



**UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA**

Análisis molecular *in silico* de la proteína heveína (hev1) y su actividad antifúngica en *Hevea brasiliensis*.

TRABAJO PRÁCTICO

Previo a la obtención del título de:

Bióloga

Autor:

PALMA MEDINA BYANCA PRISCILA

Tutor:

Blga. Janeth Galarza Tipán, MSc.; Ph.D.

La Libertad - Ecuador

2023

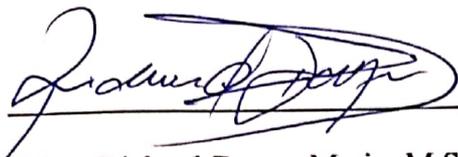
AGRADECIMIENTO

A mi familia, en especial a mis padres, Luis y Marilú, por su apoyo, comprensión y cariño permanentes. A mis hermanos, Irene y Joseph, por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A mis amigos y futuros colegas, quienes estuvieron siempre animándome a continuar, Pablo, Ámbar, Alexandra, Néstor, Gladys, Erick, Daniela, Edgar, Kevin, Edwin, Oscar, Dayana, Luis y demás, gracias a ustedes la carrera fue menos dura.

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena por dejarme formar parte de su comunidad académica. A los docentes de la Facultad Ciencias del Mar por compartir sus conocimientos y experiencias que han permitido que llegue a estas instancias. Agradezco de forma especial a la bióloga Janeth Galarza, por asesorarme y acompañarme durante la realización de este trabajo.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



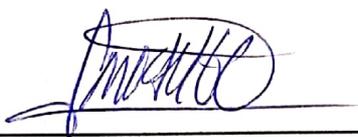
Blgo. Richard Duque Marin, M.Sc.

DECANO DE LA FACULTAD
CIENCIAS DEL MAR



Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.

DIRECTOR DE LA CARRERA
DE BIOLOGÍA



Blga. Janneth Galarza Tipán Ph.D

DOCENTE TUTOR



Blga. Erika Salavarría Palma Ph.D

DOCENTE DE ÁREA

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los contenidos, datos, ideas y resultados expuestos en este documento, corresponden exclusivamente al autor y el patrimonio intelectual del mismo, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y por la normativa intelectual vigente.



Byanca Priscila Palma Medina.

C.C. 0924538036.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	8
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo General	11
3.2 Objetivos Específicos	11
4. MARCO TEÓRICO	12
4.1 Hevea brasiliensis	12
4.2 Proteínas.....	12
4.3 Aplicaciones bioinformáticas en el estudio de las proteínas	13
4.3.1 National Center for Biotechnology Information NCBI	14
4.3.2 BioEdit.....	14
4.3.3 Swiss Model.....	15
4.3.4 RasMol	15
4.3.5 BioRender	16
4.4 Proteína heveína.....	16
4.5 Señalización celular	17
5. METODOLOGÍA	19
5.1 Obtención de la secuencia de la proteína heveína desde el NCBI.....	19
5.2 Alineación de secuencias con porcentajes de similitud.	19
5.3 Modelamiento in silico de la proteína heveína utilizando Swiss-Model.....	19
5.4 Revisión de bibliografía actualizada sobre la activación y función de la proteína heveína para realización del diseño en el programa BioRender.	20
6. RESULTADOS	21
6.1 Secuencia de aminoácidos	21
6.2 Alineamientos de secuencias	21
6.3 Modelado in silico de la proteína heveína	24
6.4 Activación y función de la proteína heveína.....	27
7. CONCLUSIONES	35
8. RECOMENDACIONES	36
9. BIBLIOGRAFÍA	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uniones de puentes disulfuro de la heveína Hb-HEV1 proveniente de <i>Hevea brasiliensis</i>	17
Figura 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína heveína.....	21
Figura 3. Alineamiento de las 8 secuencias seleccionadas en el programa BioEdit.....	23
Figura 4. Composición de aminoácidos de la proteína heveína.	24
Figura 5. A. Modelo de plantilla homóloga de heveína. B. Detalles de la plantilla obtenida.	25
Figura 6. Representación 3D de las estructuras que conforman la proteína heveína. En amarillo se muestra la ubicación de las 8 cisteínas que forman parte de heveína	26
Figura 7. Representación de la proteína precursora de heveína con sus dominios.	26
Figura 8. Pro-heveína con sus dominios: en color rojo se muestra el dominio heveína y en verde se muestra el dominio C-ter (Barwin).....	27
Figura 9. Cascada de señalización mediada por AS Y ET para la expresión de heveína.	32
Figura 10. Diseño general de activación de genes de <i>hev-1</i> y su función.	33
Figura 11. Propuesta de la utilización de heveína como proteína de defensa contra hongos en otras plantas.....	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de similitud de 8 secuencias tomadas del NCBI	22
Tabla 2. Presentación de documentos que ayudaron en la comprensión de la activación de la proteína heveína.	28

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AMPs	Péptidos antimicrobianos
AS	Ácido salicílico
ABA	Ácido abscísico
ERF-1	Factor de respuesta a etileno
ET	Etileno
OGM	Organismo genéticamente modificado
HbERF	Homólogo de factor de respuesta a etileno de <i>Hevea brasiliensis</i>
HbWRKY	Homólogo de factor de transcripción de genes de defensa de <i>H. brasiliensis</i>
MAPK	Quinasas activadas por mitógenos
MeSa	Metil-salicilato
NPR-1	Non-expressor of pathogenesis-related gene 1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
WRKY	Factor de transcripción de genes de defensa

RESUMEN

El árbol de caucho tiene la capacidad de producir látex que es una sustancia natural. Está descrito que las plantaciones de caucho son afectadas por un sinnúmero de enfermedades causadas por hongos que atacan su raíz, tallos, hojas y ramas. Como una manera de protegerse, la planta hace uso de enzimas proteasas, quitinasas, oxidasas y lectinas que son compuestos activos del látex. Heveína es la proteína más abundante en el látex, está involucrada en la defensa de la planta y debido a sus capacidades y bajo peso molecular es considerada una proteína de interés biotecnológico, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar a nivel molecular la proteína Heveína (hev1) y diseñar su activación y función antifúngica en *Hevea brasiliensis* a través de modelamientos *in silico*. El trabajo bioinformático se ha realizado mediante el uso de programas y sitios web como NCBI, BioEdit, Swiss-Model y RasMol; se obtuvo un análisis de su composición aminoacídica, un modelado de alta identidad y un diseño del mecanismo de activación y función de la proteína. Se concluye que heveína tiene un papel importante en la defensa de la planta y se logra un acercamiento al conocimiento del mecanismo de activación de heveína.

PALABRAS CLAVES: látex, heveína, proteína antifúngica, bioinformática, modelado *in silico*.

1. INTRODUCCIÓN

El caucho, árbol bondadoso que posee abundante látex blanco lechoso en su corteza, llamado por los pueblos originarios de la cuenca Amazónica como el árbol Heve y al látex Cahuchu que viene de la palabra taína que significa «lágrimas de árbol» de donde derivan sus nombres común y científico (*Hevea brasiliensis*), es una especie que pertenece a la familia Euphorbiaceae, que crece de manera natural en esta región. Mientras su distribución y cultivo se registra alrededor del mundo (Guerra & Sacoto, 2020).

El árbol de caucho tiene la capacidad de producir látex que es una sustancia natural con una composición de gran complejidad, contiene de 30 a 36% de hidrocarburos del caucho, 0.5% de cenizas, 1.5% de proteínas, 2% de resina (Ledermann, 2018). En total suma el 40.5% de componentes, menos de la mitad, el resto son gomas, aceites, azúcares, sales minerales, ácidos nucleicos, alcaloides, terpenos ceras, almidón, taninos y bálsamos. El látex es producido por casi todas las especies del género *Hevea*, siendo las más importantes *Hevea brasiliensis* y *Hevea benthamiana* las cuales han dado origen variedades que poseen látex de mayor calidad y son más resistentes a los ataques de patógenos. Debido a estas propiedades el látex producido por el árbol del caucho es utilizado para la fabricación de muchos artículos tales como: cintas adhesivas, cintas aislantes, algunos cementos de contacto, material aislante para zapatos, fabricación de correas y manguitos para vehículos, guantes, preservativos y calzado de goma (Beliczky & Fajen, 2010), por lo que es atractivo por las poblaciones amazónicas y empresas manufactureras como las que forman parte de la Asociación Ecuatoriana de Plásticos (ASEPLAS) (Superintendencia de Control del Poder de Mercado, 2016).

Está descrito que las plantaciones de caucho son afectadas por un sinnúmero de enfermedades causadas por hongos que atacan su raíz, tallos, hojas y ramas; favorecidas por la ola invernal, gracias al aumento de la humedad relativa. Bajo estas condiciones se forma una capa de agua sobre la superficie foliar que favorece la germinación de las esporas, el inicio del proceso de infección, la colonización de los tejidos y la diseminación del inóculo (zona contaminada). Además, en el mundo se han registrado 275 especies animales relacionadas a daños en el cultivo de caucho, de las cuales 218 son insectos (Rodríguez Cadena, 2009).

Las enfermedades más importantes que se dan en los cultivos del Ecuador son descritas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias en su guía técnica de cultivos en las que destaca como plaga al gusano cachón *Erinnyis ello* cuyas larvas se alimentan de hojas, tallos tiernos y brotes, los ataques más severos causan defoliación de la planta y de los brotes; y como enfermedad producida por hongos destaca el mal sudamericano de las hojas causada por *Microcyclus ulei*, provoca defoliación de los árboles y otras afectaciones, disminuyendo su producción y en algunas ocasiones llegando a producir la muerte de la planta (INIAP, 2008) (INIAP, 2014).

