.1 Extracción de fracciones proteicas totales, solubles y membranales de diferentes estadios fisiológicos de hojas y semillas de *C. chinense*

Se tomaron entre 3 y 4 g de muestra (hojas y semillas de *C. chinense* respectivamente;

en cualquiera de sus tres estadios fisiológicos), se congelaron con nitrógeno líquido y guardaron a -80 °C hasta su uso. Posteriormente, las hojas o las semillas fueron maceradas de manera independiente con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino, al que enseguida se le adicionaron 14 mL de amortiguador de extracción para hojas y 20 mL para semillas (50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 5 mM β -mercaptoetanol, 1 μ g/mL leupeptina, 1 μ g/mL aprotinina) y se continuó macerando hasta obtener una mezcla homogénea.

El homogenado se filtró a través de gasa comercial estéril (Dr. Simi) y el filtrado se colocó en tubos Nalgene de 50 mL; los tubos se centrifugaron a 23,700 x g por 15 min a 4 °C (Beckman J-2MI), se recuperó el sobrenadante, enseguida se tomaron 10 mL, se colocaron en tubos Eppendorf nuevos y se les denominó proteína total (PT). La pastilla se desechó y el resto del sobrenadante resultante fue centrifugado a 100,000 x g por una hora. Al concluir la centrifugación se recuperó el sobrenadante y se denominó como proteína soluble (PS), la pastilla se resuspendió en amortiguador de extracción adicionado con 0.1% (v/v) de Tween 20, y se le denominó como proteína membranal (PM). Las fracciones proteicas (PT, PS y PM) se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.1.2.2 Extracción de fracciones proteicas totales, solubles y membranales de hojas senescentes y semillas de *C. chinense* de 65 dpa

La extracción de proteína total, soluble y membranal se realizó a partir de material vegetal que había sido congelado a -80 °C; 3.2 g de hojas senescentes (HS) y 3.4 g de semillas de chile habanero de 65 dpa (SM65) fueron macerados en presencia de nitrógeno líquido, enseguida se adicionaron 11 y 10 mL de amortiguador de extracción respectivamente y se homogenizaron. El homogenado de cada uno se filtró por separado a través de una gasa comercial (gasa simple, Dr. Simi) previamente humedecida con 2 mL de amortiguador de extracción. El filtrado se centrifugó a 23,700 x g por 15 min a 4 °C (Beckman J2-MI); después de la centrifugación se recuperaron 10.5 mL de proteína total de hojas senescentes de chile habanero (PTHS) y 8.2 mL de proteína total de semillas de chile habanero de 65 dpa (PTSM65). Se tomó 1 mL de proteína total de cada muestra (PTHS y PTSM65) y se almacenaron en congelación a -20 °C, los restantes 9.5 mL de PTHS y 7.2 mL de PTSM65 se centrifugaron a 100,000 x g por 45 min a 4 °C. Después de la

centrifugación, se recuperaron los sobrenadantes de PTHS (9.1 mL), el cual fue denominado como proteína soluble de hojas senescentes de chile habanero (PSHS) y el de PTSM65 (6.8 mL), mismo que se denominó proteína soluble de semillas de chile habanero de 65 dpa (PSSM65).

Por otra parte, las pastillas resultantes de la centrifugación a 100,000 x *g* fueron denominadas como proteína membranal de hojas senescentes de chile habanero (PMHS) y de semillas de chile habanero de 65 dpa (PMSM65), respectivamente. Por separado, cada pastilla se lavó con 1 mL de amortiguador de extracción, enseguida, se centrifugaron a 100,000 x *g* por 30 min a 4 °C; concluida la centrifugación, se recuperó el sobrenadante de cada pastilla y se adicionó a su respectivo tubo (PSHS y PSSM65) para alcanzar un volumen final de 10.1 mL en PSHS y de 7.8 mL en PSM65, respectivamente.

Las pastillas lavadas previamente, fueron denominadas PMHS-1 y PMSM65-1, respectivamente, se resuspendieron en 9 y 6.8 mL de amortiguador de extracción adicionado con 0.5 M de NaCl; ambas pastillas se homogenizaron de manera independiente por 30 s en un sonicador Sonic desmembrator, model F50 (Fisher, Scientific) con 20% de intensidad de salida y enseguida otros 30 s con 50% de intensidad de salida. Enseguida, los homogenados se centrifugaron a 100,000 x *g* durante 45 min a 4 °C. Concluida la centrifugación, se recuperaron 8.8 mL de sobrenadante de PMHS-1 y 5.4 mL de EMCrSM65-1, respectivamente. Los sobrenadantes recuperados fueron denominados como proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal de hojas senescentes (PMHSi) o proteína unidas por interacción iónica a la fracción membranal de semillas de 65 dpa (PMSM65i). Las pastillas resultantes de la centrifugación se denominaron como fracción membranal de hojas senescentes lavada con NaCl (PMHS-Ls) o fracción membranal de semillas de 65 dpa lavada con NaCl (PMSM65-Ls); respectivamente.

Las pastillas resultantes PMHS-Ls y PMSM65-Ls se lavaron una vez más con 1 mL de amortiguador de extracción adicionado con 0.5 M de NaCl y se centrifugaron a 100,000 x *g* por 30 min a 4 °C, enseguida se recuperaron los sobrenadantes de cada muestra y de manera individual se añadieron al PMHSi o PMSM65i, para alcanzar volúmenes finales de 9.8 y 6.4 mL, respectivamente. Las pastillas resultantes PMHS-Ls1 y PMSM65-Ls1 se resuspendieron de manera independiente en 8.8 y 6.4 mL de amortiguador de extracción

adicionado con 0.1% Tritón X-100, respectivamente; se homogenizaron en un sonicador, dos veces por 30 s cada vez, excepto que la primera sonicación fue con un 20% de potencia de salida y la segunda con 50%. Concluida la sonicación, los homogenados se centrifugaron a 100,000 x g por 45 min a 4 °C. Los sobrenadantes respectivos fueron denominados como proteína membranal de hojas senescentes de chile habanero (8.5 mL) recuperada con Tritón X-100 (PMHSTr) y proteína membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa (6.3 mL) recuperada con Tritón X-100 (PMSM65Tr). Las pastillas resultantes fueron denominadas como proteína membranal de hojas senescentes lavadas con Tritón X-100 (PMHS-LTr) y proteína membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa lavada con Tritón X-100 (PMSM65-LTr).

Las pastillas PMHS-LTr y PMSM65-LTr se lavaron individualmente con 1 mL de amortiguador de extracción adicionado con 0.1% Tritón X-100, se centrifugaron a 100,000 x g por 30 min a 4 °C; enseguida se recuperaron los respectivos sobrenadantes y se añadieron a PMHSTr o PMSM65Tr, alcanzando volúmenes finales de 9.5 mL para el primero y de 7.3 mL para el segundo. Las pastillas resultantes fueron resuspendidas individualmente y homogenizadas en 100 µL de amortiguador de Laemmli 1X. Ambos homogenados se calentaron a 95 °C por 5 min, se centrifugaron a 18,800 x g por 15 min (Sorval Legend Micro 21R, Thermo Scientific); y se denominaron como proteína membranal de hojas senescentes de chile habanero recalcitrante a Tritón X-100 (PMHSrTr) y proteína membranal de semillas de chile habanero de 65 dpa recalcitrante a Tritón X-100 (PMSM65rTr). Todos los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.1.3 Cuantificación de proteínas mediante el método de Peterson (1977)

La cuantificación de las proteínas contenidas en las fracciones total, soluble y membranal de las semillas y hojas de chile habanero se realizó por el método de Peterson (1977). Brevemente, se realizó una curva estándar con albúmina sérica bovina, fracción V, Sigma con concentraciones conocidas de proteína (5 a 100 µg); para el análisis de las muestras de interés se colocaron 5 µL (de fracciones totales y solubles) y 25 µL (de fracciones membranales) de semillas y de hojas de chile habanero, respectivamente. Todos los tubos se completaron a un volumen de 1 mL con agua destilada (cada muestra por triplicado). Enseguida, a cada tubo se le agregó 100 µL de 0.15% (v/v) desoxicolato de sodio (DOC), se agitó e incubó por 10 min a temperatura ambiente. Los tubos se

añadieron con 100 μ L de 72% (v/v) ácido tricloro acético (TCA), se agitó e incubó en frío durante 20 min. Enseguida, los tubos se centrifugaron a 3,500 rpm por 30 min, se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1 mL de agua. Se adicionó 1 mL de la solución A {partes iguales de CTC [0.1% (p/v) sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0.2% (p/v) tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) y 10% (p/v) carbonato de sodio (Na_2CO_3)]}; 10% (v/v) SDS; 0.8 N hidróxido de sodio (NaOH) y agua (H_2O)} y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Por último, se adicionaron 500 μ L de reactivo de Folin (1: 6 v/v) e incubó por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia de las muestras se determinó a 750 nm.

2.1.4 Electroforesis

Se prepararon geles de 15% y 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE). Los geles de 15% se cargaron con 10 μ g de proteína de hojas o semillas de chile habanero, 1 μ g de la fracción G10P1.7.57 y 2.5 μ g del marcador de referencia de masa molecular de proteínas (BioRad). Los geles de 12%, fueron adicionados con concentraciones de proteína de hojas senescentes cuyo rango fue de entre 5.5 a 17.1 μ g, mientras que las fracciones proteicas de semillas de 65 dpa contenían entre 2 y 17.1 μ g; la fracción G10P1.7.57 contenía entre 0.85 y 1 μ g de proteína; se aplicaron 2.5 μ g del marcador de referencia de proteínas de masas moleculares conocidas (BioRad). En los geles de 15%, la electroforesis se realizó a 60 V mientras las muestras se encontraban en el gel de apilamiento, una vez que las muestras migraron al gel resoledor, entonces el voltaje se incrementó a 80 V. La electroforesis en los geles para SDS-PAGE de 12%, se realizó a 60 V. Ambas condiciones de electroforesis se realizaron por 3 h. Concluidas las electroforesis algunos de los geles se tiñeron con azul de Coomassie y otros se destinaron a la electrotransferencia del patrón de proteínas hacia membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) para posteriormente realizar western blots.

2.1.5 Electrotransferencia

El perfil proteico de los geles SDS-PAGE se electrotransfirió hacia membranas de PVDF a 50 V, durante toda la noche. El amortiguador de electrotransferencia estuvo compuesto de 20% (v/v) metanol, 192 mM glicina y 25 mM Tris-HCl.

2.1.6 Western blot

La inmunodetección de la proteína DING se realizó por western blot (para los extractos proteicos de hojas, como de semillas de chile habanero). La membrana se incubó en 5% (p/v) leche descremada (Svelty) disuelta en 25 mL de amortiguador de fosfatos 1X (PBS; 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄*7H₂O, 140 mM NaCl, pH 7.4) a 4 °C. Concluida la incubación, se decantó la leche y la membrana se lavó tres veces por 15 min cada vez con 25 mL de PBS 1X adicionado con 0.025% (v/v) Tween 20 (PBSTw). Concluidos los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo primario COM2 (dilución 1: 10,000 v/v) toda la noche a 4 °C. Después de la incubación, el anticuerpo se decantó y la membrana se lavó tres veces por 15 min cada vez con PBSTw. Enseguida, la membrana se incubó por 4 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (contra IgG de conejo) acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1: 10,000 v/v). La membrana se lavó tal como se describió previamente. Concluidos los lavados, la reacción de inmunodetección se reveló en 25 mL de amortiguador de fosfatasa alcalina (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.1 M MgCl₂, pH 9.5), adicionado de 118.7 µL de nitroazul de tetrazolio (NBT, solución madre de 0.05 g/mL en 70% (v/v) dimetilformamida) y 76 µL de bromo-cloro-indolil-fosfato (BCIP, solución madre de 0.05 g/mL en 100% (v/v) dimetilformamida).

Se realizaron controles de reconocimiento inespecífico que pudieran estar asociados al anticuerpo secundario. Dichos controles consistieron en que en paralelo a la electrotransferencia de proteínas para la realización de western blot, también se electrotransfirieron perfiles proteicos de muestras idénticas hacia membranas de PVDF. Las membranas fueron sometidas a un tratamiento idéntico descrito para western blot, excepto que la membrana utilizada como control de pegado inespecífico sólo se incubó con una dilución (1: 10,000 v/v) del anticuerpo secundario contra IgG de conejo.

2.1.7 Experimento “tipo competencia”

Previo al experimento de competencia, se preparó el complejo de anticuerpo COM2-fracción G10P1.7.57 (COM2-G10P1.7.57). Brevemente, proteína de la fracción G10P1.7.57 (7.5 µg) se desnaturalizó a 100 °C por 30 min y enseguida se dejó enfriar a temperatura ambiente, se aplicó un pulso de centrifuga al tubo Eppendorf que contenía a la fracción G10P1.7.57 desnaturalizada. Enseguida la fracción desnaturalizada se aforó a 7.5 mL con PBS (la concentración final de 1 µg/mL) y se adicionó con 0.75 µL de

anticuerpo primario COM2 (dilución 1: 10,000 v/v; conteniendo 0.046 µg/mL de COM2). El conjugado de COM2-G10P1.7.57 se incubó en agitación por 4 h a temperatura ambiente.

La inmunodetección de la proteína DING en los perfiles proteicos de hojas y de semillas de chile habanero, contenidos en las membranas de PDVF, se realizó usando el complejo COM2-G10P1.7.57. Para ello, las membranas se incubaron toda la noche en 5% (p/v) leche descremada Svelty, disuelta en PBS 1X a 4 °C. Concluida la incubación, se decantó la leche y las membranas se lavaron tres veces por 15 min cada vez con PBSTw. Concluidos los lavados, las membranas se incubaron con el conjugado COM2-G10P1.7.57 a 4 °C durante toda la noche. Después de la incubación, el anticuerpo se decantó, las membranas se lavaron tres veces por 15 min cada vez con PBSTw. Enseguida, las membranas se incubaron en agitación por 4 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (contra IgG de conejo; dilución 1: 10,000 v/v). Las membranas se lavaron tal como se describió previamente. Concluidos los lavados, la reacción de inmunodetección se reveló como se describió en el apartado 2.1.6.

2.1.8 Far western blot

La inmunodetección de la proteína DING en las fracciones proteicas de hojas y semillas de chile habanero mediante far western blot se realizó incubando las membranas toda la noche en 5% (p/v) leche descremada Svelty disuelta en PBS 1X a 4 °C toda la noche. Concluida la incubación, se decantó la leche y las membranas se lavaron tres veces por 15 min cada vez con PBSTw. Enseguida, las membranas se incubaron con 1 µg/mL de fracción G10P1.7.57 sin desnaturalizar (volumen final de 7.5 mL) a 4 °C por 4 h. Después del tiempo de incubación se decantó la fracción y las membranas se lavaron como se describió previamente. A las membranas se les añadió el anticuerpo COM2 (dilución 1: 10,000 v/v) y se incubaron a 4 °C toda la noche. Transcurrida la incubación, se decantó el anticuerpo COM2 y las membranas se lavaron con PBSTw. Enseguida, la membrana se incubó por 4 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (contra IgG de conejo; dilución 1: 10,000 v/v). Concluida la incubación, las membranas se lavaron y la reacción de inmunodetección se reveló tal como se indicó en el apartado 2.1.6.

2.1.9 Actividad endógena de fosfatasa alcalina

La detección de actividad endógena de fosfatasa alcalina en las fracciones proteicas de hojas y semillas de chile habanero se realizó siguiendo el protocolo descrito para el western blot en el apartado 2.1.6, excepto que la membrana no fue incubada con anticuerpos.

2.1.10 Anticuerpo COM2 conjugado a fluoróforos

2.1.10.1 Anticuerpo COM2 conjugado a cloruro de dabsilo (COM2-DAB)

La conjugación del anticuerpo comercial COM2 a cloruro de dabsilo, se realizó mediante el protocolo de Yearick; SIGMA-ALDRICH® (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/hplc-derivatization.html>). Brevemente, en un tubo Eppendorf, se adicionaron 192 μ L de amortiguador (1.5 M bicarbonato de sodio, NaHCO₃, pH 9) y 384 μ L de cloruro de dabsilo (concentración 2 mg de cloruro de dabsilo/mL de acetona). En otro tubo Eppendorf, se preparó una mezcla del anticuerpo COM2 (92 μ g de COM2 en 200 μ L NaHCO₃, pH 9) y se disolvió en 223 μ L de 1.5 M NaHCO₃, pH 9; el volumen resultante (423 μ L) fue añadido con el volumen total (576 μ L) de la mezcla cloruro de dabsilo/acetona. La mezcla resultante (COM2 conjugado a cloruro de dabsilo; COM2-DAB) se homogenizó e incubó a 70 °C por 10 min. Concluida la incubación, el tubo se protegió de la luz, se denominó COM2-DAB y se almacenó a -20 °C por 24 h. El anticuerpo COM2-DAB se descongeló y se colocó en un tubo concentrador Amicon Ultra de 3 kDa (Millipore), se centrifugó a 10,200 x g por 10 min. El filtrado se desechó. Al concentrado COM2-DAB se le adicionaron 400 μ L de 70% (v/v) etanol (grado Biología Molecular), el Amicon Ultra se centrifugó otra vez a 10,200 x g por 10 min. Se desechó el filtrado y el mismo proceso de lavado-centrifugación se repitió cinco veces más. En el último lavado se recuperó el concentrado y se le añadieron 50 μ L de 70% (v/v) etanol, se mezcló y se centrifugó a 10,200 x g por 10 min. Finalmente, se decantó el filtrado y se recuperó el concentrado. Los concentrados recuperados fueron mezclados y transferidos a tubos Eppendorf estériles en alícuotas de 50 μ L, protegidos de la luz y almacenados a -20 °C hasta su uso.

2.1.10.2 Conjugación del anticuerpo COM2 a Alexa Fluor 488 (COM2-AlexaF488)

La conjugación del anticuerpo COM2 a Alexa Fluor 488 (AlexaF488), se realizó siguiendo la metodología descrita en el paquete comercial de Invitrogen (Alexa Fluor® 488 Protein Labeking Kit). Brevemente, por medio de un microcon de 3 kDa (Amicon ultra – 0.5 mL 3K; regenerated cellulose 3000 mwco) y centrifugación a 12,000 x g cada 10 min, se concentraron 500 µL de anticuerpo COM2 hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente, al concentrado se le adicionaron 50 µL NaHCO₃, pH 8.3 y se mezcló. La mezcla resultante se añadió al vial que contenía AlexaF488 y se incubó en agitación toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, el anticuerpo acoplado al fluoróforo AlexaF488 se purificó mediante una columna de resina BioRad BioGel P-30, previamente empacada como lo indica el proveedor. A partir de la columna se colectaron fracciones de 1 mL; la primera banda fluorescente en eluir fue el anticuerpo COM2 acoplado a AlexaF488 (COM2-AlexaF488), la segunda banda fue el excedente del fluoróforo AlexaF488. La absorbancia de las fracciones colectadas fue determinada a 280 nm (COM2-AlexaF488) y a 494 nm (AlexaF488); en base a los valores de absorbancia obtenidos con ambas longitudes se determinó que la concentración del conjugado COM2-AlexaF488 fue de 0.3735 µg/µL con un volumen total de 2 mL. A los 2 mL del conjugado COM2-AlexaF488 se les adicionó 350 µL de BSA (9.3 µg/µL). La mezcla resultante (de COM2-AlexaF488 más BSA) se liofilizó y posteriormente se resuspendió en 1 mL de amortiguador de fosfatos 1X (solución madre 10X; 0.1 M de fosfato de potasio, 1.5 M de cloruro de sodio, pH 7.2, con 2 M de azida de sodio) provisto en el paquete comercial. La concentración final de COM2-AlexaF488 fue de 4 µg/µL. La mezcla se dividió en alícuotas de 25 µL, se protegieron de la luz y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

2.1.11 Proceso de histología

2.1.11.1 Fijación de las semillas de chile habanero en solución de formaldehído

A las semillas de chile habanero destinadas al proceso de fijación histológica (semillas de 25 dpa (SI25), semillas de 45 dpa (SS45) y semillas de 65 dpa (SM65)) se le realizó un pequeño corte junto al micrópilo y alrededor de la testa. Enseguida, las semillas de acuerdo a su grado de madurez, se colocaron en recipientes por separado y se

adicionaron con 15 mL de solución de fijación (4%, p/v, paraformaldehído disuelto en amortiguador de fosfatos: 8 mM Na_2HPO_4 y 1.47 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, pH 7.4). Los recipientes conteniendo las semillas en proceso de fijación se colocaron en una cámara hermética (Thermo Scientific), se les aplicó vacío gradual de 15 in de Hg por 10 min. Los tejidos se dejaron en vacío a 15 in de Hg por 10 min y se incubaron por 48 h a 4 °C. Después de las 48 h se retiró el vacío y las semillas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

2.1.11.2 Proceso de deshidratación

Las semillas fueron retiradas de la solución de fijación y deshidratadas en soluciones de concentración creciente de etanol (50, 70, 90 y 100% v/v), la incubación en cada concentración de etanol fue de 72 h a 4 °C, en cada solución. En la última incubación de las semillas en la solución de 100% (v/v) etanol se les aplicó vacío de 15 in de Hg por 10 min y permanecieron en esa condición durante 72 h. Finalizada la deshidratación se decantó el etanol y las semillas se añadieron a una mezcla xileno-etanol (50:50 v/v) y se incubaron por 72 h a 4 °C. Después de ese tiempo, la solución de incubación se sustituyó por nueva solución de xileno-etanol (50:50 v/v), se les aplicó vacío a 15 in de Hg por 10 min y se incubaron por 72 h a 4 °C en esa condición. Se decantó la solución de incubación y las semillas se adicionaron con xileno puro (Baker Analyzed[®] Reactivo) por 72 h a 4°C, en un primer recambio de xileno puro las semillas se incubaron por 72 h a 4 °C, mientras que, en un segundo recambio se les aplicó vacío de 15 in de Hg por 10 min y permanecieron en esa condición por 72 h a 4 °C. En los dos últimos recambios de xileno puro no se aplicó vacío y cada uno de ellos abarcó 72 h a 4°C.

