

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Evaluación de métodos de extracción de proteína total de
Tecoma stans”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:
EDUARDO ANAYA ESTEBAN

DIRECTORA:
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. 2022



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 10 de noviembre de 2022
Oficio No. JCIB/002/11/2022

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Eduardo Anaya Esteban** titulado "**Evaluación de métodos de extracción de proteína total de *Tecoma stans***" para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Edgar García López (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Jacqueline Capataz Tafur
Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

[Handwritten signature]
Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjo
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dr. Ariana Arlene Huerta Heredia, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Eduardo Anaya Esteban, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Campus Loma Bonita
Av. Ferrocarril S/N, Col. Ciudad Universitaria, Loma
Bonita, Oaxaca C.P. 68400
Tel/Fax: 01 281 872 92 30

www.unpa.edu.mx

Campus Tuxtepec
Circuito Central N° 200, Col. Parque Industrial,
Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68301
Tel/Fax: 01 287 875 9240



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA


ACTA DE REVISIÓN DE TESIS


En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 07 de noviembre de 2022 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Evaluación de métodos de extracción de proteína total de *Tecoma stans*" presentada por el alumno Eduardo Anaya Esteban, con número de matrícula 16090083, aspirante al título de Licenciatura.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.


Tuxtepec, Oaxaca, a 07 de noviembre de 2022.

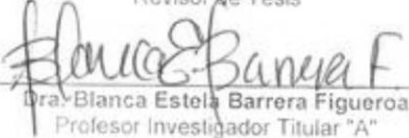
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Ariana Arlene Huerta Heredia
Catedra CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Directora de Tesis


Dr. Edgar Garcia López
Cátedra CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda Garcia
Profesor Investigador Asociado "C"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis


Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

DECLARACION DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales, Centro de Investigaciones Científicas (CIC), Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, México, bajo la asesoría de la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia.

La investigación fue realizada con financiamiento del Proyecto de Cátedra CONACyT 3212 “Estudio integral de plantas medicinales para la producción y estandarización de fitoextractos” (No. 235307) y el proyecto interno “Identificación y caracterización de proteínas inactivadoras de ribosomas de plantas medicinales de la Cuenca del Papaloapan” con No. de registro “19/2021/UNPA-IBT”.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios, por sus bendiciones y darme la oportunidad de poder cumplir uno más de mis anhelos, culminar mis estudios de licenciatura en lo que más me apasiona.

A mi familia por su apoyo incondicional en los momentos de felicidad, pero también en los de frustración y desánimo. A mi padre, a mi madre Lucía Esteban Negrete especialmente, por estar siempre pendiente de mí durante todos estos años, por sus buenos deseos cada vez que tenía un examen, por su cariño y amor incondicional a pesar de no ser un hijo totalmente ejemplar.

A una persona que sin duda será mi mayor ejemplo a seguir en este mundo de la investigación, que creyó y confió en mí, y sin dudarlo me aceptó como su tesista. De la manera más sincera y afectuosa agradezco a la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, directora de este trabajo de tesis, por su tiempo, dirección, apoyo personal, paciencia, insistencia y mucho más, para lograr culminar esta investigación.

A mi comité tutorial, especialmente al Dr. Edgar García López, Dr. Miguel Ángel Peña Rico y la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa por sus revisiones y aportaciones en la realización de esta tesis.

Al laboratorio de Biotecnología de plantas medicinales, Centro de investigaciones científicas (CIC), Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Oaxaca, México a cargo de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, por brindarme un área de trabajo para realizar mis investigaciones experimentales. De igual manera a los laboratorios de Biología molecular y Biotecnología vegetal del CIC, por permitirme el uso de ciertos equipos necesarios para mi trabajo experimental.

A todos mis amigos, por su amistad, convivencia y apoyo durante todos estos años. A pesar de algunas situaciones que nos hubieran distanciado, siempre continuamos unidos.

DEDICATORIA

*A **Dios**, por todas las bendiciones que me ha dado hasta el momento, por cuidar de mi diario vivir, por darme una hermosa familia, además, por rodearme de personas agradables a las que aprecio mucho.*

*A **mi familia** por todo su apoyo, esperando ser un ejemplo a seguir para **mis hermanos y hermanas** en el área académica, haciéndoles saber que, si yo lo logré, ellos también pueden hacerlo.*

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE TABLAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. GENERALIDADES	5
2.1. Descripción botánica: <i>T. stans</i>	5
2.2. Clasificación taxonómica	6
2.3.- Origen y distribución	6
2.4.- Usos medicinales.....	7
2.5. Antecedentes.....	7
2.5.1. Actividad biológica de <i>T. stans</i>	7
2.5.2. Estudios fitoquímicos de <i>T. stans</i>	8
2.6 Proteómica	10
2.6.1 Antecedentes de la proteómica	10
2.6.2. Metodologías de extracción/precipitación	11
2.6.2.1. Extracción/precipitación mediante TCA/acetona	12
2.6.2.2. Extracción/precipitación mediante sulfato de amonio	13
2.6.2.3. Extracción/precipitación mediante TRI-Reagent	14
2.6.2.4. Extracción/precipitación mediante el Kit Sigma-Aldrich PE0230	14
2.6.3 Purificación de proteínas.....	15
2.6.4 Aplicaciones de la proteómica	16
3.- JUSTIFICACIÓN	17
4.- HIPÓTESIS.....	18
5.- OBJETIVOS.....	19
5.1.- General	19
5.2.- Específicos.....	19
6.- METODOLOGÍA	20

6.1.- Material vegetal.....	20
6.2.- Extracción de fenoles.....	20
6.2.1.- Evaluación por cromatografía en capa fina (TLC)	20
6.3.- Extracción de proteína total de <i>T. stans</i>	21
6.3.1.- Extracción de proteína total mediante el método de TCA/acetona	21
6.3.2.- Extracción de proteína total mediante el método de sulfato de amonio	22
6.3.3.- Extracción de proteína total mediante el método TRI reagent	22
6.3.4.- Extracción de proteína total mediante el Kit Sigma Aldrich (PE0230)	22
6.4.- Cuantificación de proteína soluble	23
6.5.- Electroforesis SDS-PAGE y tinción de geles.....	24
6.6. Selección y evaluación actividad antiproliferativa de bandas pequeñas del perfil electroforético.	26
6.7. Análisis estadístico	26
7.- RESULTADOS	27
7.1.- Extracción de fenoles.....	27
7.2.- Extracción y cuantificación de proteína total soluble.....	28
7.3. Electroforesis SDS-PAGE.....	29
7.4. Evaluación de actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231 de bandas de bajo peso molecular seleccionadas del perfil electroforético.	33
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIÓN	40
10. RECOMENDACIONES.....	41
11. BIBLIOGRAFÍA	42
12. ANEXOS.....	50

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. <i>Tecoma stans</i>	5
Fig. 2. TLC de extractos hidroalcohólicos de hoja y raíz de <i>T. Stans</i> a 254 nm	27
Fig. 3. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de hoja de <i>T. stans</i>	30
Fig. 4. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de raíz de <i>T. stans</i>	31
Fig. 5. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de raíz de <i>T. stans</i>	32
Fig. 6. Gel SDS-PAGE al 12% con proteína total soluble extraída de raíz y hoja de planta silvestre de <i>T. stans</i>	33
Fig. 7. Evaluación de actividad antiproliferativa	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>T. stans</i>	6
Tabla 2. Compuestos identificados en <i>T. stans</i>	9
Tabla 3. Preparación gel de corrida Acrilamida/Bisacrilamida (9 y 12%).....	25
Tabla 4. Preparación gel concentrador Acrilamida/Bisacrilamida (5%).....	25
Tabla 5. Preparación buffer de corrida 1L.	25
Tabla 6. Valores de Rf de verbascósido identificado en raíz y hoja.	28
Tabla 7. Cuantificación de proteína total soluble por el método de Bradford obtenida de las diferentes metodologías de extracción/precipitación empleadas en <i>T. stans</i>	28
Tabla 8. Promedio de bandas obtenidas en el perfil electroforético de las diferentes metodologías de extracción/precipitación empleadas en muestras de hoja y raíz de <i>T. stans</i> ...	29

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-DIGE	Electroforesis en gel diferencial bidimensional
2-DE	Electroforesis en gel bidimensional
APS	Persulfato de amonio
DTT	Ditiotreitol
EDTA-Na₂	Etilendiamina tetraacético disódico
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
EM	Espectrometría de masas
GGB	Gama Globulina Bovina
ICAT	Marcaje de etiqueta de afinidad codificada por isótopos
IEC	Cromatografía de intercambio iónico
iTRAQ	Etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta
KCl	Cloruro de potasio
MS	Metabolitos secundarios
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTS	Proteína total soluble
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RIPs	Proteínas inactivadoras de ribosomas
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio

SEC Cromatografía de exclusión por tamaño

SILAC Marcaje de isótopos estables por aminoácidos en cultivo celular

TCA Ácido tricloroacético

TEMED Tetrametiletilendiamina

TLC Cromatografía en capa fina

Tris-HCl Tris-clorhidrato

RESUMEN

T. stans es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones, principalmente la diabetes. Se ha comprobado que posee actividades terapéuticas de tipo antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, hepatoprotectora y actúa en la cicatrización de heridas. En el presente trabajo se evaluaron cuatro metodologías diferentes de extracción de proteína total utilizando un cultivo *ex vitro* de *T. stans*, con la finalidad de establecer un único protocolo para estudios proteómicos de hoja y raíz. Para la extracción de proteína se usó una muestra con 0.25g de hoja y otra con 0.5g de raíz. Los extractos fueron cuantificados mediante la técnica de Bradford, posteriormente se evaluó la cantidad de proteína soluble que se obtuvo de cada protocolo, así como para cada tipo de órgano. Las muestras de proteína de cada protocolo se cargaron a una electroforesis SDS-PAGE al 9%, con el fin de observar el número de bandas, resolución y nitidez de las muestras proteicas, además, se seleccionaron tres bandas proteicas del gel SDS-PAGE (proteína soluble de hojas) en el rango de 20-35kDa. Solo una de las bandas presento actividad antiproliferativa (28kDa). Hasta el momento, no existen reportes de esta planta en la producción de proteínas con dicha actividad, solo lo reportado en sus metabolitos secundarios. El análisis de varianza del número de bandas obtenidas, sugiere que tanto el tipo de órgano, el método de extracción y su interacción tienen efectos significativos en cada experimento. Con base a las interacciones de las medias obtenidas en la prueba Tukey con 95% de confianza, el mejor efecto se observó al utilizar TCA/acetona para extraer proteína a partir de raíces (22±1 bandas). Por lo tanto, en este trabajo no solo se estableció la metodología de extracción más óptima, sino también se evaluó dicha actividad, obteniendo resultados satisfactorios que sugieren realizar más estudios proteómicos sobre *T. stans*.

ABSTRACT

Tecoma stans is a plant extensively used in traditional Mexican medicine to treat several diseases and conditions, mainly diabetes. It has been proven to have anti-inflammatory, anticancer, antibacterial, anti-fungal, antioxidant, hepato-protective, and wound-healing therapeutic activities. In this work, four different methodologies for total protein extraction using an ex vitro cultivation of *T. stans* were evaluated to establish a single protocol for leaf and root proteomic studies. For protein extraction, one sample with 0.25 g of leaf and other with 0.5 g of root were used. The extracts were quantified using the Bradford protein technique; subsequently, the amount of soluble protein obtained from each protocol was evaluated in addition to each type of organ. Protein samples from each protocol were electrophoresed on a 9% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) to observe the number of bands, resolution, and sharpness of the protein samples. Three protein bands were also selected from the SDS-PAGE gel (soluble leaf proteins) in the range of 20 to 35 kDa. Only one of the bands showed anti-proliferative activity (28 kDa). However, no reports of this plant in the production of proteins with such activity are available, only those reports in terms of its secondary metabolites. The analysis of variance of the number of resulting bands suggests that both the type of organ, the extraction method, and their interactions have significant effects on each experiment. Based on the interactions of the means obtained in the Tukey test with 95% confidence, the best effect was observed when using trichloroacetic acid (TCA)/acetone to extract proteins from the roots (22 ± 1 bands). Therefore, this work not only established the most optimal extraction methodology and evaluated its activity, obtaining satisfactory results that suggest further proteomic studies on *T. stans*.

1. INTRODUCCIÓN

T. stans es una planta de hoja perenne, con características similares a un arbusto. Es ampliamente utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones, se utiliza mayoritariamente para tratar la diabetes en la medicina tradicional mexicana, y hay diversos estudios que comprueban su actividad hipoglucémica (Ibarra et al., 2009, Irigoten-Rascon and Paredes, 2015; Ramírez-Ortiz et al., 2016 y Torres, 2019). Además, se ha comprobado que esta planta posee grandes beneficios terapéuticos, por ejemplo, es antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, hepatoprotectora y sirve para la cicatrización de heridas (Anand & Basavaraju, 2020). Se han aislado más de 120 compuestos químicos en esta planta, entre los cuales se incluyen alcaloides monoterpénicos, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, terpenoides, glucósidos, fitoesteroles, aceites volátiles y ácidos grasos insaturados (Taha, 1954; Sbihi et al., 2015; Taher et al., 2016; Alade et al., 2019; Mohammed et al., 2019).

Los metabolitos secundarios (MS) más que ser subproductos metabólicos (resultado de la biosíntesis de MS) son compuestos bioactivos que cumplen ciertas funciones que favorecen la interacción de la planta con su ambiente y otros organismos, además participan como mediadores contra la infección, la depredación y el agobio ambiental, de la competencia con otras especies, del consumo por parte de los herbívoros, atraen a los polinizadores y por si fuera poco, también se ven involucrados en la dispersión y protección de frutos y semillas (Alcantar-Aguirre, 2005; Rivera-Núñez y Obón de Castro, 2007).

Los MS pueden provenir de una biosíntesis constitutiva y específica realizada en un tipo órgano, tejido o bien, pueden sintetizarse en todos los órganos y tejidos de la planta. Estos pueden almacenarse en órganos o tejidos diferentes, a través de su redistribución por la xilema y/o el floema o por el espacio apoplástico, y cabe recalcar que estos productos pueden o no distribuirse de manera uniforme en la planta (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Alcantar-Aguirre, 2005). Las enzimas involucradas en la biosíntesis de los MS están completa y específicamente relacionadas con la producción o acumulación de éstos. Por lo que, para poder conocer las proteínas involucradas primero hay que seleccionar el material vegetal rico en MS de interés, y segundo, extraer las proteínas del tejido y órgano especializado en la ruta biosintética (Martínez-Esteso et al., 2015).

