

UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA

ESCUELA DE POST GRADO

MAESTRIA EN PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN AMBIENTAL



**APROXIMACIÓN INMUNO-PROTEÓMICA DE LECTINAS
PRESENTES EN *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), Y SU
BIOPROSPECCIÓN EN EL MECANISMO DE DEFENSA DE LAS
PLANTAS POR ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. AREQUIPA, 2016.**

Tesis presentada por la Bachiller:

MARIA DEL PILAR DURÁN MÁRQUEZ

Para optar del Grado Académico de:

**MAESTRO EN PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN
AMBIENTAL**

Asesor: Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.

AREQUIPA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar este objetivo, por los triunfos y los momentos difíciles los cuales acrecentaron mi fe y me enseñaron a valorar mi vida cada día más.

*A ti Madre porque eres mi ejemplo de vida, por tu apoyo en todo momento, por tus consejos, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad
¡Gracias por darme la vida!
¡Te quiero mucho!*

A ti Padre por tu nobleza, por darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ti por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A ti hermano mi compañerito y amigo que motiva en mi vida a crecer siempre, pero con humildad.

A ti Wilberth por tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por tu bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor persona, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti querido esposo, gracias por estar siempre a mi lado.

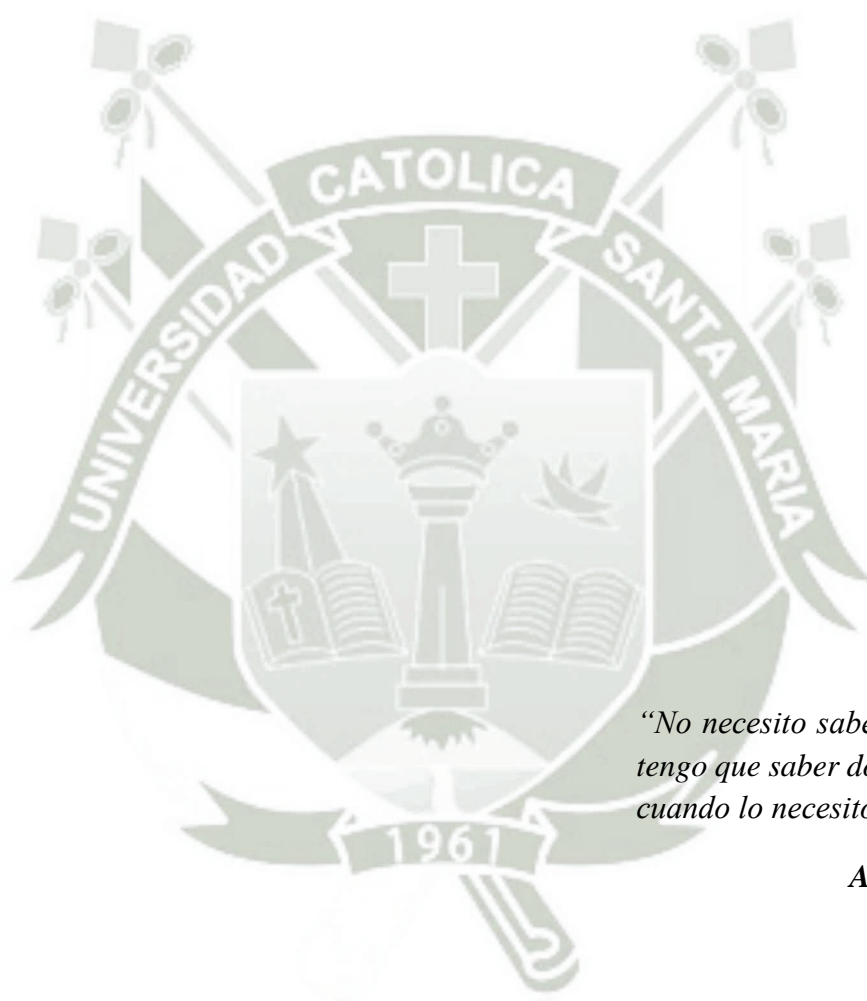
A ustedes hijos Giacomo y Micaela que son mi mayor bendición y el motivo por el cuál estoy realizando este trabajo y este objetivo en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y maestro de tesis Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. gracias por la orientación y apoyo que me brindó en este trayecto de mi vida, por permitirme conocer y aprender un mundo tan interesante como la Proteómica, por cada uno de sus consejos, por su aliento, su confianza y sobre todo porque en usted conocí la humildad y el buen corazón que los maestros tienen para con sus alumnos.

Encontré un gran amigo en el camino.

EPÍGRAFE



*“No necesito saberlo todo, solo
tengo que saber dónde buscarlo,
cuando lo necesito”*

Albert Einstein

INDICE GENERAL

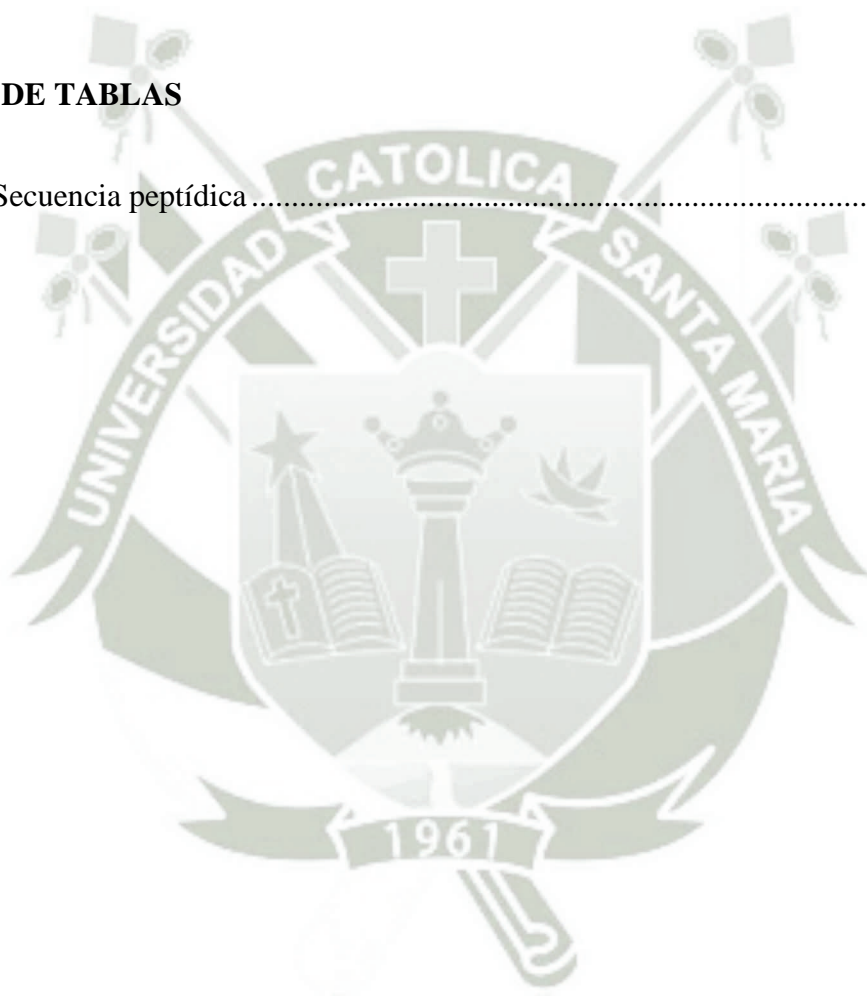
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO ÚNICO:.....	7
RESULTADOS	7
1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE 1D	8
2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE 2D	9
3. SECUENCIA DE PEPTIDOS PROCEDENTES DE SPOTS DE LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D) DE <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua)	11
4. ESTUDIO DE HOMOLOGÍA SECUENCIAL (ANALISIS BIOINFORMÁTICO), A PARTIR DE UN PÉPTIDO SECUENCIADO CORRESPONDIENTE A UN SPOT INMUNOLocalizado POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL SDS-PAGE (2D) A PARTIR DE <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua)	12
DISCUSION.....	14
CONCLUSIONES.....	19
SUGERENCIAS.....	20
PROPUESTA	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	25
ANEXO A: Proyecto de Tesis	26
ANEXO B: Constancia de uso de los Laboratorios UNICAMP – BRASIL.....	82
ANEXO 3: Fotografías	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: SDS-PAGE de extractos de proteínas de 4 muestras de <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua)	8
Figura 2: SDS-PAGE 12% BIDIMENSIONAL (2D) de <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua).	9
Figura 3: Inmuno-ensayo a partir de geles bidimensionales (2-DE) de <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua).	10
Figura 4: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos.....	13

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia peptídica	11
------------------------------------	----



RESUMEN

Innumerables procesos biológicos se dan en el interior de los sistemas biológicos, los cuales muchas veces son imperceptibles dada la complejidad de los mismos. Desde la purificación de proteínas hasta la edición de genes las plataformas OMICAS han contribuido significativamente. Así por ejemplo hoy se conoce que las plantas poseen un mecanismo intrínseco almacenado en su genoma, que es el responsable de la defensa de las mismas frente a una amenaza, desde una plaga hasta un proceso de contaminación; lo cual se traduce como un mecanismo de defensa. Nuestra riqueza en cultivares andinos evidencia este mecanismo en sus niveles de expresión dado fundamentalmente por la expresión de lectinas e inhibidores de serinoproteasas.

El presente trabajo de investigación, pretende identificar la presencia de lectinas en la expresión de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua). La presencia de una arcelina (lectina), fue identificada estructuralmente por electroforesis (1D). La electroforesis bidimensional reveló que la proteína posee una masa molecular aproximadamente de 33 kDa y un punto isoeléctrico de 5.5 lo que revela que se trata de una proteína con un ligero carácter ácido. Por otro lado, los estudios de electrotransferencia (Western blot), revelaron que se trataba de una proteína con una mayor densidad de expresión (mayor spot), así como los estudios de espectrometría de masas (MALDI-TOF), fue posible el secuenciamiento con un alto grado de fidelidad como fue evidenciada la secuencia de los 13 péptidos trípticos. El análisis bioinformático de la secuencia deducida, nos reveló que la proteína purificada se trata de una Arcelina, que forma parte de la familia de las lectinas vegetales, la cual mostró regiones altamente conservadas como lo muestra el estudio de homología secuencial.

Se logró caracterizar una arcelina (lectina) a partir de semillas de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), la cual constituye una herramienta molecular de vital importancia en la

especie por ser parte de la familia de proteínas presentes en las plantas y que forman parte del conjunto de moléculas que actúan en el mecanismo de defensa de las mismas, lo cual constituye desde el punto de vista biotecnológica un frente importante en la protección y conservación del medio ambiente al contribuir con la disminución del uso de los diferentes plaguicidas que se han convertido en un una amenaza creciente de contaminación ambiental.

PALABRAS CLAVES: Proteómica, espectrometría de masa, *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), lectina, arcelina y electroforesis bidimensional.



ABSTRACT

Innumerable biological processes occur within biological systems, which are often imperceptible given the complexity of the same. From protein purification to gene editing, OMIC platforms have contributed significantly. Thus, for example, it is known today that plants have an intrinsic mechanism stored in their genome, which is responsible for their defense against a threat, from a pest to a contamination process; Which translates as a defense mechanism. Our richness in Andean cultivars evidences this mechanism in its levels of expression given mainly by the expression of lectin and inhibitors of serinoproteases.

The present research work aims to identify the presence of lectins in the expression of *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua). The presence of an arcelin (lectin) was structurally identified by electrophoresis (1D). Two-dimensional electrophoresis revealed that the protein has a molecular mass of approximately 33 kDa and an isoelectric point of 5.5 which reveals that it is a protein with a slight acidic character. On the other hand, the Western blot studies revealed that it was a protein with a higher density of expression (greater spot), as well as the studies of mass spectrometry, it was possible the sequencing with a high degree of fidelity As evidenced by the sequence of the 13 tryptic peptides. Bioinformatic analysis of the deduced sequence revealed that the purified protein is an Arcelin, which is part of the family of vegetable lectins, which showed highly conserved regions as shown in the sequential homology study.

It was possible to characterize an arcelin (lectin) from seeds of *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), which constitutes a molecular tool of vital importance in the species because it is part of the family of proteins present in the plants and that are part of the whole Of molecules that act in the defense mechanism of the same, which constitutes from the biotechnological point of view an important front in the protection and conservation of the

environment by contributing with the decrease of the use of the different pesticides that have become a An increasing threat of environmental pollution.

KEY WORDS: Proteomics, mass spectrometry, *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), lectin, arcelin and two-dimensional electrophoresis.



INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más importantes para el hombre es la lucha contra plagas y enfermedades que afectan los cultivos agrícolas y forestales. El empleo de plaguicidas químicos ha permitido eliminar estos problemas de forma relativamente rápida y efectiva. Pero también presenta una serie de efectos desfavorables como: contaminación ambiental, afectación de la fauna beneficiosa, y el desarrollo de resistencia de los insectos a dichos compuestos.

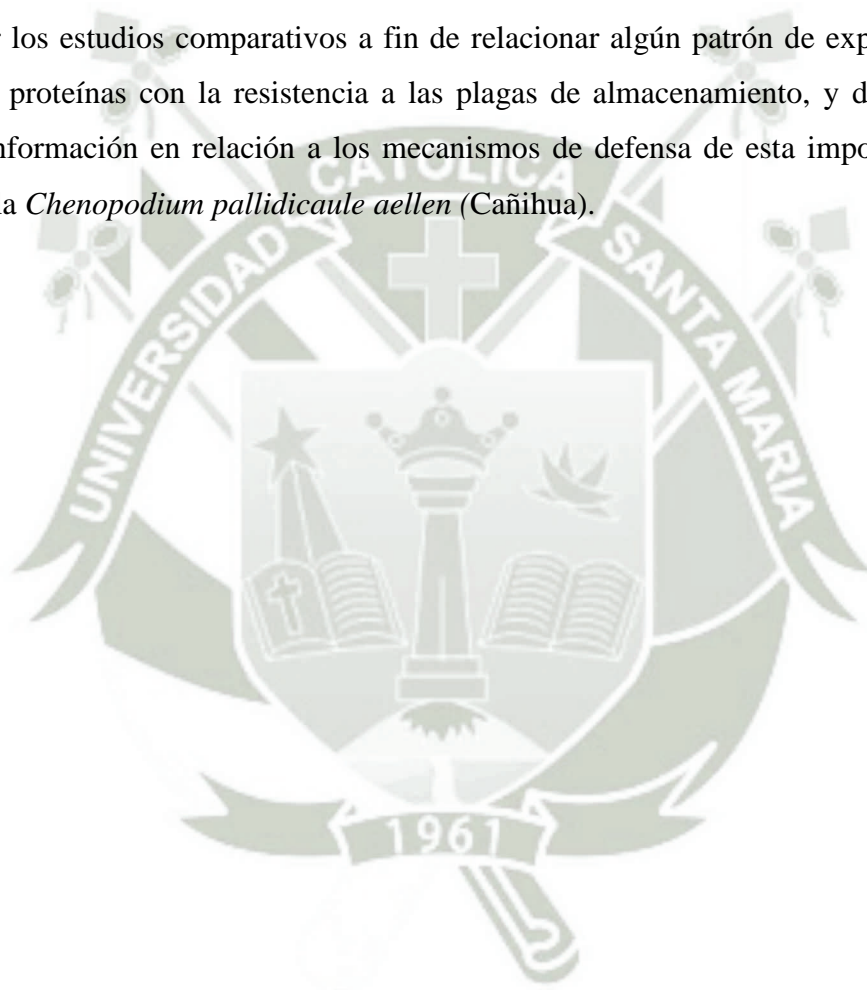
Ante esto es que varios autores han buscado una alternativa de solución entre las que se encontraría las lectinas que actuarían como proteínas de defensa vegetal contra fitopatógenos ya que pueden reconocer y ligarse a glicoconjugados presentes en la superficie de hongos, bacterias y membrana peritrófica de insectos, procediendo a “aglutinarlos” de esta manera. Además de eso, ellas poseen una mayor afinidad por oligosacáridos que son raros en las plantas o están totalmente ausentes en tejidos vegetales, lo cual ha conllevado a que se las emplee como proteínas de diagnóstico microbiológico, permitiendo la diferenciación de cepas bacterianas patógenas e incluso en la determinación específica de grupos sanguíneos.

Asimismo, la ingeniería genética vegetal actualmente ofrece la oportunidad de que una planta sea capaz de producir resistencia a insectos por la inserción y expresión de genes de proteínas enteropatógenas en plantas, por lo cual sería importante determinar la composición aminoacídica y secuencia N terminal de lectinas y crear una biblioteca cDNA. De otro lado, las recientes investigaciones empleando la plataforma PROTEÓMICA, ha permitido comprender la bioquímica, la fisiología y la biología molecular de los genes que gobiernan la inducción de resistencia o susceptibilidad de las plantas para la patogenicidad y ataque de insectos.

El Perú al ser un país andino y uno de los principales centros de dispersión (variabilidad genética) y producción de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), está en la obligación científica y tecnológica de explotar al máximo todas las cualidades de este producto sean estas nutricionales, fisiológicas, y biotecnológicas, valorizando así este cultivo.

Es por todas estas razones que en el presente estudio de investigación se pretende purificar, determinar la actividad biológica y caracterizar bioquímicamente la lectina a partir de semillas de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), pues se sabe que no existen trabajos en nuestro medio relacionados con la extracción de este tipo de proteínas que son de importancia en la alimentación de nuestra población, no obstante el valor que merece este tipo de estudio en razón de ser proteínas que actuarían como mecanismo de defensa vegetal contra insectos y de diagnóstico microbiológico.

A partir de esta primera aproximación inmuno-proteómica a las lectinas, se pretende continuar los estudios comparativos a fin de relacionar algún patrón de expresión de este grupo de proteínas con la resistencia a las plagas de almacenamiento, y de esta manera aportar información en relación a los mecanismos de defensa de esta importante especie como es la *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).





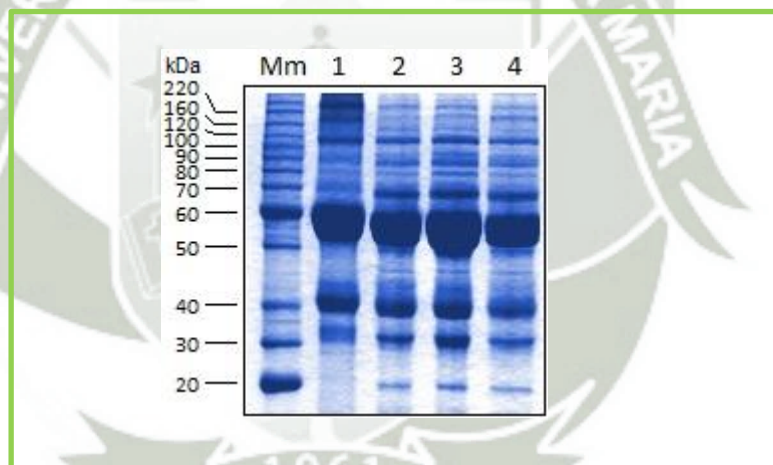
**CAPÍTULO ÚNICO:
RESULTADOS**

1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE 1D

Cuatro (4) muestras de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), fueron inicialmente consideradas para el análisis. Después de las extracciones de proteínas y un primer análisis de proteínas en geles discontinuos en una dimensión (*Figura 1*), se enfocó la atención en observar e identificar diferencias importantes en las regiones de masa molecular entre 25 a 40 kDa, rango en el cual se encuentran una mayoría de proteínas de la familia de glicoproteínas, tales como las arcelinas, lectinas entre otras.

En base a este análisis sólo un tipo de proteína fue seleccionada para el ensayo de inmuno-proteómica e identificación por espectrometría de masas, la cual estaría relacionada con los mecanismos de defensa de las plantas.

Figura 1: SDS-PAGE de extractos de proteínas de 4 muestras de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua)



Fuente: Laboratorio de Química Biológica y E.A.P de Biología, bajo la colaboración Dr. Ronald Navarro Oviedo y Prof. Luis Ponce Soto Ph.D. UNSA 2016¹.

Muestras numeradas del 1 al 4. Entre ellas los rangos de masa entre 25 a 40 kDa, correspondientes a la familia de las lectinas, entre ellas Arcelinas, donde se observa mayor variabilidad.