2.1.11.3 Inclusión de las semillas de chile habanero en parafina

La inclusión de las semillas de chile habanero en parafina se realizó con base a los protocolos descritos por Montalvo (2010), Cortés (2013) y Rodríguez (2013). Brevemente, las semillas de cada estadio (SI25, SS45 y SM65 provenientes de la inclusión de xileno) se colocaron en recipientes denominados Wax1-SI25, Wax1-SS45 y Wax1-SM65, los cuales contenían 3 g de parafina líquida (previamente fundida a 57 °C) y se incubaron bajo esa condición por 120 h. Transcurrido el tiempo de incubación, las semillas se trasladaron e incubaron por 120 h en nuevos recipientes denominados Wax2-SI25, Wax2-SS45 y Wax2-SM65 que contenían parafina fresca. Por último, las semillas se trasladaron

a otros recipientes que contenían parafina fresca y que fueron denominados Wax3-SI25, Wax3-SS45 y Wax3-SM65. En esa condición se incubaron por 120 h. Las semillas provenientes de los recipientes Wax3 se colocaron en moldes de acero y se orientaron de manera longitudinal o transversal; inmediatamente a cada molde se le adicionó parafina líquida y se le colocó el soporte de plástico. Los moldes se enfriaron a temperatura ambiente por 2 h y posteriormente a 4 °C por 10 min. Por último, se retiraron los moldes metálicos y las muestras se marcaron con la nomenclatura correspondiente para su correcta identificación.

2.1.11.4 Cortes histológicos

Las muestras incluidas en parafina fueron seccionadas empleando un micrótopo de rotación (Microm ® HM 325). El grosor de los cortes fue de 20 micras para semillas SI25 y de 16 micras para semillas SM65. El espaciado entre los cortes fue de 5 micras. Los cortes se extendieron en un cristalizador adicionado con agua destilada temperada entre 40 y 50 °C. Los cortes se recuperaron en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina (Sigma), enseguida se secaron a temperatura ambiente y se almacenaron para su desparafinación.

2.1.11.5 Desparafinación de muestras

Los portaobjetos conteniendo los cortes histológicos en parafina se colocaron a 57 °C por 40 min en una estufa para desparafinación (FELISA mod. 132-A). Enseguida, los portaobjetos se incubaron por 40 min en un recipiente conteniendo ultra clear (J.T. Baker). Concluido el tiempo, los portaobjetos se transfirieron e incubaron por 20 min en xileno puro (Baker Analyzed[®] Reactivo); se realizaron 2 recambios adicionales de xileno y en cada ocasión se incubaron por 20 min. Los portaobjetos se transfirieron a soluciones decrecientes de etanol (100, 90 y 70%, v/v, respectivamente), en cada solución los portaobjetos se incubaron por 10 min. Enseguida, los portaobjetos se incubaron por 10 min en agua bidestilada estéril y por último otros 10 min en 0.05% (p/v) azida de sodio. Los tejidos desparafinados se almacenaron a 4 °C en una cámara húmeda hasta su uso.

2.1.11.6 Incubación con COM2-DAB, COM2-AlexaF488, AlexaF488 conjugado a anticuerpo secundario contra IgG de conejo y otros fluoróforos

Inmunolocalización de la proteína DING con los anticuerpos COM2-DAB y COM2-AlexaF488.

Los cortes histológicos de semillas de 25 dpa (SI25) y de 65 dpa (SM65) se lavaron tres veces por 5 min cada vez con 50 μ L de PBS. Enseguida, los cortes se bloquearon por 5 min en 5% (p/v) leche descremada disuelta en PBS. Concluida la incubación los cortes se lavaron con PBS por tres veces (5 min cada vez) y se adicionaron con 15 μ L de COM2-DAB sin diluir o con 50 μ L de diferentes diluciones (1: 10, 1: 50, 1: 250 o 1: 500 v/v) de los anticuerpos COM2-DAB o COM2-AlexaF488. Los cortes adicionados con COM2-DAB o COM2-AlexaF488 se incubaron por 50 min en oscuridad. Enseguida, los cortes histológicos se lavaron como se indicó anteriormente.

Una parte de las muestras tratadas con COM2-DAB o COM2-AlexaF488 se añadieron con 50 μ L de PBS; a las muestras restantes se les añadieron 50 μ L de yoduro de propidio (PI, 0.3 o 0.9 μ M de concentración final) o 50 μ L de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 0.3 μ M concentración final) y se incubaron por 20 min en oscuridad. Adicionalmente, sólo los tejidos de SI25 fueron tratados con Lucifer yellow (LY, 0.25 mg). Transcurrido el tiempo de incubación, los cortes se lavaron tres veces con PBS por 5 min cada vez. Después del último lavado, los portaobjetos que contenían los cortes histológicos se adicionaron con 60% glicerol/PBS (v/v), se cubrieron con sus respectivos cubreobjetos, se sellaron con esmalte de uñas y se almacenaron en oscuridad hasta su análisis por microscopía confocal. En el caso de los cortes utilizados como testigos para autofluorescencia (SI25 y SM65, respectivamente) las preparaciones histológicas se trataron de manera parecida a los cortes histológicos incubados para la inmunodetección, excepto que en ningún momento fueron adicionados con anticuerpos.

Inmunolocalización indirecta con el anticuerpo primario COM2 y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 488 contra IgG de conejo.

La inmunolocalización de las proteínas DING en los cortes histológicos de semillas de 65 dpa (SM65) se realizó siguiendo el proceso de inmunolocalización arriba descrito (inmunolocalización con los anticuerpos COM2-DAB y COM2-AlexaF488), excepto que

los cortes se incubaron con 50 μ L de anticuerpo COM2 (dilución 1: 50, v/v) y en oscuridad por 60 min. Enseguida, los cortes histológicos se lavaron tres veces con 50 μ L de PBS por 5 min cada vez. Concluido los lavados, los cortes se incubaron con 50 μ L de un anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (dilución 1: 50, v/v) y que reconoce las IgG de conejo. Las reacciones de inmunolocalización se incubaron en oscuridad por 60 min. Después de la incubación, los cortes histológicos siguieron el tratamiento descrito para la incubación con PI y DAPI. Concluida la incubación, los cortes se mantuvieron en oscuridad hasta su análisis.

2.1.11.7 Microscopía confocal

Los análisis de microscopía confocal se realizaron en un microscopio confocal Olympus FV100 SW que para la visualización de las imágenes incluye el software FV10 ASW 3.1. Las observaciones con el microscopio se realizaron bajo las siguientes condiciones: objetivos UPLSAPO 10X 2 (NA:0.40), UPLFLN 40X O (NA:1.3) y PLAPON 60X O (NA:1.42); la velocidad de análisis fue de 20.0 μ s/pixel, el tamaño de resolución de la imagen fue de 512*512 pixeles.

La detección de la fluorescencia en los cortes histológicos de SI25 se realizó en dos fases; cada una con dos canales. En la fase 1, el primer canal utilizó una longitud de onda de excitación a 461 nm y longitud de onda de emisión a 488 nm (fluorescencia COM2-AlexaF488), mientras que el segundo canal utilizó una longitud de onda de excitación a 520 nm y longitud de onda de emisión a 543 nm (fluorescencia PI). En la fase 2 un canal con longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm (fluorescencia COM2-DAB); el segundo canal utilizó longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm (fluorescencia LY).

La detección de fluorescencia en los cortes histológicos de semillas de 65 dpa (SM65) tratados con COM2-DAB o COM2-AlexaF488; se realizaron en una fase con dos canales de observación. En el primer canal se visualizó la fluorescencia de COM2-DAB (longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm) o COM2-AlexaF488 (longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 526 nm), en el segundo canal se detectó la fluorescencia del PI (longitud de onda de excitación de 543 nm y longitud de onda de emisión de 619 nm).

2.1.12 Localización de gránulos de almidón en semillas de 65 dpa (SM65)

Dado que se ha descrito que, en las solanáceas, los gránulos de almidón se almacenan como estructuras de reserva en las semillas (Dias et al., 2013; Filippa y Bernardello., 1992), entonces, en los cortes histológicos de las semillas de 65 dpa (SM65) se analizó su posible acumulación y localización. Brevemente, cortes histológicos de SM65 adheridos a portaobjetos se lavaron tres veces con PBS (5 min cada lavado). Enseguida, los cortes se adicionaron con PBS, se cubrieron con cubreobjetos y se observaron bajo un microscopio Axioplan; provisto con una cámara AxioCam ICc5. Las fotografías adquiridas se analizaron con el Software AxioVision SE64 Rel 4.8. Una vez registrada la morfología de los cortes histológicos sin tinción, a los portaobjetos se les retiró el cubreobjetos y los cortes histológicos fueron adicionados con 50 μ L de lugol (tinción para almidón) por 5 min en oscuridad. Posteriormente, a los cortes histológicos se les retiró el excedente de lugol, se añadió PBS fresco y se analizaron bajo campo claro en el microscopio Axioplan.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Comparación del contenido proteico en fracciones de hojas y semillas de *C. chinense*.

La comparación del contenido de proteína obtenido durante el fraccionamiento de las hojas senescentes se muestra en el cuadro 3.1. En la proteína total de hoja senescente (PTHS), se recuperó un volumen final de 10.5 mL con un contenido de proteína de 9.313 mg, cantidad que fue considerada como el 100% de proteína. Para la proteína soluble de hoja senescente (PSHS), se recuperaron 10.1 μ mL con 8.039 mg de proteína, correspondiente al 86.3%. En lo que respecta a la proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal de hoja senescente (PMHSi), se recuperaron 3.9 mL con un contenido de proteína de 0.029 mg, para un 0.31% de proteína. Para la proteína membranal de hoja senescente recuperada con Tritón X-100 (PMHSTr) se obtuvieron 3.8 mL con un contenido total de proteína de 0.484 mg, cantidad que representó el 5.19%. Por último, de la proteína membranal de hoja senescente recalcitrante a Tritón X-100 (PMHSrTr), solo se recuperó 0.1 mL por tal razón la cantidad de proteína en dicho volumen no se determinó.

Cuadro 3. 1 Comparación de contenido proteico en diferentes fracciones de hojas senescentes de chile habanero.

Muestra	Concentración de proteína (μ g/ μ L)	Volumen final (mL)	Proteína total (mg)	Porcentaje del contenido proteico (%)
PTHS	0.887	10.5	9.313	100 %
PSHS	0.796	10.1	8.039	86.3 %
PMHSi	0.003	3.9	0.029	0.31 %
PMHSTr	0.051	3.8	0.484	5.19 %
PMHSrTr	XXX	0.1	XXX	XXX

Las marcas XXX en las columnas corresponden a valores que no pudieron ser determinados, debido a que PMHSrT fue resuspendida en amortiguador de Laemmli 1X.

La comparación del contenido de proteína obtenido en la extracción secuencial de las semillas de chile habanero de 65 dpa (Cuadro 3.2) mostró que la proteína total de semillas de 65 dpa (PTSM65) contenía 12.414 mg en un volumen total de 8.2 mL, tal cantidad se consideró como el 100% de proteína. Para la fracción de proteína soluble (PSSM65), se recuperaron 10.654 mg en un volumen de 7.8 mL con una recuperación del 85.82%. Por otra parte, la proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal (PMSM65i), representó el 1.28% con respecto a la proteína total dado que solamente se recuperaron 0.16 mg en 6.4 mL. La proteína membranal de semillas de 65 dpa recuperada con Tritón X-100 (PMSM65Tr) se obtuvo en 7.3 mL, siendo una cantidad de 0.17 mg para un rendimiento de 1.36%. Por último, la proteína de membrana de semillas de 65 dpa recalcitrante a la solubilización con Tritón X-100 (PMSM65rTr), se recuperó en un volumen de 0.1 mL y no se determinó su porcentaje dado que se resuspendieron directamente en amortiguador de Laemmli 1X.

Cuadro 3. 2 Comparación de contenido proteico en diferentes fracciones de semillas de chile habanero de 65 dpa.

Muestra	Concentración de proteína (µg/µL)	Volumen Final (mL)	Proteína total (mg)	Porcentaje del contenido proteico (%)
PTSM65	1.514	8.2	12.414	100
PSSM65	1.366	7.8	10.654	85.82
PMSM65i	0.025	6.4	0.16	1.28
PMSM65Tr	0.024	7.3	0.17	1.36
PMSM65rTr	XXX	0.1	XXX	XXX

XXX en las columnas corresponden a valores que no pudieron ser determinados, debido a que PMSM65rTr fue resuspendida en amortiguador de Laemmli 1X.

3.1.1 Perfil de proteínas en geles de SDS-PAGE y detección de la proteína DING por western blot en extractos proteicos de hojas de *C. chinense* en diferentes estadios de desarrollo

La separación por electroforesis en geles de 15% SDS-PAGE del perfil de proteína total (10 µg/carril) de las hojas de chile habanero en los diferentes estadios de desarrollo; hojas jóvenes (PTHJ), hojas maduras (PTHM) y hojas senescentes (PTHS), mostró que el perfil de polipéptidos es abundante en las diferentes muestras y que algunas de las bandas de proteína mantienen abundancias similares en los tres extractos i.e., el polipéptido ~34 kDa, de acuerdo con la tinción; en contraste, otros polipéptidos aumentaron su cantidad conforme aumentó el grado de desarrollo de las hojas, i.e., ~10 y ~47 kDa (Figura 3.1 A). Por otra parte, el western blot con el anticuerpo COM2 en una membrana de PVDF conteniendo perfiles idénticos de proteína total, detectó un polipéptido de ~39 kDa en los carriles que contenían la proteína total de PTHJ, PTHM y PTHS, así como en la fracción proteica G10P1.7.57 (Figura 3.1 B). La señal de inmunodetección fue más fuerte en la fracción correspondiente a PTHJ con respecto a las de PTHM y PTHS (Figura 3.1 C). En el caso de la membrana incubada únicamente con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina, se observó que dicho anticuerpo se une de manera inespecífica a dos polipéptidos con masas moleculares de ~34 y ~47 kDa (Fig. 3.1 C).

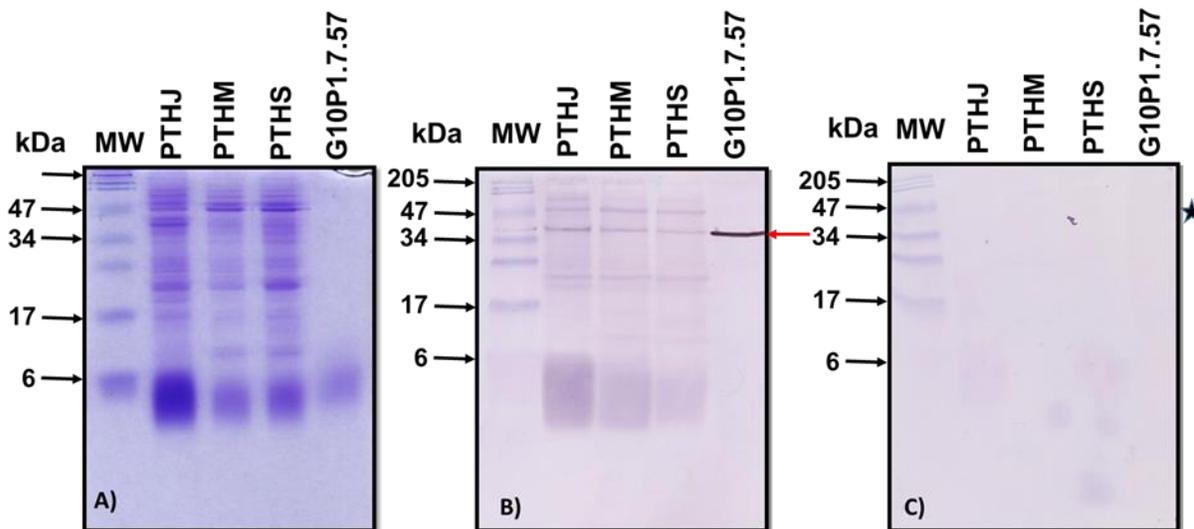


Figura 3. 1 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína total de hojas de chile habanero con diferente grado de desarrollo. A) Patrón de proteínas en un gel de SDS-PAGE de 15% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Western blot usando el anticuerpo COM2 después de haber sido detectado con un anticuerpo secundario contra conejo, conjugado a fosfatasa alcalina. C) Membrana incubada solo con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (control de reconocimiento inespecífico). PTHJ, proteína total de hojas jóvenes; PTHM, proteína total de hojas maduras; PTHS, proteína total de hojas senescentes; G10P1.7.57, fracción de proteína (1 μ g); MW, marcador de masa molecular de proteínas de referencia (2.5 μ g). La flecha en rojo indica la localización de la proteína DING (~39 kDa) y la estrella a la derecha indica la unión inespecífica del anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina.

El análisis por SDS-PAGE en un gel de 15% de poliacrilamida y la tinción con azul de Coomassie de la proteína soluble (10 μ g/carril) de hojas jóvenes (PSHJ), hojas maduras (PSHM) y hojas senescentes (PSHS) mostró un perfil diverso de polipéptidos; algunos de los polipéptidos se acumularon conforme aumentó el grado de desarrollo de la hoja i.e., ~47 kDa (Figura 3.2 A), mientras que otros desaparecieron (i.e., ~17 kDa). El western blot con el anticuerpo COM2 sobre dichas membranas mostró que el anticuerpo reaccionó con un polipéptido de ~39 kDa en la fracción soluble de PSHJ, PSHM y PSHS (Figura 3.2 B). El inmunoreconocimiento fue mayor en la proteína soluble de hojas jóvenes (PSHJ); dado que la intensidad de la señal fue mayor en esa muestra. Por otra parte, el polipéptido de ~39 kDa también fue detectado en la fracción G10P1.7.57, la cual se utilizó como testigo positivo (Figura 3.2 B). En contraste, en la membrana incubada únicamente con el anticuerpo secundario, no se observó señal de inmunoreconocimiento. Estos resultados

indican que el anticuerpo COM2 reconoce específicamente a la banda de ~39 kDa en la proteína soluble de hojas.

