



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROTEOMICA MEMBRANAL DE ALEURONA DE CEBADA:
MODIFICACION DEL PATRON ELECTROFETICO POR EL
ALMACENAMIENTO DE LA SEMILLA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

KARLA ADRIANA CAMACHO OLVERA



MEXICO, D.F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Irma Ofelia Bernal Lugo
Vocal	Prof. José Pedraza Chaverri
Secretario	Prof. Alfredo Salazar Zazueta
1er Suplente	Prof. Luis Padilla Fuentes
2° Suplente	Prof. Diana Barreda Oviedo

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,
UNAM.

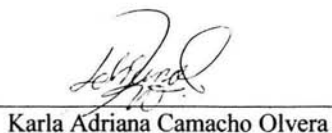
Asesor del Tema:


Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo

Superviso técnico:


M. en C. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

Sustentante:


Karla Adriana Camacho Olvera



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

DEDICATORIA

A mis padres:

Por el apoyo y amor incondicional que hicieron posible la culminación de mis estudios y presentación de esta tesis, porque esta es la herencia más valiosa que pudieron haberme dado.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por guiarme por el buen camino, al haberme dado la fuerza y paciencia necesaria para lograr una de las metas más importantes de mi vida.

A mis padres:

Por sus consejos apoyo y amor incondicional que siempre me han brindado, por haber sido siempre un ejemplo a seguir. Agradezco la confianza que han depositado en mí.

A mis hermanas Ivonne, Sandra y Diana:

Por su ayuda en los momentos difíciles, así como de las palabras de aliento para conseguir mis metas, a ti San por ser mi ejemplo y mi gran apoyo, se los dedico con cariño y esperando que sirva de impulso y estímulo para ti Dianita, faltas tú...

A la Dra. Irma Bernal:

Por su capacidad para compartir sus conocimientos, su entusiasmo para guiarme y motivarme en cada faceta de este proyecto. Gracias.

A Vanesa Maya:

Por tu dedicación, apoyo, paciencia y disposición a ayudarme siempre.

Al jurado, Prof. José Pedraza Chaverri, Prof. Alfredo Salazar Zazueta, Prof. Luis Padilla Fuentes, Prof. Diana Barreda Oviedo, por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

A Javier:

Por estar conmigo de principio a fin, por aguantar malos ratos y ayudarme en cada momento de desesperación, por tener siempre la palabra adecuada para no dejarme vencer y por la oportunidad de compartir este momento contigo.

A Magda:

Por haberme enseñado el verdadero sentido de la amistad el estar en las buenas y en las malas junto a mi en forma incondicional y desinteresada, contigo aprendí que es cierto que los amigos son como los angelitos no es necesario verlos para saber que están ahí...

A Vane:

Por hacer más agradables y divertidos los últimos semestres de la carrera.

A mis compañeras y amigas del Lab. 104, Marcela, Leticia, Valeria, Adriana, Vanessa M. y Vane.

Y con el orgullo de haber pertenecido a la Facultad de Química y la satisfacción de formar parte de la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias.

Índice General

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Morfología y estructura del grano de cebada.....	5
2.2 Germinación.....	7
2.3 Movilización de reservas.....	8
2.4 Control de la síntesis de α -amilasa por AG ₃	10
2.5 Percepción de la hormona.....	12
2.6 Papel de las endomembranas en el transporte intracelular y en la secreción de proteínas.....	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos particulares.....	16
4. METODOLOGÍA.....	17
4.1 Material biológico.....	17
4.2 Preparación de las semillas.....	17
4.3 Obtención de las capas de aleuronas.....	17

4.4 Obtención de microsomas.....	17
4.5 Determinación de proteína.....	18
4.6 Electroforésis en SDS/PAGE.....	19
4.7 Electroforésis en dos dimensiones (IEF/SDS-PAGE).....	20
4.8 Tinción con nitrato de plata.....	22
4.9 Metodología bioinformática (Uso de PD-QUEST).....	23
4.9.1 Edición de imágenes.....	23
4.9.2 Detección y edición de manchas.....	23
4.9.3 Comparación de imágenes.....	25
4.9.4 Alineación de imagen.....	25
4.9.5 Análisis comparativo de tratamientos.....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1 Optimización de la metodología para la extracción y solubilización de proteínas membranales.....	28
5.2 Optimización para la separación en dos dimensiones de proteínas de membrana de aleurona de cebada.....	34
5.3 Mapas proteicos, plantilla de semillas frescas y envejecidas.....	39
5.4 Proteínas membranales de capa de aleurona de cebada que presentan cambios cualitativos por los diversos tratamientos.....	41
5.5 Proteínas membranales de capa de aleurona de cebada que presentan cambios cuantitativos por los diferentes tratamientos.....	45

5.6 Proteínas membranales de capa de aleurona de cebada, que presentan cambios por los diversos tratamientos en una semilla envejecida.....	46
5.7 Comparación de los proteomas iniciales de las proteínas membranales de capa de aleurona de cebada de una semilla fresca y una semilla envejecida.....	48
6. CONCLUSIONES.....	55
7. PERSPECTIVAS.....	56
8. BIBLIOGRAFÍA.....	57
9. ANEXO 1.....	64

Índice de tablas

Tabla 1.	Efectividad de diversos agentes solubilizantes de proteína en la extracción de proteínas membranales.....	30
Tabla 2.	Efectividad de la precipitación con TCA 10% en acetona en presencia de diversos agentes solubilizantes de proteína.....	33
Tabla 3.	Número de manchas detectadas en los mapas proteicos, plantilla de semillas frescas y envejecidas con diferentes tratamientos.....	38
Tabla 4.	Proteínas que sufren cambios por efecto de los diversos tratamientos.....	40
Tabla 5.	Similitud en los proteomas iniciales de la aleurona de cebada envejecida y fresca.....	41
Tabla 6.	Proteínas que por efecto del ácido giberélico dejan de detectarse en las membranas de aleuronas.....	42
Tabla 7.	Nuevas proteínas detectadas en el mapa proteico de membranas aisladas de aleuronas tratadas con ácido giberélico.....	42
Tabla 8.	Proteínas no detectadas en las membranas de aleuronas frescas incubadas..	44
Tabla 9.	Proteínas que se inducen por efecto de la incubación en una semilla fresca.	45
Tabla 10.	Proteínas que disminuyen en un 50% su abundancia por efecto del ácido giberélico, con respecto al control (aleuronas sin AG ₃).....	46
Tabla 11.	Proteínas que presentan un aumento del 50% en su abundancia durante el período de incubación.....	46
Tabla 12.	Proteínas presentes en todos los tratamientos.....	46
Tabla 13.	Efecto del envejecimiento en el mapa proteico de la aleurona.....	47

Índice de tablas

Tabla 14.	Proteínas que se afectan por causa del envejecimiento.....	49
-----------	--	----

Índice de figuras

Figura 1.	Diferentes regiones de una semilla de cebada.....	7
Figura 2.	Esquema sobre la movilización de reservas.....	9
Figura 3.	Diagrama del procedimiento general para la obtención de proteínas membranales solubilizadas.....	28
Figura 4.	Estructura de los detergentes utilizados para la extracción y solubilización de proteínas membranales de aleurona de cebada.....	29
Figura 5.	Reparto de la proteína microsomal en fracción soluble e insoluble, después de la extracción con CHAPS y urea.....	31
Figura 6.	Diagrama del procedimiento general para la separación de proteínas en dos dimensiones IEF/SDS-PAGE.....	34
Figura 7.	Optimización de IEF/SDS-PAGE de proteína membranal solubilizada.....	35
Figura 8.	Efecto de la cantidad de proteína cargada sobre la resolución de manchas de proteína en el IEF/SDS-PAGE.....	36
Figura 9.	Imagen del proteoma de la fracción microsomal de aleurona generada por el programa PD-QUEST	37
Figura 10.	Mapas proteicos de la fracción microsomal de aleuronas de cebada en semilla frescas y envejecidas bajo los diferentes tratamientos.....	39
Figura 11.	Mapas proteicos para cada uno de los tratamientos en aleuronas de semillas frescas y cambios presentados por las diferentes manipulaciones.....	43
Figura 12.	Mapas proteicos y cambios presentados por la incubación en una semilla envejecida.....	47

Índice de figuras

- Figura 13. Mapas proteicos y cambios presentados por la inducción en una semilla envejecida.....48
- Figura 14. Separación por IEF/SDS-PAGE de proteínas membranales de aleuronas recién aisladas de semilla fresca y envejecida.....50
- Figura 15. Zonas en las que se encuentran el mayor número de cambios en el mapa proteico por causa del envejecimiento.....50

RESUMEN

Las membranas de la capa de aleurona están involucradas en la síntesis y secreción de hidrolasas inducidas por el ácido giberélico (AG_3). A la fecha no se han identificado las proteínas membranales responsables de formar los complejos proteicos para que este conjunto de respuestas moleculares se realicen con éxito.

Con la finalidad de conocer los cambios que el AG_3 provocó en la composición proteica de las membranas y clasificar las proteínas involucradas es este cambio, en este trabajo se optimizaron las condiciones de extracción y de elaboración de mapas proteicos de las membranas de aleurona de semillas de cebada provenientes de dos cosechas, una reciente o fresca (1998) y otra envejecida o almacenada (cosecha 1974). Ambos objetivos se lograron. Los cambios de composición proteica de las membranas como consecuencia de los tratamientos se pueden agrupar en subproteomas. El subproteoma constitutivo, proteínas no modificadas por los tratamientos; subproteoma de nuevas proteínas, formado por un conjunto de proteínas detectadas por efecto de los tratamientos; el subproteoma desvanecido, formado por las proteínas que ya no fueron detectadas por efecto del tratamiento. Este último representó el mayor cambio del proteoma membranal.

En las membranas provenientes de aleuronas aisladas de semillas envejecidas, el subproteoma constitutivo no estuvo presente y no se presentaron los otros dos subproteomas, por lo tanto sugerimos que la aleurona envejecida no fue capaz de promover la síntesis, reclutamiento o modificación de las proteínas del nuevo subproteoma detectado por efecto del tratamiento.

1. INTRODUCCIÓN.

La cebada es un cereal que se produce en poca cantidad en México. Cuenta con una superficie establecida de 370 mil hectáreas de cebada maltera y una producción de alrededor de 770 mil toneladas al año, esto es, una participación del 0.3% a nivel mundial. Tradicionalmente la producción nacional de cebada maltera es suficiente para satisfacer la demanda anual que tiene la industria cervecera por lo que la importación de este cereal fue de 3.2 % en el año 2000 participa de manera complementaria. (www.chapingo.mx/investigación/pronisea).

La cebada en la industria cervecera se utiliza principalmente para la obtención de la malta. El proceso de malteo se puede definir como la germinación parcial del grano bajo condiciones controladas de temperatura y humedad seguido por un secado lento y cuidadoso, esto con el objetivo de obtener y preservar la máxima actividad enzimática posible. Posteriormente, se realiza el proceso de maceración donde, los almidones que contiene la cebada se convierten en azúcares fermentables para la levadura produciendo, entre otros compuestos, alcohol (Aastrup,1989).

La cebada, a diferencia de la mayoría de los otros cereales posee una capa de aleurona conformada por múltiples estratos, su composición y estructura es totalmente distinta a la del resto del endospermo, sus células no contienen gránulos de almidón, en cambio tienen alto contenido de proteína (Serna, 1996).

La capa de aleurona juega un papel muy importante durante el malteo porque sintetiza las enzimas indispensables para hidrolizar a los compuestos del endospermo. La mayoría de estas enzimas son amilolíticas que migran paulatinamente de la periferia hacia el centro del

cariópside, ocasionando a su vez desdoblamiento gradual del almidón. Esta movilización de reservas está regulada por el ácido giberélico (AG₃) (Serna, 1996).

El AG₃ es una clase de hormona vegetal que produce diversos cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La química y metabolismo de estos compuestos han sido estudiados por mucho tiempo por lo que se ha llegado a comprender las vías involucradas en su biosíntesis y catabolismo. Sin embargo, los mecanismos de acción por los que el AG₃ desata una serie de eventos celulares en las plantas, es decir, la comprensión de las vías de percepción-transducción-respuesta aún permanecen en sus primeras etapas (Sian, 2000).

Existe evidencia indicando que en la percepción del AG₃ en las células de la capa de aleurona, así como en la biosíntesis y secreción de las enzimas inducidas por este fitorregulador participan las membranas celulares, la plasmática en la percepción y las endomembranas en la biosíntesis y secreción (Jones & Jacobsen, 1990).

También se ha demostrado que las semillas almacenadas inadecuadamente producen una menor cantidad de α -amilasa que las semillas frescas (Bernal, *et al.*, 1999). Una posibilidad para explicar estos resultados es que en semillas almacenadas, las proteínas membranales hayan sufrido cambios fisicoquímicos y esto haya alterado la respuesta de la aleurona al AG₃.

Para demostrar si las proteínas membranales sufren cambios por causa de un almacenamiento inadecuado, en este trabajo se propone usar como herramienta de análisis la Proteómica y así visualizar los cambios en el proteoma de la fracción membranal, producidos por el envejecimiento.

2. ANTECEDENTES

A nivel mundial, la cebada ocupa el quinto lugar en producción dentro de los cultivos básicos. Los principales países productores son: Rusia, Canadá, Alemania, Francia, España, Turquía y Estados Unidos, concentrando el 52% del volumen mundial, en tanto que la producción de México, tan sólo tiene una participación del 0.3%. A nivel nacional, los estados de Hidalgo y Tlaxcala ocupan el primer y segundo lugar en producción, con el 25.5% y 16.2%, respectivamente, concentrando el 41.7% de la producción nacional. En Tlaxcala los principales municipios productores de cebada son; Tlaxco, Calpulalpan, y Hueyotlipan, produciendo el 66.23% de la entidad. La tecnología de producción predominante es la de temporal, mecanizado, fertilizado y semilla mejorada (TMF), con un rendimiento promedio de 2.5 ton/ha. (www.sagarpa.gob.mx).

La producción y comercialización de la cebada en nuestro país juega un papel importante entre las actividades agrícolas, de las que dependen miles de familias del campo mexicano. Se trata de una actividad estable y dinámica que en los años recientes ha cobrado cada vez mayor importancia por sus volúmenes de producción y por su relación indirecta con el mercado externo a través de la venta de cerveza. (www.procampo.gob.mx)

Sin embargo, hay que decir que la mayoría de los productores de cebada dependen de forma significativa de los subsidios que reciben por la vía del PROCAMPO. Las condiciones de la producción en la mayor parte de los casos están marcadas por su carácter temporalero, es decir están influidas seriamente por factores naturales que hacen un tanto incierto el volumen y la calidad de las cosechas. (www.funcionpublica.gob.mx/scagp).

