

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



Trabajo:

**EFFECTO DE UNA CISTATINA RECOMBINANTE SOBRE ENZIMAS DIGESTIVAS
DE INSECTOS QUE ATACAN A GRANOS ALMACENADOS.**

Por:

JUAN PABLO GALVÁN RAMIREZ.

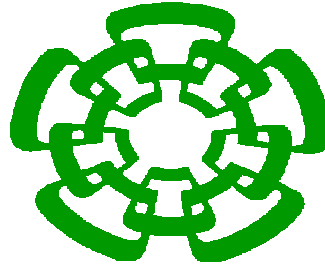
T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Junio del 2008**

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I. P. N.
UNIDAD GUANAJUATO**



TESIS

**EFFECTO DE UNA CISTATINA RECOMBINANTE SOBRE ENZIMAS DIGESTIVAS
DE INSECTOS QUE ATACAN A GRANOS ALMACENADOS.**

Ubicación del trabajo

Este trabajo se realizo en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, Gto., bajo la dirección de la Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez.

Irapuato, Guanajuato 2008

DEDICATORIA

A mis padres Ma. Guadalupe Ramírez Rodríguez y Armando Galván Castañeda, a quienes les agradezco con todo mi corazón el apoyo brindado en mi vida personal y en mi vida profesional.

A mi abuelo Daniel Galván García (+) a quien lamentablemente ya no pudo compartir este momento conmigo.

A mi abuelita Margarita Castañeda G., a mi tía Clara Garvín C.

A mis hermanos Teresa de Jesús, Daniela, Margarita, Armando y Rafael.

A todos mis amigos por todos los momentos compartidos, de la preparatoria y de la universidad.

A María del San Juan y sus hermanas, quien es un a persona muy importante en mi vida.

A mis abuelos Vicente y Pragedis, tíos y tías por el apoyo los consejos y el apoyo brindado.

A mis padrinos Ma. Margarita Galván y su esposo Isidro Gallaga y a sus hijos Miguel, Nelson y Alex.

A mi hermana Teresa de Jesús, su esposo Ángel Ramírez y a mi sobrina Ariana Galván Ramírez.

A todos mis tíos, tías, primos y primas.

A mis tíos Alfredo Galván y Gloria Castañón a sus hijos por su apoyo y consejos brindados.

A Merlin Mariana Ricardo Peña y su hijo Ernesto por su amistad y compañía brindada.

Rebeca Gonzales Villegas por su amistad y apoyo.

Al Dr. Eugenio Gurrero Rodríguez (+) por su apoyo y consejos brindados durante la mi estancia en la Universidad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Ana Gloria, Blanca, Armando, Caerlo, Erick, Alfonso por su amistad y los momentos que pasamos juntos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por la formación que recibí.

Al CONCYTEG por la beca de tesis y apoyo para el desarrollo del presente trabajo.

Al CONVESTAV por permitirme hacer uso de sus instalaciones para el desarrollo de la tesis.

A la Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez por su guía y apoyo durante el desarrollo de la tesis.

A mi comité de sinodales por todo el apoyo recibido, A la Dra. Rosalinda mendosa Villarreal, él Dr. Ernesto Cerna Chávez, y al Dr. Gabriel Gallegos Morales.

Al departamento de parasitología y a todo sus profesores y personal que labora, que siempre contaran conmigo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
Introducción.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
1. Plagas que atacan a granos almacenados.....	3
1.1. Importancia económica de las plagas que atacan a las leguminosas.....	3
1.2. Familia Bruchidae.....	5
1.3. Gorgojo Bruco del frijol, caraota, poroto, habichuela o judía).El gorgojo de frijol caupi <i>Acanthoscelides obtectus</i> (Say).....	8
1.3.1. Descripción.....	8
1.3.2. Distribución.....	8
1.3.3. Biología.....	8
1.3.4. Importancia.....	9
1.4. Gorgojo de las leguminosas <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius)....	10
1.4.1. Descripción.....	10
1.4.2. Distribución.....	10
1.4.3. Biología.....	10
1.4.4. Importancia.....	11
1.5 Gorgojo mexicano del frijol, gorgojo pinto o pintado del frijol <i>Zabrotes Subfasciatus</i> (Boheman).....	11
1.5.1. Descripción.....	11
1.5.2. Distribución.....	11
1.5.3. Biología.....	12
1.5.4. Importancia.....	12
1.6. El Amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>), origen y características generales.....	13
1.6.1. Morfología de la planta.....	13

1.6.2. Importancia.....	14
1.7. Mecanismos de defensa de las plantas.....	15
2. Las Proteasas.....	16
2.1. Clasificación.....	16
2.1.1. Endoproteinasas.....	17
2.1.2. Serín proteinasas.....	18
2.1.3. Aspártico proteinasas.....	18
2.1.4. Cisteín proteinasas.....	18
2.1.5. Métalo proteinasas.....	19
3. Inhibidores de proteinasas.....	19
3.1. Fitocistatinas.....	21
3.1.2. Características generales.....	22
3.1.3. Distribución en la planta.....	23
3.1.4. Función biológica.....	23
3.2. Fitocistatinas como proteínas de defensa.....	23
4. Antecedentes y Justificación.....	25
5. Objetivo general.....	29
5.1. Objetivos específicos.....	29
5.2. Hipótesis.....	29
MATERIALES Y METODOS.....	30
6.1. Crecimiento de <i>E coli</i> transformada con el gen de cistatina.....	30
6.1.1. Obtención de lisado celular.....	30
6.1.2. Cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976).....	31
6.2. Purificación de proteína en una columna de alta afinidad Ni-NTA.....	32
6.2.1. Equilibrio.....	32
6.2.2. Afinidad.....	32
6.2.3. Lavado.....	33

6.2.4. Elusión.....	33
6.3. Análisis en geles de poliacrilamida por electroforesis.....	33
6.4. Análisis de pureza (electroforesis bidimensional).....	34
6.5. Obtención de larvas de los insectos <i>A. obtectus</i> , <i>C. maculatus</i> , <i>Z. subfasciatus</i>	35
6.5.1. Disección del intestino medio.....	35
6.6. Extracción de enzimas digestivas de insectos.....	35
6.7. Detección de actividad proteolítica en Zimogramas.....	36
6.8. Inhibición de actividad proteolítica de proteasas en Zimogramas, para las tres especies de insectos, <i>A. obtectus</i> , <i>C. maculatus</i> , <i>Z. subfasciatus</i>	37
7. RESULTADOS.....	38
8. DISCUSIÓN.....	59
9. CONCLUSIONES.....	60
10. REFERENCIAS.....	62
11. APÉNDICE.....	67

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema y estructura tridimensional de la orizacistatina I de arroz (OC-I).....	19
Figura 2. Cinética de crecimiento bacteriano con dos tiempos de inducción y su concentración de proteína.....	38
Figura 3. Cromatograma de la elusión de la cistatina purificada en columna de afinidad.....	39
Figura 4. Perfil electroforético en geles de poliacrilamida-SDS de lisado celular, fracción purificada y proteínas no retenidas en la columna.....	41
Figura 5. Electroforesis bidimensional.....	42
Figura 6. Perfiles proteolíticos de insectos plaga del frijol, <i>Acanthoscelides obtectus</i> ; B. <i>Callosobruchus maculatus</i> y C. <i>Zabrotes subfasciatus</i>	44
Figura 7. Experimento de inhibición con E64 contra la actividad de proteasas digestivas de <i>A. obtectus</i> en geles de poliacrilamida.....	46
Figura 8. Porcentajes de inhibición con E64 de la actividad proteolítica en intestinos de <i>A. obtectus</i> obtenidos con el programa 1D Image Analysis Software de Kodak.....	46
Figura 9. Perfil de actividad proteolítica presente en <i>A. obtectus</i> y el efecto de la cistatina recombinante.....	48
Figura 10. Porcentajes de inhibición con la cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica en intestinos de <i>A. obtectus</i> obtenidos con el programa 1D Image Analysis Software de Kodak.....	48
Figura 11. Experimento de inhibición con E64 contra la actividad de proteasas digestivas de <i>C. maculatus</i> en geles de poliacrilamida.....	50
Figura 12. Porcentajes de inhibición con E64 sobre la actividad proteolítica en intestinos de <i>A. obtectus</i> obtenidos con el programa 1D Image Analysis Software de Kodak.....	50
Figura 13. Perfil de actividad proteolítica presente en <i>C. maculatus</i> y el efecto de la cistatina recombinante a concentraciones diferentes.....	52
Figura 14. Porcentajes de inhibición de la cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica en intestinos de <i>C. maculatus</i> obtenidos con el	

programa 1D Image Analysis de Kodak.	52
Figura 15. Experimento de inhibición con E64 contra la actividad de proteasas digestivas de <i>Z. subfasciatus</i> en geles de poliacrilamida.....	54
Figura 16. Porcentajes de inhibición E64 contrala actividad proteolítica en intestinos de <i>Z. subfasciatus</i> obtenidos con el programa 1D Image Analysis de Kodak.....	54
Figura 17. Perfil de actividad proteolítica presente en <i>Z. subfasciatus</i> y el efecto de la cistatina recombinante a concentraciones diferentes.....	56
Figura 18. Porcentajes de inhibición de la cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica en intestinos de <i>Z. subfasciatus</i> obtenidos con el programa 1D Image Analysis de Kodak.....	56

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Grupo de proteinasas.....	Página 15
-------------------------------------	--------------

Cuadro 2. Plantas transgénicas expresando genes que codifican para inhibidores de proteasas del tipo cisteín en defensa contra insectos.....	22
Cuadro 3. Inhibición E-64 vs <i>A. obtectus</i> , intensidad de la banda y porcentaje de inhibición analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.....	70
Cuadro 4. Inhibición de Cistatina vs <i>A. obtectus</i> , intensidad de la banda y porcentaje de inhibición analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.....	70
Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de E-64 vs <i>C. maculatus</i> analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.....	70
Cuadro 6. Porcentaje de inhibición de Cistatina vs <i>C. maculatus</i> analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.....	71
Cuadro 7. Porcentaje de inhibición de E-64 vs <i>Z. subfasciatus</i> analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.....	71
Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de Cistatina vs <i>Z. subfasciatus</i> analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.....	71

Introducción

El frijol es una planta originaria de Mesoamérica, la cual se viene cultivando desde hace alrededor de 8 mil años, desarrollándose durante ese tiempo una amplia diversidad de especies de frijoles. En México las especies más comunes ascienden a 50, destacando las cuatro especies que el hombre a domesticado, como son el

Phaseolus vulgaris L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* (frijol comba) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tépari), siendo las especies más importantes por el área de superficie sembrada y producción las dos primeras.