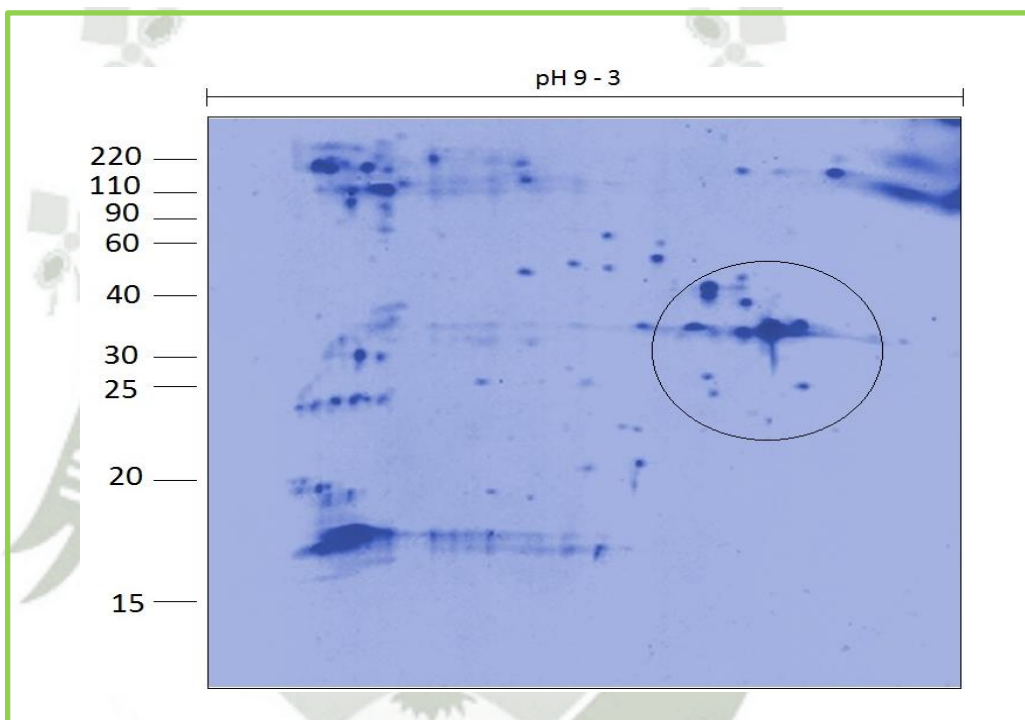
Mm: masa molecular de los marcadores de peso molecular.

¹ Ver Anexo C

2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE 2D

En la *figura 2* podemos observar el patrón de expresión diferencial de las lectin-like proteins del proteoma de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), donde la región correspondiente al rango 33-35 kDa y 5.5 -5.7 pH de punto isoeléctrico, se distinguen patrones de dos tres y hasta cuatro manchas o spots.

Figura 2: SDS-PAGE 12% BIDIMENSIONAL (2D) de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).



Fuente: Laboratorio de Química de Proteínas. Instituto de Biología, Dpto. de Bioquímica. UNICAMP (Brasil) 2016².

En círculo se señala la inmuno-detección de glicoproteínas y se observa en la región correspondiente a esta familia de proteínas.

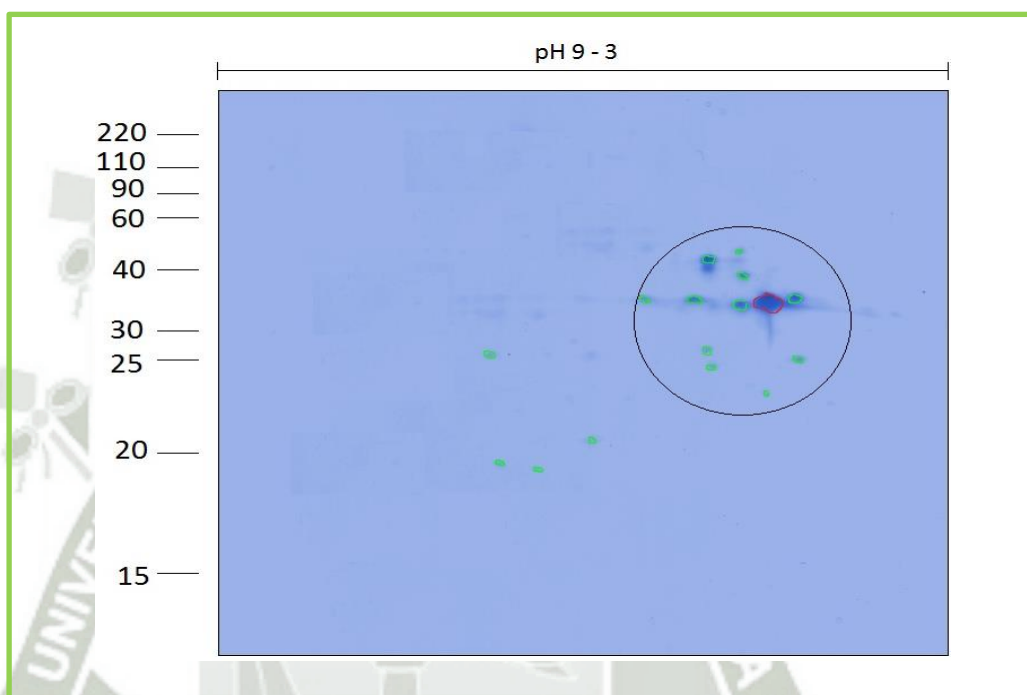
Resultados obtenidos a través del análisis de imagen con el programa Phoretix 2D.

Con respecto a la diferencia de las arcelinas (*Figura 3*), se analizaron los spots de la periferia observando resultados positivos para la familia de las fitohemaglutininas y

² Ver Anexo B: Constancia de uso de laboratorios de UNICAMP – Brasil.

algunas otras lectinas diferentes a arcelina, por lo que se comprobó la presencia de arcelinas en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).

Figura 3: Inmuno-ensayo a partir de geles bidimensionales (2-DE) de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).



Fuente: Laboratorio de Química de Proteínas. Instituto de Biología, Dpto. de Bioquímica. UNICAMP (Brasil) 2016³.

En círculo se señala la inmuno-detección de arcelina (borde rojo) y en borde verde se observa fitohemaglutininas y algunas otras lectinas diferentes a arcelina.

Resultados obtenidos a través del análisis de imagen con el programa Phoretix 2D.

³ Ver Anexo B: Constancia de uso de laboratorios de UNICAMP – Brasil

3. SECUENCIA DE PEPTIDOS PROCEDENTES DE SPOTS DE LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D) DE *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua)

A fin de corroborar la identidad de las proteínas inmuno-localizadas, estas fueron preparadas y analizadas por espectrometría de masas. La tabla 1 representa los péptidos obtenidos para la mayoría de los spots analizados (70%) correspondiente a la familia de las arcelinas reportada en las bases de datos utilizadas. Con este análisis se comprueba la efectividad de la técnica de inmuno-proteómica en la detección de las proteínas de interés.

Tabla 1: Secuencia peptídica

MASA	POSICIÓN	SECUENCIA PEPTÍDICA
4564.2340	125 - 165	DYFLGLFNKPPDPEAHIVA VVFD TSSNQIEIDMNSISPVAR
3718.7547	215 - 248	VLNDWVSVGFSATSGLYDPTSETHDVLVSWFSK
3401.7627	6 - 36	LLSLALFLVLLTHANSASETSFNFTSFD TNK
1369.5875	203 - 214	CNFSTSSVHMEK
1217.6736	37 - 48	LILQGDASVSSK
1205.5215	58 - 69	GNGDPTVDSMGR
1092.5068	249 - 257	FSQHTT SER
1022.5517	193 - 202	ASLVYPSGTK
813.3989	128 - 188	ITYDSSK
772.4927	49 - 55	GQLLLTK
610.2831	173 - 177	YNGEK
608.2886	80 - 85	DSTTGK
516.2889	189 - 192	NNLR

Fuente: Elaboración propia, bajo colaboración Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D 2016

*Se obtuvieron 13 péptidos, de los cuales se escogió el más grande para la comparación de la huella peptídica con la base de datos, identificándose como arcelina de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).*

pI teórico: 6, 16 / ***Masa molecular promedio*** 29375.87 / ***Masa molecular mono-isotópica:***29357.62.

4. ESTUDIO DE HOMOLOGÍA SECUENCIAL (ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO), A PARTIR DE UN PÉPTIDO SECUENCIADO CORRESPONDIENTE A UN SPOT INMUNOLOCALIZADO POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL SDS-PAGE (2D) A PARTIR DE *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua)

La figura 4 muestra los estudios de homología secuencial, por un análisis Bioinformático, usando el software DNAS⁴ (Ver 5.0), de un péptido secuenciado vía espectrometría de masa MS/MS, correspondiente a un spot inmunolocalizado por “inmunoblotig”, específico para glicoproteínas de la familia de las arcelinas.

La secuencia del péptido tríptico generado del spot correspondiente al gel bidimensional SDS-PAGE (2D), de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), es sometido a un análisis de homología secuencial en la base de datos SWISS-PROT⁴, la cual revela que se trata de una enzima correspondiente a la familia de las arcelinas disponibles en la base de datos consultada, con la que guarda un alto match o grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado por espectrometría de masa (MALDI-TOF) (Figura 4).

Los trazos (-), observados corresponden a los generados por el software para el proceso de alineamiento.

⁴ Annotated protein sequence database: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>

DISCUSION

Diferentes metodologías han sido abordadas para el estudio de proteínas de almacenamiento en los cereales, estas técnicas incluyen metodologías bioquímicas de aislamiento y purificación de proteínas, para futuros estudios estructurales, funcionales e inmunológicos que resultan largos y complicados para el estudio de una proteína a la vez.

En el presente estudio se propone una combinación de técnicas de proteómica e inmunoproteómica para el estudio de proteínas de interés, logrando identificar en un simple ensayo de Western-blot, la familia de proteínas denominadas arcelinas presentes en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), con la finalidad de llevar a cabo análisis comparativos de la expresión de las mismas.

Chenopodium pallidicaule aellen (Cañihua), fue inicialmente considerada para este análisis. Después de las extracciones de proteínas y un primer análisis de los patrones proteicos en geles disociantes en una dimensión (Figura 1), se centró la atención en observar e identificar diferencias importantes en las regiones de peso molecular entre 25-40 KDa, rango en el cual se encuentran la mayoría de las proteínas de la familia de las Arcelinas.

En base a este análisis, las proteínas en ese rango de masa molecular fueron seleccionadas para el ensayo de inmunoproteómica e identificación por espectrometría de masas. Se obtuvo la aproximación proteómica seleccionada en un gel bidimensional 2D de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), (Figura 2) y se procedió a realizar un análisis comparativo a través del software de análisis de imagen. Como imagen de referencia se incluyeron los inmuno-ensayos a partir de geles bidimensionales. Con esta metodología se logró la identificación de las regiones de las proteínas correspondientes a las proteínas en estudio (Figura 2).

En la figura 3 podemos observar el patrón de expresión diferencial de las lectin-like proteins en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), donde la región correspondiente al rango 33-35 kDa y 5.5 -5.7 pH de punto isoeléctrico, se distinguen patrones de dos tres y hasta cuatro manchas o spots. En la variedad analizada se observa la presencia de proteínas en la región de análisis.

A fin de corroborar la identidad de las proteínas inmuno-localizadas, estas fueron preparadas y analizadas por espectrometría de masas (MALDI_TOF). La tabla 1 representa los 13 péptidos obtenidos para la mayoría de los spots analizados (70%) correspondiente a la huella peptídica de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), reportada en las bases de datos utilizadas. Con este análisis se comprueba la efectividad de la técnica de inmuno-proteómica en la detección de la proteína de interés.

Con respecto a la presencia de otras proteínas expresadas en torno a las masas moleculares y puntos isoelectrónicos semejantes, que carece de actividad lectina (Figura 3), se analizaron los spots de la periferia observando resultados positivos para la familia de las fitohemaglutininas y algunas otras lectinas diferentes a arcelina, por lo que se descartó la presencia de esta última en estas proteínas estudiadas.

La búsqueda de la identidad de estas proteínas analizadas no arrojó ningún resultado positivo en la identificación de las diferentes familias de arcelinas, sin embargo, el patrón de expresión diferencial nos hace pensar que existen combinaciones de ellas en estas variedades, adicionalmente, la base de datos carece de la suficiente información al respecto. Es recomendable emplear en futuros análisis técnicas de espectrometría tipo MALDI TOF/TOF para obtener las secuencias específicas para identificar las familias de proteínas. Por otro lado, es importante resaltar el hallazgo de este grupo de proteínas (arcelinas) en *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua), en el análisis, esto habla de una alta frecuencia de estas proteínas en variedades de origen peruano, lo cual contrasta con solo un 10% de incidencia reportado para las variedades provenientes de otras regiones geográficas (Osborn, Alexander, Sun, Cardona, & Bliss, 1988).

Estos compuestos bioactivos especializados en defensa de plantas pueden repeler o intoxicar insectos, mientras que las proteínas de defensa a menudo interfieren con su digestión (Fürstenberg-Hägg, Zagrobelny, & Bak, 2013).

Desde el análisis en el mecanismo de defensa de las plantas frente a los insectos que son los principales predadores en las plantas; las lectinas, al parecer atraviesan sin problema todo el intestino anterior ya que probablemente se ligaría temporalmente con los azúcares de la dieta del insecto, es decir con monómeros glucosídicos del almidón.

En general, las lectinas tienen propiedades insecticidas, son capaces de unirse a la N-acetil-D-glucosamina la cual se encuentra polimerizada formando parte de la quitina que cubre la membrana peritrófica de los insectos. Sin embargo, las lectinas vegetales con diferentes especificidades también han demostrado su capacidad como moléculas insecticidas, lo que sugiere que esta propiedad no es exclusiva de las lectinas específicas de N-acetil-D-glucosamina. (Sadeghi, Van Damme, Peumans, & Smagghe, 2006)

Se ha encontrado lectinas con acción más potente que la que se reporta aquí, perteneciente a la gran familia de las fitohemaglutininas y las RIPs (proteínas inactivadoras de ribosomas), siendo algunas de ellas capaces de inducir apoptosis a través de la activación de endonucleasas que provocarían la fragmentación del ADN y eventualmente la muerte celular (ZhuSalzman, y otros, 1998). En agricultura, se ha observado que una mayor expresión de las RIPs confiere a las plantas una mayor resistencia a los virus, hongos, insectos y también a la sequía y la salinidad (Stirpe, 2013).

Así, la presencia de cierto polipéptido en la familia de las fitohemaglutininas encontrada por Osborn y colaboradores en ciertas accesiones mexicanas de frijol, otorgaba resistencia frente a dos gorgojos (*Zabrotes subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus*) que son predadores de cultivos domésticos. Estas accesiones salvajes resistentes contenían la proteína arcelina que se hallaba ausente en variedades susceptibles.

La clonación del cDNA de la arcelina-1 (una de las cuatro variantes electroforéticas de la arcelina) reveló una secuencia nucleotídica que era 78% homóloga a PHA y una secuencia aminoacídica con 58 a 61 % de similaridad con PHA-E, PHA-L, y AI. (Osborn, Burow, & Bliss, 1988). Evidencia genética demostró que en estas accesiones salvajes el gen de la arcelina estaba estrechamente asociada a los genes para PHA (Osborn, Blake, Gepts, & Bliss, 1986).

El análisis de MS de la proteína se secuenció al 52% y la proteína se identificó como lectina con una fuerte homología de los genes de fitohemaglutinina (PHA). Se amplificó el cDNA de longitud completa de la lectina (KF601826) con 934 pb, que contenía un dominio principal altamente conservado de la región lectin_legume_LecRK_Arcelin_ConA. La alineación múltiple y el análisis filogenético indicaron claramente que la lectina pertenecía a la familia PHA, y la lectina podría evolucionar a partir de la variante Arc

Algo interesante, fue que la PHA se presentó en el 90% de todos los cultivares de frijol y en todas las accesiones salvajes, mientras que la arcelina estaba ausente en frijoles cultivados, pero presente en 10% de las accesiones salvajes. Parece que todas las líneas domesticadas podrían provenir de líneas salvajes que no tienen arcelina o en la que el gen de la arcelina se pierde o se halla inactivada en el curso de la domesticación.

Algo similar a lo anterior es probable que acontezca con la Arcelina presente en *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua), pero esto no significa que cultivares domésticos carezcan de lectinas o arcelinas con actividad defensiva i/o tóxica, sobre todo en aquellas provenientes de semillas, ya que estas estructuras constituyen el patrimonio genético de toda planta.

Por otro lado, Murdock et al. (1990) empleando un sistema de semilla artificial, demostraron de que un 1 % (p/p) de WGA (aglutinina de germen trigo) incrementa la duración del desarrollo larval de 32 días a 55 días, y que las tres isolectinas de WGA tienen efectos similares (Huesing, Murdock, & Shade, 1991). Resultados parecidos han sido obtenidos ahora con la lectina de arroz y UDA (aglutinina de *Urtica dioica*). Sin embargo, las lectinas purificadas de chamico y tomate tienen un efecto significativamente menor sobre el desarrollo de las larvas del gorgojo del caupí.

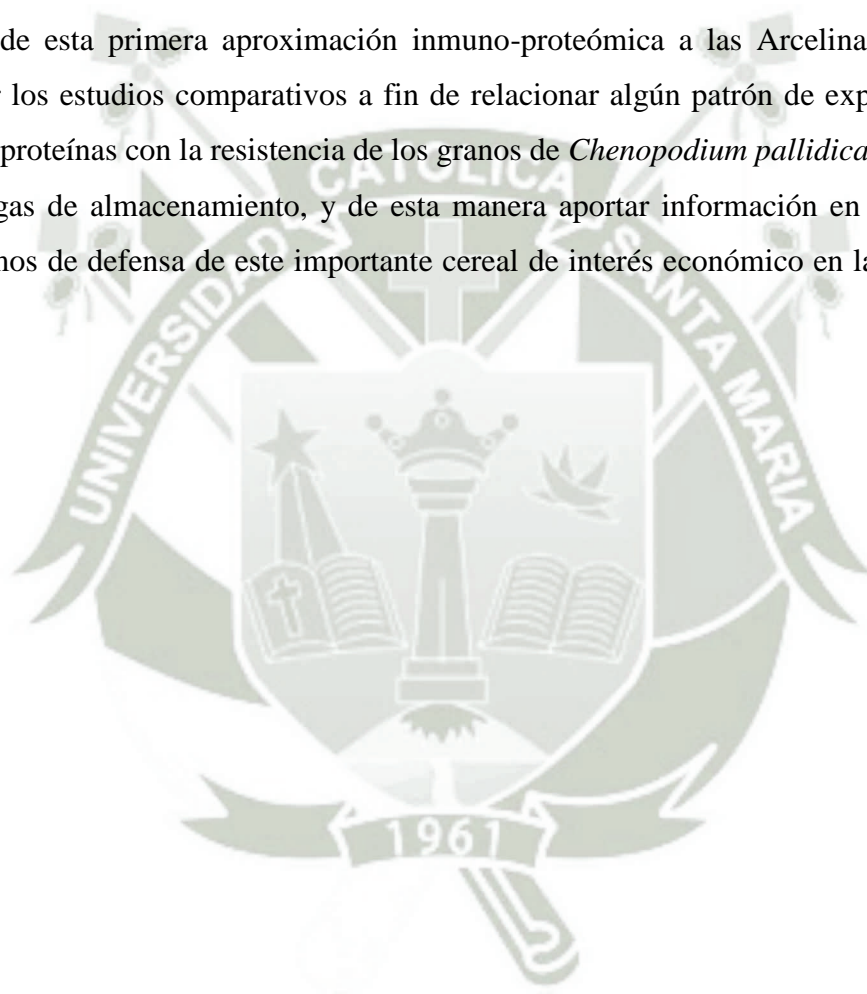
Recientemente, también se ha demostrado a través de experimentos in vitro que la WGA tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de dos importantes plagas del maíz, el barrenador de maíz (*Ostrinia nubilalis*) y el gusano radicular de maíz (*Diabrotica undecimpunctata*) (Czapla & Lang, 1990). Estos investigadores han demostrado de que la incorporación de 0.059 % de WGA (p/p) dentro de la dieta artificial produce 50% de mortalidad en las larvas del barrenador de maíz europeo.

Aunque el modo de acción de estas lectinas ligadoras de quitina no es conocido, se especula que sus efectos deletéreos sobre el desarrollo del insecto son mediados por el ligamiento a quitina de la membrana peritrófica que reviste el intestino medio de insectos. Tal ligamiento podría interferir con la absorción de nutrientes (Chrispeels & Raikhel, 1991).

Experimentos más recientes indican que las lectinas también funcionan como disuasión de la alimentación contra los insectos. Como consecuencia, se han introducido genes que

codifican la lectina de hoja y bulbo de *Allium sativum* (ajo) y la lectina de guisante (Sadeghi, y otros, 2008) la aglutinina del *Galanthus nivalis* (campanilla de febrero) (Nagadhara, y otros, 2004) y la lectina del guisante (Melander, Ahman, Kamnert, & Stromdahl, 2003) . Se introdujeron en el tabaco y en el arroz para reducir la depredación por insectos alimentadores de floema, tales como áfidos. Los efectos tóxicos de las lectinas, que provocan una pérdida de fecundidad de los insectos, están generalmente mediados por el dominio de unión al azúcar de la lectina y se producen a niveles fisiológicos (Shahidi-Noghabi, Van Damme, & Smagghe, 2008)

A partir de esta primera aproximación inmuno-proteómica a las Arcelinas, se pretende continuar los estudios comparativos a fin de relacionar algún patrón de expresión de este grupo de proteínas con la resistencia de los granos de *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua), a las plagas de almacenamiento, y de esta manera aportar información en relación a los mecanismos de defensa de este importante cereal de interés económico en la alimentación peruana.



CONCLUSIONES

1. Se identificó la presencia de lectinas en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), dentro del rango de masa molecular de 25 a 40 kDa.
2. La lectina purificada mostró una masa molecular aproximada de 33 kDa y un punto isoeléctrico 5.5 a través de un gel bidimensional.
3. Los estudios de electrotransferencia (Western blot), fueron capaces de ligar en la inmunotrasferencia a la lectina y ser reconocida como una arcelina.
4. La lectina purificada e identificada como arcelina, fue secuenciada vía espectrometría de masas, donde fue analizada en las bases de datos a partir de la secuencia de 13 péptidos tripzinizados, fue suficiente para identificar a la familia de lectinas vegetales.
5. Los estudios de bioinformática a partir de la secuencia de la lectina identificada como una arcelina, purificada a partir de semillas de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), mostraron regiones y dominios conservados dentro de esta familia de proteínas presentes en las plantas y con un gran potencial biocontrolador en el mecanismo de defensa de las plantas, sobre la base de la bioprospección en la protección del medio ambiente.