Como una manera de protegerse del ataque de los hongos, la planta hace uso de enzimas proteasas, quitinasas, oxidasas y lectinas que son compuestos activos del látex. Entre las lectinas de mayor importancia está la proteína heveína que tiene la capacidad de unirse a quinina; su función principal es inhibir el crecimiento de diversos hongos. Así también, un gran número de lectinas han sido caracterizadas de especies de cereales, leguminosas y solanáceas. Éstas, varían ampliamente en estructura y secuencia, pero todas contienen el dominio de unión a quitina. Algunas de ellas han mostrado tener propiedades antimicrobianas. La susceptibilidad que tiene el organismo a ser atacado por estos patógenos puede deberse a la baja producción de látex durante sus primeros años de vida, sabiendo que esta sustancia se constituye de proteínas que sirven en la defensa, como lo son las lectinas. (Broekaert et al., 1990) menciona que el sellado de las heridas se produce por coagulación de látex, este proceso implica la ruptura de los cuerpos lutoideos (organelo de origen vacuolar). El taponamiento de las heridas puede ser importante para prevenir la entrada de patógenos en el floema.

Heveína es la proteína más abundante en el látex, está involucrada en la defensa de la planta y debido a sus capacidades y bajo peso molecular es considerada una proteína de interés biotecnológico, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo caracterizar a nivel molecular la proteína Heveína (hev1) y diseñar su activación y función antifúngica en *Hevea brasiliensis* a través de modelamientos *in silico*.

2. JUSTIFICACIÓN

Existen diversas enfermedades y plagas que pueden presentarse en las plantaciones de caucho y que pueden ser significativas si no se manejan con cuidado. La mayoría de las enfermedades provienen de los hongos y se presentan en las hojas de los árboles durante cualquier etapa del ciclo de vida del árbol. Pueden ocasionar muerte descendente o retraso del crecimiento, en las plantas que están en etapa de vivero y reducción en la producción de látex en el árbol adulto.

Como se mencionó anteriormente, el mal sudamericano de las hojas es la enfermedad más limitante para el cultivo del caucho natural ocasionada por el hongo *Microcyclus ulei*. Este hongo afecta únicamente al género hevea y ataca directamente a las hojas jóvenes en desarrollo causando daño y la caída prematura de las mismas; esto disminuye la actividad fotosintética del árbol y por ende su producción de látex entre un 20 y 75% (Rojas, 2017). Pero esta no es la única enfermedad que afecta al cultivo del caucho. En los estudios realizados por el INIAP en las evaluaciones registra algunos insectos y otros hongos como agentes causales de enfermedades en la planta.

El árbol de caucho está bajo estrés biótico y abiótico de manera constante, por lo que sus estrategias de respuesta y defensa dependen principalmente de la liberación del látex, debido a que le sirve de barrera física protectora y cicatrizante de heridas. Además, el látex contiene a la heveína, una proteína que es fundamental en la coagulación de la goma y en la defensa de la planta (Tam et al., 2015).

Recientemente se ha demostrado que la heveína se une a la quitina e inhibe el crecimiento de varios hongos por lo tanto se ha sugerido que juega un papel en la protección de los sitios de heridas del ataque de hongos. Sin embargo, no se conoce a nivel molecular como se activa la heveína y cómo actúa en el proceso de protección del árbol de caucho contra hongos, por lo que este trabajo está basado en softwares, programas bioinformáticos y análisis de artículos científicos, que permitirán obtener un modelo *in silico* de la proteína heveína (hev1) y su actividad antifúngica en *Hevea brasiliensis*. Esta información ayudará a conocer el proceso biológico y molecular de la proteína, además permitirá proponer el uso de heveína en otros cultivos que tengan problemas de hongos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular la proteína Heveína (hev1) y diseñar su activación y función antifúngica en *Hevea brasilienses* a través de modelamientos *in silico*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analizar a nivel molecular la proteína hev1 seleccionando secuencias registradas en el NCBI que cumplan las condiciones para realizar el modelamiento *in silico*.
- Conocer la estructura de la proteína de interés mediante los programas Swiss-Model y RasMol para la obtención de un modelado de alta identidad.
- Diseñar la activación y función de la proteína heveína demostrando su actividad antifúngica en *Hevea brasilienses* a través del análisis de documentos científicos y el uso del programa BioRender.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 *Hevea brasiliensis*

La *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll.Arg. (1865) es un árbol deciduo muy ramificado que en la naturaleza puede alcanzar 25-40 m de altura con tronco cilíndrico, hasta más de 1 m de diámetro, de corteza lisa de color grisáceo. La especie es originaria de Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana francesa, Perú y Venezuela donde crece en la foresta pluvial amazónica, sobre suelos prevalentemente arcillosos, hasta cerca 600 m de altitud. El nombre del género deriva de “heve”, término con el cual es llamado el árbol por los indígenas de la Amazonia; el nombre específico “brasiliensis” = de Brasil, indica uno de los lugares de origen (Mazza, 2014).

4.2 Proteínas

Las proteínas son biomoléculas que consisten básicamente en carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. También pueden contener elementos como azufre, fósforo, hierro, magnesio y cobre. Son macromoléculas formadas por cadenas de unidades estructurales, los aminoácidos. Estos aminoácidos se unen por medio de enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y el grupo α -amino, con pérdida de agua (Martínez Augustin & Martínez de Victoria, 2006).

La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido; si el número de aminoácidos que forma la molécula no es mayor de 10, se denomina oligopéptido, si es superior a 10 se llama polipéptido y si el número es superior a 100 aminoácidos se habla ya de proteína. Por tanto, las proteínas son cadenas de aminoácidos que se pliegan adquiriendo una estructura tridimensional que les permite llevar a cabo miles de funciones (Riedel, 2008).

Las proteínas están codificadas en el material genético de cada organismo, donde se especifica su secuencia de aminoácidos, y luego son sintetizadas por los ribosomas. Las proteínas desempeñan un papel fundamental en los seres vivos y son las biomoléculas más versátiles y diversas. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre ellas funciones estructurales, enzimáticas, transportadora, etc. (Luque Guillén, 2009)

4.3 Aplicaciones bioinformáticas en el estudio de las proteínas

La bioinformática es un área emergente interdisciplinaria que se ocupa de la aplicación de la informática en la recopilación, almacenamiento, organización, análisis, manipulación, presentación y distribución de información relativa a los datos biológicos o médicos, tales como macromoléculas. La Bioinformática es un campo de las ciencias computacionales que lleva a cabo el análisis de secuencias de moléculas biológicas. Normalmente se aplica a los genes, al ADN, al ARN, o a las proteínas, y resulta especialmente útil para comparar secuencias de genes y proteínas entre distintos organismos, pudiendo ver las relaciones evolutivas entre organismos, e intentando averiguar cuál es la función de dichos genes y proteínas (NIH, 2022).

La bioinformática formal se enfoca al desarrollo de procesos informáticos para modelar y simular sistemas biológicos, así como al desarrollo y aplicación de algoritmos orientados al análisis de datos de distintas disciplinas científicas, para lo cual se aplican tanto métodos clásicos en bioinformática como de vida e inteligencia artificial. Gracias a esta ciencia es posible integrar tecnología, biología y computación para el desarrollo de programas útiles en alineamientos múltiples de secuencias, diseño de árboles filogenéticos, análisis tridimensional de moléculas, así como paquetes de programas para inferir filogenias por distintos métodos; así como analizar secuencias de ADN y secuencias de proteínas, utilizando distintos tipos de algoritmos que permiten comparar secuencias, predecir la estructura de genes, y acomodar posibles errores humanos o de secuenciación (Gómez-Merino, 2010).

La Proteómica es esencialmente el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas (proteoma) expresadas por un genoma, con el fin de obtener una visión global integrada de los procesos celulares. El proteoma de una célula varía según el estado en que se encuentre, de manera que en cada momento y en cada tipo celular el perfil de proteínas expresadas será diferente. Las proteínas pueden identificarse y clasificarse con respecto a su función e interacciones entre ellas, y de este modo es posible caracterizar las redes funcionales que establecen y su dinámica durante los procesos fisiológicos y patológicos (Cárdenas et al., 2019).

En este trabajo se utilizaron varios programas y páginas, mismas que son detalladas a continuación:

4.3.1 National Center for Biotechnology Information NCBI

El sitio del NCBI, conformado por un amplio y diverso banco de bases de datos, herramientas y otros medios, posibilita la exploración integral de sus recursos mediante un sistema de recuperación (un gran motor de búsqueda), distribuido por primera vez en 1991, que permite la búsqueda simultánea de información generalmente de carácter público sobre los más diversos aspectos de las ciencias de la vida y la salud en decenas de bases de datos de una calidad excepcional (Cañedo et al., 2009).

Una de las primeras bases de datos que surgió fue GenBank, que es una colección de todas las secuencias de ADN y proteínas disponibles. Es mantenido por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI). GenBank allanó el camino para el Proyecto Genoma Humano (HGP), lo que permitió la secuenciación completa y la lectura del plano genético. El NCBI ha tenido la responsabilidad de hacer accesible la base de datos de secuencias de ADN de GenBank desde 1992. GenBank se coordina con laboratorios individuales y otras bases de datos de secuencias tales como las del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y la Base de Datos de ADN de Japón.

Estas bases de datos ayudan a los investigadores a encontrar datos biológicos relevantes al ponerlos a disposición en un formato legible en una computadora. Toda la información biológica es fácilmente accesible a través de herramientas de minería de datos que ahorran tiempo y recursos. Las bases de datos biológicas pueden clasificarse ampliamente como bases de datos de secuencia y estructura. Las bases de datos de estructuras son para estructuras de proteínas, mientras que las bases de datos de secuencias son para secuencias de ácidos nucleicos y proteínas (Schmidt, 2019).

4.3.2 BioEdit

BioEdit es un programa gratuito para edición de alineamientos y análisis de secuencias que funciona únicamente sobre ambiente MS/Windows. Es, sin lugar a duda, uno de los programas más conocidos para edición de secuencias para dicho sistema operativo. Cuenta con varias herramientas que van desde la creación de alineamientos hasta la anotación de plásmidos. El alineamiento de secuencias consiste en la comparación de secuencias homologas para localizar las inserciones, deleciones o cambios puntuales en los nucleótidos que se hayan podido producir en el proceso de divergencia desde el ancestro común (Calvo et al., 2011).

4.3.3 Swiss Model

Swiss-Model es uno de los modeladores de proteínas más utilizados en la actualidad por científicos estructurales para la generación de modelos tridimensionales basados en homología, debido a que presenta varias ventajas sobre otros modeladores en el área, entre las que destacan: generación de modelos tridimensionales en poco tiempo (hay casos que con solo unos minutos basta), colocación de los puentes disulfuro, si presenta alguno la proteína analizada, predicción de la estructura cuaternaria en la proteína analizada y visualización de gráficos de alta calidad.