El cultivo del frijol juega un papel muy importante en la economía y en el ámbito social, ya que es considerado un producto estratégico dentro del desarrollo rural de México, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada a nivel nacional y representa además la segunda actividad agrícola más importante en el país por el número de productores dedicados a su cultivo. En específico para el bajío guanajuatense se obtuvo una producción de 56.4 millones de toneladas, con rendimientos 0.6 toneladas por hectárea (SAGARPA 2007). Es así, que como generador de empleo es relevante dentro de la economía del sector rural.

Asimismo, es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye la fuente principal de proteínas para dicho sector, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro.

Es importante conocer las principales plagas que atacan al cultivo de frijol, ya que pueden ser desde que se encuentra en campo directamente a la planta o cuando ya ha sido cosechado el grano, ya que el constante ataque de insectos y de patógenos sobre las plantas y granos almacenados, produce pérdidas muy elevadas para los agricultores, considerando la pérdida por el ataque de plagas y las enfermedades, llegan al 37%, siendo los 13% de esta pérdida causada para los insectos (Gatehouse *et al.*, 1992), quienes han tenido que recurrir tradicionalmente al uso intensivo de pesticidas. Sin embargo, su utilización presenta grandes problemas, ya que al no ser específicos contra una clase particular de organismos, y dado que su toxicidad abarca una amplia variedad de organismos, han generado daños considerables tanto a la ecología, como a los organismos superiores, debido a que estos también son blanco de su toxicidad. (Blanco *et. al* 2002)

Ante la demanda creciente de productos agrícolas es necesario potenciar el desarrollo de nuevas estrategias de producción basadas en programas de control integrado que combinen diversas prácticas, entre las cuales se incluya el uso racional de plaguicidas, pero al mismo tiempo se exploren nuevas estrategias. De este modo, en una cuantía que por ahora no supera el 5%, se usan también los denominados bioinsecticidas, algunos de los cuales tienen un origen biológico (Gatehouse *et al.*, 1992). Uno de los fines de este tipo de prácticas es la obtención de plantas resistentes que contengan en sus tejidos bioinsecticidas y, por tanto, les confieran altos niveles intrínsecos de resistencia a los insectos.

Las plantas, de manera natural, poseen y pueden desarrollar sus propias defensas químicas contra los insectos que atacan sus tejidos. Entre las numerosas clases de fitoquímicos naturales destacan las lectinas (Chrispeels y Raikhel, 1991), compuestos fenólicos (Summers y Felton, 1994) e inhibidores de enzimas digestivas o también llamados fitocistatinas (Wolfson y Murdock, 1995).

Uno de los enfoques actuales en la búsqueda de nuevos bioinsecticidas se ha orientado hacia la utilización y manipulación de las propias defensas químicas de las plantas. La mayoría de estas sustancias tienen en común que ejercen su acción en el sistema digestivo del insecto. Es por ello que para el desarrollo de estos métodos alternativos de control resulta necesario conocer tanto la bioquímica y fisiología digestiva de los insectos que son plaga de cultivos agrícolas como los mecanismos y modos de acción de estos insecticidas naturales. El descubrimiento y el conocimiento de las proteínas que pueden funcionar como insecticidas son un punto importante para la creación de plantas resistentes a las plagas.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Plagas que atacan a granos almacenados

Las plagas de granos almacenados por lo general tienen su origen en el grano cosechado del campo, mientras otras infestan productos alimenticios durante el

procesamiento y almacenaje. Las principales plagas de granos almacenados (gorgojos, palomitas, polillas, taladrillos) pueden volar a edificios desde el exterior, venir de áreas interiores apartadas o emigrar dentro de lugares no infestados hacia fuentes de infestación como desechos de granos que se concentran en rendijas y grietas.

Desde luego que las pérdidas dependen del tipo de insecto, de la cantidad de los mismos y fundamentalmente de la calidad de los granos al entrar al depósito. Cabe mencionar que: granos dañados y sucios son más deteriorables por todos los agentes nocivos, incluyendo a los insectos. Otro factor a considerar, es la constitución fisicoquímica de los granos. Esto depende de la genética de cada variedad. Por Ej. Los maíces dentados amarillos, son más deteriorables que los duros "Flint". Otro Ej. Los sorgos con altos contenidos de taninos, no son fácilmente atacados por insectos.

Este trabajo se enfoco a tres especies de gorgojos que pertenecen a la familia Bruchidae siendo la más perjudicial en el ataque a granos almacenados, *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*.

1.1. Importancia económica de las plagas que atacan a las leguminosas

Como se menciona anteriormente, los Brúquidos representan el problema fitosanitario más importante el mayor peligro para los granos almacenados y cabe mencionar como característica importante el régimen alimenticio que presentan estas especies es cletrofágico, esto es, devorador de semillas, fundamentalmente de leguminosas.

Las leguminosas constituyen uno de los cultivos hortícolas más importantes para la mayoría de los países, sobre todo para aquellos que están en vías de desarrollo. Una gran proporción de estos cultivos van dirigidos a la alimentación humana (judías, garbanzos, lentejas, habichuelas, guisantes, etc.) y cierto porcentaje va dirigido a la industria química y farmacéutica. Una de las propiedades de las Leguminosas es que pueden utilizarse varios órganos (hoja, raíz, semilla) sin necesidad de un tratamiento

industrial, ya que tienen un alto nivel energético y cierto contenido vitamínico. Ramos (1976) Buscar mas reciente.

Las leguminosas constituyen uno de los principales productos mercantiles de muchos países. El intercambio comercial (importación y exportación) es vital para muchos de ellos. Sin embargo, frecuentemente el rendimiento se ve disminuido por acción de las plagas de leguminosas, entre las que destacan las provocadas por los «gorgojos» o Brúquidos, deteriorando la mercancía y ocasionando pérdidas que han llegado a millones de dólares para algunos países.

Las plagas de granos almacenados por lo general tienen su origen en el grano cosechado del campo, mientras otras infestan productos alimenticios durante el procesamiento y almacenaje. Es conveniente destacar el carácter económico que se le debe dar al concepto de plaga, por sus implicaciones en las decisiones que se deben instrumentar para su control. La sola presencia de una especie, con capacidad para causar daño, no debe ser justificación para aplicar medidas de control, a menos que dicha presencia esté representada por una población lo suficientemente grande como para ser capaz de infringir un daño realmente económico

En el control de granos almacenados expertos estiman entre un 5 % al 10 % de la producción de alimentos es perdida por causa de los insectos. En ciertos países esas cifras se expanden hasta el 50%, además que algunas especies son polivoltinas, son especies que presentan más de dos generaciones al año, generalmente de tres a cuatro generaciones en circunstancias ecológicas propicias, cifra que varía según la temperatura y humedad del granero, así como la tasa de agua de las semillas.

A este grupo pertenecen especies de origen exótico, frecuentemente tropical, como *Acanthoscelides obsoletus* Say., *Callosobruchus chinensis*, L., *Callosobruchus maculatus* F., *Zabrotes subfasciatus* B., etc. el ciclo vital de la mayoría de estas especies inicia con la oviposición que se lleva a cabo en campo y posteriormente la larva se desarrolla en semillas almacenadas. Este fenómeno puede repetirse, dando origen a varias generaciones que se suceden ininterrumpidamente. A este grupo pertenecen las especies más perjudiciales para el manejo de granos almacenados.

1.2. Familia Bruchidae

La familia Bruchidae tiene 1600 especies conocidas en el mundo (Romero-Nápoles & Johnson 2000), de este total, 750 son conocidas en el Nuevo mundo (Romero-Nápoles et al., 1996, Romero-Nápoles & Johnson 2000), de las cuales en México tenemos 323 especies distribuidas en 21 géneros (Romero-Nápoles 2002).

Esta familia, también conocida como “gorgojos” o escarabajos de las semillas, son coleópteros cuyas larvas se alimentan de semillas, principalmente de leguminosas, aunque también depredan semillas de otras plantas. Los adultos ovipositan en las semillas hospederas y al eclosionar las larvas penetran y se alimentan dentro de la semilla, posteriormente ocurre la pupación en la cavidad formada en donde se alimento la larva y finalmente emerge el adulto (Romero-Nápoles 2002).

Hasta la fecha, se conoce que las especies de de la familia Bruchidae se alimentan de 33 familias de plantas (Romero- Nápoles & Johnson 2000). Varias especies de Bruchidae son de importancia económica como plagas, ya que atacan a las leguminosas de importancia agrícola y legumbres almacenadas. Aunque se considera que las especies de Bruchidae económicamente importantes representan menos del 5% (Romero-Nápoles & Johnson 2000).

La familia Bruchidae es un grupo homogéneo de insectos pertenecientes al orden *Coleóptera*, filogenéticamente comprendido entre otros *Phytophaga* tales como *Chrysomelidae* y *Curculionidae*, y cuya principal característica biológica es la de presentar un régimen alimenticio de tipo cletrofágico, esto es, devorador de semillas, en su mayor parte de especies de Papilionáceas, entre las cuales quedan comprendidas numerosas especies de leguminosas comestibles, por lo cual estos insectos revisten una gran importancia económica.

Los miembros pertenecientes a esta familia de interés agrícola y fitosanitario han sido objeto de numerosos estudios encaminados al conocimiento de su biología, para

posteriores ensayos destinados a su control. En Estados Unidos (Bridwell, 1932; Larson, 1924 y 1927), en Alemania (Zacher, 1930), en Inglaterra (Herford, 1935; Southgate, 1957), en Francia (Lepesme, 1945; Vayssiere, 1944), en Argelia (De Luca, 1956), etc.

La gran mayoría de los Bruchidos vive en semillas de leguminosas, aunque un pequeño grupo es capaz de desarrollarse en otras plantas. Los adultos depositan los huevos sobre las vainas cuando se encuentran en campo o sobre los granos después de ser cosechados y almacenados. Las larvas recién eclosionadas, penetran en las semillas donde se desarrollan hasta alcanzar el estadio de pupa. Muchas de las especies de estos insectos sólo emergen de los granos cuando han alcanzado el estado de adulto.