El uso de la cebada en México, se da principalmente por la industria cervecera para la obtención de la malta. El malteo comienza agregando agua al grano hasta que alcanza un 45% de humedad, durante 5 días se permite su germinación y el proceso de germinación se detiene mediante el secado y tostado lento y cuidadoso, esto con el objetivo de obtener y preservar la máxima actividad enzimática posible y producir el aroma típico de la cerveza. La malta como se mencionó anteriormente es la que provee las enzimas que convierten el almidón del grano en azúcares fermentables para la levadura en el proceso de fermentación (Serna, 1996).

2.1 Morfología y estructura del grano de cebada:

El grano o la cariósida se subdivide en tres partes fundamentales: pericarpio, endospermo y germen (Serna, 1996).

Pericarpio: El pericarpio encierra a la semilla y está compuesto de varias capas de células. Básicamente, ésta estructura se divide en epicarpio, mesocarpio y endocarpio. Su función primordial es evitar que la humedad conducida por las células tubulares se pierda, se puede decir que actúan como un sello o empaque. Estas células tienen una función importante pues sirven de medio de conducción y distribución del agua que se absorbe a través del germen durante el proceso de germinación.

Las funciones primordiales del pericarpio son proteger el grano contra agentes bióticos externos, impedir la pérdida de humedad y conducir y distribuir el agua y otros nutrientes durante la germinación (Serna, 1996).

Endospermo: el endospermo se subdivide en las siguientes partes:

- a) La aleurona, en cebada tiene de dos a cuatro estratos, la composición y estructura de la capa de aleurona es totalmente distinta al resto del endospermo: las células no

contienen gránulos de almidón, en cambio tienen un alto contenido de proteína concentrada en gránulos de aleurona, aceite contenido en los esferosomas y minerales como el ácido fítico que se halla en los gránulos de aleurona y cuerpos fíticos. Las paredes de estas células son gruesas con alto contenido de fibra.

- b) Endospermo periférico se caracteriza por su alto contenido proteico y por contener unidades de almidón pequeñas, angulares y compactadas.
- c) Endospermo vítreo: las células maduras del endospermo maduro contienen básicamente cuatro estructuras: paredes celulares, gránulos de almidón, y cuerpos proteicos. Las paredes celulares son delgadas y encierran a los demás componentes. En ellas hay un alto contenido de fibra insoluble y soluble. Los gránulos de almidón ocupan la mayoría del espacio celular y están rodeados y separados por la matriz proteica que sirve como pegamento para mantener la estructura interna de la célula. Los cuerpos proteicos son redondos y muy pequeños si se comparan con las unidades de almidón. Están dispersos en el espacio celular y en su mayoría incrustado en la membrana de los gránulos de almidón. En las células del endospermo vítreo no existen espacios de aire y los gránulos de almidón están bien recubiertos por la matriz proteica, por lo que adquieren formas angulares (poligonales). Esta estructura tiene una apariencia vítrea o translúcida debido a que la luz no es difractada cuando pasa a través del endospermo.
- d) Endospermo almidonoso: El endospermo almidonoso se encuentra encerrado por el vítreo. Es decir, se encuentra en la parte más céntrica del grano. Contiene las mismas estructuras del endospermo vítreo pero las unidades de almidón son de mayor tamaño y menos angulares las paredes celulares en general son más delgadas que las del endospermo vítreo (Serna, 1996).

Germen: Básicamente el germen encierra el eje embrionario y el escutelo o escudo. Esta estructura se encuentra adherida o fusionada al endospermo por medio del escudo. Este tejido y su epitelio son morfológicamente el único cotiledón de las gramíneas. Sirve como almacén de nutrientes y como puente de comunicación entre la plántula o embrión en desarrollo y el gran almacén de nutrientes del endospermo. El eje embrionario resulta de la diferenciación del embrión y está formado por la radícula y la plúmula, que formarán las raíces y la parte vegetativa de la planta, respectivamente. El germen se caracteriza por carecer de almidón y por su alto contenido de aceite, proteína, azúcares solubles y cenizas. Además, es alto en vitaminas B y E (Serna, 1996).

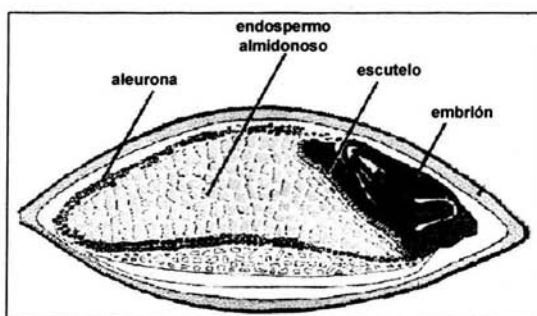


Figura 1. Diferentes regiones de una semilla de cebada.

2.2 Germinación.

Este proceso fisiológico resulta en cambios significativos de la composición química y estructural de los granos. Estos cambios le permiten producir la energía necesaria requerida para el crecimiento y desarrollo del embrión en una nueva planta. El mecanismo de germinación empieza cuando la semilla se expone a factores favorables, como son la

presencia de agua, la disponibilidad de oxígeno y temperatura, que propician la síntesis de hormonas (Giberelinas) seguida por la generación de enzimas degradadoras de los tejidos de reserva: el endospermo y el escutelo.

Durante la germinación, la semilla germinante produce ácido giberélico (**AG₃**) en el embrión, el cual difunde hacia el endospermo, induciendo a su paso la producción de enzimas hidrolíticas tanto en el germen mismo como en la capa de aleurona. (Gilroy & Jones, 1992). La acción de estas enzimas desdobra gradualmente al almidón, a los lípidos y a la proteína del grano. Esto con el objetivo de proveer energía y nutrimentos necesarios para el desarrollo del embrión (Jacobsen, *et al.*, 1988).

Durante la germinación ocurren cambios importantes en la estructura y composición química de los cereales. El agua se absorbe rápidamente por el germen y se transfiere al endospermo a través de las células tubulares del pericarpio. El germen tiene mayor capacidad de retención de agua que el endospermo. La generación o síntesis de ácido giberélico por el embrión es el mecanismo más importante para la movilización de reservas de la germinación, debido a que induce a la **capa de aleurona** a producir las enzimas degradadoras de almidón, proteína y fibra. Este tipo de hormona se sintetiza en mayor cantidad durante los primeros dos días después de que empieza la germinación. Las giberelinas también estimulan directamente el desarrollo del eje embrionario mediante mecanismos que aceleran la división celular (Jones, *et al.*, 1990).

Las giberelinas aparecen envueltas en la regulación de numerosos aspectos de la germinación y desarrollo de las plantas. La acción bioquímica y molecular del AG₃ se estudia principalmente en la capa de aleurona (Hooley, *et al.*, 1991).

2.3 Movilización de reservas

Durante el desarrollo, la semilla acumula reservas, las cuales se almacenan en forma de proteínas, polisacáridos, lípidos y minerales, en el endospermo almidonoso y en la aleurona. Durante la germinación, estas reservas son degradadas y movilizadas vía escutelo, hacia el embrión, donde son utilizadas como sustratos para su crecimiento. Las enzimas responsables de la hidrólisis de las reservas son suplidas por la aleurona bajo el control de AG_3 (Lovegrove & Hooley, 2000).

En la Fig. 2 se muestra un esquema de la movilización de reservas en cebada y de los procesos que comprende.

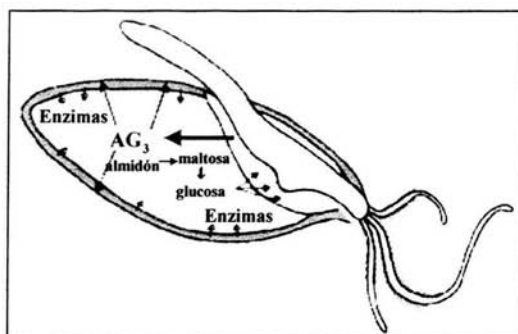


Figura 2. Esquema sobre la movilización de reservas.

Primeramente se deben degradar las paredes celulares de las células del endospermo ya que con esto se facilita el acceso de las enzimas al almidón del grano y a la matriz de proteínas circundantes del endospermo.

Los arabinosilanos y los (1-3) (1-4)- β -Glucanos son los polisacáridos que se encuentran presentes en mayor proporción en las paredes celulares de aleuronas y del endospermo por lo que, en respuesta al AG_3 , las enzimas que se sintetizan e inician la degradación de las

paredes celulares son las endo 1-4 β -xilanasas y las (1-3) (1-4) β -glucanasas (Jacobsen, *et al.*, 1988).

La hidrólisis de almidón, el polisacárido de mayor abundancia en el endospermo de la semilla, procede a través de la acción de varias y numerosas enzimas, la α -amilasa, endohidrolasa, inicia la degradación de amilosa y amilopectina. La β -amilasa y la α -glucosidasa, exohidrolasas que sirven para degradar los residuos de maltosa y glucosa. Todas las enzimas antes mencionadas son sintetizadas por la capa de aleurona durante la germinación y su producción es controlada por el AG₃ (Jacobsen, *et al.*, 1988).

La capacidad de la aleurona para producir las enzimas anteriores varía extensivamente dependiendo del genotipo, las condiciones de crecimiento, la edad del grano y muchos otros factores (Jones, *et al.*, 1990).

2.4 Control en la síntesis de α -amilasa por AG₃.

Muchos trabajos han tenido como objetivo describir los diferentes efectos causados por el AG₃ a nivel celular y genético en la capa de aleurona. Es decir, se han estudiado varios eventos moleculares que se inducen o modifican por la presencia del fitorregulador, pero el más estudiado y representativo es la regulación de los genes de α -amilasa por el AG₃, debido a que la α -amilasa constituye la principal enzima sintetizada *de novo* como respuesta a este fitorregulador (Jones, *et al.*, 1990).

La α -amilasa de cereales presenta dos grupos de isoenzimas con diferentes puntos isoeléctricos (pI), el primer grupo presenta un pI de 4.6 y el otro alrededor de 5.9, los cuales son denominados AMY 1 y AMY 2 respectivamente (Jones, *et al.*, 1990).

Aislando capa de aleurona, se puede observar que la síntesis de las isoformas AMY 1 pueden ser detectadas antes de la adición de AG₃, pero la síntesis de la isoformas AMY 2 no. Después del tratamiento con AG₃, la proporción en la síntesis de ambos grupos incrementa aunque primero se observa el incremento en AMY 1 (Jones, *et al.*, 1990).

La demostración de la regulación diferencial de éstos grupos se realizó tanto a nivel de traducción como de transcripción. Para el caso de la traducción se evaluó la abundancia de cada una de las isoformas de α -amilasa, esto es por cantidad de proteína; desde el punto de vista transcripcional se comparó la abundancia ARNm. En ambos experimentos se incubaron las aleuronas en presencia de AG₃ por diferentes tiempos. Para el caso de proteínas, las aleuronas fueron marcadas radiactivamente en la última hora de incubación, los polipéptidos fueron extraídos y visualizados por fluorografía, y se observó que en las primeras horas existe una mayor cantidad de AMY 1 y conforme pasa el tiempo se va incrementando, sin embargo para el caso de AMY 2 en los primeros tiempos de incubación existe en muy poca cantidad, a las 16 hrs. alcanza un máximo de síntesis y posteriormente decrece muy lentamente. Para el caso del ARNm se usaron sondas específicas para cada isoforma, el ARNm fue aislado de las aleuronas después del término del período de incubación y marcado radiactivamente para cada isoforma y los resultados correspondieron a lo ya obtenido en la síntesis de proteínas del experimento anterior. (Jones, *et al.*, 1990).

Con base a los resultados de muchos estudios, se ha determinado que el ARNm de la α -amilasa se acumula en presencia de AG₃ y que el ABA inhibe esta acumulación (Jacobsen & Chandler, 1988). También se ha observado que el ARNm de la α -amilasa de bajo pI se encuentra presente en la aleurona hidratada, se incrementa de 10 a 20 veces como respuesta al AG₃ durante las primeras 24 horas y responde a niveles bajos del fitorregulador

aproximadamente de 10^{-8} M. Por otra parte, el ARNm de la α -amilasa, de alto pI esta en muy baja concentración en el tejido hidratado, se incrementa de 50 a 100 veces de las 12 a las 16 horas como respuesta al AG₃ decreciendo más tarde y responde al AG₃ en altas concentraciones aproximadamente de 10^{-6} M . Todo esto refuerza la idea de que los genes de los diferentes grupos de α -amilasa son regulados diferencialmente (Rogers, 1985).

En la actualidad, la capa de aleurona es uno de los pocos sistemas con familias de genes bien identificados que son regulados positivamente por el ácido giberélico y cuyos productos están bioquímicamente identificados como la α -amilasa. Por ello, ha servido como un modelo importante para el estudio de la regulación hormonal de la expresión génica en plantas.

2.5 Percepción de la hormona.

La membrana plasmática no funge sólo como delimitadora de los diferentes dominios intra y extracelulares, sino que también regulan la entrada y salida de distintos materiales a través de diferentes mecanismos de transporte intrínsecos. Por otra parte también, controla las interacciones célula-célula a través de diferentes receptores de membrana, y percibe los niveles externos de mensajeros químicos.

Los receptores de la membrana plasmática son proteínas transmembranales, con sitios de enlace en la porción de la proteína expuesta al exterior de la célula. En general, la ocupación de estos sitios por moléculas que pueden inducir una respuesta del receptor causará un cambio conformacional en la proteína receptora que será propagado de la región expuesta al interior de la célula. En la parte de la membrana plasmática en contacto con el

citoplasma, puede haber diferentes interacciones entre el receptor y otras proteínas que eventualmente lleven a distintos estadios del proceso de transducción.

En las plantas, el mecanismo por el cual se lleva a cabo la percepción- transducción de las señales emitidas por los fitorreguladores no se conoce todavía. Sin embargo, los modelos de percepción-transducción de señales para hormonas animales, han influido de manera importante en el estudio de estos sistemas en plantas.

Algunos fitorreguladores pueden atravesar membranas biológicas por lo que pueden interactuar con receptores citoplasmáticos, como en el caso de algunas hormonas esteroides en animales. Por otra parte, también es posible que interactúen con receptores que se encuentren en algún lugar de la parte externa de la membrana plasmática.

Un receptor se define como una proteína (generalmente enlazada a un glucósido) capaz de enlazarse específica y reversiblemente a un compuesto químico que lleva un mensaje a la célula, sin transformarlo químicamente. Después de que se da la unión mensajero químico – receptor, éste último sufre un cambio conformacional que provoca el desencadenamiento de una serie de reacciones que producen eventualmente una respuesta fisiológica en la célula (Devlin, 1982).

Existen experimentos que demuestran que la percepción del ácido giberélico en células de capa de aleurona se da a nivel de membrana plasmática, uno de ellos hecho en avena. Estos investigadores aislaron protoplastos de aleurona, demostraron que cuando se une covalentemente esferas de sefarosa al AG₄ con lo cual la molécula se vuelve más grande y por lo tanto impermeable a la membrana, y se le adiciona al medio de incubación conteniendo protoplastos de aleurona, existe una respuesta al estímulo que es la secreción de α -amilasa (Hooley, *et al.*, 1991).