SUGERENCIAS

1. Continuar y ampliar estudios de investigación tendientes a valorizar las propiedades aglutinantes de lectinas en otros cultivares de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), así como en especies cultivadas de importancia económica.
2. Promover el empleo controlado de estas proteínas para el manejo de plagas y microorganismos patógenos ya que estarían coevolutivamente relacionadas, evitando de esta forma el desarrollo de resistencia genética adquirida y la contaminación del ambiente por plaguicidas.
3. Realizar estudios de Proteoma Funcional completo de lectinas de los cultivares de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), para poder obtener en el futuro una base de datos de esta familia de proteínas en esta especie y realizar futuros estudios de clonaje molecular en especies susceptibles de modo que sirva como una herramienta molecular para en el mecanismo de defensa de otras especies semejantes permitiéndonos a futuro mitigar el proceso de contaminación ambiental por plaguicidas.

PROPUESTA

El presente trabajo de investigación se convierte en el punto de partida de los estudios a nivel de la plataforma Proteómica en el Perú, ya sumados como los estudios de aproximación Proteómica de *Trichoderma sp.* realizados por el laboratorio de fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo; ambos sirven como una propuesta a nivel nacional para la creación del primer centro de Espectrometría de Masas en el Perú, por ser de prioridad nacional conforme a las políticas de investigación, desarrollo e innovación propuestas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC).

Este centro se enmarca en tres funciones específicas:

1. Formación de recursos humanos altamente calificados en Espectrometría de Masas.
2. Consolidación de los proyectos vigentes y futuros en las áreas de Biotecnología, Saneamiento Ambiental entre otros, utilizando la Espectrometría de Masas para los respectivos estudios de validación.
3. Prestación de servicios a la empresa pública y privada en el tema de análisis y validación de técnicas nacionales como internacionales para la validación de servicios en investigación tecnológica.

BIBLIOGRAFÍA

- **Chrispeels, M. J., & Raikhel, N. V.** (Jan de 1991). Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell.*, 3(1), 1-9. doi: 10.1105/tpc.3.1.1
- **Czapla, T. H., & Lang, B. A.** (Dec de 1990). Effect of Plant Lectins on the Larval Development of European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Southern Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(6), 2480-2485. doi:10.1093/jee/83.6.2480
- **Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., & Bak, S.** (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(5), 10242-10297. doi:10.3390/ijms140510242
- **Hernandez, J., & Leon, J.** (1992). *Cultivos Marginados, otra perspectiva de 1492* (Vol. 26). Roma, Italia: Colección FAO: Producción y protección vegetal.
- **Hilder, V. A., Powell, K. S., Gatehouse, A. M., Gatehouse, J. A., Gatehouse, L. N., Shi, Y., . . . Boulter, D.** (1995). Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research*, 4(1), 18-25. doi:10.1007/BF01976497
- **Huesing, J. E., Murdock, L. L., & Shade, R. E.** (1991). Rice and stinging nettle lectins: Insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. *Phytochemistry*, 30(11), 3565-3568. doi: 10.1016/0031-9422(91)80066-A
- **Melander, M., Ahman, I., Kamnert, I., & Stromdahl, A.** (Oct de 2003). Pea lectin expressed transgenically in oilseed rape reduces growth rate of pollen beetle larvae. *Transgenic Res*, 12(5), 555-567. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601654?dopt=Abstract>
- **Murdock, L., Huesing, J., Nielsen, S., Pratt, R., & Shade, R. E.** (1990). Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*, 29(1), 85-89. doi:10.1016/0031-9422(90)89016-3
- **Nagadhara, D., Ramesh, S., Pasalu, I., Rao, Y., Sarma, N., Reddy, V., & Rao, K.** (2004). Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (gna) exhibit

- high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). *Theor Appl Genet*, 109(7), 1399-1405. doi:10.1007/s00122-004-1750-5
- **Osborn, T. C., Alexander, D. C., Sun, S. S., Cardona, C., & Bliss, F. A.** (1988). Insecticidal activity and lectin homology of Arcelin seed proteins. *Science.*, 240, 207-210. doi:10.1126/science.240.4849.207
 - **Osborn, T., Blake, T., Gepts, P., & Bliss, F.** (Mar de 1986). Bean arcelin : 2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. *Theor Appl Genet*, 71(6), 847-55. doi:10.1007/BF00276428
 - **Osborn, T., Burow, M., & Bliss, F.** (Feb de 1988). Purification and characterization of arcelina seed protein from common bean. *Plant Physiol*, 86(2), 399-405. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16665920>
 - **Richards, O. Y.** (1983). *Tratado de Entomología Imms: Estructura, Fisiología y Desarrollo* (Vol. 1). España: Ediciones Omega S.A.
 - **Sadeghi, A., Smagghe, G., Broeders, S., Hernalsteens, J., De Greve, H., Peumans, W., & Van Damme.** (Feb de 2008). Ectopically expressed leaf and bulb lectins from garlic (*Allium sativum* L.) protein transgenic tobacco plants against cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*). *Transgenic Res*, 17, 9-18. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11248-007-9069-z>
 - **Sadeghi, A., Van Damme, E., Peumans, W., & Smagghe, G.** (2006). Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. *Phytochemistry*, 67, 2078-2084. doi:10.1016/j.phytochem.2006.06.032
 - **Shahidi-Noghabi, S., Van Damme, E., & Smagghe, G.** (Dec de 2008). Carbohydrate-binding activity of the type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I from elderberry (*Sambucus nigra*) is a determining factor for its insecticidal activity. *Phytochemistry*, 69(17), 2972–2978. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.09.012
 - **Stirpe, F.** (Jun de 2013). Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. *Toxicon*, 67, 12-16. doi:10.1016/j.toxicon.2013.02.005
 - **ZhuSalzman, K., Shade, R. E., Koiwa, H., Salzman, R. A., Narasimhan, M., Bressan, R. A., . . . Murdock, L.** (8 de Dic de 1998). Carbohydrate binding and

resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin

II. *Plant Biology*, 95(25), 15123-15128. Obtenido de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24586/>







ANEXO A: Proyecto de Tesis



**ANEXO B: Constancia de uso de los Laboratorios
UNICAMP – BRASIL**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Departamento de Bioquímica



DECLARAÇÃO


Declaro para os fins devidos que, foram realizadas várias técnicas em química de proteínas para os estudos de Aproximação Imuno-proteômica de lectinas presentes em *Chenopodium pallidicaule*.

Essas técnicas incluíram: montagem de coluna para uso em cromatografia convencional, realização da corrida cromatográfica com fluxo constante do solvente obtido por bomba peristáltica, determinação do perfil cromatográfico por leitura ultravioleta nos comprimentos de onda em 220 e 280 nm em espectrofotômetro das frações, separação e purificação dessas proteínas por sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), seqüenciamento de proteínas via espectrometria de massas, liofilização das amostras, preparo de tampões de corrida, dosagem de proteína, preparo de gel para eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE).

Todo este serviço foi solicitado pela Srta. María del Pilar Duran Márquez.

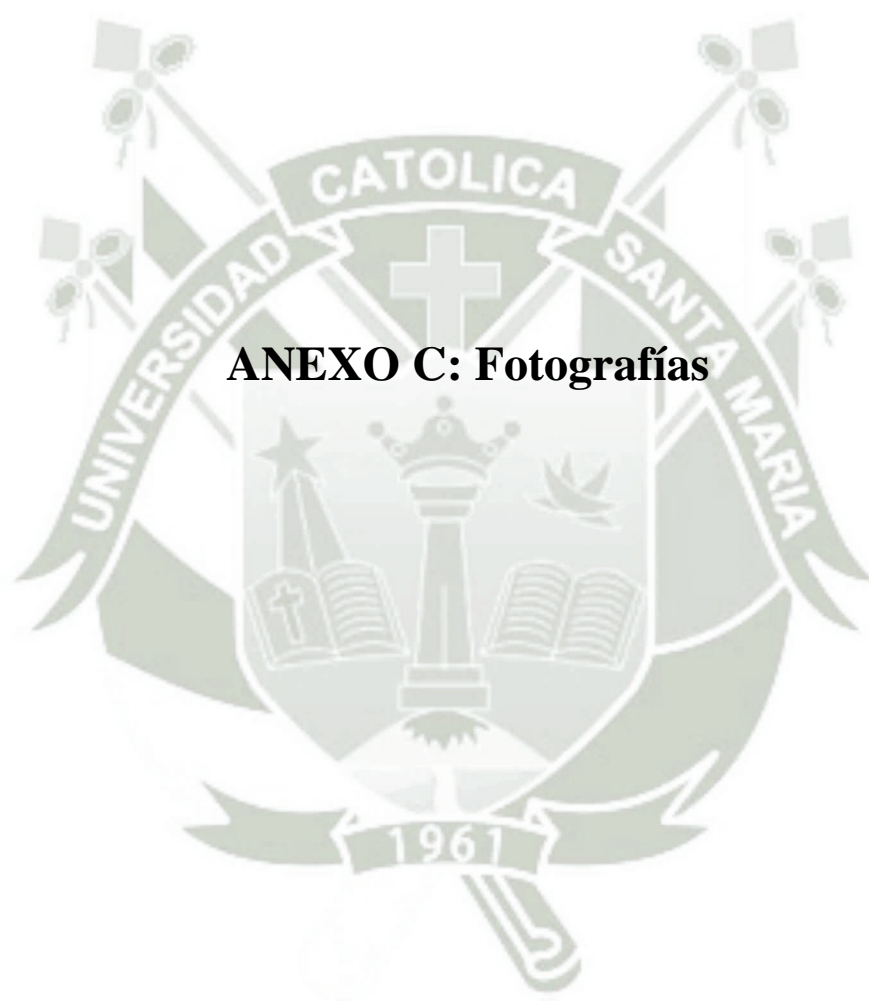
Campinas, 08 de Dezembro de 2016..

CARTÓRIO
R. GERALDO


Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.
Professor Colaborador Convidado
Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia - UNICAMP



Instituto de Biologia – Unicamp
Cidade Universitária “Zeferino Vaz” s/n CP 6109 CEP 13093-970 Campinas – SP
Fone: 55-19-35216130 Fax: 55-19-3521-6129



ANEXO C: Fotografías

MUESTRA

Chenopodium pallidicaule aellen (Cañihua)



PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



En un matraz se realiza la extracción de proteínas empleando un Tampón "Tris-HCl" 0.5 M pH 7.9

ELECTROFORESIS: Laboratorio de Química Biológica y E.A.P de Biología, bajo la colaboración

Dr. Ronald Navarro Oviedo y Prof. Luis Ponce Soto Ph.D. UNSA 2016

1.- Armado de la base



2.- Preparación de los geles



**Preparación del Running Gel
12,5%**

- Bis-Acrilamida
- Tris-HCl 1M pH8,8
- Agua MilliQ
- SDS 20%
- TEMED y PSA 10%

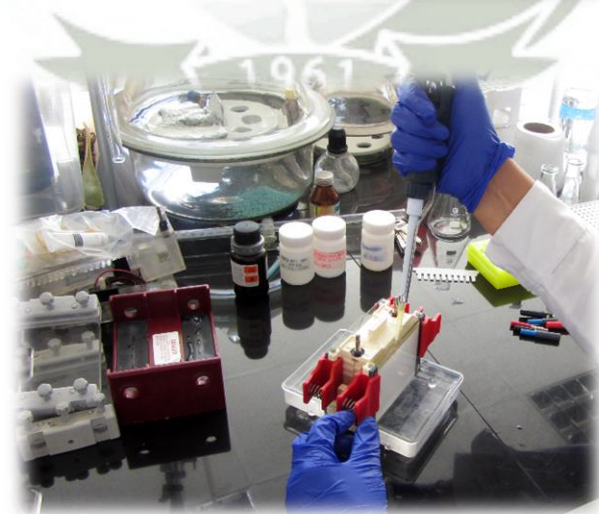


Preparación del Stacking Gel 5%

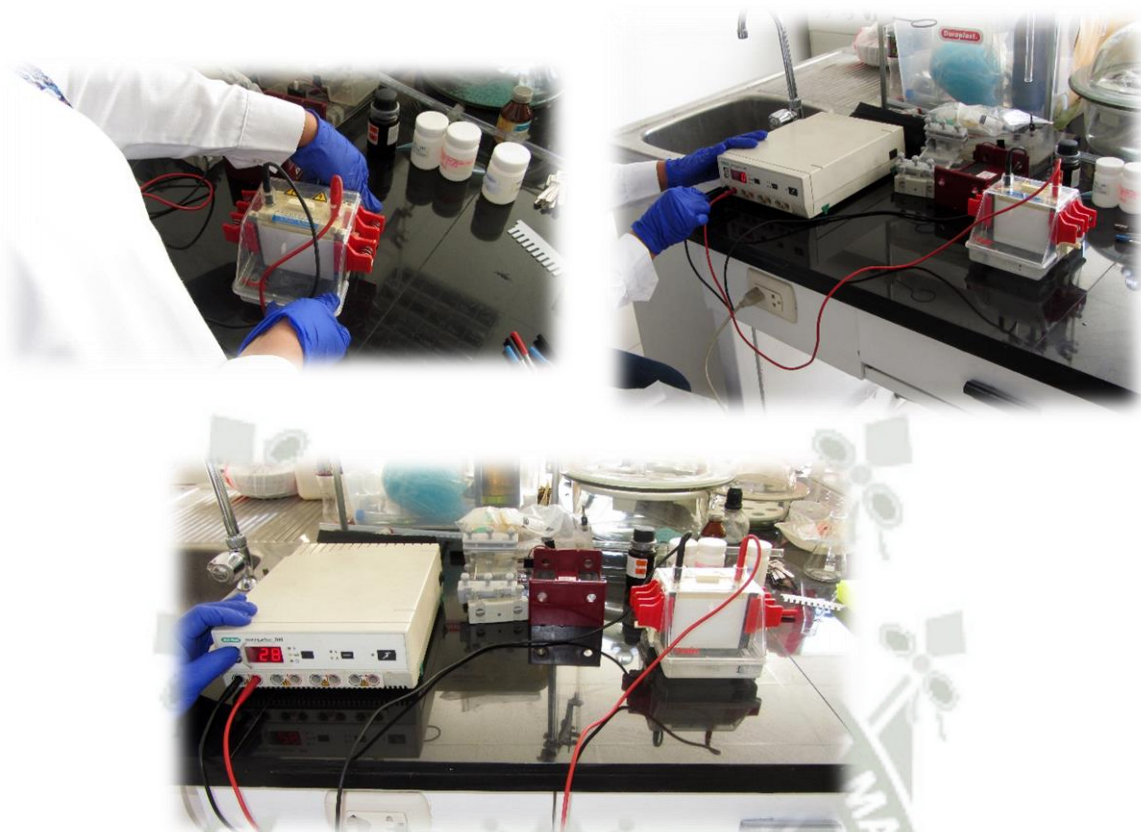
- *Bis-Acrilamida*
- *Tris-HCl 1M pH6,8*
- *Agua MilliQ*
- *SDS 20%*
- *TEMED y PSA 10%*



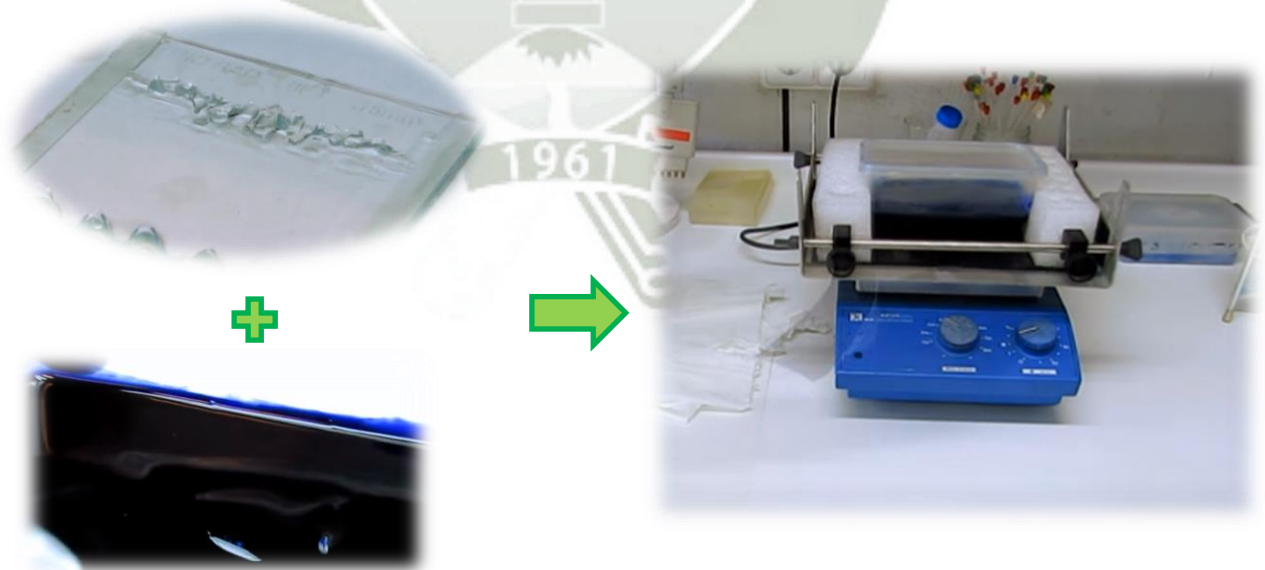
3.- Aplicación de la muestra



4.- Desarrollo de la Electroforesis

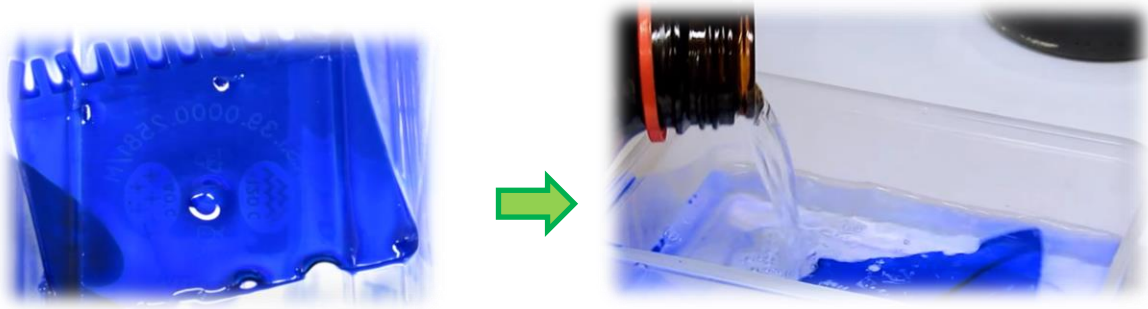


5.- Tinción de proteínas



Azul brillante de Coomassie

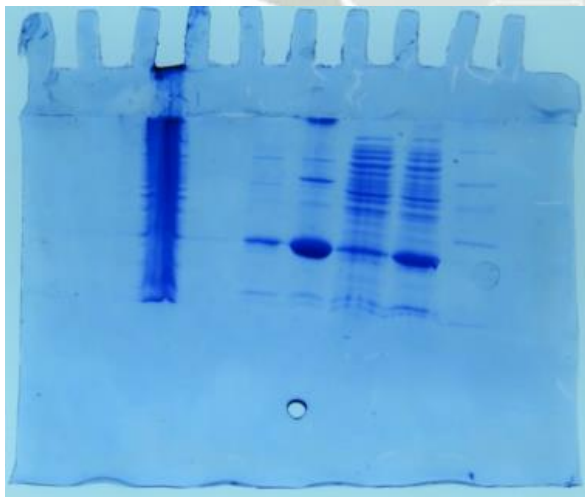
6.- Decoloración del gel



Solución de decoloración rápida

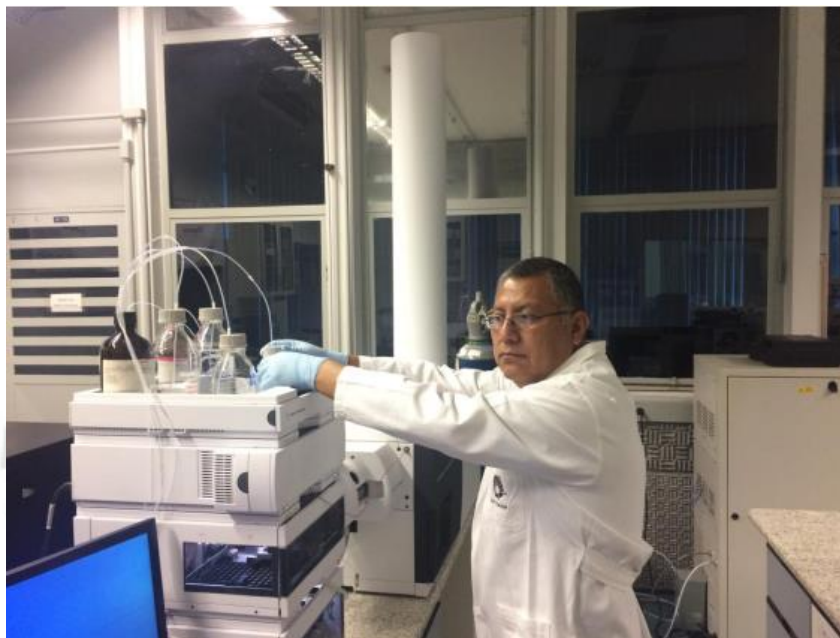


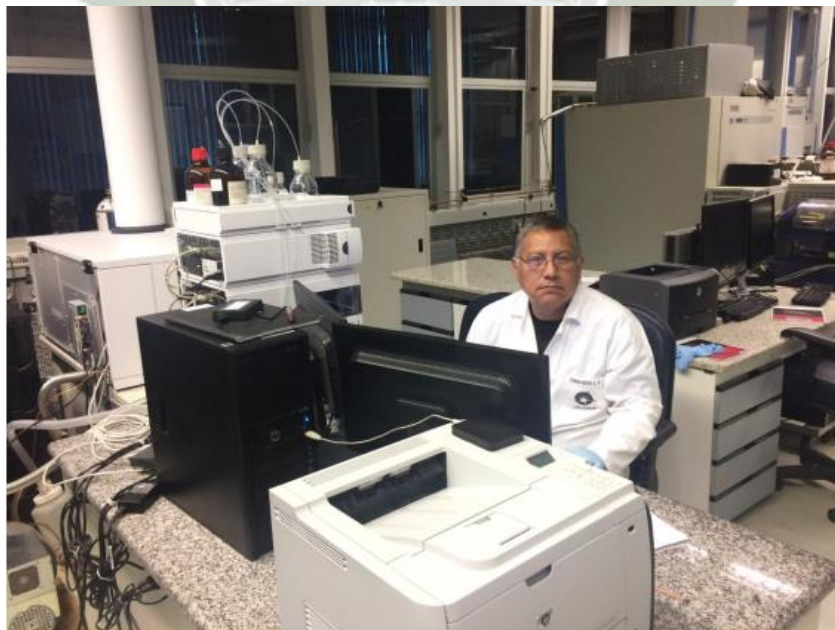
7.- Secado manual



Las proteínas fijadas en geles de poliacrilamida y teñidas con azul de brillante de coomasie se observan como bandas azules de diferentes pesos moleculares