Sin embargo, este carácter, por ser propio de la larva, nos conduce a distinguir dos categorías alimenticias a lo largo de la vida del insecto, ligadas a su función biológica:

- a) *Alimentación de la larva*: ligada preferentemente a la conservación del individuo, esto es, a asegurar la evolución hasta el estado adulto. En este estado el insecto se alimenta principalmente de semillas y en raras excepciones se alimenta de otra parte de la planta.
- b) *Alimentación del adulto*: ligada preferentemente a la conservación de la especie, esto es, asegurar la reproducción. A este respecto, los trabajos de Y. de Luca (1952), demuestran que el grado de madurez de las gónadas depende del grado de ingesta de granos de polen. En este estado el animal tiene una longevidad corta, dirigida tan sólo al acoplamiento y la reproducción, alimentándose de granos de polen, néctar de la flor y tan solo ocasionalmente, devora las partes tiernas de la planta huésped.

Las especies de importancia económica se dividen en dos categorías. En la primera, se encuentran las que infestan granos en formación y por lo tanto son plagas de

campo. Una vez cosechado el grano, los adultos pueden emerger durante el almacenamiento, pero deben regresar al campo para continuar la infestación. En la segunda categoría, se encuentran aquellas especies que no solamente son capaces de infestar los granos en el campo, sino que además pueden continuar la infestación durante el almacenamiento (Yus Ramos 1976).

Como parte del presente trabajo se analizaron tres especies de gorgojos pertenecientes a la familia Bruchidae que atacan al frijol común: *Acantocelides obtectus* S., *Callosobruchus maculatus* F., *Zabrotes subfasciatus* B.

1.3. Gorgojo Bruco del frijol, caraota, poroto, habichuela o judía).El gorgojo de frijol caupi *Acanthoscelides obtectus* (Say).

Es una plaga importante del frijol almacenado en las regiones altas a partir de 800m.s.n.m, preferiblemente entre los 1600-1800 y regiones subtropicales. (Schoonhoven, 1976 y Schoonhoven *et., al* 1988). Esta especie puede causar daños al grano de frijol tanto en los sitios de almacenamiento como en el campo, debido a que la hembras ovipositan en las grietas de las vainas, o en los espacios libres entre los granos almacenados. Por esta razón los granos que son infestados por *A obtectus* no presentan oviposturas adheridas a la testa (Schoonhoven *et., al* 1988; Serrano *et., al* 1983)

1.3.1. Descripción

El adulto tiene la cabeza pequeña, con ojos grandes y salientes, antenas largas y aserradas. Cuerpo ovoidal grueso y cubierto de pelos, más ancho en la parte posterior. Los élitros son cortos y no cubren completamente la parte posterior del abdomen. Fémur posterior con un diente grande y dos pequeños. Capaz de volar. El adulto es de color pardo, con pequeñas bandas transversales en los élitros, mide 3.5 a 4.5mm de longitud. A simple vista es difícil distinguir la hembra del macho; una forma es mediante la observación al microscopio de sus órganos genitales; la otra por la configuración de los últimos segmentos abdominales.



Esta especie limita su ataque a frijoles, no se alimenta de cereales u otros productos, aunque algunos autores indican como huéspedes al garbanzo y en forma experimental, lentejas y arvejas.

1.3.2. Distribución

Se considera originario de las regiones tropicales de Sudamérica. En la actualidad, se le encuentra en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de casi todo el mundo.

1.3.3. Biología

En el campo, la hembra introduce los huevos dentro de las vainas con granos fisiológicamente maduros. Durante el almacenamiento los coloca libremente entre los granos. De los huevos emergen las pequeñas larvas, que recorren los granos para posteriormente penetrar en su interior. La perforación de entrada es prácticamente

imposible de observar a simple vista y a través de ella pueden penetrar una o varias larvas.

Cuando la larva completa su desarrollo, antes de pupar, corta la testa del grano sin dañar la cutícula, formando una "ventana" característica fácilmente visible en los granos de colores claros. El adulto, empuja la cubierta para salir del grano dejando un orificio característico de forma circular. En un mismo grano pueden desarrollarse varios individuos ya que no se presenta el fenómeno de canibalismo entre las larvas, por lo que los granos dañados pueden presentar múltiples orificios. Su ciclo biológico dura de 4 a 6 semanas, dependiendo de la influencia de los factores ambientales. Los adultos son de vida corta; de 10 a 12 días y no se alimentan de granos almacenados.

La hembra oviposita un promedio de 63 huevos y aunque su vida es relativamente corta, pueden existir varias generaciones en un año, debido a su habilidad de colocar rápidamente sus huevos.

1.3.4. Importancia

Se le considera una plaga primaria debido a que ataca los granos enteros, tanto en el campo como en almacén y además porque es capaz de sobrevivir en el campo durante el invierno en estado larvario.

1.4. Gorgojo de las leguminosas *Callosobruchus maculatus* (Fabricius).

1.4.1. Descripción

Insecto de 3 a 4.5mm de longitud, de cuerpo oval, semicuadrado. Los élitros no cubren totalmente el abdomen, con manchas negras visibles en la hembra, mientras que las del macho son de color castaño con manchas negras muy pequeñas. Ataca principalmente al garbanzo mostrando menos preferencia por lentejas y



frijoles. Ha sido reportado infestando granos de soya por lo que aparentemente puede ser una plaga de importancia para esta leguminosa.

1.4.2. Distribución

Probablemente originario de África; en la actualidad se le encuentra en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Se considera relativamente reciente su aparición en América existiendo reportes de su presencia en Brasil y México.

1.4.3. Biología

La hembra adhiere los huevos sobre la superficie de los granos o sobre las vainas. Una vez que se lleva a cabo la eclosión de los huevos, las larvas penetran inmediatamente dentro de los granos, en donde permanecen hasta llegar a la fase de adulto. Antes de iniciar el periodo de pupa, la larva construye una galería hacia el exterior dejándola cubierta solamente por el pericarpio, de manera similar a las galerías de *A. obtectus*. Los adultos son de vida corta y no se alimentan de los granos. Su ciclo biológico dura aproximadamente 21 días a 32.5° C aproximadamente, alargándose a 74 días a 20° C. La temperatura máxima para su desarrollo es de 35° C y la mínima de 17 a 18⁰C. Algunos individuos requieren de 3 veces más tiempo para completar su ciclo biológico. Se ha reportado que existen dos formas de adultos, una "activa" que se caracteriza por ser voladora y otra "normal" que no vuela. Las formas activas tardan en emerger de 5 a 6 días más que las normales y la maduración de los ovarios de las hembras se atrasa alrededor de 2 semanas después de la salida. Las formas activas prefieren humedad relativa (H.R.) y temperaturas altas, por lo que son más abundantes previo a la estación húmeda.

1.4.4. Importancia

Plaga primaria que causa daños de consideración a los productos que ataca, causando porcentajes altos de daño en granos que ataca.

1.5. Gorgojo mexicano del frijol, gorgojo pinto o pintado del frijol *Zabrotes Subfasciatus* (Boheman).

Es la plaga más importante del frijol almacenado en las regiones cálidas (Schoonhoven, 1976 y Schoonhoven et., al 1988). Atacando únicamente al frijol almacenado.

1.5.1. Descripción

Existen dificultades para identificar sus estados inmaduros y para diferenciar sus fases de desarrollo. El adulto es de cuerpo oval, grueso, convexo, negro, con excepción de la base de las antenas y ápice de los tarsos. Mide de 1.8 a 2.5mm de longitud y de 1.2 a 1.8mm de ancho. Sus antenas son largas y sobrepasan la mitad del cuerpo, los artejos son más largos que anchos, negros, salvo los dos primeros que son rojizos.



La hembra es más grande que el macho; de color negro, con cuatro manchas de color cremoso en los élitros. El macho es de color gris uniforme. Este insecto prefiere los granos de frijol, aunque también puede alimentarse de granos de caupí, arvejas, lentejas y soya.

1.5.2. Distribución

Regiones tropicales y subtropicales de América Latina de donde se considera originario. Su presencia ha sido reportada en algunas regiones de África.

1.5.3. Biología

Su biología es similar a la de *Acanthoscelides obtectus*, pero a diferencia de esta especie, la hembra adhiere fuertemente los huevos a los granos. Las hembras ovipositan un promedio de 36 huevos. Los huevos frescos adheridos a la testa de los granos, son brillantes y translúcidos, mientras que las posturas ya eclosionadas son blancas y opacas. Las larvas recién emergidas, penetran al interior, donde pasan por cuatro instares larvales y antes de iniciar el periodo de pupa construyen una galería

hacia el exterior del grano, que dejan cubierta solamente por el pericarpio. El adulto empuja la cubierta para salir del grano. Los adultos son de vida corta, como promedio de 10 a 12 días y no se alimentan de granos almacenados. Su ciclo biológico dura 24 a 25 días a 32.5° C. Si la temperatura disminuye, el periodo para su desarrollo se alarga; a 20° C dura 100 días. Resisten una temperatura máxima de 37.5° C y una mínima ligeramente inferior a 20° C.

1.5.4. Importancia

Es una plaga primaria de gran importancia económica en las zonas productoras de frijol de las regiones tropicales y subtropicales de América Latina. Predomina sobre *Acanthoscelides obtectus* en los climas cálidos, húmedos, con poca altitud sobre el nivel del mar. En las regiones templadas con inviernos fríos, es desplazado con facilidad por *A obtectus*.

1.6. El Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), origen y características generales

El amaranto (*Amaranthus* spp) es un cultivo anual para la producción de grano que se siembra en agroecosistemas del centro y sur de México, por su valor nutritivo, el amaranto tiene un mercado potencial importante, aunque también es utilizado como forraje (Kauffman, 1990; Weber, 1990). El grano de amaranto es considerado como

seudocereal, ya que tiene propiedades similares a las de los cereales aunque estudios botánicos han demostrado que no lo es (Kauffman 1992).

El amaranto pertenece a la familia Amaranthaceae. El género *Amaranthus* está compuesto por 60 especies, pero después de varios estudios se ha llegado a la conclusión de que las especies de semilla comestible se reducen a: *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus cruentus*. De las tres especies anteriores, solo *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus hypochondriacus* se cultivan en México y *Amaranthus caudatus* en Sudamérica (Iturbide *et al.*, 1992).

1.6.1. Morfología de la planta

El amaranto es una especie anual, es una planta herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura con distintas coloraciones intermedias. La raíz es pivotante con abundante ramificación, facilitando la absorción de agua y nutrientes, la raíz principal sirve de sostén a la planta, el tallo es cilíndrico y anguloso con gruesas estrías longitudinales que alcanza de 0.4 a 3 m de longitud, las hojas son pecioladas, lisas o poco pubescentes de color verde o púrpura la inflorescencia del amaranto corresponde a panojas amarantiformes o glomeruladas muy vistosas, terminales o axilares, que pueden variar de totalmente erectas hasta decumbentes, el tamaño varía de 0.5-0.9 m pudiendo presentar diversas formas incluso figuras caprichosas y muy elegantes. El grano de amaranto es una pequeña semilla, cuyo diámetro varía entre 0.9 y 1.7 milímetros.