El segundo experimento se realizó en cebada, aislaron también protoplastos de aleurona, microinyectaron con AG₃ dentro del protoplasto y fue incubado por 24 hrs. y se determinó la respuesta al AG₃ por medio de la secreción de α -amilasa pero no hubo respuesta, sólo existió secreción de esta enzima cuando el AG₃ estaba presente en el medio de incubación. De la misma manera probaron con ácido abscísico (ABA), que es antagonista del AG₃ y observaron que cuando se incubaban los protoplastos en presencia de AG₃ y ABA no había secreción de α -amilasa (Gilroy & Jones,1994). Como conclusión de los experimentos antes mencionados se puede definir que en efecto el AG₃ se percibía a nivel de membrana plasmática.

2.6 Papel de las endomembranas en el transporte intracelular y en la secreción de proteínas.

Después de su síntesis, la α -amilasa se secreta por exocitosis de las células de la aleurona hacia el endospermo almidonoso. En células animales la secreción de proteínas que son sintetizadas por el retículo endoplásmico rugoso, pasan a través del Golgi y se secretan dentro de vesículas las cuales atraviesan las membranas. Se cree que los eventos de síntesis y de transporte en vegetales pueden ser similares (Bush, *et al.*, 1992).

La actividad de los transportadores de Ca²⁺ especialmente en membranas y endomembranas como retículo endoplásmico y vacuolas mantiene bajos niveles de Ca²⁺ en el citosol y altos niveles dentro de los organelos (Gilroy & Jones,1992). La importancia de mantener bajos niveles en el citosol aun no es conocida pero recientes estudios indican que una concentración alta dentro de los organelos es importante para su función. Elevados niveles de concentración de Ca²⁺ en el RE particularmente parecen necesarios para tener una

actividad secretoria (Gilroy & Jones,1992). En la literatura se reporta que se ha encontrado que las vesículas de RE aisladas de la capa de aleurona muestran niveles elevados de transporte de Ca^{2+} cuando la aleurona ha sido tratada previamente con AG_3 , como sabemos el AG_3 incrementa la síntesis y secreción de hidrolasas principalmente de α -amilasa, por lo tanto el incremento del flujo de Ca^{2+} dentro del RE es una parte esencial por la estimulación de AG_3 y por lo tanto de la producción de hidrolasas (Bush & Jones, 1992).

Como podemos observar en este proyecto los sistemas membranosos están involucrados en la funcionalidad de este proceso y las proteínas son las responsables de la mayoría de los procesos dinámicos que se llevan acabo dentro de ellas.

Resumiendo sabemos que la degradación del almidón por enzimas sintetizadas durante la germinación es importante para el desarrollo del embrión y el crecimiento de la planta.

En la industria cervecera, este proceso de síntesis de hidrolasas por la aleurona juega un papel importante para la obtención de una malta de buena calidad, especialmente la actividad de las enzimas que degradan al almidón. Las cuales durante el proceso de maceración son determinados en términos del poder diástasico, el cual determina la capacidad de hidrólisis de almidón en azúcares fermentables (Kraemer, *et al.*, 2001).

La cebada en México se siembra durante el período de otoño-invierno, cosechándose durante el período de primavera-verano, por lo que la semilla se mantiene en almacenamiento durante casi todo el año.

Si la semilla de cebada, es almacenada inadecuadamente (altas temperaturas y humedades relativas altas) o por tiempos muy prolongados la semilla se deteriora. Una de las manifestaciones de este envejecimiento es la baja capacidad de producción de enzimas hidrolíticas, lo que conlleva a la obtención de maltas de baja calidad.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto del envejecimiento y del AG₃ en la composición proteica de membranas aisladas de aleurona de cebada.

3.2 Objetivos particulares:

- Optimizar la metodología para la extracción y separación en dos dimensiones de proteínas de membrana.
- Elaborar y analizar patrones electroforéticos de doble dimensión de proteínas membranales de aleuronas frescas y envejecidas tratadas en ausencia y en presencia de ácido giberélico.
- Seleccionar las manchas de proteína que presenten diferencias cualitativas y/o cuantitativas
- Hacer una identificación parcial por peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) de proteínas involucradas en la respuesta al ácido giberélico y que se afectan por el envejecimiento

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Se utilizaron semillas de cebada *Hordeum vulgare*, variedad Himalaya, cosecha 1998 y 1974, obtenidas del Departamento de Agronomía de la Universidad de Washington, Pullman, WA.

4.2 PREPARACIÓN DE LAS SEMILLAS:

Las semillas de cebada se cortaron transversalmente eliminando el embrión. Las medias semillas sin embrión se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v), agitándolas en esta disolución durante 20 minutos. Se enjuagaron, de seis a ocho veces con agua destilada estéril, hasta eliminar el olor a hipoclorito.

4.3 OBTENCIÓN DE LAS CAPAS DE ALEURONA:

Las medias semillas desinfectadas se colocaron a embeber durante 72 hr a 30-32 °C sobre 2 círculos de papel filtro grueso y 7 ml de agua destilada estéril que contenía estreptomycin y clorafenicol, ambos a una concentración de 20 µg/ml de agua de imbibición de cada uno de éstos antibióticos, en cajas Petri de vidrio estériles. Al término de este tiempo, se eliminó el endospermo almidonoso con ayuda de un par de espátulas. Todas las manipulaciones con las semillas desinfectadas se realizaron en condiciones estériles.

4.4 OBTENCIÓN DE MICROSOMAS.

Lotes de 300 aleuronas aisladas se depositaron en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se les agregaron 5 ml de buffer de incubación (Succínico 20 mM y cloruro de calcio 20 mM a pH

5), adicionando ó no, ácido giberélico 10^{-6} M. Los matraces se cubrieron con parafilm y se incubaron por 3 hr a 25 ± 3 °C con agitación constante (200 rpm).

Después del tiempo de incubación se decantó el amortiguador y con ayuda de una toalla de papel, las aleuronas, se secaron extrayendo la mayor cantidad de agua posible. Las aleuronas se homogenizaron con arena de mar, en hielo.

Poco a poco se agregaron 30 ml de amortiguador de homogenización (sacarosa 330 mM Tris HCl 100 mM, EDTA 5 mM, pH 5.5) y β -mercaptoetanol, 1 μ l por ml de buffer, directo de la botella del reactivo, este se agregó en el momento de utilizar el amortiguador. El homogenado se filtró por 4 capas de gasa y se recolectó en un vaso de precipitados. El filtrado se pasó a un tubo de centrifuga. El homogenado se centrifugó a 10,000 xg por 10 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se depositó en otro tubo y se centrifugó a 112,000 xg por 1 hr a 4°C. Se utilizó una centrifuga marca Beckman, modelo OPTIMA™, TLX y un rotor de 60T; completado el tiempo de centrifugación se tiró el sobrenadante, y con cuidado para no desprender la pequeña pastilla del tubo, se secó para retirar el exceso de líquido que quedó en las paredes y se resuspendió, con ayuda de un pincel, en 650 μ l de amortiguador de resuspensión (Tris base 40 mM, pH 7.4, EGTA 2 mM y $MgCl_2$ 2 mM, conteniendo PMSF 1 mM , CHAPS al 2 % y urea 4 M.).

4.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA:

La determinación de proteína se realizó por el método de Lowry (Lowry, *et al*, 1951)

En un tubo de ensayo se agregaron los reactivos indicados a continuación:

- 1 ml de agua
- La muestra (5 a 10 μ L)
- 3 ml de solución C agitar en vortex

- Reposar 5-10 min.
- Añadir 300 μ L de solución D, agitar en vortex
- Reposar 30 min, desarrollo de color.
- Leer en espectrofotómetro a 660 nm.

La curva patrón se realizó con una solución estándar de seroalbúmina de bovino (1 mg / ml). El rango lineal fue de 20 a 80 μ g de proteína.

Solución A: carbonato de sodio al 2 %

hidróxido de sodio al 0.4 %

tartrato de sodio y potasio al 0.16 %

SDS al 1 %

Solución B: Sulfato de cobre pentahidratado al 4 %

Solución C: A + B en proporción 100:1

Solución D: Folín concentrado 1:1 con agua

4.6 ELECTROFORÉISIS EN SDS/ PAGE

Para la preparación del gel se tomaron las siguientes cantidades de las soluciones patrón preparadas con anterioridad.

GEL SEPARADOR	
Soluciones Patrón	Gel al 10 %
Tris HCl 3 M pH 8.8	2.81 ml
SDS 10 %	0.075 ml
Soln. A al 30 % de Acrilamida/ Bis-Acrilamida	2.49 ml
H ₂ O	-
Persulfato de amonio al 30 %	16 μ l
TEMED	5 μ l
GEL CONCENTRADOR AL 4 %	
Tris HCL 1 M pH 6.8	0.250 ml
SDS al 10 %	0.035 ml
Soln. al 30% de Acrilamida/ Bis-Acrilamida	0.333 ml
H ₂ O	1.88 ml
Persulfato de amonio al 30 %	3 μ l
TEMED	12 μ l

- Las soluciones, tanto del gel concentrador como del gel separador, se desgasificaron alrededor de 10 a 15 min. El persulfato de amonio y el TEMED se agregaron a las soluciones después de la desgasificación, justo antes de ser depositados a las placas. Una vez vertida la solución en la placa de vidrio se esperó a que el gel polimerizara. Primero se vertió el gel separador y se le adiciona agua en la parte superior, se dejó a temperatura ambiente sin perturbación hasta que gelificó y luego se vertió el gel concentrador y se ajustó el peine.
- Una vez que el gel polimerizó, el peine se retiró y los pozos se lavaron con amortiguador de corrida. En cada pozo se cargaron 15 μg de proteína de la muestra, (se realizó el cálculo para definir el volumen de muestra que contenían 15 μg de proteína).
- El soporte del gel cargado se depositó en la cámara para electroforesis y se corrió durante 2:30 hr a 90 volts.
- Los geles se tiñeron con el reactivo de nitrato de plata.

4.7 IEF/SDS-PAGE

- La proteína recuperada en los microsomas, se determinó por el método de Lowry. (Lowry, *et al.*, 1951).
- Una alícuota de la suspensión de microsomas conteniendo 600 μg de proteína, se transfirió a un tubo eppendorf y se precipitó con acetona conteniendo 10% de ácido tricloroacético (TCA) por 24 hr a una temperatura de -20°C . Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm en microfuga para eppendorff por 10 min. El sobrenadante se eliminó y la pastilla se resuspendió en acetona al 80% y se centrifugó por 5 min.

a 14000 rpm en una centrífuga para eppendorf modelo 5415 C. Este procedimiento se repitió 3 veces. La pastilla se secó al vacío.

- La muestra de microsomas precipitada y seca, se rehidrató en 125 μ l de amortiguador conteniendo: 8 M de urea, 4 % de CHAPS, 0.3 % de DTT, 1 μ l de anfolinas pH 4-7 y 0.002% de azul de bromofenol.
- Los 125 μ l de muestra se utilizaron para cargar la tira de acrilamida con gradiente de pH de 4 a 7, inmovilizado (IPG-strips, Amersham Biosciences).
- La hidratación de la tira con la muestra se realizó por 16 hrs. a 20 °C, en el equipo Multiphor II.
- Después del tiempo de hidratación, se corrió la primera dimensión IEF, en el Multiphor, aplicando primero una corriente de 500 V por 1 hr y después un gradiente de voltaje 500 V a 3500 V en 1.5 hr, por último una corriente de 5000 V/hr.
- Una vez terminada la separación por punto isoseléctrico (IEF), se retiró la tira del equipo y se depositó en un amortiguador de equilibrio antes de continuar con la separación por peso molecular, SDS-PAGE. El amortiguador de equilibrio contenía: Tris HCl pH 8.8 50 mM, urea 6 M, glicerol 30 %, SDS 2 % y azul de bromofenol al 0.002 % y se agregó DTT al 1%, el lavado en este amortiguador se hizo por 20 min, después se realizó otro lavado también por 15 min pero en lugar de agregar DTT se agregó yodoacetamida al 2.5 %.

Después del equilibrio, la tira se depositó en un gel de acrilamida al 10% y se corrió a 20 mA por 15 min y después 40 mA por 2 hr. Los geles fueron teñidos por nitrato de plata.

4.8 TINCIÓN POR NITRATO DE PLATA.

- Para fijar la proteína, el gel se sumergió toda la noche y con agitación continua en 50 ml de solución fijadora (ácido acético al 10% y etanol 30%).
- La solución fijadora se retiró y el gel se enjuagó, con 50 ml de etanol al 30%, 3 veces por 20 min cada una, y 2 veces con agua destilada por 15 min, cada una.
- Para sensibilizar el gel se utilizaron 50 ml de una solución que contenía, ditionita al 0.025 %, en la cual se sumergió el gel y se agitó durante 1 min.
- El gel se enjuagó en 50 ml de agua destilada 2 veces por 1 min, también en agitación constante.
- La tinción con nitrato de plata se llevó acabo en 50 ml de una solución de nitrato de plata al 0.2 % recién preparada, por 30 min en agitación.
- El gel se enjuagó con 50 ml agua destilada por 1 min también en agitación constante.

Para revelar se mantuvo el gel en agitación con 50 ml de una solución de Na_2CO_3 al 6 %, 20 mM de Na_2SO_3 y 48 μl de formaldehído por 5 min., y se detuvo la reacción con 1.75 ml de ácido acético, directo de botella.

4.9 METODOLOGÍA BIOINFORMÁTICA.

Una vez que se obtuvieron los geles, éstos fueron escaneados y guardados en archivos con formato TIF ya que es la única forma que el programa PDQUEST los puede reconocer y abrir, para poder trabajar en ellos.

USO DE PDQUEST.

4.9.1 Edición de imagen:

Este es el primer paso que utilizamos para empezar el análisis en PDQUEST, gracias a la edición se optimizaron las imágenes escaneadas de los geles.

1.1 La opción *Transform* permitió ajustar la imagen en cuanto al brillo y al contraste disminuyendo así el fondo.

1.2 La opción de cortado, *Crop* se utilizó para reducir el tamaño del archivo que ocupaba la imagen, ya que el escaneo original de los geles arroja archivos muy extensos, un primer beneficio es que, se puede seleccionar una área del gel donde se encuentra la mayor parte de las manchas y eliminar zonas del borde. Los parámetros de área seleccionada se guardan para que todos los siguientes geles sean cortados de la misma manera y del mismo tamaño quedando todos con áreas iguales y bien definidas.

4.9.2 Detección y edición de manchas (*spots*):

En esta parte se seleccionan los parámetros para la detección de las manchas en los geles escaneados. Dadas las variaciones entre geles por la tinción (intensidad en las manchas diferentes, o quizás un fondo rayado que resulta en una imagen con poca claridad). Se eligió el gel que presentara menos fondo y el que contenía mayor número de manchas.

2.1 Parámetros de selección, opción *Spot detection wizard*: una vez seleccionado el gel, se marcaron bajo criterio personal las siguientes manchas, la que se considerará más tenue, la más pequeña, la más grande y por último se dibuja un recuadro abarcando la región más representativa del gel.