PURIFICACIÓN Y ANALISIS DE MUESTRA DE *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC-FR) Y ESPECTROMETRIA DE MASAS VIA TOF (CUADRUPOLO) Realizada por el Prof. Luis Alberto Ponce Soto en el LABORATORIO THOMSON DE ESPECTROMETRIA DE MASAS DEL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA UNIVERIDAD ESTADUAL DE CAMPINAS – BRASIL





UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO

MAESTRIA EN PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN AMBIENTAL



PROYECTO DE TESIS

**APROXIMACIÓN INMUNO-PROTEÓMICA DE LECTINAS
PRESENTES EN *Chenopodium pallidicaule aellen* (CAÑIHUA), Y SU
BIOPROSPECCIÓN EN EL MECANISMO DE DEFENSA DE LAS
PLANTAS POR ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO. AREQUIPA, 2016.**

Proyecto de tesis presentado por la bachiller:

MARÍA DEL PILAR DURAN MÁRQUEZ

Para optar el Grado Académico de:

**MAESTRO EN PLANIFICACIÓN Y GESTIÓN
AMBIENTAL**

Asesor:

PROF. LUIS ALBERTO PONCE SOTO Ph.D.

AREQUIPA - PERÚ

2016

ÍNDICE GENERAL

I.	PREÁMBULO	32
II.	PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	33
1.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:.....	33
1.1	Enunciado del Problema:	33
1.2	Descripción del Problema:	33
a)	Área del Conocimiento:	33
b)	Operacionalización de Variables:.....	33
1.3	Análisis de Variables:.....	33
1.4	Justificación del Problema:	34
2.	MARCO CONCEPTUAL:.....	35
2.1	Plaguicidas.....	35
2.2	<i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua).....	37
2.2.1	Origen.....	37
2.2.2	Clasificación Taxonómica.....	38
2.2.3	Descripción botánica, variedades.....	39
2.2.4	Valor Nutricional.....	42
a)	Proteína.....	43
2.3	Lectinas.....	45
2.4	Recursos genéticos.....	46
2.5	Plataforma Proteómica.....	47
2.5.1	Tecnología de la proteómica	50
2.5.1.1	Separación de proteínas.....	50
2.5.1.2	Identificación y caracterización de proteínas	52
2.6	Electroforesis	54
2.6.1	Electroforesis bidimensional	55
2.7	Estructura de las proteínas	57
2.7.1	Fragmentación de proteínas	57
2.7.1.1	Proteólisis	57
2.7.1.1.1	Digestión en solución	57

2.7.1.1.2 Digestión en gel.....	57
2.7.1.2 Rompimiento químico.....	59
2.8 Espectrometría de masas.....	59
2.8.1 Preparación de la muestra	60
2.8.2 Ionización de la muestra.....	60
2.8.2.1 MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization)	61
2.8.3 Análisis de masa.....	62
2.8.3.1 Analizadores cuadrupolo.....	62
Analizador de tiempo de vuelo (ToF).....	64
3. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS:	65
4. OBJETIVO GENERAL:	68
5. Objetivos Específicos	68
6. HIPÓTESIS:	68
III. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	69
1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN:.....	69
1.1 Instrumentos:.....	69
1.2 Materiales:.....	69
1.3 Técnicas:.....	69
1.3.1 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica	69
1.3.2 Electroforesis en PAGE-SDS.....	69
1.3.3 Geles bidimensionales (2-DE)	70
1.3.4 Inmunoensayos.....	71
1.3.5 Análisis de Imágenes.....	71
1.3.6 Caracterización estructural	72
1.3.7 Concepción del modelo estructural tridimensional	72
2. CAMPO DE VERIFICACIÓN:	74
2.1 Ubicación espacial:	74
2.2 Ubicación Temporal:.....	74
2.3 Población.....	74
2.4 Estrategia de recolección de datos:	74

2.5	Recursos:	74
2.6	Criterios para el manejo de resultados:	75
IV.	CRONOGRAMA DE TRABAJO:	75
V.	PRESUPUESTO	76
VI.	BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Análisis de Variables	33
Cuadro 2:	Características de valor nutritivo - agroindustrial y estadísticos simples de 90 accesiones de <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua).	43
Cuadro 3:	Valor Nutritivo del grano de <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua) expresado en g/100g	43
Cuadro 4:	Contenido de aminoácidos en los granos andinos	44
Cuadro 5:	Composición proximal de cereales y granos andinos	45
Cuadro 6:	Fracciones proteicas de quinua y <i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua) (% de proteína total)	45
Cuadro 7:	Agentes químicos utilizados frecuentemente en fragmentación de péptidos	59
Cuadro 9:	Cronograma de Trabajo	75
Cuadro 10:	Presupuesto	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	<i>Chenopodium pallidicaule aellen</i> (Cañihua). Sus componentes Botánicos.....	39
Figura 2:	Tipos de Cañihua de distinta ramificación.....	40
Figura 3:	Estrategias utilizadas en proteómica para la identificación y el análisis de proteínas	49
Figura 4:	Mecanismos por los que un gen puede dar lugar a múltiples productos génicos	50
Figura 5:	Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	53
Figura 6:	Electroforesis bidimensional.....	56
Figura 7:	Ionización por MALDI	62
Figura 8:	Analizador de iones de cuadrupolo	63
Figura 9:	Configuración de un analizador de cuadrupolo triple.....	63

Figura 10: Analizador de tiempo de vuelo 65

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 2: Grano de Cañihua variedad IllpaINIA..... 42
Fotografía 1: Variedad ILLPA INIA-406..... 42



I. PREÁMBULO

Actualmente observamos en nuestro entorno un crecimiento continuo de población y por ende de cultivos agrícolas que para controlar y mitigar alguna plaga de origen animal o vegetal realizan el empleo de plaguicidas durante la producción, el almacenamiento, el transporte, la distribución y la elaboración de dichos productos y sus derivados.

Los plaguicidas potentes como los organoclorados (poseen átomos de carbono, cloro, hidrógeno, en ocasiones oxígeno y son muy estables en el ambiente) resisten la degradación química y bacteriana debido a su estructura química, puesto que al ser liberados permanecen inalterados por largo tiempo en el ambiente y como son sustancias poco solubles en agua se evaporan pasando al aire o uniéndose a las partículas del suelo, como vapor o polvo, además pueden ser transportadas por grandes distancias depositándose nuevamente a través de lluvias o aguas superficiales.

El presente trabajo de investigación pretende purificar, determinar la actividad biológica y caracterizar bioquímicamente la lectina a partir de semillas de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), pues se sabe que no existen trabajos en nuestro medio relacionados con la extracción de este tipo de proteínas que son de importancia en la alimentación de nuestra población, no obstante el valor que merece este tipo de estudio en razón de ser proteínas que actuarían como mecanismo de defensa vegetal contra insectos y de diagnóstico microbiológico.

II. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

1.1 Enunciado del Problema:

Cuál es el nivel de expresión de lectinas presentes en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).

1.2 Descripción del Problema:

a) Área del Conocimiento:

- Área General: Ciencias de la Vida.
- Área Específica: Proteoma Funcional.
- Especialidad: Química de Proteínas.
- Línea: Aproximación Proteómica.

b) Operacionalización de Variables:

- **Variable Independiente:** Nivel de expresión de lectinas en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).
- **Variable Dependiente:** Presencia de lectinas en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).

1.3 Análisis de Variables:

Cuadro 1: Análisis de Variables

VARIABLE	INDICADOR	Unidad/ Categoría	Escala
<ul style="list-style-type: none"> • Nivel de expresión de lectinas en Cañihua (<i>Chenopodium pallidicaule aellen</i>) por aproximación inmuno-proteómica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis del perfil cromatográfico. • Análisis de espectros de masa. • Análisis de secuencias protéicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Número de lectinas expresas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cuantitativa

Fuente: Elaboración propia 2016

1.4 Justificación del Problema:

Diferentes metodologías han sido abordadas para el estudio de proteínas de almacenamiento en plantas, estas técnicas incluyen metodologías bioquímicas de aislamiento y purificación de proteínas, para futuros estudios estructurales, funcionales e inmunológicos que resultan largos y complicados para el estudio de una proteína a la vez.

En el presente estudio se propone una combinación de técnicas de proteómica e inmuno-proteómica para el estudio de proteínas de interés, pretendiendo lograr identificar en un simple ensayo de Western-blot, la familia de proteínas denominadas lectinas presentes en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) con la finalidad de llevar a cabo análisis comparativos de la expresión de las mismas. La presencia de lectinas encriptados en el genoma de la *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), genera gran expectativa por el actual desconocimiento de la procedencia de éstas.

La presencia de esta familia de proteínas podría explicar la resistencia de la especie a las diferentes condiciones ecológicas de amenaza por plagas, se sabe que las lectinas actúan modulando este mecanismo.

El estudio global de las diferentes lectinas, es de sumo interés en la bioprospección de moléculas, con el objetivo de establecer su importancia en la presencia de lectinas que podrían convertirse en candidatas para ser modelo de estudio en el mecanismo de defensa de cultivos alto-andinos que sufren la amenaza por plagas. Para ello es necesario realizar:

1. Desarrollo de técnicas de lectinas a partir de semillas *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).
2. Análisis de secuencias de lectinas presentes en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), empleando espectrometría de masas, electroforesis y cromatografía líquida.

2. MARCO CONCEPTUAL:

2.1 Plaguicidas

Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que se le pueden administrar para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Algunos plaguicidas han sido identificados como un peligro a largo plazo para el medio ambiente y están prohibidos o rigurosamente restringidos por convenios internacionales, como el Convenio de Estocolmo sobre los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), que entró en vigor en mayo de 2004 y abarca 12 productos químicos, que incluye ocho plaguicidas y otros contaminados con dioxina. Las clasificaciones incluidas en ese documento tienen una utilidad para ayudar a las autoridades de los países en desarrollo a adoptar decisiones prácticas destinadas a mitigar el riesgo de los plaguicidas y a dar prioridad, en sus procedimientos reguladores, a la revisión de plaguicidas problemáticos específicos (Red de Acción en Plaguicidas del Reino Unido, 2009).

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso (López, 1993)

Tabla 1: Clasificación de los Plaguicidas según su toxicidad expresada DL₅₀ (mg/Kg)

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase IA	Extremadamente peligroso	Paratión, dieldrín
Clase IB	Altamente peligrosos	Eldrín, diclorvos
Clase II	Moderadamente peligrosos	DDT, clordano
Clase III	Ligeramente peligrosos	Malatión

Fuente: *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*¹.

Tabla 2: Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad

Persistencia ^a	Vida Media ^b	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

Fuente: *Guía Básica de Pesticidas*² y *Pesticidas*³.

^a Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

^b Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

¹ López CL. Exposición a plaguicidas organofosforados. Perspectivas en Salud Pública N.o 18. México: Instituto Nacional de Salud Pública, 1993

² Briggs SA, Rachel Carson Council. Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards. Washington: Taylor & Francis publishers, 1992

³ Al-Saleh I A. Pesticides: a review article. J Environ Pathol Toxicol Oncol 1994; 13:151-161.

Tabla 3: Clasificación de los plaguicidas, según la familia química

Familia Química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permethrin
Derivados bipyridilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

Fuente: *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*⁴.

Según la OMS la actividad que más emplea este tipo de compuestos es la agricultura, en un 85% de la producción mundial, con la finalidad de controlar químicamente las diversas plagas que reducen la cantidad y calidad de las cosechas de alimentos y de otros vegetales.

2.2 *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).

2.2.1 Origen

Chenopodium pallidicaule aellen (Cañihua), originaria de los Andes del sur de Perú y de Bolivia, fue domesticada por los pobladores de la cultura Tiahuanaco, asentados en la meseta del Collao. No se han encontrado vestigios arqueológicos relacionados con esta planta, y la dehiscencia que aún presentan

⁴ López CL. Exposición a plaguicidas organofosforados. Perspectivas en Salud Pública N.º 18. México: Instituto Nacional de Salud Pública, 1993

los granos sugiere que su domesticación no está completa (Hernandez & León, 1992).

Es una de las especies agrícolas menos estudiada pero más nutritiva. “En muchas oportunidades se la ha confundido con la quinua” (VargasC., 1938), ya que, es una planta anual que pertenece a la misma familia que la quinua (*Chenopodiaceae*). En 1929 el botánico suizo Paul Aellen creó la denominación *Chenopodium pallidicaule* para este cultivo (Mujica, y otros, 2002).

La *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) es una planta que se llega a desarrollar hasta en alturas de 4000 m.s.n.m. debido fundamentalmente a su alta resistencia a las bajas temperaturas y precocidad de desarrollo (Repo-Carrasco, Hellström, Juha-Matti, & Mattila, 2010).

El mismo autor indica que un factor negativo puede ser considerado el tamaño del grano, el mismo que casi nunca ha sobrepasado un milímetro de diámetro con un alto porcentaje de granos negros, lo que hace necesario hacer uso de técnicas para superar este inconveniente. En nuestro país, la producción de Cañihua se encuentra principalmente en el departamento de Puno, donde se cultivan anualmente 5748 hectáreas (MINAGRI Ministerio de Agricultura y Riego, 2014).

2.2.2 Clasificación Taxonómica

Mujica (2002), plantea que la *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) corresponde a la siguiente clasificación taxonómica:

Reino:	Vegetal
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales
Familia: Chenopodiaceae
Género: Chenopodium
Especie: *Chenopodium pallidicaule*
Nombre común: Cañahua, kañihua, cañihua, etc

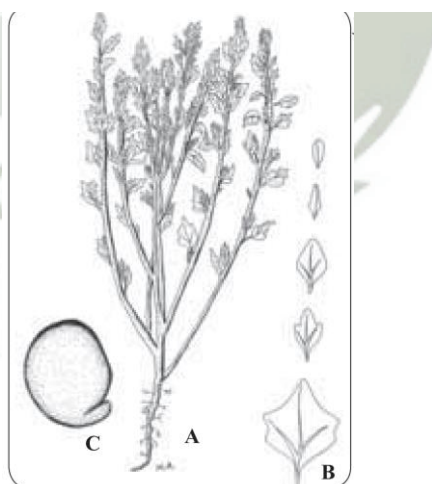
2.2.3 Descripción botánica, variedades

La planta de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) alcanza entre 20 y 70 cm de alto, tanto los tallos en su parte superior, como las hojas y las inflorescencias están cubiertas de vesículas de color blanco o ligeramente rosado que las protegen del frío.

Las hojas alternas presentan pecíolos cortos y finos, las láminas son engrosadas, de forma de rombo, las hojas presentan tres nervaduras bien marcadas en la cara inferior que se unen después en la inserción del pecíolo.

Las inflorescencias son pequeñas, axilares o terminales, cubiertas totalmente por el follaje que las protege del efecto de las bajas temperaturas (Tapia & Fries, 2007).

Figura 1. *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua). Sus componentes Botánicos



Chenopodium pallidicaule aellen (Cañihua).

Sus Componentes botánicos⁵:

A. Planta B. Formas de hoja C. Grano

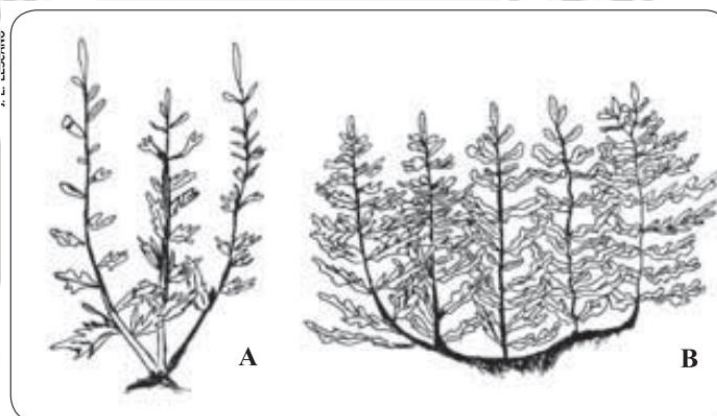
⁵ León, J. 1963. Cultivos andinos. Publicación # 6. IICA, Lima.

El fruto está cubierto por el perigonio de color generalmente gris, el pericarpio es muy fino y traslúcido. La semilla es muy pequeña de 1 a 1,2 mm y de color castaño claro, oscuro o negro con el episperma muy fino (Tapia & Fries, 2007).

Paredes (1967), propuso la clasificación en cuatro grupos principales de cañihuas cultivadas y una silvestre:

- Saigua qañiwa: de crecimiento erecto, grano castaño.
- Saigua ccoito: de crecimiento erecto grano marrón oscuro a negro.
- Lasta qañiwa: crecimiento ramificado grano castaño.
- Lasta ccoito: crecimiento ramificado grano marrón oscuro a negro.
- Cuchi-qañiwa: especie semi silvestre.

Figura 2. Tipos de Cañihua de distinta ramificación



*Tipos de Chenopodium pallidicaule aellen (Cañihua) de distinta ramificación*⁶

A. Saywa B. Lasta

Variedades en Puno

En la estación experimental Illpa/INIAE en Puno, se han seleccionado las variedades Ramis, Cupi y Lampa. Sin embargo los campesinos reconocen una

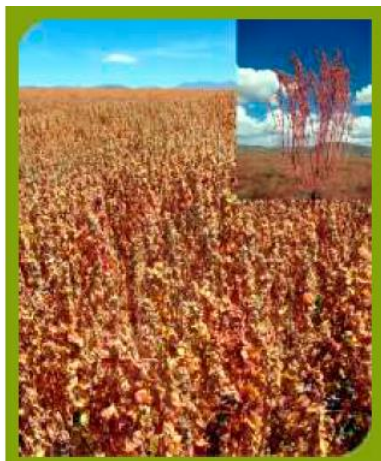
⁶ Lescano, J. L. 1981. Fisiología y biología floral de la quinua. En: Curso cultivo de la Quinua. CICA-UNTA, Puno, Perú. 1981

serie de cultivares adicionales como Chilliwa, Kello o amarillo, Puka o rojo y Airampo o de color morado.

Variedad Illpa INIA 406 (Apaza, 2010):

- Hábito de crecimiento de la planta: Saiwa.
- Altura de planta: 67 cm.
- Diámetro del tallo central: 5.0 mm.
- Color de estrías: rojo.
- Color del tallo en madurez fisiológica: anaranjado.
- Número de ramas primarias desde la base hasta el segundo tercio de la planta: 33.
- Cobertura vegetativa medida a la madurez fisiológica considerando la cobertura más ancha de la planta: 31 cm.
- Forma de lámina foliar del tercio medio de la planta en plena floración: ancha ovada.
- Número de dientes de la lámina foliar del tercio medio de la planta en plena floración: 5 a 7.
- Longitud del peciolo de hojas del tercio medio de la planta en plena floración: 12 mm.
- Longitud máxima de la lámina foliar del tercio medio de la planta en plena floración: 2.40 cm.
- Ancho máximo de lámina foliar del tercio medio de la planta en plena floración: 1.73 cm.
- Color de la hoja a la madurez fisiológica: anaranjado.
- Grado de dehiscencia cuando alcanza la madurez fisiológica: ligera

**Fotografía 2: Variedad ILLPA
INIA-406**



Fuente: (Apaza 2010)

**Fotografía 1: Grano de Cañihua variedad
Illpa INIA**



Fuente: (Apaza 2010)⁷

2.2.4 Valor Nutricional

Chenopodium pallidicaule aellen (Cañihua) se caracteriza por contener proteínas de alto valor biológico, mayor que el de la quinua, además de fibra. Es un alimento considerado nutracéutico o alimento funcional, con un elevado contenido de proteínas (15.7 a 18.8 por ciento) y una proporción importante de aminoácidos esenciales, entre los que destaca la lisina (7.1%), aminoácido escaso en los alimentos de origen vegetal, que forma parte del cerebro humano (Apaza, 2010).