1.6.2. Importancia

El cultivo de amaranto constituye una actividad productiva alternativa viable y rentable. Sus cualidades y propiedades nutritivas, agronómicas, industriales y económicas garantizan el éxito de la cadena nutritiva. Aunque la pérdida de una tradición es una desventaja, se enmarca como un detonador económico regional que

contribuye a reducir los niveles de desnutrición en los sectores más vulnerables de la población.

Además cabe mencionar que se ha observado que *Amaranthus hypochondriacus* ofrece resistencia al ataque del insecto *Lygus* y la plaga *Sciara* sp., esta última presente en todas las zonas productoras de amaranto en México (Espitia-Rangel, 1992; Espitia-Rangel 1986, Espitia-Rangel 1989, Sánchez et al., 1991), además de mostrar tolerancia a algunas especies de hongos de almacigo (Espitia, 1992; Sánchez et al., 1991)

Complementado que el grano de amaranto, es un cultivo originario del continente americano, cuyas semillas son ricas en proteínas con altos contenidos en aminoácidos como son lisina y aminoácidos azufrados (cisteína y metionina). Se cultivan en suelos infértiles bajo condiciones semiáridas ya que toleran dichas condiciones. La planta de amaranto ha sido estudiada en varios aspectos, uno de ellos es la presencia de algunos mecanismos de defensa inducibles como son los inhibidores de tripsina y alfa amilasas, se ha observado también que esta planta puede representar un fuente potencial de genes para el control de plagas, entre estos genes, aparte de los inhibidores antes mencionados se puede mencionar a la cistatina *AhCPI* (Valdés Rodríguez 2007).

1.7. Mecanismos de defensa de las plantas.

Las plantas, organismos sésiles, están obligadas a discriminar entre los diferentes retos que les plantea su entorno y responder a ellos. Estas respuestas a su ambiente biótico y abiótico les permiten la mejor distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse. No debe, pues, sorprendernos que gran parte de las reacciones de defensa se reflejen en una diversidad bioquímica que tiene muy pocos

paralelos con otros grupos de organismos. De hecho, el repertorio bioquímico de las plantas es único. Vivanco *et al.*, (2005).

La enorme diversidad fitoquímica y el largo tiempo de evolución de este metabolismo han resultado en interacciones de complejidad creciente. En el caso de las interacciones entre plantas e insectos, por ejemplo, ciertos compuestos con estructuras muy similares pueden ejercer actividades muy disímiles, desde insecticidas hasta repelentes o incluso atractivos. Tamaña variedad de respuestas, resultado de una compleja coevolución, no sólo resulta fascinante desde el punto de vista biológico, sino que también acarrea consecuencias económicas importantes. Vivanco *et al.*, (2005).

Uno de los mecanismos de defensa desarrollados por las plantas consiste en la expresión de proteínas que actúan como inhibidores de enzimas del sistema digestivo de los insectos. Estos inhibidores suelen ser moléculas muy resistentes y efectivas y están diseñadas para provocar problemas en la absorción de los nutrientes, afectando el desarrollo de los insectos, reduciendo su fecundidad e incluso provocándoles la muerte.

Con frecuencia se proponen métodos de control biológico como alternativa a los insecticidas sintéticos, para así reducir su impacto en el medio agrícola. Los progresos alcanzados en el conocimiento de las respuestas inducidas en las plantas y su regulación, junto con la revolución en genómica y proteómica, prometen replantear la investigación en este campo para encaminarla hacia la explotación predecible de los mecanismos de resistencia endógena.

2. Las Proteasas

Las enzimas proteolíticas son aquellos que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos. Existen varios términos que, aunque tuvieron mínimas diferencias de significado (Barret y McDonald, 1986), hoy se usan indistintamente junto al de enzimas proteolíticas, y son proteasas, proteinasas y peptidasas (Barret *et.*, *al* 1998).

Las proteasas se encuentran extensamente en plantas y animales así como en los microorganismos (Kenny, 1999). Son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Usan una molécula de agua para hacerlo y por lo tanto se clasifican como hidrolasas. Estas pueden romper ya sea enlaces peptídicos específicos (*Proteólisis limitada*), dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la proteína, o pueden reducir un péptido completo a aminoácidos. (*Proteólisis ilimitada*).

Las proteasas desempeñan papeles cruciales en la fisiología y la patología de organismos vivos controlando la síntesis y la función de las proteínas (Turk, 1999).

2.1. Clasificación

El cuadro No. 1 enumera las clases principales de proteasas definidas en la nomenclatura de la enzima del Comité Nacional de la Unión Internacional de la Bioquímica y de la Biología Molecular NC-UBMB (NC-IUBMB, 1992).

Conforme a su sitio de acción, se subdividen en; exopeptidasas (o peptidasas) y endopeptidasas (o proteinasas). El primer grupo actúa sobre enlaces peptídicos proximales al N o C terminal, mientras que el segundo inicia en enlaces alejados a los extremos amino o carboxilo (Hartley, 1960, Oliveira *et. al* 2003)

De acuerdo al grupo funcional presente en el sitio activo, se clasifican en; serín proteinasas, aspártico proteinasas, cisteín proteinasas y metalo proteinasas (Hartley, 1960 y Olivera *et. al* 2003)

2.1. Endoproteinasas

La proteólisis es responsable del mantenimiento celular y de la respuesta al estrés, mediante procesos como la degradación de proteínas defectuosas o extrañas, el reciclaje de aminoácidos necesarios para sintetizar nuevas. También es esencial en el control del desarrollo y metabolismo mediante la reducción de enzimas clave y

proteínas reguladoras, además de participar en la muerte celular programada de células en tejidos y órganos específicos (Beer *et al.*, 2000).

La presencia del grupo amino o carboxilo libres, tiene una influencia negativa en su actividad enzimática. Conforme al mecanismo catalítico se han agrupado en, serín proteinasas, aspártico proteinasas, cisteín proteinasas, y metalo proteinasas, (Hartley, 1960, Oliveira et al., 2003) (Cuadro1)

Cuadro 1. Grupo de proteinasas.

Proteinasa	Aminoácido del sitio activo	pH Optimo (rango)	Proteínas
Serín	Ser, His	7-9	Tripsina, Quimiotripsina, Elastasa, Catepsina (+) G
Cisteín	Cys	4-7	Papaína*,Ficina, Bromelaína, Ananaina , Catepsina(+)B, C, H, K, L, O, S, y W
Aspártico	(2) Asp, Try	<5	Catepsina(+)D y , Renina, Pepsina
Metalo	Ión Metal	7-9	Carboxipeptidasas A y B, Aminopeptidasas

*Papaína aislada de fruta y látex de *Carica papaya* usada para identificar inhibidor de cisteín proteinasas; (+) El termino de "Catepsina" es generalmente utilizado en cisteín proteasas lisosomales (Cygler y Morb, 1997; Matsumoto et al., 1997).

2.1.2. Serín proteinasas

Las serín proteinasas comprenden a dos familias, la familia del Quimotripsina, que incluye las enzimas mamíferas tales como Quimotripsina, Tripsina, Elastasa y kallikreina; la otra familia incluye enzimas con plegamientos similares a los de la

subtilisina. Aunque la estructura general 3D es diferente en las dos familias, tienen la misma geometría activa del sitio, y la catálisis procede vía el mismo mecanismo. Exhiben diversas especificidades del sustrato, que se relacionan con las substituciones del aminoácido en los varios subsitios de la enzima que obran recíprocamente con los residuos del sustrato (Schaller, 2004).

2.1.3. Aspártico proteinasas

Las aspártico proteinasas realizan su acción catalítica en medios ácidos, fragmentando principalmente residuos ácidos (Acido glutámico, glutamina, ácido aspártico y asparagina). Esta familia incluye las enzimas digestivas como la pepsina, quimosina, catepsina, lysosomal D, procesando las enzimas como la renina, y ciertas proteasas fungicidas (penicillopepsina, rhizopuspepsina, endothiapepsina), (Mares *et al.*, 1989).

2.1.4. Cisteín proteinasas

Las cisteín proteinasas incluyen proteinasas vegetales tales como la papaína, actinidina, bromelaina y varios tipos de catepsina lisosomal de mamíferos, y las calpains citosólica (activadas por calcio), así como varias proteinasas de parásitos (ejemplo *Trypanosoma*, *Schistosoma*). La papaína es el ejemplo tipo y el miembro mejor estudiado de esta familia. El pH óptimo de estas enzimas varía desde neutro hasta ligeramente ácido. Como la formación de la catálisis de las serín proteinasas usan un covalente intermedio e implica una cisteína y un residuo de la histidina.

Los tipos de proteasas mencionados anteriormente son los más estudiados. Las proteasas desempeñan papeles importantes en la activación de enzimas, reciclamiento de proteínas y en otros procesos fisiológicos como la digestión, sin embargo a pesar de que son importantes en el metabolismo su actividad debe ser regulada por diversos medios como los inhibidores de proteinasas (Kuroda *et al.*, 2001; Yoza *et al.*, 2002; Connors *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2004).

2.1.5. Métalo proteinasas

Los metalo proteinasas pueden ser una de las más viejas clases de proteinasas y se encuentran en bacterias y hongos así como en organismos superiores. Difieren principalmente en sus secuencias y sus estructuras, pero la gran mayoría contiene un átomo de cinc dentro de su sitio catalítico. En algunos casos, el cinc se puede substituir por otro metal tal como cobalto o níquel sin la pérdida de la actividad.

La termolisina bacteriana muestra dentro de su estructura cristalográfica, que el cinc es limitado por dos residuos de histidina y un residuo de ácido glutámico. (Skiles *et al.*, 2004).

3. Inhibidores de proteinasas

Los inhibidores de proteinasas son polipéptidos y proteínas que inhiben la actividad catalítica de las enzimas proteolíticas, estos inhibidores al igual que las proteasas están presentes en casi todas las formas de vida. En plantas, dichas proteínas se encuentran generalmente concentradas en tejidos de almacenamiento como semillas y tubérculos, particularmente en las gramíneas, leguminosas y solanáceas, aunque también se ha reportado su presencia en otras familias botánicas. (Blanco y Aguirre 2002). Estos inhibidores se encuentran principalmente en los granos y tejidos de reserva de las plantas; alcanzan concentraciones bastante altas (5-15 % de la proteína total), (Vivanco *et. al.*, 2005)

A la fecha se han descrito proteínas con actividad inhibitoria de proteasas, secuencias de nucleótidos que codifican para dichas proteínas, y construcciones de ADN que comprenden dichas secuencias de nucleótidos. Dichas proteínas constituyen un potencial biotecnológico para el control de plagas ya que se ha demostrado que pueden ser útiles para prevenir, combatir o reducir el daño causado en las plantas por agentes fitopatógenos o insectos plaga mediante, la inhibición de proteasas digestivas. La incorporación de las secuencias de nucleótidos codificantes de dichas proteínas en genomas de plantas y su expresión podría proporcionar protección a las plantas que presentan una susceptibilidad a estos tipos de daño. (Ryan, C. A. 1990).