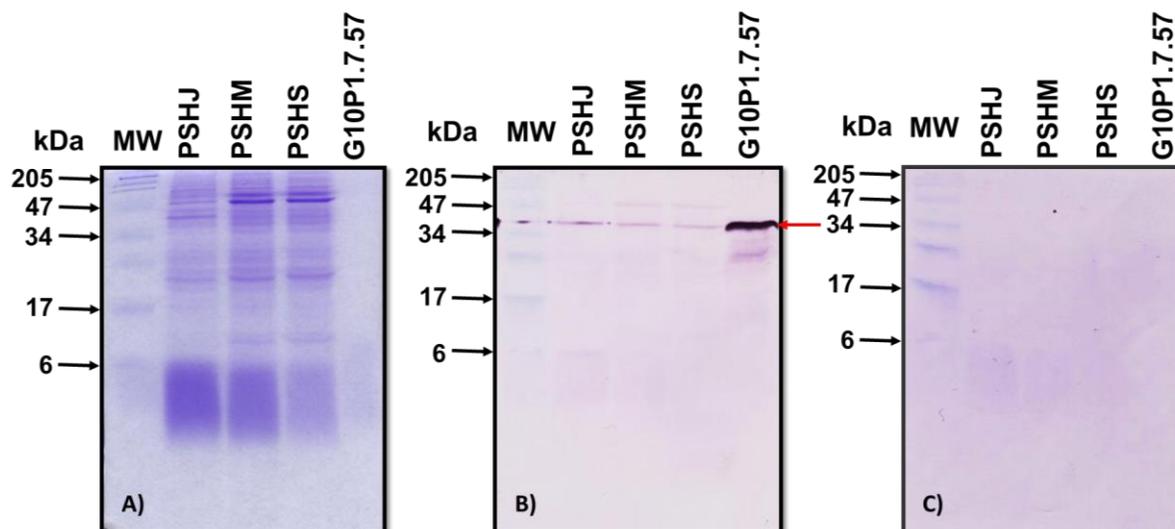


Figura 3. 2 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína soluble de hojas de chile habanero en diferente estadio de desarrollo. A) Patrón de proteínas (10 μ g) en un gel de SDS-PAGE de 15% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Inmunoblot con el anticuerpo COM2 detectado por medio de un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. C) Membrana incubada únicamente con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (control de unión inespecífica del anticuerpo secundario). Proteína soluble de hojas jóvenes; PSHJ, proteína soluble de hojas maduras; PSHM, proteína soluble de hojas senescentes PSHS; fracción proteica G10P1.7.57 (1 μ g); MW, marcador de masa molecular de proteínas (2.5 μ g). La flecha en rojo indica la localización de la proteína DING (~39 kDa).

El análisis en gels de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) del perfil de polipéptidos (10 μ g/carril) de proteína membranal de hojas jóvenes (PMHJ), hojas maduras (PMHM) y hojas senescentes (PMHS) y su tinción con azul de Coomassie (Figura 3.3 A), mostró un abundante perfil de polipéptidos en todas las muestras, así como una acumulación diferencial de los mismos en algunos casos (i.e., ~47, ~27, ~10 kDa), comportamiento que parece estar asociado con el grado de desarrollo (Figura 3.3 A). En lo que respecta al western blot, se observó que el anticuerpo COM2 reconoció al polipéptido de ~39 kDa en las diferentes fracciones membranales (PMHJ, PMHM y PMHS), así como en la fracción G10P1.7.57 (Figura 3.3 B). Sin embargo, el inmunoreconocimiento del anticuerpo por dichas fracciones membranales no fue contundente, debido a que, se encontró que el

procedimiento de extracción descrito en el apartado 2.1.2.1 no fue el adecuado para obtener las fracciones proteicas membranales de diferentes estadios de desarrollo de hojas; no se hicieron lavados previos a las extracciones subsecuentes y esto resultó en contaminación cruzada de proteína entre las fracciones subcelulares.

Por otra parte, la incubación de una membrana únicamente con el anticuerpo secundario mostró que dicho anticuerpo reconoce de manera inespecífica a una banda de ~47 y otra de ~8.7 kDa (Figura 3.3 C).

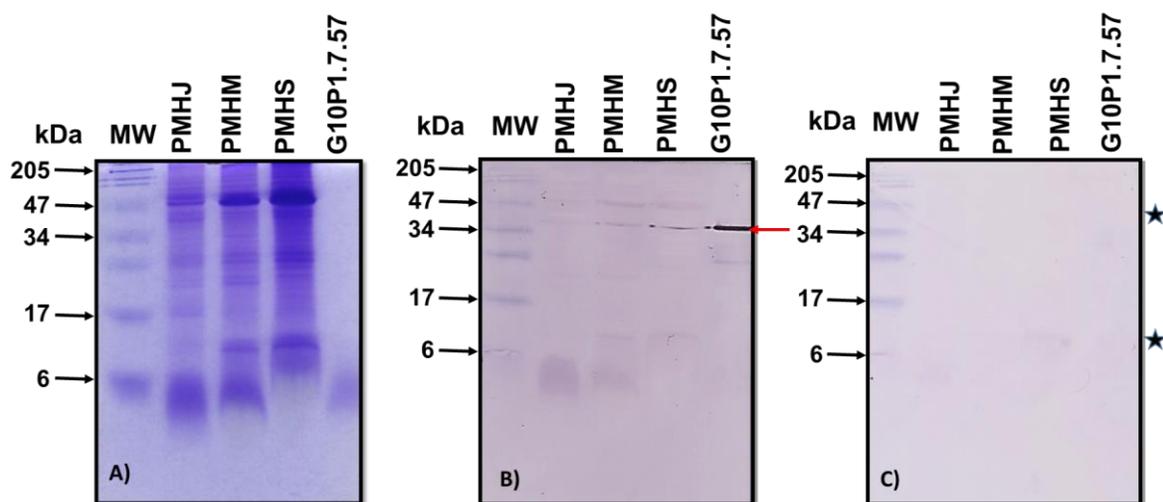


Figura 3. 3 Perfil de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 a partir de proteínas membranales de hojas de chile habanero en diferente estadio de desarrollo. A) Patrón de proteínas en un gel de 15% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Inmunoblot con el anticuerpo COM2 revelado mediante un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. C) Membrana incubada solo con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Proteína membranal de hojas jóvenes (PMHJ), proteína membranal de hojas maduras (PMHM), proteína membranal de hojas senescentes (PMHS), 1 μ g de fracción G10P1.7.57, que contiene proteínas DING (G10P1.7.57), 2.5 μ g de marcador de masa molecular de proteínas (MW). La flecha en color rojo indica la localización de la proteína DING (~39 kDa) y las estrellas indican la unión inespecífica del anticuerpo secundario.

3.1.2 Perfil de proteína en geles de SDS-PAGE, análisis por western blot y actividad de fosfatasa endógena en extractos de proteína de hojas senescentes de *C. chinense*.

Dado que los resultados de inmunodetección mostraron que la proteína DING (polipéptido de ~39 kDa) se encontraba presente tanto en la proteína soluble como membranal en todos los estadios fisiológicos de hojas de chile habanero, entonces se realizaron

modificaciones al proceso de extracción de proteínas de membrana con el objetivo de determinar si la proteína DING de chile habanero es una proteína que se asocia a membrana. Dicho protocolo de extracción se describe en el apartado 2.1.2.2 de materiales y métodos, y consistió básicamente en lavar las proteínas de membrana con amortiguador de extracción adicionado con NaCl o el detergente Tritón X-100.

En la figura 3.4 A se observa el perfil proteico de los diferentes extractos de hojas senescentes. El perfil electroforético de la proteína soluble de hojas senescentes de chile habanero (PSHS) fue similar al perfil de proteína total (PHTS), dado que, en ambas muestras se detectaron bandas de proteína con masas moleculares de ~105.9, ~70.7, ~67.6, ~50.1, ~42.6, ~35.4, ~31.6, ~26.3, ~25.1, ~21.8; ~18.8, ~14.1 y ~8.4 kDa. Por otra parte, en el carril correspondiente a proteína de membrana de hojas senescentes recuperada con Tritón X-100 (PMHSTr) no se observó ninguna proteína. En el caso del carril correspondiente a la proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal de hojas senescentes (PMHSi) solo se observó una banda con masa molecular aproximada de 63 kDa. Con respecto al perfil proteico de la proteína de membrana recalcitrante a Tritón X-100 (PMHSrTr) se observó un barrido de polipéptidos, este comportamiento quizás estuvo asociado con un exceso de proteína.

El western blot con el anticuerpo COM2 (Figura 3.4 B), detectó proteínas DING con masas moleculares cercanas a ~54.9; ~39; ~21 y 7.9 kDa en la proteína total y soluble de las hojas senescentes (PHTS y PSHS, respectivamente). Cabe resaltar que, en el grupo de trabajo, previamente se han hallado proteínas DING con pesos moleculares aproximados de ~39 y ~7.57 kDa en extractos solubles de semillas. En el control positivo de inmunodetección (fracción G10P1.7.57) el anticuerpo COM2 inmunoreconoció a una banda de ~39 kDa (Figura 3.4 B). Este testigo positivo también fue colocado como referencia en el control de pegado inespecífico del anticuerpo secundario (Figura 3.4 C) y en el ensayo de actividad endógena de fosfatasa alcalina (Figura 3.4 D). El resultado mostró que la incubación de la membrana solo con el anticuerpo secundario no produjo señal alguna apoyando entonces la especificidad de reconocimiento del polipéptido de ~39 kDa con el anticuerpo COM2. Por otra parte, el ensayo también reveló que tanto las fracciones proteicas de hojas senescentes como la fracción G10.P1.7.57 no tienen actividad endógena de fosfatasa alcalina.

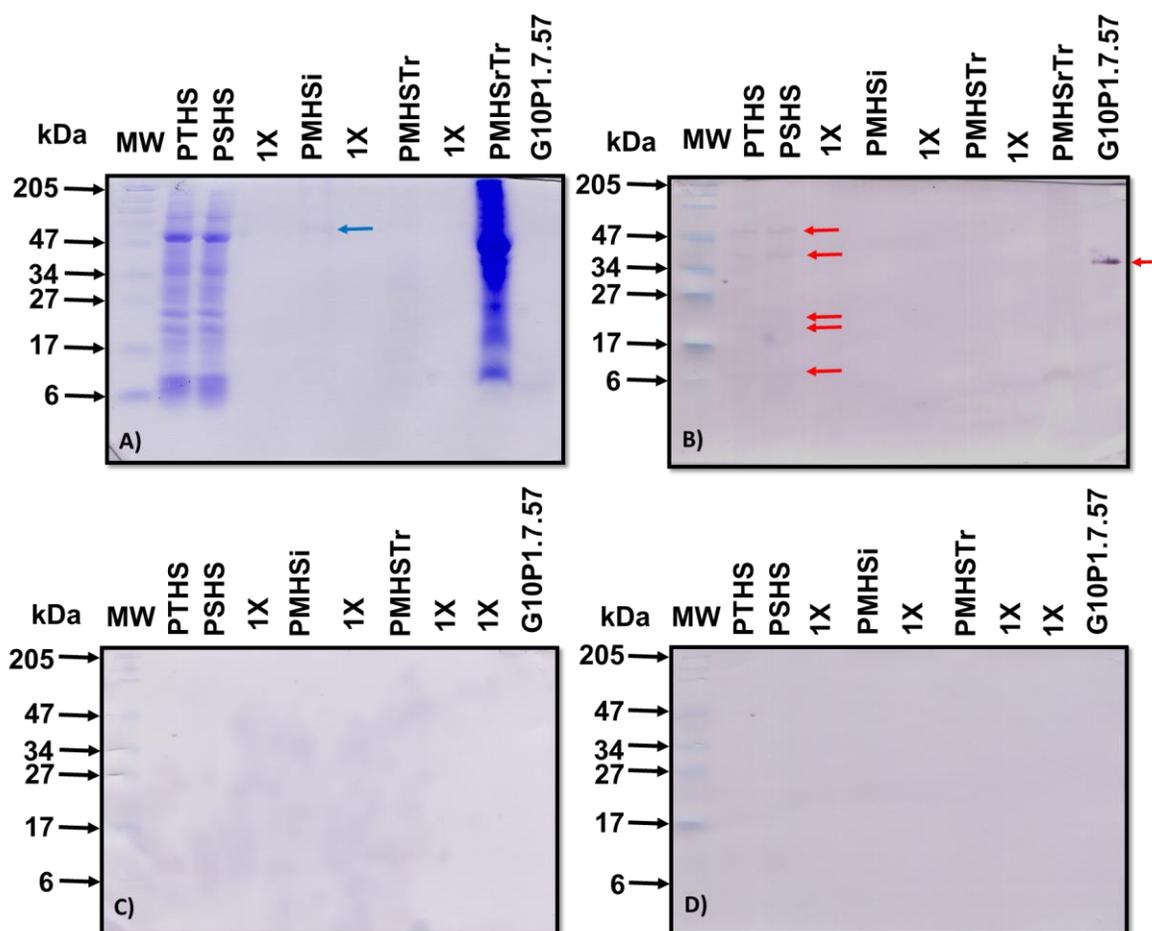


Figura 3. 4 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 de fracciones de proteína total, soluble y membranal de hojas senescentes de chile habanero. A) Perfil proteico de extractos de hojas senescentes de chile habanero teñido con azul de Coomassie en un gel de SDS-PAGE de 12% de poliacrilamida. B) Inmunoblot con el anticuerpo COM2 y un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. C) Testigo negativo incubado solo con anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. D) Evaluación de actividad de fosfatasa endógena de los extractos proteicos de hojas senescentes. MW, proteínas de masa molecular conocida (BioRad; 2.5 μ g); PTHS, proteína total de hojas senescentes (17.1 μ g); PSHS, proteína soluble de hojas senescentes (17.1 μ g); PMHSi, proteína unida por interacción iónica a la fracción membranal de hoja senescente (5.5 μ g); PMHSTr, proteína de membrana de hoja senescente recuperada con Tritón X-100 (9.2 μ g) y PMHSrTr, proteína de membrana de hoja senescente recalcitrante a la extracción con Tritón X-100 (concentración desconocida). 1X, amortiguador de Laemmli 1X; G10P1.7.57, fracción proteica G10P1.7.57 que contiene proteínas DING (0.85 μ g). Flechas en color rojo indican la posición de migración de las putativas proteínas DING.

3.1.3 Perfil de proteína en geles de SDS-PAGE y western blot en extractos proteicos de semillas de *C. chinense* en diferentes estadios de desarrollo

La tinción con azul de Coomassie de los geles de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) donde se separó el perfil de proteína total (10 µg/carril) de las semillas de chile habanero de 25 dpa (PTSI25), 45 dpa (PTSS45) y 65 dpa (PTSM65) mostró un perfil complejo de polipéptidos (Figura 3.5 A). El western blot con el anticuerpo COM2 detectó una banda de ~39 kDa en los carriles correspondientes a las fracciones totales de los diferentes estadios de semilla de chile habanero, así como en la fracción G10P1.7.57 (Figura 3.5 B). En la membrana incubada solo con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina se detectó a una banda de ~47 kDa como parte del pegado inespecífico del anticuerpo secundario (Figura 3.5 C).

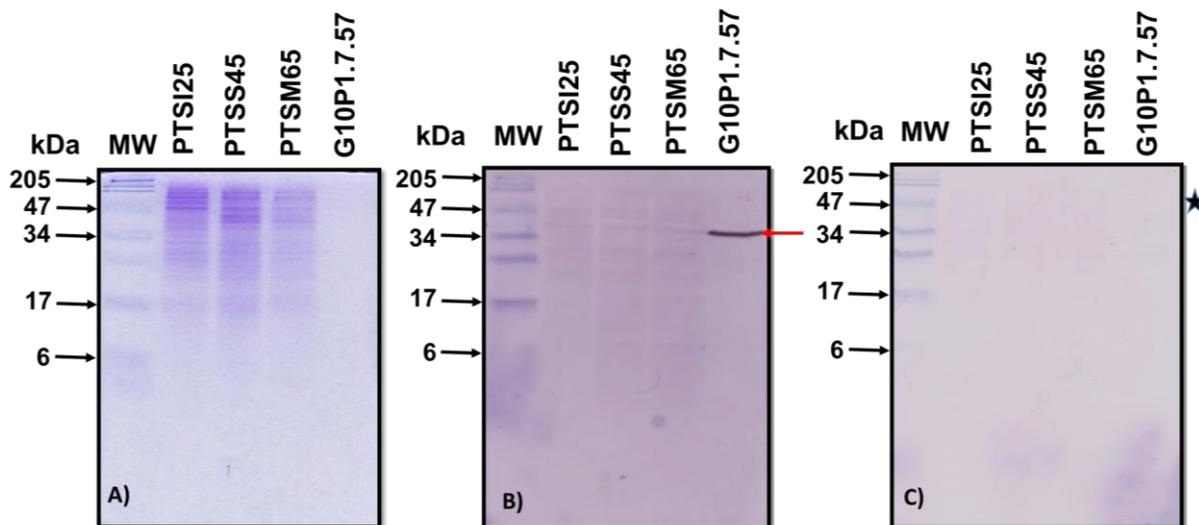


Figura 3. 5 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína total de semillas de chile habanero en diferentes etapas de desarrollo. A) Patrón de proteínas en un gel de SDS-PAGE de 15% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Inmunoblot con el anticuerpo COM2 revelado con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. C) Membrana incubada solo con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (control de unión inespecífica). Proteína total de semillas de 25 dpa (PTSI25), proteína total de semillas de 45 dpa (PTSS45) y proteína total de semillas de 65 dpa (PTSM65). Las muestras de semilla contenían 10 µg de proteína. G10P1.7.57 que contiene proteínas DING (G10P17.57, 1 µg); MW, proteínas de masa molecular conocida (BioRad; 2.5 µg). La flecha roja indica la posición de las proteínas inmunoreactivas con el anticuerpo COM2. La estrella a la derecha indica el pegado inespecífico del anticuerpo secundario.

La tinción con azul de Coomassie del gel de SDS-PAGE de 15% de poliacrilamida donde se analizaron los perfiles de proteína soluble (10 µg/carril) de semillas de frutos de chile habanero de 25 dpa (PSSI25), de semillas de 45 dpa (PSSS45) y de 65 dpa (PSSM65) mostró un perfil complejo de polipéptidos (Figura 3.6 A). Se detectó que una proteína de ~7 kDa aumentó su contenido conforme aumentó la madurez de la semilla, mientras que una de ~47 kDa disminuyó conforme aumentó la madurez (Figura 3.6 A). Por otra parte, el western blot incubado con el anticuerpo COM2 detectó la presencia de proteínas DING en las tres fracciones de proteína soluble de las semillas en diferentes estados de madurez (PSSI25, PSSS45 y PSSM65) siendo más abundante la señal de inmunoreconocimiento en PSSI25. La señal de inmunoreconocimiento del polipéptido de ~39 kDa detectada en las tres fracciones solubles coincide con la masa molecular del polipéptido detectado en la fracción G10P1.7.57, la cual contiene proteínas DING (Figura 3.6 B); este hecho confirma que el polipéptido de ~39 kDa fue reconocido específicamente por el anticuerpo COM2. La incubación de una membrana desarrollada en paralelo donde solo se añadió anticuerpo secundario no produjo ninguna señal (Figura 3.6 C).

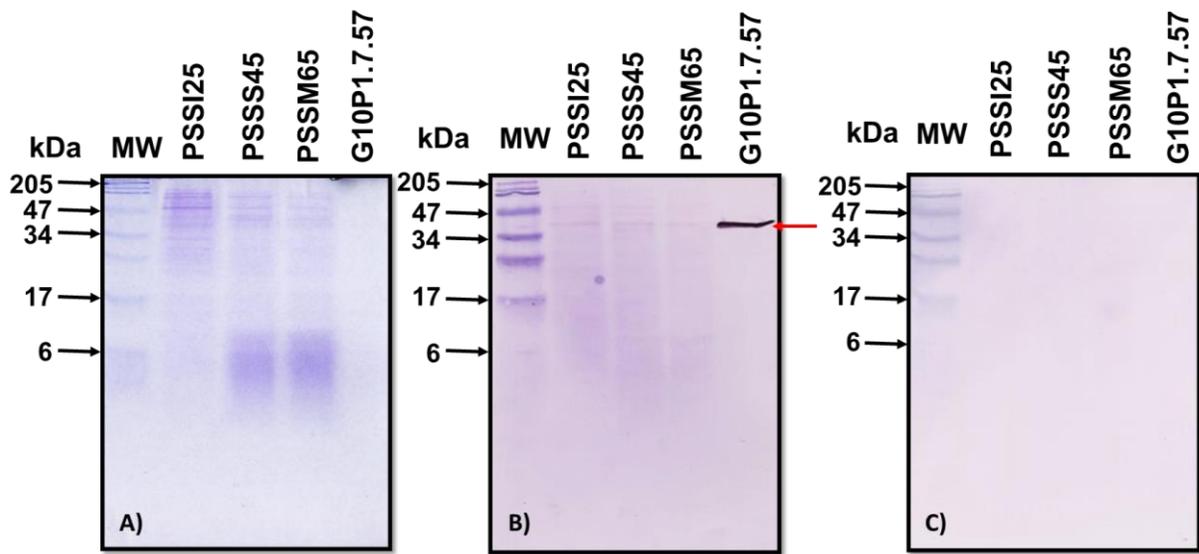


Figura 3. 6 Perfil de proteína e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones de proteína soluble de semillas de chile habanero en diferentes estadios de desarrollo. A) Patrón de proteínas en un gel de SDS-PAGE de 15% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Perfil de inmunodetección producido por el anticuerpo COM2 después de ser revelado con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. C) Membrana de PVDF incubada sólo con el anticuerpo secundario (control de pegado inespecífico). Proteínas de fracción soluble de semillas de 25 dpa (PSSI25), proteínas de fracción soluble de semillas de 45 dpa (PSSS45), proteínas de fracción soluble de semillas de 65 días dpa (PSSM65). Se aplicaron 10 μ g de proteína soluble de las muestras previamente descritas. G10P1.7.57, 1 μ g de fracción proteica de referencia que contiene proteínas DING. MW, proteínas de masa molecular conocida (2.5 μ g, BioRad). La flecha roja indica la localización de la proteína DING (~39 kDa).