Además de estos compuestos necesarios para mantener el equilibrio metabólico en el hombre, contiene varios aminoácidos que la destacan como fuente proteica vegetal superando a otros cereales y comparándose a otros alimentos de primer orden (Bioversity International, 2010).

La cantidad de proteína se presenta en el Cuadro 2 muestra una fluctuación de 12.76 a 19.00% (Rojas & Pinto, 2006), y estos valores son más amplios que los que reporta en el Cuadro 3 Mujica et al. (Mujica, y otros, 2002), quienes con

⁷ Apaza, V. (Nov. de 2010). Manejo y Mejoramiento de la Kañiwa. 2, 25. Puno, Perú.

base en diferentes trabajos de investigación indican una variación de 13.8 a 16.72%.

Cuadro 2. Características de valor nutritivo - agroindustrial y estadísticos simples de 90 accesiones de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).

COMPONENTES	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	SD
Proteínas (%)	12,76	19,00	16,12	1,55
Grasa (%)	2,11	14,50	7,46	1,96
Fibra (%)	5,45	11,12	8,41	1,16
Ceniza (%)	3,12	5,77	4,29	0,58
Carbohidratos (%)	45,72	67,70	56,91	5,33
Humedad (%)	4,68	14,70	10,37	1,76
Energía (Kcal/100g)	324,54	396,42	358,92	20,52
Granulo almidón (u)	5,50	38,00	18,98	6,96
Azúcar invertido (%)	5,00	35,00	15,33	7,55
Agua empaste (%)	9,00	39,00	20,18	6,21

Fuente: (Rojas & Pinto, 2006).

SD = Desviación estándar; Análisis de muestras realizadas por LAYSAA, Cochabamba

Cuadro 3: Valor Nutritivo del grano de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) expresado en g/100g

Producto	Mat. seca	Proteína %	Grasa	Carbohidratos	Cenizas	Fibra
Cañihua	90,2	15.18	8,4	58,6	3.4	3.8

Fuente: (Lezcano, 1997).

a) Proteína

Son macromoléculas formadas por unidades de aminoácidos, estos determinan la calidad de una proteína, son 22 en total, nueve de ellos son esenciales, valina, fenilalanina, histidina, treonina, isoleucina, leucina, metionina, lisina y el triptófano (Cuadro 4). Los aminoácidos esenciales son primordiales para el

desarrollo de las células cerebrales (proceso de aprendizaje, memorización, raciocinio, crecimiento físico).

La Cañihua tiene un alto contenido de proteínas (18.8%) comparado con otros cereales, como se aprecia en el cuadro 5.

Las proteínas de quinua y de cañihua, son principalmente del tipo albúmina y globulina, éstas tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales parecida a la composición de aminoácidos de la caseína, proteína de la leche (Repo-Carrasco, 1992) (Cuadro 6)

**Cuadro 4: Contenido de aminoácidos en los granos andinos
(mg de aminoácido/16 g de nitrógeno)**

Aminoácido	Quinua	Kañiwa	Kiwicha	Arroz	Trigo
Ácido aspártico	7,8	7,9	7,4	8	4,7
Treonina	3,4	3,3	3,3	3,2	2,9
Serina	3,9	3,9	5	4,5	4,6
Ácido glutámico	13,2	13,6	15,6	16,9	31,3
Prolina	3,4	3,2	3,4	4	10,4
Glicina	5	5,2	7,4	4,1	6,1
Alanina	4,1	4,1	3,6	5,2	3,5
Valina	4,2	4,2	3,8	5,1	4,6
Isoleucina	3,4	3,4	3,2	3,5	4,3
Leucina	6,1	6,1	5,4	7,5	6,1
Tirosina	2,5	2,3	2,7	2,6	3,7
Fenilalanina	3,7	3,7	3,7	4,8	4,9
Lisina	5,6	5,3	6	3,2	2,8
Histidina	2,7	2,7	2,4	2,2	2
Arginina	8,1	8,3	8,2	6,3	4,8
Metionina	3,1	3	3,8	3,6	1,3
Cistina	1,7	1,6	2,3	2,5	2,2
Triptófano	1,1	0,9	1,1	1,1	1,2
% de N del grano	2,05	2,51	2,15	1,52	2,24
% de proteína	12,8	15,7	13,4	9,5	14

Fuente: (Repo-Carrasco, 1992)

**Cuadro 5: Composición proximal de cereales y granos andinos
(g/100 g materia seca)**

Especie	Proteína	Grasa	Fibra cruda	Cenizas	Carbohidratos	Calcio	Magnesio
						(mg)	(mg)
Trigo	10,5	2,6	2,5	1,8	78,6	-	-
Cebada	11,8	1,8	5,3	3,1	78,1	26	57
Avena	11,6	5,2	10,4	2,9	69,8	-	-
Centeno	13,4	1,8	2,6	2,1	80,1	-	-
Triticale	14	1,7	2,6	2	78,7	-	-
Arroz	9,1	2,2	10,2	7,2	71,2	39,6	119
Maíz	11,1	4,9	2,1	1,7	80,2	-	-
Sorgo	12,4	3,6	2,7	1,7	79,7	-	-
Quinua	14,4	6	4	2,9	72,6	85	204
Kañiwa	18,8	7,6	6,1	4,1	63,4	157	210
Kiwicha	14,5	6,4	5	2,6	71,5	-	-

Fuente: (Repo-Carrasco, 1992)

**Cuadro 6: Fracciones proteicas de quinua y *Chenopodium pallidicaule aellen*
(Cañihua) (% de proteína total)**

Granos andinos	Albumina + globulinas	Protaminas	Glutelinas + proteínas insolubles
Kañiwa	41	28	31
Quinua	45	23	32

Fuente: (Repo-Carrasco, 1992)

2.3 Lectinas

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas agrupadas por su habilidad de reconocer y unirse a carbohidratos o glicoconjugados con una alta especificidad (Van Damme, Peumans, Pusztai, & Bardocz, 1998).

La capacidad de aglutinar células distingue a estas proteínas de otras macromoléculas capaces de unirse a los carbohidratos. Además, su origen no inmune los diferencia de las inmunoglobulinas anti-carbohidratos que aglutinan las células. Existen lectinas tanto en animales como en organismos sin sistemas inmunes, como plantas y bacterias. (Santos, y otros, 2014)

Las plantas usan metabolitos secundarios o macromoléculas resultantes del metabolismo primario contra microorganismos, insectos, herbívoros o en respuesta al estrés abiótico (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005)

En las plantas, entre las muchas proteínas implicadas en los mecanismos de defensa están las lectinas, las proteínas inactivadoras de los ribosomas (tipos 1 y 2), los inhibidores de la proteasa, los inhibidores de la α -amilasa, las arcelinas, las quitinasas, las quimiolectinas (proteínas como las lectinas monovalentes) canatoxina (proteínas del tipo hemilectinas) (Stanisçuaski, Silva, Mulinari, Alves, & Carlini, 2005)

Las lectinas parecen jugar un papel importante en la protección de la planta contra los depredadores al afectar el crecimiento y desarrollo de los insectos y la presentación de toxinas a los herbívoros. Algunas lectinas son tóxicas, como la lectina de semillas de *Dialium guineense* (Bari, y otros, 2013).

2.4 Recursos genéticos.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) define en su artículo 2 a los «recursos genéticos» como el material genético de valor actual o potencial. En realidad, se trata de cualquier material de origen animal o vegetal, microorganismos u otros que contengan unidades funcionales de herencia. Podría incluir genes, secuencias genéticas, moléculas, extractos biológicos, semillas, plasma, entre otros materiales

Estos recursos no solamente son importantes para algunos campos como la medicina y la agricultura, sino también suponen nuevas formas para el control biológico de las plagas, nuevas formas para conservar alimentos, nuevas alternativas para enfrentar los problemas de contaminación, nuevos cosméticos y fragancias (MINAM, s.f.).

2.5 Plataforma Proteómica

La proteómica ayuda a formar una conexión entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico, formándose así una herramienta útil e importante en el análisis funcional de genes cuya función puede ser desconocida.

Los factores que llevaron al desarrollo de la proteómica:

- La secuenciación de genomas a gran escala y la formación de bases de datos de proteínas.
- El desarrollo de técnicas de espectrometría de masas que se fueron desarrollando para analizar proteínas y péptidos.
- La separación de proteínas mediante 2D-PAGE con la introducción de los gradientes de pH inmovilizados (Gil García, Actualidad SEM, 2003).

El término “Proteoma” fue usado por vez primera en 1995 para describir el conjunto de **PROTE**ínas de un **genOMA**, en una célula o un tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la “Proteómica” (Banks , y otros, 2000).

Proteómica es el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global integrada de los procesos celulares. El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2D-PAGE. Según esto, la proteómica comenzó en los años setenta cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la identificación de las proteínas era difícil debido a la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles para la caracterización de las proteínas. En los años noventa la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que limita la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marca el comienzo de una nueva era. Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, el análisis

funcional de las proteínas y estudios de localización. (Gil García, Actualidad SEM, 2003)

Se puede hablar de dos tipos de proteómica:

a) Proteómica de expresión

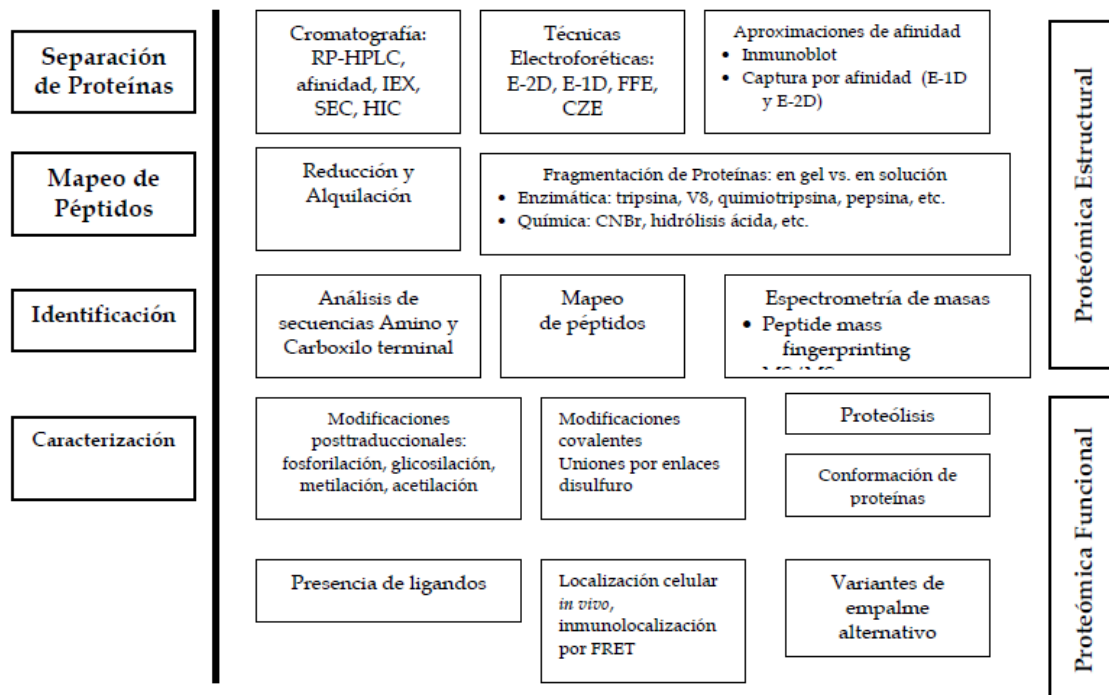
La proteómica de expresión es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. En esta estrategia se compara la expresión del proteoma total o de subproteomas entre diferentes muestras. La información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas en transducción de señales, la identificación de proteínas específicas de una enfermedad y proteínas de interés en microbiología médica. (Gil García, Actualidad SEM, 2003)

b) Proteómica del mapa celular.

La proteómica del mapa celular o estructural es el estudio de la localización subcelular de las proteínas y de las interacciones proteína-proteína, mediante la purificación de orgánulos o complejos y la posterior identificación de sus componentes mediante espectrometría de masas.

También se utiliza el término de proteómica funcional para referirse a diversas aproximaciones proteómicas que permiten el estudio y caracterización de un grupo de proteínas determinado proporcionando información importante sobre señalización, mecanismos de la enfermedad o interacciones proteína-fármaco. (Gil García, Actualidad SEM, 2003)

Figura 3: Estrategias utilizadas en proteómica para la identificación y el análisis de proteínas



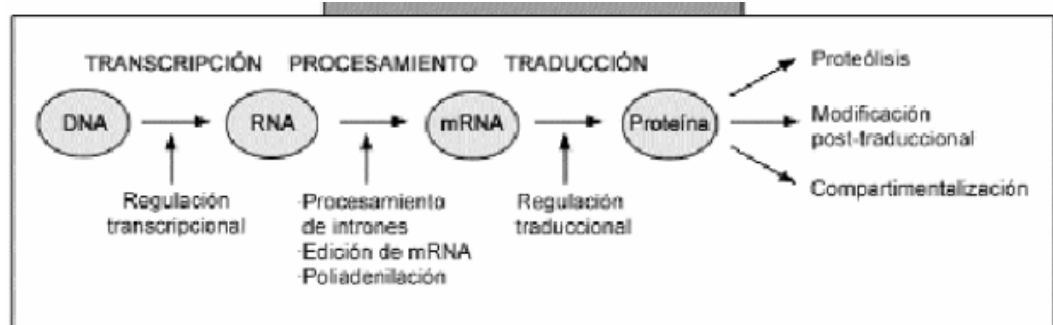
Siglas: (SEC) Size-exclusion chromatography;
(IEX) ion-exchange, chromatography;
(HIC) hydrophobic interaction chromatography;
(FFE) free flow electrophoresis;
(CZE) capillary zone electrophoresis;
(FRET) fluorescence resonance energy transfer.

Para poder desarrollar los ambiciosos objetivos de la proteómica se requiere la implicación de diversas disciplinas como biología molecular, bioquímica, microbiología y bioinformática. Siendo esta última de enorme importancia, ya que será necesario desarrollar ordenadores con una gran capacidad para organizar la gran cantidad de información que se generara en estas investigaciones.

Para caracterizar un proteoma de una célula es importante tener en cuenta que el proteoma es dinámico y que es reflejo del medio ambiente en el que es estudiado.

Como respuesta a estímulos externos e internos, las proteínas pueden ser modificadas post-traduccionalmente, translocadas, sintetizadas o degradadas (*Fig. 4*).

Figura 4: Mecanismos por los que un gen puede dar lugar a múltiples productos génicos



Fuente: (Gil García, Actualidad SEM, 2003)

2.5.1 Tecnología de la proteómica

A pesar de los avances tecnológicos en proteínas, aún existen limitaciones que no permiten realizar diferentes tipos de proteómica.

Las cuatro plataformas de la tecnología proteómica son:

- PRIMERO: Preparación y manejo de la muestra proteómica.
- SEGUNDO: Determinación de la información de la secuencia parcial de aminoácidos
- TERCERO: Identificación y cuantificación de proteínas
- CUARTO: Mapeo celular

2.5.1.1 Separación de proteínas

La electroforesis en geles de poliacrilamida es el método con mayor uso en la separación de proteínas. Esta técnica es la más adecuada en la separación de mezclas complejas de proteínas.

La electroforesis en una dimensión es elegida como el método para muchas aplicaciones proteómicas. Las proteínas son separadas en base a su masa solubilizándolas en dodecil sulfato sódico (SDS), lo cual no genera problemas de solubilización. Esta técnica permite la separación de proteínas de 10-300 KDa. Su aplicación más común después de realizar algún tipo de purificación previa es la caracterización de proteínas.

La electroforesis bidimensional 2D-PAGE permite en un solo experimento separar hasta miles de proteínas, constituyéndose como el método más eficiente en separación de mezclas muy complejas de proteínas. La 2D-PAGE se basa en una separación de proteínas en función de la carga, seguida de una separación de las proteínas en función de su masa molecular. La primera separación se realiza mediante isoelectro enfoque, aquí las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición donde su carga neta es cero (punto isoelectro). En la segunda, las proteínas se separan mediante electroforesis en presencia de SDS. La alta resolución de la técnica se debe a que las dos separaciones se basan en parámetros independientes.

El desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) fue un descubrimiento clave para la 2D-PAGE ya que elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga que si se asociaban a los gradientes de pH preparados con anfolitos acarreadores..

En los geles IPG, son las “inmobilinas” las que generan el gradiente y estas están copolimerizadas con la matriz de acrilamida del gel. Esto permitió mejorar la resolución y reproducibilidad de los geles además de aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada. La reproducibilidad conseguida con los IPGs ha permitido que se comparen mapas entre diferentes laboratorios lo que facilita el intercambio de información.

En la detección de proteínas tradicional se emplea el marcaje radioactivo o la tinción con azul de Coomassie, o con plata, que permite conseguir mayor sensibilidad. El método de tinción de plata superficial es un método con reciente desarrollo, que es compatible con la digestión proteica y la espectrometría de masas, pero el umbral de detección no es tan sensible como el que se sigue con los protocolos de tinción de plata más utilizados. También se han empezado a utilizar tinciones y marcajes fluorescentes (Sypro-Ruby, Cy3, Cy5...) que exhiben un sensibilidad comparable a la plata y permiten mediante espectrometría de masas, el análisis posterior de las proteínas. Adicionalmente se han desarrollado programas para comparar las imágenes

de 2D-PAGE facilitando identificar y cuantificar manchas de proteínas entre diferentes muestras.

La 2D-PAGE se aplica principalmente en la proteómica de expresión, donde la expresión de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma cuantitativa. La aparición o desaparición de manchas facilita información sobre la expresión diferenciable de proteínas y la intensidad de las manchas da a conocer los niveles de expresión.

2.5.1.2 Identificación y caracterización de proteínas

La identificación de proteínas es el primer paso para otros estudios que pueden llegar a la caracterización funcional. Además, en el caso de los geles bidimensionales, esta identificación nos lleva a la creación de mapas de referencia.

Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos:

- La secuenciación del extremo N-terminal,
- Detección con anticuerpos específicos.
- Composición de aminoácidos,
- Co-migración con proteínas conocidas
- Sobre-expresión y delección de genes⁸.

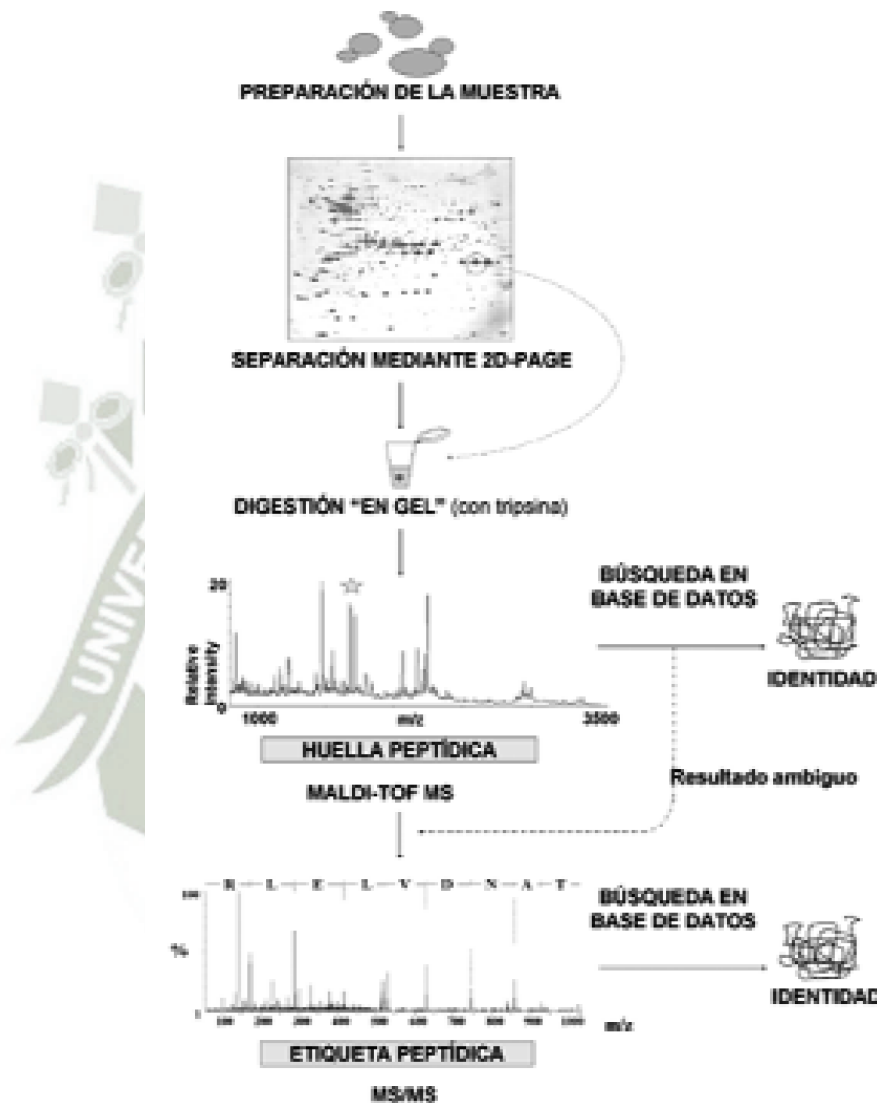
Estos métodos no resultan apropiados para su utilización como estrategias a gran escala.