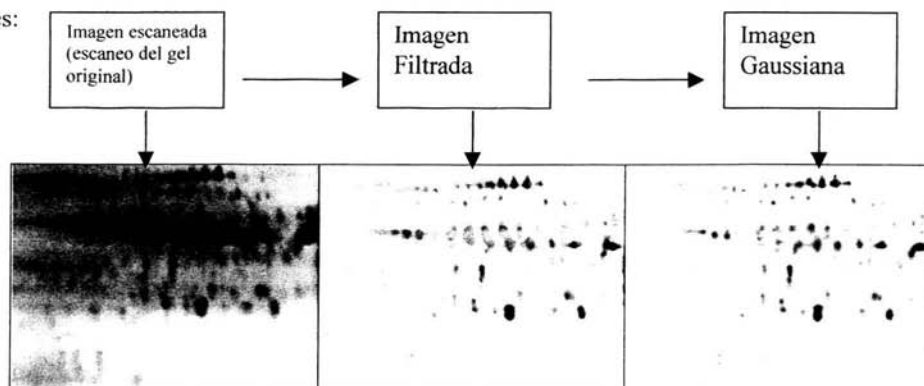
2.2 Prueba gaussiana opción *Gaussian model during test*: Esta opción del programa delimita automáticamente el contorno circular de las manchas en automático lo que ayuda a distinguir dos manchas en una mancha larga, cuando hay un traslape. Con esto la detección de las manchas se hará más exacta.

2.3 Conteo del total de manchas opción *Find spot center*: Con los parámetros establecidos anteriormente esta función realiza el conteo de las manchas en el gel por lo que sólo contará las manchas que cumplan con las características de intensidad y contorno circular seleccionadas.

Todos los demás parámetros u opciones que presenta el programa en esta parte se dejaron tal como sugería el programa.

Por último se procedió a detectar las manchas en los demás geles con los mismos parámetros, con la opción *Processing gels*.

Cuando las manchas son detectadas en PDQUEST se arrojan 3 diferentes tipos de imágenes:



Para realizar las comparaciones, el programa recomienda utilizar las imágenes Gaussianas ya que las manchas en este tipo de imagen se ven más claras y se logran distinguir cuando las manchas están superpuestas.

4.9.3 Comparación de imágenes opción *Matchset* del programa.

Después de haber realizado la detección de las manchas en todos los geles se hacen las comparaciones de las manchas a través de los matchsets. Un matchset en PDQUEST es el mecanismo para comparar y analizar las manchas en el experimento, entre repeticiones, por lo que, puede consistir en uno o más geles, en este caso fueron 6 geles por cada tratamiento.

3.1 Selección de imágenes opción *Creating matchset* : Los matchsets son creados con las imágenes gaussianas de los geles que forman parte de cada tratamiento que para este caso fueron 6.

3.2 Selección de un estándar opción *Selecting the standard template*: Cuando se crea el matchset el programa solicita la selección de una imagen que servirá como templado y se tomará como el estándar, la imagen que se elige como la estándar es aquella donde se detectó el mayor número de manchas.

4.9.4. Alineación de imagen.

Después de seleccionar la imagen que será nuestro estándar se comienza por ajustar las imágenes de acuerdo a las manchas que se tienen en todos los geles, para después adicionar las manchas que no estén en el estándar, pero sí se encuentren en mínimo tres miembros del matchset.

4.1 Guías, opción *Landmark*: Los landmarks son manchas de referencia que el programa usa para alinear las posiciones de todas las demás en cada gel. Para

marcar una mancha ésta debe estar en el estándar y el programa automáticamente señala si se encuentra en los demás miembros del matchset.

4.2 Emparejar, opción *Matching*: Para terminar la alineación se marcaron como landmarks por lo menos 70 manchas que se encontraran en los 6 geles. Finalmente se utilizó la opción de *automatching*.

4.3 Adición de manchas, opción *Adding spots to estandard*: una vez que se terminó de alinear los geles, se localizaron las manchas que se encontraban en por lo menos 3 geles del matchset y no se encontraban en el estándar y se procedió a adicionarlas para tener en el estándar todas las proteínas que posiblemente deba tener la muestra.

4.4 Asignación de PM y pI opción *Mr pI Data*: El siguiente paso fue asignarle valores de PM y pI a 4 manchas (proteínas) , preferentemente que estuvieran en los extremos tanto de PM como de pI con la opción de *Enter MrpI data* del menú de *Análisis*. Se asignaron sólo 4 valores ya PDQUEST puede calcular los valores de todas las manchas del estándar tomando esos 4 valores como referencia.

Una vez que se crearon los estándares de cada uno de nuestros tratamientos lo siguiente fue pasar al análisis.

4.9.5 Análisis comparativo de tratamientos.

El primer paso de nuestro análisis fue crear un *High level matchset* que en PDQUEST significa crear un matchset a partir de los estándares de cada tratamiento, para comparar los patrones electroforéticos, resultados de una serie de experimentos o de tratamientos diferentes.

5.1 Guías (*Landmark*): Se utilizaron por lo menos 70 landmarks nuevamente para alinear los estándares y no se adicionaron manchas ya que se utilizaron los estándares.

5.2 Función estadística opción *Spot Review tool*: esta herramienta de análisis despliega un histograma por cada mancha. Cada barra del histograma representa la intensidad de la mancha en unidades arbitrarias. Asimismo, PD QUEST asigna un número a cada mancha de acuerdo a la zona en que se encuentre. También se indican las manchas que se encuentran en un tratamiento y no en el otro con su respectiva información de número e intensidad.

5.3 Parámetros opción *Spot parameters* (opción del menú de *Spots*) una vez que se identificaron las manchas que estaban ausentes en cada tratamiento lo que se hizo fue obtener sus PM y sus pl, para complementar nuestra información.

5.4 *Exporting Images*: Finalmente lo que se realizó fue exportar la imagen, a Word para presentar el resultado, esta opción se encuentra en el menú *File*.

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1 Optimización de la metodología para la extracción y solubilización de proteínas membranales.

Dadas las características hidrofóbicas de las proteínas membranales, su estudio se ha visto impedido, debido a los problemas que se presentan en la extracción para mantenerlas en estado soluble. Por esto, en primera instancia se realizó la optimización de las condiciones de extracción y solubilización de proteínas membranales de la capa de aleurona. El procedimiento general utilizado para solubilizar las proteínas membranales se muestra en la figura 3.

Este procedimiento se utilizó para aislar proteína membranal de aleuronas de semillas de cosecha 1998 y de cosecha 1974. En este trabajo sólo se reporta la optimización con el último sistema, pues el primero fue optimizado por una compañera de laboratorio.

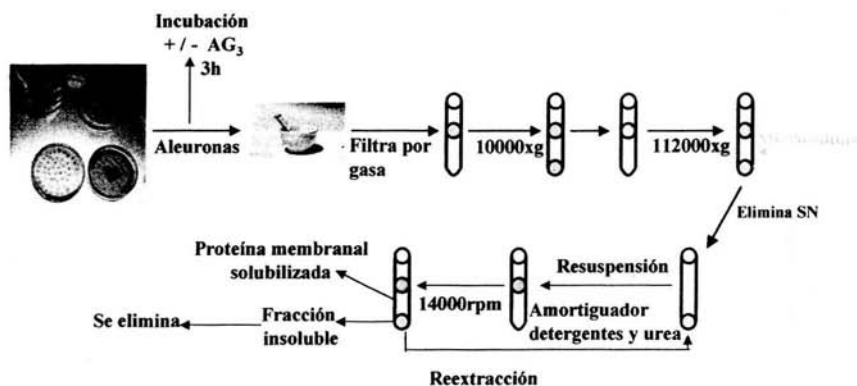
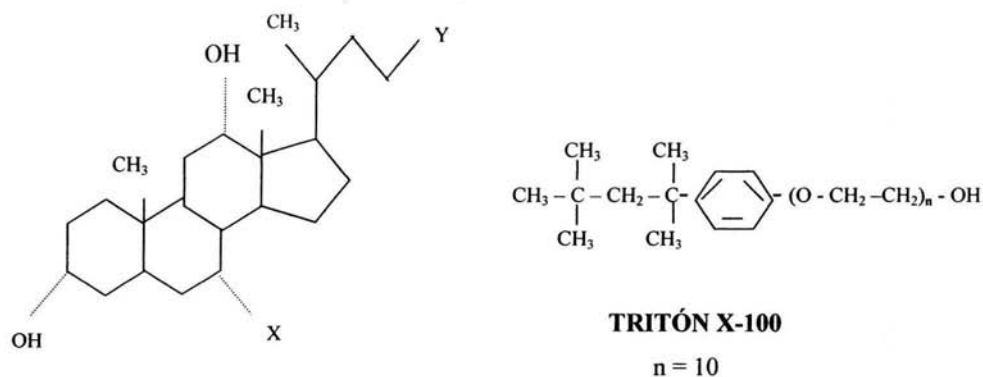


Figura 3. Diagrama del procedimiento general para la obtención de proteínas membranales solubilizadas (PMS).

La etapa crítica del procedimiento es la solubilización de la proteína de los microsomas y que en la figura 3 está representada por la resuspensión. Las proteínas membranales son liposolubles por lo que una forma de solubilizarlas consiste en reemplazar los fosfolípidos que las rodean por detergentes, además del uso de agentes caotrópicos.

Para la solubilización de las proteínas de la fracción microsomal se utilizaron en diferentes combinaciones dos detergentes no iónicos, el Tritón X-100 y CHAPS (Figura 4) y como agente caotrópico, la urea. Se eligió el uso de estos dos detergentes debido a que son detergentes que no interfieren con el isoelectroenfoco de las proteínas.



CHAPS

X = OH,

Y = CO-NH-(CH₂)₃-N⁺(CH₃)₂-SO₃⁻

Figura 4. Detergentes utilizados para la extracción y solubilización de proteínas.

La eficiencia de cada tratamiento se cuantificó como el porcentaje de proteína solubilizada, respecto al total de proteína presente en la preparación microsomal (Tabla 1).

El porcentaje de proteína microsomal solubilizada fue similar, del orden del 50%, con ambos tipos de detergentes (comparar renglones 1 y 2, Tabla 1). El utilizarlos en forma

conjunta como agentes solubilizantes no mejoró de manera sustancial la solubilización de proteína microsomal (comparar renglones 3 con 1 y 2 Tabla 1). En contraste, la eficiencia de los detergentes como agentes solubilizantes de la proteína microsomal se incrementó por la adición de urea (comparar renglones 4 con 1 ó renglones 5 con 2 Tabla 1). Independientemente del detergente utilizado o de la concentración de urea, la proteína solubilizada fue de cerca del 70 % de la proteína microsomal (comparar los renglones 6, 7 con los renglones 8 con 1, 2 y 3, Tabla 1). Sin embargo, sólo se obtuvieron resultados reproducibles al utilizar CHAPS y urea como agentes solubilizadores (comparar los Exp 1 y 2 en los renglones 4 y 7 Tabla 1). Dado que ni la mejor combinación de agentes solubilizantes logró solubilizar toda la proteína microsomal, surge la duda de si la proteína solubilizada representa el total de las proteína microsomales. Para resolver esta duda se comparó el patrón electroforético de proteínas tanto de la proteína solubilizada como la presente en la pastilla (Figura 5). Las proteínas solubilizadas fueron similares a las que permanecen en la fracción insoluble.

Tabla 1. Efectividad de diversos agentes solubilizantes de proteína en la extracción de proteínas membranales

Agentes solubilizadores			% del total proteína solubilizada	
CHAPS	Tritón X-100	urea	Exp. 1	Exp. 2
2 %	-	-	50.4	86.2
-	2 %	-	48.1	47.4
2 %	2 %	-	59.8	59.9
2 %	-	4 M	67.6	68.3
-	2 %	4 M	83.1	68.3
2 %	2 %	4 M	68.4	82.0
4 %	-	8 M	70.4	82.6

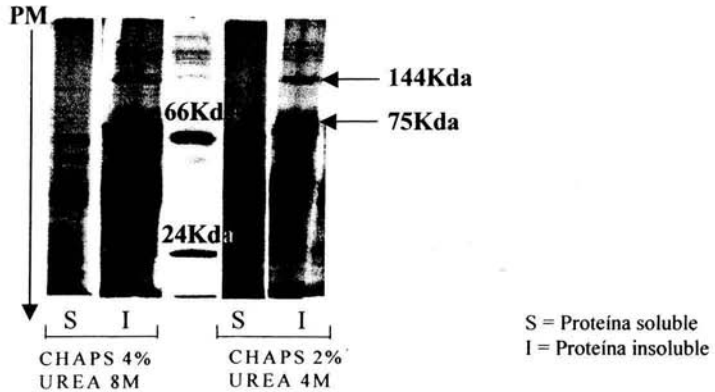


Figura 5. Reparto de la proteína microsomal en fracción soluble y fracción insoluble, después de la extracción con CHAPS y Urea. Muestra: 15 µg de proteínas membranales de capa de aleurona de tejido recién aislado en semilla envejecida.

A excepción de 2 bandas que se logran observar notablemente en la fracción insoluble cuando se utiliza CHAPS 2% y Urea 4M, esto quiere decir que pueden existir proteínas de alto peso molecular que no se están extrayendo.

Sabemos que los detergentes ayudan al rompimiento de las interacciones entre lípidos y proteínas; sin embargo, los detergentes con centros aromáticos como es el caso del Tritón X-100, no remueve lípidos eficientemente, pero son más eficientes rompiendo agregados proteicos. Por el contrario, detergentes que quitan lípidos eficientemente son los que tienen cadenas lineales, sin embargo no rompen agregados (Santoni, *et al.*, 2000). Esto puede explicar el hecho de que la solubilización de las proteínas hidrofóbicas fuese un poco menor con Tritón X-100 que con CHAPS. En los últimos años se ha demostrado que los detergentes no iónicos como el Tritón X-100 son útiles en la separación de proteínas membranales; sin embargo ahora el uso de detergentes zwitteriónicos como el CHAPS han

sido más eficientes, debido a que evitan la formación de agregados de proteínas, lo que hace que haya menor número de interacciones hidrofóbicas y permitiendo así su solubilización (Molloy, 2000).

Hay algunos compuestos que ayudan a mantener la estabilidad de una proteína; sin embargo a concentraciones altas se pueden utilizar como desnaturalizantes tal es el caso de la urea, que es una molécula que ayuda a aumentar la solubilidad de las sustancias no polares en el agua induciendo su desnaturalización. Su eficacia como desnaturalizante radica en su capacidad para romper las interacciones hidrofóbicas (Voet,1992). Así la urea solubiliza y ayuda a desdoblar más a las proteínas, lo que provoca que haya mayor interacción de las proteínas con el detergente y por lo tanto una mejor solubilización. Esto explica que cuando se utilizó a la urea en la metodología para la extracción y solubilización de proteínas se observan aumentos en el porcentaje de proteína solubilizada en todos los casos.