El análisis del perfil de proteínas membranales (10 μ g/carril) provenientes de semillas de chile habanero de 25 dpa (PMSI25), 45 dpa (PMSS45) y de 65 dpa (PMSM65) presentaron un perfil complejo de polipéptidos; en particular, un polipéptido con masa molecular de ~79 kDa se acumuló de forma abundante en las fracciones PMSS45 y PMSM65; adicionalmente, un polipéptido de ~47 kDa se acumuló en la proteína membranal obtenida de semillas de 45 dpa (Figura 3.7 A). Por otra parte, el western blot mostró señal de inmunoreconocimiento positivo en el polipéptido de ~39 kDa en todas las fracciones membranales de las semillas (PMSI25, PMSS45 y PMSM65; Figura 3.7 B). Sin embargo, este resultado no fue contundente, debido a que, se encontró que el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2.1 no fue el adecuado para la extracción de las fracciones proteicas membranales de semillas en diferentes estadios de desarrollo; no se

realizaron lavados previos a las extracciones subsecuentes y esto resultó en contaminación cruzada de proteína entre las fracciones subcelulares. Por otra parte, la membrana incubada solo con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina, mostró que dicho anticuerpo se une de manera inespecífica a cuatro polipéptidos con masas moleculares de ~47, ~34, ~24 kDa y ~19 kDa (Figura 3.7 C).

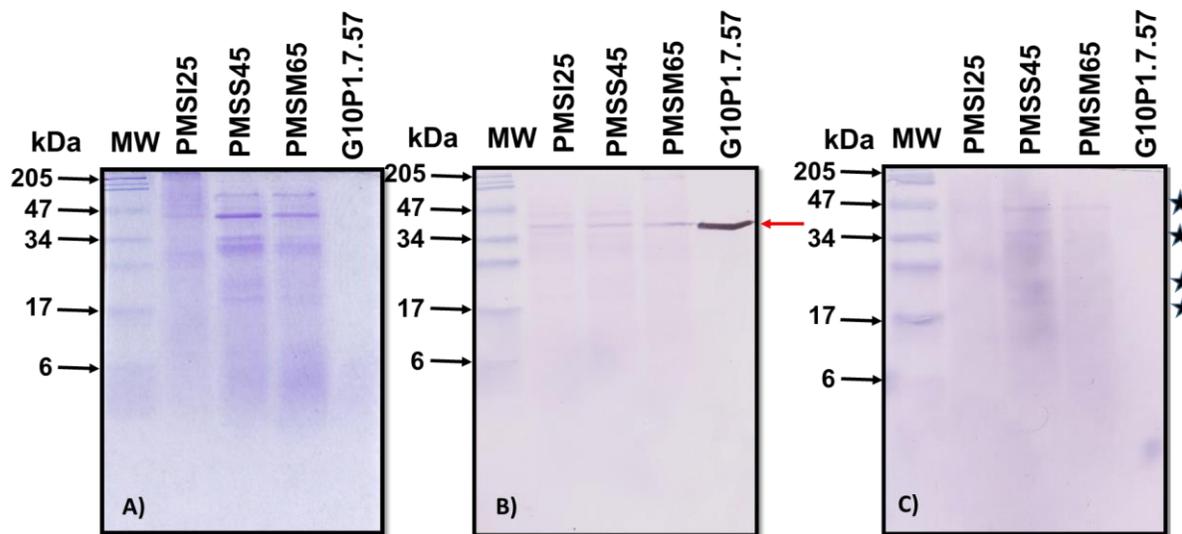


Figura 3. 7 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en proteína membranal obtenida a partir de semillas de chile habanero en diferentes estadios de desarrollo. A) Patrón de proteínas en gel de SDS-PAGE de 15% de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Señal de inmunoblot producido por el anticuerpo COM2 después de ser detectado con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. C) Membrana incubada con el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Proteína membranal de semillas de 25 dpa (PMSI25), proteína membranal de semillas de 45 dpa (PMSS45), proteína membranal de semillas de 65 dpa (PMSM65). Los carriles contenían 10 μ g de cada una de las muestras previamente descritas. G10P1.7.57, fracción de proteína que contiene proteínas DING (1 μ g). MW, proteínas de masa molecular conocida (2.5 μ g, Biorad). Las flecha roja indica la localización de la proteína DING (~39 kDa) y las estrellas a la derecha indican la unión inespecífica del anticuerpo secundario.

3.1.4 Perfil de proteína en gels de SDS-PAGE, análisis por western blot y actividad de fosfatasa endógena en extractos proteicos de semillas de 65 dpa

Para descartar la posibilidad de que la detección de proteínas DING en la proteína soluble y membranal de todos los estadios fisiológicos de semillas de chile habanero fuera producto de una contaminación de los extractos membranales con proteína soluble

durante el proceso de extracción, entonces se realizó una modificación al protocolo de extracción de proteína membranal (ver apartado 2.1.2.2). Dicha modificación consistió en realizar lavados a la pastilla resultante de la separación de la proteína soluble a 100,000 x g; y enseguida se realizó la limpieza de las proteínas de membrana.

El perfil proteico de semillas maduras de chile habanero de 65 dpa después de ser separado en un gel de SDS-PAGE de 12% de poliacrilamida y teñido con azul de Coomassie (Figura 3.8 A) reveló que los polipéptidos de la proteína soluble (PSSM65) son idénticos a los de la proteína total (PTSM65), aunque en PSSM65 la tinción fue más tenue con respecto a PTSM65. En ambos extractos se observaron proteínas con masas moleculares de ~63, ~44.6, ~38.9, ~32.3, ~28, ~23.7, ~17.7, ~9.7 kDa. En lo que respecta a la muestra de proteínas unidas por interacción iónica a la fracción membranal (PMSM65i), se detectaron bandas de proteína con masas moleculares de ~165.9, ~112.2, ~70.8, ~63.1, ~50.1, ~44.6 y ~38.9 kDa (flechas azules, carril PMSM65i, Figura 3.8 A). Para la proteína de membrana de semillas de 65 dpa recuperada con Tritón X-100 (PMSM65Tr) se observó una banda de proteína con una masa molecular de ~70.8 kDa. Con respecto a la proteína de membrana de semillas de 65 dpa recalcitrante a Tritón X-100 (PMSM65rTr), el perfil proteico mostró polipéptidos con masas moleculares de ~112.2, ~70.8, ~63.1, ~50.1, ~44.6, ~38.9, ~32.3, ~28, ~25, ~23.7 y ~18.8 kDa (flechas azules, carril PMSM65rTr, Figura 3.8).

No obstante, lo complejo del perfil de polipéptidos de la proteína de membrana de las semillas de 65 dpa, el anticuerpo COM2 solo reaccionó con la proteína DING de ~39 kDa y las putativas proteínas DING con masas moleculares ~58.8, ~35.4, ~30.9, ~7 y ~5 kDa en la proteína total y la proteína soluble de semillas maduras de 65 dpa (PTSM65 y PSSM65, respectivamente; Figura 3.8 B). Es de resaltar que, en la proteína soluble de semillas, el grupo de trabajo previamente ha encontrado proteínas DING con masas moleculares cercanas a los ~39 y ~7.57 kDa. En el testigo positivo de la inmunodetección de proteínas DING (fracción G10P1.7.57), se detectó una banda de ~39 kDa (Figura 3.8 B). En contraste, no se detectó señal de inmunoreconocimiento en la membrana que fue incubada solo con anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (testigo negativo; Figura 3.8 C). La evaluación de actividad de fosfatasa endógena de la figura 3.8 D reveló que los extractos proteicos de semillas de 65 dpa no presentan actividad endógena de

fosfatasa alcalina.

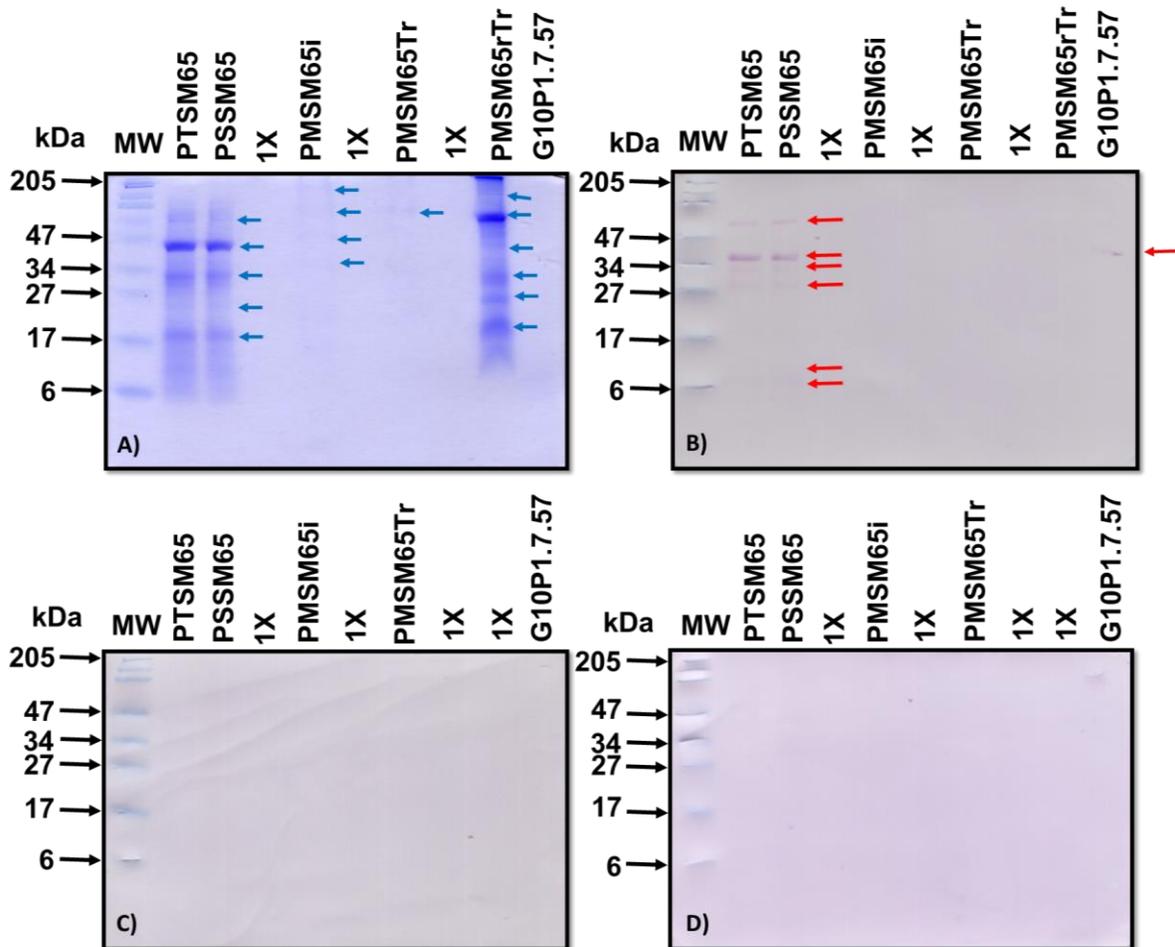


Figura 3. 8 Patrón de proteínas e inmunodetección con el anticuerpo COM2 en fracciones proteicas de semillas de chile habanero de 65 dpa. A) Perfil proteico de extractos de semillas de chile habanero de 65 dpa teñido con azul de Coomassie en un gel de SDS-PAGE de 12% de poliacrilamida. B) Inmunoblot con el anticuerpo COM2 después de haber sido revelado con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. C) Membrana incubada solo con anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. D) Evaluación de actividad de fosfatasa endógena de los extractos de semillas de 65 dpa. MW, proteínas de masa molecular conocida (2.5 μ g, BioRad). PTSM65, extracto proteico total de semillas de 65 dpa (15 μ g); PSSM65, proteína soluble de semillas de 65 dpa (15 μ g); PMSM65i, proteínas unidas por interacción iónica a la fracción de membrana (4.2 μ g); PMSM65Tr, proteína de membrana recuperada con Tritón X-100 (2 μ g); PMSM65rTr, proteína de membrana recalcitrante a Tritón X-100 (concentración desconocida); 1X, Amortiguador de Laemmli a concentración 1X; G10P1.7.57, fracción proteica de referencia de proteínas DING (1 μ g). Flechas azules indican bandas de proteínas detectadas mediante la tinción con azul de Coomassie y flechas rojas indican la inmunodetección de la proteína DING (~39 kDa) y putativas proteínas DING.

3. 1.5 Perfiles de proteínas en geles de SDS-PAGE, análisis de “tipo competencia” y far western de extractos de hojas senescentes y de semillas de *C. chinense* 65 dpa

Para descartar la posibilidad de que el anticuerpo COM2 tuviera reacciones de reconocimiento inespecífico se evaluó la especificidad de dicho anticuerpo por medio de un ensayo de western blot y un ensayo de “tipo competencia”. Por otra parte, se realizó un far western blot con el objetivo de comprobar que la fracción G10P1.7.57, utilizada como sonda, pudiera estar interactuando con otras proteínas de los extractos proteicos PSHS y PSSM65. Como control positivo de inmunoreconocimiento se colocó a la fracción G10P1.7.57 (Figura 3.9).

La tinción del perfil de proteínas con azul de Coomassie en un gel de SDS-PAGE de 12% de poliacrilamida cargado con la proteína soluble de hojas senescentes de chile habanero (PSHS) y de la proteína soluble de semillas de 65 dpa (PSSM65; Figura 3.9) mostró un perfil complejo de polipéptidos con un rango de entre 10 y 150 kDa.

En lo que respecta a los ensayos de western blot, de “tipo competencia” y far western; se observó que en el ensayo de “tipo competencia” no se abatió la señal de inmunodetección del anticuerpo COM2 con respecto a la señal observada en el western blot, dado que, en ambos ensayos en la proteína soluble de las hojas senescentes (PSHS) y en la proteína soluble de la semilla de 65 dpa (PSSM65) se detectaron las proteínas con masas moleculares de ~120, ~63, ~56.2, ~39, ~36.7 y ~31.6 kDa, respectivamente. En la fracción G10P1.7.57 se detectaron proteínas con masas moleculares de ~39, ~31.6 y ~29.5 kDa (Figuras 3.9 B y C). Por otra parte, el far western blot mostró que la señal de inmunoreconocimiento de las proteínas DING disminuyó con respecto a la señal detectada en el western blot y en el ensayo de “tipo competencia” dado que en las proteínas de PSHS solo se detectaron la presencia de proteínas con masas moleculares de ~56.2 y ~39 kDa (Figura 3.9 D). Por el contrario, en las proteínas de PSSM65, se detectaron proteínas con masas moleculares de ~56.2, ~39 y ~31.6 kDa al igual que en el western blot y en el ensayo de “tipo competencia”; sin embargo, también hubo un aumento de la señal de las bandas por debajo de los ~37 kDa (Figura 3.9 D) que no se aprecian muy claramente en los ensayos de western y de “tipo competencia”.

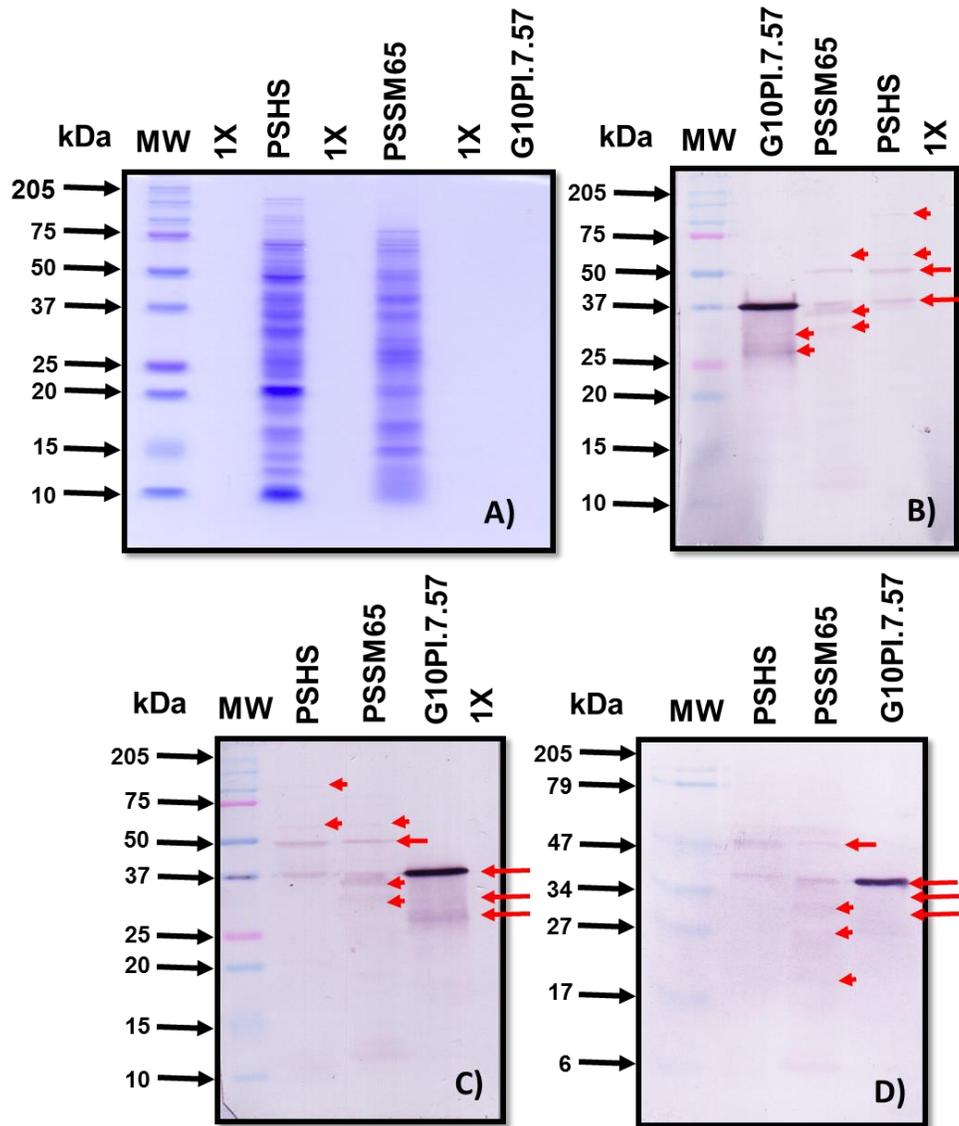


Figura 3. 9 Patrón de proteínas y evaluación de inmunodetección con el anticuerpo COM2 en proteínas solubles de hojas senescentes y semillas de chile habanero de 65 dpa mediante western blot, ensayo “tipo competencia” y far western blot. A) Perfil de proteína soluble de hojas senescentes y semillas de chile habanero de 65 dpa teñido con azul de Coomassie en un gel de SDS-PAGE de 12% de poliacrilamida. B) Western blot con el anticuerpo COM2. C) Ensayo “tipo competencia” con el complejo COM2-G10P1.7.57. y D) Far western blot, con la fracción G10P1.757 como sonda más el anticuerpo COM2. B, C y D se revelaron con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. MW, proteínas de masa molecular conocida (2.5 µg, BioRad). PSHS, proteína soluble de hojas senescentes (25 µg); PSSM65, proteína soluble de semillas de 65 dpa (25 µg). 1X, amortiguador de Laemmli a concentración 1X; G10P1.7.57, fracción proteica de referencia de proteínas DING (1 µg). Las flechas rojas indican la inmunodetección de la proteína DING de ~39 kDa y de las putativas proteínas DING.

3.2 Resultados de microscopía confocal

3.2.1 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 25 dpa

3.2.1.1 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 25 dpa mediante el anticuerpo COM2-DAB

En células del embrión de semillas de chile habanero de 25 dpa, el anticuerpo COM2-DAB se unió a estructuras celulares en la zona del citoplasma, de acuerdo a la fluorescencia detectada por microscopía confocal (Figuras 3.10 D y H). Tal como se observa en la imagen sobrepuesta (Merge) en la figura 3.10 H, la señal de fluorescencia emitida por el anticuerpo COM2-DAB se encontró fuera del núcleo, éste último identificado en color rojo mediante el fluoróforo ioduro de propidio (PI; Figura 3.10 C), y cerca de la matriz citoplasmática localizada en color amarillo mediante el fluoróforo Lucifer yellow (LY; Figuras 3.10 E, G e I). Lo anterior sugiere que en células de semillas de chile habanero de 25 dpa, la proteína DING de 39 kDa es citoplasmática (Figuras 3.10 G, H e I). Por otra parte, la señal de fluorescencia del Lucifer yellow se detectó tanto en la matriz citoplasmática como en el núcleo (Figuras 3.10 E, F e I) en células de semillas SI25.