Los inhibidores de proteasas son herramientas importantes usadas por la naturaleza para el control de la actividad de sus proteasas-blancas. Los inhibidores conocidos y caracterizados son, en su mayoría, inhibidores de serín-proteasas, no obstante recientemente un gran número de inhibidores de cisteín-proteasas se ha aislado y se ha caracterizado (Presagie y Huber, 1992).

Para el caso de insectos plaga los inhibidores de proteasas sintetizados por las plantas son generalmente proteínas pequeñas y que forman parte de los mecanismos de defensa de las plantas. Al bloquear la actividad de las proteasas intestinales, frenan el crecimiento larval y en ocasiones provocan la muerte por ayuno. Los inhibidores de proteasas bloquean las proteasas de serín, cisteína y aspártico, así como a las metalocarboxipeptidasas (Vivanco *et al.*, 2005).

Aunque cabe mencionar que existen familias de inhibidores con especificidad para cada una de las clases mecanísticas, de tal manera que se tienen inhibidores de serín proteinasas, cisteín proteinasas, ácido aspártico proteinasas y metalo proteinasas (Barret. 1986), la actividad inhibitoria se atribuye a la capacidad para formar complejos estables con proteasas ; bloqueando, modificando o previniendo el acceso del sustrato del sitio de activo de la enzima (Laskowski y Qasim, 2000; Otlewski *et al.*, 2005)

3.1. Fitocistatinas

Dentro de los inhibidores de proteasas podemos mencionar a las cistatinas, que son inhibidores específicos de cisteín proteinasas. En el caso de las plantas podemos encontrar un tipo específico de cistatinas o llamadas Fitocistatinas, que constituyen una familia formada por más de 80 miembros descritos tanto en mono- como en dicotiledóneas, que se agrupan en una rama independiente del árbol evolutivo de esta superfamilia de proteínas. Se caracterizan por presentar, además de la secuencia conservada LARFAV exclusiva de vegetales, tres motivos comunes a

todas las cistatinas implicados en la interacción enzima-inhibidor: i) el sitio reactivo QxVxG; ii) una o dos glicinas en el extremo amino terminal de la proteína y iii) un triptófano en la segunda parte de la molécula (Figura 1).

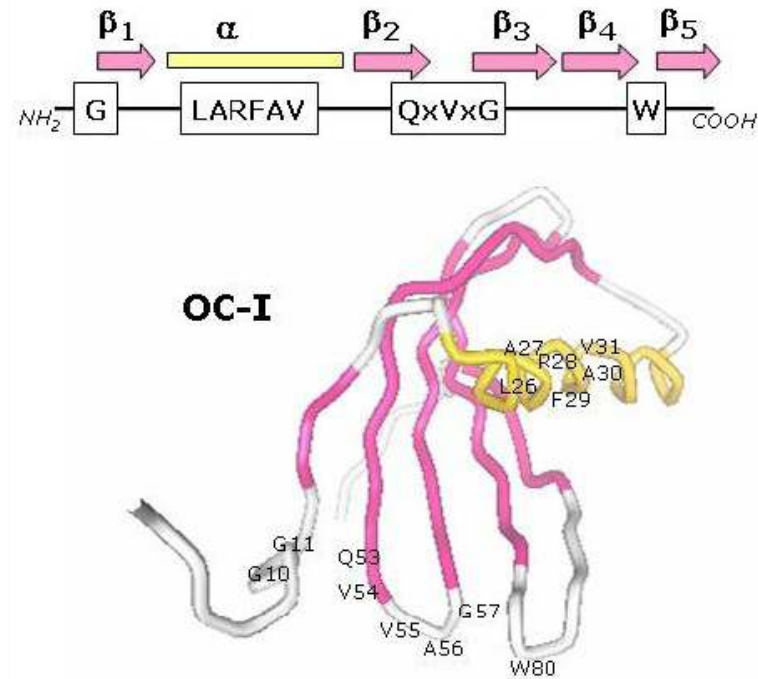


Figura 1. Esquema y estructura tridimensional de la orizacistatina I de arroz (OC-I) indicando las secuencias de aminoácidos LARFAV y los motivos implicados en la interacción enzima-inhibidor, basada en datos estructurales de Nagata *et al.*

3.1.2. Características generales

Las fitocistatinas son inhibidores no competitivos que inhiben de forma específica peptidasas C1A de la familia de la papaína (peptidasas C1A; MEROPS peptidase database, <http://merops.sanger.ac.uk>).

La afinidad de cada fitocistatina por las distintas peptidasas es específica y diferencial como consecuencia de un proceso evolutivo cuya finalidad es la ampliación del espectro de inhibición (Rassam *et al.*, 2004).

Además, presentan puntos isoeléctricos neutros o ácidos, carecen de puentes disulfuro, no sufren procesos post-traduccionales de glicosilación y son estables a variaciones de temperatura y pH. Generalmente la mayoría posee un peso molecular entre 11-16 kDa y un solo dominio inhibitor, aunque se han descrito algunos miembros que presentan una extensión carboxilo terminal que las confiere un tamaño molecular de ~ 23kDa. (Lim *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2005).

Recientemente se ha demostrado que los genes que codifican fitocistatinas de bajo peso molecular carecen de intrones o poseen solo uno localizado entre el motivo LARFAV y el centro reactivo de su región codificante (ORF), mientras que los genes que codifican proteínas de ~ 23kDa presentan sus ORFs interrumpidos por tres intrones (Martinez *et al.*, 2005, Waldrom *et al.*, 1993). El significado funcional y/o evolutivo de los intrones es aún desconocido. Además, existe otro grupo independiente de fitocistatinas, denominadas multicistatinas de ~ 87 kDa, que están formadas por la repetición de 8 dominios inhibidores (Waldrom *et.*, al 1993; Wu *et.*, al 2000).

3.1.3. Distribución en la planta

Muchas especies de plantas producen fitocistatinas que al igual que otros inhibidores de proteinasas se acumulan en órganos de almacenamiento, sin embargo, también pueden acumularse en los tallos y hojas al ser inducidas por factores abióticos o

como mecanismo de defensa constitutivo o inducible contra plagas de insectos y diversos depredadores (Morán y Segovia 2001).

3.1.4. Función biológica

A las fitocistatinas se les ha atribuido esencialmente un papel endógeno relacionado con el reciclamiento proteico y la muerte celular programada debido a su capacidad de inhibir cisteín-proteasas de la planta, y un papel de defensa basado en su actividad inhibitoria frente a cisteín-proteasas heterólogas. La función endógena está poco estudiada, aunque son varias las fitocistatinas relacionadas con la regulación de la degradación de las proteínas de reserva a nivel de semilla.

Asimismo, se ha demostrado que las fitocistatinas son capaces de inhibir la actividad de proteasas endógenas relacionadas con otros procesos fisiológicos, lo que apoya su papel como reguladores de la proteólisis. Este es el caso de la cistatina de papaya que inhibe *in vitro* caricaína, una cisteín-proteasa endógena (Song, Taylor , Baker *et al.*, 1995)

3.2. Fitocistatinas como proteínas de defensa

En numerosos estudios se ha demostrado, que las plantas producen inhibidores de proteasas capaces de suprimir la actividad de las enzimas contenidas en el tracto digestivo de insectos (Ryan, 1990; Gatehouse *et al.*, 1999). También se ha demostrado que manteniendo insectos en un dieta rica en inhibidores de tipo serín y cisteín proteasas suprimen su crecimiento, desarrollo y producción (Broadway y Duffer, 1986; Gatehouse y Boulter 1983; Kuroda y et al., 1996).

Se reportado que causan efectos adversos sobre insectos, lepidópteros (mariposas), (Ryan, 1990), coleópteros (escarabajos y gorgojos) (Benchekroun *et al.*, 1995; Leocardonnel et al., 1999), suprimiéndoles la asimilación normal de las proteínas.

Plantas transgénicas que expresan genes que codifican para inhibidores del tipo cisteín proteinasas que han mostrado efectividad contra insectos (Cuadro 2) (Khatun et al., 2004). Un ejemplo claro es en plantas de tabaco se expreso un inhibidor de

judía (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), que al ser infestada con *Heliothis virescens* fue capaz de disminuir, e contenido de larvas hasta un 50% en comparación con la planta sin el gen de inhibidor (Hilder et al., 1987)

Cuadro 2. Plantas transgénicas expresando genes que codifican para inhibidores de proteasas del tipo cisteín en defensa contra insectos. (Khatun et al., 2004)

Tipo de inhibidor	Planta transformada	Resistencia contra	Referencia
Orizacistatina I	Álamo	<i>Chrysomela tremule</i> (Coleóptera: Chrysomelidae)	Leple et al., 1995
	Papa	Afido de la papa (<i>Myzus persicae</i>)	Gatehouse et al., 1996
	Papa	Larvas del escarabajo de papa <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Leocardonnel et al., 1999
	Semilla de oleaginosa	Gorgojo de la col (Coleóptera: curculionidae)	Jouanin et al., 1998
	Semilla de oleaginosa	<i>Myzus persicae</i>	Rahbe et al., 2003
Cistatina de maíz	Arroz	Gorgojo del grano del maíz: <i>Sitophylus zeamais</i>	Irie et al., 1996
Inhibidor de cisteín proteinasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Álamo blanco (<i>Populus alba</i> L.)	Escarabajo de chrysomelidae: <i>Chrysomela populi</i>	Delledonne et al., 2001

4. Antecedentes y Justificación

Las cistatinas son inhibidores de cisteín proteinasas. Han sido aislados de diferentes organismos incluyendo microorganismos, animales y plantas. Entre las cistatinas de origen vegetal o fitocistatinas podemos mencionar a las aisladas del tallo de la piña, látex de papaya, de los tubérculos de la papa, semillas de *Vigna unguiculata*. El

mecanismo sugerido mediante el cual las fitocistatinas realizan la inhibición es evitando que el sustrato acceda al sitio catalítico de la proteinasa (Birk, 2003).