Este programa ha sido pionero en el campo del modelado automatizado desde hace más de 25 años, cuenta con una biblioteca de plantillas que se actualiza constantemente de acuerdo con las estructuras depositadas en el PDB. Además proporciona estimaciones de calidad en varias etapas del proceso de modelado, por ejemplo, indica el porcentaje de identidad y cobertura entre la secuencia modelar y las diferentes plantillas y, una vez que se genera el modelo, la función de QMEAN evalúa la calidad del modelo a escala global y local (Arreola-Barroso et al., 2022).

Este método es fundamental para la construcción de estructuras terciarias por homología, las estructuras de referencia propuestas por el programa Swiss- Model en donde deberán tener un mínimo de 30% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la proteína. La herramienta construyó la estructura base en tres dimensiones siguiendo parámetros de similitud (Ballesteros & Parra, 2018).

4.3.4 RasMol

RasMol es un programa para representación gráfica de moléculas que busca visualizar las proteínas, los ácidos nucleicos y las moléculas pequeñas. Es una herramienta educativa poderosa para mostrar la estructura del ADN y de las proteínas. El programa se diseñó para presentar, enseñar y generar imágenes que se pudieran publicar. El programa trabaja con archivos de coordenadas moleculares de diferentes formatos entre ellos: PDB (Brookhaven Protein Databank), MDL (Molecular Design Limited's), MSC (Minnesota Supercomputer Center's), XYZ (XMol) y CHARMm; estos archivos contienen la posición espacial de cada uno de los átomos que conforman la molécula y los enlaces formados entre ellos. Con este programa se pueden ver, rotar y animar tanto moléculas

pequeñas como moléculas y cristales grandes. Cada una de las perspectivas del modelo se puede guardar como una imagen diferente (Malinowski et al., 2004).

4.3.5 BioRender

BioRender es un programa online gratuito para hacer imágenes científicas. Ofrece plantillas pre armadas editables y ofrece stickers para armar tu propia presentación según el área: microbiología, biología celular, botánica, neurociencias, inmunología, entre otros. Se puede regular el tamaño de la imagen creada según sea para un artículo, una presentación digital, o medidas personalizadas. Una vez terminado, se puede compartir por correo electrónico o redes sociales, además de descargarlo como imagen (Ruether, 2022).

4.4 Proteína heveína

Descrita por primera vez en 1960 (Archer, 1960) y su secuencia de aminoácidos fue identificada en 1975 (Walujono et al., 1975). Heveína fue purificada e identificada inicialmente en el látex del árbol del caucho, *Hevea brasiliensis*, y es uno de los componentes proteicos más abundantes del mismo. Consta de 43 aminoácidos, rico en glicina y cisteína, con actividad sobre la quitina (Cardillo et al., 2018). La heveína madura se origina a partir de una proteína precursora de 204 aminoácidos que se procesa postraduccionalmente, dando lugar a 2 dominios distintos: el dominio de unión a quitina N-terminal de 43 aminoácidos (heveína madura), y un dominio C-terminal de 144 aminoácidos homólogo a las proteínas inducibles por heridas WIN1 y WIN2 de la patata (Pujade-Renaud et al., 2005).

Su estructura terciaria está compuesta por 2 hélices alfa y 3 láminas beta las cuales son antiparalelas; estas son responsables por la formación de la lámina beta central con las 2 hélices alfa largas situadas acá al lado y estabilizado por puentes disulfuro (Marques Dos Santos, 2022). Presenta ocho cisteínas y las uniones se forman entre Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6 y Cys7-Cys8 (Fig. 1).

Hb-HEV1

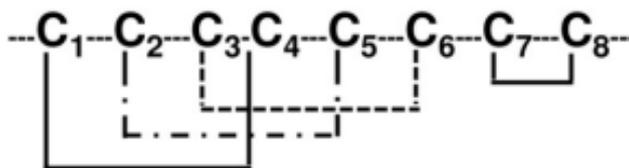


Figura 1. Uniones de puentes disulfuro de la heveína Hb-HEV1 proveniente de *Hevea brasiliensis*.

Fuente: Cardillo et. al. 2018

Existen varios péptidos/proteínas que presentan similitudes en sus dominios con la heveína, además de la heveína misma, y en todos se observó actividad antifúngica e insecticida. La aglutinina de germen de trigo (WGA) es la heveína más estudiada, interactúa específicamente con oligómeros de quitina y pueden ligarse a las extremidades de hifas y esporas jóvenes, además de poseer afinidad por zigosporas inhibiendo el crecimiento de sus hifas (Mendoza Blanco, 2007).

4.5 Señalización celular

Se refiere al conjunto procesos y etapas que ocurren de forma concatenada por el que una célula convierte una determinada señal o estímulo, de origen extra o intracelular, en otra señal o respuesta específica. Las respuestas de esta señalización pueden ser excitatorias, inhibitorias o moduladoras, y pueden alterar el movimiento o forma celular, alterar el metabolismo celular o la expresión génica, también es importante mencionar que una misma señal química puede desencadenar respuestas diferentes, dependiendo del tejido o célula blanco (Fickert, 2012).

Las principales moléculas que participan en la señalización son: aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, hormonas, derivados de ácidos grasos, óxido nítrico, monóxido de carbono, especies reactivas de oxígeno (ROS) y estas moléculas pueden ser secretadas por la célula señalizadora o permanecer unida a la superficie de esta. La señalización de defensa está conducida por diversas moléculas que le permiten a la planta responder a los estímulos. La principal función de estas moléculas de señalización consiste en traducir los estímulos extracelulares registrados por receptores de la célula para la activación de genes específicos, que juntos ejecutan respuestas intracelulares altamente específicas al

estímulo externo agresor. Los señaladores ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) juegan un papel importante tanto en la resistencia basal como en la resistencia específica (Díaz-Puentes, 2012).

5. METODOLOGÍA

Trabajo bioinformático:

5.1 Obtención de la secuencia de la proteína heveína desde el NCBI

Para la obtención de la secuencia de aminoácidos de la proteína heveína se realizó una búsqueda en la página del NCBI. Seleccionando la opción nucleótido y con el nombre científico del organismo junto con el nombre de la proteína.

5.2 Alineación de secuencias con porcentajes de similitud.

Una vez seleccionada la secuencia original, que en este caso es la correspondiente al código AAO63571.1, se realizó el alineamiento de secuencias mediante el BLAST, con la finalidad de obtener porcentajes de similitud y cobertura de la secuencia en estudio comparada con otras secuencias semejantes pero que provienen de otros organismos. Luego se realizó la descarga en formato FASTA de 8 secuencias de heveína, las cuales tenían tamaños iguales o cercanos a la secuencia original. Posteriormente estas secuencias fueron alineadas en el programa BioEdit, con la finalidad de conocer zonas variables y zonas conservadas que están formando parte de estas secuencias (Bello, 2020).

5.3 Modelamiento *in silico* de la proteína heveína utilizando Swiss-Model.

Para esto, se ingresa la secuencia original de la proteína de interés en la página de Swiss-Model. El programa se encarga de proporcionar un modelo teórico homólogo de la proteína heveína. Dentro de la plantilla obtenida se visualizan graficas correspondientes a una comparación de estructuras por homología las cuales tienen un mínimo de 30% de identidad con la secuencia original, siguiendo parámetros de similitud y evaluando la calidad de las plantillas.

Con la plantilla ya seleccionada y descargada en PDB, se hace uso del programa RasMol para la observación de la estructura de la proteína de interés. Aquí se realizaron comparaciones de las estructuras que la conforman (hélices alfa, laminas beta) (Pillacela et al., 2020).

5.4 Revisión de bibliografía actualizada sobre la activación y función de la proteína heveína para realización del diseño en el programa BioRender.

El diseño se fundamentó en una revisión bibliográfica detallada del funcionamiento de la proteína de interés dentro de *Hevea brasiliensis* utilizando una tabla general para el registro de datos con sus respectivas referencias. Para la visualización de la activación de la proteína se utilizó BioRender que es un programa que permite hacer imágenes científicas, ofreciendo plantillas editables de acuerdo con el área de estudio: microbiología, biología celular, botánica, neurociencias, entre otros. Una vez obtenida la información necesaria, mediante ilustraciones se procedió a ordenar y simular el proceso de cómo actúa heveína en la defensa del árbol del caucho contra patógenos.

6. RESULTADOS

6.1 Secuencia de aminoácidos

Se seleccionó a heveína, proteína correspondiente a *Hevea brasiliensis* en la plataforma digital NCBI con el código AAO63571.1, donde se obtuvo la siguiente secuencia de aminoácidos:

Hev1 – 204 aa <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAO63571.1>

```
1  mnifmvllc ltgvaiaeqc gwqaggklcp nnlccsqygw cgssddycsp skncqsnckd
61  sgegvggeia ydvratyhly npqdhgwdln avsaycstwd ankpyswrsk ygwtafcgpv
121 gahgqpscgc clsvtntgtg akttvrvdq csngglldv nvfrqldtdg kgyerghltv
181 nyqfvdcgds fnplfsimks svin
```

6.2 Alineamientos de secuencias

Se selecciona la secuencia de interés y se corre el BLAST con lo cual se obtiene la gráfica del alineamiento de la secuencia de heveína comparada con secuencias similares de otros organismos.