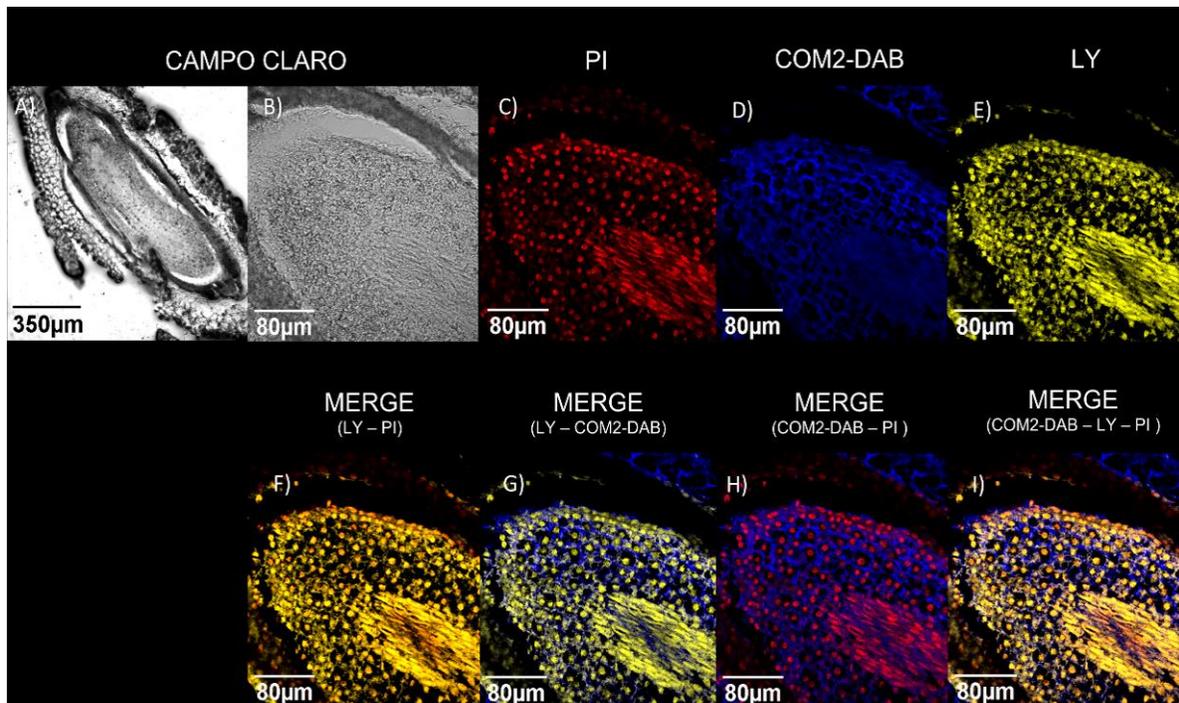


Figura 3. 10 Inmunocitlocalización de la proteína DING mediante el anticuerpo COM2-DAB en semillas de chile habanero de 25 dpa. Panel A) Corte histológico transversal de una semilla de chile habanero de 25 dpa (SI25) vista a 10X en campo claro. B) Amplificación a 40X del corte histológico transversal de SI25. C) Citolocalización de los núcleos con ioduro de propidio (PI) en color rojo; con longitud de onda de excitación a 520 nm y longitud de onda de emisión a 543 nm. D) Inmunodetección de la proteína DING en semilla de chile habanero (25 dpa) mediante el anticuerpo COM2-DAB, visto en color azul; con longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm. E) Citolocalización de estructuras celulares con el compuesto fluorescente Lucifer yellow (LY) en color amarillo, con longitudes de onda de excitación a 488 nm y de emisión a 520 nm. F). Sobrelapamiento de las señales detectadas en la figura C con la figura E. G) Sobrelapamiento de las señales detectadas en la figura D con la figura E. H) Sobrelapamiento de las señales en las figuras C y D. I) Sobrelapamiento de las señales en las figuras C, D y E. Las figuras de la B a la G fueron observadas a 40X. Regleta de 80 µm (línea de color negro o blanco). Todas las imágenes se visualizaron en el microscopio confocal Olympus FV100 SW con el programa FV10 ASW 3.1.

3.2.1.2 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 25 dpa mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488

El anticuerpo COM2-AlexaF488 se unió a estructuras celulares en la misma zona que el anticuerpo COM2-DAB, de acuerdo a la fluorescencia del primero detectada por microscopía confocal. La señal del anticuerpo COM2-AlexaF488 se ubicó en el citoplasma de la célula (Figuras 3.11 D, G, H e I). Al sobreponer las figuras 3.11 C (fluorescencia emitida por PI), 3.11 D (fluorescencia del anticuerpo COM2-AlexaF488) y 3.11 E (fluorescencia emitida por el LY), el solapamiento (Figura 3.11 I) mostró señal en el citosol sugiriendo que en semillas de *C. chinense* Jacq. de 25 dpa (SI25) la proteína DING de 39 kDa es citoplásmica.

Por otra parte, dado que LY es un fluorocromo de citosol pero que en estos análisis se detectó en el núcleo (unión inespecífica; Figuras 3.11 F y 3.10 F), dicha localización nuclear dificultó la correcta localización del conjugado COM2-AlexaF488 (Figuras 3.11 G y H), dado que ambos colorantes (LY y AlexaF488) emiten señal en el mismo rango (520 nm) y resultan en el mismo color (verde). Entonces, en las figuras donde se incluyó el LY se utilizó el color amarillo para diferenciarlo del COM2-AlexaF488 y en los experimentos posteriores se descartó el uso del LY.

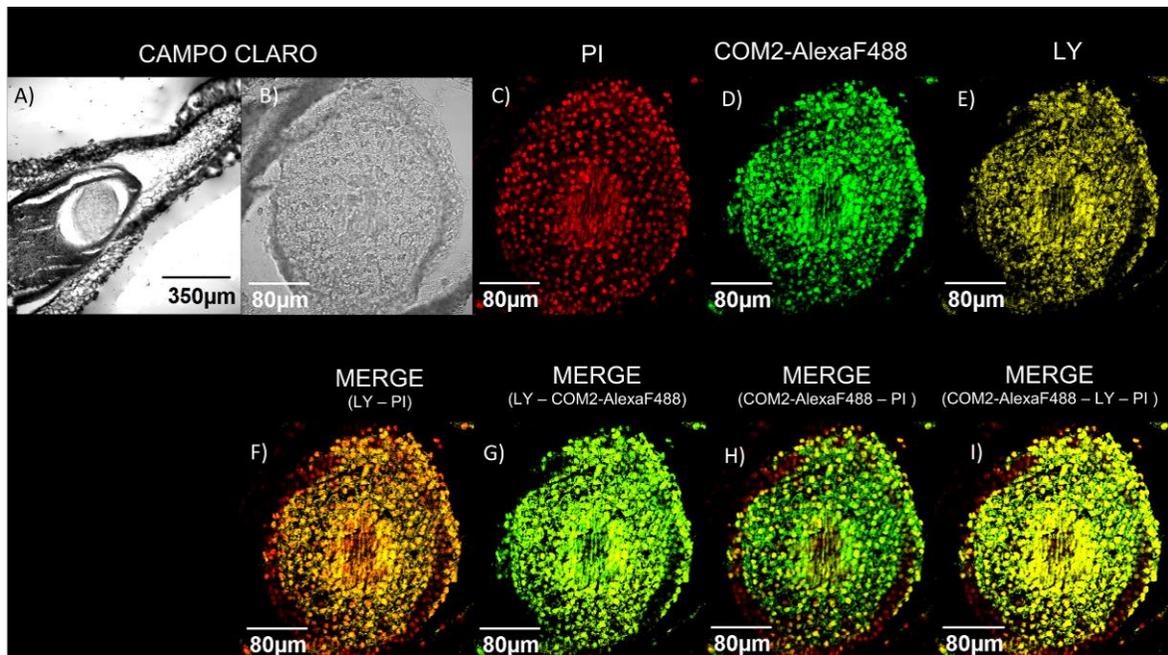


Figura 3. 11 Inmunocitlocalización de la proteína DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en semillas de chile habanero de 25 dpa. A) Corte histológico transversal de una semilla de chile habanero de 25 dpa (SI25) vista a 10X en campo claro. B) Acercamiento a 40X en campo claro, células del embrión del corte histológico de la figura A. C) Citolocalización de la referencia nuclear yoduro de propidio (PI, en color rojo) en células del embrión SI25 (longitud de onda de excitación a 520 nm y longitud de onda de emisión a 543 nm). D) Inmunodetección de la proteína DING (color verde) en células del embrión SI25 mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 (longitud de onda de excitación a 461 nm y longitud de onda de emisión 488 nm). E) Citolocalización de estructuras celulares con el compuesto fluorescente Lucifer yellow (LY) en color amarillo, (longitud de onda de excitación a 488 nm y de emisión a 520 nm). F) Sobreposicionamiento de la señal detectada en las imágenes C y E. G) Sobreposicionamiento de la señal detectada en las imágenes D y E. H) Sobreposicionamiento de la señal detectada en las imágenes C y D. I) Sobreposicionamiento de la señal detectada en las imágenes C, D y E. De las figuras B a I se observaron a 40X; regleta de 60 µm (línea de color negro o blanco). Todas las imágenes fueron obtenidas del microscopio confocal Olympus FV100 SW con el programa FV10 ASW 3.1.

3.2.2 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa

3.2.2.1 Inmunocitocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa mediante el anticuerpo COM2-DAB

Los primeros experimentos con el anticuerpo COM2-DAB, para inmunocitocalizar la proteína DING a nivel subcelular en semillas de chile habanero de 65 dpa, dieron señal de fluorescencia en el citoplasma (Figuras 3.12 D y E). Al realizar el superlapiamiento de las señales de fluorescencia emitidas por el fluoróforo de referencia nuclear PI y la señal de fluorescencia del anticuerpo COM2-DAB (Figura 3.12 C, D y E), se observó que el anticuerpo no reconoce proteínas del núcleo; lo cual apoya el hecho de que las proteínas DING son citoplasmáticas en células del embrión de semillas de chile habanero de 65 dpa.

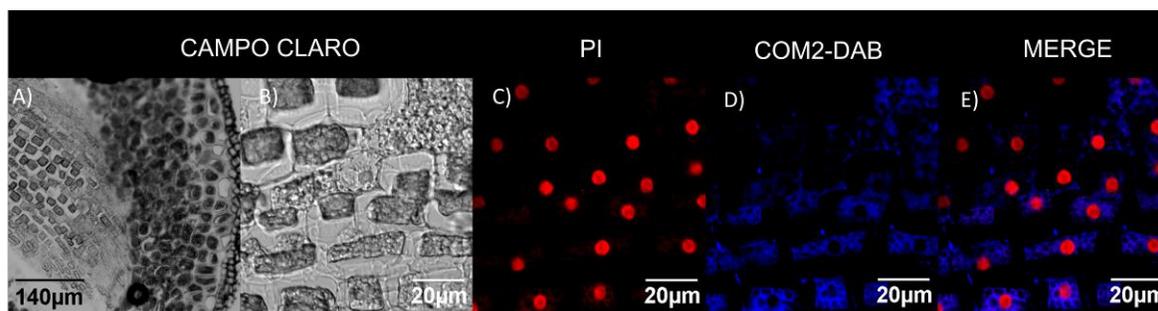


Figura 3. 12 Inmunocitocalización de la proteína DING con el anticuerpo COM2-DAB en semillas de chile habanero de 65 dpa. A) Corte histológico longitudinal de una semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65) vista a 10X+2.61 en campo claro. B) Acercamiento a 40X+3.41 en campo claro, células del embrión del corte histológico de la figura A. C) Citocalización de núcleos con yoduro de propidio (PI, color rojo) en células del embrión de SM65 (longitud de onda de excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm). D) Inmunodetección de la proteína DING (color azul) en células del embrión en SM65 mediante el anticuerpo COM2-DAB (longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm). E) Sobreposición de la señal en las imágenes C y D. Las figuras B a E se visualizaron a magnitud de 40X+3.41. Regleta de 20 µm (línea de color negro o blanco). Todas las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal Olympus FV100 SW con el programa FV10 ASW 3.1.

Para asegurar que la señal detectada no era un artefacto en la inmunocalización con el anticuerpo COM2-DAB, entonces para cada tratamiento se realizaron cortes que fueron utilizados como controles de autofluorescencia de las semillas de chile habanero de 65 dpa (SM65); la figura 3.13 es una imagen representativa de los controles de autofluorescencia. En ella, se observó una ligera nubosidad azul, la cual es señal de

autofluorescencia de la semilla SM65 en el canal de detección de azul (longitud de excitación a 405 nm y longitud de emisión a 461 nm) en células del endospermo y embrión respectivamente (Figuras 3.13 C, F e I).

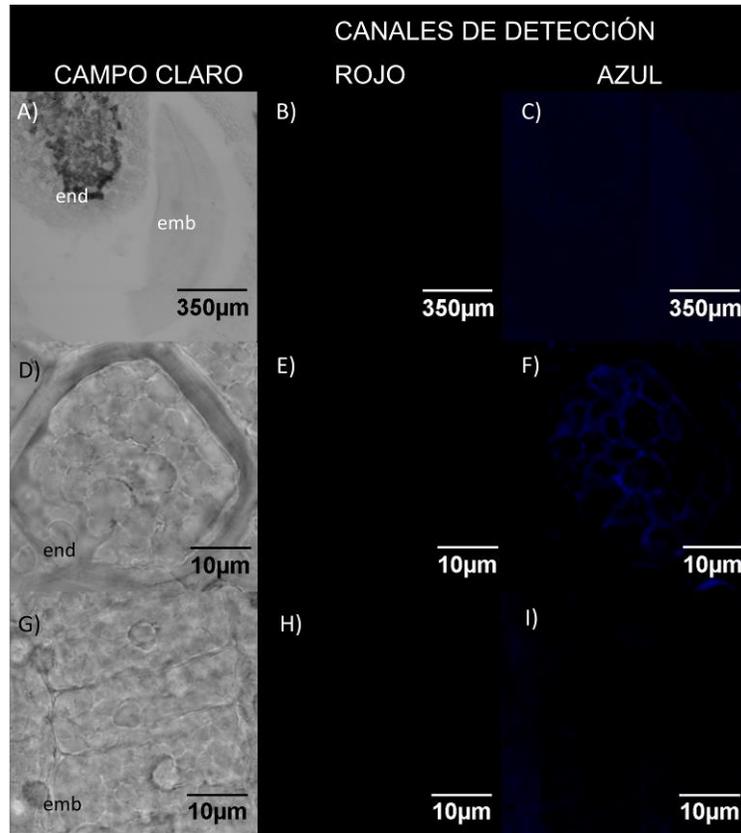


Figura 3. 13 Detección de autofluorescencia en corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM65 visto a 10X en campo claro. B) Señal de autofluorescencia de la figura A en el canal de detección de rojo. C) Señal de autofluorescencia de la figura A en el canal de detección de azul. D) Células de endospermo del corte histológico de la figura A. E) Señal de autofluorescencia de la figura D en el canal de detección de rojo. F) Señal de autofluorescencia de la figura D en el canal de detección de azul. G) Células del embrión del corte histológico de la figura A. H) Señal de autofluorescencia de la figura G en el canal de detección de rojo. I) Señal de autofluorescencia de la figura G en el canal de detección de azul. Las figuras de A a C fueron observadas a 10 X; las figuras de D a I se observaron a 60X+5.01. Longitud de onda de excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm para la autofluorescencia en el canal de detección de rojo (canal para PI), longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm para la autofluorescencia en el canal de detección de azul (canal para COM2-DAB).

Enseguida, se observaron al microscopio las muestras de SM65 tratadas con el anticuerpo COM2-DAB y el fluoróforo PI; para conocer la localización subcelular de la proteína DING.

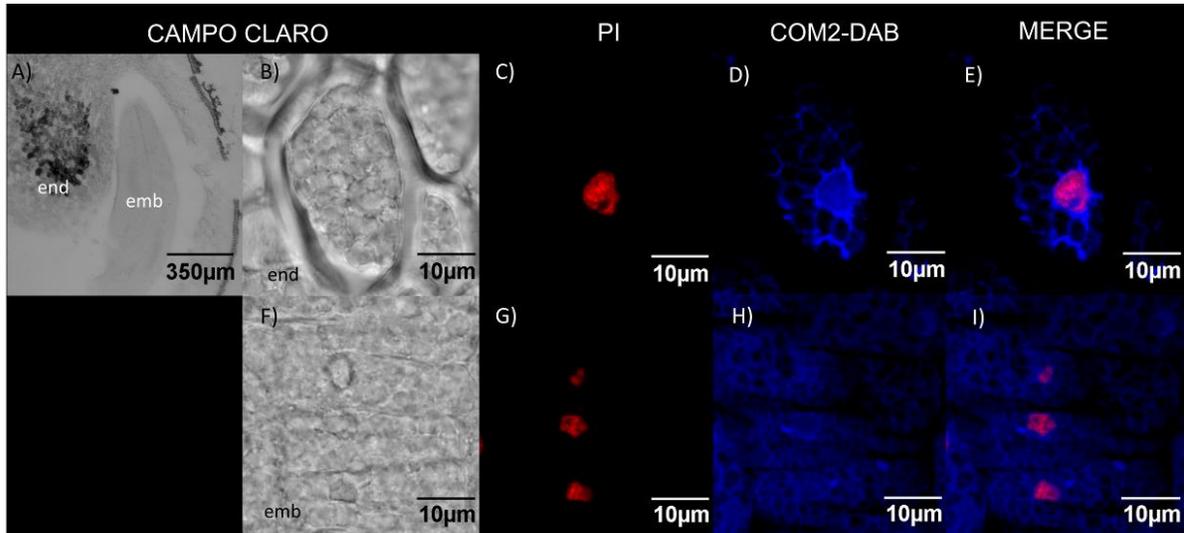


Figura 3. 14 Inmuncitlocalización mediante el anticuerpo COM2-DAB de las proteínas DING en un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM65 visto en campo claro a 10X. B) Células del endospermo del corte histológico de SM65 de la figura A, visto a 60X+5.01. C) Señal de fluorescencia de la tinción con yoduro de propidio (PI) en célula de la figura B. D) Inmuncitlocalización de las proteínas DING mediante la señal de fluorescencia del anticuerpo COM2-DAB en célula de la figura B. E) Sobrelapamiento de las figuras C y D. F) Células del embrión en corte histológico de SM65 de la figura A, visto a 60X+5.01. G) Señal de fluorescencia de PI en células de la figura F. H) Inmuncitlocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo COM2-DAB en célula de la figura F. I) Sobrelapamiento de las figuras G y H. La figura A se observó a 10X y las figuras de B a I se observaron a 60X+5.01. Longitud de onda de excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm para para PI, longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm para COM2-DAB.

3.2.2.2 Inmuncitlocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488

En los primeros experimentos con el anticuerpo COM2-AlexaF488 se detectó que la señal de fluorescencia de este anticuerpo se encontraba fuera del núcleo de las células del embrión de las semillas de 65 dpa (Figura 3.15 D); al realizar el sobrelapamiento de las señales de fluorescencia emitidas por el fluoróforo de referencia PI (Figura 3.15 C) y el anticuerpo COM2-AlexaF488 se observó que el anticuerpo no reconoce proteínas del

núcleo (Figuras 3.15 E), lo cual indica que las proteínas DING de semillas de chile habanero de 65 dpa tienen localización fuera del núcleo y se encuentran en el citoplasma.