La extracción de proteínas es un proceso mediante el cual se recuperan las proteínas intracelulares, por métodos mecánicos o químicos, considerando su mínimo daño, este es un paso crucial para futuros estudios y análisis proteómicos (Ahmed, 2005). La elección del método de rotura depende de la localización de la proteína y las características mecánicas del tejido o células de donde se va a aislar la proteína (Ramírez, 2015). Otras características de los tejidos vegetales son, niveles relativamente bajos de proteína, la extracción se dificulta debido a la presencia de proteasas, compuestos como polisacáridos, pigmentos, ácidos nucleicos, lípidos y fenoles, que interfieren en extracción de proteínas (Faurobert *et al.*, 2007; Méchin *et al.*, 2007). Hasta ahora ninguna metodología de extracción de proteínas puede capturar el proteoma completo, es por eso que deben optimizarse o bien buscar el que realice la mejor extracción posible. Existen metodologías de extracción para plantas modelo que funcionan muy bien usando los mismos tejidos vegetales, pero para plantas con un alto contenido de MS que puedan ser interferentes durante la extracción, se deben aplicar metodologías robustas que puedan ser reproducibles para análisis proteómicos posteriores (Pavoković, Križnik & Krsnik-Rasol, 2012).

T. stans es una planta que tiene un uso potencial en la medicina tradicional, y es por ello que, se le conoce ampliamente por sus fitoconstituyentes y efectos terapéuticos. En este trabajo se realizaron diferentes metodologías de extracción de proteínas total utilizando planta *ex vitro* de *T. stans*, con la finalidad de establecer un protocolo de extracción para estudios proteómicos de hoja y raíz de esta planta medicinal.

2. GENERALIDADES

2.1. Descripción botánica: *T. stans*

Tecoma stans es un arbusto o árbol pequeño, perennifolio o caducifolio, puede llegar a medir de 1 a 20 m de alto, con un diámetro de hasta 25 cm. Tiene hojas compuestas, opuestas e imparipinnadas, 5 a 13 folioladas; los folíolos aserrados y lanceolados, el folíolo terminal de 2.4 a 15 cm de largo. Su corteza es dura y acostillada. Las flores tienen inflorescencia en racimo terminal o subterminal, con 20 flores aproximadamente; cáliz corto-cupular, de 4 a 7 mm de largo; corola color amarillo vivo, con 7 líneas rojizas en la garganta, tubular-campanulada, de 3 a 5 cm de largo (CONABIO, 2021). Las flores suelen ser muy vistosas, pero con una fragancia muy débil. Su fruto tiene forma de una cápsula alargada, cilíndrica y dehiscente, color café, ahusada hacia los extremos, de 7 a 21 cm de largo y 5 a 7 mm de ancho. Las semillas contenidas dentro del fruto se liberan mediante la abertura de la superficie lenticelada, estas suelen ser pequeñas, aplanadas y aladas, llegan a medir de 7 a 9 mm de largo y sus alas son de un color blanco amarillentas, hialino-membranáceas, agudamente demarcadas del cuerpo de la semilla, aumentando el tamaño de la semilla en 8 a 10 mm de ancho y 2 a 2.5 cm de largo. Su sexualidad es hermafrodita (CONABIO, 2021).



Fig. 1. *Tecoma stans*. Planta ex vitro.

Se le conoce con diferentes nombres como tronador, tronadora, palo amarillo, saúco amarillo, roble amarillo o trompeta amarilla (Anand & Basavaraju, 2020), y en botánica como

Bigonia stans L., *T. incisa* Sweet, *Bigonia frutencens* Millere ex DC. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2022). “*Tecoma*” se deriva del náhuatl “*tecomaxochitl*”, que significa “flor en forma de copa” y “*stans*” se deriva del latín “*sto-are, steti, statum*” que significa “erecto, erguido” debido a sus inflorescencias (Lorenzo-Cáceres., 2011).

2.2. Clasificación taxonómica

Tabla 1. Taxonomía de *T. stans* (Singh et al., 2013).

Dominio	Eukayiota
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Angiosperma</i>
Phyllum	<i>Tracheobionta</i>
Subphyllum	<i>Euphyllophytina</i>
Super división	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	Magnoliopsida
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Escrofularios</i>
Familia	<i>Bignoniaceae</i>
Género	<i>Tecoma</i> Juss
Especie	<i>T. stans</i> (L.) Juss. ex Kunth
Kunth	<i>trompeta amarilla</i>

2.3.- Origen y distribución

Esta planta es nativa de América, habita en la selva alta perennifolia, selva baja caducifolia, bosques de encinos, matorrales, pastizales, dunas costeras, campos de cultivo abandonados (CONAFOR, 2021). Se extiende desde el sur de Estados Unidos por México, Centroamérica hasta el norte de la Argentina (Anand & Basavaraju, 2011). Crece de forma silvestre en casi todo México y se puede encontrar en los estados de Aguascalientes, Baja California, Baja California sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero,

Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelia, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (CONABIO, 2021).

2.4.- Usos medicinales

T. stans es ampliamente utilizado en la medicina herbal tradicional mexicana, para tratar padecimientos como hiperglucemia, trastornos gastrointestinales y del tracto urinario, ictericia, dolores de muelas y cabeza, resfriados, infecciones cutáneas y mordeduras de escorpiones, serpientes y ratas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2022). Por otro lado, estudios han demostrado que posee grandes beneficios terapéuticos, por ejemplo, disminución de los niveles altos de glucosa en sangre, acciones antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, hepatoprotectoras y de cicatrización de heridas (Anand & Basavaraju, 2020).

2.5. Antecedentes

2.5.1. Actividad biológica de *T. stans*

La actividad biológica de *T. stans* está siendo estudiada a partir de los extractos obtenidos de sus diferentes órganos, mientras que otras investigaciones se empeñan en dilucidar y construir las rutas metabólicas que producen ciertos MS con actividades biológicas reportadas, por ejemplo; estudios realizados por Patriota *et al.*, (2016), sobre los extractos de hojas de *T. stans* demostraron actividad antifúngica. Martínez-Báez *et al.*, (2016, 2018) reportaron que extractos de *T. stans* presentaron actividad antioxidante y antibacteriana. Marzouk *et al.*, (2006) demostraron su actividad anticancerígena y sus componentes antioxidantes. En extractos etanólicos de cultivos *in vitro* de *T. stans* en flores, raíz, corteza y hoja se ha reportado actividad anticancerígena por Thirumal *et al.*, (2012); Thirumal *et al.*, (2013). Alonso-Castro *et al.*, (2010) reportaron que los extractos de *T. stans* exhibieron actividad antidiabética. López-Laredo *et al.*, 2009 encontraron valores significativos en la actividad antioxidante en callos de *T. stans* cultivados en fotoperíodo y oscuridad. Por otro lado, Senthilkumar Sureshkumar and Rajaseka., (2010) demostraron que los extractos poseen actividad antibacteriana sobre bacterias patógenas humanas. Govindappa *et al.*, (2011) mostraron que los extractos etanólicos y metanólicos de *T. stans* tienen actividad antimicrobiana y antioxidante. Mohamed *et al.*, (2013) evidenciaron la actividad antibacteriana y antioxidante de los árboles de *T. stans*. Mohamed, Abdel-Aziz and Hegazy., (2016) demostraron actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*. Ibarra *et al.*,

2009; Irigoten-Rascon and Paredes, 2015; Ramírez-Ortiz *et al.*, 2016; Torres, 2019 comprobaron su actividad hipoglucemiante.

Sabiendo que *T. stans* tiene una amplia gama de actividades biológicas, las cuales son atribuidas a ciertos MS contenidos en la planta, por ejemplo, los feniletanoides glicosilados (compuestos formados por de alcohol feniletílico, ácido cafeico y fracciones de glucosilo), entre los cuales el verbascósido (Tian *et al.*, 2020). Diversos estudios han comprobado que este compuesto posee muchas de estas bioactividades, entonces, conocer la ruta biosintética de este en la planta de estudio es una prioridad, lo cual conlleva a extraer, aislar y caracterizar las proteínas (enzimas) que intervienen en cada paso de la biosíntesis, con el fin de diseñar una propuesta de la misma (Alipieva *et al.*, 2014).

2.5.2. Estudios fitoquímicos de *T. stans*

La literatura evidencia numerosos estudios en extractos acuoso, etanólico y hexánico de hojas de *T. stans*, los cuales contienen fitoesteroles, alcaloides, quininas, aminoácidos, monoterpenos, triterpenos, glucósidos, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esquiterpenlactonas y metilesteroles (Singh *et al.*, 2013), siendo los alcaloides triterpenoides y fenilpropanoides, los de mayor importancia, ya que presentan actividades biológicas muy poderosas para aplicaciones clínicas.

Otros estudios basados en la extracción de compuestos fitoquímicos en *T. stans* haciendo uso de solventes como metanol y acetato de etilo, han demostrado una máxima extracción y presencia de éstos (Raju *et al.*, 2011; Taher *et al.*, 2016), polifenoles, flavonoides, terpenoides, alcaloides, glucósidos, fitoesteroles, saponinas, taninos y ácidos grasos. Entre todos los anteriores, los ácidos fenólicos que se han reportado son, clorogénico, ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido gálico, cafeico, ácidos vanílico, o-cumárico y sinápico; sitoesteroles; triterpenoides; y flavonoides, como, flavonona, apigenina, crisoeriol, kaempferol, luteolina, quercetina, rutina, 7,8-dihidroxi-4,6-dimetoxi flavona y verbascósido (Rastogi and Mehrotra, 1993; Lins and Felicio, 1993; Srivastava, 1994; Marzouk *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2016).

Tabla 2. Compuestos identificados en *T. stans*

Familia	Nombre	Parte de la planta o tipo de cultivo	Referencia
Alcaloides	Tecomina	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976 2. Pualino & Felicio, 1993
	Tecomanina	1. Callos en medio líquido 2. Semillas	1. Dohnal, 1976 2. Pualino & Felicio, 1993
	Hidroxitecomanina	1. Semillas	1. Pualino & Felicio, 1993
	Tecostanina	1. Callos en medio líquido 2. Hojas	1. Dohnal, 1976 2. Costantino <i>et al</i> , 2003
	Hidroxiskitantina	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976
		2. Semillas 3. Hojas	2. Pualino & Felicio, 1993 3. Al-Assawi <i>et al</i> , 2012
	Hidroxidehidroxi skitantina	1. Semillas	1. Pualino & Felicio, 1993
	Skitantina	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976 2. Pualino &
	Dehidroxiskitintina	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976
		2. Semillas	2. Pualino & Felicio, 1993
	N-normetilskitantina	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976 2.
	Tecostidine	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976
	Boschniakine	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976
Noractinidina	1. Callos en medio líquido	1. Dohnal, 1976	
Polifenol	Ácido P-hidroxi benzoico	1. Hojas	1. Taher <i>et al</i> , 2016
		2. Hojas	1. Ramírez <i>et al</i> , 2016
	Ácido cafeico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido Vanílico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido ferúlico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido isoferúlico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido elágico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido P-cumarico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido cinámico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido protocatecuico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido gálico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Pirogalol	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
Quercetina	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016	
Kampferol	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016	
Flavonoide	Apigenina	1. Hojas	1. Taher <i>et al</i> , 2016
		2. Hojas	2. Ramírez <i>et al</i> , 2016
	Hesperetina	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	7-Hidroxi flavona	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Catequina	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
Luteolina	1. Hojas	1. Taher <i>et al</i> , 2016	
	2. Hojas	2. Ramírez <i>et al</i> , 2016	
Flavonoide glucosidado	Quercitrina	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Luteolina 7-O-glucosidada	Hojas	Ramírez <i>et al</i> , 2016
Flavonona	Chrysoeriol	Hojas	Ramírez <i>et al</i> , 2016
	Naringenina	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
Fenilpropanoides	Ácido rosmanirico	Hojas	Taher <i>et al</i> , 2016
	Ácido clorogénico	1. Hojas	1. Taher <i>et al</i> , 2016
2. Hojas		2. Ramírez <i>et al</i> , 2016	
Fenilpropanoide glucosidados/ feniletanoides	Verbascosido	Hojas	Ramírez <i>et al</i> , 2016

Los compuestos bioactivos contenidos en *T. stans* son el resultado de la biosíntesis de los metabolitos secundarios (MS) de la planta. Los MS más que ser subproductos metabólicos, cumplen ciertas funciones que favorecen la interacción de la planta con su ambiente y otros organismos, además participan como mediadores contra la infección, la depredación y el agobio ambiental, de la competencia con otras especies, del consumo por parte de los herbívoros, atraen a los polinizadores y por si fuera poco, también se ven involucrados en la dispersión y protección de frutos y semillas (Alcantar-Aguirre, 2005; Rivera-Núñez and Obón de Castro, 2007). Los MS pueden provenir de una biosíntesis constitutiva y específica realizada en un tipo órgano, tejido o bien, pueden sintetizarse en todos los órganos y tejidos de la planta. Estos pueden almacenarse en órganos o tejidos diferentes, a través de su redistribución por la xilema y/o el floema o por el espacio apoplástico, y cabe recalcar que estos productos pueden o no distribuirse de manera uniforme en la planta (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Alcantar-Aguirre, 2005). Las enzimas involucradas en la biosíntesis de los MS están completa y específicamente relacionadas con la producción o acumulación de éstos. Por lo que, para poder conocer las proteínas involucradas primero hay que seleccionar el material vegetal rico en MS de interés, y segundo, extraer las proteínas del tejido y órgano especializado en la ruta biosintética (Martínez-Esteso *et al.*, 2015).

2.6 Proteómica

2.6.1 Antecedentes de la proteómica

La proteómica es la caracterización del proteoma, incluyendo la expresión, estructura, funciones, interacciones y modificaciones de proteínas en cualquier etapa (Domon *et al.*, 2006), esta abarca aplicaciones tecnológicas para la identificación y cuantificación del contenido total de proteínas presentes en una célula, tejido u organismo, complementa a la genómica y a la transcriptómica, para así dejar expuesta la identidad de las proteínas contenidas en un organismo y de igual manera conocer la estructura y funciones específicas de una proteína (Aslam *et al.*, 2017).

Según los datos históricos, los inicios de la proteómica están dados a partir de 1964, con la introducción de la "disc electrophoresis" en geles de poliacrilamida por L. Ornstein y B.J. Davis. El término "proteómica" se utilizó por primera vez en 1996 por Marc Wilkins para expresar la frase "*complemento de proteína de un genoma*" (Wilkins *et al.*, 1996). Más tarde, Laemmli (1970) introdujo el uso del dodecilsulfato de sodio (SDS) para la separación de proteínas en función de

su peso molecular, dando lugar a lo que conocemos como SDS-PAGE. Posteriormente J. Klose y P.H. O'Farrell (1970), introdujeron la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), haciendo una combinación del isoelectroenfocado (IEF) con la SDS-PAGE; gracias a esto O'Farrell detectó 1100 manchas en un único gel de 2D-PAGE, mediante el uso de proteínas totales de *E. coli* marcadas radioactivamente. Años más tarde Norman y Leigh Anderson (1982) idearon una estrategia para catalogar todas las proteínas producidas en el cuerpo humano, al que nombraron como "The Human Protein Index". Una de las técnicas introducidas para la identificación de las proteínas obtenidas de geles 2D que ha dado un gran avance en la proteómica, es la espectrometría de masas (Cazzulo, 2014).