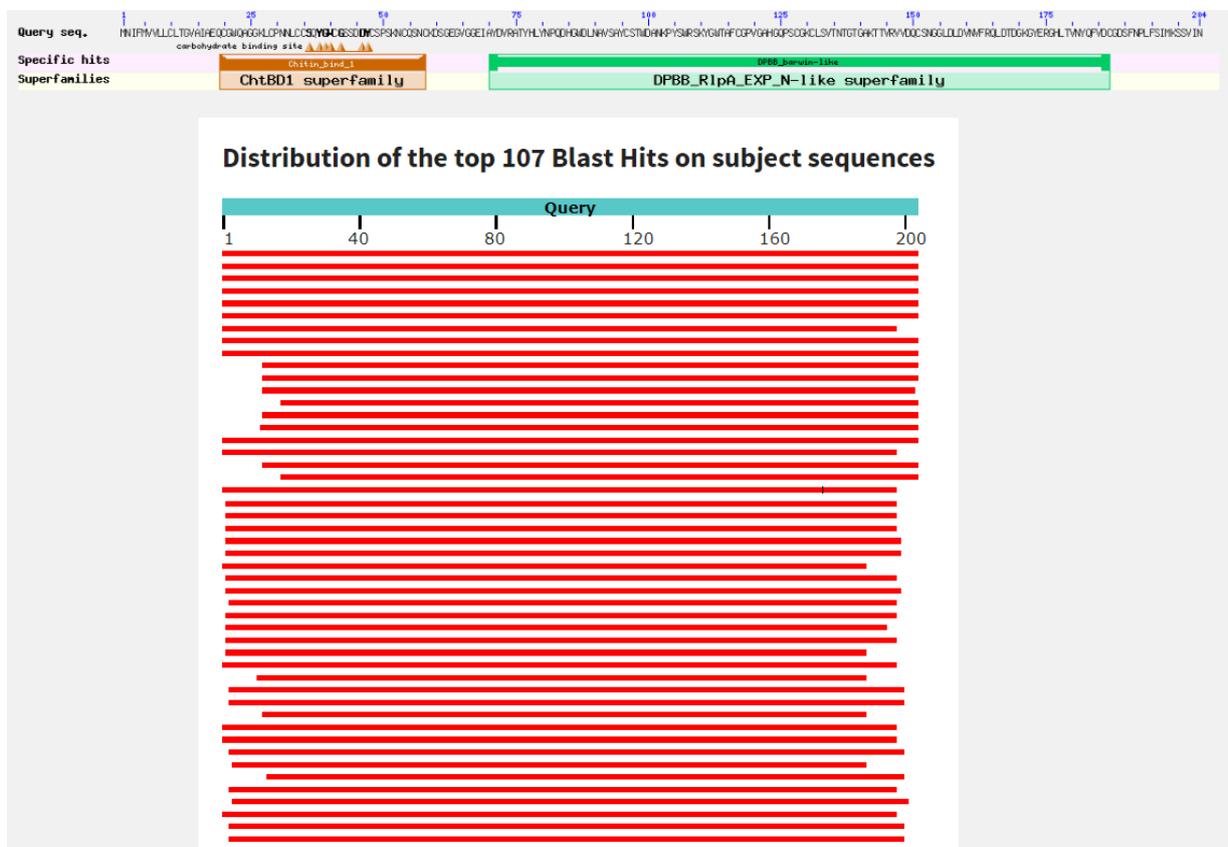


Figura 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la proteína heveína.

Fuente: NCBI

De todas las secuencias proporcionadas por el NCBI, se seleccionaron 8 secuencias para realizar la comparación de similitud e identidad con la secuencia original, considerando las secuencias AAO63571.1 con 100% de similitud, AAO63574.1 con 92.16% de similitud, AAO63572.1 con 92.23% de similitud, EEF31100.1 con 83.33% de similitud, KAG5232640.1 con 77.61% de similitud, KAG5232646.1 con 77.11% de similitud, XP_002319076.2 con 77.50% de similitud, XP_020212639.1 con 77.37% de similitud, tal como se detalla en la Tabla 1:

Tabla 1. Porcentajes de similitud de 8 secuencias tomadas del NCBI

Descripción	Nombre científico	Cobertura de consulta	Porcentaje identidad	Acceso
HEV1.1	<i>Hevea brasiliensis</i>	100%	100%	AAO63571.1
HEV2.2	<i>Hevea brasiliensis</i>	100%	92.16%	AAO63574.1
HEV1.2	<i>Hevea brasiliensis</i>	100%	92.23%	AAO63572.1
Proteína inducida por heridas WIN2	<i>Ricinus communis</i>	97%	83.33%	EEF31100.1
Heveína	<i>Salix suchowensis</i>	97%	77.61%	KAG5232640.1
Heveína	<i>Salix suchowensis</i>	97%	77.11%	KAG5232646.1
Pro-heveína	<i>Populus trichocarpa</i>	96%	77.50%	XP_002319076.2
Proteína inducida por heridas WIN2	<i>Cajanus cajan</i>	91%	77.37%	XP_020212639.1

Fuente: Palma, 2023

El resumen gráfico otorgado por NCBI muestra las diferencias en el tamaño de las secuencias seleccionadas, lo que puede indicar que algunas de ellas no poseen la

cantidad de aminoácidos que posee la secuencia original. El alineamiento de las secuencias descritas en la Tabla 1 se realizó con la finalidad de identificar similitudes entre secuencias y desarrollar modelos homologos de la proteína de interes.

Para conocer las regiones conservadas y regiones variables de las secuencias en estudio se realizó el alineamiento con 8 secuencias correspondientes a los géneros *Hevea*, *Ricinus*, *Salix*, *Populus*, *Cajunus* en el programa BioEdit. El programa usa simbologías de letras, colores y caracteres; en este caso, cada letra tiene un color y simbolizan los aminoácidos, los puntos simbolizan los aminoácidos conservados en las secuencias. Se pueden observar diferencias en el número de aminoácidos de heveína en diferentes géneros. Esto se debe, principalmente, a las variaciones que presentan los organismos debido al proceso evolutivo. Estas diferencias se basan en la sustitución de aminoácidos por otros en las diferentes secuencias, dando a entender que se puede tratar de proteínas homologas ya que mantienen gran parte de la estructura que les confiere su función antifúngica pero que pertenecen a otras especies.



Figura 3. Alineamiento de las 8 secuencias seleccionadas en el programa BioEdit

Fuente: BioEdit

La composición de aminoácidos (aa), otorgada por BioEdit (fig. 4), revela los porcentajes de los aa predominantes en la proteína precursora de heveína (204 aa). Glicina (Gly)

obtuvo el porcentaje más alto con 12.25%, le siguen Serina (Ser) con 9.31% y Asparagina (Asn), Valina (Val) y Cisteína (Cys) con 7.35%. Gly, Ser y Val están involucrados en la respuesta al estrés abiótico, regulación de la entrada/salida del agua en la planta y en la resistencia de la planta frente a estrés, cambios de temperatura, etc., respectivamente. Por otro lado, Asn es usada como molécula de almacenamiento y transporte de nitrógeno en muchas plantas, mientras que Cys ejerce un papel esencial en las respuestas de las plantas a situaciones de estrés (Gotor, 2010).

En heveína madura (43 aa) los aminoácidos predominantes son Cys con 18.60% y Gly con 11.62%, estos aa juntos permiten la interacción con quitina; además de que las uniones disulfuro entre Cys le confieren estabilidad a la proteína (Velasco et al., 2022).

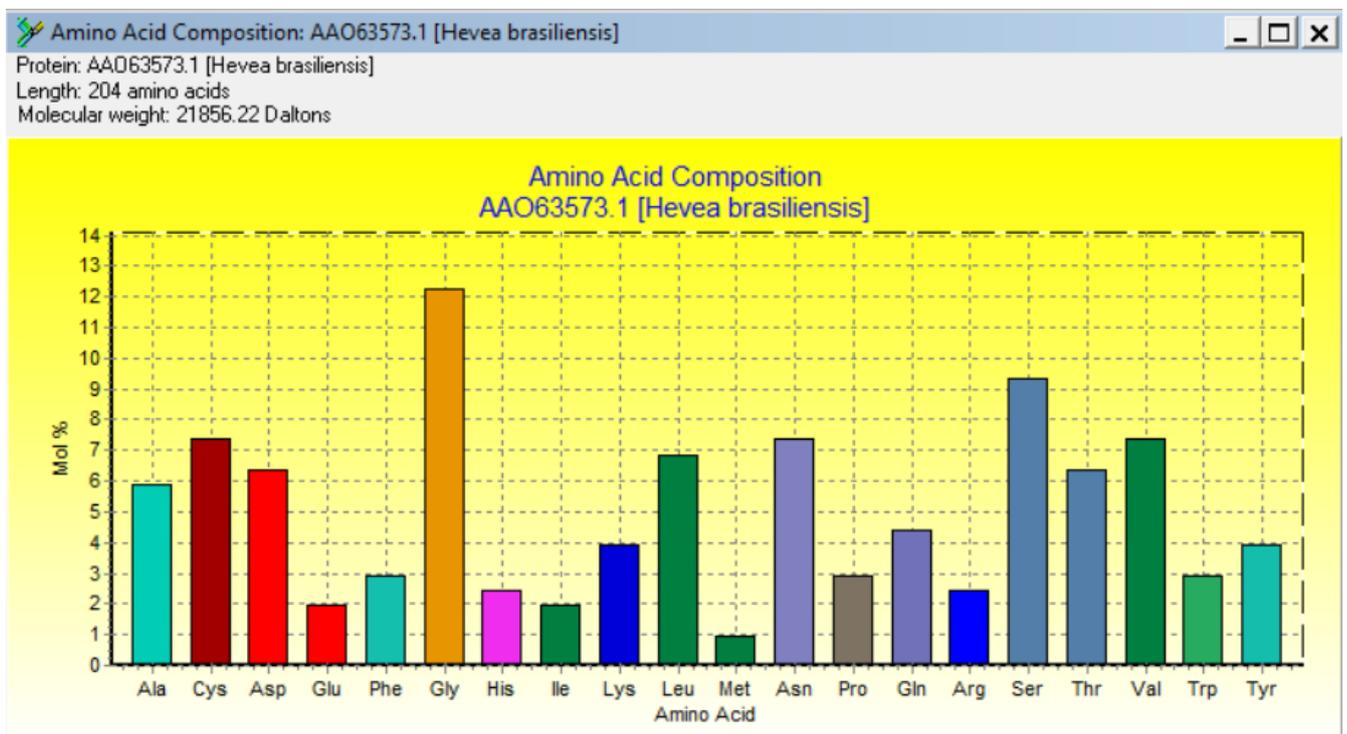


Figura 4. Composición de aminoácidos de la proteína heveína.