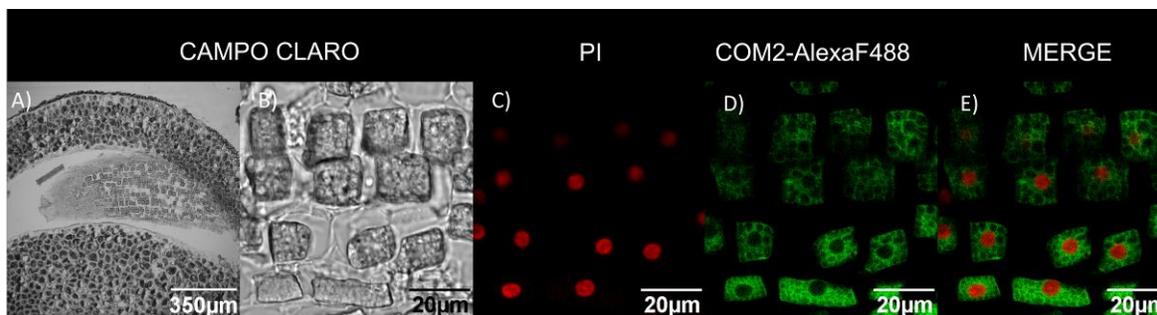


Figura 3. 15 Inmunocitlocalización de la proteína DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en semillas de chile habanero de 65 dpa. A) Corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65) visto en campo claro a 10X. B) Acercamiento a 40X+4, células del embrión del corte histológico de la figura A. C) Citolocalización de núcleos teñidos con ioduro de propidio (PI, color rojo) en células del embrión de SM65 (longitud de onda excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm para PI). D) Inmunodetección de la proteína DING (color verde) en células del embrión en SM65 mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 (longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 526 nm para COM2-AlexaF488). E) Sobreposicionamiento de la señal detectada en las imágenes C y D. Las figuras de B a E se observaron a 40X+4. Regleta de 20 µm (línea de color negro o blanco). Todas las imágenes fueron obtenidas en el microscopio confocal Olympus FV100 SW con el programa FV10 ASW 3.1

En otro experimento se consideró la autofluorescencia del tejido de un corte longitudinal de semilla madura de 65 dpa (SM65) a longitud de onda de excitación de 543 nm y longitud de onda de emisión de 619 nm; para el canal de detección de rojo (fluorescencia de ioduro de propidio, PI), la longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm para el canal de detección de azul (fluorescencia de 4',6-diamino-2-fenilindol, DAPI) y, la longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm para el canal de detección de verde (fluorescencia de COM2-AlexaF488 o del anticuerpo secundario acoplado a AlexaF488 que reconoce IgG de conejo) (Figura 3.16). Se detectó que la testa de la semilla SM65 autofluoresce en los canales de detección rojo, verde y azul (Figuras 3.16 B, C y D), y que de esta última también se observó una ligera autofluorescencia del endospermo (Figura 3.16 B y F).

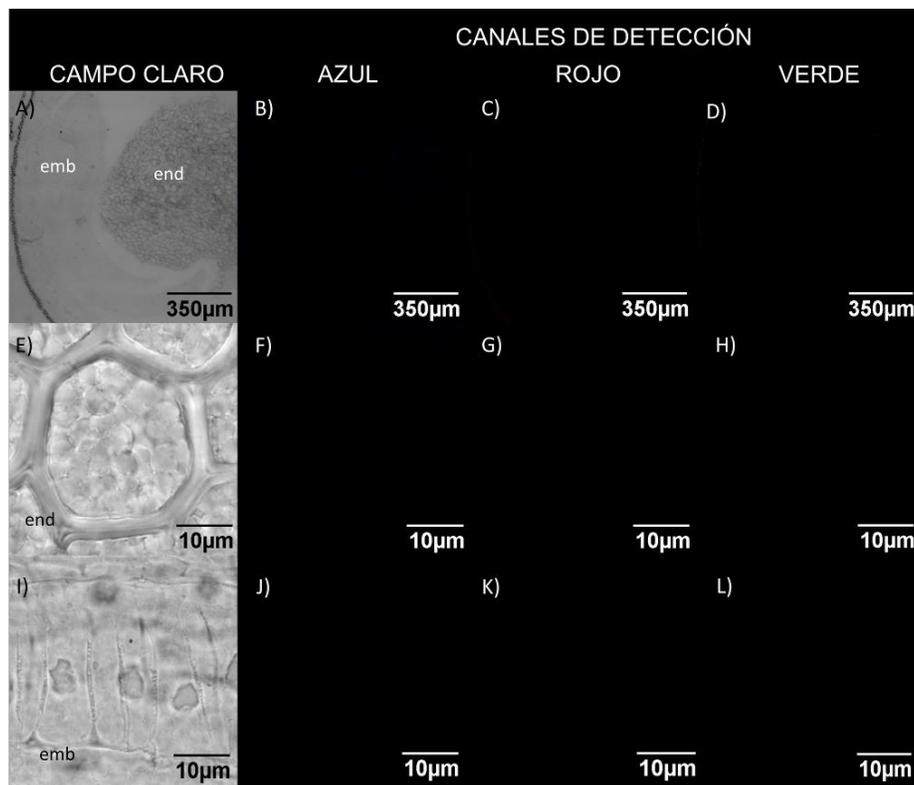


Figura 3. 16 Detección de autofluorescencia de un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM65 visto a 10X en campo claro. B) Señal de autofluorescencia de la figura A en el canal de detección de azul. C) Señal de autofluorescencia de la figura A en el canal de detección de rojo. D) Señal de autofluorescencia de la figura A en el canal de detección de verde. E) Célula de endospermo del corte histológico de la figura A. F) Señal de autofluorescencia el canal de detección de azul de la figura E, G) Señal de autofluorescencia el canal de detección de rojo de la figura E. H) Señal de autofluorescencia el canal de detección de verde de la figura E. I) Células del embrión del corte histológico de la figura A. J) Señal de autofluorescencia el canal de detección de azul de la figura I, K) Señal de autofluorescencia el canal de detección de rojo de la figura I. L) Señal de autofluorescencia el canal de detección de verde de la figura I. Las imágenes de A a D fueron observadas a 10 X y las imágenes de E a L a 60X+5.01. Longitud de onda de excitación a 405 nm y longitud de onda de emisión a 461 nm (canal para observar fluorescencia de DAPI). Longitud de onda de excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm para la autofluorescencia el canal de detección de rojo (fluorescencia de PI), longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm para la autofluorescencia el canal de detección de verde (para fluorescencia de COM2-ALEXA F488 o del anticuerpo secundario acoplado a AlexaF488 que reconoce IgG de conejo, dependiendo del tratamiento).

La inmunocitlocalización de la proteína DING con el anticuerpo COM2-AlexaF488 en cortes histológicos de semillas SM65 confirmó que la proteína DING tiene una localización

citoplasmática en dichas semillas, de acuerdo a la señal fluorescente de COM2-AlexaF488 detectada en células del endospermo y células del embrión de SM65 observadas a 60X (Figuras 3.17 D y 3.17 H, respectivamente). En las figuras 3.17 E y 3.17 I se observó el sobrelapamiento de la señal de fluorescencia obtenida con el anticuerpo COM2-AlexaF488 con la señal emitida por PI (referente nuclear, Figuras 3.17 E y I). Ese resultado indica que las proteínas DING no son nucleares ni en células del endospermo ni en células del embrión de semillas de chile habanero de 65 dpa. Lo anterior se confirmó al incubar una semilla de 65 dpa con el anticuerpo COM2-AlexaF488 con DAPI como referente nuclear (Figuras 3.18 E y 3.18 I).

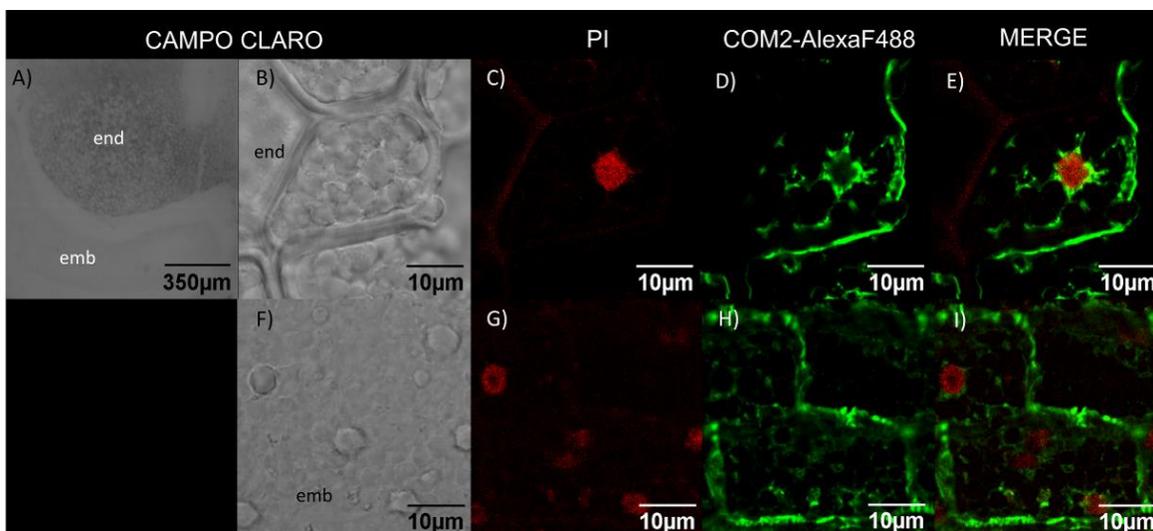


Figura 3. 17 Inmunocitlocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en corte histológico longitudinal de semillas de chile habanero de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM65 en campo claro visto a 10X. B) Célula del endospermo vista a 60X+5.01 en el corte histológico de SM65 de la figura A. C) Señal de fluorescencia del núcleo teñido con ioduro de propidio (PI) en célula de la figura B. D) Inmunocitlocalización de la proteína DING mediante la señal de fluorescencia del anticuerpo COM2-AlexaF88 en célula de la figura B. E) Sobrelapamiento de las figuras C y D. F) Células del embrión del corte histológico de SM65 de la figura A, vistas a 60X+5.01. G) Señal de fluorescencia del PI en células de la figura F. H) Inmunocitlocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en células de la figura F. I) Sobrelapamiento de las figuras G y H. La figura A se observó a 10X y las figuras de B a I fueron observadas a 60X+5.01. Longitud de onda de excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm para la fluorescencia de PI, longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm para fluorescencia del anticuerpo COM2-AlexaF488.

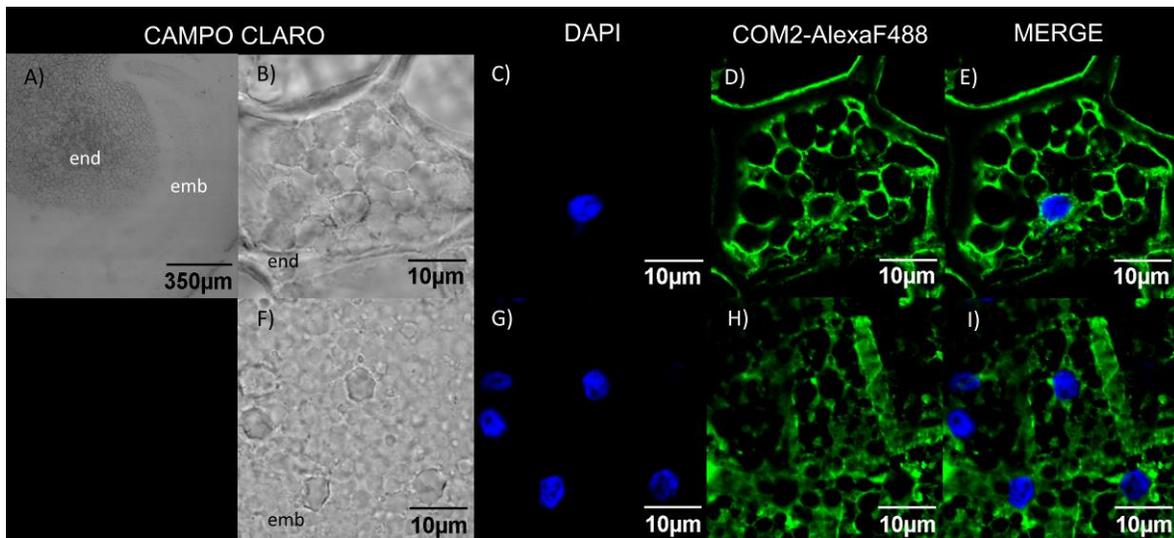


Figura 3. 18 Inmunocitlocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF488 en corte histológico longitudinal de semillas de chile habanero de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM65 visto a 10X en campo claro. B) Célula del endospermo del corte histológico de SM65, de la figura A, observada a 60X+5.01 en campo claro. C) Señal de fluorescencia de núcleo teñido con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, en color azul) en célula de la figura B. D) Inmunocitlocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo COM2-AlexaF88 (en color verde) en célula de la figura B. E) Sobrelapamiento de las figuras C y D. F) Células del embrión del corte histológico de SM65, de la figura A, vistas a 60X+5.01 en campo claro. G) Señal de fluorescencia de núcleos teñidos con DAPI en células de la figura F. H) Inmunocitlocalización de las proteínas DING mediante la señal de fluorescencia del anticuerpo COM2-AlexaF488 (en color verde) en células de la figura F. I) Sobrelapamiento de las figuras G y H. La figura A fue vista a de 10X y las figuras de B a I fueron vistas a magnitud de 60X+5.01. Longitud de onda de emisión a 405 nm y longitud de onda de excitación a 461 nm para fluorescencia de DAPI. Longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm para la fluorescencia del anticuerpo COM2-AlexaF488.

3.2.2.3 Inmunocitlocalización de la proteína DING en semillas de 65 dpa mediante el anticuerpo COM2 y un anticuerpo secundario acoplado a AlexaF488.

Para confirmar el resultado de la inmunocitlocalización directa de la proteína DING de semillas de chile habanero con los anticuerpos COM2-DAB y COM2-AlexaF488, se realizó una inmunocitlocalización indirecta de ésta proteína mediante el uso del anticuerpo primario COM2 y un anticuerpo secundario de cabra acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (Cabra-AlexaF488 vs. IgG-Conejo; Molecular Probes Invitrogen A11008). Como era de esperarse, la señal de la inmunodetección indirecta ubicó la proteína DING

en el citoplasma de las células del endospermo y embrión de semillas de chile habanero de 65 dpa (Figura 3.20). En paralelo a la inmunodetección indirecta también se realizó un ensayo de autofluorescencia en el corte histológico de semilla de 65 dpa (ver Figuras 3.16 D, H y L). El ensayo de pegado inespecífico del anticuerpo secundario también resultó negativo (ver Figura 3.19).

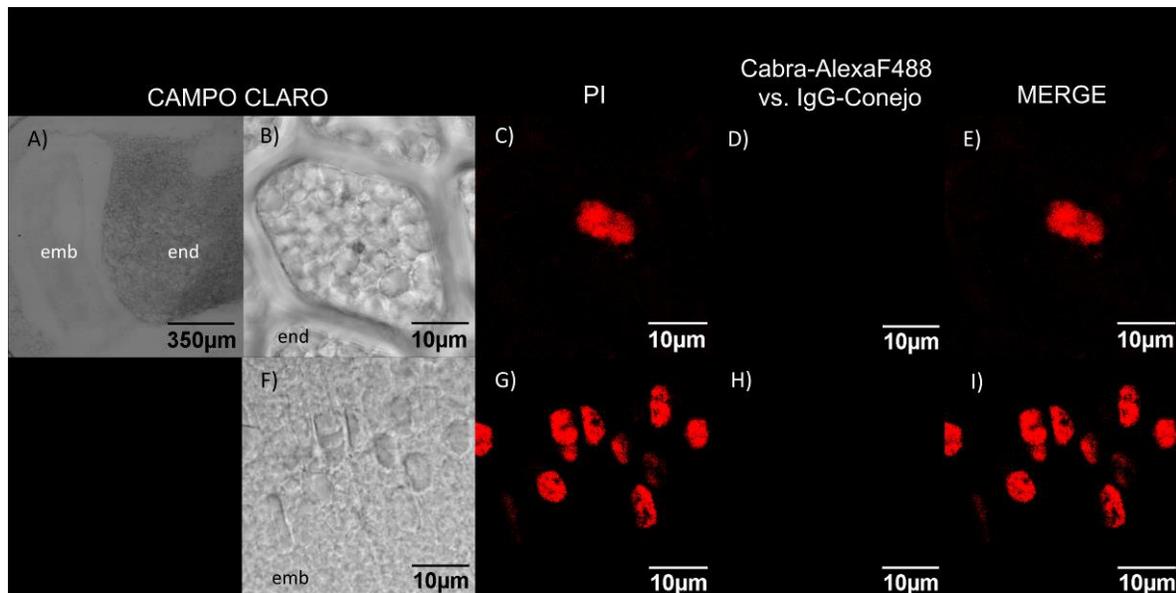


Figura 3. 19 Control de pegado inespecífico del anticuerpo secundario-AlexaF488 en semillas de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM65 visto en campo claro a 10X. B) Célula del endospermo del corte histológico de SM65, de la figura A, observada a 60X+5.01. C) Señal de fluorescencia de los núcleos teñidos con PI en célula de la figura B. D) Señal de pegado inespecífico conferida por la “fluorescencia” del anticuerpo secundario-AlexaF488 evaluada en célula de la figura B. E) Sobrelapamiento de las figuras C y D. F) Células del embrión del corte histológico de SM65, de la figura A, vista a 60X+5.01. G) Señal de fluorescencia del núcleo teñido con PI en células de la figura F. H) Señal de pegado inespecífico conferida por la “fluorescencia” del anticuerpo secundario-AlexaF488 en células de la figura F. I) Sobrelapamiento de las figuras G y H. La figura A fue vista a 10X y las figuras de B a I fueron observadas con el objetivo 60X+5.01, longitud de onda de excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm para la fluorescencia de PI. Longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm para la fluorescencia del anticuerpo secundario de cabra acoplado a AlexaF488 y que reconoce a la IgG de conejo.

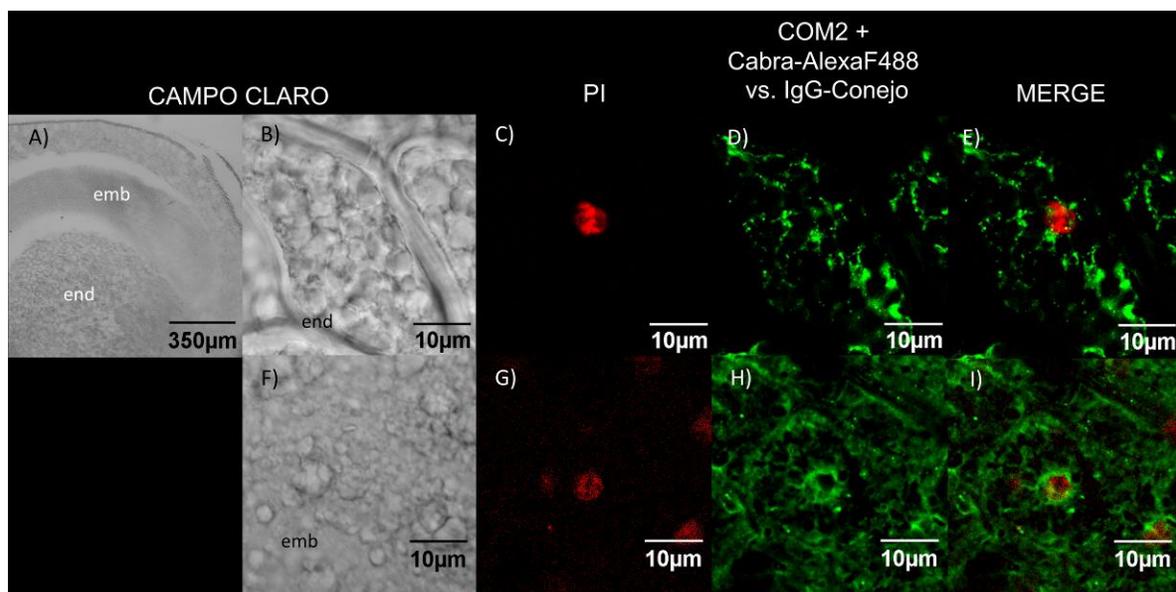


Figura 3. 20 Inmunocitocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo primario COM2 y un anticuerpo secundario-AlexaF488, en un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM65 visto a 10X en campo claro. B) Célula del endospermo del corte histológico de SM65, en la figura A, vista a 60X+5.01. C) Señal de fluorescencia de los núcleos teñidos con PI en célula de la figura B. D) Inmunocitocalización de las proteínas DING mediante el anticuerpo primario COM2 y su detección en célula de la figura B, mediante la señal de fluorescencia del anticuerpo secundario-AlexaF488. E) Sobrelapamiento de las figuras C y D. F) Células del embrión del corte histológico de SM65, referido en la figura A y observado a 60X+5.01. G) Señal de fluorescencia de los núcleos teñidos con PI en células de la figura F. H) Inmunocitocalización de las proteínas DING en células de la figura F, mediante el anticuerpo primario COM2 y la señal de fluorescencia del anticuerpo secundario-AlexaF488. I) Sobrelapamiento de las figuras G y H. La figura A se observó a 10X y las figuras de B a I fueron observadas a 60X+5.01. Longitud de onda de excitación a 543 nm y longitud de onda de emisión a 619 nm para fluorescencia de PI, longitud de onda de excitación a 488 nm y longitud de onda de emisión a 520 nm para la fluorescencia de COM2 + el anticuerpo secundario acoplado a AlexaF488.