Los fosfolípidos al igual que las proteínas membranales se solubilizan en detergentes y urea. Sin embargo, los fosfolípidos interfieren en la separación de las proteínas por isoelectroenfoco por lo que es necesario eliminarlos del sistema. Esto se logra adicionando ácido tricloacético (TCA) al medio, una vez que la proteína microsomal ha sido solubilizada. En presencia de TCA la proteína se insolubiliza mientras que los fosfolípidos son solubles en este medio. Por tanto la proteína se recupera en la pastilla después de centrifugar y se redisuelve en CHAPS y urea.

Los tratamientos más eficientes para solubilizar proteína microsomal fueron: 2 % CHAPS y 4 M de urea; y 4 % CHAPS y 8 M urea, por lo que fueron tratadas con TCA para determinar cual era el más adecuado para una buena recuperación de proteína microsomal libre de fosfolípidos. En la Tabla 2 se observa que la combinación de CHAPS al 2% y

urea 4 M constituyen el mejor disolvente para obtener proteína microsomal libre de fosfolípidos. Este mismo tratamiento fue también el óptimo para aleuronas aisladas de semillas de cosecha reciente. Aunque en este caso se recuperó un mayor porcentaje de la proteína microsomal.

Tabla 2. Efectividad de la precipitación con TCA 10% en acetona en presencia de diversos agentes solubilizantes de proteína.

Tratamiento	% de recuperación después de la precipitación	
	Semilla envejecida	Semilla fresca
CHAPS 2% Urea 4M	48.2	72.2
CHAPS 4% Urea 8M	15.34	19.4

La cantidad recuperable de proteínas en semillas de reciente cosecha fue mayor que en semillas envejecidas. Esto pudo deberse al hecho de que una porción de proteínas de las membranas de aleurona envejecida ya no precipitan con TCA, posiblemente porque su interacción con lípidos se hace más fuerte. En cambio en una semilla fresca esta interacción es débil y puede ser destruida por el detergente.

Una vez establecida la condición óptima para la obtención de la proteína membranal solubilizada y libre de fosfolípidos se procedió a establecer las condiciones adecuadas para su separación por IEF/SDS-PAGE. En la figura 6 se muestra un diagrama general del procedimiento utilizado.

5.2 Optimización para la separación en dos dimensiones de proteínas de membrana de aleurona de cebada.

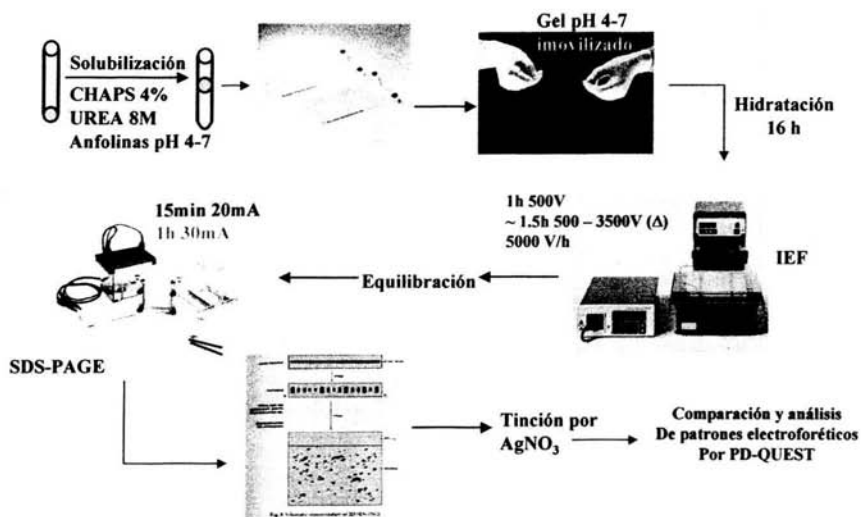


Figura 6. Diagrama del procedimiento para la separación de proteínas por IEF/SDS-PAGE

Los patrones electroforéticos que se utilizan para el análisis proteómico se obtienen separando las proteínas por punto isoiónico seguido de una separación por peso molecular. Para estas separaciones se utilizan geles de acrilamida con un gradiente de pH (IPG-strips, Amersham Biosciences) y geles de acrilamida con diferentes grados de entrecruzamiento respectivamente. En cada caso se deben optimizar las condiciones para que el gel donde se observe el patrón de proteínas presente poco fondo, proteínas distribuidas a lo largo y ancho del gel y cada mancha, representado una proteína, sea esférica.

Para lograr lo anterior las proteínas microsomales se separaron por isoelectroenfoque en dos gradientes de pH , uno de 3 a 10 y otro de 4 a 7. La separación por peso molecular se realizó a dos concentraciones de acrilamida 12% y 10% y se utilizaron dos protocolos de tinción por AgNO_3 , para visualizar las proteínas. En el primero se utilizó un complejo de AgNO_3 con NH_4OH y el revelado se realizó con citrato de sodio y el segundo procedimiento incluyó una sensibilización con ditionita , previa a la tinción con AgNO_3 y el revelado se llevó acabo con Na_2CO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

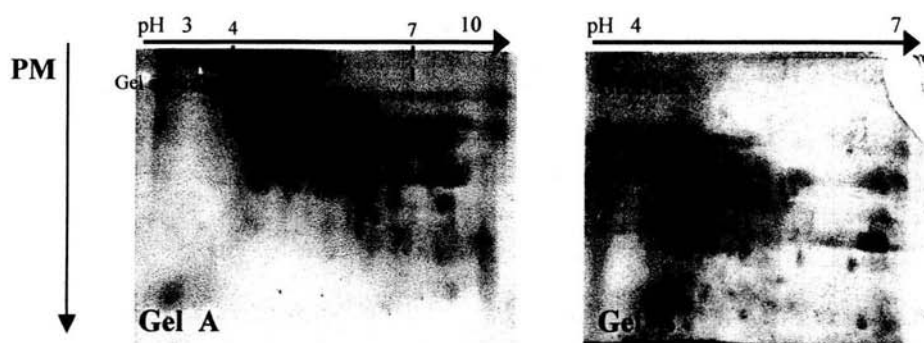


Figura 7. IEF/SDS-PAGE de proteína membranal solubilizada. A, gel 12.5% acrilamida y tinción con $\text{AgNO}_3/\text{NH}_4\text{OH}$. B, gel 10% de acrilamida y tinción con sensibilización con ditionita. Muestra: proteínas membranales de capa de aleurona de tejido recién aislado de semilla envejecida.

El gel A y B de la figura 7 muestran los resultados de tales experimentos. En el gel 7 A se observa que cuando en el isoelectroenfoque se utiliza una tira con gradiente de pH de 3 a 10, y las proteínas enfocadas se separan en un gel al 12.5% de acrilamida y se utiliza el protocolo de tinción más sencillo, las proteínas se localizan en una región discreta del gel, que comprende desde pH 4 a 7, una situación similar ocurrió cuando se utilizó una concentración de 12.5% de acrilamida. En este caso se observó que en la migración de

proteínas por peso molecular, hubo muy poca separación en la región de mayor peso molecular, esto es, en la zona superior del gel. Respecto a la tinción, el fondo resultó muy intenso con el método en que se utilizó AgNO_3 y NH_4OH , revelando con citrato de sodio. Por lo anterior se decidió utilizar un gradiente de pH de 4 a 7 para separar las proteínas por pI, un gel al 10% para separarlas por peso molecular y sensibilizar con ditionita antes de la tinción con plata y revelar con Na_2CO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Cuando se cambiaron todas las condiciones antes descritas (gel B figura 7), las proteínas se distribuyeron en todo el gel y el fondo fue más claro.

Por lo que los siguientes geles se corrieron en gradiente de 4 a 7 para el isoelectroenfoque, gel de acrilamida al 10 % y tinción por plata con previo tratamiento con ditionita.

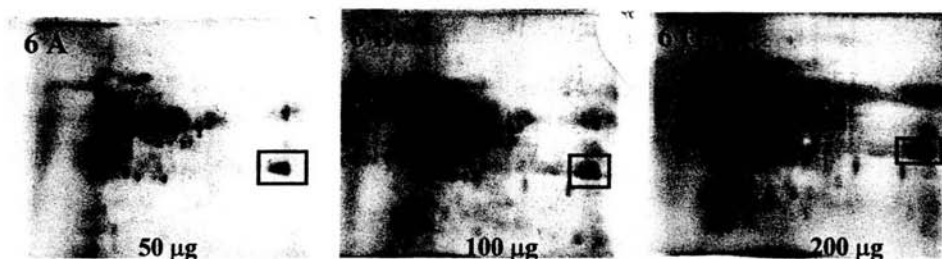


Figura 8. Efecto de la cantidad de proteína cargada en la resolución de manchas de proteína en el IEF/SDS-PAGE. Muestra: proteínas membranales de capa de aleurona de tejido recién aislado de semilla envejecida.

También se observó que en los primeros geles realizados presentaban un alargamiento vertical y se veían superpuestas las manchas de proteína, lo que sugería que había un problema con el enfoque de las proteínas, o bien, la presencia de algún contaminante en los

amortiguadores del SDS-PAGE (Fig. 8C). Sin embargo, al correr muestras con menor cantidad de proteína, se observó que el alargamiento se debía a un exceso en la cantidad de proteína cargada. En la figura 8 se muestra un ejemplo de esto. En el recuadro de la figura 8 B, se observa una mancha alargada verticalmente; no obstante, al correr la misma muestra en menor cantidad (8 A) se puede ver que en realidad son dos manchas de proteína, que ahora se definen mejor. Por ello, en los subsecuentes experimentos se utilizaron 50 μ g de proteína.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la separación de proteínas por IEF/SDS-PAGE, se procedió a elaborar los patrones electroforéticos de proteínas membranales de aleuronas incubadas en ausencia y en presencia de AG₃.

En la figura 9 A se muestra la imagen digitalizada de un gel original en el que se separaron las proteínas membranales de aleuronas aisladas de semillas envejecidas. Utilizando las imágenes digitalizadas de tres repeticiones independientes corridas por duplicado cada una y el programa PD QUEST (su utilización se narra en metodología bioinformática) se generó un gel estándar o master para cada tratamiento (Figura 9B), donde el fondo ha sido filtrado de forma tal que se aprecian mejor las manchas de proteínas.

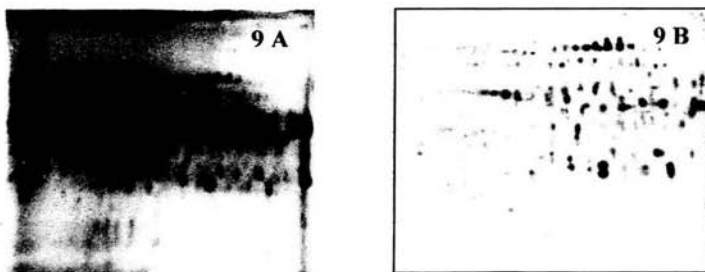


Figura 9A. Separación por IEF/SDS-PAGE de proteínas membranales de capa de aleurona de tejido recién aislado de semilla envejecida, y Figura 9B el estándar generado por el programa.

En un principio lo que se hizo fue verificar si existían diferencias en los mapas proteicos de membranas aisladas de aleurona de cebada de las cosechas 1998 y 1974 por cualquiera de las manipulaciones esto es, por la incubación, por la inducción con AG_3 y por el envejecimiento. En la Figura 10 se muestran los geles plantilla o mapas proteicos para cada uno de los tratamientos. El número de proteínas en cada patrón electroforético fue muy grande (Tabla 3) debido a que el programa PD-QUEST detecta como proteína todas las manchas independientemente de su intensidad. Al revisar manualmente la reproducibilidad de algunas de las proteínas (en cuántos de los seis geles de un mismo tratamiento, la proteína estaba presente) nos dimos cuenta que sólo las manchas con intensidad mayor a 20,000 unidades arbitrarias (UAI) se detectaban en las seis replicas. Esto fue interpretado como que, para considerar reproducible un mapa proteico solo debíamos considerar proteínas cuya intensidad fuese igual o mayor de este límite. También establecimos que para que existiera un cambio cuantitativo inducido por un tratamiento sólo era confiable, si el cambio era igual o mayor a 10,000 UAI.

Tabla 3. Número de manchas detectadas en los mapas proteicos, plantilla de semillas frescas y envejecidas con diferentes tratamientos

Tratamiento	No. total de proteínas
<i>Recien aislada</i>	
Semilla fresca	259
Semilla envejecida	214
<i>Incubación</i>	
Semilla fresca	219
Semilla envejecida	186
<i>Inducción con AG_3</i>	
Semilla fresca	185
Semilla envejecida	184

5.3 Mapas proteicos, plantilla de semillas frescas y envejecidas.

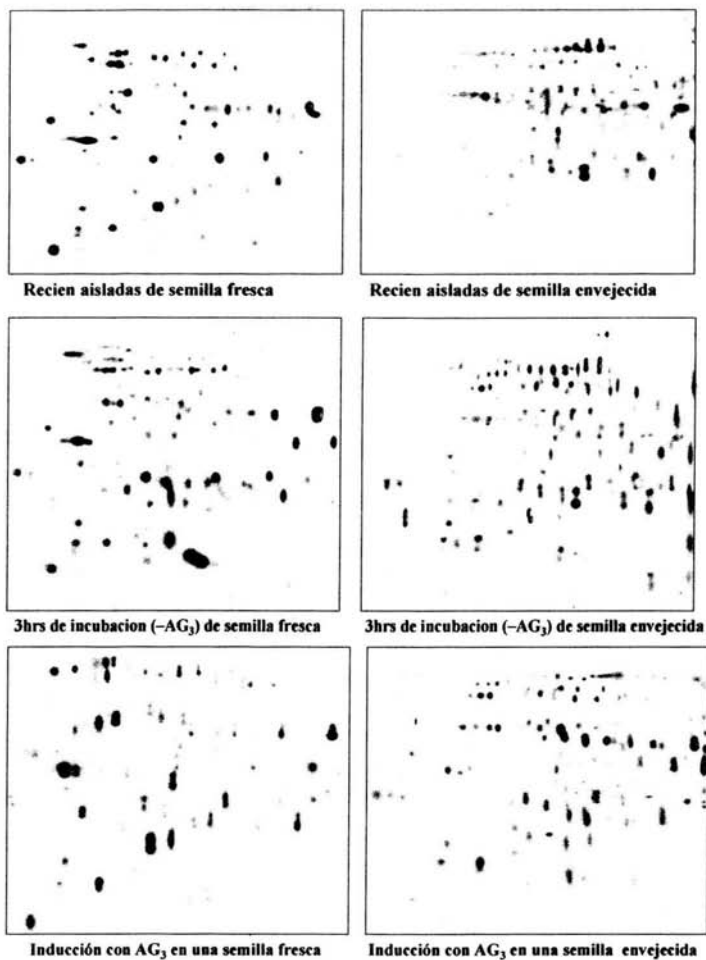


Figura 10. Proteomas de la fracción microsomal de aleurona de cebada en semilla frescas y envejecidas

Utilizando los criterios anteriores, el número de proteínas presentes en el mapa de cada tratamiento fue evaluado y el porcentaje de similitud fue calculado, como el porcentaje que se modificó respecto del total de las proteínas que permanecieron sin cambio en los diferentes tratamientos. En las tablas Tabla 4 y 5 se observan estos resultados. En semilla fresca se detectaron un número muy importante de cambios (Tabla 4); mientras que en semilla envejecida bajo estos mismos criterios no se observaron cambios salvo por dos proteínas en el tratamiento con AG₃ y cuatro que ya no se detectaron por efecto de la incubación.