2.6.2. Metodologías de extracción/precipitación

La extracción de proteínas es el primer y más importante paso en un estudio de proteómica, que tiene como finalidad liberar y aislar las proteínas intracelulares de la célula (vegetal, animal, etc.) hacia el exterior (Ahmed, 2005), sin embargo, existe una limitante, pues los diferentes tejidos de las plantas poseen contenidos relativamente bajos de proteína (Faurobert *et al.*, 2007). Es decir, el tejido vegetal contiene en su interior poca cantidad de proteínas respecto al animal; en otras palabras, solo entre el 1-2% de la célula es citoplasma, y aquí es donde se alojan las proteínas, el resto lo abarcan las vacuolas y la pared celular, siendo estas dos secciones las que presentan una gran cantidad de fenoles, terpenos, pigmentos, ácidos orgánicos, carbohidratos y otros compuestos no protéicos como polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y proteasas, que pueden interferir al momento de la extracción de las proteínas, en la separación por electroforesis y al definir el perfil electroforético de las plantas (Carpentier, 2009; Méchin *et al.*, 2007).

Entonces, si extracción de proteínas corresponde a un proceso que Comienza con una ruptura o lisis celular, en la cual, los métodos más utilizados son la homogenización del tejido y la destrucción de membranas mediante procesos físicos y/o químicos, este paso maximiza la liberación de las proteínas y al mismo tiempo evita la degradación de estas debido a factores como la temperatura, modificaciones por proteólisis, oxidación, entre otros. Las técnicas de ruptura celular se pueden clasificar en métodos físicos mecánicos, métodos físicos no mecánicos y métodos químicos, siendo este último mediante el tratamiento con álcalis, detergentes, solventes, ácidos o sustancias caotrópicas, considerando el más mínimo daño a la proteína, ya

que la extracción de proteínas es el paso primordial para futuros procedimientos y estudios proteómicos (González-Fernández *et al.*, 2014; Maldonado-Moreno *et al.*, 2017; Ramírez, 2015). Dentro del paso de la rotura celular debe extraerse la proteína con un tampón adecuado, la elección depende de la localización de la proteína y las características mecánicas del tejido o células de donde se va a aislar la proteína (Ramírez, 2015).

Las metodologías de extracción de proteínas vegetales por lo general implican tres pasos posteriores a la ruptura celular, el primero es la precipitación (algunos reactivos usados son acetona, el ácido tricloroacético (TCA) / acetona y el fenol tamponado con Tris), el cual supone separar el total de las proteínas de los compuestos interferentes. El siguiente paso generalmente es una segunda precipitación, y finalmente las proteínas precipitadas se resolubilizan en tampón. Los objetivos de la extracción son varios, por ejemplo, interrumpir las interacciones macromoleculares para producir cadenas polipeptídicas monoméricas, evitar la modificación de proteínas en el medio de solubilización entre otras. Hasta ahora ninguna metodología de extracción de proteínas puede capturar el proteoma completo, es por eso que deben optimizarse o bien buscar el que realice la mejor extracción posible. Existen metodologías de extracción para plantas modelo que funcionan muy bien usando los mismos tejidos vegetales, pero, para plantas que no son modelo, se deben aplicar metodologías robustas que puedan ser reproducibles para estudios o análisis proteómicos posteriores (Pavoković, Križnik & Krsnik-Rasol, 2012).

2.6.2.1. Extracción/precipitación mediante TCA/acetona

La precipitación con TCA/acetona es un método normalmente utilizado para la precipitación y concentración de proteínas totales, en sus inicios fue desarrollado por Damerval *et al.*, (1986); posteriormente fue modificado y adecuado para su uso en diversos tejidos. Las investigaciones indican que este método minimiza la degradación de las proteínas y la actividad de las proteasas, reduciendo los contaminantes como las sales o los polifenoles (Shaw and Riederer, 2003). Durante el proceso de la precipitación, las sustancias orgánicas solubles se enjuagan y son eliminadas, dejando solo a las proteínas y otras sustancias insolubles en el pellet, y por ultimo las proteínas se extraen utilizando un tampón de elección (Wang *et al.*, 2008; Mechín *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2014). Este método depende de la pulverización completa y el enjuague repetido del polvo (o pellet al finalizar la precipitación) del tejido para eliminar los compuestos interferentes (Niu *et al.*, 2018).

2.6.2.2. Extracción/precipitación mediante sulfato de amonio

La precipitación con sulfato de amonio es un método comúnmente utilizado para la purificación de proteínas, también conocido como salazón o salado y hace uso de altas concentraciones de sal, basándose en el principio de la fuerza iónica de una solución, ya que, al aumentar ésta, disminuye la solubilidad de las proteínas en la solución. Gracias a la naturaleza iónica del sulfato de amonio y la alta constante dieléctrica del agua, los iones de sal disociados (amonio catiónico y sulfato aniónico), hacen a esta sustancia sumamente soluble en agua, por tanto, puede precipitar a las proteínas (Laboratorium Discounter, 2022). Es decir, las proteínas son solubles en agua gracias a su interacción con éste, pero, al añadir sulfato de amonio se unen al agua formando puentes de hidrogeno, la proteína se deshidrata y las biomoléculas interactúan hidrofólicamente entre ellas, formando el precipitado, la proteína menos soluble en la solución se une a las sales presentes (Phillips and Signs, 2004). El objetivo principal del método es remover una cantidad considerable de compuestos o moléculas ajenas a las proteínas como, ácidos nucleicos, toxinas, entre otros (Phillips and Signs, 2004).

En este método ocurren dos fenómenos, el *salting in*, en el cual la concentración de sal aumenta la solubilidad de la proteína (baja fuerza iónica) y el *salting out*, en el que la solubilidad de las proteínas disminuye a altas fuerzas iónicas. Este efecto se produce por la competencia de las moléculas de agua que forman parte de la capa de solvatación (capa de agua), la cual está presente en la mayoría de las proteínas, está asociada y cercana a su superficie, y disminuye al incrementar la concentración de los iones de sal (Larrañondo 2001; Phillips and Signs, 2004).

Dicho lo anterior, este tipo de precipitación, es el resultado de una disminución de la solubilidad y no de la desnaturalización de la proteína, haciendo que el precipitado pueda disolverse mediante tampones estándar y las trazas de sales presentes pueden ser retiradas por diálisis, ultrafiltración o bien por una columna de exclusión molecular. Esta precipitación es cómoda, económica y sencilla para fraccionar mezclas de proteínas complejas, además, existen tablas y fórmulas para determinar las cantidades necesarias para añadir a un extracto de proteínas con la finalidad de obtener la concentración requerida de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ya sea, en sólido o solución (Laboratorium Discounter, 2022; Phillips and Signs, 2004).

2.6.2.3. Extracción/precipitación mediante TRI-Reagent

El método de TRI-Reagent combina el fenol y el tiocianato de guanidinio en una solución de monofase (Thermo Fisher Scientific, 2022), permitiendo el aislamiento asociado de ADN, ARN y proteínas con el fin de una caracterización molecular completa (fenotipado molecular) de muestras biológicas (Lenchik, Desiderio and Gerling, 2005).

Las muestras vegetales son homogeneizadas en el reactivo TRI, con la adición de bromocloropropano o cloroformo provocando la separación de la solución en dos fases, una acuosa y otra orgánica. Las proteínas deberían encontrarse en la fase orgánica, dejando al ARN en fase acuosa y el ADN a la interfase (Thermo Fisher Scientific, 2022). El uso de este método, minimiza la cantidad de muestra requerida para un fenotipado molecular, es decir, genera una ventaja para muestras pequeñas y difíciles de obtener, (Lenchik, Desiderio and Gerling, 2005), por ejemplo, extraer proteína de tejidos u órganos vegetales como corteza o raíces a veces se complica, o bien si se trabaja con cultivos con una biomasa limitada. También se ha informado que para la separación con 2-DE, tiene efectos sustanciales significativos en la capacidad de identificar spots de proteínas y la visualización general del perfil proteómico (Lenchik, Desiderio and Gerling, 2005).

2.6.2.4. Extracción/precipitación mediante el Kit Sigma-Aldrich PE0230

Este Kit está diseñado específicamente para extraer una muestra cualitativa de todas las proteínas lista para su posterior análisis proteómico, sin importar el tipo de especie o tejido vegetal del que se quiera extraer las proteínas. El protocolo no requiere ultracentrifugación ni partición bifásica de polímeros acuosos. Este incluye dos reactivos, un cóctel de inhibidores de proteasas específicos de plantas y un nuevo reactivo caotrópico con mayor poder solubilizante para extraer más proteínas hidrofóbicas (reactivo de extracción de proteínas tipo 4). El cóctel de inhibidores de proteasas es una mezcla éstos, con una vasta especificidad para la inhibición de serina, cisteína, metaloproteasas, aspártico y aminopeptidasas. Contiene pepstatina A, fluoruro de 4-(2 aminoetil) bencenosulfonilo, E-64, leupeptina, 1,10-fenantrolina y bestatina. El cóctel es muy eficaz para prevenir la degradación de proteínas durante el proceso de extracción. Una vez eliminados los polifenoles, taninos y otras sustancias interferentes, el tejido vegetal (ya sea molido, fresco o congelado) se resuspende en el reactivo caotrópico. Los restos vegetales sedimentan mediante centrifugación y se recupera el extracto proteico (Sigma-Aldrich, 2016).

2.6.3 Purificación de proteínas

Después de la extracción y aislamiento de las proteínas de dicha unidad experimental, el siguiente paso es el análisis proteómico, el cual depende de la purificación específica de las proteínas para así aplicar el análisis y obtener los datos proteómicos con la finalidad de identificar o caracterizar las diferentes proteínas de interés. Las técnicas convencionales para la purificación de proteínas se basan en la cromatografía, por ejemplo, de intercambio iónico (IEC), de exclusión por tamaño (SEC) y de afinidad (Jungbauer and Hahn, 2009; Hage *et al.*, 2012). Para el análisis de proteínas selectivas, se pueden utilizar el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la transferencia Western. Sin embargo, estas técnicas están limitadas al análisis de pocas proteínas individuales y no pueden definir el nivel de expresión de la proteína. Es por eso que existen técnicas que se utilizan la separación de muestras proteicas complejas como, electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), electroforesis en gel bidimensional (2-DE) y electroforesis en gel diferencial bidimensional (2D-DIGE), también se han establecido micromatrices o chips de proteínas para análisis de expresión rápida y de alto rendimiento (Sutandy *et al.*, 2013). Como se ha mencionado anteriormente, la espectrometría de masas (EM) se especializa en el análisis de mezclas proteicas complejas con mayor sensibilidad (Yates III, 2011). Recientemente se han desarrollado técnicas como la degradación de Edman, la cual determina la secuencia de aminoácidos de una proteína en específico (Smith, 2001), otras más son las técnicas de marcaje de etiqueta de afinidad codificada por isótopos (ICAT), marcaje de isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular (SILAC) y de etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) para proteómica cuantitativa (Aslam *et al.*, 2017).

Las técnicas de alto rendimiento que proporcionan una estructura tridimensional no son la excepción, ya que tienen gran relevancia dentro de la proteómica, para comprender la función biológica de una proteína, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) (Wiese *et al.*, 2007; Smyth and Martin, 2000). Por último, para manejar la gran cantidad de datos y su almacenamiento se generan las bases de datos de bioinformática, en la que se emplean herramientas bioinformáticas para la predicción de estructuras 3D, análisis de dominios y motivos de proteínas, análisis rápido de la interacción proteína-proteína y el análisis de datos de la EM. De igual forma, las herramientas de alineación

son indispensables para el análisis de secuencias y estructuras para dilucidar su relación evolutiva (Aslam *et al.*, 2017).

2.6.4 Aplicaciones de la proteómica

Las investigaciones dirigidas hacia la secuenciación de genomas proveen información muy completa y detallada sobre el genoma de diferentes especies vegetales, pero dejan a un lado la información sobre el número y la cantidad de proteínas activas que se encuentra en los tejidos vivos, y de igual manera, ofrecen poca información sobre la función que desempeñan las proteínas que codifican, o de las variaciones en la expresión y síntesis de las diferentes proteínas como respuesta a diferentes estímulos. Otra desventaja más de estas investigaciones, es la ausencia de respuestas sobre las posibles modificaciones post-traduccionales en las que pueden estar comprometidas las proteínas durante el proceso de maduración hasta obtener su función determinada o específica (Vela, 2004).

Y es aquí donde podemos ver la diferencia entre los estudios proteómicos de tejidos vegetales, resaltando las plantas con propiedades medicinales ya que éstas son consideradas como una fuente potencial de nuevos fármacos y terapias, y las nuevas investigaciones están dirigidas a comprender el metabolismo secundario y las acciones farmacológicas de los compuestos derivados y así formular el uso eficaz de las plantas medicinales, con el fin de tener aplicaciones en el campo de la biología, medicina o farmacia (Hashiguchi *et al.*, 2017). Actualmente los estudios proteómicos en plantas tienen como primer propósito identificar nuevas proteínas respecto a su función, en segundo lugar, pero no menos importante descubrir el control de su expresión dentro de redes de regulación, ya que teniendo esto podemos disponer de dos alternativas, ya sea potenciar la expresión o producción de alguna proteína en particular o bien suprimir alguna que no proporciona ningún valor para la generación de compuestos de interés. Y, por último, tienen como objetivo detectar cambios en la expresión génica bajo la influencia de factores ambientales, con los mismos propósitos proteómicos antes mencionados (Vela, 2004).

3.- JUSTIFICACIÓN

Los compuestos fenólicos y alcaloides contenidos en *T. stans* tienen una gran importancia gracias a sus aplicaciones medicinales y farmacológicas. *T. stans* posee una amplia gama de actividades biológicas, que van desde la cicatrización de heridas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes y hepatoprotectoras. La producción de los MS contenidos en *T. stans* es el resultado de rutas biosintéticas en la cual participan un conjunto de proteínas, que se encuentran codificadas en el proteoma de la planta. Dicho lo anterior, si se pretende conocer que proteínas están involucradas en la biosíntesis, es necesario partir de del aislamiento de la proteína total contenida en la planta, haciendo uso de algunas técnicas de extracción que permitan no solo recuperar la mayor cantidad de proteínas, sino también que la proteína este integra, libre de interferentes y lista para análisis posteriores. La importancia de poder conocer que proteínas están asociadas a la ruta biosintética de determinados metabolitos, radica en encontrar estrategias biotecnológicas para incrementar la producción de compuestos de interés, de igual forma nos proporciona información sobre como inferir en los mecanismos y la funcionalidad de sus proteínas en los procesos bioquímicos y mecanismos de defensa.

En este trabajo se buscó encontrar la mejor metodología de extracción de proteína total de muestras de hojas y raíces de *T. stans*, que permitiera cuantificar la mayor cantidad de proteína y obtener la mejor resolución de bandas protéicas en los geles SDS-PAGE. La correcta extracción y composición de las proteínas en las muestras de las proteínas contenidas en *T. stans*, serán de gran utilidad en estudios de proteómica diferencial.

4.- HIPÓTESIS

El manejo de cuatro diferentes metodologías de extracción/precipitación de proteínas en muestras de hoja y raíz de plantas silvestres de *T. stans*, permitirá la evaluación y establecimiento de al menos una metodología de extracción de proteína total que permita la extracción y precipitación efectiva, manteniendo integra, abundante y soluble a las proteínas contenidas en *T. stans*.