3.3 Localización de gránulos de almidón en SM65

Durante el proceso de inmunocitocalización de las proteínas DING con los anticuerpos COM2-DAB, COM2-AlexaF488 y COM2 + anticuerpo secundario-AlexaF488, se observó que dichos anticuerpos rodeaban estructuras esféricas contenidas en las células del endospermo y del embrión de las semillas de chile habanero de 65 dpa (SM65). Se consideró que estas estructuras pudieran ser gránulos de almidón como se describe en la literatura; entonces para confirmar o descartar esta posibilidad, se tiñeron con lugol los

cortes histológicos de SM65. Se observó que tanto las células del endospermo como las del embrión dieron señal positiva para almidón, hecho que sugiere que las proteínas DING se encuentran asociadas a dichas estructuras y que las mismas tienen una distribución citoplasmática (Figura 3.21).

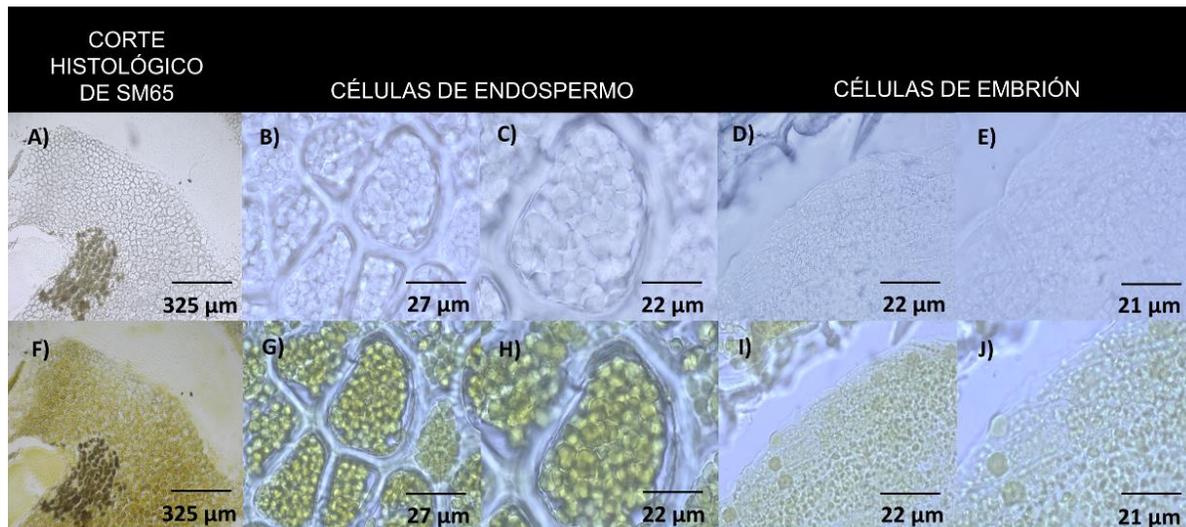


Figura 3. 21 Localización de gránulos de almidón en un corte histológico longitudinal de semilla de chile habanero de 65 dpa (SM65). A) Corte histológico longitudinal de SM655 visto a 10X en campo claro. B) Acercamiento a una célula de la figura A, mostrando el endospermo del corte histológico de SM65, visto a 100X+1.25 en campo claro. C) Acercamiento a una célula de la figura B, en campo claro a 100X+2. D) Células del embrión de corte histológico de SM65, de la figura A, visto en campo claro a 100X+1.25. E) Acercamiento a las células de la figura D, vistas en campo claro a 100X+2. F) Corte histológico longitudinal de SM65 teñido con lugol, visto en campo claro a 10X. G) Célula del endospermo del corte histológico de SM65, de la figura F, en campo claro visto a 100X+1.25. H) Acercamiento a una célula de la figura G, visto en campo claro a 100X+2. I) Células del embrión de corte histológico de SM65, de la figura F, visto en campo claro a 100X+1.25. J) Acercamiento a las células de la figura I visto en campo claro a 100X+ 2. Las figuras de A a E, sin tinción con lugol. Las figuras de F a J, tinción con lugol. Para observar las muestras se utilizó un equipo Axioplan con una cámara AxioCam ICc5 acoplada al equipo, y el programa AxioVision SE64 Rel 4.8

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se sabe que el proceso de embriogenesis y desarrollo de la semilla, así como el desarrollo de otros órganos es un proceso complejo y que la dinámica de proteínas que lo acompaña sufre modificaciones constantes e inclusive puede presentar particularidades en cada especie. En el caso de chile habanero es poco lo que se conoce acerca de las proteínas involucradas en el desarrollo fisiológico de las hojas y las semillas. Pérez (2014) reportó que en embriones y semillas de *C. chinense* Jacq. con diferente grado de desarrollo (21, 28, 36, 44 y 52 dpa) había proteínas relacionadas con la embriogenesis tardía (LEA por sus siglas en inglés de Late Embryogenesis Abundant) con masas moleculares de ~55, ~45 y ~36 kDa, cuya expresión génica era constante a lo largo del desarrollo de las semillas, pero que, la proteína se acumulaba conforme la semilla maduraba. Esa observación apoyó el hecho de que la acumulación de las proteínas LEA está asociado a la madurez fisiológica de la semilla (Pérez, 2014).

En este estudio en los diferentes extractos proteicos de hojas y de semillas de chile habanero con diferentes grados de desarrollo se encontraron perfiles electroforéticos con abundancia de polipéptidos i.e. ~34 y ~47 kDa (Figuras 3.1 A, 3.2 D y 3.7 A). De acuerdo con su masa molecular es posible que estos polipéptidos pudieran estar relacionados con la familia de las proteínas LEA. Sin embargo, con las evidencias experimentales de este trabajo no es posible confirmarlo, para hacerlo se requiere secuenciar a nivel de aminoácidos dichos polipéptidos.

En lo que respecta a la proteína de ~39 kDa detectada en todos los estadios de desarrollo de hojas y semillas en *C. chinense*, y cuya abundancia es mayor en etapas jóvenes (HJ y SI25), estudios previos de secuenciación determinaron que en semillas corresponde a una proteína DING. La inmunodetección en hojas del polipéptido de ~39 kDa por medio del anticuerpo COM2 sugiere que dicho polipéptido es una proteína DING.

En los extractos proteicos de hojas de chile habanero, la señal de inmunodetección con el anticuerpo COM2 fue más fuerte en la fracción de proteína total correspondiente a PTHJ con respecto a PTHM y PTHS (Figura 3.1 B) así como en la fracción de proteína soluble de PSHJ con respecto a PSHM y PSHS (Figura 3.2 E). Por consiguiente, se sugiere que

la proteína DING es una proteína soluble y que tiene una mayor presencia en las hojas de chile habanero en estadios tempranos de desarrollo. Con respecto a los extractos proteicos de semillas de chile habanero; se inmunodetectó con una intensidad similar a la proteína DING en todos los carriles correspondientes a los extractos proteicos totales de los diferentes grados de madurez de la semilla (Figura 3.6 B), mientras que en la proteína soluble, la señal de inmunoreconocimiento fue mayor en PSSI25 (Figura 3.7 E), por lo que se sugiere que la proteína DING en semillas de *C. chinense* es una proteína soluble y que dicha proteína es más abundante en etapas tempranas del desarrollo de las semillas de chile habanero.

El inmunoreconocimiento de la banda de ~39 kDa en extractos proteicos de hojas y semillas fue confirmado por el control positivo (fracción proteica G10P1.7.57, que contiene una proteína DING de ~39 kDa), dado que fue desarrollado en paralelo a los extractos proteicos en dichos western blots. Ese resultado apoya la especificidad del anticuerpo COM2 por ese polipéptido de ~39 kDa. Cabe mencionar, que, aunque en la literatura se menciona que la típica proteína DING es de 40 kDa (Bernier, 2013; Berna et al., 2009; Lewis y Crowther., 2005); Berna et al. (2009b) describen que en células eucariotas se pueden encontrar proteínas DING con masa molecular entre 38 y 40 kDa. Ejemplo de ello son: la proteína CAI (proteína DING) de 39 kDa en células epiteliales renales de mono (Kumar et al., 2004; Berna et al., 2009a); una proteína DING de 38 kDa que actúa como receptor de cotinina en neuronas de ratones (Berna et al., 2009b), y la proteína p38^{SJ} de *H. perforatum* de 38 kDa (Bernier, 2013; Darbinian et al., 2009).

En los experimentos iniciales de western blot con el anticuerpo COM2 se detectó señal de inmunodetección positiva en un polipéptido de ~39 kDa en los extractos proteicos membranales provenientes de hojas y de semillas en diferentes grados de madurez (Figuras 3.3 H y 3.7 H, respectivamente). Entonces para confirmar o descartar que la señal detectada por el anticuerpo COM2 en el polipéptido de ~39 kDa de las fracciones membranales fuera debido a una contaminación de las fracciones de proteína membranal con los remanentes de las fracciones de la proteína soluble, se realizaron lavados secuenciales adicionales de la proteína membranal con amortiguador de extracción adicionado con NaCl y amortiguador de extracción adicionado con el detergente Tritón X-100 (ver apartado 2.1.2.2 en la sección de materiales y métodos). Los resultados de

dichos experimentos mostraron que el anticuerpo COM2 no detectó proteínas DING en las proteínas unidas por interacción iónica a la fracción membranal de hojas senescentes y semillas de 65 dpa (PMHSi y PMSM65i, respectivamente), proteína de membrana recuperada con Tritón X-100 de hojas senescentes y de semillas de 65 dpa (PMHSTr y PMSM65Tr, respectivamente) y proteína de membrana recalcitrante a Tritón X-100 de hojas senescentes y semillas de 65 dpa (PHSrTr y PMSM65rTr, respectivamente) (Figuras 3.4 B y 3.8 B), confirmando con ello que las primeras detecciones en la fracción membranal fueron producto de contaminación de la fracción con el polipéptido de ~39 kDa. En contraste con los resultados anteriores, el anticuerpo detectó y confirmó la presencia de la proteína DING de ~39 kDa en proteínas totales y solubles, tanto de hojas senescentes (PTHS y PSHS; Figura 3.4 B) como para semillas de 65 dpa (PTSM65 y PSSM65; Figura 3.8 B). Además, también detectó putativas proteínas DING con masa molecular de ~54.9, ~21 y 7.9 kDa en la proteína total y soluble de las hojas senescentes (PTHS y PSHS; Figura 3.4 B). Cabe resaltar que, en el grupo de trabajo, previamente se han hallado proteínas DING con masas moleculares de ~39 y ~7.57 kDa en extractos solubles de semillas de chile habanero. (Tamayo-Sansores, 2016; datos no publicados; Uc-Ku, 2014; Brito-Argáez et al., 2009).

Con respecto a los análisis de pegado inespecífico del anticuerpo secundario en los extractos proteicos de hojas y semillas de chile habanero en diferentes estadios de desarrollo; tales análisis inicialmente sugirieron la existencia de unión inespecífica del anticuerpo secundario a un polipéptido de ~47 kDa presente en los extractos proteicos totales y membranales de hojas y semillas en diferentes estadios de desarrollo (Figuras 3.1 C, 3.3 I, 3.5 C y 3.9 I), en un polipéptido de ~8.7 kDa contenido en los extractos membranales de hojas en diferentes estadios de desarrollo (Figura 3.3 I) y en polipéptidos de ~34 kDa, ~24 kDa y ~19 kDa presentes en los extractos membranales de semillas en diferentes estadios de desarrollo (Figura 3.7 I). Sin embargo, al incrementar la astringencia de las condiciones experimentales, el pegado inespecífico se eliminó (Figuras 3.4 C y 3.8 C). Ese hecho sugiere que las extracciones realizadas en el apartado 2.1.2.2 (sección de materiales y métodos) se realizaron con las condiciones experimentales adecuadas.

En la literatura se ha descrito que la proteína DING tiene actividad de fosfatasa (Berna et

al., 2009b; Darbinian et al., 2009; Ahn et al., 2007) y debido a que se ha reportado que algunos extractos proteicos de plantas presentan actividades enzimáticas endógenas, aún después de haber sido sometidas a electroforesis en SDS-PAGE usando el sistema Laemmli (Laemmli, 1970; citado por Villanueva y Malek-Hedayat, 1987), entonces en este trabajo se decidió evaluar si los extractos proteicos de hojas senescentes y de semillas de chile habanero de 65 dpa presentan actividad endógena de fosfatasa alcalina y que dicha actividad pudiera estar interfiriendo con la inmunodetección y su revelado con dicha enzima. El resultado obtenido después de la evaluación mostró que los extractos proteicos de hojas senescentes y semillas de 65 dpa no presentan actividad endógena de fosfatasa alcalina (Figuras 3.4 D y 3.8 D).

La evaluación de la especificidad de reconocimiento del anticuerpo COM2 mediante experimentos de tipo competencia, utilizando el anticuerpo COM2 acomplejado a proteína DING contenida en la fracción proteica G10P1.7.57 (Figura 3.9 C) mostró que el complejo anticuerpo-antígeno (COM2-DING) no logró abatir la señal de inmunodetección del anticuerpo COM2 dado que el anticuerpo inmunoreconoció la proteína con masa molecular de ~39 kDa con una intensidad similar a la observada en el western blot (Figura 3.9 B). Tal resultado contrastó con lo esperado dado que el sitio de reconocimiento del anticuerpo debería estar ocupado por el antígeno y por lo tanto el complejo COM2-DING no debería reconocer ninguna proteína. Una posibilidad para explicar tal comportamiento es que no se utilizó la cantidad correcta de antígeno para bloquear por completo el anticuerpo o que se utilizó un exceso de anticuerpo. Por ello se propone que en el futuro hay que realizar experimentos de dosis respuesta entre el anticuerpo y la fracción G10P1.7.57 con el objetivo de determinar la cantidad de fracción G10P1.7.57 que es necesaria para bloquear 0.046 µg/mL de anticuerpo COM2. Otra posibilidad sería bloquear al anticuerpo COM2 con el péptido sintético contra el cual se produjo e inmunopurificó el anticuerpo COM2.

Por otra parte, en el ensayo de “tipo competencia” los resultados sugerían que el complejo COM2-G10P1.7.57 aumentaba la señal de los extractos proteicos de hojas senescentes y semillas de chile habanero de 65 dpa respecto a la señal detectada en el ensayo de western blot. Entonces, para confirmar o descartar la idea de que las proteínas en la fracción G10P1.7.57 pudieran estar interaccionando con las proteínas de los extractos

proteicos transferidos a la membrana de PVDF, se decidió realizar un far western blot a la par de un western blot. El resultado mostró que las proteínas presentes en la fracción G10P1.7.57 (1 µg/mL, incubada en el ensayo de far western; ver sección 2.1.8 de materiales y métodos) son capaces de establecer interacciones proteína-proteína con los extractos proteicos solubles (de hojas senescentes (ESHS) y de semillas de 65 dpa (ESSM65), respectivamente) y con la fracción G10P1.7.57 depositados en la membrana de PVDF, dado que se observó una disminución de la intensidad en el inmunoreconocimiento de las bandas de proteína mayores a ~50 kDa en ESHS y ESSM65 al igual que una disminución en las bandas de ~39, ~31.6 y ~29.5 kDa en la fracción G10P1.7.57 en el ensayo de far western respecto a los ensayos de western y de “tipo competencia” (Figuras 3.9 B, C y D). Esto sugiere que las proteínas de la fracción G10P1.7.57 con la que se incubó la membrana de PVDF, estarían bloqueando el reconocimiento del anticuerpo COM2 (1: 10,000 v/v; 0.046 µg/mL) por las proteínas DING en la fracción G10P1.7.57 y en los extractos solubles (ESHS y ESSM65, respectivamente) depositados en dicha membrana (Figura 3.9 D). No obstante, los resultados de los experimentos “tipo competencia” y far western blot realizados en este trabajo no fueron concluyentes, por lo que deberán optimizarse en el futuro. Cabe resaltar que un estudio realizado por Uc-Ku (2014) mediante far western blot encontró que había interacción entre las proteínas obtenidas de flor, hoja madura y tallo de chile habanero (20 µg de proteína) y las proteínas de la fracción G10P1.7.57 (0.273 µg/mL) la cual había utilizado como sonda, observando un incremento de la señal de inmunoreconocimiento del anticuerpo COM2.

El anticuerpo COM2 es capaz de detectar de manera específica la proteína DING de ~39 kDa en la fracción G10P1.7.57 de *C. chinense*; sin embargo, también inmunoreconoció a putativas proteínas DING de ~31.6, ~29.5, ~26.9, ~25.1 (Figuras 3.9 B y C) en dicha fracción. Ese resultado no es extraño, dado que el anticuerpo COM2 se generó contra una secuencia de aminoácidos (ITYMSPDYAAPTLAGLDDATK) con alta conservación en otras proteínas DING de especies reportadas en las bases de datos. Dicha secuencia estaba presente en la secuenciación de los polipéptidos de ~7.57 y ~39 kDa (proteína DING) obtenidos de la fracción G10P1.7.57 (datos no publicados). Esto sugiere que la proteína DING de ~7.57 kDa y otras DING putativas (aún sin secuenciar) con masa molecular menor a ~39 kDa provienen de la proteólisis del polipéptido de ~39 kDa. La

observación de que los polipéptidos con pesos moleculares menores a 39 kDa reaccionan con el anticuerpo COM2 puede explicarse porque se ha descrito que la proteína tiene un sitio de corte para la proteasa Xa en el extremo carboxilo terminal (Berna et al., 2009b; Ahn et al., 2007). Por otra parte, Berna et al. (2009a) reportaron que en la proteína estimuladora sinovial (SSP, una proteína DING en humanos), aislada inicialmente como una proteína de 205 kDa (p205), después de digestión triptica y secuenciación del N-terminal de los polipéptidos resultantes de 40, 27 y 25 kDa, todos ellos contenían el dominio DINGGG (Berna et al., 2009a).

En la literatura se han reportado proteínas DING con tamaños de entre 150 y 200 kDa y también con tamaños menores a 40 kDa (36, 28 y 27 kDa) pero siempre la predominante es la de ~40 kDa (Collombet et al., 2010; Berna et al., 2009b; Adams et al., 2002). Algunas de las proteínas DING que difieren del peso molecular de 40 kDa son la de 28 kDa de tubérculos de alcachofa (*Helianthus tuberosus*; Berna et al., 2009b), las proteínas DING de 27 y 38 kDa de *H. perforatum* (denominadas p27^{SJ} y p38^{SJ}, respectivamente; Darbinian et al., 2009) y las proteínas DING de 57 y 62 kDa en *Brassica rapa* (Bernier, 2013). Berna et al. (2009b) señalan la posible existencia de isoformas de las proteínas DING debido a cambios conformacionales y a un dominio C-terminal no tan conservado comparado con el extremo N-terminal "DING".

Con respecto a la localización subcelular de la proteína DING de *C. chinense*, en este estudio se dejó de trabajar con las hojas y se decidió realizar la inmunocitlocalización solo en las semillas de esta especie, debido a que en semillas de chile habanero fue donde se hallaron y secuenciaron las proteínas DING de ~7.57 y ~39 kDa. Para llevar a cabo la inmunocitlocalización de las proteínas DING en cortes histológicos de semillas de chile habanero, primero se conjugó el anticuerpo COM2 a cloruro de dabsilo (COM2-DAB) o Alexa Fluor 488 (COM2-AlexaF488). El cloruro de dabsilo es un reactivo fluorescente para conjugación a proteínas y su detección fluorescente por diferentes métodos, entre ellos el HPLC. En nuestros experimentos hemos utilizado las longitudes de onda de 405 nm para excitación y 461 nm para emisión para la detección del COM2-DAB; cabe mencionar que estas longitudes de emisión y detección corresponden a las del DAPI por lo que al inicio de esta investigación se tuvo que confirmar que la señal de inmunoreconocimiento del anticuerpo COM2-DAB fuera específica. Por esa razón y como

un segundo criterio de inmunolocalización, se conjugó el anticuerpo COM2 a Alexa Fluor 488 (COM2-AlexaF488) cuya señal de fluorescencia se detecta a longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 526 nm. Esto permitió corroborar la señal de pegado del anticuerpo vista previamente con COM2-DAB. Los análisis posteriores con este conjugado permitieron confirmar que la señal de pegado del anticuerpo obtenida previamente con COM2-DAB era real dado que la señal de ambos fluoróforos coincidía en el sitio de localización (Figuras 3.11, 3.12, 3.14, 3.15, 3.17 y 3.18). Por último, se realizó una inmunocitlocalización de manera indirecta utilizando el anticuerpo COM2 como sonda para inmunodetectar proteínas DING y un anticuerpo secundario de cabra acoplado a Alexa Fluor 488 (contra IgG de conejo) para detectar al anticuerpo primario (COM2) y revelar la inmunodetección mediante la señal de fluorescencia del AlexaF488. Una vez más, se determinó que la señal del anticuerpo secundario acoplado a AlexaF488 (al reconocer al COM2; Figura 3.20) emite señal en la misma zona que los anticuerpos COM2-DAB y COM2-AlexaF488. Este hecho confirmó que la proteína DING está ubicada en el citoplasma en células del endospermo y embrión de semillas de 65 dpa.