Fuente: BioEdit

6.3 Modelado *in silico* de la proteína heveína

El modelo homólogo proporcionado por el programa Swiss-Model presenta una estructura tridimensional donde es difícil diferenciar entre hélices α y láminas β (fig. 5A), aun así, la plantilla tuvo un 100% de identidad con la secuencia de heveína, como se muestra en la figura 5B. En esta última figura se muestran detalles de la plantilla, como el valor de

QMEAN el cual indica la calidad del modelo a escala global y local siendo los valores aceptados entre 0 y -4.0 (que en este caso fue de 0.17) y el valor QMEANDisCo que permite realizar estimaciones de calidad, teniendo como rango aceptable valores entre 0 y 1 donde uno es bueno (y en te caso el valor fue 0.69 ± 0.12).

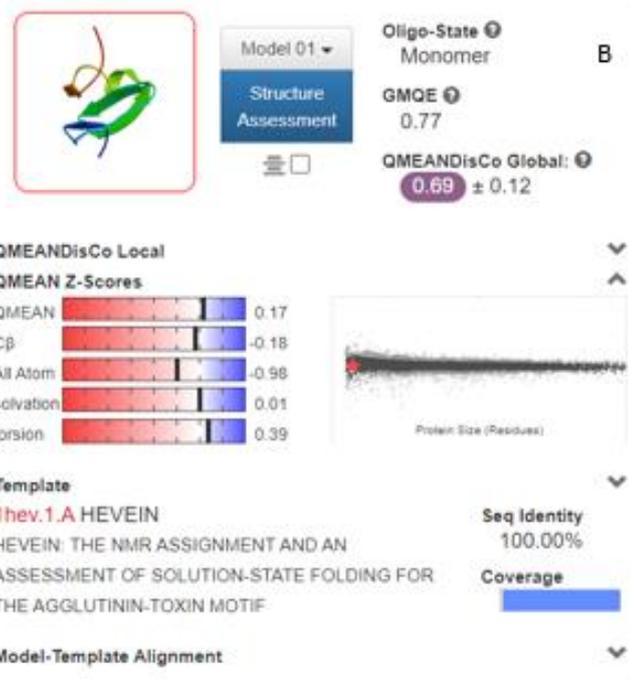
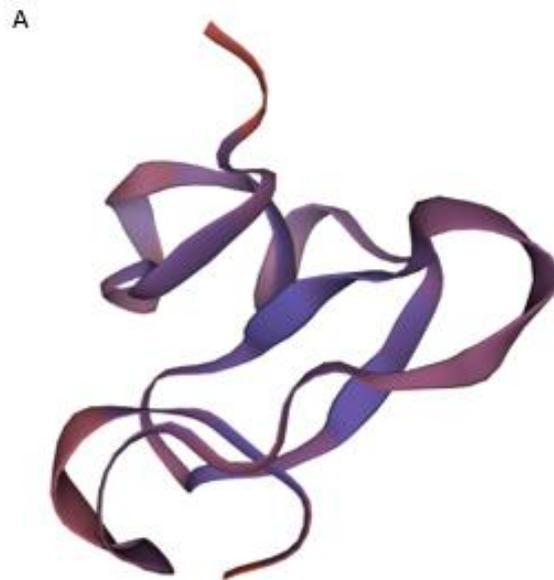


Figura 5. A. Modelo de plantilla homologa de heveína. B. Detalles de la plantilla obtenida.

Fuente: Swiss-Model

Con respecto a los componentes estructurales de la proteína, se obtuvo desde el programa RasMol, el mismo que nos entregó lo siguiente: se diferencian las hélices α , giros y láminas β . Heveína es una proteína cuya estructura globular está compuesta por 2 hélices alfa y 3 láminas beta las cuales son antiparalelas.

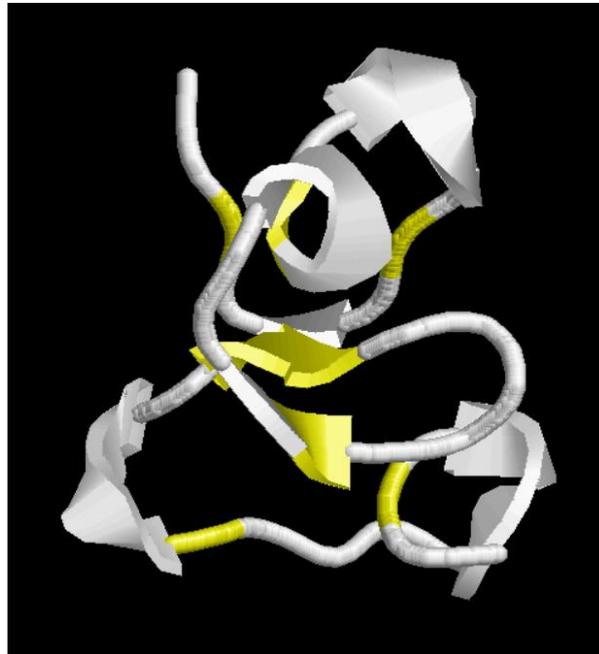


Figura 6. Representación 3D de las estructuras que conforman la proteína heveína. En amarillo se muestra la ubicación de las 8 cisteínas que forman parte de heveína

Fuente: RasMol

Los dominios presentes en la proteína precursora de heveína (204 aa) son 2: la heveína de 43 aa N-terminal, una lectina que lleva un motivo de unión a quitina con propiedades antifúngicas, y un dominio C-terminal (C-ter), que posee propiedades amiloides (Berthelot et al., 2016).

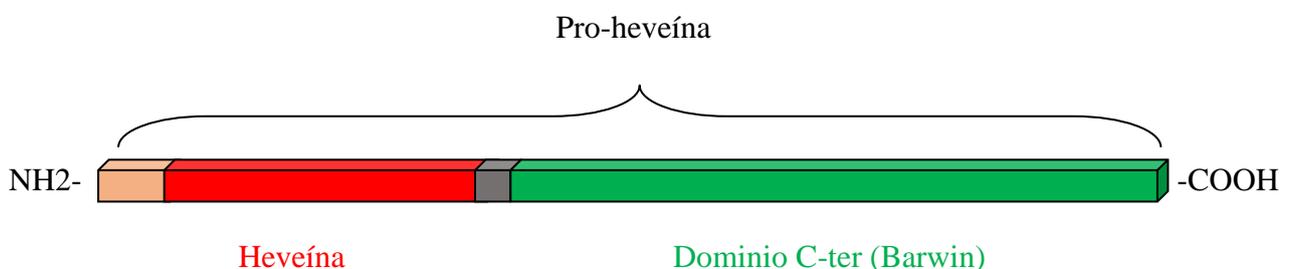


Figura 7. Representación de la proteína precursora de heveína con sus dominios.

Fuente: Adaptado de Berthelot et al., 2016

Heveína o dominio de unión a quitina tipo 1 (ChtBD1), es un dominio de lectina que se encuentra en proteínas de plantas y hongos que se unen a N-acetilglucosamina, endoquitinasas de plantas, un importante alérgeno de unión a IgE en el látex de caucho natural. Este dominio está involucrado en el reconocimiento y/o unión de subunidades de quitina (Lu et al., 2020).

El dominio C-terminal es un dominio perteneciente a la familia de proteínas de plegado de barril beta de doble psi (DPBB) similares a Barwin. Es una probable lectina vegetal que puede estar involucrada en un mecanismo de defensa y se une débilmente a heveína (Maia et al., 2021).



Figura 8. Pro-heveína con sus dominios: en color rojo se muestra el dominio heveína y en verde se muestra el dominio C-ter (Barwin)

Fuente: RasMol

6.4 Activación y función de la proteína heveína

Se sabe que la expresión de heveína se da en las células del árbol de caucho, es almacenada en los laticíferos, está involucrada en la coagulación de látex y tiene la capacidad de unirse a quitina. Al igual que la heveína, los péptidos similares a la heveína inhiben el crecimiento de los hongos que contienen quitina y defienden a las plantas contra el ataque de una amplia variedad de patógenos fúngicos (Tam et al., 2015). A continuación, se presenta una revisión bibliográfica de la activación de la proteína heveína basada en la información científica de la tabla 2.

Tabla 2. Presentación de documentos que ayudaron en la comprensión de la activación de la proteína heveína.

Acción de la proteína	Referencia
<p>Obtuvieron ARN de heveína y le aplicaron tratamientos con ET y ABA descubriendo que estas moléculas favorecen la expresión de heveína.</p>	<p>Xiao-Dong et al., 2002.</p>
<p>Se compara la composición y estructura de las diferentes proteínas de defensa para determinar alergenos, destaca que dentro de las clases de quitinasas con dominio heveína, el de las de clase I tiene un alto grado de identidad con la heveína del látex.</p>	<p>Díaz Perales, A., 2000.</p>
<p>Aislaron heveína del látex y la relacionan con una lectina de la ortiga debido a su similitud, además demuestran su actividad antifúngica <i>in vitro</i>. Discuten sobre la posibilidad de que su activación sea similar a quitinasa, debido a su alta identidad y su ubicación en vacuolas de las plantas que las producen.</p>	<p>Van Parijs et al., 1991.</p>
<p>Describen los mecanismos de defensa de las plantas y la activación de señales mediadas por AS, ET, JA. Así mismo, presentan brevemente las vías de señalización y las moléculas que forman parte del proceso.</p>	<p>Ramírez, M., & Rodríguez, A., 2012.</p>
<p>Identificaron genes que codifican a proteínas HbWRKY, descubrieron que HbWRKY40 fue significativamente inducida por SA. Sus hallazgos indican que HbWRKY40 regula genes de defensa en <i>H. brasiliensis</i>.</p>	<p>Yang et al., 2020.</p>
<p>Presentan una descripción detallada de las vías y moléculas que participan en la activación de AS, ET, ABA, AJ, entre otros.</p>	<p>Jordán, M., & Casaretto, J., 2016.</p>
<p>Describe los avances en el entendimiento de la señalización molecular para la inducción de la RSA mediada por el AS.</p>	<p>Díaz-Puentes, 2012.</p>
<p>Informan sobre proteínas quinasas de <i>H. brasiliensis</i>, denominadas HbMAPKs, las cuales tienen diferentes funciones en la biosíntesis del látex.</p>	<p>Jin et al., 2017.</p>

Reporta un factor de etileno presente en *H. brasiliensis* que coordina genes implicados en la defensa de la planta; HbERF-IXc5 desempeña un papel importante en la producción de látex.