Las cistatinas se clasifican en cuatro familias, la familia 1, comúnmente se conocen como familia de las estefinas. Estos inhibidores no contienen puentes disulfuro ni carbohidratos unidos a la parte proteica. Tienen pesos moleculares alrededor de los 11 kDa, y se les ha catalogado como proteínas citosólicas. La familia 2 se conoce como familia de las cistatinas, son proteínas inhibidoras que contienen dos puentes disulfuro cerca del carboxilo terminal y están glicosidadas. Los pesos moleculares están entre los 13-24 kDa. Se ha reportado que son proteínas secretadas gracias a que cuentan con un péptido señal. La tercera familia de las cistatinas, se denomina como familia del Kininógeno, y comprende a los kininogenos del plasma sanguíneo, dónde se ubican los miembros más grandes de las cistatinas siendo moléculas más complejas cuyos pesos moleculares se ubican entre 60 a 120 kDa. Poseen puente disulfuro y glicosilaciones además de que también son proteínas que se secretan. La cuarta familia de cistatinas incluye las denominadas fiocistatinas, inhibidores de cisteín proteinasas de origen vegetal, con características muy semejantes a las familias 1 y 2. El primer miembro caracterizado de esta familia fue la oryzacistatina, aislada a partir de semillas de arroz que está relacionado en estructura a la cistatina de la clara de huevo. Las fitocistatinas a su vez se dividen en dos grupos, uno con cistatinas de un solo dominio, y el segundo con cistatinas de múltiples dominios, en el que se incluyen miembros como la multicistatina de los tubérculos de la papa y la de las hojas de tomate. Algunos investigadores muestran que la inhibición de las cistatinas contra la papaína es no competitiva (Oliveira et al., 2003).

Se han propuesto dos papeles importantes para estos inhibidores presentes en plantas; primero, se ha postulado que podrían estar involucrados en la regulación de la proteólisis durante la maduración y la germinación de la semilla; segundo, también se ha considerado que podrían contribuir a la defensa de la planta contra proteinasas exógenas, como aquellas provenientes de insectos plaga y nematodos. De hecho, se ha comprobado que varias cistatinas tienen la capacidad de inhibir proteinasas de insectos en ensayos in vitro, y se ha reportado también que al sobreexpresar

cistatinas en plantas transgénicas se ha logrado obtener resistencia contra ciertos insectos plaga, principalmente coleópteros y contra nemátodos (Pernas et al., 1999).

En algunos trabajos se puede apreciar como la presencia de cistatinas recombinantes pueden dar un efecto de fitoprotección a plantas, por ejemplo, la expresión de cistatina A, stefina A, quininogeno y equistatina cuando se expresaron en plantas de papa, fueron capaces de provocar un efecto deterrente hacia los trips y se les vislumbra nuevas aplicaciones en el papel de defensa de plantas (Outchkourov et al., 2004).

En 2007, Valdés-Rodríguez y col. reportaron la presencia de un cistatina en la especie *Amaranthus hypochondriacus*, esta cistatina tiene 247 residuos de aminoácidos en su cadena polipeptídica, la cual cuenta con la región consenso LARFAV característica de fitocistatinas y un posible sitio catalítico QWAG. El perfil de expresión de esta cistatina se presenta en semillas y va disminuyendo durante la germinación. En tejidos vegetativos se expresa por acción de factores ambientales como salinidad, frío y calor. Posiblemente también pudiera estar involucrada en los mecanismos de defensa de la planta; sin embargo, aún falta fundamentar este punto. Algo que cabe destacar es que esta cistatina novedosa tiene un potencial que aún falta por explorar.

La presencia de cisteín proteinasas como enzimas digestivas en insectos y patógenos, permite plantear que las fitocistatinas pueden ser usadas para conferir resistencia a los cultivos susceptibles al ataque de insectos, pudiendo afectar algunos aspectos de su ciclo vital como son la fecundidad y supervivencia, obstaculizando que se complete el ciclo vital de los insectos y consecuentemente disminuyendo las poblaciones y protegiendo a las plantas de dichos efectos nocivos (Tokoya et al., 2000).

Un ejemplo de acción de un inhibidor de cisteín proteasas efectivo contra plagas es el de la soya, que suprimió el crecimiento y el desarrollo del bruchido (*Callosobruchus maculatus*) así como otros coleópteros tales como escarabajo

occidental del maíz (*Diabrotica virgifera virgifera*) y el escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Zhao et al., 1996; Koiwa et al., 1998).

Entre los numerosos ejemplos de inhibición *in vitro* publicados es de destacar el caso de las cistatinas de arroz, soya y cebada, que purificadas a partir de cultivos de *E. coli* recombinantes, inhibieron la actividad digestiva de importantes insectos plaga como el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) o al gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera*) (Koiwa et al., 2000).

Recientemente se ha desarrollado una estrategia nueva para llevar a cabo los bioensayos, incorporando dosis controladas de una cistatina de *Vigna unguiculata* purificada como proteína de fusión a partir de cultivos de *E. coli*, en semillas artificiales que se han utilizado para alimentar larvas del coleóptero *Zabrotes subfasciatus*. Como resultado se obtuvo una reducción drástica del peso de las larvas y un aumento de su mortalidad lo que ha demostrado los efectos deletéreos de esta cistatina (Aguilar et al.; 2006).

En algunos trabajos revisados por Oliveira y col. se han demostrado efectos por parte de E-64 e inhibidores de tipo fitocistatinas sobre el crecimiento y desarrollo de varios coleópteros como *Diabrotica undecimpunctata*, *D. virgifera*, *Callosobrunchus maculatus*, *C. chinensis*, *Tribolium castanuem*, *Lepinotarsa decemlineata*, *Acanthocelides obtectus*, entre otros (Oliveira et al., 2003). Dado lo anterior y considerando el potencial que presenta la cistatina de amaranto en este trabajo se explora la capacidad inhibitoria de esta proteína recombinante contra las proteinasas presentes en los intestinos de insectos plaga que atacan al frijol. El presente trabajo pretende apoyar con bases en bioquímica y biología molecular el desarrollo de nuevas estrategias para el control de plagas que atacan al frijol.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de una cistatina recombinante expresada en *Escherichia coli* contra proteinasas intestinales de insectos que atacan a granos almacenados.

5.1. Objetivos específicos

- Purificación de una cistatina recombinante de amaranto utilizando una columna de alta afinidad Ni-NTA.
- Determinar la actividad inhibitoria de la cistatina recombinante contra proteasas digestivas de insectos que atacan a granos almacenados.

5.2. Hipótesis

La cistatina recombinante purificada ejerce un efecto inhibitorio contra proteinasas digestivas de granos almacenados *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*.

6. MATERIALES Y METODOS

Para la producción masiva de la cistatina recombinante de amaranto en este trabajo se utilizó la Clona (27) de la cepa bacteriana M15 de *Escherichia coli*, transformada con el vector PQE2 el cual contiene la secuencia codificante de la cistatina de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) fusionada a una cola de residuos de histidina. La cepa se conservó en un medio sólido Luria Bertani (LB).

Las muestras de granos almacenados infestados con las diferentes especies de insectos analizados durante el trabajo fueron proporcionados por el personal del Insectario del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav Campus Guanajuato

6.1. Crecimiento de *E. coli* transformada con el gen de cistatina

Para preparar el preinóculo, la cepa bacteriana de *E. coli* se conservó en medio LB sólido (agar al 1%), la cepa bacteriana fresca, se creció por 16 horas a una temperatura de 37°C. Con una colonia aislada se inocularon 4ml de medio de cultivo SB (líquido) con dos antibióticos: Carbenicilina (Cb) a una concentración 100mg/ml y Kanamicina (Km) 25mg/ml. El cultivo se incubó 16hrs a 37°C en agitación constante a una velocidad de 200-210rpm.

6.1.1. Obtención de lisado celular

El cultivo se mantuvo en crecimiento hasta alcanzar una DO de 0.5, la cual se midió a una longitud onda de 600nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640),

Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica mencionada, se agregó al medio de cultivo el inductor conocido como IPTG (Isopropil-D-tio-galac-topiranósido) a una concentración de 0.1mM, para comenzar la inducción de la síntesis de proteína recombinante por espacio de 2:30 h hasta alcanzar una absorbancia promedio de 1.4 a 600nm. Una vez transcurrido el tiempo requerido, el cultivo fue centrifugado (Biofuga stratos (Accesolab1.4.)) por un periodo de 10 min a una velocidad de 12,000xg para lograr separar el paquete celular (pastilla) del medio. El sobrenadante resultante fue eliminado y se recuperó la pastilla formada principalmente por células bacterianas, la cual fue resuspendida con Buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM) a razón de 0.625ml por cada 2ml de medio de cultivo, en agitación constante (Labnet) con una velocidad de 10rpm a una temperatura de 4°C.

Para favorecer el proceso de ruptura celular, las células resuspendidas en el buffer de lisis fueron sometidas a un proceso de congelamiento-descongelado cuatro veces utilizando hielo seco y acetona, y descongelando con agua desionizada a 37°C;

finalmente la mezcla fue procesada en un baño de sonicación (Sonicador, Branson® 2510) por 1 h, en periodos de 20min a 4⁰C.

Para recuperar las proteínas de la mezcla lisada, la muestra fue centrifugada durante 40min a una velocidad de 12,000xg, lo cual permitió separar la fracción de proteína hidrosoluble de todos los restos celulares que permanecieron formando una pastilla, el sobrenadante fue recuperado con mucho cuidado para evitar contaminación con restos de la pastilla. El sobrenadante se distribuyó en alícuotas de 2ml y se conservaron congelados a -20⁰C hasta su uso.

La fracción soluble obtenida se analizó en geles de Poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, utilizando la cámara de electroforesis (Mini protean II de Bio Rad).

6.1.2. Cuantificación de proteínas por el método Bradford (Bradford, 1976)

Para determinar la concentración proteica del extracto obtenido de la lisis de las células bacterianas, se utilizó el método colorimétrico de Bradford (1976), empleando para ello el reactivo concentrado de Bio-Rad “Protein Assay Dye Reagent Concentrates”, siguiendo las instrucciones del fabricante. El método se basa en la afinidad del colorante azul de Coomassie por residuos básicos e hidrofóbicos de aminoácidos en las proteínas.