Tabla 4. Proteínas que sufren cambios por efecto de los diversos tratamientos

Semilla fresca	Recién aislada	Incubación	Inducción con AG₃
No. de proteínas	39 iniciales	19 se desvanecen 14 se mantienen 6 presentan cambios en intensidad 26 nueva detección	8 no cambian, esto es, se mantienen desde el inicio 6 se desvanecen 4 se desvanecen 2 se mantienen 5 no cambian 4 cambian de intensidad 17 se desvanecen 13 nueva detección
% de similitud		35.9 (RA vs Incubación)	33.3 (Incubación vs Inducción con AG ₃)

Tabla 5. Similitud en los proteomas iniciales de la aleurona de cebada envejecida y fresca.

Tratamiento	No. total de proteínas	% de similitud
Recién aislada		
Semilla fresca	39	58.9
Semilla envejecida	22	

5.4 Proteínas membranales de capa de aleurona de cebada que presentan cambios cualitativos por los diversos tratamientos en una semilla fresca.

El número total de proteínas en los mapas de los diferentes tratamientos varió de 39 iniciales a sólo 8 que se mantuvieron constantes independientemente del tratamiento esto quiere decir que más del 79% de la composición proteínica membranal se modificó por los tratamientos utilizados en este trabajo. Como se indica más adelante estos cambios fueron específicos para cada tipo de tratamiento. Las aleuronas de cada uno de los lotes, control y envejecido, se sometieron a dos tratamientos: incubación e inducción con AG₃. Por claridad en lo sucesivo llamaremos membranas no inducidas o sin tratamiento a las membranas provenientes de aleuronas incubadas sin AG₃ y membranas inducidas o tratadas con AG₃ a las aisladas de aleuronas inducidas con AG₃. Para evaluar el cambio que este fitorregulador realizaba en el mapa proteico, se compararon los mapas de proteínas membranales obtenidos de los tratamientos antes mencionados (Fig. 11). Veintisiete proteínas, ya no fueron detectadas en el mapa de proteínas de membranas inducidas (Tabla 6), al mismo tiempo, trece nuevas proteínas fueron detectadas (Tabla 7).

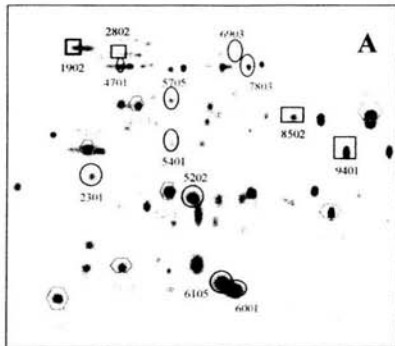
Tabla 6. Proteínas que por efecto del AG₃ dejan de detectarse en las membranas de aleuronas

No. de mancha	PM	pI	No. de mancha	PM	pI
6001	13.1	5.9	1501	38.5	4.6
5002	13.2	5.5	7504	43.8	6.2
6105	13.7	5.8	8505	45.3	6.6
2103	15.3	4.9	5705	48.9	5.5
2104	17.9	4.9	3802	61.4	5.1
6201	21.1	5.8	7803	61.5	6
7201	22.4	5.9	4701	61.6	5.2
5202	24.9	5.6	4803	61.8	5.3
7301	26.2	6.1	5805	62.3	5.6
201	26.8	4.4	7804	62.6	6.1
2301	28.8	4.9	2901	69.9	4.9
3401	34.4	5	6903	67.2	5.9
1304	34.8	4.8	6901	67.5	5.8
5401	36.4	5.5			

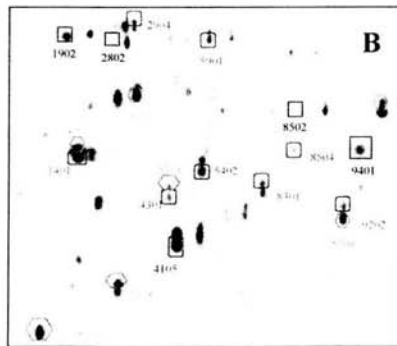
De las no detectadas ante la inducción, cuatro (2901, 4701, 6001, 8505) aumentaron su abundancia durante la incubación. Podría suponerse que se tratan de proteínas de ajuste durante el período de incubación, pero que tal vez también son importantes para la inducción con AG₃ porque finalmente ya no se detectan. Sin embargo también de este mismo grupo hay seis proteínas (201, 1304, 1501, 2104, 3802, 7504) que no presentan cambios durante la etapa de incubación pero dejan de detectarse por el AG₃ lo cual puede significar que sean importantes en la respuesta o para la preparación de la acción del fitorregulador.

Tabla 7. Nuevas proteínas detectadas en el mapa proteico de membranas aisladas de aleuronas tratadas con AG₃

No. de mancha	PM	pI	No. de mancha	PM	pI
4105	18.9	5.4	8504	30.7	6.3
9202	20.5	6.7	3604	51.1	5.3
4301	21.7	5.6	1902	67.2	5.1
8301	24.3	6.1	2804	67.7	5.2
8201	24.6	6.3	5901	72.9	5.8
5402	26.4	5.8	2904	78.4	5.4
1401	28.8	5			



Aleuronas de semilla fresca, 3hrs de incubación (-AG₃)



Aleuronas de semilla fresca, inducción con AG₃

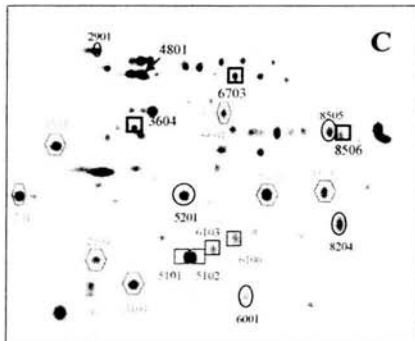
A vs B: ejemplos de proteínas que cambian por efecto del AG₃.

En rojo disminuyen de intensidad por AG₃

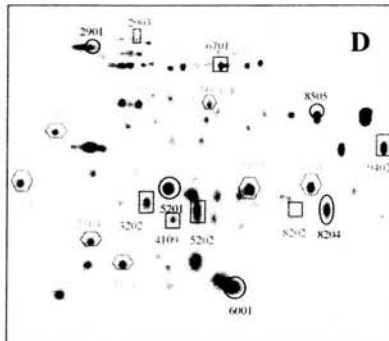
En verde se desvanecen por efecto del AG₃

En azul se inducen por efecto del AG₃

En naranja las proteínas que no se vieron modificadas por causa del AG₃



Aleuronas recién aisladas de semilla fresca



Aleuronas de semilla fresca, 3hrs de incubación (-AG₃)

C vs D: ejemplos de proteínas que cambian por efecto de la incubación.

En rojo aumentan de intensidad por la incubación

En verde se desvanecen por efecto de la incubación

En azul se inducen por efecto de la incubación

En naranja las proteínas que no se vieron modificadas por causa de la incubación

Figura 11. Gels master o mapas proteicos para cada uno de los tratamientos y cambios presentados por las diferentes manipulaciones.

La incubación del tejido fresco recién aislado también produjo cambios en el mapa proteico de membranas (Tabla 8). Por efecto de este tratamiento, diecinueve proteínas presentes en el mapa proteico de membranas provenientes de tejido recién aislado ya no se detectaron en

el mapa proteico de aleuronas incubadas, al mismo tiempo durante la incubación se detectaron 26 nuevas proteínas (Tabla 9).

Es posible que estas proteínas que SE desvanecen por efecto de la incubación sean del tipo de las dehidrinas ya que se ha descrito que el estrés por falta de agua induce acumulación de un gran número de proteínas denominadas como dehidrinas; sin embargo su función exacta no es clara.

Se ha propuesto que forman parte de la osmoadaptación, ya que durante la desecación de la semilla hay una acumulación de estas proteínas (Chourey, *et al.*, 2003).

Tabla 8. Proteínas no detectadas en las membranas de aleuronas frescas incubadas

No. de mancha	PM	pI	No. de mancha	PM	pI
2001	16.1	4.9	8506	43	6.6
5102	19.7	5.6	7501	44	6
5101	19.8	5.5	7502	44	6.1
6103	20.3	5.7	3604	44.8	5.2
6106	21.2	5.9	6703	59.5	5.9
9301	27.1	6.8	4801	60.5	5.2
3303	32.1	5.2	5804	61.3	5.5
7401	37.5	6.1	3804	64.6	5.2
6402	38.2	5.8	4802	64.9	5.3
3502	43	5.2			

Se sabe que los niveles de dehidrinas se incrementan en respuesta a las bajas temperaturas, sequedad, estrés osmótico o por ácido absicico. En Arabidopsis, las dehidrinas han sido caracterizadas por tener pI de 4.6-6.4. A través de muchos estudios bioquímicos y fisiológicos se ha sugerido que las dehidrinas juegan un papel importante en la estabilización de la estructura en las proteínas, en la estructura de las membranas bajo condiciones adversas (estrés en el medio ambiente), a través de la interacción con la parte

alifática de la alfa hélice. El posible papel de las dehidrinas es estabilizar a las membranas bajo condiciones de estrés (Alsheikh, *et al.*, 2003).

En cambio, las proteínas que se detectan por efecto de la incubación pueden tratarse de proteínas de ajuste debido al nuevo ambiente en las que se encuentran la aleuronas. Recientes estudios indican que bajo un estrés hiperosmótico se inducen genes involucrados en la síntesis y el mantenimiento de paredes celulares y membranas, así como también genes de factores involucrados con la transducción de señales (Mikami & Murata, 2003).

Tabla 9. Proteínas que se inducen por efecto de la incubación en una semilla fresca.

No. de mancha	PM	pI	No. de mancha	PM	pI
5002	13.2	5.5	8502	43.5	6.3
6105	13.7	5.8	6602	43.6	5.8
2103	15.3	4.9	3603	47.4	5.1
6201	21.1	5.8	5705	48.9	5.5
8202	22.3	6.4	6803	61.4	5.8
7201	22.4	5.9	7803	61.5	6
6202	24.6	5.8	4803	61.8	5.3
5202	24.9	5.6	5805	62.3	5.6
7301	26.2	6.1	7804	62.6	6.1
2301	28.8	4.9	3803	67.2	5.1
9402	34.2	6.7	6903	67.2	5.9
3202	34.4	5	6701	67.5	5.8
4109	36.4	5.5	2903	70.1	4.8

5.5 Proteínas membranales de capa de aleurona de cebada, que presentan cambios cuantitativos por los diversos tratamientos en una semilla fresca.

También se detectó un grupo pequeño de proteínas que con los tratamientos sufrieron cambios cuantitativos. En el caso del tratamiento con AG₃, cuatro proteínas disminuyeron su intensidad en un 50% (Tabla 10), mientras que en el caso de la incubación, seis proteínas

incrementaron su intensidad (Tabla 11), de las cuales dos (5201, 8204) permanecieron sin cambio al tratarlas con AG₃ y las otras cuatro ya no se detectaron. Lo anterior sugiere que el metabolismo de membranas de aleurona aisladas fue muy dinámico.

Sorprendentemente, solo ocho proteínas se mantuvieron sin modificación en todos los tratamientos (Tabla 12).

Tabla 10. Proteínas que disminuyen en un 50% su abundancia por efecto del AG₃, con respecto al control (aleuronas sin AG₃).

No. de mancha	PM	pI	No. de mancha	PM	pI
9401	34.2	6.7	3803	67.2	5.1
8502	43.5	6.3	1902	70.1	4.8

Tabla 11. Proteínas que presentan un aumento de un 50% en su abundancia durante el período de incubación.

No. de mancha	PM	pI	No. de mancha	PM	pI
8204	22.4	6.6	4701	59	5.2
5201	24.9	5.5	6001	17.1	6
2901	68.2	4.9	8505	44	6.6

Tabla 12. Proteínas presentes en todos los tratamientos.

No. de mancha	PM	pI	No. de mancha	PM	pI
1002	12.4	4.7	2302	34.7	4.9
3104	15.3	5.1	9401	44.6	6.9
7302	25.7	6.1	6601	46.8	5.7
8303	26.2	6.5	4603	46.9	5.2

5.6 Proteínas membranales de capa de aleurona de cebada, que presentan cambios por los diversos tratamientos en una semilla envejecida.

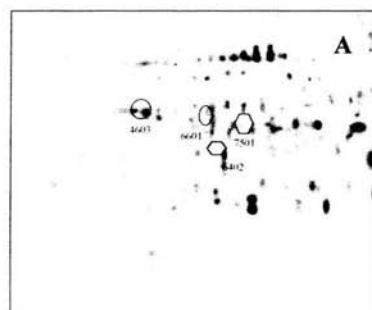
En las aleuronas envejecidas, el mapa de proteínas fue similar entre membranas inducidas o no (Figura 12 B vs C). En este caso sólo dos proteínas (8204, 9401) se desvanecen por

efecto del AG₃. Ambas fueron analizadas en semilla fresca y se encontró que la proteína 8204 no se modificaba por efecto del fitorregulador y la 9401 disminuía en un 50% de su abundancia por el mismo efecto (Tabla 13).

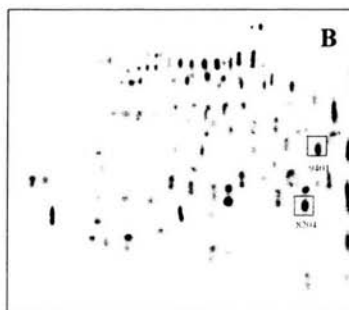
Tabla 13. Efecto del envejecimiento en el mapa proteico de la aleurona

Proteínas que se desvanecen por la inducción con AG ₃ y que se encuentran en una semilla envejecida		
No. De mancha	PM	pI
8204	22.1	6.7
9401	33.6	6.8
Proteínas que se desvanecen por la incubación en una semilla fresca y que se encuentran en una semilla envejecida		
No. De mancha	PM	pI
6402	27.4	5.8
7501	34.3	6.1
6601	37.5	5.7
4603	39.8	5.2

En cuanto a los mapas proteicos de membranas de aleuronas recién aisladas e incubadas de semillas envejecidas, sólo cuatro proteínas estuvieron presentes en membranas de aleuronas recién aisladas y pudieron ser detectadas en membranas incubadas. De nuevo, sólo dos de estas proteínas se desvanecieron en tejido fresco, la 6402 y la 7501 (Figura 12 A vs B).