5.- OBJETIVOS

5.1.- General

- Establecer una metodología efectiva de extracción de proteínas total de planta de *Tecoma stans*

5.2.- Específicos

- Extracción de compuestos fenólicos de las muestras de raíz y hoja de la planta.
- Realizar diferentes extractos y precipitación de proteína total en los dos tipos de órganos de las plantas silvestres de *T.stans*.
- Cuantificar la proteína recuperada de las técnicas seleccionadas
- Realizar geles SDS-PAGE para observar la diversidad, integridad, abundancia y concentración de las proteínas presentes en los dos distintos órganos de estudio de *T. stans*.
- Seleccionar las bandas de bajo peso molecular del perfil proteico observadas en el gel SDS-page (20-35 kDa).
- Evaluar si las bandas proteicas seleccionadas poseen actividad antiproliferativa.

6.- METODOLOGÍA

6.1.- Material vegetal

Se colectaron hojas frescas del árbol de *T. stans* en el mes de agosto y raíces en el mes de noviembre. La recolección se realizó en San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca en las coordenadas 18°04'53.3"N 96°10'32.2"W. El material vegetal colectado se limpió y pesó, posteriormente a la colecta de las muestras para extracción de proteína, se trasladaron al laboratorio (4°C) y se congelaron a -20°C hasta su uso. Para las muestras utilizadas en la extracción de fenoles, se colectaron y pesaron, posteriormente se pulverizaron. El material colectado estaba libre de contaminación por exposición a agentes químicos, físicos y/o biológicos.

6.2.- Extracción de fenoles

Los compuestos fenólicos fueron extraídos de acuerdo a la metodología descrita por López *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. Se realizó una extracción hidroalcohólica con metanol-agua (70:30) considerando una relación de 1:10 (p/v) entre el material vegetal y el solvente. La mezcla de extracción se sonicó por 25min a temperatura ambiente, se sometió a una centrifugación a 3500rpm por 10min, para separar el extracto del residuo vegetal. Los extractos se dejaron secar en estufa a 40°C en frascos de vidrio cuyo peso fue llevado a peso constante antes de agregar el extracto. Una vez alcanzado el peso constante, se calculó la cantidad de solvente (80:20 metanol/agua) para disolver el extracto seco, considerando puntar una concentración de 17µg/µL.

6.2.1.- Evaluación por cromatografía en capa fina (TLC) de compuestos fenólicos en *T. stans*.

La evaluación de fenoles se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizaron placas de sílica F254 (Merck) como fase estacionaria. El sistema de solventes de la fase móvil para fenoles consistió en: acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) (Laredo *et al.*, 2009). Se colocaron 85µg de extracto fenólico por spot en las cromatoplasmas, las placas cromatográficas fueron observadas a luz UV de 254 nm con una lámpara UV.

Se determinó el factor de retención (Rf) usando la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{Lc}{Ls}$$

Donde:

- **Lc** = Longitud recorrida por cada compuesto, desde la zona de punteo de la muestra hasta la altura alcanzada.
- **Ls** = Longitud recorrida por el disolvente desde la zona de punteo hasta el frente del solvente

6.3.- Extracción de proteína total de *T. stans*

Para cada uno de los diferentes métodos utilizados en los experimentos de extracción de proteína se utilizaron 0.25g de muestra de hoja y 0.5g de muestra de raíz.

6.3.1.- Extracción de proteína total mediante el método de TCA/acetona

Se siguió el protocolo descrito por Niu L. *et al.*, (2018), realizándole algunos cambios para mejorar la extracción. Las muestras de *T. stans* fueron pulverizadas en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido, una vez que las muestras estuvieron totalmente pulverizadas (polvo muy fino), con la ayuda de una espátula de acero se colocó en un microtubo de 1.5mL y se le agregó 1ml de la solución de extracción, la cual estaba compuesta por SDS al 1%, 0.1M de Tris-HCl (pH 6,8), 2mM de EDTA- Na_2 , 20mM de DTT y 2 mM de PMSF o $1\mu\text{L}/1\text{mL}$ de cóctel de inhibidor de proteasas (P9599-Sigma) (se añadió minutos antes de usarse), se homogeneizó suavemente y se dejó incubar en hielo durante 15min. Después, el homogeneizado resultante se centrifugó a 12,000rpm durante 5min a 4°C. Una vez centrifugada la muestra, el extracto proteico se pipeteo a tubos nuevos y estériles. Se agregó en una relación 1:1 el extracto proteico y una mezcla de TCA/acetona (20:80 v/v). Se dejó incubar durante toda la noche, posteriormente se centrifugó a 12,000rpm durante 5min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet o precipitado de proteína se lavó con acetona al 80%, seguido de una centrifugación a 12,000rpm durante 3min a 4°C. El pellet se secó al aire durante un período de tiempo entre 5-10min, esperando que toda la acetona se volatilizara por completo, posteriormente el pellet fue disuelto en un buffer de rehidratación (ReadyPrep 2-D Starter Kit Rehydration/Sample Buffer), se realizó una última centrifugación a 12,000rpm a 4°C durante 2min para recuperar solamente la proteína soluble y finalmente fue guardada a -20°C.

6.3.2.- Extracción de proteína total mediante el método de sulfato de amonio

El método se realizó de acuerdo al protocolo de López (2012), para lo cual las muestras de *T. stans* se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente se agregó a un microtubo de 1.5mL con 1 mL de solución de extracción con 0.1M de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.5, 1mM de KCl, 2mM de EDTA y 1.5% de polivinilpolipirrolidona (PVPP, p/p). La muestra se dejó en extracción a 4 °C durante 2 horas y una vez pasado este tiempo se centrifugó a 12,000rpm durante 5min a 4°C. El extracto acuoso obtenido se precipitó toda la noche a 4°C con sulfato de amonio al 70%. Pasado este tiempo se centrifugó a 12,000rpm durante 10min a 4°C y el pellet se resuspendió en tampón de rehidratación (ReadyPrep 2-D Starter Kit Rehydration/Sample Buffer). Se realizó una última centrifugación a 12,000rpm a 4°C durante 2min para recuperar solamente la proteína soluble y finalmente fue guardada a -20°C.

6.3.3.- Extracción de proteína total mediante el método TRI reagent

Las muestras de *T. stans* se pulverizaron en nitrógeno líquido, posteriormente se colocó en un microtubo de 1.5mL y se adicionó 1mL de solución TRI-Reagent (93289 Sigma-Aldrich); la mezcla se incubó por 10min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente, se centrifugó a 12,000rpm durante 10min, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 0.2mL de cloroformo (grado HPLC) por cada mL de TRI-Reagent utilizado para la homogenización. Se mezcló en vortex durante 20 segundos y se centrifugó a 12,000rpm por 15min. Se eliminó la fase acuosa y se añadió 0.3mL de etanol (grado reactivo) al 100%, se mezcló por inversión brevemente y se incubó por 3min a temperatura ambiente. Rápidamente, se centrifugó a 4500rpm por 5min, al sobrenadante se le añadieron 1.5mL de isopropanol (grado reactivo) por mL de reactivo de TRI-Reagent y se incubó por 10min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 12,000rpm por 15min; el sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó 3 veces con etanol al 100%. Posteriormente, la muestra se mezcló en vortex y se centrifugó a 8,650rpm por 5min, se desechó el sobrenadante, y la pastilla se dejó secar durante 30-45min, aproximadamente. Finalmente, se resuspendió la pastilla en buffer de rehidratación (ReadyPrep 2-D Starter Kit Rehydration/Sample Buffer).

6.3.4.- Extracción de proteína total mediante el Kit Sigma Aldrich (PE0230)

Se siguió el protocolo de extracción contenido en el Kit de extracción de proteína total de Sigma Aldrich (PE0239) (Sigma-Aldrich, 2016). Las muestras de *T. stans* fueron trituradas en

nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El polvo se transfirió a un microtubo de 1.5mL que fue pesado con anterioridad y se mantuvieron en hielo. Inmediatamente se procedió a añadir 1.5ml de la solución de metanol preparada (etanol + inhibidor de proteasas) para minimizar la degradación de las proteínas. Se agitaron brevemente los tubos (15–30 segundos) y se colocaron a –20°C. La mezcla se incubó durante 5min a –20°C con agitación periódica (cada minuto). La suspensión se centrifugó a 12,000rpm durante 5 min a 4 °C para sedimentar las proteínas y los restos de tejido vegetal. El sobrenadante fue eliminado. El proceso de lavado/extracción con solución de etanol preparada se repitió 3 veces más. Después de la extracción final con la solución de metanol se eliminó el sobrenadante, los tubos se invirtieron sobre una toalla de papel limpia para eliminar cualquier solución de metanol visible. Siguiendo el proceso, se añadió 1.5ml de acetona preenfriada a –20°C. Se agitó brevemente la muestra (15–30 segundos) y se incubó durante 5min a –20°C. Pasado el tiempo la solución se centrifugó a 12,000rpm durante 5min a 4°C para sedimentar las proteínas y los restos de tejido vegetal. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire durante 5 a 10min a temperatura ambiente. Después de secar la muestra, se pesó el vial y se restó la masa de tara predeterminada del vial para determinar la masa de tejido vegetal obtenido. Al sedimento de tejido vegetal, se le añadieron 4µL de solución de trabajo de reactivo tipo 4 por cada mg de tejido vegetal. El sedimento de tejido fue disuelto completamente en vórtex. Se dejó incubar durante 15min con vórtex intermitente a temperatura ambiente. Una vez completado el tiempo de incubación, la suspensión se centrifugó a 12,000rpm durante 30min para sedimentar los restos de tejido vegetal. El sobrenadante (muestra de proteína total), se colocó en un tubo limpio y estéril.

6.4.- Cuantificación de proteína soluble

El ensayo de Bradford es un método de determinación de proteínas totales, el cual está basado en la unión del colorante Comassie® azul brillante G-250 a las proteínas, desplazándose así su máximo de absorción de 470nm a 595nm (Bradford, 1976). Este colorante posee afinidad a los aminoácidos básicos y aromáticos. El protocolo de Bradford es muy sencillo y fácil de realizar, ya que en un solo paso genera una reacción colorimétrica, con la cual se puede cuantificar cuanta proteína está contenida en nuestra muestra (Kruger, 2009).

Como primer paso se realizó una curva de calibración empleando una muestra estándar de 0.75mg/mL de Gama Globulina Bovina (GGB), realizando 6 tubos con diferentes diluciones.

Para esto se agregó 1mL del reactivo de Bradford, un volumen determinado del estándar teniendo como resultado un gradiente de concentración de 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06mg/mL de GGB, y por último H₂O estéril. Se realizó la medición con un espectrofotómetro UV-vis (Optizen POP) a 595nm. El mejor valor de R obtenido al realizar la curva fue de 0.9967 con $y=0.0051x$ (Anexo 1).

Para las muestras de proteína total soluble (PTS) extraídas de *T. stans*, se utilizaron 5μL para muestras donde la recuperación visible fue poca y 10μL para el caso contrario. Posteriormente se le agregó 1mL de reactivo de Bradford y 95 o 90μL de H₂O estéril respectivamente, para finalmente ser leídas a 595 nm.

6.5.- Electroforesis SDS-PAGE y tinción de geles

Cada una de las muestras de proteína obtenidas a partir de los diferentes métodos de extracción, fueron sometidas a una electroforesis SDS-PAGE al 9%, con el fin de observar el número de bandas, resolución y nitidez de las muestras proteicas. Los pasos para realizar la electroforesis SDS-PAGE fueron los siguientes: preparación de buffer de corrida (Tabla 5), polimerización del gel de corrida y concentrador (Tabla 3 y 4 respectivamente), preparación y carga de la muestra. Para la preparación de la muestra, se calculó el volumen de muestra y buffer de carga, respecto a su concentración teniendo en cuenta el tamaño del pozo del gel y considerando 60μg de proteína soluble por cada pozo, de modo que, para concentraciones bajas (menores a 6μg/μL) de proteína se utilizaron geles con pozos grandes (16mm x .75mm x 5mm) y para concentraciones altas o medias (mayores a 6 μg/μL) de proteína se utilizaron geles con pozos pequeños (10mm x 0.75mm x 5mm). Una vez realizada la mezcla de proteína y buffer de carga, se dejó incubar en un termobloque a 95C° durante 5min. Pasado el tiempo, se cargó la muestra en el gel y se dejó correr 20min a 70v y posteriormente a 100v durante 90min aproximadamente o bien hasta que la muestra estuviera a punto de salir del gel en el otro extremo.

Una vez finalizado el tiempo de corrida, el gel se colocó en una bandeja vidrio donde se le añadió azul de Coomassie y se dejó en tinción durante toda la noche a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de tinción, se recuperó el colorante y el gel teñido se sumergió en una solución para desteñir (metanol, ácido acético y agua en una relación 40:10:50) durante un periodo de tiempo de al menos 60min, renovando la solución cada 20min durante ese periodo. Una vez

visible el bandeo, los geles fueron colocados en un transiluminador, se observaron y fotografiaron usando solo luz blanca.

Tabla 3. Preparación gel de corrida Acrilamida/Bisacrilamida (9 y 12%).

	Stock	[Final]	V_f (9%)	V_f (12%)
Acrilamida/Bisacrilamida	30%		1.5mL	2.2mL
Tris-HCl, pH 8.8	1.5M	375mM	1.25mL	1.3mL
H₂O (estéril)			2.2mL	1.5mL
SDS	10%	0.1%	50μL	50μL
TEMED			10μL	10μL
APS (Persulfato de amonio)	10%		10μL	10μL

Tabla 4. Preparación gel concentrador Acrilamida/Bisacrilamida (5%).

	Stock	[Final]	V_f
Acrilamida/bisacrilamida	30%	5%	416.6μL
Tris-HCl, pH 6.8	1M	375mM	315μL
H₂O (estéril)			1745μL
SDS	10%	0.1%	25μL
TEMED			10μL
APS (Persulfato de amonio)	10%		10μL

Tabla 5. Preparación buffer de corrida 1L.

	Stock	[Final]	Contenido
Tris base		25mM	3.025g
Glicina		192mM	14.4g
H₂O (destilada)			990mL
SDS	10%	0.1%	10mL

6.6. Selección y evaluación actividad antiproliferativa de bandas pequeñas del perfil electroforético.

Se escogieron los perfiles electroforéticos del método de TCA/acetona a partir hoja, para seleccionar tres bandas de diferente peso molecular en el rango de 20-35 kDa, entre las cuales fueron 28, 30 y 32 kDa. Estas fueron recortadas del gel al 9%, se conservaron en buffer de corrida a 4°C y se realizaron las pruebas de actividad de citotoxicidad por el método de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) en el laboratorio de Biomedicina de la Universidad del Papaloapan.