Para la cuantificación de proteína se utilizó una alícuota de 500µl proveniente del lisado celular. Se procedió a cuantificar la concentración de proteína, tomando como referencia una curva estándar de Albúmina de Suero Bovino. Se utilizaron de 1 hasta 5 µl de muestra. La muestra se disolvió en agua a un volumen de 400 µl y se añadieron 100 µl del reactivo de Bradford, la mezcla se incubó por 10min a temperatura ambiente. Como blanco de calibración solo se añadieron 400µl de agua desionizada y 100µl de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a 595 nm.

6.2. Purificación de la cistatina recombinante en una columna de alta afinidad Ni-NTA.

La purificación de la cistatina se realizó mediante cromatografía de alta afinidad en una columna de Ni-NTA (Níquel-Acido-Nitrilo-Triacético de Invitrogen). Esta resina fue diseñada para obtener un alto rendimiento, eficacia y especificidad en la purificación de proteínas recombinantes fusionadas a seis residuos de histidina. Consiste en una matriz de agarosa (resina) donde el níquel está unido a ella, mediante cuatro sitios de coordinación con el ácido nitrilotriacético. La cola de histidinas permite la separación de la proteína recombinante, ya que presenta interacción con el níquel presente en la resina, permitiendo de esta manera la purificación selectiva.

La carga de proteína proveniente de las células bacterianas en la columna fue en proporción 1:5 w/v, por cada ml de resina se hicieron pasar 25mg de proteína total, a una concentración de 2µg/µl.

6.2.1. Equilibrio

Antes de cada separación cromatográfica el pH de la columna se equilibró hasta alcanzar pH 8, este proceso se realizó haciendo pasar Buffer de Lisis pH 8 (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM). A cada una de las fracciones obtenidas se le midió el pH hasta que este fue constante e igual a 8.

6.2.2. Afinidad

Una vez que se logró equilibrar la columna, se pasó la muestra obtenida en la lisis de celular a través de un filtro de 0.2 µm (Nalgene). Posteriormente se pasó por la columna. El tiempo de acoplamiento fue por un periodo de 3hrs con flujo de recirculación constante. Manteniendo una temperatura de 4⁰C.

6.2.3. Lavado.

Una vez concluida la etapa de acoplamiento de la muestra proteica con la resina de afinidad se procedió a lavar la resina con la finalidad de separar las proteínas que nos se pegaron a la columna empleando para ello el Buffer de Lisis pH 8. Se colectaron fracciones durante el lavado y se les midió absorbancia a 280 nm hasta que está estuvo muy cercana a cero. El proceso de lavado tardó cerca de 3 horas.

6.2.4 Elusión.

Este proceso es crítico durante la purificación por lo que se recomienda un cuidado y monitoreo constante. El objetivo de esta etapa es obtener la proteína recombinante que se acopló a la resina de afinidad, para lo cual se hizo pasar Buffer de Elución (NaH_2PO_4 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 250mM) pH 8, a través de la columna. Como resultado de este proceso de elusión se colectaron 20 fracciones de 1ml a las cuales se les midió la absorbancia a 280nm. Las fracciones con mayor absorbancia se conservaron en alícuotas de 1ml en microtubos y se conservaron a -20°C .

Las muestras de las fracciones recuperadas de la elusión se analizaron en geles de poliacrilamida al 12%, de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli 1970.

6.3 Análisis en geles de poliacrilamida por electroforesis

Se usó la metodología descrita por Laemmli 1970. La cual utiliza geles de poliacrilamida para separar las proteínas en función de su peso molecular. Para la elaboración y electroforesis de estos geles desnaturizantes se utilizó el equipo MINI-Protean III de Bio-Rad, que permite conseguir geles de 5.5 cm de altura, 7.5 cm de ancho y 0.75 ó 1 mm de espesor.

Un gel típico del sistema Laemmli consta de dos partes, la parte superior del gel denominado gel concentrador, que consta aproximadamente de 1cm de gel, dicho gel permite la entrada de la muestra. La fase de concentración se preparo a una concentración del 4% de acrilamida. La parte inferior o gel separador, y es en esta sección donde se realiza la separación de las proteínas que se concentraron en cada carril por efecto del gel concentrador en este caso se utilizó un porcentaje de acrilamida del 12% (Ver apéndice).

Las condiciones de corrida en la electroforesis fueron un voltaje de 80 Volts (V) los primeros 15 min, hasta que todas las muestras se alinearon en la fase de concentración, seguido de un cambio en el voltaje hasta alcanzar 120 V. Para

determinar la movilidad electroforética relativa de las proteínas estudiadas se usaron marcadores peso molecular conocido (Bench-Mark™, Ladder (Invitrogen)).

Las proteínas separadas en el gel se fijaron durante 30min en solución fijadora (Etanol 40%, Acido acético 10%), después se tiñeron con azul de Coomassie durante (Etanol 40%, Acido acético 10%, Azul de Coomassie 0.1%) por 1 h. Los patrones electroforéticos se digitalizaron (Amersham Biosciences) y posteriormente se secaron entre dos láminas de celofán durante 6 horas a 37°C.

6.4. Análisis de pureza (electroforesis bidimensional)

Después de que se purificó la proteína recombinante con la columna de afinidad la muestra se dializó contra agua desionizada en una cámara de diálisis, (Microdiálisis System (BRL)) y se liofilizó con un secador al vacío Maxi Dry Plus hasta lograr obtener la muestra seca que se conservó a -20°C.

Para el isoelectroenfoque se utilizó un gel comercial con un gradiente lineal de pH 3-10, el cual se rehidrato en 125µl Buffer de rehidratación (DTT 0.31%, CHAPS 0.65%, Urea 7M, Tiourea 2M y anfolinas de rango de pH 3-10), con 5µg de proteína que anteriormente se solubilizó en 1ml de agua desionizada estéril. El protocolo de isoelectroenfoque fue: 250 Volts/1 h, 500 Volts/30min, 1000 Volts/30min, 8000 Volts/5 h, hasta alcanzar un voltaje total de 16412 Volts. Concluido el isoelectroenfoque se equilibrio por 15min la tira con Buffer de equilibrio (Tris 50mM, Urea 6M, Glicerol 30%, SDS 2%) más DTT 0.4µM, posteriormente se equilibrio con el Buffer de equilibrio más iodocetamida 82.4µM por 15 min, agregando colorante azul de Bromofenol.

Posteriormente se llevo acabo la electroforesis bidimensional, aplicando un voltaje inicial de 90 Volts para los primeros 15 min, y 100 Volts hasta que se concluyo el frente de corrida. Se fijo y se tiño al igual que el sistema de Laemmli, se digitalizaron (Amersham Biosciences) y se analizo bajo el Programa IMAGE MASTER.

6.5 Obtención de larvas de los insectos *A. obtectus*, *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*.

Los cultivos de insectos fueron monitoreados hasta obtener larvas en el último estadio larval en el cual se enfocó nuestro estudio. Las larvas se extrajeron rompiendo los granos y se seleccionaron recuperando las de mayor tamaño. Se conservaron a una temperatura de -80°C en microtubos.

6.5.1. Disección del intestino medio.

La disección del intestino fue realizada bajo microscopio-estereoscopio en frío para evitar la degradación por proteinasas. Los tractos digestivos se suspendieron en cloruro de sodio 0.15mM para facilitar así su extracción y evitar la resequedad. Se conservaron en microtubos a razón de 20 intestinos en 50 μl de NaCl, para cada uno de los insectos y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

6.6. Extracción de enzimas digestivas de insectos.

La extracción de enzimas digestivas se hizo en la solución de cloruro de sodio antes mencionada. Los intestinos se descongelaron y se maceraron hasta lograr romper el intestino para posteriormente centrifugar la mezcla por espacio de 30 min a una velocidad de 12,000xg. El sobrenadante claro se recuperó y se desechó la pastilla y la capa de grasa blanquecina. El sobrenadante recuperado se sometió de nuevo a otro paso de centrifugación por 10min a la misma velocidad, recuperando nuevamente el sobrenadante y conservándolo a -20°C en microtubos hasta su uso. Se cuantificó proteína por el método de Bradford, para obtener la concentración de proteína de la muestra.

6.7. Detección de actividad proteolítica en Zimogramas

Para este caso se usó la metodología descrita por Shager y Von Jagow (1987).

En este tipo de geles de poliacrilamida o también llamados Zimogramas con gelatina como sustrato al 0.1%, se observa una banda blanca sobre un fondo azul indicando la actividad proteolítica. Para la elaboración y electroforesis de estos geles desnaturizantes se utilizó el equipo MINI-Protean III de Bio-Rad, que permite conseguir geles de 5.5 cm de altura, 7.5 cm de ancho y 0.75 o 1mm de espesor. En esta metodología el gel esta compuesta por dos fases al igual que el sistema Laemmli, con pero a diferencia el gel separador se preparo al 12.5% de acrilamida. Cabe mencionar que los reactivos de preparación son diferentes (ver apéndice).

Para la separación de las proteínas la electroforesis se aplicaron 20 mA, los primeros 15 min, hasta que todas las muestras se alinearon en la fase de concentración, posteriormente se aplicaron 30 mA, hasta terminar la corrida. Para determinar la movilidad electroforética relativa de las proteínas estudiadas se usaron marcadores peso molecular conocido (Bench-Mark™, Ladder (Invitrogen)).

Una vez ya preparados los geles, posteriormente se procede a su activación de las enzimas digestivas agregando DTT (ditiotreitól), a una concentración de 2.5mM y se dejó incubar en microtubos por 30 min a temperatura ambiente, y posteriormente se agrego el Buffer de carga (TRIS 50mM, Glicerol 12%, SDS 4%, Negro amido 0.2%) a razón 1:1 v/v, se corrió a 20mA los primeros 15 min (fuente de poder Bio-Rad Power Basic) y posteriormente a 30mA, el frente de corrida duro un tiempo de corrida aproximado de 3:00 a 3:30 h, posteriormente se lavo con Buffer de lavado (Acetato de sodio 50mM pH 5, DTT 2.5mM, Tritón 100X al 0.1%) por 15min en agitación, posteriormente se coloca Buffer de Incubación BI (Acetato de sodio 50mM pH 5, DTT 2.5mM) por 15min en agitación, se cambio BI antes mencionada por nueva y se incubo por 3hrs a 37°C.

Cumpliendo el tiempo de incubación se fijo el gel con solución fijadora (Acido acético 10%, Etanol 40%) por 30 min y posteriormente se tiño el por 1 h con solución Teñidora (Acido acético 10%, Etanol 40% y Negro amido 0.1%), posteriormente se coloco solución desteñidora para desteñir (Ácido acético al10%) observando la actividad proteolítica mostrando bandas que no se tiñeron en color blanco, en un

fondo azul. Los geles de poliacrilamida se digitalizaron (Amersham Biosciences) para su estudio.