La espectrometría de masas es un método rápido y de alta sensibilidad empleado para la detección y la identificación de proteínas a gran escala, es el primer paso para el estudio de proteoma de distintos organismos. Adicionalmente permite la caracterización de modificaciones post-traduccionales como la glicosilación y la fosforilación que presentan relevancia fisiológica. La secuencia realizada para la identificación a gran

⁸ Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf

escala de proteínas mediante el empleo de espectrometría de masas se muestra en la Fig 5.

Figura 5: Estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas



Fuente: (Pitarch, Sanchez, Nombela, & Gil, 2003)

El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas se debe al desarrollo de métodos de ionización suave, donde se convierte las biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa. Los espectrómetros de masa presentan una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga (m/z) de los iones en fase gaseosa.

Esta técnica tan robusta implica:

1. Conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa empleando técnicas de ionización suave, como ionización desorción con láser asistida con matriz (MALDI) donde la muestra se encuentra en estado sólido, o la ionización mediante electrospray (ESI) acá la muestra está en solución.
2. Separación de los iones según su m/z en un analizador de masas (analizador tipo ToF (Time of Flight), cuadrupolo, trampa iónica, etc.)
3. Fragmentación opcional de los iones peptídicos.
4. Medición de las masas en un detector donde se obtiene un espectro de masas.

Actualmente se han desarrollado fuentes de MALDI que se acoplan a un analizador QToF o a dos analizadores ToF en tándem (MALDI-ToF/ToF).

Las estrategias para identificación de proteínas son:

- Huella de masas peptídicas (PMF: peptide mass fingerprinting) o mapeo de masas peptídicas utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF.
- Fragmentación de péptidos mediante un espectrómetro de masas en tándem, que permite obtener la secuencia total o parcial de los aminoácidos.

2.6 Electroforesis

Es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional⁹ (García, 2000).

Es de destacar que, a escala analítica, los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras

⁹ GARCÍA, P. H. M., 2000.- Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ. Diag., 1 (2): 31-41.

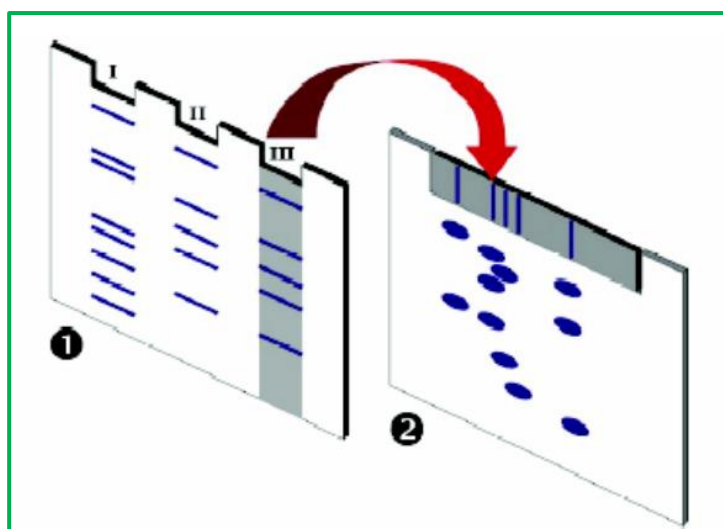
biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza. Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoelectrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (García, 2000).

La mayoría de las biomacromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) poseen determinada carga eléctrica con grupos aniónicos y catiónicos capaces de disociarse. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas. De lo anterior se deduce que el pH influye sobre la velocidad de migración de las moléculas (Nochumson, inventors, & FMC Corporation, 1985). En el punto isoelectrico de la biomolécula, pH al cual su carga neta es 0, esta no migra. Por debajo del punto isoelectrico tiene carga neta positiva y migra hacia el cátodo, y por encima del punto isoelectrico tienen carga neta negativa y migra hacia el ánodo.

2.6.1 Electroforesis bidimensional

Es la aplicación de dos electroforesis distintas que se realizan a una misma muestra. En la primera (primera dimensión) son separados los componentes de la muestra según (carga, tamaño o pI), y en la segunda (segunda dimensión) son separados según un parámetro distinto del anterior. Consiguiéndose el máximo de resolución mediante técnicas electroforéticas.

La electroforesis bidimensional suele referirse a la combinación de dos tipos de electroforesis con mayor resolución: electroenfoque (primera dimensión) y SDS-PAGE (segunda dimensión) (*Fig. 6*).

Figura 6: Electroforesis bidimensional

Fuente: Protocolo y Técnicas CULTEK¹⁰

En la figura se muestra una electroforesis bidimensional donde:

❶ Primera dimensión (SDS-PAGE). En este gel se aplica el marcador de pesos moleculares en el pocillo I y la muestra en los pocillos II y III. Posteriormente el carril del pocillo III) se corta y se coloca en un nuevo gel ❷ que se ha polimerizado sin pocillos, acá se desarrolla la segunda dimensión (EEF) perpendicularmente a la primera. Se puede observar que algunas bandas producen más de una mancha en la segunda dimensión.

En la electroforesis bidimensional la aparición de una sola mancha indica una muestra homogénea, esto es debido a la pureza y gran poder de resolución de la técnica.

¹⁰ Electroforesis de proteínas. <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/soluciones-electroforesis-protocolos.pdf>

2.7 Estructura de las proteínas

2.7.1 Fragmentación de proteínas

En la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) se requiere que la muestra esté fragmentada en sus constituyentes peptídicos sea por métodos químicos o enzimáticos.

Los enlaces disulfuro presentes en la estructura de las proteínas no se digieren, y los que si producen mezclas de péptidos muy complejas. Por todo esto antes de llevar a cabo la digestión, es necesario reducir y alquilar los residuos de cisteína en las proteínas que han sido resueltas por electroforesis.

Para que la proteína se despliegue de tal forma que mejore el rendimiento en el proceso de digestión se debe seguir 2 pasos:

- *Primero:* reducir el enlace disulfuro
- *Segundo:* alquilar los grupos tiol de los residuos de cisteína.

2.7.1.1 Proteólisis

El método más utilizado en proteómica para el rompimiento de proteínas es la fragmentación enzimática debido a la gran variedad de enzimas existentes. Este método ofrece alta especificidad y eficiencia en el rompimiento de las proteínas, además de un mínimo de reacciones laterales.

2.7.1.1.1 Digestión en solución

La digestión de proteínas puede realizarse ya sea en solución o en gel. La digestión en solución presenta el problema de que la electroelución de una proteína desde la matriz de un gel de poliacrilamida hacia la solución de digestión es difícil y varía de proteína a proteína.

2.7.1.1.2 Digestión en gel

La digestión en gel se utiliza de manera rutinaria en proteínas separadas mediante electroforesis en 2D. Se ha reportado que utilizando este

procedimiento es posible fragmentar cantidades tales como 10 pmoles de proteína; sin embargo, al emplear cantidades por debajo de 5 pmoles se observa una disminución significativa en la producción de péptidos.

En 1996, Wilm et al. reportaron que la digestión de proteínas en geles teñidos con azul de Coomassie y plata era compatible con el análisis de proteínas por MS; mientras que Shevchenko et al. demostraron que al teñir con plata se podía omitir el uso de glutaraldehído (que reacciona con los grupos amino libres de las proteínas) sin afectar la sensibilidad de visualización de las proteínas y favoreciendo el análisis por MS.

Independientemente del método de visualización, es importante que el desteñido de las proteínas se realice de manera correcta antes de la digestión. Si no se remueve el azul de Coomassie de la muestra se afectará la eficiencia de digestión de la tripsina ya que éste se une a los residuos básicos de las proteínas. La presencia de iones de plata, de azul de Coomassie, y de detergentes como el SDS (que se ioniza fácilmente) puede afectar también el análisis de MS.

La proteína de interés se recupera del gel cortando la banda manualmente, aunque existen también sistemas automatizados. Antes de añadir la enzima al fragmento de gel con la proteína de interés, éste se deshidrata mediante lavados sucesivos con acetonitrilo y posteriormente se seca al vacío. Este paso favorece que la enzima se incorpore eficientemente por difusión cuando el gel es rehidratado con el buffer de digestión. Una vez llevada a cabo la reacción enzimática los péptidos producidos se extraen de la matriz del gel por difusión utilizando solventes orgánicos y ácidos, entre ellos el ácido trifluoroacético y el acetonitrilo. Para eliminar eficientemente sales, buffers y contaminantes de los péptidos extraídos de la matriz del gel se utilizan columnas de cromatografía en fase reversa (RP-HPLC). Una vez eliminados los contaminantes, las muestras están listas para ser analizadas por MS si se encuentran en la concentración requerida por el método.

Las proteínas resueltas en geles de poliacrilamida pueden también ser transferidas por electroblotting a membranas con tripsina inmovilizada donde se lleva a cabo su fragmentación.

2.7.1.2 Rompimiento químico

Los métodos químicos son complementarios a la proteólisis, y aunque no siempre se utilizan tienen aplicaciones específicas en casos donde la proteólisis no es apropiada o no se cuenta con la enzima adecuada. El rompimiento químico presenta varias desventajas, entre ellas: baja eficiencia de corte, inespecificidad en el corte con la mayoría de los métodos y reacciones laterales indeseables. Un método que presenta una excelente especificidad de corte es el rompimiento con bromuro de cianógeno (CNBr), que se utiliza para cortar proteínas insolubles o de membrana generando péptidos relativamente largos. En el siguiente cuadro se muestran los métodos químicos empleados más comúnmente para digerir proteínas.

Cuadro 7: Agentes químicos utilizados frecuentemente en fragmentación de péptidos

Agente químico	Sitio de corte	Observaciones
Bromuro de cianógeno (CNBr)	C- terminal de Metionina	Excelente especificidad y rendimiento de corte. Exceso de CNBr puede causar rompimiento en residuos de Y y W.
Hidrólisis ácida (ácido fórmico)	Residuos de Aspartil	Rompimiento específico.
Hidroxilamina	Enlaces Asn-Gly	Algunos enlaces Asn-X se pueden romper.
BNPS-skatole	Triptofano	Inestable en condiciones ácidas.

Fuente: (Global Mass Spec Sales & Service, s.f.)

2.8 Espectrometría de masas

Mediante espectrometría de masas es posible obtener información estructural de las proteínas tal como secuencia de aminoácidos y la masa de los péptidos. Esta información puede utilizarse para identificar proteínas comparando los resultados con bases de datos. La espectrometría de masas también resulta útil para identificar y localizar modificaciones post-traduccionales en las proteínas. La recolección de

información por medio de MS se podría dividir en las 3 etapas que se mencionan a continuación.

2.8.1 Preparación de la muestra

Como se mencionó previamente, la proteína se resuelve de una mezcla proteica empleando generalmente técnicas electroforéticas. Debido a que la conversión de la proteína en sus constituyentes peptídicos proporciona mayor información que la obtenida con la proteína completa es necesario llevar a cabo una fragmentación de la misma por los métodos que ya se describieron en este trabajo. Una vez obtenidos los constituyentes peptídicos estos pueden ser purificados por RP-HPLC, utilizando ZipTips (Millipore) o material de perfusión Poros R2 (PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass). (Fig. 5)

2.8.2 Ionización de la muestra

Para el análisis de muestras biológicas por MS es necesario que las moléculas estén cargadas eléctricamente y secas. Este requisito se cumple convirtiendo las moléculas en iones desolvatados. Han sido varias las técnicas que se han desarrollado con este fin, las primeras de ellas se basaron en el impacto de electrones y en la ionización química.

Estas técnicas resultaron efectivas para ionizar moléculas pequeñas pero no para la ionización de moléculas de alto peso molecular, como las biomoléculas. La espectrometría de masas se revolucionó en 1981 gracias a la introducción del bombardeo rápido de átomos (FAB, fast atom bombardment) por Barber. Esta técnica permitió la ionización y detección de biomoléculas con relativamente buena sensibilidad. Hoy en día, los métodos más comúnmente empleados para generar iones desolvatados son el MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) y el ESI (electrospray ionization), estos han reemplazado por completo al FAB. Tanto el MALDI como el ESI son métodos de ionización suaves donde se mantiene relativamente la integridad de la muestra.

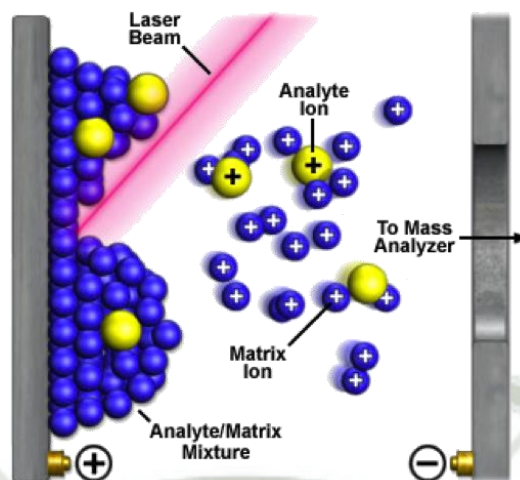
2.8.2.1 MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization)

Este método fue introducido en 1988 por Karas y Hillenkamp. En el MALDI la muestra se incorpora en una matriz de moléculas y posteriormente es sometida a radiación con un láser. El láser promueve la formación de iones moleculares. La matriz, capaz de absorber luz de la longitud de onda emitida por el láser, está constituida por una molécula pequeña tal como el ácido 2,5-dihidroxibenzóico, el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico o el ácido sinapínico. Tanto la muestra como la matriz se colocan en una placa de metal y se dejan evaporar, propiciando la formación de cristales. La placa de metal se coloca en el espectrómetro y el láser es dirigido automáticamente a sitios específicos de la placa.

La luz emitida por el láser, generalmente con una longitud de onda de 337 nm, causa la desorción y la ionización de la muestra tanto por protonación como por desprotonación generando iones predominantemente monovalentes. Los iones producidos son posteriormente acelerados hasta el analizador.

El proceso puede estar automatizado desde la aplicación de la muestra hasta la recolección y el análisis de los datos, lo que constituye la principal ventaja del MALDI.

Adicionalmente, no siempre es necesario que las muestras a analizar sean sometidas procesos de purificación después de la digestión en gel, lo que constituye otra ventaja de este método sobre el ESI.

Figura 7: Ionización por MALDI

Fuente: (National High Magnetic Field Laboratory, s.f.)¹¹

2.8.3 Análisis de masa

Una vez que las proteínas o péptidos se convierten en iones moleculares, estos son acelerados desde la fuente de iones hacia el analizador de masa donde los iones son separados de acuerdo a su relación carga-masa (m/z) en el vacío.

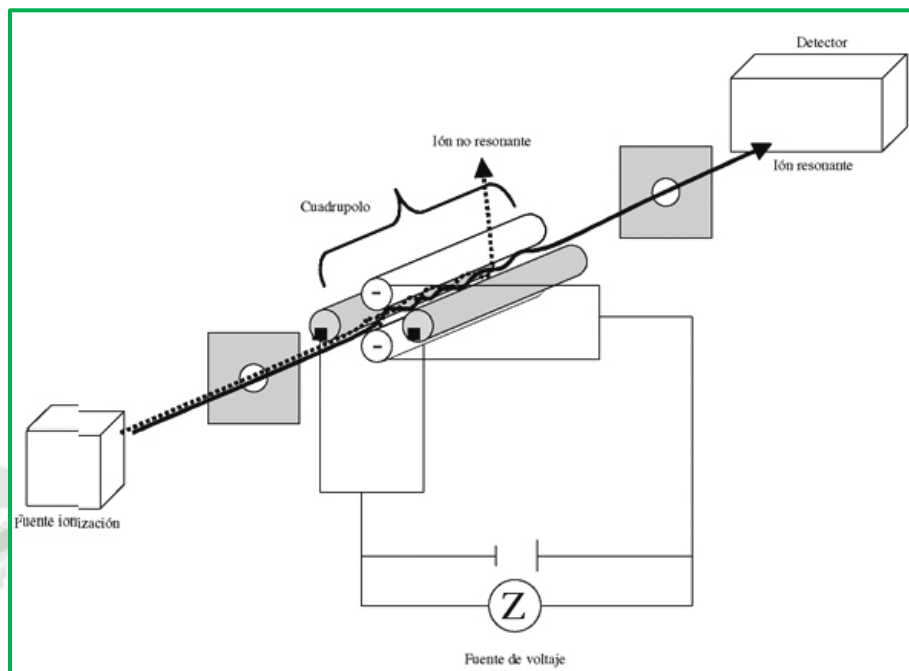
2.8.3.1 Analizadores cuadrupolo

Este analizador de masas es el más común. En la figura 8 se observa que en el analizador cuadrupolo, los iones son conducidos a través de un campo eléctrico formado por el cuadrupolo que son 4 barras metálicas paralelas. Un cuadrupolo actúa como un filtro másico permitiendo la transmisión de iones con una cierta relación m/z o bien puede transmitir todos los iones. Un solo analizador de cuadrupolo en análisis de proteómica, nos brinda información útil, pero al combinar tres cuadrupolos como se observa en la figura 9 y acoplarlos a un sistema de ESI podemos obtener información sobre la secuencia de amino ácidos de un péptido. Donde el primer y tercer cuadrupolo operan como filtros de masa, y el segundo funciona como una

¹¹ National High Magnetic Field Laboratory <http://www.magnet.fsu.edu>

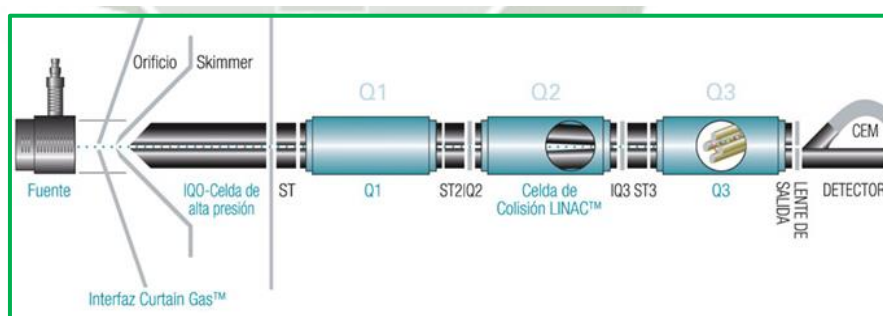
celda de colisión, donde se origina la información sobre la estructura proteica. Esta configuración es denominada “tandem space” o MS/MS.

Figura 8: Analizador de iones de cuadrupolo



Fuente: Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria^{12, 13}

Figura 9: Configuración de un analizador de cuadrupolo triple



Fuente: (Guía de productos para Laboratorios analíticos, s.f.)¹⁴

¹² Romero R., Fernández J.L., Plaza P., Garrido A. y Martínez J.L; Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. Rev. Esp. Salud Publica vol.81 no.5 Madrid sep./oct. 2007

¹³ Núñez O, Moyano E y Galcerán MT. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. Trends Anal Chem. 2005; 24:683-703

¹⁴ Guía de productos para Laboratorios analíticos:

http://www.gualab.com.ar/imprimir_art.php?idm=1022&accion=imprimir

Analizador de tiempo de vuelo (ToF)

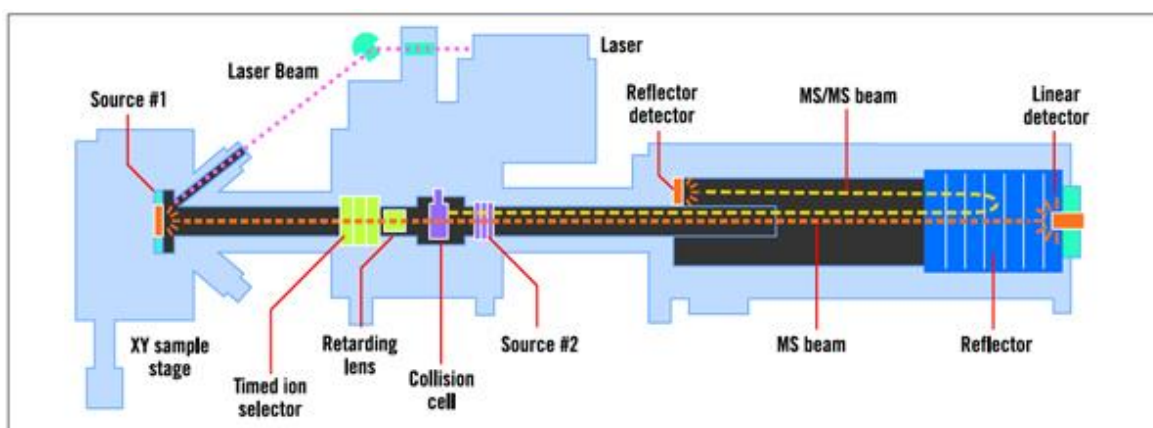
Éste es uno de los analizadores más simples. Mide la relación m/z de un ión determinando el tiempo requerido para recorrer la longitud de un tubo de vuelo desde que el ión abandona la fuente de iones; el ión es impulsado con una velocidad inicial, la cual depende directamente de su masa. El tiempo de vuelo del ión es proporcional a la raíz cuadrada de su relación m/z dada una aceleración constante provocada por el voltaje.

$$\text{Tiempo de vuelo} = k \sqrt{(m/z)}$$

Algunos analizadores de masa de ToF incluyen un espejo de iones o reflectrón al final del tubo de vuelo, el cual repele los iones a través de este tubo y los dirige al detector. De esta forma, se ve incrementada la longitud del tubo de vuelo con lo que mejora la resolución.