Aleuronas recién aisladas de semilla envejecida



Aleuronas de semilla envejecida, 3hrs de Incubación (-AG₃)

Ejemplos de proteínas que cambian por efecto de la incubación en una semilla envejecida

En verde desaparecen por efecto de la incubación

En azul desaparecen por efecto de la inducción con AG₃

Figura 12. Geles master o mapas proteicos y cambios presentados por la incubación en una semilla envejecida.

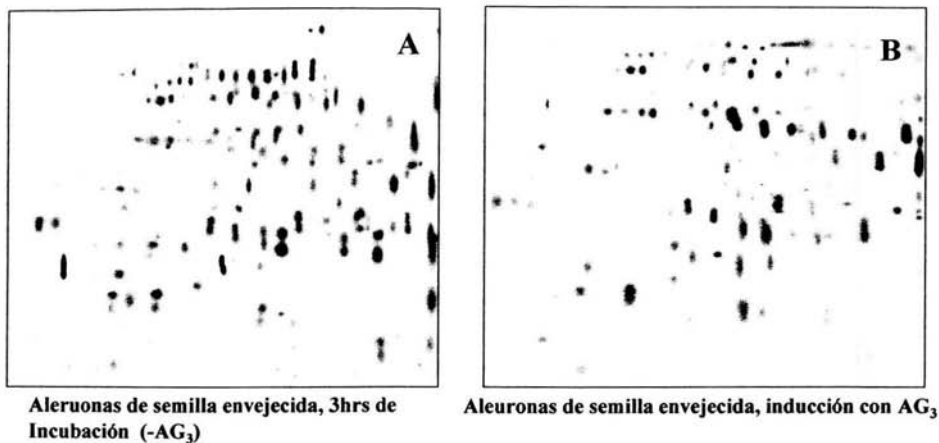


Figura 13. Geles master o mapas proteicos y cambios presentados por la inducción con AG₃ en una semilla envejecida.

5.7 Comparación de los proteomas iniciales de las proteínas membranales de capa de aleurona de cebada de una semilla fresca y una semilla envejecida.

Debido a que en el mapa proteico de membranas aisladas de aleurona envejecida los tratamientos no produjeron los mismos cambios que cuando se utilizó tejido fresco, lo que se hizo fue comparar los patrones de proteínas recién aisladas en ambas semillas y observar las diferencias (Tabla 14 y Figura 14).

Tabla 14. *Proteínas que se afectan por causa del envejecimiento.*

No. De mancha	Intensidad tejido fresco	Intensidad en tejido envejecido	PM	pI	No. De mancha	Intensidad en tejido fresco	Intensidad en tejido envejecido	PM	pI
9002	-----	20778	15	6.9	3502	21448	-----	43	5.2
1002	86998	-----	16	4.6	7504	42459	26978	43.8	6.2
2001	20053	-----	16.1	4.9	8501	-----	21145	43.8	6.3
5804	24855	-----	17.1	6	7501	25341	48040	44	6
6001	24972	-----	17.1	6	7502	28274	-----	44	6.1
3104	44704	-----	17.8	5.2	8505	30557	36703	44	6.6
2104	23407	-----	19.6	4.9	8502	-----	23050	44.1	6.4
5102	34910	-----	19.7	5.6	9401	70365	-----	44.5	6.9
5101	58910	-----	19.8	5.5	6602	-----	31036	44.6	5.9
6103	24206	-----	20.3	5.7	3604	22630	-----	44.8	5.2
6101	20229	-----	21.2	5.9	6601	20906	22789	48.6	5.8
6001	-----	37779	21.2	6.1	4603	51897	37009	49.2	5.3
7202	-----	57878	22	6.1	3603	-----	26372	49.4	5.1
8204	45417	-----	22.4	6.6	6603	-----	29763	49.9	6
201	49416	-----	24.9	4.3	7601	-----	21491	50.5	6.1
5201	40882	-----	24.9	5.5	6701	-----	27586	52	5.7
7302	57494	-----	25.2	6.1	1702	26454	-----	53.3	4.7
8303	37301	-----	25.7	6.5	4701	23853	-----	59	5.2
9301	32653	-----	27.1	6.8	6703	20409	-----	59.5	5.9
2302	109357	-----	31.1	4.9	3802	40545	-----	60.1	5.1
1304	25291	-----	31.8	4.8	4801	30707	-----	60.5	5.2
3303	25898	-----	32.1	5.2	6802	-----	24131	64.2	5.8
5301	-----	24710	33.2	5.7	3804	39982	-----	64.6	5.2
4402	-----	22539	35.3	5.6	6805	-----	37396	64.7	6.2
7401	25110	-----	37.5	6.1	4802	23012	-----	64.9	5.3
6402	29200	21213	38.2	5.8	7803	-----	25908	65.3	6.1
1501	46593	-----	39.4	4.6	6902	-----	24868	67.5	6
9503	45704	59610	42.3	6.9	6804	-----	20618	67.9	6.2
8506	25661	-----	43	6.6	2901	29023	-----	68.2	4.9

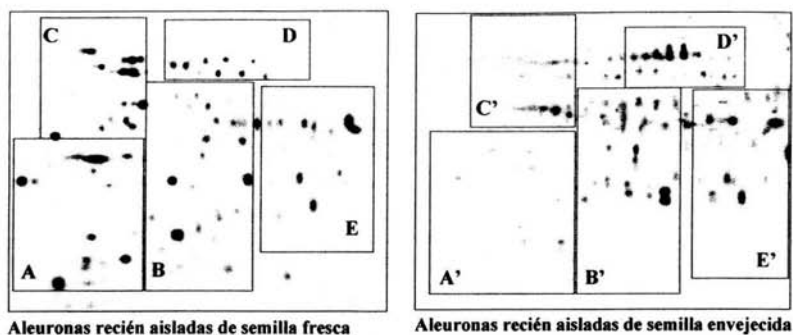


Figura 14. Separación por IEF/SDS-PAGE de proteínas membranales de capa de aleurona de tejido recién aislado extremo izquierdo en semilla fresca y extremo derecho envejecida.

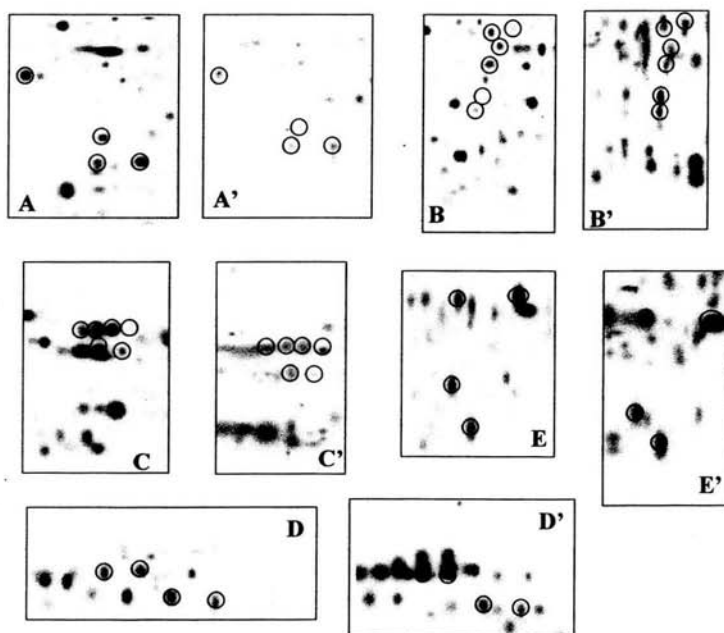


Figura 15. Zonas en las que se encuentran el mayor número de cambios en el mapa proteico, por causa del envejecimiento. A,B,C,D,E, zona del proteoma de aleurona fresca, A',B',C',D',E', zona del proteoma de aleurona envejecida

Para que resulte más fácil la comparación se tomaron algunas manchas de referencia las cuales están encerradas en un círculo.

En la zona A se observa que un gran número de manchas que se desvanecen y las que están presentes disminuyen en su intensidad, en la zona B se observan manchas que aparecen o que migran hacia el lado básico en una semilla envejecida, así como muchas se desvanecen por efecto del envejecimiento, en la zona C también se observa una baja de intensidad y una pérdida de proteínas al igual que en la zona E. Y por último en la zona D se observan proteínas que aumentan de intensidad por efecto del envejecimiento, así como la aparición de otras, que en el patrón de la semilla fresca no se encontraban.

La movilización de reservas durante la germinación involucra la síntesis en la aleurona de diversas hidrolasas que son secretadas al endospermo almidonoso; donde degradan las diversas macromoléculas de reserva (almidón, proteínas, ácidos nucleicos, polímeros de pared celular etc.), hasta moléculas de bajo peso molecular, las cuales son utilizadas por el embrión para su crecimiento (Ritchie, *et al.*, 2000).

El malteo de la cebada para la fabricación de cerveza consiste en proporcionarle a la semilla las condiciones para que se realice la función de la aleurona. Sólo que en este caso, la glucosa producida por la hidrólisis del almidón, por acción de la α -amilasa y las glucosidasas, es fermentada por las levaduras.

En ambos sistemas, la síntesis y secreción de las hidrolasas es regulada por la acción del ácido giberélico (Fincher, 1989). Este mensajero químico, es percibido en la membrana plasmática (Gilroy & Jones, 1994), y la transmisión de esta señal hacia el núcleo se realiza con la participación de un conjunto de proteínas presentes en la membrana plasmática (Lovegrove, 2000). Una vez que esta señal llega al núcleo se inicia la síntesis de los ARNm que codifican para las hidrolasas. Estos ARN mensajeros, por codificar para proteínas que se secretan, se traducen en retículo endoplásmico rugoso. Para su secreción, estas proteínas requieren de una maquinaria especializada que involucra la producción de vesículas membranales que contienen a las hidrolasas y el citoesqueleto que permite su tráfico desde el retículo endoplásmico rugoso, sitio donde son producidas, hasta la membrana plasmática, a la cual se fusionan permitiendo la salida de las hidrolasas hacia el endospermo almidonoso (Ritchie, *et al.*, 2000).

Para que este conjunto de respuestas moleculares se realicen con éxito, el AG₃ deberá orquestar la organización de proteínas membranales en diferentes conjuntos funcionales. La

modulación de esta arquitectura molecular es la base para la respuesta fisiológica de la aleurona y cualquier modificación en esta arquitectura se podría reflejar como una disminución de la magnitud de respuesta de la aleurona al AG₃.

Una de las metodologías utilizadas para un análisis total de proteínas ya sea a nivel de órgano, célula o de organelo es la espectometría de masas de las proteínas presentes en un mapa proteico o proteoma del sujeto en estudio. En el mapa proteico de las membranas de aleuronas recién aislada de semilla fresca (cosecha 1998) se distinguen tres subconjuntos de proteínas. Aquel que no cambió por los tratamientos (Tabla 12) denominado subproteoma estructural de la aleurona; un segundo conjunto de proteínas que dejó de detectarse, (Tabla 8), llamado subproteoma desvanecido donde se incluyeron a las proteínas cuya intensidad fue por abajo del límite de detección una vez que las aleuronas se incubaron en presencia (Tabla 6) o ausencia de AG₃ (Tabla 8).

En el mapa proteico de las membranas de aleuronas tratadas con AG₃ se distinguen el subproteoma estructural y el subproteoma de las nuevas proteínas, caracterizadas porque un subconjunto fue producto de la incubación (Tabla 9) y el otro por efecto del AG₃ (Tabla 7).

La mayoría de las proteínas estructurales así como las que formaban el subproteoma desvanecido por efecto de la incubación no pudieron ser detectadas en las membranas de la aleurona envejecida recién aislada (Tabla 14). Lo que sugiere que este conjunto de proteínas es indispensable para que la aleurona responda metabólicamente a los tratamientos de incubación y con AG₃. esta sugerencia se ve apoyada por el hecho de que en los mapas proteicos de membranas aisladas de las aleuronas envejecidas tratadas con AG₃, tampoco se detectó el subproteoma de las nuevas proteínas. Indicando que en la aleurona envejecida, el sistema no fue capaz de realizar los cambios que la membrana requería para inducir la respuesta a la incubación y al tratamiento con AG₃.

Resulta sorprendente el hecho de que el cambio más espectacular en los mapas proteicos de membranas frescas fuese el conjunto de proteínas que ya no se detectaron después de los tratamientos. Una posibilidad es que este conjunto de proteínas estuviese involucrado en proteger la funcionalidad de las membranas durante la fase de desecación de la formación de la semilla. Se ha reportado que durante la desecación de las semillas se sintetizan proteínas cuya función es la de preservar la estructura de las membranas, a través de formar puentes de hidrógeno con los componentes membranales, permitiendo que aún a contenidos de agua de 12% o menos, la viabilidad de la semilla se mantenga (Leopold,1986). Una vez que el metabolismo de la semilla se activa por efecto de la hidratación, estas proteínas ya no serían requeridas, pues la funcionalidad membranal se mantendría a través de los puentes de hidrógeno que formarían con el agua. Entonces las proteínas del subproteoma desvanecido podrían ser utilizadas como fuente de aminoácidos para la síntesis de otras proteínas. Estos cambios podrían ser producto de la degradación, de la remoción o de modificaciones de las proteínas membranales.

Por otro lado, el subproteoma de las nuevas proteínas puede ser el resultado de la biosíntesis, el reclutamiento o la modificación de proteínas ya existentes o combinaciones de estos mecanismos. Las nuevas proteínas detectadas por la incubación del tejido fresco parecerían más importantes para la funcionalidad de la membrana durante la incubación. Esta última propuesta se apoya en el hecho de que la incubación de la aleurona, en este trabajo, se realizó en amortiguador, mientras que, en condiciones fisiológicas, la aleurona está en contacto con el endospermo almidonoso. Las diferencias de presión que ejercen estos medios sobre la célula pueden influir en la turgencia celular. Por lo que una posibilidad es que las aleuronas incubadas en agua requieran de estas proteínas para mantener, en este medio, la turgencia y por lo tanto la funcionalidad. Por lo que si estas

proteínas no se sintetizarán cuando el tratamiento con AG₃ se realizara en medias semillas sería la prueba de que efectivamente la aleurona las requiere para ajustarse al nuevo medio externo.

Respecto al subconjunto de nuevas proteínas que se detectan por el tratamiento con AG₃, podrían ser las que formarán los nuevos complejos requeridos por la aleurona para coordinar todos los eventos membranales que conducen a la síntesis y secreción de las hidrolasas. Estas serían las proteínas que estuvieran involucradas de manera directa en la movilización de reservas.

6. CONCLUSIONES.

Se logró la extracción y solubilización de una fracción de proteínas representativa de las presentes en las membranas de capa de aleurona de cebada.

El proteoma membranal de la aleurona proveniente de semilla fresca (Cosecha 1998) se modificó por efecto de los tratamientos.

El proteoma membranal de la aleurona proveniente de semilla envejecida (cosecha 1974) fue diferente del proveniente de semilla fresca (cosecha 1998). Estas diferencias fueron cualitativas y cuantitativas.