Brevemente el método de MTT consistió en sembrar en placas de 96 pozos una suspensión celular de 100µL que contenían 1×10^5 células MDA MB 231. Las cuales fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h para permitirles su adhesión al fondo del pozo. Transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 1% de penicilina/estreptomina. Y se añadió medio nuevo que contenía 1 y 5µL del extracto proteico. Las células se incubaron a las condiciones de cultivo por 48h. Para el ensayo de citotoxicidad, se agregaron 10µL de la solución MTT (5mg/mL en PBS) y se incubo por 3h a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente, el medio se aspiró y se añadieron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazan formados por la actividad mitocondrial de las células vivas. Se determinó la absorbancia a 570nm de la solución resultante.

6.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA de dos vías) a los valores de concentración de proteína recuperada y las bandas obtenidas por cada tipo de órgano y método utilizado. La prueba Tukey con 95% de confianza fue aplicada al número de bandas obtenidas, con el fin de comprobar quien tiene el mayor efecto en la extracción de proteínas, es decir, el tipo de método (4 diferentes), el tipo de órgano (raíz y hoja) o bien la interacción de ambos. Se utilizo el software Minitab 18 (prueba gratis).

7.- RESULTADOS

7.1.- Extracción de fenoles

Los compuestos fenólicos pueden estar presentes dentro de una planta en dos grandes categorías: solubles e insolubles: por ejemplo, los fenoles libres, los fenoles glicosilados y los fenoles esterificados conforman a los solubles, y dentro de este último grupo están los ácidos fenólicos, flavonoides y amidas fenólicas, es así que cada subgrupo posee propiedades fisicoquímicas diferentes, entre ellos la solubilidad (Ibrahim *et al.*, 2010). Y en base a esta característica, es que se requiere específicamente una mezcla de solventes para separarlos de los demás, para así poder analizarlos y evaluar su presencia en dicho tejido u órgano vegetal.

En el presente trabajo, la extracción se realizó siguiendo la metodología de López *et al.*, (2008). Se utilizó para la extracción 1g de hoja y 1g de raíz. Se obtuvo de hoja 163.7 ± 3.87 mg_{EX}/g_{pf} y de raíz 37.4 ± 2.7 mg/g_{pf}.

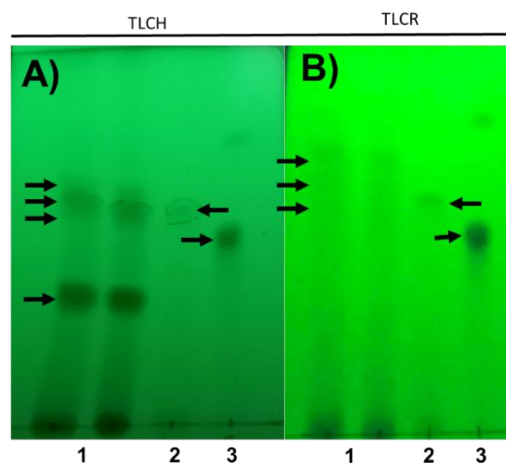


Fig. 2. TLC de extractos hidroalcohólicos de hoja y raíz de *T. Stans* a 254 nm. A) compuestos obtenidos a partir de hoja. B) compuestos obtenidos a partir de raíz. 1A) Hoja (dos réplicas), 1B) Raíz, 2) Estándar verbascósido, 3) Estándar clorogénico. Se puntearon 85µg de extracto en cada carril. Fase móvil: acetato de etilo-metanol-agua (80:10:8). Las flechas indican las bandas obtenidas en cada extracto de cada tipo de órgano, resaltando la banda correspondiente a el estándar de verbascósido.

Los extractos se colocaron en las cromatoplasmas, se corrieron las muestras con la fase de móvil y se analizaron al UV (254nm). En la Fig. 2, se observa la distribución de las bandas a través de la placa de sílica y la comparación con los estándares de verbascósido y clorogénico. Esto confirma la presencia de verbascósido en ambas muestras, no se observó la presencia de clorogénico.

La Tabla 6, muestra los valores de Rf obtenidos en raíz y hoja y además el estándar del verbascósido. Y esto confirma que ambos extractos contienen verbascósido.

Tabla 6. Valores de Rf de verbascósido identificado en raíz y hoja.

	Valor de R _f
Raíz	0.56
Hoja	0.55
Estándar verbascósido	0.55

7.2.- Extracción y cuantificación de proteína total soluble

En esta investigación se evaluaron 4 diferentes metodologías, descritas anteriormente (Apartado 6.3). En la Tabla 7, se muestran los resultados de la cuantificación de PTS de los diferentes extractos proteicos. Se puede observar, que el protocolo de extracción para hoja que proporcionó una mayor concentración de proteína, fue el método de sulfato de amonio (162.4±15.4 µg de proteína) seguido de la metodología de TRI-Reagent, TCA/acetona y Kit de Sigma Aldrich. En el caso de raíz, la mayor concentración de proteína se obtuvo con la extracción de TCA/acetona (143.3±15.6 µg de proteína) seguido del método de sulfato de amonio. Este contenido de proteína se verificó con los geles SDS-PAGE que se mostrarán posteriormente. La tabla 7 solo muestra la media y desviación estándar de las concentraciones de proteína obtenidas por los dos factores estudiados, en el Anexo 2 se puede observar el análisis de varianza. Solo se realizó análisis de varianza, debido a que los valores de concentración obtenidos de algunos métodos pudieran estar sobreestimados, lo cual se explica y cuestiona en el apartado de discusión de resultados.

Tabla 7. Cuantificación de proteína total soluble por el método de Bradford obtenida de las diferentes metodologías de extracción/precipitación empleadas en *T. stans*.

Métodos	Concentración (µg/µL)		Proteína total (µg)		µg de proteína/g de biomasa	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
TCA/acetona	3.86±0.60	28.65±3.12	19.28±2.98	143.27±15.58	77.12±11.90	286.54±31.17
Sulfato de amonio	32.48±3.08	9.15±8.11	162.42±15.39	45.75±40.54	649.67±61.58	91.5±81.08
Kit Sigma	4.18±0.44	1.34±0.16	41.76±4.38	14.38±0.11	167.06±17.52	28.76±0.23
TRI-Reagent	12.03±0.29	2.83±0.87	120.26±2.86	28.3±8.71	481.05±11.43	56.6±17.42

7.3. Electroforesis SDS-PAGE

En la Tabla 8, se presenta el condensado de bandas proteicas obtenidas de hoja y raíz de *T. stans* de acuerdo a las metodologías seleccionadas. El protocolo de extracción que proporcionó un mayor número de bandas fue el método de TCA/acetona para raíz y hoja (22 ± 1 y 8 ± 1 bandas, respectivamente), seguido de la metodología de sulfato de amonio para el caso de raíz (9 ± 1 bandas) y TRI-Reagent en el caso de hoja (5 ± 0 bandas). La tabla 8 solo muestra la media y desviación estándar de las bandas obtenidas por los dos factores estudiados, en el Anexo 3 se puede observar las tablas arrojadas por el análisis de varianza y la prueba Tukey realizada.

Tabla 8. Promedio de bandas obtenidas en el perfil electroforético de las diferentes metodologías de extracción/precipitación empleadas en muestras de hoja y raíz de *T. stans*.

Total de bandas observadas		
Métodos	Promedio de bandas	
	Hoja	Raíz
TCA/acetona	8 ± 1	22 ± 1
Sulfato de amonio	3 ± 2	9 ± 1
Kit Sigma	2 ± 0	1 ± 0
TRI-Reagent	5 ± 0	6 ± 0

El perfil electroforético para los extractos obtenidos a partir de hoja y raíz de *T. stans*, muestra un bandeo definido para cada tipo extracto, y es así como podemos definir cuál de cada uno de los métodos recupera mejor a las proteínas contenidas en los diferentes órganos de la planta analizados.

En la Fig. 3, se muestra el gel SDS-PAGE para los extractos de hoja. El mejor método de extracción fue la metodología de TCA/acetona que dio como resultado 9 bandas definidas (20, 30, 32, 37, 42, 44, 57, 64 y 85 kDa). Similar a lo reportado por Ramírez *et al* (2018) y Niu *et al* (2018) donde el mayor número de bandas proteicas lo obtuvo al usar este método. En los demás métodos se logran apreciar bandas, pero la mayoría de estas no se encuentran muy bien definidas, por ejemplo; para la extracción con sulfato de amonio se aprecian 5 bandas de las

cuales 4 concuerdan con las observadas en TCA/acetona, que se encuentran entre los 44, 57, 64 y 85 kDa.

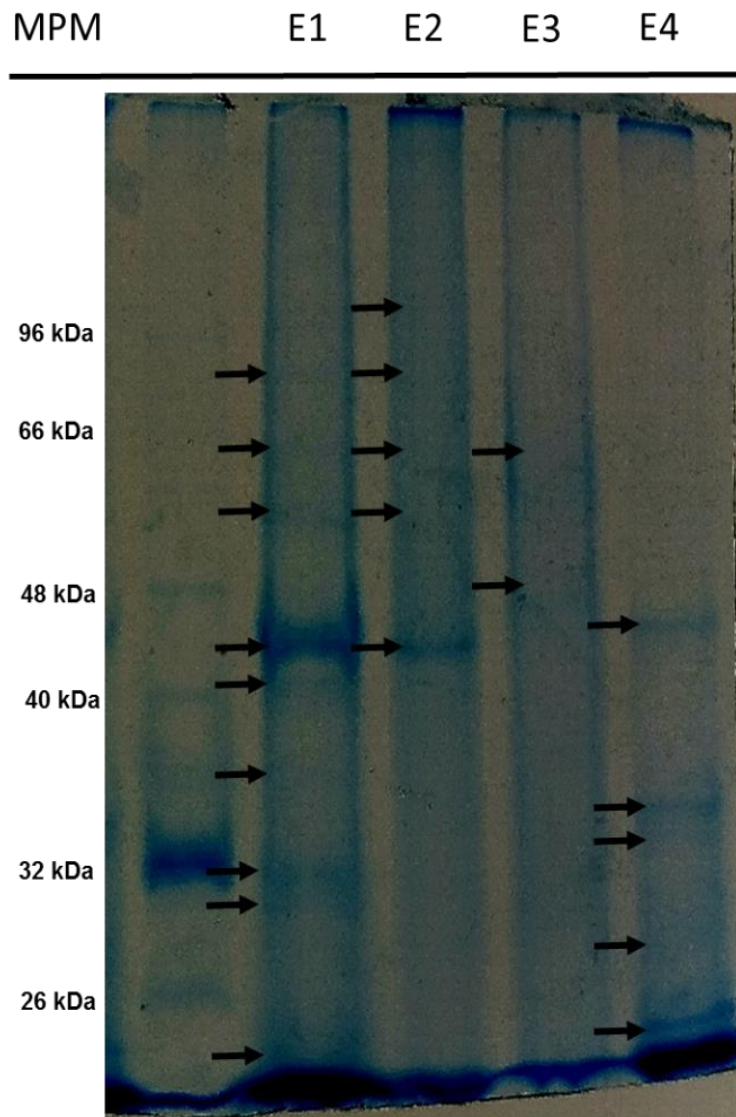


Fig. 3. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de hoja de *T. stans*. Muestra de proteína extraída utilizando el método de: E1) TCA/acetona. E2) Sulfato de amonio. E3) Kit Sigma Aldrich PE0230. E4) TRI-Reagent. Se muestra un gel del triplicado.

En la Fig. 4, se muestra el condensado del perfil electroforético de los extractos de PTS obtenidos a partir de raíz. Se logra observar un número de bandas mayor que en hoja respecto a algunos métodos en particular y un bandeo mucho más definido. El perfil electroforético de los extractos mediante TCA/acetona evidencia la presencia de al menos 22 bandas que van desde los 20 a 100 kDa aproximadamente y se encuentran presentes en el triplicado del experimento. En

el triplicado de las muestras recuperadas a partir de la extracción con sulfato de amonio, se logró observar un bandeo definido, en el que se pueden apreciar 11 diferentes bandas, de las cuales 5 están presentes en todas las muestras (23, 32, 38, 63 y 86 kDa), las otras 6, su presencia varía en al menos uno en los experimentos (28, 34, 39, 44, 46 y 49 kDa).

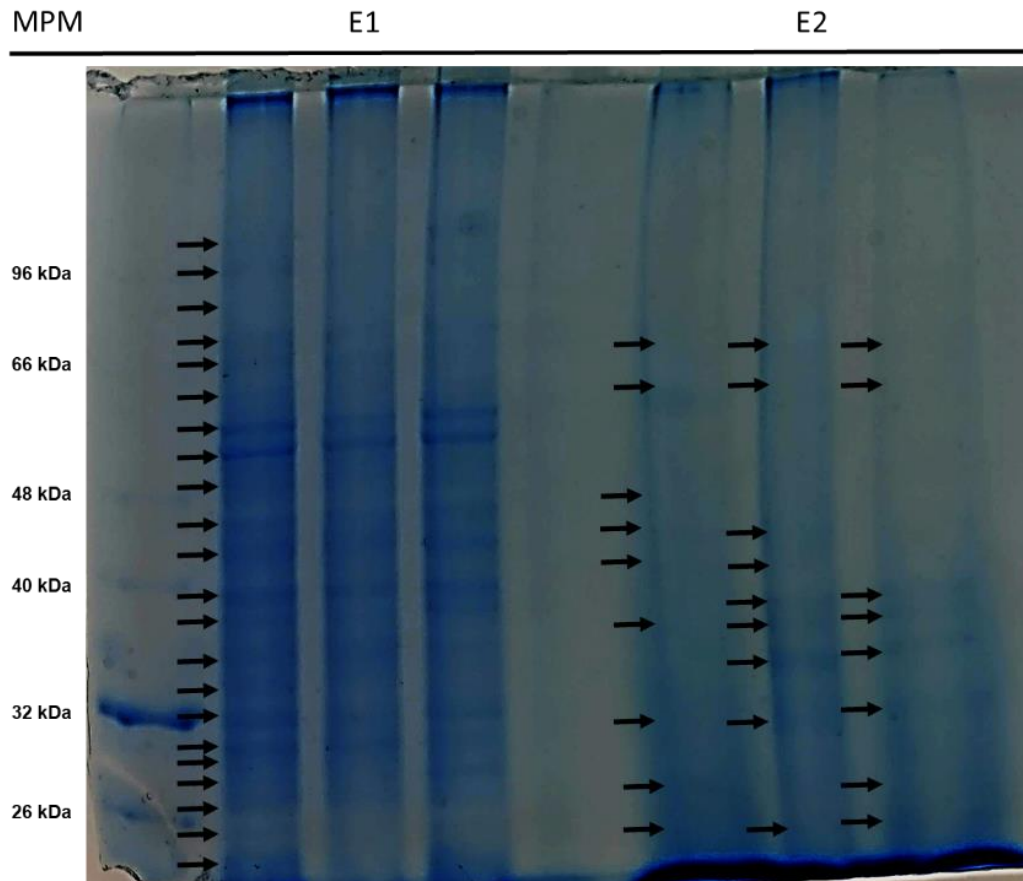


Fig. 4. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de raíz de *T. stans*. Muestra de proteína extraída utilizando el método de: E1) TCA/acetona. E2) Sulfato de amonio.