En los cortes histológicos de semillas de chile habanero de 25 dpa se detectó que la proteína DING se encontraba en el citosol en células del embrión, dada las señales de fluorescencia de los anticuerpos COM2-DAB y COM2-AlexaF488 (Figuras 3.10 D y H para COM2-DAB, y figuras 3.11 D y H para COM2-AlexaF488, respectivamente). Además, la señal del anticuerpo COM2-DAB también se detectó cerca de la señal emitida por el referente de matriz citoplasmática (Lucifer yellow, LY; Figura 3.10 G). En conjunto, tales resultados, apoyan el hecho de que las proteínas DING se encuentran en el citosol en estadios tempranos de semillas de chile habanero. Por otra parte, a pesar de que en la literatura se ha descrito que el fluorocromo LY no es capaz de cruzar la membrana plasmática (Hanani, 2012) y se considera como un indicador de matriz citoplasmática y de vacuolas (Wright y Oparka, 1989; Steinberg et al., 1988), en este estudio se encontró que el LY podría tener una localización nuclear en células de semillas SI25 (Figuras 3.10 E, 3.10 F, 3.11 E y 3.11 F); dicha localización de LY en núcleo se sugiere que podría deberse a una unión inespecífica causada por un exceso de este fluorocromo (0.25 mg de LY). En consecuencia, el LY dificultó la correcta localización del conjugado COM2-AlexaF488 (Figuras 3.11 G y H), dado que ambos colorantes (LY y AlexaF488) requieren

de una energía de excitación en el rango de absorción en la longitud de onda a 488 nm y para emitir su señal de fluorescencia a longitud de onda a 520 nm.

Berna et al. (2009b) señalan que las proteínas DING encontradas son usualmente secretadas (DING de *P. aeruginosa*; Shah et al., 2013; Zaborina et al., 2008) o se encuentran en citosol; esta última refiriéndose al estudio previo realizado por Kumar et al. (2004) donde describieron que la proteína inhibitoria de la unión de cristales de calcio al epitelio de riñón, conocida como CAI (proteína DING), se localizaba tanto en citosol como en membrana. Por otra parte, Collombet et al. (2010) describieron la localización subcelular de la proteína DING en membranas de células de hígado de ratón, así como en el núcleo de las neuronas en cortes histológicos de cerebro de ratón. En plantas este sería el primer estudio de localización subcelular de proteínas DING en realizarse, y los resultados hasta ahora sugieren que las proteínas DING de semillas de chile habanero son proteínas citosólicas que bordean al núcleo (Figuras 3.10 F, 3.10 G, 3.11 E, 3.12 E, 3.14 E, 3.14 I, 3.15 E, 3.17 E, 3.17 I, 3.18 E, 3.18 I, 3.20 E, 3.20 I) y los gránulos de almidón presentes en el embrión y en el endospermo de dichas semillas (Figuras 3.21 G y H, y 3.21 I y J, respectivamente). Estos últimos, se han descrito que proveen de energía a las semillas para posteriores procesos de crecimiento de tejidos (Dias et al., 2013; Filippa y Bernardello, 1992).

Duwenig et al. (1997) describieron que, los tubérculos representan los principales órganos de demanda de almacenamiento de energía en plantas de patata (*Solanum tuberosum* L.). Los carbohidratos se almacenaban en el tubérculo en forma de almidón, el cual, posteriormente se moviliza durante la germinación debido a la acción de las enzimas degradantes de almidón (hidrolasas y fosforilasas; Duwenig et al., 1997). Un ejemplo es la fosforilasa citosólica que tendría acceso a los gránulos de almidón en el proceso de la germinación debido a la descomposición membranal, y de ese modo influye en la movilización de almidón y la formación de nuevos brotes (Sowokinos et al., 1987; citado por Duwenig et al., 1997). En el caso de *C. chinense*, se sabe que la proteína DING presentó actividad de fosfatasa (Brito-Argáez; datos no publicados). Debido a que se localizó esta proteína bordeando los gránulos de almidón en células del embrión y del endospermo, la proteína DING de *C. chinense* podría estar hidrolizando grupos fosfatos para posteriormente cederlos a las fosforilasas encargadas de la movilización del almidón.

Otra posibilidad es que la proteína DING de *C. chinense* se estuviera asociando con una proteína tipo germina (GLP) confiriéndole a la semilla protección contra patógenos. Se ha descrito que las proteínas GLPs están involucradas en procesos de defensa contra patógenos durante la germinación y durante la edad adulta de las plantas (Bernier y Berna., 2001); en un estudio de expresión heteróloga de los genes de *Arabidopsis thaliana* en *Nicotiana tabacum*, a partir de esta última especie se co-purificó a la proteína germina AtGER3 asociada con una proteína DING (Berna et al., 2009; Berna et al., 2002). Esto sería consistente con estudios previos en el laboratorio que han demostrado que la fracción G10P1.7.57 presenta actividad de inhibición contra patógenos como *X. campestris*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Mogel-Salazar et al., 2011).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5. CONCLUSIONES

Los extractos proteicos solubles de hojas y de semillas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.) en sus diferentes estadios fisiológicos contienen una proteína DING. La presencia de estas proteínas es más abundante en las etapas fisiológicas tempranas tanto de hojas (HJ) como de semillas (SI25). Los análisis por western blot, con el anticuerpo COM2 permitieron establecer que la proteína DING de semillas de chile habanero es una proteína que se encuentra en la fracción soluble y no en la membrana como se pensó en un principio. Estos resultados se apoyan tanto en los western blot como en la inmunocitocalización de las proteínas DING en semillas de chile habanero de 25 dpa (SI25) y de 65 dpa (SM65) realizada con los anticuerpos COM2-DAB, COM2-AlexaF488 y COM2 más anticuerpo secundario acoplado a AlexaF488. Mediante la microscopía confocal se confirmó que la proteína DING está localizada en el citosol.

5.1 PERSPECTIVAS

En cuanto a las putativas proteínas DING de ~31.62, ~26.92, ~19.95, ~17.78, ~12.59 y ~7.08 kDa sería conveniente secuenciar dichos polipéptidos para confirmar su identidad como proteínas DING. Además, diseñar experimentos que permitan elucidar si la proteína DING de ~39 kDa de chile habanero sufre proteólisis.

Realizar los experimentos de competencia COM2-DING con el péptido sintético contra el que fue generado el anticuerpo COM2, esto con el fin de confirmar por un método alternativo, la especificidad del anticuerpo COM2 por proteínas DING.

En lo referente a la localización subcelular de las proteínas DING en chile habanero mediante microscopía confocal, es conveniente incorporar otros fluoróforos (referentes para membrana, citoesqueleto, etc.) que permitan tener un panorama más íntegro acerca de la localización de dicha proteína en los cortes histológicos de semillas y que además permitan inferir la función de la proteína DING de chile habanero, dado que se especula que podrían ser proteínas del tipo estructural, y que por ello estarían interactuando con la matriz extracelular y quizás el citoesqueleto. También, se especula acerca de una posible

interacción de la proteína DING con los amiloplastos localizados en semillas de chile habanero. Las proteínas DING pudieran estar asociadas con la movilización del almidón dada su localización bordeando los gránulos de almidón en células del endospermo y embrión; sin embargo, aún faltan varios estudios que permitan confirmar o negar dicha especulación.

Por otra parte, este trabajo abre la puerta para futuros experimentos que confirmen o descarten si el fluorocromo LY puede internalizarse al núcleo de las células en cortes histológicos de semillas de chile habanero, o si sólo es un artefacto de interferencia ocasionado por la concentración de dicho fluorocromo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aceves, N.L., J.L. Juárez, D.L. Palma, R.L. López, B.H. Rivera, J.R. Rincón, R.C. Morales, R.A. Hernández y A.S. Martínez (2008). Estudio para determinar zonas de alta potencialidad del cultivo del chile habanero (*Capsium chinense* Jacq.) en el estado de Tabasco. SAGARPA y Gobierno del Estado de Tabasco. Tabasco, México. pp 1-10.
- Ahn, S., S. Moniot, M. Elias, E. Chabriere, D. Kim y K. Scott (2007). Structure–function relationships in a bacterial DING protein. *FEBS letters*, 581, 3455–3460.
- Ball, G., V. Viarre, S. Garvis, R. Voulhoux y A. Filloux (2012). Type II dependent secretion of a *Pseudomonas aeruginosa* DING protein. *Research in Microbiology*, 163(6), 457–469.
- Berna, A., F. Bernier, E. Chabriere, M. Elias, K. Scott y A. Suh (2009a). For whom the bell tolls? DING proteins in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2205-2218.
- Berna, A., K. Scott, E. Chabrière y F. Bernier (2009 b). The DING family of proteins: ubiquitous in eukaryotes, but where are the genes?. *Bioessays*, 31(5), 570-580.
- Bernier, F y A. Berna (2001). Germins and gemin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(7), 545-554.
- Bernier, F (2013). DING proteins: numerous functions, elusive genes, a potential for health. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(17), 3045-3056.
- Bookland, M.J., N. Darbinian, M. Weaver, S. Amini y K. Khalili (2012). Growth inhibition of malignant glioblastoma by DING protein. *Journal of Neuro-Oncology*, 107(2), 247–256.
- Brito-Argáez, L., F. Moguel-Salazar, F. Zamudio, T. González-Estrada e I. Islas-Flores (2009). Characterization of *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. *Asian Journal of Biochemistry*, 4(3): 77-87.
- Brito-Argáez, L., M. Poot-Chi, R. Uc-Ku, J. Tamayo-Sansores, D. Madera-Piña e I. Islas-Flores (2014). Las proteínas DING, una familia con intrigantes funciones celulares. *Tecnociencia Chihuahua*, 8(1), 17-29.

- Buczowska, H., J. Dyduch y A. Najda (2013). Capsaicinoids in hot pepper depending on fruit maturity stage and harvest date. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 12(6), 183-196.
- Castellani, E.D., C.F. Damião F, I. Bergemann de A y R.C. de Paula (2008). Morfología de frutos e semillas de especies arbóreas del género *Solanum* L. *Revista Brasileira de Sementes*, 30(1), 102-113.
- Castro-Concha, L.A., J. Tuyub-Che, A. Moo-Mukul., F.A. Vazquez-Flota y M.L. Miranda-Ham (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (habanero pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, 1-5.
- Charles, D.J. (2012). "Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources". Springer Science & Business Media. New York. pp. 189-199.
- Chi, M.F. (2014). Inmunodetección con el anticuerpo COM1 de la proteína DING presente en la fracción G10P1.7.57 y sus homólogos en una línea celular derivada de semilla de chile habanero. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. pp 42.
- Collombet, J-M., M. Elias, G. Gotthard, E. Four, F. Renault, A. Joffre, D. Baubicho, D. Rochu y E. Chabrière (2010). Eukaryotic DING proteins are endogenous: an immunohistological study in mouse tissues. *PLoS ONE*, 5(2), 1-7.
- Cortés, N. (2013). Embriogénesis somática e histología de *Capsicum annum*. Tesis. Licenciatura. Universidad Tecnológica de Tehuacán. Puebla. pp. 70.
- Curry, J., M. Aluru, M. Mendoza, J. Nevarez, M. Melendrez y M.A. O'Connell (1999). Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science*, 148(1), 47-57.
- Darbinian, N., M. Czernik, A. Darbinyan, M. Elias, E. Chabriere, S. Bonasu, K. Khalili y S. Amini (2009). Evidence for phosphatase activity of p27^{SJ} and its impact on the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(3), 400-407.

-
- Darbinian, N., R. Gomberg, L. Mullen, S. Garcia, M.K. White, K. Khalili y S. Amini (2011). Suppression of HIV-1 transcriptional elongation by a DING phosphatase. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112(1), 225–232.
- Darbinian-Sarkissian, N., A. Darbinyan, J. Otte, S. Radhakrishnan, B.E. Sawaya, A. Arzumanyan, G. Chipitsyna, Y. Popov, J. Rappaport, S. Amini y K. Khalili (2006). p27^{SJ}, a novel protein in St. John's Wort, that suppresses expression of HIV-1 genome. *Gene Therapy*, 13(4), 288–295.
- Dias, G.B., V.M. Gomes, T.M.S. Moraes, U.P. Zottich, G.R. Rabelo, A.O. Carvalho, M. Moulin, L.S.A. Gonçalves, R. Rodrigues y M. Da Cunha (2013). Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. *Genetics and Molecular Research*, 12, 6488-6501.
- Duwenig, E., M. Steup, L. Willmitzer y J. Kossmann (1997). Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *The Plant Journal*, 12(2), 223-333.
- Filippa, E.M. y L.M. Bernardello (1992). Estructura y desarrollo de fruto y semilla en especies de *Atheneak*, *Aureliana* y *Capsicum* (*Solaneae*, *Solanaceae*). *Darwiniana*, 31 (1-4), 137-150.
- Finch-Savage, W.E y G. Leubner-Metzger (2006). Seed and dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3), 501-523.
- González, E.T., C.C Casanova, P.L. Gutiérrez, T.L. Torres y S.S. Peraza (2010). Capítulo 7, uso de la flora y fauna silvestre, chiles cultivados en Yucatán, en: Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 342-344.
- Hanani, M. (2012). Lucifer yellow – an angel rather than the devil. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(1), 22-31.
- Hernández, B.J.A. (2010a). Manual para el procesamiento del chile habanero. Fundación Produce Tabasco A. C., SIGOLFO. Universidad Tecnológica de Tabasco. pp. 100

- Hernández, M.S. (2010b). Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México. Campo experimental Bajío, INIFAP. pp. 86.
- Ibisa, V.P., J. Cañizares y F. Nuez (2010). EcoTILLING in *Capsicum* species: searching for new virus resistances. *BMC Genomics*, 11(1), 1-15.
- Invitrogen. (2006). Alexa Fluor® 488 Protein Labeling Kit. Molecular Probes™ Invitrogen Detection Technologies, 1-5.
- Kumar, V., S. Yu, G. Farrell, F.G. Toback y J. Lieske (2004). Renal epitelial cells constitutively produce a protein that blocks adhesion of crystals to their surface. *American Journal Physiological Society*, 287(3), F373-F383.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lesner, A., R. Shilpi, A. Ivanova, M.A Gawinowicz., J. Lesniak, D. Nikolov y M. Simm (2009). Identification of X-DING-CD4, a new member of human DING protein family that is secreted by HIV-1 resistant CD4⁽⁺⁾ T cells and has anti-viral activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(2), 284–289.
- Lewis, A.P. y D. Crowther (2005). DING proteins are from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 252(2), 215-222.
- Long-Solís, J. (1998). *Capsicum* y cultura: La historia del chile. Fondo de Cultura Económica. México. pp. 203.
- López-Puc, G., A. Canto-Flick y N. Santana-Buzzy (2009). El reto biotecnológico del chile habanero, *Ciencia*, 30-35.
- Mendoza, R (2006). Sistemática e historia del ají "*Capsicum*" Torn. *Universalía*, 11(2), 80-88.
- Moguel, S.F. (2008). Bioprospección de proteínas de *Capsicum chinense* con actividad antimicrobiana sobre *Xanthomonas campestris* y *Phytophthora capsici*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. pp. 98.

-
- Moguel-Salazar, F., L. Brito-Argáez, M. Díaz Brito e I. Islas-Flores (2011). A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: antimicrobial peptides from *Capsicum* sp. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19918-19928.
- Montalvo, A.C.E. (2010). Técnica histológica. [Online]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Lina/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf [Acceso 6 marzo 2014]
- Moo, M.A.J. (2012). Tolerancia a la desecación y calidad fisiológica en semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis Maestría. Instituto Tecnológico de Conkal. Yucatán. México. pp. 119.
- Morales, R., A. Berna, P. Carpentier, C. Contreras-Martel, F. Renault, M. Nicodeme, M-L. Chesne-Seck, F. Bernier, J. Dupuy, C. Schaeffer, H. Diemer, A. Van-Dorselaer, J.C. Fontecilla-Camps, P. Masson, P. Rochu y E. Chabriere (2006). Serendipitous discovery and X-ray structure of a human phosphate binding apolipoprotein. *Elsevier Structure*, 14(3), 601–609.
- Papik. Industria agrícola maya, chile habanero, definición. [Online]. Disponible en <http://www.habanero-yucatan.com/sp/definicion.htm> [Acceso 28 marzo 2014].
- Perera, T., A. Berna, K. Scott, C. Lemaitre-Guillier y F. Bernier (2008). Proteins related to St. John's Wort p27^{SJ}, a suppressor of VIH-1 expression, are ubiquitous in plants. *Phytochemistry*, 69(4), 865-872.
- Pérez, M.C.I. (2014). Cinética de la maduración de la semilla de *Capsicum chinense* Jacq. relacionada al desarrollo del fruto. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. pp. 68.
- Ramchiary, N., K. Mechuselie, V. Brahma, S. Kumaria y P. Tandon (2014). Application of genetics and genomics towards *Capsicum* translational research. *Plant Biotechnology Reports*, 8(2) 101-123.
- Ramírez, J.G., S. Góngora G, L.A. Pérez M, R. Dzib E.R, C. Leyva M, e I.R. Islas-Flores. (2005). Síntesis de oportunidades e información estratégica para fijar prioridades de investigación y transferencia de tecnología en chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.). En: Estudio

BIBLIOGRAFÍA

estratégico de la cadena agroindustrial: Chile habanero. INIFAP, SAGARPA, ASERCA, CIATEJ, UNACH, CICY, OTRAS. Mérida, Yucatán, México. p 23.

Rodríguez, R.Y. (2013). Embriogénesis somática e histología de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de licenciatura. Universidad Tecnológica de Tehuacán. Puebla. pp. 70.

Ruiz-Lau N., L.F. Medinay y E.M. Martínez (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Revista Ciencia*, 70-77.

SAGARPA. (2013). Servicio nacional de inspección y certificación de semillas, guía técnica para la descripción varietal, Chile habanero [*Capsicum chinense* Jacq.]. SINAREFI. México. pp 30.

Schmitt, B., R. Stadler y N. Sauer (2014). Immunolocalization of *solanaceous* SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: new perspectives for phloem loading and transport. *Plant Physiology*, 148(1), 187-199.

Shah, M., A. Zaborin, J.C. Alverdy, K. Scott y O. Zaborina (2014). Localization of DING proteins on PstS-containing outer-surface appendages of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 352(1), 54-61

Sowokinos, J.R., P.H. Orr, J.A. Knoper y J.L. Varns (1987). Influence of potato storage and handling stress on sugars, chip quality and integrity of the starch (amyloplast) membrane. *American Potato Journal*, 64(5), 213-226.

Steinberg, T.H., J.A. Swanson y S.C. Silverstein (1988). A prelysosomal compartment sequesters membrane-impermeant fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix of J774 macrophages. *The Journal of Cell Biology*, 107(3), 887-896.

Surh, Y.J., E. Lee y J.M. Lee (1998). Chemoprotective properties of some pungent ingredients present in red pepper and ginger. *Mutation Research*, 402(1-2), 259-267.

Texeira, F.R., M.C.O.P. Lima, H.O. Almeida, R.S. Romeiro, D.J. Silva, P.R.G. Pereira, E.P.B. Fontes y M.C Baracat-Pereira (2006). Bioprospection of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* growth. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 418- 421.

- Uc-Ku, R.R. (2014). Implementación de la metodología de far western en proteínas de semillas de chile habanero utilizando como sonda la fracción G10P1.7.5 o al polipéptido CchDINGp39kDa. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. pp 42.
- Villanueva M.A. y S. Malek-Hedayat (1987). Elimination of endogenous peroxidase artefacts in immunoblots of plant extracts. *Plant Science*, 52(1-2), 141-146.
- Wright, K.M. y K.J. Oparka (1989). Uptake of Lucifer yellow CH into plant-cell protoplasts: a quantitative assessment of fluid-phase endocytosis. *Planta*, 179(2), 257-264.
- Yearick V. HPLC derivatization reagents: dabsyl chloride, SIGMA-ALDRICH, AnalytiX volume 4 article 3. [Online] Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/hplc-derivatization.html> [Acceso 29 noviembre 2011].
- Zaborina, O., C. Holbrook, Y. Chen, J. Long, A. Zaborin, I. Morozova, H. Fernandez, Y. Wang, J.R. Tuerner y J.C. Alverdy (2008). Structure–function aspects of PstS in multi-drug–resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*, 4(2), e43.