Lestari et al., 2018.

Realizan una revisión general de la función y conformación de las cascadas de MAP cinasas y de su participación y asociación en la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos.

Saucedo & Gavilanes, 2005.

Fuente: Palma, 2023

Normalmente, heveína es producida por las células cuando ocurre un daño mecánico, que suelen ser cortes realizados al tronco para extracción de látex, con la finalidad de iniciar con el proceso de coagulación uniendo las partículas de caucho (RPS) y sellando la herida. El puente heveína-RPS está mediado por N-acetil-D-glucosamina e implica una glicoproteína receptora de 22 kDa localizada en la superficie de RPS (Chrestin et al., 1997). Para la defensa del árbol frente a patógenos fúngicos que atacan las hojas, el látex actúa como barrera para impedir el paso del hongo hacia el interior, en este caso, heveína actúa como una proteína de defensa que, gracias a su dominio N-terminal detecta y se une de manera reversible a la quitina presente en el agente agresor.

El mecanismo de activación de heveína no ha sido esclarecido pero se sabe que su activación es similar al de quitinasas; según (Díaz Perales, 2000), las quitinasas con dominio de heveína (quitinasas de clase I) tienen un alto grado de identidad con la heveína del látex, del mismo modo (Van Parijs et al., 1991) expresan que la ubicación de heveína y de las quitinasas es muy similar en las plantas que las producen, y alegan que su activación y función podrían ser igual de similares.

(Xiao-Dong et al., 2002) mencionan que la expresión del gen de heveína podría ser inducida por etileno (ET) y ácido abscísico (ABA), aunque otros autores expresan que las moléculas son etileno (ET) y ácido salicílico (AS) (Devadas et al., 2002; Téllez, 2016); ambas moléculas pueden actuar sinérgica o antagónicamente durante la activación de genes de defensa, por lo que se las reconoce como las moléculas que inician la cascada de señalización y la respuesta inducida de la planta.

En la transducción de señales mediadas por ET se da cuando es liberado por el agente invasor mientras establece una relación parasitaria con la célula anfitriona. El ET será reconocido por una proteína homóloga de ERF1 (factor de respuesta a etileno) presente en *H. brasiliensis* denominada HbERF-IXc5 (Lestari et al., 2018). Una vez el ET llega al sitio de unión, la proteína se fosforila gracias a su interacción con la HbCRF (quinasa), lo que desencadena la vía de activación de las MAP quinases. Esta vía inicia con la fosforilación de HbMAPKKK, que fosforila a HbMAPKK que a su vez fosforila a HbMAPK, esto permite la activación del factor de transcripción HbWRKY40 que inducirá la síntesis de ARNm y expresión de heveína.

En la transducción de señales mediadas por SA existen dos posibles vías: la dependiente y la independiente de NPR1 y su interacción con un factor de transcripción WRKY (Ramírez & Rodríguez, 2012). En *Hevea brasiliensis* se ha demostrado la expresión del gen HbWRKY40 el cual es dependiente de AS (Yang et al., 2020). En este caso, la presencia AS induce la síntesis del factor de transcripción HbWRKY40, al mismo tiempo AS es transformado en metil-salicilato MeSa. MeSa se une a NPR1 y la activa. HbWRKY40 y NPR1 inducen la expresión de ARNm de heveína (Fig. 9).

En términos generales, la activación de los genes que codifican para heveína inicia con la interacción entre patógeno y la epidermis de la hoja, luego el patógeno atraviesa la membrana gracias a la activación de supresores de defensa, libera sus esporas/hifas y éstas germinan dando paso al proceso de infección. Con la intrusión del patógeno, la célula desencadena la primera respuesta defensiva, la liberación del látex, para reforzar su pared celular e impedir el avance del patógeno y, a su vez, moléculas de señalización promueven la transducción de señales: ET y AS inducen la expresión de los genes de defensa produciendo ARNm de Hev-1. Luego de las modificaciones postraduccionales, la heveína madura se une a la quitina presente en la pared celular de la espora/hifa alterando la membrana y provocando la lisis celular (Fig.10).

Sin duda la investigación referente a proteínas antimicrobianas es un área de gran interés. Heveína al poseer actividad antifúngica es parte del grupo de péptidos antimicrobianos (AMPs) estudiados para encontrar métodos de control de plagas en cultivos; su aplicación puede darse en plantas de interés que sufren de constantes ataques por hongos, como árboles maderables, el algodón (*Gossypium spp.*) y la linaza (*Linum usitatissimum*) para la cual se plantea una propuesta con el posible mecanismo de acción de heveína (Fig. 11). Es importante mencionar que heveína es asociada con la alergia al látex en los humanos

(Jiménez-Carrillo et al., 2022); por lo que su aplicación en plantas que contribuyen en la alimentación sigue siendo considerada. (Giraldo, 2011) menciona que los productos génicos que normalmente no inducen alergias no se convierten en alergénicos de repente si son expresados en una planta GM. Si el producto es conocido como alergénico, entonces también será alergénico en una planta GM.

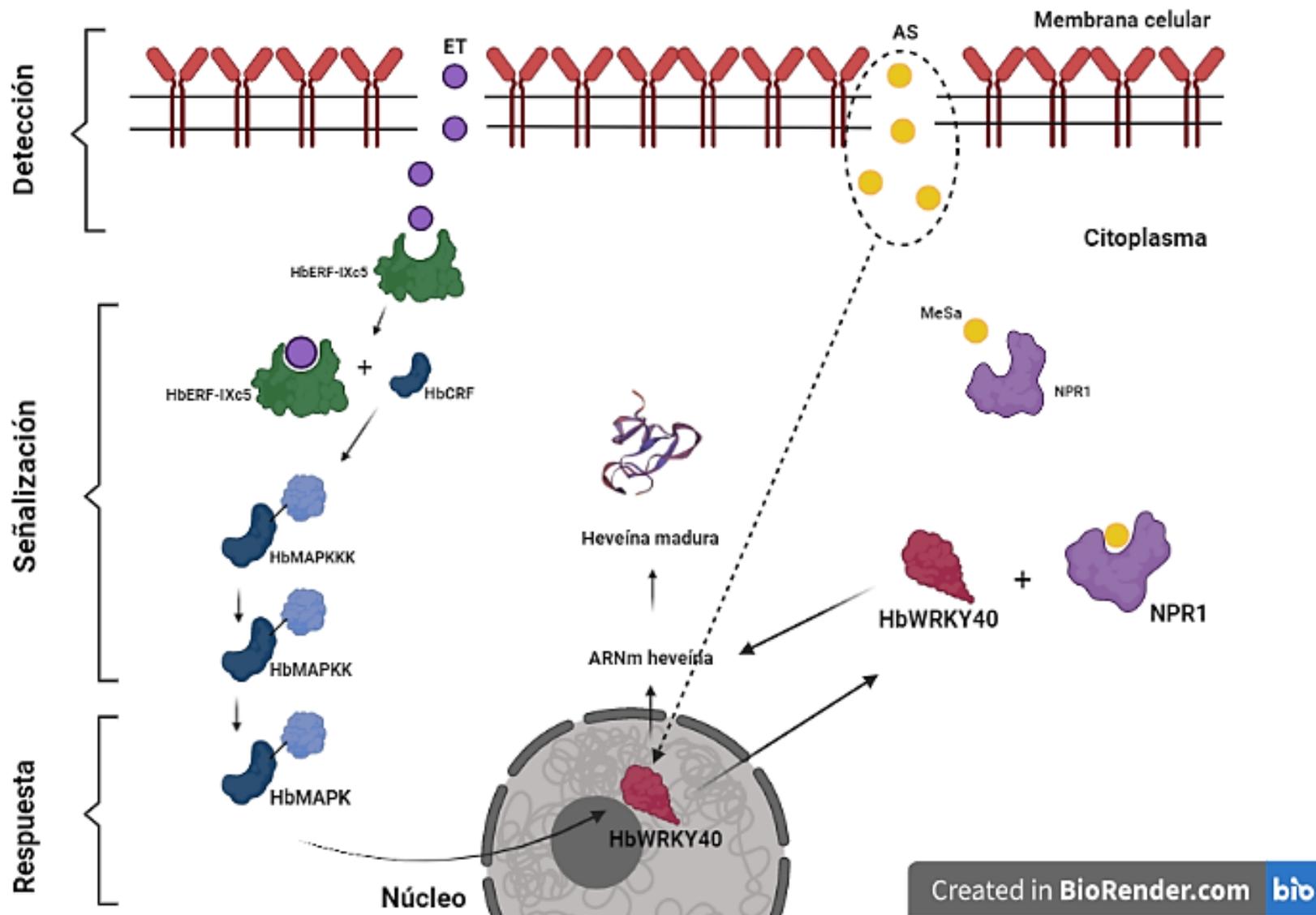


Figura 9. Cascada de señalización mediada por AS Y ET para la expresión de heveína.