El reflectrón sirve también para corregir las pequeñas diferencias en la energía cinética (E_c) que existe entre iones de la misma masa. Estas diferencias se deben a la posición que guarda cada ión en la fuente de iones al momento de que son acelerados al aplicar una diferencia de potencial.

Las diferencias en la energía cinética de los iones se reduce debido a que los iones con E_c mayor viajan más lejos en el reflectrón que los iones con E_c menor. Esto ocasiona que los iones con la misma masa se enfoquen mejor en el detector mejorando considerablemente la resolución y la precisión del cálculo de masas.

Figura 10: Analizador de tiempo de vuelo

Fuente: (Global Mass Spec Sales & Service, s.f.)¹⁵

Los espectrómetros de masa con analizadores de tiempo de vuelo acoplados a sistemas de ionización MALDI se denominan espectrómetros MALDI-ToF. Estos se utilizan principalmente en fingerprinting de péptidos y se usan como herramienta primaria en la identificación de proteínas debido su velocidad. Un sistema MALDI-ToF sirve para obtener la secuencia de péptidos empleando la técnica de decaimiento post - fuente (post source decay, PSD)

3. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS:

Publicación: Ficha Técnica Kañiwa. Cultivos Andinos Lima 2008

Autor: Ministerio de Agricultura. MINAGRI

Ficha: *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), es una hierba cuyo tamaño oscila entre los 0,2 y 0,6 m. Se han identificado alrededor de 380 tipos en Puno y éstos se encuentran en etapa de evaluación. Sus orígenes son inciertos; pero es casi seguro que es nativa de los Andes. Todos los genotipos investigados son indiferentes a las condiciones de luz solar. En un campo en Finlandia, 35 ecotipos (coleccionados de Puno, Perú) producen granos a una latitud de 60°49'N, y 5 ecotipos producen a 64°41'N.

¹⁵ Global Mass Spec Sales & Service: <http://www.krssltd.com/used-refurbished-mass-spectrometer/maldi/applied-biosystem-api4700>

La planta requiere de un ambiente húmedo en el período de crecimiento y es resistente a las sequías en su madurez. En el Altiplano la temperatura media oscila entre 14 y 18°C, pero la kañihua puede resistir ambientes relativamente cálidos, de alrededor de 25° C, si cuenta con la humedad necesaria. La kañihua responde bien al nitrógeno y al fósforo, esto a pesar de que en los Andes los fertilizantes son poco utilizados. Las semillas de kañihua ofrecen un alto contenido proteico para las dietas escasas en carnes. Además poseen un balance de aminoácidos de primera línea siendo particularmente rica en lisina, isoleucina y triptofano. Esta calidad proteica en combinación con un contenido de carbohidratos del orden del 60% y aceites vegetales del orden del 8%, la hacen altamente nutritiva (MINAGRI Ministerio de Agricultura, 2008).

Investigación: Estudios Estructura y Función de una Lectina Aislada de Semillas de *Caesalpinia Spinosa* Kuntze (Tara) Chile 2007 (Mendoza, Gandolfo, Ponce, Novello, & Marangoni, 2007)

Autor: Werner Mendoza; Laura Gandolfo; Luis Ponce; José Novello; Sergio Marangoni

Resumen

Una lectina de semillas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Tara; Caesalpinaceae, Leguminosae) fue purificada y caracterizada a través de extracción salina, por combinación de dos cromatografías de exclusión molecular y HPLC de fase reversa. El análisis en SDS-PAGE demostró que la lectina purificada era homogénea ya que ésta presentó una sola banda de proteína correspondiente a un tamaño molecular de 29 kDa. La lectina de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (CsLEC) fue capaz de aglutinar eritrocitos del grupo sanguíneo humano “B” Rh+ con una CMH de 3,86 µg/ml y esta actividad fue inhibida por D-glucosa, D-manosa, D-maltosa, D-glucosamina, N-acetil glucosamina (3,25 mM) y el agente quelante EDTA (0,31 mM), lo que sugiere que puede ser considerada como una lectina tipo C que depende de iones divalentes como calcio y manganeso. El análisis completo de aminoácidos reveló que CsLEC es ácida y sumamente hidrofóbica (16,3% residuos ácidos, 8,9% básicos, 17,0% neutros y 57,8% residuos hidrofóbicos), prevaleciendo la fenilalanina (Phe, 22,1%). Comparación de la secuencia aminoacídica con otras secuencias de vegetales determinó que CsLEC tiene homología con lectinas de la familia Leguminosae,

mostrando una semejanza del 67,9% con la leucoaglutinina de *Maackia amurensis* (Fabaceae, Papilionoideae) con sialilactosa y el precursor de la lectina de *Maackia amurensis*.

Su genoma es aún desconocido, sin embargo por su resistencia a plagas, se convierte en un modelo biológico de estudio por su posible expresión de proteínas que actúan en el mecanismo de defensa de las plantas, tales como las lectinas e inhibidores de serinoproteasas. El grupo de proteínas más relacionadas con este efecto insecticida son las denominadas lectinas o fitohemaglutininas (Osborn, Alexander, Sun, Cardona, & Bliss, 1988) (Osborn, Burow, & Bliss, 1988)

Las lectinas son proteínas pertenecientes al grupo de las lectinas, son proteínas de almacenamiento relacionadas genéticamente con el complejo locus de lectinas Arcelina – Phitohemaglutinina - inhibidor de alpha-amylasa (APA). A diferencia de las lectinas, las Arcelinas tienen diferente especificidad intrínseca por los complejos de azúcares, lo cual genera un mecanismo diferente de toxicidad por ejemplo en los bruquidios (Fabre, y otros, 1998).

Las propiedades tóxicas de las lectinas se cree están relacionadas a la habilidad de reconocer e interactuar con otras glico-proteínas, constituyentes de las membranas y células del tracto digestivo de los insectos (Minney, y otros, 1990) (Fabre, y otros, 1998) (Paes, y otros, 2000)

Las técnicas de electroforesis en una y dos dimensiones han sido utilizadas para distinguir entre genotipos de diverso origen de especies, tal es el caso de las diferencias encontradas entre genotipos Andinos y mesoamericanos, los cuales pueden ser distinguidos unos de otros por la movilidad electroforética de proteínas como Phaseolina (Gepts, Osborn, Rashka, & Bliss, 1986) (Gepts & Bliss, 1986)

Sin embargo, hay muy poca información acerca del uso de técnicas de proteómica (geles bidimensionales y Espectrometría de masas) para la identificación de proteínas insecticidas en granos de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua).

El presente trabajo representa la primera aproximación en inmuno-proteómica utilizada para caracterizar la presencia de lectinas en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), como un aporte a futuro en la caracterización de los mecanismos de resistencia a plagas.

4. OBJETIVO GENERAL:

Identificar lectinas de *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), por análisis inmuno-proteómico y estudiar por análisis bioinformático su Bioprospección en el mecanismo de defensa de las plantas.

5. Objetivos Específicos

- a. Purificar y caracterizar estructuralmente lectinas presentes en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua), por cromatografía líquida en columnas de hidrofobicidad HiTRAP.
- b. Determinar su relación masa y punto isoeléctrico por electroforesis bidimensional (2D).
- c. Determinar por Inmunodetección la presencia de lectinas presentes por electrotransferencia (Western blot).
- d. Secuenciar las lectinas presentes en Cañihua (*Chenopodium pallidicaule aellen*), por espectrometría de masa MALDI TOF/TOF.
- e. Realizar un análisis bioinformático de las secuencias encontradas en el contexto del mecanismo de defensa de las plantas, desde una Bioprospección.

6. HIPÓTESIS:

NO EXISTE la presencia de lectinas en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) Arequipa 2016.

SI EXISTE la presencia de lectinas en *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) Arequipa 2016.

III. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN:

1.1 Instrumentos:

- Perfiles cromatográficos.
- Geles de poliacrilamida.
- Espectros de masas.

1.2 Materiales:

- Columnas cromatográficas HITRAP de hidrofobicidad.
- Equipo de electroforesis de proteínas.
- Espectrómetro de masas.

1.3 Técnicas:

1.3.1 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Las lectinas procedentes de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule aellen*), son purificadas en columnas del sistema HITrap (H&C USA.) El sistema cromatográfico usado es el de cromatografía convencional. Son colectadas fracciones de 1 mm por tubo determinándose la presencia de proteínas. Las fracciones que exhiben mayor actividad hemaglutinante, son empleadas para la obtención del “pool” y guardadas a 0°C.

1.3.2 Electroforesis en PAGE-SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida es realizada siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) en que las placas de poliacrilamida (PAGE) son preparadas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5% y un gel de corrida de 12,5%. Las placas fueron preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % fue preparado usando un tampón Tris-HCl 0.5M de pH = 6,8 y el gel de corrida fue preparado

usando tampón Tris-HCl 1M de pH = 8,8. A ambos geles se les agregó SDS al 20% en cantidad suficiente para llevar a una concentración final de 0.5% (v/v).

La corrida electroforética es realizada en un sistema doble de miniplacas SE 250 Mighty Small II (Hoeffer scientific instruments). Tanto las muestras y los marcadores de masa molecular fueron disueltos en tampón de muestra (Tris-HCl 0,075M; pH = 6,8; 10% glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol). La corrida electroforética fue realizada a 30 mA. Los geles son coloreados con solución de Comassie Blue 0,05% a 37°C, y el exceso de colorante será removido con ácido acético al 7%.

1.3.3 Geles bidimensionales (2-DE)

Según O`Farrell (1975) los geles en dos dimensiones serán realizados de la siguiente manera:

Para la primera dimensión se utilizarán tiras de gradiente de pH IpG de General Electric (Estados Unidos), con un rango de pH distribuido linealmente entre 3 y 10, de siete centímetros de longitud. El protocolo para el uso de estas tiras comprende tres pasos:

- **Rehidratación:** 18 horas en una solución buffer DeStreak™ (GE Health Care Amersham Biosciences) que contiene: urea, tiourea, CHAPS y 1% de anfólitos con rango lineal de pH 3 a 10; en esta solución se disolvieron los extractos proteicos de los endospermos. En cada caso se colocó un volumen de extracto que correspondía aproximadamente a 15 µg de proteínas.
- **Equilibración:** dos incubaciones de 15 minutos cada una con ditiotreitól al 1% en buffer de equilibrio (úrea, Tris-HCl, glicerol, SDS y azul de bromofenol) y otra con una solución de iodoacetamida al 4% en buffer de equilibrio.
- **Enfoque:** Finalmente las tiras se colocarán en una cámara de isoelectroenfoque utilizando el equipo Ettan IPGphor (GE Health Care Amersham Biosciences) y las especificaciones del fabricante.

Para la segunda dimensión, las tiras serán acopladas a geles de poliacrilamida al 12% y de 1 mm de espesor (según indicaciones antes mencionadas) con agarosa 0,5% y se realizará la electroforesis en una cámara Mini-protean II BIORAD. Utilizando buffer Tris-glycine-SDS a 200V. Los spots de proteínas fueron visualizados con tinción de plata PlusOne™ (Amersham Bio-Sciences). Los geles serán realizados por triplicado para cada ensayo (O'Farrel, 1975).

1.3.4 Inmunoensayos

Posterior a la electroforesis 2-D SDS-PAGE las proteínas serán transferidas a membranas de nitrocelulosa a 100 V por 1 h para los análisis de Western blot. La membrana será teñida con rojo Ponceau para observar los spots de proteínas transferidos. Las membranas serán incubadas por 1 hora en solución de bloqueo compuesta por 2% leche descremada en buffer Tris- salino (TBS) con 0.5% Tween-20 (TTBS). Luego serán incubadas con anticuerpos (1:6000 en TBST) para lectinas (Sparvoli & Bollini, 1998) durante una hora. El inmuno-suero será pre-absorbido toda la noche con 100mg de harina de una variedad de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule aellen*) carente de lectinas, a fin de eliminar reactividad cruzada inespecífica del anticuerpo (Lioi, Sparvoli, Galasso, Lanave, & Bollini, 2003).

La unión de los anticuerpos a la membrana será detectada con anticuerpos secundarios (1:2000 en TTBS) conjugados con peroxidasa de rábano y revelados usando el kit comercial ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences), y siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal quicio-luminiscente de las manchas será detectada por el equipo QuimiDoc Bio-Rad (Bio-Rad, Munich, Germany).

1.3.5 Análisis de Imágenes

Una vez teñidos los geles, se llevará a cabo un análisis comparativo de los mismos, para ello se fotografiarán con un equipo Perkin Elmer (Waltham MA, Estados Unidos) modelo ProXCISION. Las imágenes digitales obtenidas fueron analizadas empleando el programa Phoretix 2D versión 2004. Este programa, mediante la comparación de imágenes digitales de los diversos geles, permitirá

analizar los geles de electroforesis bidimensionales de los granos y determinar la presencia de manchas o spots comunes. Como criterios que permitirán ubicar las zonas de las imágenes de los geles donde se ubicarán las proteínas de interés, el resultado del inmuno-ensayo también será digitalizado e introducido como referencia en el análisis de los geles, y se utilizarán valores teóricos de punto isoelectrico y masa molecular para calibrar todo el experimento.

1.3.6 Caracterización estructural

Los estudios necesarios para la caracterización estructural de lectinas procedentes de Cañihua (*Chenopodium pallidicauleaellen*), son realizadas en el LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncroton), a través del LNBio (Laboratório Nacional de Biociências) junto al Portal de Serviços del Laboratório de Espectrometría de Masas.

La determinación de la masa total y el estudio de homología secuencial de los diferentes péptidos obtenidos por clivajes enzimáticos serán analizados por espectrómetros acoplados a sistemas de cromatografía de alto desempeño y serán utilizados con fuentes de ionización tipo Maldi (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) y nanoelectrospray (ESI). Para el estudio del alineamiento de los fragmentos peptídicos será utilizado bancos de datos, dentro de ellos el NCBI-BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman , 1990).

1.3.7 Concepción del modelo estructural tridimensional

A partir de los resultados obtenidos anteriormente será posible obtener un modelo tridimensional con auxilio de diversos programas de bioinformática (Chimera). Así será posible comparar el modelo estructural de secuencias de aminoácidos con otras secuencias ya depositados en bancos de datos, las mismas que posean hemaglutinante.

Las bases a consultar son:

ExpASy Molecular Biology Server:

Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V,

Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res*, 40(W1):W597-W603, 2012. Disponible en <http://www.expasy.org>

EMBL Nucleotide Sequence Database:

Kulikova T1, Aldebert P, Althorpe N, Baker W, Bates K, Browne P, van den Broek A, Cochrane G, Duggan K, Eberhardt R, Faruque N, Garcia-Pastor M, Harte N, Kanz C, Leinonen R, Lin Q, Lombard V, Lopez R, Mancuso R, McHale M, Nardone F, Silventoinen V, Stoehr P, Stoesser G, Tuli MA, Tzouvara K, Vaughan R, Wu D, Zhu W, Apweiler R. EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res*.2004;Jan 1;32(Database issue):D27-30. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681351>
<http://www.ebi.ac.uk>

SWISS-2DPAGE: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database:

R D Appel, J C Sanchez, A Bairoch, O Golaz, F Ravier, C Pasquali, G J Hughes, and D F Hochstrasser. SWISS-2DPAGE: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Resv*. 22(17); 1994 SepPMC308325. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308325/>
<http://www.expasy.ch/ch2d/>

SWISS-PROT: Annotated protein sequence database Disponible en:

<http://www.expasy.ch/sprot/>
<http://www.uniprot.org/>
http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html

WORLD-2DPAGE: Index to 2-D PAGE databases and services Disponible en:

<http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>
<http://www.proteome.com/comments.html>
<http://www.proteomics.com/>

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN:

2.1 Ubicación espacial:

- Ciudad de Arequipa - Perú. Laboratorio Química Biológica y E.A.P. de Biología. Bajo colaboración Dr. Ronald Navarro Oviedo UNSA 2016
- Ciudad de Sao Paulo - Brasil: Laboratorio de química de proteínas. Instituto de Biología. Dpto. Bioquímica UNICAMP 2016.

2.2 Ubicación Temporal:

Setiembre, octubre y noviembre del 2016.

2.3 Población

Muestras: Se utilizarán semillas de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule aellen*).
Variedad: Illpa INIA-406

2.4 Estrategia de recolección de datos:

∞ **Organización:**

- Se desarrolló el Proyecto de Tesis con la asesoría del docente Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D., encargado del curso metodología de la investigación científica.
- Se eligió como asesor al mismo docente.
- El Proyecto de Tesis de Maestría será revisado y aprobado por los dictaminadores designados por la unidad de pos grado de la Universidad Católica de Santa María.
- La parte experimental se realizará en diferentes laboratorios, del Perú y Brasil, bajo la supervisión de Prof. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.
- Se tabularan los resultados utilizando diversos software de análisis proteómico y bioinformático.
- Se realizara el informe final respectivo.

2.5 Recursos:

Humanos: El investigador.

2.6 Criterios para el manejo de resultados:

Como se mencionó se utilizará varios software, tales como:

- DNA Star
- Protein Pilot
- Quimera.

IV. CRONOGRAMA DE TRABAJO:

Cuadro 8: Cronograma de Trabajo

ACTIVIDAD	Setiembre 2016			Octubre 2016			Noviembre 2016		
	Etapas			Etapas			Etapas		
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA	X								
ELABORACION DE PROYECTO DE TESIS	X								
APROBACION DE PROYECTO DE TESIS	X								
ENSAYOS PREVIOS CROMATOGRAFIA LIQUIDA.			X						
ELECTROFORESIS SDS-PAGE				X					
ESPECTROMETRIA DE MASAS Y ANALISIS BIOINFORMATICO					X				
ANALISIS DE RESULTADOS						X			
REDACTAR EL INFORME FINAL							X	X	X

Fuente: Elaboración propia 2016

V. PRESUPUESTO

Cuadro 9: Presupuesto

ITEM	COSTO (S/.)
1. Purificación por Cromatografía líquida (Hitrap)	1 500.00
2. Electroforesis Bidimensional (2D)	2 900.00
3. Análisis de secuencia por espectrometría de masa	5 000.00
4. Inmunotransferencia	2 500.00
5. Analisis Bioinformatico (DNStar)	1 500.00
6. Imprevistos Material muestras, acondicionamiento de muestras, traslado.	1 000.00
TOTAL	14 400.00

Fuente: Elaboración propia 2016

VI. BIBLIOGRAFÍA

- **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J.** (Oct de 1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol Biol*, 215(3), 403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- **Apaza, V.** (Nov. de 2010). Manejo y Mejoramiento de la Kañiwa. 2, *Ira*, 43. Puno, Perú: Altiplano E.I.R.L. Obtenido de http://www.nuscommunity.org/uploads/tx_news/Libro_Manejo_y_Mejoramiento_Ka%C3%BIiwa.pdf
- **Banks, R., Dunn, M., Hochstrasser, D., Sanchez, J., Blackstock, W., Pappin, D., & Selby, P.** (Nov de 2000). Proteomics: New perspectives, new biomedical opportunities. *The Lancet*, 18(356), 1749-56. doi:10.1016/S0140-6736(00)03214-1
- **Bari, A., Silva, H., Silva, M., Pereira Júnior, F., Cajazeiras, J., Sampaio, A., . . . Cavada, B.** (Aug de 2013). Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect. *J Mol Recognit.*, 26(8), 351-6. doi:10.1002/jmr.2279.