En la Fig. 5, se muestra el perfil electroforético de los extractos de PTS de raíz, mediante el uso de las metodologías de TRI-Reagent y el Kit Sigma PE0230. Ambos métodos mostraron un menor bandeo y los condensados de proteínas fueron considerablemente definidos con proteínas menores a 48kDa. Para el Kit Sigma PE0230, se logró observar una sola banda (29 kDa), la cual estuvo presente en todos los experimentos usando el Kit. Para la metodología TRI-Reagent se aprecian al menos 6 bandas (entre 45 y 29 kDa), presentes en la mayoría de las muestras, exceptuando solo una, que muy probablemente sufrió degradación durante el proceso (probablemente por temperatura o acción de proteasas).

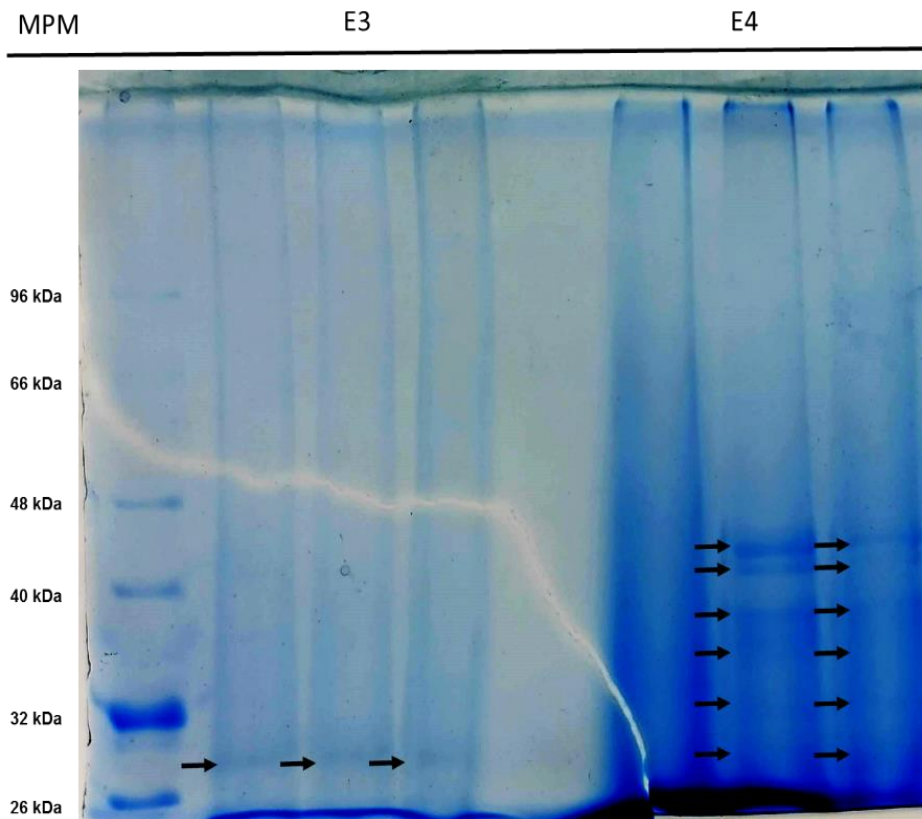


Fig. 5. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de raíz de *T. stans*. E3) Kit Sigma Aldrich PE0230. E4) TRI Reagent.

Para comparar la similitud o diferencia de bandeo entre los dos órganos de estudio (ver Fig. 6), se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12%, usando el método de extracción que generó una mejor definición y mayor número de bandas proteicas. El perfil electroforético indicó una gran diferencia en el número de bandas entre los diferentes órganos, para las muestras de hoja se observan al menos 13 bandas definidas y separadas unas de otras. Mientras que, las muestras de raíz revelaron la presencia de 19 bandas definidas. En el caso de las proteínas de hoja se observaron 5 bandas más por debajo de 20 kDa, las cuales no se habían visualizado en el gel elaborado al 9%. De igual manera, en el caso de la muestra de raíz se vieron 4 bandas proteicas más. Tomando en cuenta la relación entre las bandas observadas en el caso las muestras de raíz las 22 bandas detectadas al 9% corresponden a 14 bandas en el gel elaborado al 12%. El bandeo observado en todos los geles son resultado de la tinción con azul de Coomassie, el cual tiene una sensibilidad de 0.1 a 0.5µg de proteína (Brunelle & Green, 2014). De tal modo que, tanto en las muestras de raíz como de hoja pudieran ser detectadas un mayor número de bandas proteicas si se utilizara otro método de tinción.

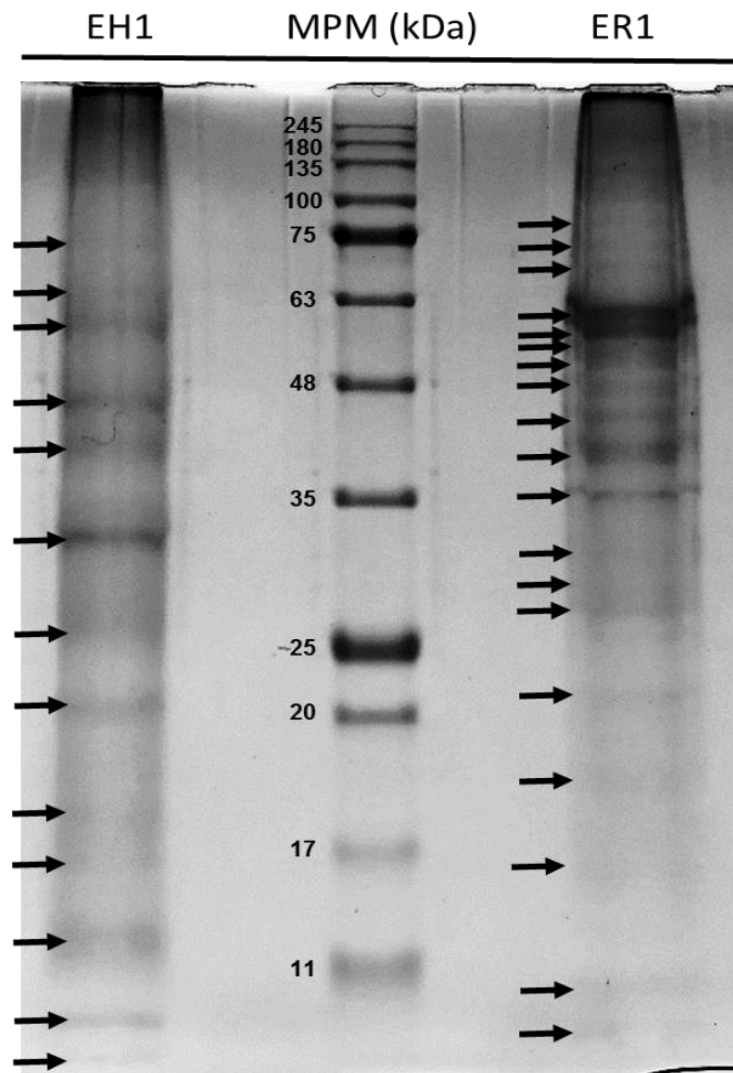


Fig. 6. Gel SDS-PAGE al 12% con proteína total soluble extraída de raíz y hoja de planta silvestre de *T. stans*. EH1) Extracción con TCA/acetona en hoja. ER1) Extracción con TCA/acetona en raíz.

7.4. Evaluación de actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de mama MDA MB 231 de bandas de bajo peso molecular seleccionadas del perfil electroforético.

Los resultados obtenidos de las proteínas contenidas en las bandas de 30 y 32 kDa respecto a la evaluación de actividad antiproliferativa, no muestran actividad. Sin embargo, las proteínas contenidas en las bandas de 28 kDa muestran una pérdida significativa de la viabilidad celular (40%), como se muestra en la Fig. 7.

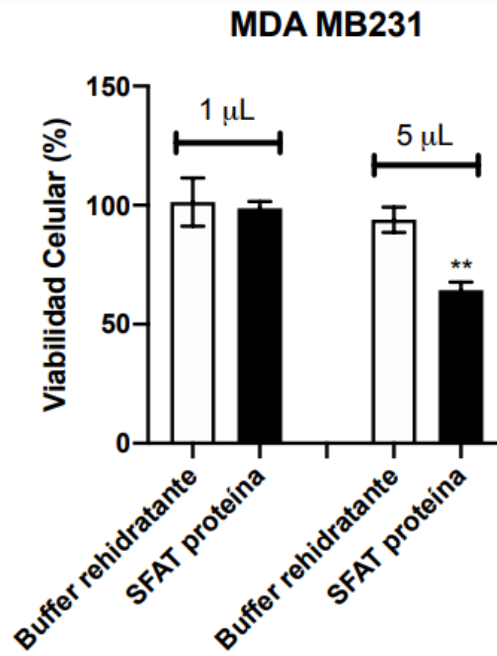


Fig. 7. Evaluación de actividad antiproliferativa. Proteínas aisladas en un peso molecular de 28 KDa. **P<0.01 vs Buffer rehidratante

8. DISCUSIÓN

Respecto a la extracción de fenoles, las bandas obtenidas concuerdan con los resultados observados por Cisneros, 2019. Además, el estándar de verbasacósido, confirma la presencia de este en hoja y raíz de la planta de estudio. Uno de los objetivos de esta investigación fue seleccionar el mejor método de extracción/precipitación que permita hacer estudios proteómicos de *T. stans*, así como, correlacionar la presencia de proteínas involucradas en la biosíntesis de ese compuesto y otros más que son de importancia médica y farmacológica.

La extracción de proteínas a partir de un tejido vegetal es el primer paso en los estudios proteómicos, ya que es necesario e importante asegurar el rompimiento de las células que constituyen a este, es decir, es un paso crucial antes de procesarlas en una electroforesis. El tejido vegetal es muy complejo debido a que sus células están cubiertas por una pared celular rígida, además de otros compuestos como polisacáridos de almacenamiento, lípidos y compuestos fenólicos que dificultan e intervienen en la extracción de proteínas (Faurobert et al., 2007; Méchin et al., 2007). Es por eso que uno de los métodos de pre-extracción más utilizado es la maceración con nitrógeno líquido, que mejora la trituración del órgano o tejido vegetal. La baja temperatura del nitrógeno líquido y la fuerza aplicada al macerar permite obtener un polvo fino, en el cuál las soluciones de extracción utilizadas pueden acceder con mayor facilidad a las células (Wang et al., 2008).

Otro paso muy importante en la extracción de proteínas es la elección de la solución amortiguadora de extracción, debido a que no todos los protocolos descritos en la literatura funcionan de la misma manera en cada tipo de tejido vegetal (Ramírez, 2015). Cabe resaltar, que una de las principales dificultades que conlleva extraer proteínas de los tejidos vegetales es su bajo contenido de estas, la presencia de proteasas y compuestos interferentes como fenólicos, pigmentos, lípidos, ácidos nucleicos, entre muchos más (Méchin et al., 2007).

Según los datos obtenidos de cantidad de proteína total soluble en la extracción/precipitación de proteínas en *T. stans*, los mejores resultados fueron observados a partir de la extracción con sulfato de amonio y TRI-Reagent, ya que la concentración de proteína obtenida en las muestras de hoja y raíz fueron altas (649.6 ± 61.58 , 91.5 ± 81.08 y 167 ± 17.52 , $28.7 \pm 0.23 \mu\text{g}$ de proteína/g de biomasa respectivamente) comparada con los métodos de

TCA/acetona y el Kit Sigma. Sin embargo, el método de Bradford no resultó ser el más adecuado para la cuantificación de proteína, ya que el buffer de rehidratación utilizado, contiene compuestos que pudieran actuar como interferentes, entre ellos la urea, CHAPS, DTT y anfolito Bio-Lyte que sobreestima la concentración de proteína (Bradford, 1976). Esto pudo confirmarse mediante corrimiento electroforético, ya que las muestras con alta concentración de proteína cuantificada mostraron un barrido en el gel, muy pocas o ninguna banda proteica en el gel SDS-PAGE. Lo anterior pone en evidencia que, todos los precipitados de cada uno de los métodos se vieron afectados (algunos más que otros) por los compuestos interferentes del buffer al momento de cuantificar la concentración de proteína. En última instancia, estas interferencias provocan una sobrestimación del contenido de proteínas en las muestras. La proteína soluble con mayor interferencia (según los barridos en los geles que se mostraran más adelante), fue la obtenida por el método de sulfato de amonio. El análisis de varianza de las concentraciones muestra que existen diferencias significativas (valor de $P < 0.05$) sobre los valores de respuesta (número de bandas) obtenidos por cada método y tipo de órgano (ver Anexo 2).

La poliacrilamida es la base de los geles SDS-PAGE, es químicamente inerte, de propiedades uniforme, de preparación rápida, reproducible, además, genera geles transparentes con estabilidad mecánica, insoluble en agua, relativamente no iónicos y por si fuera poco permite una buena visualización de las bandas de proteínas durante un periodo largo de tiempo. Los geles se forman por la co-polimerización de la acrilamida, el entrecruzador N,N'-metilen bis-acrilamida en presencia de un catalizador de ion persulfato (en forma de persulfato de amonio) y un iniciador como TEMED (Álvarez-Contreras, 2011; Pérez-Chabela et al., 2015).

La electroforesis SDS-PAGE es una técnica que permite observar con mayor claridad si un extracto proteico obtenido de una extracción/precipitación de proteínas contiene o no a éstas, si existen compuestos que pudieran estar interfiriendo en la cuantificación y de igual forma nos proporciona información sobre si están sufrieron algún tipo de degradación. Por ejemplo, si el extracto cuantificado contiene compuestos interferentes observaríamos un barrido oscuro en el gel, muy pocas bandas o tal vez ninguna a pesar de que en la cuantificación obtuvimos un valor alto de concentración, o bien si el extracto sufrió alguna degradación en el proceso, se verían bandas, pero también un barrido que oscurecería el gel en el carril que se encuentra la muestra

degradada. Una virtud más de estos geles, es la manera controlada de modificar el tamaño del poro, pues, solo se necesita variar la concentración del polímero (Álvarez-Contreras, 2011).

Con base a los resultados obtenidos en los perfiles electroforéticos, los mejores se pueden observar en la metodología de TCA/acetona tanto para hoja como raíz. Seguido de la metodología de TRI-Reagent, aunque presenta un 45% menos bandas con respecto a la hoja y 73% menos número de bandas con respecto a la raíz comparándolo con lo obtenido con el método de TCA/acetona. Dejando así, con resultados menos satisfactorios a la metodología con sulfato de amonio y el Kit Sigma. Según Ramírez *et al.*, (2018) y Niu *et al.*, (2018), el uso de la metodología de TCA/acetona para extracción de proteínas en plantas ha mostrado resultados favorables en sus investigaciones respecto a sus perfiles proteicos, obteniendo una buena resolución y definición de bandas, lo cual concuerda con los resultados de este trabajo.