La aleurona envejecida no fue capaz de promover la síntesis, reclutamiento o modificación de las proteínas del nuevo subproteoma detectado por efecto de los tratamientos.

7. PERSPECTIVAS

- Para identificar las proteínas membranales requeridas para la movilización de reservas se deberá mandar secuenciar las proteínas membranales de capa de aleurona de cebada que fueron de nueva detección durante la inducción con AG₃. Esta secuencia se utilizará para ser comparada en bancos de datos. Una vez localizada su posible identidad y función; se analizará su probable participación en los eventos membranales que conducen a la síntesis y secreción de las hidrolasas.
- Para identificar a las proteínas importantes para la movilización de reservas que se alteran por efecto del envejecimiento se deberá secuenciar las diecisiete proteínas membranales de capa de aleurona de cebada que se perdieron en la aleurona de semilla envejecida, su posible identidad será asignada a través de la búsqueda en banco de datos.
- Identificar en que etapa del almacenamiento inadecuado se pierde la funcionalidad de la aleurona.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aastrup, S., Riis, P. Y Hanson, J.R. (1989) Procedimientos del Congreso Europeo de la Convención de la cervecería, Zurich, 171-178
2. Aquila, A., Corona, M.G., Di Turi, M. (1998) Heat-shock proteins in monitoring aging and heat-induced tolerance in germinating wheat and barley embryos. *Seed Science Research* 8; 91-98.
3. Alsheikh, M., Heyen, B., Randall, S. (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 278; 40882-40889.
4. Bahaji, A., Aniento, F., Cornejo, M.J. (2003) Uptake of an endocytic marker by rice cells: variations related to osmotic and saline stress. *Plant cell Physiol* 44; 1100-1111.
5. Bernal-Lugo, I., Parra, C., Carballo, A. Hamabata, A. (1994) Enzymic systems altered by accelerated aging of seeds. *Plant Physiol* 13; 287-294.
6. Bernal-Lugo, I., Rodriguez, M., Gavilanez-Ruiz, M. Hamabata, A. (1999) Reduced aleurone α -amylase production in aged wheat seeds is accompanied by lower levels of high-pl α -amylase transcripts and reduced response to gibberellic acid. *Journal of Experimental Botany* 50; 311-317.

7. Bethke, P., Schuurink, R. Jones, R.L. (1997) Hormonal signaling in cereal aleurone. *Journal of Experimental Botany* 48; 1337-1356.
8. Campos, P., Quartiin, V., Ramalho, J., Nunes M.A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of coffee sp. *Plants. Journal of Plant Physiology* 160; 283-292.
9. Chandler, P., Jacobsen, J.V. (1991) Primer extension studies on α -amylase mRNAs in barley aleurone. II. Hormonal regulation of expression. *Plant Molecular Biology* 16; 637-645.
10. Chourey, K., Ramani, S., Apte, S.K. (2003) Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa*) cultivar Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. *Journal of Plant Physiology* 160; 1165-1174.
11. Devlin, M. (1982) *Fisiología vegetal*, Ediciones Omega, España, 419-425.
12. Evans, D., Wallace, W., Lance, R.C.M., Macleod, L.C. (1997) Measurement of beta-amylase in malting barley (*Hordeum vulgare* L.). II. The effect of germination and kilning. *Journal of Cereal Science* 26; 241-250.
13. Fincher, G.B. (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology* 40, 305-346.

14. Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., Svensson, B. (2002) Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology* 129; 1308-1319.
15. Gallardo, K., Job, C., Groot, S., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., Job, D. (2002) Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiology* 129; 823-837.
16. Galleschi, L., Capocchi, A., Ghiringhelli, S., Saviozzi, F. (2002) Antioxidants, free radicals, storage proteins, and proteolytic activities in wheat (*Triticum durum*) seeds during accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50; 5450-5457.
17. Gilroy, S., Jones, R.L. (1992) Calmodulin stimulation of unidirectional calcium uptake by the endoplasmic reticulum of barley aleurone. *Planta* 190; 289-296.
18. Gilroy, S., Jones, R.L. (1992) Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89; 3591-3595.
19. Gilroy, S., Jones R.L. (1994) Perception of gibberellic and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiology* 104; 1185-1192.
20. Guy, P.A., Black, M. (1998) Germination-related proteins in wheat revealed by differences in seed vigour. *Seed Science Research* 8; 99-111.

21. Haleem, J. (2001) The role of separation in proteomics research. *Electrophoresis* 22; 3629-3638.
22. Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20; 660-663.
23. Hooley, R., Beale, M.H., Smith, S.J. (1991) Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta* 183; 274-280.
24. Jacobsen, J.V., Chandler, P.M. (1988) Gibberellin and abscisic acid in germinating cereals. In *plant Hormones and their role in plant growth development*. Kluwer Acad. Publishers, Ed. P.Davies, 164-193.
25. Jones B, (1997) Purification, identification, and partial characterization of a barley protein that inhibits green malt endoproteinases. *American Society of Brewing Chemists, Inc.* 55; 58-64.
26. Jones, R.L., Jacobsen, J.V. (1990) Regulation of the synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone. *International Review of cytology*. 126; 49-71
27. Jones, R.L., Jacobsen, J.V. (1982) The role of the endoplasmic reticulum in the synthesis and transport of amylase in barley aleurone layers. *Planta* 156; 421-432.
28. Jones, R.L., Carbonell, J. (1984) Regulation of the synthesis of barley aleurone α -amylase by gibberellic acid and calcium ions. *Plant Physiol* 76; 213-218.

29. Kraemer, G., Mundstock, E.C., Cavalli-Molina, S. (2001) Developmental expression of amylases during barley malting. *Journal of Cereal Science* 33; 279-288.
30. Kumar, B., Pandey, D.M., Goswami, C.L., Jain, S. (2001) Effect of growth regulators on photosynthesis, transpiration and related parameters in water stressed cotton. *Biology Plantarum* 44; 475-478.
31. Leopold, A.C. (1986) *Membranes, metabolism and dry organism*, Comstock Publishing Associates, España, 188-191.
32. Lovegrove, A., Hooley, R. (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Plant Science* 5; 102-110.
33. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.L. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
34. Mikami, K., Murata, N. (2003) Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. *Progress in Lipid Research* 42; 527-543.
35. Molloy, M., (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Analytical Biochemistry* 280; 1-10.

36. Richards, D., King, K.E., Ait-ali, T., Harberd, N. (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of Gibberellin signaling. *Annual. Review. Plant Physiology* 52; 67-88.
37. Ritchie, S., Swanson, S., Gilroy, S. (2002) From common signaling components to cell specific responses: insights from the cereal aleurone. *Physiologia Plantarum* 115; 342-351.
38. Ritchie, S., Swanson, S., Gilroy, S. (2000) Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Science Research* 10; 193-212.
39. Santoni, V., Molloy, M., Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* 21; 1054-1070.
40. Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F., Rabilloud, T. (2000) Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* 21; 3329-3344.
41. Schuurink, R., Sedee, N., Wang, M. (1992) Dormancy of the barley grain is correlated with gibberellic acid responsiveness of the isolated aleurone layer. *Plant Physiol* 100; 1834-1839.

42. Serna, S. (1996) Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales, AGT Editor, S.A. México, 34-42, 98, 307-315
43. Yusm, SM., Kuoyot. YH., Sheu. G., Sheu. YJ., Liu. LF. (1991) Metabolic derepression of α -amylase gene expression in suspension-cultured cell of rice. The Journal of Biological Chemistry 266; 21131-21137.
44. Voet, D., Voet, J. (1992) Bioquímica, Ediciones Omega, España, 294-335
45. Trufanov V. (2003) Aggregating ability of seed storage proteins from cereals differing in gluten quality. Applied Biochemistry and Microbiology 39; 418-421.

OTRAS FUENTES:

46. www.procampo.gob.mx
47. www.chapingo.mx/investigación/pronisea
48. www.funcionpublica.gob.mx/scagp
49. www.sagarpa.gob.mx
50. www.cddhcu.gob.nvoleon.html

ANEXO I. Información general sobre las proteínas que se modificaron por los diferentes tratamientos

#de mancha	RA 98' intensidad	-AG 98' intensidad	PM	pl	Presenta cambios en abundancia	+AG 98 intensidad	Presenta cambios en abundancia	PM	pl	En 74 intensidad	PM	pl
CONSTITUTIVAS												
1002	86998	50172	16	4.6	-	50196	-	12.4	4.7	-----		
2302	109357	91559	31.1	4.9	-	68988	-	34.7	4.9	-----		
3104	44704	37483	17.8	5.2	-	25232	-	15.3	5.1	-----		
4603	51897	41162	49.2	5.3	-	24735	-	46.9	5.2	37009	39.8	5.2
7302	57494	69882	25.2	6.1	-	42727	-	25.7	6.1	-----		
8303	37301	44055	25.7	6.5	-	34787	-	26.2	6.5	-----		
9401	70365	41961	44.5	6.9	-	42379	-	44.6	6.9	-----		
6601	20906	27993	48.6	5.8	-	39383	-	46.8	5.7	22789	37.5	5.7
No sufren cambios por la incubación pero Ya no se detectan por AG₃												
201	49416	37870	24.9	4.3	-	-----	-----	26.8	4.4	-----	---	---
1304	25291	22022	31.8	4.8	-	-----	-----	34.8	4.8	-----	---	---
1501	46593	24318	39.4	4.6	-	-----	-----	38.5	4.6	-----	---	---
2104	23407	32168	19.6	4.9	-	-----	-----	17.9	4.9	-----	---	---
3802	40545	31245	60.1	5.1	-	-----	-----	61.4	5.1	-----	---	---
7504	42459	41469	43.8	6.2	-	-----	-----	43.8	6.2	-----	---	---
Aumentan de intensidad por la incubación ya no se detectan por AG₃												
2901	29023	141552	68.2	4.9	+	-----	-----	69.9	4.9	-----	---	---
4701	23853	98779	59	5.2	+	-----	-----	61.6	5.2	-----	---	---
6001	24972	110558	17.1	6	+	-----	-----	13.1	5.9	-----	---	---
8505	30557	54339	44	6.6	+	-----	-----	45.3	6.6	-----	---	---
Aumentan de intensidad por la incubación pero no sufren cambios con AG₃												
5201	40882	84711	24.9	5.5	+	52623	-	25.9	5.4	-----	---	---
8204	45417	71602	22.4	6.6	+	40196	-	22.3	6.6	29919	22.1	6.7
Desaparecen por la incubación												
2001	20053	-----	16.1	4.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
3303	25898	-----	32.1	5.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
3502	21448	-----	43	5.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
3604	22630	-----	44.8	5.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
3804	39982	-----	64.6	5.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
4801	30707	-----	60.5	5.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
4802	23012	-----	64.9	5.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
5101	58910	-----	19.8	5.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
5102	34910	-----	19.7	5.6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
5804	24855	-----	61.3	5.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
6103	24206	-----	20.3	5.7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
6106	20229	-----	21.2	5.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
6402	29200	-----	38.2	5.8	-----	-----	-----	-----	-----	21213	27.4	5.8
6703	20409	-----	59.5	5.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
7401	25110	-----	37.5	6.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
7501	25341	-----	44	6	-----	-----	-----	-----	-----	48040	34.3	6.1
7502	28274	-----	44	6.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
8506	25661	-----	43	6.6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---
9301	32653	-----	27.1	6.8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---

RA 98'	#de mancha	-AG 98' intensidad	+AG 98 intensidad	Presenta cambios en abundancia	PM	pl	En 74 intensidad	PM	pl
Se inducen por la incubación pero no sufren cambios por AG ₃									
-----	3603	43227	59049	-	47.4	5.1	-----	-----	-----
-----	6202	36499	23492	-	24.6	5.8	-----	-----	-----
-----	6602	20063	20451	-	43.6	5.8	-----	-----	-----
-----	6803	32549	23675	-	61.4	5.8	-----	-----	-----
-----	8202	21554	25901	-	22.3	6.4	-----	-----	-----
Se inducen por la incubación y disminuyen de intensidad por el AG ₃									
-----	2903	71659	27700	+	70.1	4.8	-----	-----	-----
-----	3803	114346	32804	+	67.2	5.1	-----	-----	-----
-----	8502	44128	20034	+	43.5	6.3	-----	-----	-----
-----	9402	76784	35418	+	34.2	6.7	23383	33.6	6.8
Se inducen por la incubación y ya no se detectan por efecto del AG ₃									
-----	2103	29971	-----	-----	15.3	4.9	-----	-----	-----
-----	2301	23128	-----	-----	28.8	4.9	-----	-----	-----
-----	3202	41065	-----	-----	34.4	5	-----	-----	-----
-----	4803	42446	-----	-----	61.8	5.3	-----	-----	-----
-----	5002	26056	-----	-----	13.2	5.5	-----	-----	-----
-----	5202	62338	-----	-----	24.9	5.6	-----	-----	-----
-----	4109	22579	-----	-----	36.4	5.5	-----	-----	-----
-----	5705	28416	-----	-----	48.9	5.5	-----	-----	-----
-----	5805	26752	-----	-----	62.3	5.6	-----	-----	-----
-----	6105	108872	-----	-----	13.7	5.8	-----	-----	-----
-----	6201	30351	-----	-----	21.1	5.8	-----	-----	-----
-----	6701	33438	-----	-----	67.5	5.8	-----	-----	-----
-----	6903	20131	-----	-----	67.2	5.9	-----	-----	-----
-----	7201	46400	-----	-----	22.4	5.9	-----	-----	-----
-----	7301	31320	-----	-----	26.2	6.1	-----	-----	-----
-----	7803	49867	-----	-----	61.5	6	-----	-----	-----
-----	7804	27331	-----	-----	62.6	6.1	-----	-----	-----
Se inducen por AG ₃									
-----	1902	-----	20497	-----	67.2	5.1	-----	-----	-----
-----	2804	-----	38643	-----	67.7	5.2	-----	-----	-----
-----	3604	-----	41583	-----	51.1	5.3	-----	-----	-----
-----	4105	-----	40372	-----	18.9	5.4	-----	-----	-----
-----	8201	-----	34063	-----	24.6	6.3	-----	-----	-----
-----	1401	-----	58603	-----	28.8	5	-----	-----	-----
-----	2904	-----	55821	-----	78.4	5.4	-----	-----	-----
-----	4301	-----	52623	-----	21.7	5.6	-----	-----	-----
-----	5402	-----	25375	-----	26.4	5.8	-----	-----	-----
-----	5901	-----	31813	-----	72.9	5.8	-----	-----	-----
-----	8301	-----	40382	-----	24.3	6.1	-----	-----	-----
-----	8504	-----	25830	-----	30.7	6.3	-----	-----	-----
-----	9202	-----	30857	-----	20.5	6.7	-----	-----	-----

Abreviaturas	Significado
PM	Peso molecular
pI	Punto isoelectrico
intensidad	En unidades arbitrarias
-	No presenta cambios en abundancia en un 50 %
+	Presenta cambios de abundancia en un 50 %
-----	No existe