- **Bioersity International.** (2010). Granos Andinos, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. (W. Rojas, J. Soto, M. Pinto, M. Jager, & S. Padulosi, Edits.) Roma. Obtenido de http://www.bioersityinternational.org/uploads/tx_news/Granos_andinos__avances__logros_y_experiencias_desarrolladas_en_quinua__ca%C3%B1ahua_y_amaranto_en_Bolivia_1413.pdf
- **Fabre, C., Causse, H., Mourey, L., Koninkx, J., Rivière, M., Hendriks, H., . . . Rougé, P.** (Feb de 1998). Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-2) seeds. *Biochem J*, 329(3), 551-560. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445382>
- **García, H. M.** (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.*, 1(2), 31-41.
- **Gepts, P., Osborn, T. C., Rashka, K., & Bliss, F. A.** (1986). Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botany*, 40, 451- 468. Obtenido de https://www.jstor.org/stable/4254906?seq=1#page_scan_tab_contents
- **Gepts, P., & Bliss, F. A.** (1986). Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Economic Botany*, 40, 469-478. Obtenido de http://www.jstor.org/stable/4254907?seq=1#page_scan_tab_contents
- **Gil García, C.** (Jun de 2003). La metodología proteómica, una herramienta. *Actualidad - Sociedad Española de Microbiología*(35), 12 - 20. Obtenido de https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM35_11.PDF
- **Gil García, C.** (Jun de 2003). La metodología proteómica, una herramienta. *Actualidad - Sociedad Española de Microbiología*(35), 12-20.
- **Global Mass Spec Sales & Service.** (s.f.). Obtenido de <http://www.krssltd.com/used-refurbished-mass-spectrometer/maldi/applied-biosystem-api4700>

- **Guía de productos para Laboratorios analíticos.** (s.f.). Obtenido de http://www.guialab.com.ar/imprimir_art.php?idm=1022&accion=imprimir
- **Hernandez, J., & León, J.** (1992). *Cultivos Marginados, otra perspectiva de 1492* (Vol. N°26). Roma, Italia: Colección FAO: Producción y protección vegetal . Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-t0646s.pdf>
- **Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- **Lezcano, J.** (1997). Cultivo de Cañihua. *En: IX Congreso Internacional de cultivos Andinos*, 25, 28, 29. Cusco, Perú.
- **Lioi, L., Sparvoli, F., Galasso, I., Lanave, C., & Bollini, R.** (Sep de 2003). Lectin-related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theor Appl Genet*, 107(5), 814-22. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12819911>
- **López, C.** (1993). Exposición a plaguicidas organofosforados. (M. I. Pública, Ed.) *Perspectivas en Salud Pública*(18).
- **Mendoza, W., Gandolfo, L., Ponce, L., Novello, J., & Marangoni, S.** (2007). Estudios Estructura y Función de una Lectina Aislada de Semillas de caesalpinia spinosa kuntze (Tara). *SCIELO-Chile*, 25, 49-58.
- **MINAGRI Ministerio de Agricultura.** (18 de Jun de 2008). Cultivos Andinos. Obtenido de <http://www.minagri.gob.pe/portal/download/pdf/sectoragrario/agricola/lineasdecultivosemergentes/KANIHUA.pdf>
- **MINAGRI Ministerio de Agricultura y Riego.** (2014). Anuario “Producción Agrícola 2014”. 16. Lima, Perú. Obtenido de <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=produccion-agricola>
- **MINAM.** (s.f.). *Ministerio del Ambiente*. Obtenido de Manual de Legislación ambiental:

http://legislacionambientalspda.org.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=50&Itemid=3184

- **Minney, B. H., Gatehouse, A. M., Dobie, P., Dendy, J., Cardona, C., & Gatehouse, J. A.** (1990). Biochemical bases of seed resistance to *Zabrotes subfasciatus* (bean weevil) in *Phaseolus vulgaris* (common bean); a mechanism for arcelin toxicity. *Journal of Insect Physiology*, 36, 757-767. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002219109090049L>
- **Mujica, A., Jacobsen, S., Ortiz, R., Cahuana, A., Apaza, V., Aguilar, P., & Dupeyrat, R.** (2002). La cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en la nutrición humana del Perú. 68.
- **National High Magnetic Field Laboratory.** (s.f.). Obtenido de <http://www.magnet.fsu.edu>
- **Nochumson, S., inventors, & FMC Corporation, a.** (1985). Polyacrylamide cross-linked with a polysaccharide resin as electrophoretic gel medium.US patent 4,542,200. Obtenido de <http://www.google.ch/patents/US4542200>
- **O'Farrel, P.** (1975). High Resolution two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem*, 250, 4007-402. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/236308>
- **Osborn, T. C., Alexander, D. C., Sun, S. S., Cardona, C., & Bliss, F. A.** (1988). Insecticidal activity and lectin homology of Arcelin seed proteins. *Science*(240), 207-210. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17800917>
- **Osborn, T., Burow, M., & Bliss, F. A.** (1988). Purification and characterization of arcelina seed protein from common bean. *Plant Physiology*(86), 399-405. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16665920>
- **Paes, N. S., Gerhardt, I. R., Coutinho, M. V., Yokoyama, M., Santana, E., Harris, N., . . . Grossi de Sá, M. F.** (2000). The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immuno-localization of the arcelin protein. *Journal of Insect Physiology*, 46, 393-402. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770203>

- **Paredes, C. A.** (1967). Estudio Agronómico de la Cañihua. Cusco, Perú: Tesis Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. .
- **Pitarch, A., Sanchez, M., Nombela, C., & Gil, C.** (2003). Analysis of the Candida albicans proteome I. Strategies and applications. *Journal of Chromatography*(B787), 101-128.
- **Ramirez, J., & Lacasaña, M.** (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Riesgos Labor*, 4(2), 67-75. Obtenido de http://www.sistemamid.com/panel/uploads/biblioteca/2014-05-01_11-59-0899004.pdf
- **Red de Acción en Plaguicidas del Reino Unido.** (2009). *Catálogo de listas de plaguicidas que identifican aquellos asociados con impactos particularmente dañinos para la salud o el medio ambiente*. Documento informativo, RAPAL, Uruguay. Obtenido de http://www.rapaluruguay.org/agrotoxicos/Prensa/La_lista_de_listas.pdf
- **Repo-Carrasco, R.** (1992). *Cultivos andinos y la alimentación infantil*. Lima: Comisión de Coordinación de Tecnología Andina, CCTA.
- **Repo-Carrasco, R., Hellström, J., Juha-Matti, P., & Mattila, P.** (2010). Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*, 120, 128–133. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609011662>
- **Rojas, W., & Pinto, M.** (2006). Evaluación del valor nutritivo y agroindustrial de accesiones de quinua y cañahua. En: Rojas W (ed.). Proyecto "Manejo, Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos de Granos Altoandinos en el marco del SINARGEAA". Informe Final 2005-2006. 32-42. La Paz, Bolivia.
- **Santos, A., da Silva, M., Napoleao, T., Paiva, P., Correia, M., & Coelho, L.** (Dec de 2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. (R. Trends, Ed.) *Current Topics in Peptide & Protein Research, Chapter, 15*, 41-62. Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/277708908_Lectins_Function_structure_biological_properties_and_potential_applications

- **Sparvoli, F., & Bollini, R.** (1998). Arcelin in wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds: sequence of arcelin 6 shows it is a member of the arcelins 1 and 2 subfamily. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 383. doi:10.1023/A:1008682917192
- **Stanisçuaski, F., Silva, C., Mulinari, F., Alves, M., & Carlini, C.** (2005). Insecticidal effects of canatoxin on yhe cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera:Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45, 753-60.
- **Tapia, M. E., & Fries, A. M.** (2007). Guia de Campo de los Cultivos Andinos. *Primera*. (F. y. ANPE, Ed.) Lima, Perú. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/010/ai185s/ai185s.pdf>
- **Van Damme, E., Peumans, W., Pusztai, A., & Bardocz, S.** (1998). *Properties and biomedical applications*. In: *A handbook of plant lectins*. Chichester,: UK: John Wiley and Sons.
- **VargasC.** (1938). Nota etnobotánica sobre la Cañihua. *Rev. Arg. Arg.*, 5(4), 224-230.
- **Zhao, J., Davis, L., & Verpoorte, R.** (Jun de 2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv.*, 23(4), 283-333. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003



**ANEXO B: Constancia de uso de los Laboratorios
UNICAMP – BRASIL**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Departamento de Bioquímica



DECLARAÇÃO


Declaro para os fins devidos que, foram realizadas várias técnicas em química de proteínas para os estudos de Aproximação Imuno-proteômica de lectinas presentes em *Chenopodium pallidicaule*.

Essas técnicas incluíram: montagem de coluna para uso em cromatografia convencional, realização da corrida cromatográfica com fluxo constante do solvente obtido por bomba peristáltica, determinação do perfil cromatográfico por leitura ultravioleta nos comprimentos de onda em 220 e 280 nm em espectrofotômetro das frações, separação e purificação dessas proteínas por sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), seqüenciamento de proteínas via espectrometria de massas, liofilização das amostras, preparo de tampões de corrida, dosagem de proteína, preparo de gel para eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE).

Todo este serviço foi solicitado pela Srta. María del Pilar Duran Márquez.

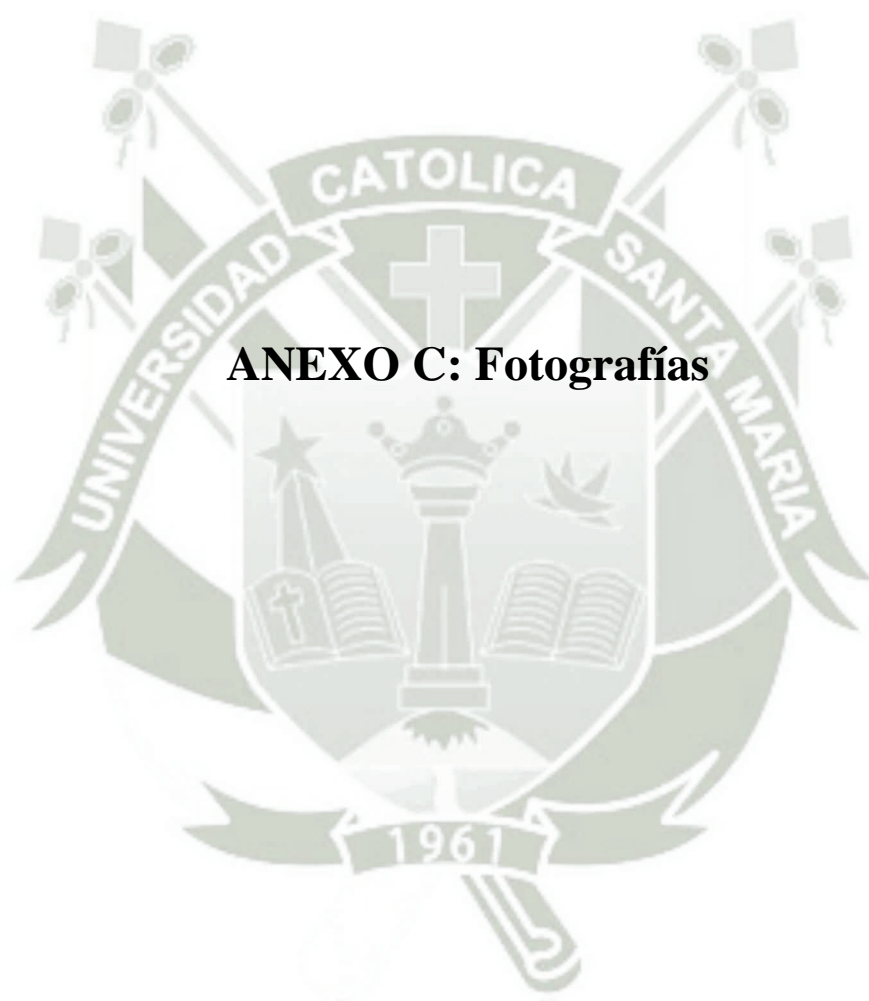
Campinas, 08 de Dezembro de 2016..

CARTÓRIO
R. GERALDO


Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto Ph.D.
Professor Colaborador Convidado
Departamento de Bioquímica
Instituto de Biologia - UNICAMP



Instituto de Biologia – Unicamp
Cidade Universitária “Zeferino Vaz” s/n CP 6109 CEP 13093-970 Campinas – SP
Fone: 55-19-35216130 Fax: 55-19-3521-6129



ANEXO C: Fotografías

MUESTRA

Chenopodium pallidicaule aellen (Cañihua)



PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



En un matraz se realiza la extracción de proteínas empleando un Tampón "Tris-HCl" 0.5 M pH 7.9

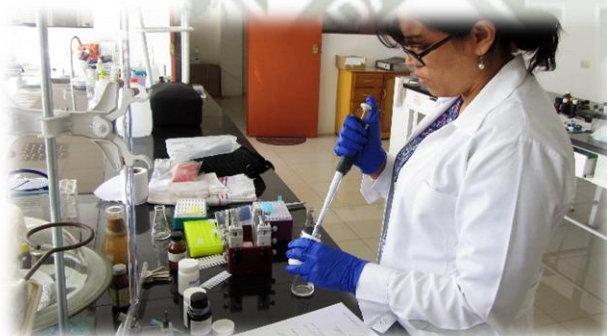
ELECTROFORESIS: Laboratorio de Química Biológica y E.A.P de Biología, bajo la colaboración

Dr. Ronald Navarro Oviedo y Prof. Luis Ponce Soto Ph.D. UNSA 2016

1.- Armado de la base



2.- Preparación de los geles



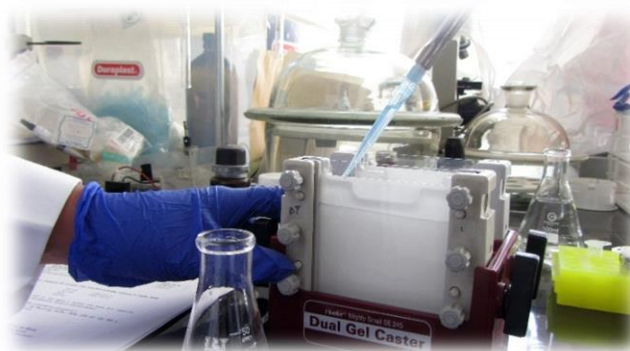
**Preparación del Running Gel
12,5%**

- Bis-Acrilamida
- Tris-HCl 1M pH8,8
- Agua MilliQ
- SDS 20%
- TEMED y PSA 10%

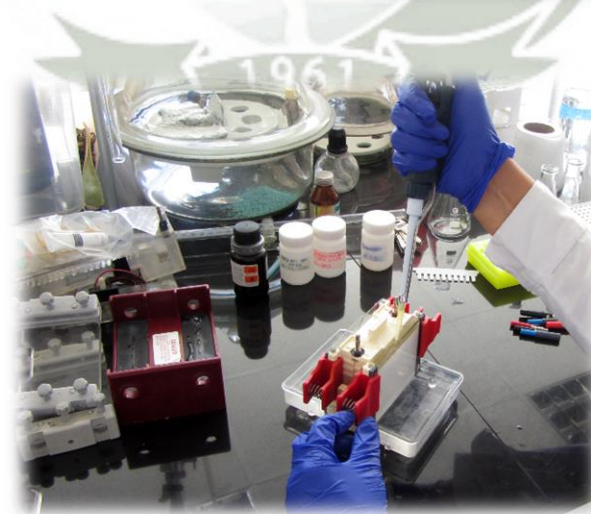


Preparación del Stacking Gel 5%

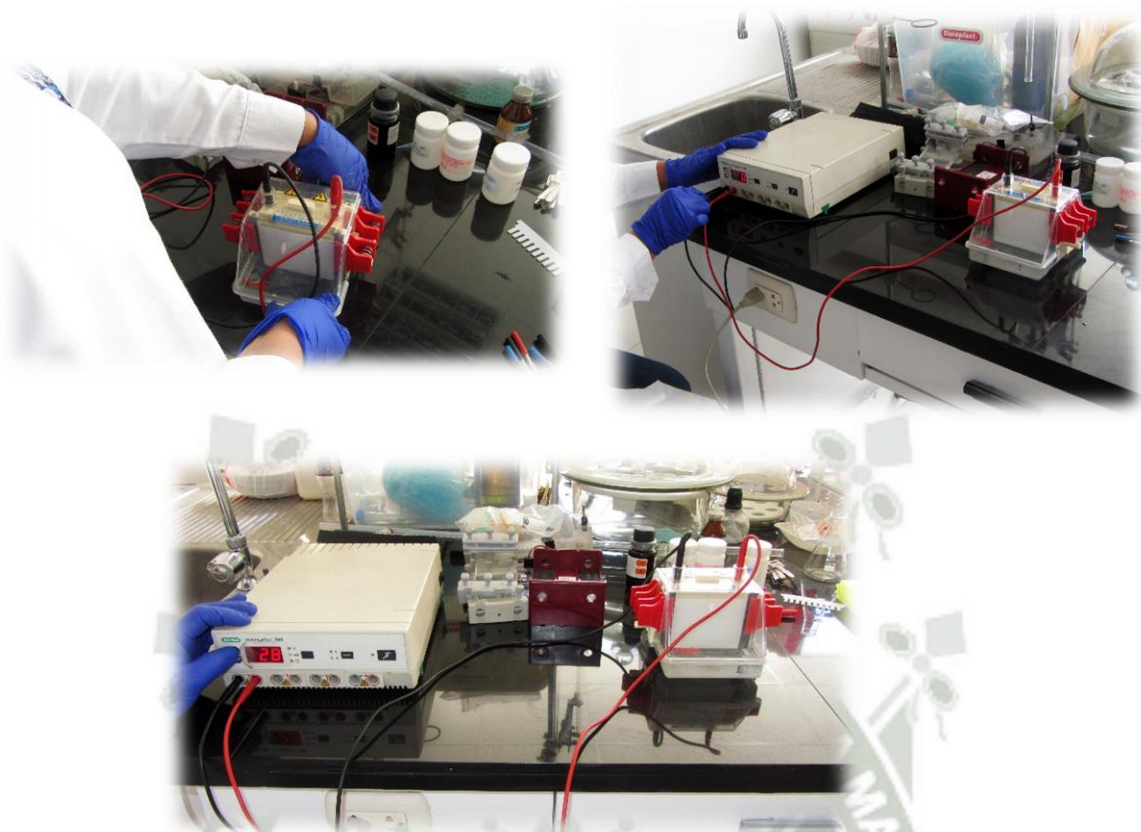
- *Bis-Acrilamida*
- *Tris-HCl 1M pH6,8*
- *Agua MilliQ*
- *SDS 20%*
- *TEMED y PSA 10%*



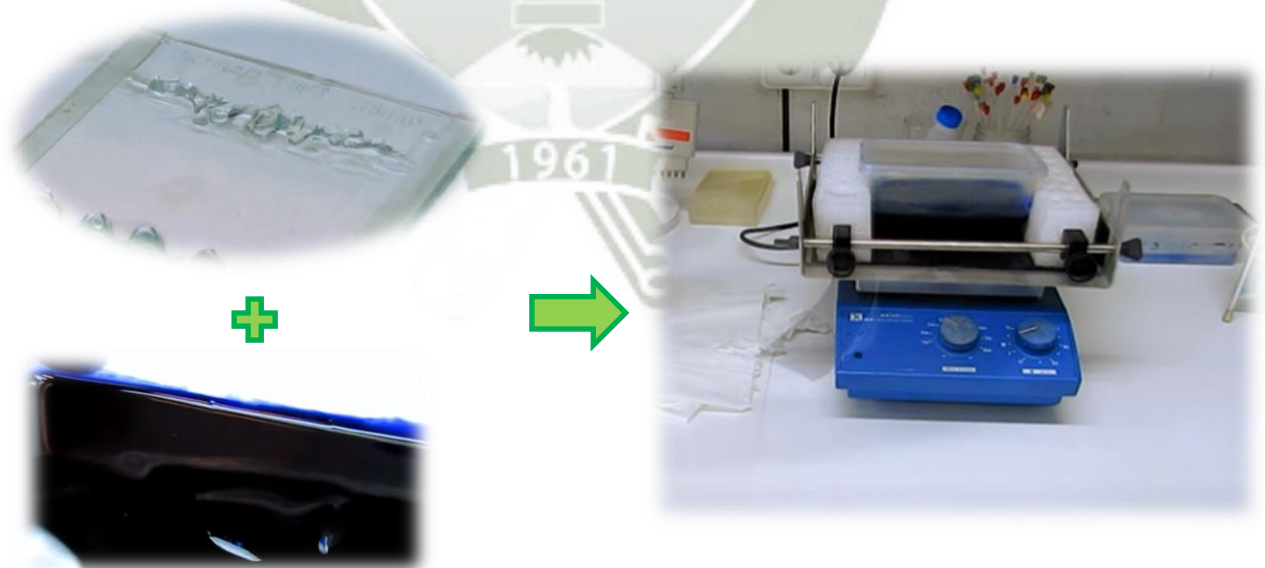
3.- Aplicación de la muestra



4.- Desarrollo de la Electroforesis



5.- Tinción de proteínas



Azul brillante de Coomasie

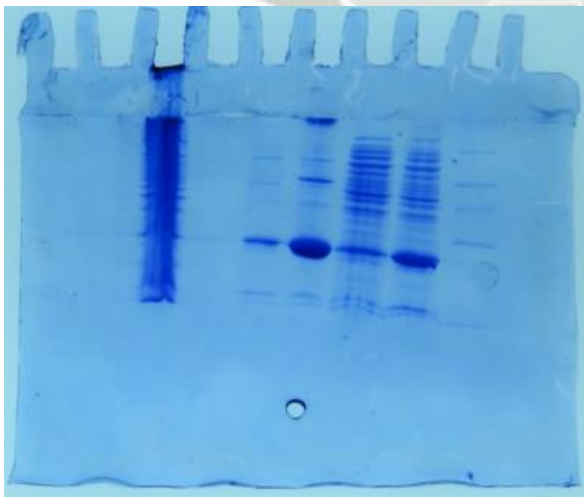
6.- Decoloración del gel



Solución de decoloración rápida



7.- Secado manual



Las proteínas fijadas en geles de poliacrilamida y teñidas con azul de brillante de coomasie se observan como bandas azules de diferentes pesos moleculares

PURIFICACIÓN Y ANALISIS DE MUESTRA DE *Chenopodium pallidicaule aellen* (Cañihua) POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC-FR) Y ESPECTROMETRIA DE MASAS VIA TOF (CUADRUPOLO) Realizada por el Prof. Luis Alberto Ponce Soto en el LABORATORIO THOMSON DE ESPECTROMETRIA DE MASAS DEL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA UNIVERIDAD ESTADUAL DE CAMPINAS – BRASIL