Fuente: Palma, 2023. Creado en BioRender.com

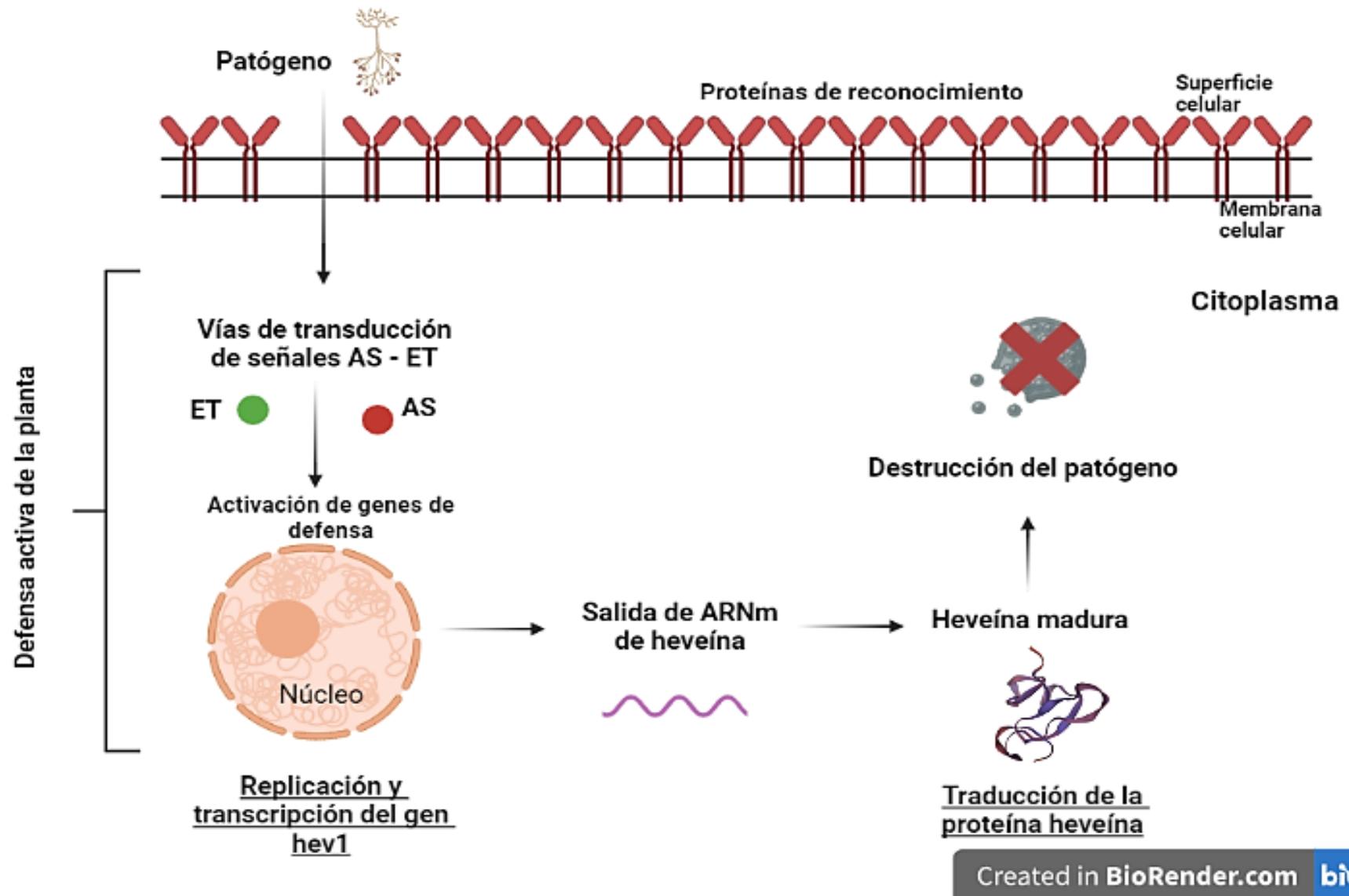


Figura 10. Diseño general de activación de genes de *hev-1* y su función.

Fuente: Palma, 2023. Creado en BioRender.com

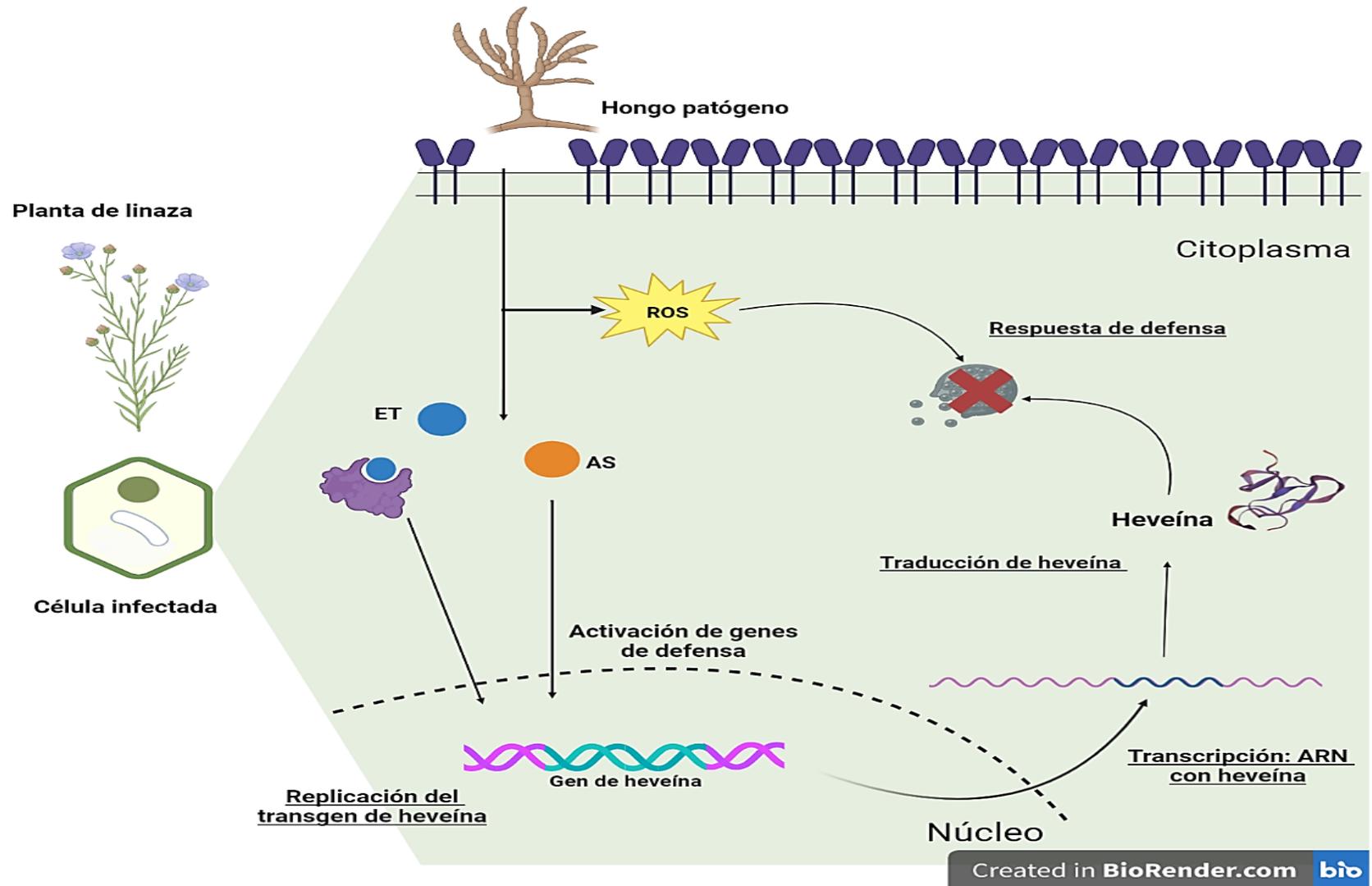


Figura 11. Propuesta de la utilización de heveína como proteína de defensa contra hongos en otras plantas.

Fuente: Palma, 2023. Creado en BioRender.com

7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- ✓ El alineamiento en BioEdit reveló las variaciones de aminoácidos entre las secuencias seleccionadas, las cuales en su mayoría fueron sustitución de aminoácidos por otros que cumplían funciones similares, además mostró las zonas conservadas, las cuales confieren una estructura similar entre las proteínas.
- ✓ La observación de la proteína heveína en Swiss-Model demostró la estructura globular conformada por dos hélices α y 3 láminas β , las cuales fueron observadas mediante el programa RasMol, obteniendo un modelado de alta identidad.
- ✓ La proteína heveína tiene un papel fundamental en la defensa del árbol de caucho ya que es la proteína que se encuentra en mayor cantidad en el látex, además promueve la coagulación de este y presenta propiedades antifúngicas, las cuales son muy valiosas para combatir patógenos. Se ha logrado un acercamiento al conocimiento de los mecanismos de activación de uno de los factores de expresión génica que están asociados con las respuestas de defensa de *Hevea brasiliensis* contra el ataque de hongos. Esto se consiguió con el apoyo de la bioinformática y los programas que ha permitido obtener imágenes tridimensionales (modelos *in silico*) de la proteína heveína.

8. RECOMENDACIONES

Este trabajo proporciona datos sobre la estructura, función e interacciones de la proteína heveína. Se ha obtenido un modelado de la proteína que aporta información sobre la estructura tridimensional y cómo su estructura se relaciona con su función. Así mismo, contribuye a entender los mecanismos de activación de los genes que codifican a heveína y cómo actúa en la respuesta de defensa de la planta. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos *in silico* deben ser validados mediante experimentos (cristalografía, interacción molecular, mutagénesis, etc.) para garantizar que los hallazgos son precisos y fiables. Se recomienda la realización de los experimentos antes mencionados para, posteriormente, hacer uso de herramientas biotecnológicas y de ingeniería genética que permitan la aplicación de la proteína en otras plantas de interés.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Archer, B. L. (1960). The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein*. *Biochemical Journal*, 75(2), 236-240.
<https://doi.org/10.1042/bj0750236>
- Arreola-Barroso, R., Quintero-Hernández, V., Muñoz-Rojas, J., Gaytán, P., Rivera-Urbalejo, A., Rosete-Enríquez, M., Martínez-Martínez, L., & Juárez-González, V. R. (2022). *SWISS-MODEL es un generador de modelos estructurales de proteínas cuyas estructuras aún no están depositadas en el PDB*. 7(27), 117-130.
- Ballesteros, C. N., & Parra, D. C. (2018). *Modelamiento in silico de la proteína heparan-alfa-glucosamina n- acetiltransferasa y análisis funcional de isoformas mediante docking molecular*. 94.
- Beliczky, L., & Fajen, J. (2010). *Industria del caucho*. 40(17), 20.
- Bello, A. (2020). *Análisis molecular in silico de la proteína Citocromo b en el género Mytilus*. 43.
- Berthelot, K., Peruch, F., & Lecomte, S. (2016). Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins. *Biochimie*, 127, 258-270.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.006>
- Broekaert, I., Lee, H. I., Kush, A., Chua, N. H., & Raikhel, N. (1990). Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), 7633-7637.
- Calvo, G., García, M. J., & Rojas, M. (2011). *Alineamiento de Secuencias de DNA Bioedit | PDF | Alineación de secuencia | Biología Computacional*. Scribd.
<https://es.scribd.com/doc/147681010/Alineamiento-de-Secuencias-de-Dna-Bioedit>