Respecto a los perfiles electroforéticos obtenidos de las muestras extraídas con sulfato de amonio y el Kit Sigma, sí se lograron observar algunas bandas definidas, pero mayoritariamente un barrido en todo el carril, o bien la ausencia de bandas. De manera particular, el protocolo con sulfato de amonio, pareciera estar dejando una cantidad considerable de sales al momento de precipitar la proteína y generar el pellet, las cuales pudieran provenir del reactivo precipitante (también del buffer de rehidratación a la hora de rehidratar). Las investigaciones sugieren que este método necesita de una purificación para eliminar completamente las sales de sulfato restantes, como la cromatografía en columna o algunos métodos de ultrafiltración (Básaca–Loya *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2020). Es así, que estas sales pudieran interferir en la cuantificación y la electroforesis, provocando un barrido en el carril del gel o bien que las proteínas hayan sufrido algún tipo de degradación (por temperatura o acción de proteasas) durante el proceso. Para el caso del Kit Sigma, no hay explicación clara del por qué no se lograron recuperar proteínas, ya que se siguió al pie de la letra el protocolo marcado por el proveedor. Al comparar este método con los demás se puede considerar que la cantidad de biomasa sea una variable, ya que ésta se relaciona con la cantidad de reactivo de trabajo tipo 4 que marca el protocolo. Además, es el único protocolo que, en vez de rescatar un pellet de proteína, la separación se realiza en el sobrenadante, generando así un volumen alto en el que la proteína podría encontrarse diluida.

Los métodos utilizados tuvieron un efecto visible en la recuperación de ciertas proteínas dependiendo de su peso molecular, por ejemplo, las muestras de TCA/acetona contenían bandas proteicas desde 20 kDa hasta 85 y 100 kDa (tanto en hoja como raíz), respectivamente. Las muestras con sulfato de amonio solo contenían bandas por encima de 48 kDa para hoja, mientras que para raíz era todo lo contrario. El mismo caso se presentó para las muestras del Kit sigma, pero con un menor bandeo. Para las muestras de TRI-Reagent las bandas se mantuvieron por debajo de los 48 kDa en ambos órganos.

De acuerdo a los estudios de proteómica realizados anteriormente en el grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología de Plantas Medicinales de la Universidad del Papaloapan, los resultados obtenidos por el método de TCA/acetona en este trabajo son más satisfactorios respecto a los perfiles electroforéticos obtenidos por los métodos utilizados (TRI-Reagent) por Montes (2017) y Sánchez (2019), ya que el bandeo es más definido, mayor nitidez y el número de bandas separadas es más abundante.

Los análisis estadísticos (ver Anexo 3) de varianza en base al número de bandas obtenidas, tanto el tipo de órgano como el método de extracción y su interacción, evidencia que hay diferencias significativas en cada experimento (es decir, al menos una de las medias es diferente), además, el valor de $R^2=96.4\%$, sabiendo así que nuestro modelo estadístico se ajusta a los datos obtenidos. Respecto a lo anterior, para cada tipo órgano a estudiar es necesario verificar la extracción de proteína con diferentes métodos para poder asegurar la mejor extracción de PTS. Sin embargo, al realizar la prueba Tukey con 95% de confianza, los valores de la media indican que los mejores efectos respecto al método, órgano y la interacción de ambos son; el mejor método es el de TCA/acetona, seguido del tipo órgano el cual es la raíz y, por último, el mejor efecto se puede obtener al utilizar el método de TCA/acetona para extraer proteína a partir de raíces de *T. stans*.

La actividad antiproliferativa fue evaluada mediante el ensayo de citotoxicidad por el método de MTT, el cual determina espectrofotométricamente el número de células/la viabilidad celular en función de la actividad mitocondrial en células vivas. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables rompen el anillo de tetrazolio (indica el funcionamiento normal de las mitocondrias) del MTT, dando como producto cristales de formazán púrpura (Talib

and Mahasneh, 2010). En base a los resultados obtenidos de las bandas seleccionadas para la evaluación de actividad antiproliferativa, solo uno de los pesos moleculares seleccionados mostró actividad (proteínas contenidas en la banda de 28 kDa aprox.) mientras que los demás no. Estos valores (Fig. 6) muestran una pérdida significativa de la viabilidad celular (40%) revelando así, que alguna (as) de las proteínas contenidas en la banda con un peso molecular de 28 kDa poseen actividad antiproliferativa. Este tipo de actividad biológica ya ha sido reportada en extractos etanólicos de cultivos in vitro de *T. stans* en flores, raíz, corteza y hoja por Thirumal *et al.*, (2012); Thirumal, Kishore and Srimanthula, (2013) y Marzouk *et al.*, (2006). Con la evaluación realizada en este trabajo, podemos afirmar que existe esta actividad a nivel de proteína, habría que realizar más estudios específicos y así validar que los principios anticancerígenos corresponden a ciertas proteínas de bajo peso molecular.

Estos resultados pudieran estar relacionadas con algunas proteínas como las RIPs, según Peumans, Hao and Van Damme, (2001) estas proteínas rondan entre los 30 KDa; las cuales son enzimas con actividad N-glicosidasa (contienen un dominio de ARN N-glicosidasa) causantes de la eliminación de una adenina específica, interrumpiendo así la síntesis proteica y causando la muerte celular (Nielsen and Boston, 2001), pero el presente trabajo no sustenta ni confirma esto.

9. CONCLUSIÓN

Los extractos de raíz y hoja de *T. stans* evaluados por cromatografía en capa fina confirmaron la presencia de verbascósido, lo cual asegura la presencia de las proteínas que intervienen en la ruta biosintética en los extractos proteicos.

De los cuatro diferentes métodos evaluados, todos mostraron resultados favorables respecto a la extracción debido a que se logró cuantificar proteína, los mejores resultados se obtuvieron en los métodos de TCA/acetona y TRI-Reagent.

Con base a los resultados obtenidos en la cuantificación de proteína recuperada de cada protocolo de extracción (en hoja y raíz), los valores de concentración, cantidad de proteína y la relación proteína/biomasa obtenida estuvieron correlacionados con el perfil electroforético (número de bandas) de 3 métodos utilizados (TCA/acetona, TRI-Reagent y el Kit Sigma).

Los resultados obtenidos en los perfiles electroforéticos de geles SDS-PAGE de cada tipo de órgano y método de extracción muestran una diversidad y abundancia considerable de proteínas, ya que se logró obtener un buen número de bandas con buena definición y nitidez. Con base al análisis estadístico, se concluye que todos los experimentos tienen un efecto significativo, pero el mejor efecto (interacción de los dos factores) se puede obtener al utilizar el método de TCA/acetona para extraer proteína a partir de raíces de *T. stans*.

Las bandas pequeñas de 28 KDa analizadas mostraron actividad antiproliferativa.

10. RECOMENDACIONES

Establecer un protocolo de uso funcional del Kit Sigma para ser usado en muestras de plantas. Se recomienda aumentar la cantidad de muestra en relación al reactivo de trabajo tipo 4 y evaluar la cantidad de proteína extraída.

Experimentar con nuevas metodologías de extracción, más robustas y con modificaciones que beneficien o mejoren la precipitación. Además, que eliminen en su mayoría a los compuestos interferentes.

Usar otras metodologías de cuantificación de proteínas, esto debido a la presencia de compuestos interferentes. Por ejemplo, el Kit 2-D quant.

Usar otro tipo de tinción de geles que tenga una mayor sensibilidad, para una mejor visualización de las bandas.

Hacer más estudios de extracción e identificación de la proteína contenida en la banda de 28KDa.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Talib, W. H., & Mahasneh, A. M. (2010). Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia Pharmaceutica*, 78(1), 33–45.
- Ahmed, H. (2005). Extraction of Protein. En H. Ahmed, *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization* (págs. 1-34). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Alade, A., Ekundayo, I., Aboaba, S., & Flamini, G. (2019). Chemical characterization of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth volatile oils. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*; 7(3), 11-16.
- Alcantar-Aguirre, F. C. (2015). Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca. (*Bemisia tabaci*). *Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato.*, 149.
- Alipieva, K., Korkina, L., Erdogan Orhan, I., & Georgiev, M. I. (2014). Verbascoside — A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances*, 32(6), 1065–1076.
- Alonso-Castro, A., Zapata-Bustos, R., Romo-Yanez, J., Camarillo-Ledesma, P., Gómez-Sánchez, M., & Salazar-Olivo, L. (2010). The antidiabetic plants *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae) and *Teucrium cubense* Jacq (Lamiaceae) induce the incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin-resistant murine and human adipocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 1–6.
- Álvarez-Contreras, I. d. (2011). Purificación y caracterización bioquímica de la aminopeptidasa (tcAPE) de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L). In *Tesis de Maestría en Ciencias. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco.*
- Anand, M., & Basavaraju, R. (2020). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 113270.
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2016). Proteomics: Technologies and Their. *Journal of Chromatographic Science*, 1–15.
- Básaca-Loya, G. A., Valdez, M. A., Enríquez-Guevara, E. A., Gutiérrez-Millán, L. E., & Burboa, M. G. (2009). Extracción y purificación de B-ficoeritrina de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum*. *Ciencias Marinas*, 35(4), 359-368.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. (2022, Julio 18). Retrieved from Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=tecoma-stans>

- BRADFORD , M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 72, 248-254.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Coomassie Blue Staining. *Methods in Enzymology, Volume 541*, 161-167.
- Carpentier, S. C. (2009). Plant Protein Sample Preparation for 2-DE. In J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook* (pp. 109-119). USA: Third Edition. Humana Press.
- Cazzulo, J. J. (2014). De la Genómica a la Proteómica. *Manual de Proteómica, Sociedad Española de Proteómica, INTECH, UNSAM-CONICET, Argentina*, 13-20.
- Chen, X., Diao, W., Ma, Y., & Mao, Z. (2020). Extraction and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth using an ethanol/ammonium sulfate aqueous two-phase system combined with ultrafiltration. *RSC advances*, 10(49), 29587-29593.
- Cisneros Ríos, D. d. (2019). Producción de compuestos fenólicos en plántulas y raíces in vitro de *Tecoma stans*. (*Tesis de Maestría en proceso, Universidad del Papaloapan*).
- CONABIO. (2021, 01 27). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. Retrieved from Nova Genera et Species Plantarum: [//www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/12-bigno8m.PDF](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/12-bigno8m.PDF)
- CONAFOR. (2021, 01 27). *Plantas medicinales de la farmacia viviente CEFOFOR. Usos terapéuticos y dosificación*. Retrieved from Plantas medicinales de la farmacia viviente CEFOFOR. Usos terapéuticos y dosificación: [//www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas_medicinales_de_la_farmacia_viviente-conafor.pdf](http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/plantas_medicinales_de_la_farmacia_viviente-conafor.pdf)
- Damerval, C., De Vienne, D., & Zivy, M. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7(1), 52-54.
- Discounter, L. (2022, 07 20). *Laboratoriumdiscounter*. Retrieved from Sulfato de amonio: <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/quimicos/a-z/a/sulfato-de-amonio/>
- Dohnal, B. (1976). Investigations on some metabolites of *Tecoma stans* Juss. callus tissue. Part III. Chromatographical search for iridoids, phenolic acids, terpenoids and sugars. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 46(2), 187-199.
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Espectrometría de masas y análisis de proteínas. *Ciencias (Nueva York, NY)* 312 (5771), 212–217.
- Faurobert, M., Pelpoir, E., & Chaïb, J. (2007). Phenol Extraction of Proteins for Proteomic Studies of Recalcitrant Plant Tissues. *Methods in Molecular Biology, vol. 335: Plant Proteomics: Methods and Protocols*. Humana Press, 9-14.

- González-Fernández, R., Valero Galván, J., & Jorrín Novo, J. V. (2014). Proteómica en hongos fitopatógenos. In: Corrales F., and J. J. Calvete. (eds.). *Manual de Proteómica. Sociedad Española de Proteómica, Madrid*, 585-607.
- Govindappa, M., Sadananda, T. S., Jeevitha, M. K., Channabasava, R., Pooja, K. S., & Raghavendra, V. B. (2011). Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical screening of *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex kunth. *Journal of Phytology* (2011), 68-76.
- Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., . . . Zheng, X. (2012). Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 69, 93-105.
- Hashiguchi, A., Tian, J., & Kom, S. (2017). Proteomic Contributions to Medicinal Plant Research: From Plant Metabolism to Pharmacological Action. *Proteomes*, 5(4), 35.
- Ibarra, M., Cantú, P. C., Verde, M. V., & Oranday, A. (2009). Caracterización Fitoquímica y Efecto Hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su Relación con la Presencia del Cromo como Factor de Tolerancia a la Glucosa . Vol. 20(5), 55-65.
- Ibrahim, M., Prasad, K., Ismail, A., Azlan, A., & AbdHamid, A. (2010). Physiochemical composition and antioxidant activities of underutilized *Mangifera pajang* fruit. *African Journal of Biotechnology*, 9(28), 4392-4397.
- Irigoten-Rascon, F., & Paredes, A. (2015). Raramuri healers, chapter 8. Tarahumara Medicine: Ethnobotany and Healing Among the Raramuri of Mexico. *University of Oklahoma Press, Norman, Publishing Division of the University, Mexico. ISBN: 978- 0-0861-5270-7(epub)*.
- Jara, A., & Kopchick, J. J. (2012). Proteomics: a comprehensive approach. *An. pediatri. (2003, Ed. impr.)*, 137-139.
- Jungbauer, A., & Hahn, R. (2009). Ion-exchange chromatography. In *Methods in Enzymology. Elsevier BV*, 349–371.
- Kruger, N. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. *The protein protocols handbook*, 17-24.
- L., O., & B. J., D. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann NY Acad Sci*, 121, 404-427.
- Larrahondo A., J. E. (2001). Evaluaciones químicas preliminares de productos naturales. *Catorse SCS*.
- Lenchik, N. I., Desiderio, D. M., & Gerling, I. C. (2005). Two-dimensional gel electrophoresis characterization of the mouse leukocyte proteome, using a tri-reagent for protein extraction. *Proteomics*, 5(8), 2202-2209.
- Lins, A. P., & Felicio, J. D. (1993). Monoterpene alkaloids from *Tecoma stans*. *Phytochemistry (Oxf.)* 34 (3), 876–878.