- Cañedo, R., Rodríguez, R., & Vázquez, Y. (2009). *Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos: Un palacio de la información para la medicina molecular*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352009000400003
- Cárdenas, C., Martín, M., & Lobo, C. (2019). *Proteómica*. Servicios centrales de apoyo a la investigación. <http://www.scai.uma.es/areas/ccvi/pro/pro.html>
- Cardillo, A. B., Ceron, M. C. M., Romero, S. M., & Cascone, O. (2018). *Péptidos antimicrobianos de plantas*. 160(1), 19.
- Chrestin, H., Pujade-Renaud, V., Montoro, P., Narangajavana, J., Vichitcholchai, N., Teerawatanasuk, K., & Lacrotte, R. (1997). *Expression of genes involved on coagulation and regeneration of latex. Clonal variations and effects of yied stimulation with ethrel* [Conference_item]. Seminar on the Biochemical and Molecular Tools for Exploitation Diagnostic and Rubber Tree Improvement. Workshop on Electrophoresis Application to Rubber Tree Clone Identification; Mahidol University. <https://agritrop.cirad.fr/464990/>
- Devadas, S. K., Enyedi, A., & Raina, R. (2002). The Arabidopsis hrl1 mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid and ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 30(4), 467-480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01300.x>
- Díaz Perales, A. (2000). *Proteínas De Defensa Como Potenciales Panalergenos Vegetales: Quitinasas De Clase I Y Proteínas De Transferencia De Lípidos*. xiao. <https://oa.upm.es/617/1/02200021.pdf>
- Díaz-Puentes, L.-N. (2012). *Systemic Acquired Resistance Induced by Salicylic Acid*. 10(2), 11.

- Fickert. (2012, mayo 21). Transducción de señales: Cómo funciona la red de comunicación celular. *El·lipse*. <https://ellipse.prbb.org/es/transduccion-senales-como-funciona-red-comunicacion-celular/>
- Giraldo, A. C. (2011). Cultivos Transgénicos: Entre Los Riesgos Biológicos Y Los Beneficios Ambientales Y Economicos. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), Art. 3.
- Gómez-Merino, F. (2010). *Bioinformática: Aplicaciones en Genómica y Proteómica* (Primera). Colegio de Postgraduados.
https://www.researchgate.net/publication/253408324_Bioinformatica_Aplicaciones_en_Genomica_y_Proteomica
- Gotor, C. (2010). *El poder de la cisteína*. 2, 15-18.
- Guerra, D., & Sacoto, D. (2020, diciembre 15). *Productores de caucho en ecuador, sinopsis del pasado y presente | Noticias Agropecuarias*.
<https://elproductor.com/2020/12/productores-de-caucho-en-ecuador-sinopsis-del-pasado-y-presente/>
- INIAP. (2008). *Guía de cultivos*. 72. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5309>
- INIAP. (2014). *Caucho*. Instituto Nacional De Investigaciones Agropecuarias.
<http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfores/rcaucho>
- Jiménez-Carrillo, C. E., Piña-Ramos, K. M., Meza-Arrayales, C., Villaruel-Flores, K. P., García-Aguirre, A., Jiménez-Carrillo, C. E., Piña-Ramos, K. M., Meza-Arrayales, C., Villaruel-Flores, K. P., & García-Aguirre, A. (2022). Alergia al látex: Opciones terapéuticas. *Revista alergia México*, 69, 55-68.
<https://doi.org/10.29262/ram.v69isupl1.1035>
- Jin, X., Zhu, L., Yao, Q., Meng, X., Ding, G., Wang, D., Xie, Q., Tong, Z., Tao, C., Yu, L., Li, H., & Wang, X. (2017). Expression Profiling of Mitogen-Activated Protein Kinase Genes Reveals Their Evolutionary and Functional Diversity in Different Rubber Tree

(*Hevea brasiliensis*) Cultivars. *Genes*, 8(10), Art. 10.

<https://doi.org/10.3390/genes8100261>

Ledermann, W. (2018). El camino del caucho. *Revista chilena de infectología*, 35(2), 191-194. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000200191>

Lestari, R., Rio, M., Martin, F., Leclercq, J., Woraathasin, N., Roques, S., Dessailly, F., Clément-Vidal, A., Sanier, C., Fabre, D., Melliti, S., Suharsono, S., & Montoro, P. (2018). Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor HbERF-IXc5 enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation. *Plant Biotechnology Journal*, 16(1), 322-336. <https://doi.org/10.1111/pbi.12774>

Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D265-D268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>

Luque Guillén, M. V. (2009). *Estructura y propiedades de las proteínas*. Centro de investigaciones. Universidad de Valencia. España.
https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf

Maia, L. B. L., Pereira, H. D., Garratt, R. C., Brandão-Neto, J., Henrique-Silva, F., Toyama, D., Dias, R. O., Bachega, J. F. R., Peixoto, J. V., & Silva-Filho, M. C. (2021). Structural and Evolutionary Analyses of PR-4 SUGARWINs Points to a Different Pattern of Protein Function. *Frontiers in Plant Science*, 12, 734248.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.734248>

Malinowski, R., Klevickis, C., & Kolvoord, R. (2004). Come See The Molecules. *EDUTEKA*, 29(4). <https://eduteka.icesi.edu.co/articulos/RasMol>

- Marques Dos Santos, L. (2022). *Análise In Silico Da Evolução De Heveínas No Reino Vegetal* [Maestría, Universidade Federal De Uberlândia].
<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/35855/1/An%C3%A1liseInSilico.pdf>
- Martínez Augustin, O., & Martínez de Victoria, E. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 01-14.
- Mazza, G. (2014, enero 20). Hevea brasiliensis. *Monaco Nature Encyclopedia*.
<https://www.monaconatureencyclopedia.com/hevea-brasiliensis/?lang=es>
- Mendoza Blanco, W. (2007). *Caracterización fisicoquímica y acción antifúngica de una lectina aislada de semillas de Buddleja coriacea Remy "colle negro"* [Maestría, Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa].
<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/4686/BIMmeblwc.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- NIH. (2022, septiembre 23). *Bioinformática*. Genome.gov.
<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica>
- Pillacela, B., Galarza, J., & Tufiño, C. (2020). Reliability of in silico Modeling Based on Restriction Patterns for the Study of the Carotenogenic Gene pds of Haematococcus sp. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 5, 16.
<https://doi.org/10.11648/j.ijmb.20200501.13>
- Pujade-Renaud, V., Sanier, C., Cambillau, L., Pappusamy, A., Jones, H., Ruengsri, N., Tharreau, D., Chrestin, H., Montoro, P., & Narangajavana, J. (2005). Molecular characterization of new members of the Hevea brasiliensis hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1727(3), 151-161.
<https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.12.013>
- Ramírez, M., & Rodríguez, A. (2012). *Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: Una revisión*. XIV(1), 271-284.

Riedel, M. A. (2008). *PROTEINAS*.

<https://avdiaz.files.wordpress.com/2008/11/proteinas.pdf>

Rodríguez Cadena, L. (2009). *Estudio de factibilidad para la producción de caucho*

«*Hevea brasiliensis*» en Quevedo, provincia de Los Ríos.

Rojas, A. (2017, octubre 3). Enfermedades del caucho en Colombia. *ANEIA - Universidad*

de Los Andes. <https://agronegocios.uniandes.edu.co/2017/10/enfermedades-del-caucho-en-colombia/>

Ruether. (2022, septiembre). *BioRender—Software and Services—Swarthmore*

KnowledgeBase. <https://kb.swarthmore.edu/display/SW/BioRender>

Schmidt. (2019, julio 7). Bases de datos biológicas: Una visión general y una perspectiva

de futuro. *Enago Academy Spanish*.

<https://www.enago.com/academy/latam/biological-databases-an-overview-and-future-perspectives/>

Superintendencia de Control del Poder de Mercado. (2016). *Estudio de Mercado sobre*

“*La Producción y Comercialización de Plásticos de Polipropileno en El Ecuador*”.

<https://www.scpm.gob.ec/sitio/wp-content/uploads/2019/03/Plasticos-Versin-Pblica-1.pdf>

Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial Peptides from

Plants. *Pharmaceuticals*, 8(4), 711-757. <https://doi.org/10.3390/ph8040711>

Téllez, D. (2016). *Expresión De Genes De Defensa En Respuesta A La Aplicación De*

Bioelicitores En Fruto De Tomate (Solanum lycopersicum L.) [Centro de

Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.].

<https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/24/1/T%C3%A9llez%20Escobedo%20Daniela%20Grissel.pdf>

- Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., & Peumans, W. J. (1991). Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, *183*(2), 258-264. <https://doi.org/10.1007/BF00197797>
- Velasco, I. B. G., Rojas, B. F., Aguilar, V. V., Caballero, M. D. S., Castellanos, M. S. L., García, L. M., & Olivera, B. L. S. (2022). *LAS LECTINAS COMO HERRAMIENTAS EN BIOMEDICINA*. *41*(1), 28-10.
- Walujono, K., Scholma, R. A., Beintema, J. J., Anton, M., & Hahn, A. M. (1975). *Amino acid sequence of Hevein [of latex]*. International Rubber Conference, Kuala Lumpur (Malaysia), 20 Oct 1975.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Amino+acid+sequence+of+Hevein+%5Bof+latex%5D&author=Walujono%2C+K.&publication_year=1975
- Xiao-Dong, D., Xiao-Wen, F. E. I., & Xue-Qin, H. J.-S. and Z. (2002). Isolation and Analysis of Rubber Hevein Gene and Its Promoter Sequence. *Journal of Integrative Plant Biology*, *44*(8), 936-940.
- Yang, J., Wang, Q., Luo, H., He, C., & An, B. (2020). HbWRKY40 plays an important role in the regulation of pathogen resistance in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Reports*, *39*(8), 1095-1107. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02551-x>