- López Quimbayo, L. D. (2012). Extracción de proteínas a partir de hojas y semillas de *Pentacalia nítida* y evaluación de la actividad antimicrobiana de extracto proteico acuoso. (*Tesis para Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana*).
- López, A. R., Ramírez, F. D., Ramírez, S. I., & Trejo, G. (2008). Acumulación de compuestos antioxidantes en callos de *Tecoma stans* L. (copa de oro) y análisis químico preliminar. V *Congreso Internavional de Ingeniería Bioquímica XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular*, (pp. 1-14). México.
- López-Laredo, A. R., Sepúlveda-Jiménez, G., Ramírez-Flores, F. D., & Trejo-Tapia, G. (2009). Comparison of metabolite levels in callus of *Tecoma stans* (L.). Cultured in photoperiod and darkness. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 550-558.
- Maldonado-Moreno, K., Martell-Gaytán, R., Alvarado-Tenorio, B., Valero-Galván, J., Martínez-Martíne, A., Díaz-Sánchez, Á. G., & González-Fernández, R. (2017). Comparación de métodos de extracción de proteínas de cerebro y linfocitos de rata. *Tecnociencia Chihuahua*, 11(3), 127-137.
- Martínez Báez, A. Z. (2018). Actividad biológica de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*, *Magnolia grandiflora* y su aplicación en formulaciones a base de biopolímeros . (*Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León*).
- Martínez-Báez, A., Oranday-Cárdenas, A., Verde-Star, J., Arévalo-Niño, K., Ibarra-Salas, M., González-González, G., & Rodríguez-Garza, R. (2016). Estudio preliminar sobre la actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 47, núm. 2, 36-44.
- Martínez-Esteso, M. U., Martínez-Márquez, A., Sellés-Marchart, S., Bru-Martínez, R., & Morante-Carriel, J. A. (2015). The role of in proteomics progressing insights into plant secondary metabolism. *Front. Plant Sci.*, 6:504 .
- Marzouk, M., Gamal-Eldeen, A., & Mohamed, M. (2006). Anti-proliferative and antioxidant constituents from *Tecoma stans*. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 01 Nov 2006, 61(11-12), 783-791.
- Méchin, V., Damerval, C., & Zivy, M. (2007). Total Protein Extraction with TCA-Acetone. In H. Thiellement, M. Zivy, & C. Damerval, *Plant Proteomics: Methods and Protocols* (pp. 1-8). Totowa, New Jersey: Primera edición. Humana Press. USA. 2007.
- Mohamed, H. A., Abdel-Aziz, M. M., & Hegazy, M. M. (2019). Anti-oral pathogens of *Tecoma stans* (L.) and *Cassia javanica* (L.) flower volatile oils in comparison with chlorhexidine in accordance with their folk medicinal uses. *Medicina* 55 (6), 301.
- Montes Palmeros, M. (2017). Plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana* expuestas a metil jasmonato. (*Tesis de Maestría, Universidad del Papaloapan*).

- Nielsen, K., & Boston, R. S. (2001). Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52(1) , 785-816.
- Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., & Wang, W. (2018). Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLoS ONE* 13(12), 13.
- Patriota, L., Procópio, T., D. de Souza, M., de Oliveira, A., Carvalho, L., Pitta, M., . . . Napoleão, T. (2016). A Trypsin Inhibitor from *Tecoma stans* Leaves Inhibits Growth and Promotes ATP Depletion and Lipid Peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Frontiers in Microbiology*. Volumen 7. 611, 1-10.
- Paulino Lins, A., & D'Arc Felicio, J. (876-878). Monoterpene alkaloids from *Tecoma stans*. *Phytochemistry*. Volume 34, 3, 1993.
- Pavoković, D., Križnik, B., & Krsnik-Rasol, M. (2012). Evaluation of Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Non-Model Recalcitrant Plant Tissues. *Croat. Chem. Acta* 85 (2) (2012), 177–183.
- Pérez-Chabela, M., Soriano-Santos, J., Ponce-Alquicira, E., & Díaz-Tenorio, L. M. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *NACAMEH*. Vol. 9, No. 2, 77-96.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*, 83(2), 346-356.
- Peumans, W. J., Hao, Q., & Van Damme, E. J. (2001). Ribosome- nactivating from plants:more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.*, Issue 15, 1493-1506.
- Phillips, A. T., & Signs, M. W. (2004). Desalting, concentration, and buffer exchange by dialysis and ultrafiltration. *Current Protocols in Protein Science*, 38(1), 4.4.1–4.4.15.
- Quintín Bueno, N. P. (2010). Extracción de la fracción proteica utilizando dos solventes (agua y Tris-HCl) y determinación de la actividad antimicrobiana a los extractos sobre las cepas *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus aureus* – a partir de hojas. In *de Pentacalia nítida (Fam. Asteraceae)* (pp. 1-22). Bogotá., D.C. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Tesis para Microbiología Industrial.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., & Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of proteomics*, 73(11), 2064-2077.
- Raju, S., S., K., Rao, U., & Sreenath, R. (2011). *Tecoma stans* (L.) ex. Kunth (bignoniaceae): ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *J. Pharmaceut. Biomed. Sci.* 8 (8), 1–5.
- Ramírez Ramírez, G., Heil, M., Orona Tamayo, D., Adame Álvarez, R. M., Ramírez Ramírez, D. T., & Durán Flores, F. D. (2008). ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN GRÁNULOS Y HOJAS DE *Acacia hindsii* Y EN HORMIGAS DE LA REGIÓN DE IRAPUATO. *Universidad Autónoma de Querétaro. Departamento de Ingeniería Genética. Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Campus Guanajuato*, 1-4.

- Ramírez, G., Zamilpa, A., Zavala, M., Perez, J., Morales, D., & Tortoriello, J. (2016). Chrysoeriol and other polyphenols from *Tecoma stans* with lipase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 185, 1-8.
- Ramírez-Ortiz, M. E., Rodríguez-Carmona, O. Y., Hernández-Rodríguez, O. S., Chel-Guerrero, L., & Aguilar-Méndez, M. Á. (2016). ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE Y ANTIOXIDANTE DE TRONADORA, RAÍZ DE WEREQUE Y RAÍZ DE NOPAL. *Alimentos Funcionales de Hoy. Barcelona, España: OmniaScience*, 143-180.
- Rastogi, R., & Mehrotra, B. (1993). Compendium of Indian Medicinal Plants, vol. II. *Central Drug Research Institute and Publications & Information Directorate, Lucknow and New Delhi*, 1970–1976.
- Rivera-Núñez, D., & Obón de Castro, C. (2007). Manual de teoría y prácticas de etnobotánica. *Capítulo 8. Editores Murcia. España.*, 55-66.
- Rojas, A. C. (2021, 03 15). *Método: Gel de poliacrilamida para proteínas*. Retrieved from Conogasi.org: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-poliacrilamida-para-proteinas/>
- S., K., V., S., G., A., S., K. K., & M., M. (2012). In vitro and in vivo anticancer activity of methanolic extract of *Tecoma stans* flowers. *IRJP*, 3(3), 246-251.
- Salem, M., Gohar, Y., Camacho, L., El-Shanhorey, N., & Salem, A. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research Vol. 7(5)*, 418-426.
- Sánchez de Lorenzo-Cáceres, J. M. (2018). *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex Kunth. *Arboles Ornamentales. Ayuntamiento de Murcia. Concejalía de Medio Ambiente.*, 2 pp.
- Sánchez, C. A. (2019). Producción de metabolitos secundarios y perfil proteómico en plántulas transformadas y silvestres de *Stevia rebaudiana*. (*Tesis de maestría, Universidad del Papaloapan*).
- Sbihi, H. M., Mokbli, S., Nehdi, I. A., & Al-Resayes, S. I. (2015). Physico-chemical properties of *Tecoma stans* Linn. seed oil: a new crop for vegetable oil. *Natural Product Research*, 29(13), 1249-1255.
- Senthilkumar, C. S., Suresh Kumar, M., & Rajaseka, M. (2010). In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts from *Tecoma stans* (L.) Juss. et Kunth, *coleus forskohlii* and *pogostemon patchouli* against human pathogenic bacteria. *International Journal of PharmTech Research. Vol.2, No.1*, 438-442.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, núm. 3, 355-363.

- Shaw , M. M., & Riederer, B. M. (2003). Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *PROTEOMICS: International Edition*, 3(8), 1408-1417.
- Sigma-Aldrich. (2022, 07 20). *Plant Total Protein Extraction Kit (PE0230) - Technical Bulletin*. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es>
- Singh, A., B.P., N., & Mathur, K. (2013). Tecoma stan: An Important Medicinal Plant. *International Journal of Pharmaceutical Erudition* 3(2), 13-21.
- Smith, J. (2001). Peptide sequencing by Edman degradation. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA,.
- Smyth, M. S., & Martin, J. (2000). x Ray crystallography. *Molecular Pathology: MP* 53(1), 8–14.
- Srivastava, B. K., & Reddy, M. R. (1994). A new flavanone from the flowers of Tecoma stans. *Orient. J. Chem.* 10 (1), 81–84.
- Sutandy, F., Qian, J., Chen, C.-S., & Zhu, H. (2013). Overview of Protein Microarrays. *Current Protocols in Protein Science*. 72(1), 27-1.
- Taha, M. M. (1954). The carotenoids of the petals of two species of Tecoma. *Biochem. J.*, 58 (3), 413–415.
- Taher, M. A.-H., Dawood, D. H., Sanad, M. I., & Hassan, R. A. (2016). Searching for anti-hyperglycemic phytochemicals of Tecoma stans. *European Journal of Chemistry*, 7(4), 397-404.
- ThermoFisher-Scientific. (2022, 07 20). *Solución de TRI Reagent™*. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM9738>
- Thirumal, M. M., Kishore, G., & Srimanthula, S. (2013). Antiproliferative activity of various parts of Tecoma stans (L.) against human breast cancer cells in vitro. *Res. J. Pharmaceut. Biol. Chem. Sci.*, 4(2), 305–313.
- Thirumal, M., Kishore, G., Prithika, R., Das, S., & Nithya, G. (2012). Invitro anticancer activity of tecomastans (L.) Ethanolic leaf extract on human breast cancer cell line (MCF-7). *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(4), 488-493.
- Tian, X.-Y., Li, M.-X., Lin, T., Qiu, Y., Zhu, Y.-T., Li, X.-L., . . . Chen, L.-P. (2020). A review on the structure and pharmacological activity of phenylethanoid glycosides. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 170.
- Torres Xocua, L. M. (2019). Actividad hipoglucemiante de extractos y fracciones de plantas silvestre e in vitro de Tecoma stans. (*Tesis de Maestría, Universidad del Papaloapan*).
- Vela, J. C. (2004). Aproximación cinética, molecular y proteómica al estudio de podredumbre apical en frutos de tomate ("Lycopersicon esculentum" M.). Implicación de polifenol oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes. (*Tesis Doctoral. Universidad de Alicante*).

- Wang, W., Tai, F., & Chen, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Plant molecular biology reporter*, 26(4), 292-300.
- Wang, W., Tai, F., & Chen, S. (2008). Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *Journal of separation science*, 31(11), 2032-2039.
- Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E., & Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*, 7(3), 340-350.
- Wu, X., Xiong, E., Wang, W., Scali, M., & Cresti, M. (2014). Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nature protocols*, 9(2), 362-374.
- Yates III, J. R. (2011). A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. *Nature Methods*, 8(8), 633-637.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Curva de calibración de Gama Globulina Bovina

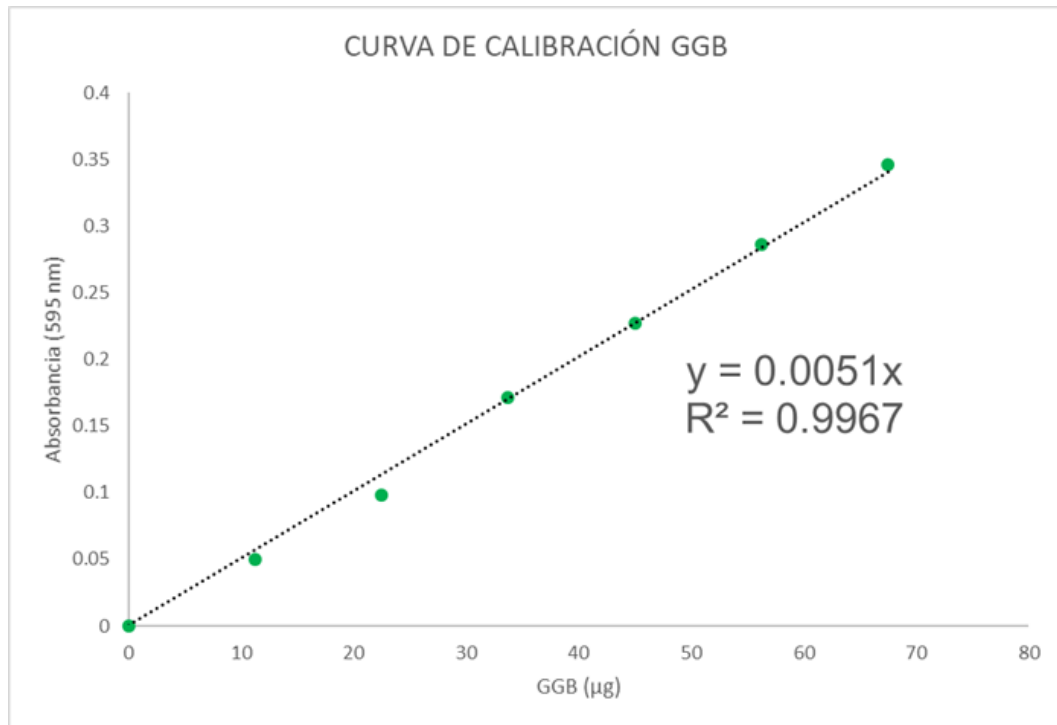


Ilustración a. Se utilizó Gama Globulina Bovina (GGB) 0.75 mg/ml.

ANEXO 2. Análisis de varianza de dos factores sobre las concentraciones (ANOVA de dos factores Minitab)

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Método	3	246244	82081	53,74	0,000
Órgano	1	311564	311564	203,97	0,000
Método*Órgano	3	520466	173489	113,58	0,000
Error	16	24440	1527		
Total	23	1102714			

ANEXO 3. Tablas obtenidas del software de análisis estadístico Minitab.

1. Análisis de varianza de dos factores del número de bandas obtenidas.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Método	3	627,79	209,264	93,01	0,000
Órgano	1	117,04	117,042	52,02	0,000
Método*Órgano	3	220,13	73,375	32,61	0,000
Error	16	36,00	2,250		
Total	23	1000,96			

2. Prueba Tukey sobre los métodos utilizados.

Método de Tukey y una confianza de 95%

Método	N	Media	Agrupación
1	6	15,1667	A
2	6	5,6667	B
4	6	4,5000	B
3	6	1,5000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

*Nota: Métodos: 1) TCA-acetona, 2) Sulfato de amonio, 3) Kit Sigma, 4) TRI-Reagent.

El mejor efecto se obtiene al utilizar el método de TCA/acetona.

3. Prueba Tukey sobre los órganos utilizados.

Método de Tukey y una confianza de 95%

Órgano	N	Media	Agrupación
R	12	8,91667	A
H	12	4,50000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

*Nota: Organo: R) Raíz, H) Hoja.

El mejor efecto se obtiene al utilizar como muestra a la raíz de planta.

4. Prueba Tukey sobre la interacción entre los métodos y los órganos utilizados.

Método de Tukey y una confianza de 95%

Método*Órgano	N	Media	Agrupación
1 R	3	22,0000	A
2 R	3	8,6667	B
1 H	3	8,3333	B
4 H	3	5,0000	B C
4 R	3	4,0000	C
2 H	3	2,6667	C
3 H	3	2,0000	C
3 R	3	1,0000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

*Nota: Métodos: 1) TCA-acetona, 2) Sulfato de amonio, 3) Kit Sigma, 4) TRI-Reagent. Organo: R) Raíz, H) Hoja.

El mejor efecto se obtiene al utilizar el método de TCA/acetona sobre la raíz de la planta.