6.8. Inhibición de actividad proteolítica de proteasas digestivas en Zimogramas, para las tres especies de insectos, *A. obtectus*, *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*.

La actividad inhibitoria (parcial o total) causada por la cistatina recombinante sobre una cisteín-proteasa se detectó midiendo la actividad proteolítica residual después de preincubar la cistatina con la proteasa.

Para este experimento se utilizó E-64, que es un inhibidor comercial de cisteín proteinasas como inhibidor comercial empleado para determinar si el mecanismo catalítico presente en las proteasas de insectos es cisteín proteinasas. También se comparó el efecto cistatina recombinante purificada.

Los ensayos incluyeron un tratamiento control, que consistió de la actividad proteolítica presente en cada insecto. Los otros tratamientos incluyeron los extractos con actividad proteolítica preincubado con DTT 2.5 mM y E-64 en varias concentraciones. Para el caso de la acción inhibitoria de la cistatina, los extractos proteolíticos se preincubaron con DTT 2.5 mM y cistatina en diferentes concentraciones. Seguido a la preincubación las muestras se corrieron en electroforesis por espacio de 3 a 3:30 h. Una vez terminada la separación electroforética, los geles fueron lavados con buffer de lavado y de incubación pensionados en el apartado anterior, se colocó solución de incubación nueva y se incubaron por 3 h a 37°C con los inhibidores a la concentración correspondiente disueltos en el buffer de incubación (Acetato de sodio 50 mM pH 5, DTT 2.5 mM + el inhibidor dado el caso). Finalmente los geles se fijan y se tiñen como se menciona en el apartado 4.3.

Los bandas de actividad proteolítica de los Zimogramas fueron sometidas a un análisis por computadora, con el programa 1D Image Analysis Software de Kodak. Para esto se hizo un cálculo de la cantidad de pixeles que tiene cada banda tomando

en cuenta su intensidad, un pixel es la menor unidad en la que se descompone una imagen digital, ya sea una fotografía, o un gráfico. Estos datos arrojaron valores proporcionales al área de hidrólisis de la proteasa en el gel y una disminución en pixeles se debió a la reducción del área de hidrólisis de una proteasa que fue inhibida, que se represento en % de inhibición. Para esto se tomo como control para cada uno de los insectos la actividad proteolítica visualizada para cada uno sin inhibidor (E-64 –Cistatina) como el 0% de inhibición. Los valores arrojados fueron graficados para mostrar su valor de inhibición para especie y para inhibidor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de *E. coli* y producción de cistatina recombinante visualizada en geles de poliacrilamida.

En trabajos previos en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas del Cinvestav campus Guanajuato se clonó la secuencia codificante de la cistatina de amaranto en el vector pQE2 para su expresión en la cepa M15 de *E. coli*. Las células transformadas de *E. coli* se caracterizaron por producir una cistatina recombinante de

un peso molecular de 28kDa. Posteriormente se establecieron las condiciones para obtener la cistatina recombinante a altas concentraciones, expresada en medio Súper Broth (SP) líquido, con un tiempo de 2:30 h de inducción con IPTG 0.1mM. En la figura 2 se muestra la cinética de crecimiento bacteriano a diferentes tiempos de inducción, en los cuales se muestra que ya que no se detectan diferencia en el contenido de proteína total después de 2:30 h de inducción, por lo cual se eligió este tiempo para realizar la inducción en los ensayos sucesivos.

Los cultivos bacterianos se obtuvieron después del periodo de incubación y fueron sometidos a un proceso de lisis celular (ver apartado 2.1.2 en Metodología) para poder obtener la proteína total. Esta mezcla de proteínas se sometió al proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad en la columna con Agarosa-Ni NTA.

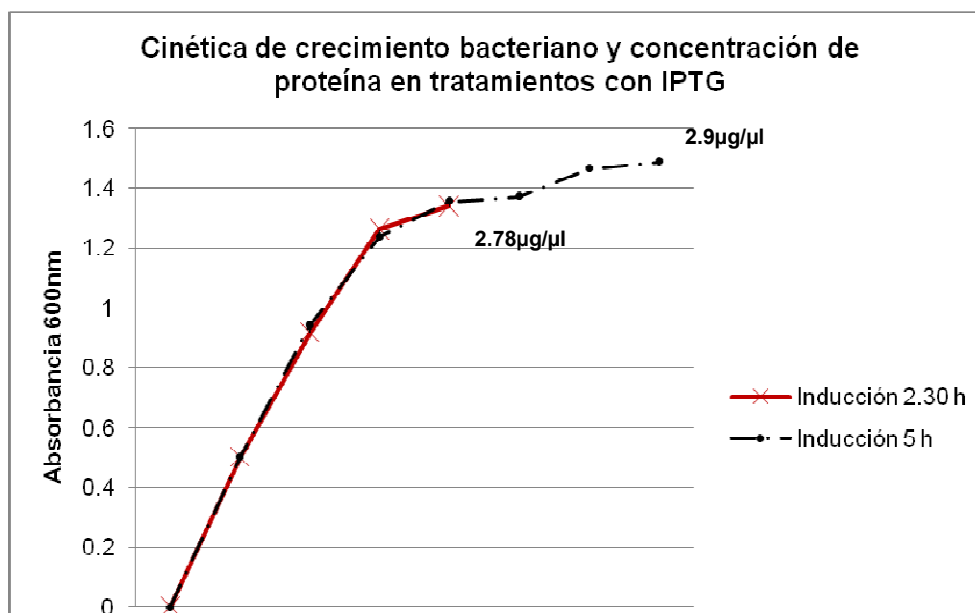


Figura 2. Cinética de crecimiento bacteriano con dos tiempos de inducción y su concentración de proteína. El cultivo se creció hasta una absorbancia de 0.5 a 600nm a partir de la cual se inició la inducción con IPTG 0.1 mM. La concentración de proteína total a 2:30 y 5 h se indica en la gráfica como $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Purificación de la cistatina

Se estandarizó el método de purificación de la cistatina recombinante en la columna Ni-NTA, la separación cromatográfica fue reproducible entre los diferentes lotes. Obteniendo la fracción de cistatina recombinante en el mismo número de fracción.

En la Figura 3. Se presenta un cromatograma típico durante la purificación de la cistatina, la cual eluyó en un pico comprendido generalmente en tres fracciones con

la mayor absorbancia. A las cuales se cuantificó la concentración de proteína a cada una de las muestras colectadas.

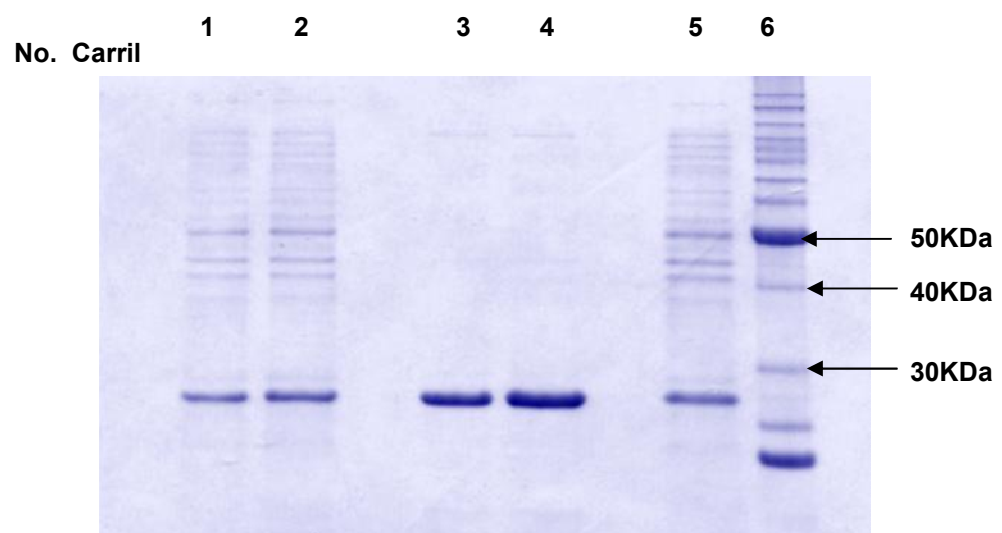
Figura 3. Cromatograma de la elusión de la cistatina purificada en columna de afinidad. Las fracciones de mayor absorbancia fueron recuperadas y se les cuantificó proteína (Bradford).

Análisis del proceso de purificación en geles de poliacrilamida.

El proceso de purificación de la cistatina recombinante fue monitoreado por análisis en SDS-PAGE. En la figura 4, se muestra una electroforesis en una dimensión del proceso de purificación. En cada carril se cargaron 2 y 5 microgramos de proteína para poder visualizar todas las proteínas presentes en el extracto bacteriano y en las fracciones de la purificación.

En el gel se aprecia que en los carriles 1 y 2 con concentraciones diferentes aparecen todas las proteínas obtenidas del proceso de lisis celular; sin embargo, se puede notar que hay una banda muy marcada que corresponde a la cistatina, de acuerdo a lo que se puede observar en los carriles 3 y 4 en donde también se cargaron diferentes concentraciones de la fracción de cistatina purificada. En el carril 5 se visualizan las proteínas que no fueron reconocidas por la columna de afinidad y que fueron lavadas con el buffer inicial. Se puede apreciar en este carril que aparece una banda en la misma posición que la cistatina purificada, esto podría deberse a que se sobrecargó la columna con proteína y el exceso no pudo interactuar fuertemente con la resina y terminó siendo lavado con el buffer inicial.

Los marcadores de peso molecular se muestran en el carril 6 (Bench-Mark™, Ladder (Invitrogen)).



← 25KDa
← 20KDa

Figura 4. Perfil electroforético en geles de poliacrilamida-SDS de lisado celular, fracción purificada y proteínas no retenidas en la columna. Carril 1 (2µg), carril 2 (5µg) de proteínas de lisado celular, 3(2µg), carril 4 (5µg) de cistatina purificada, carril 5 (5µl) de la fracción no retenida por la columna, carril 6. (Bench-Mark™, Ladder (Invitrogen)).

Confirmación de la purificación de la cistatina recombinante mediante electroforesis bidimensional

Una vez obtenida la fracción de la cistatina recombinante se procedió a hacer un análisis para confirmar la pureza de dicha fracción visualizada inicialmente con electroforesis en una dimensión. El fundamento de esta técnica es la separación de las proteínas en la primera dimensión por punto isoeléctrico y separación por peso molecular en la segunda. Este sistema permite da una alta resolución a los elementos presentes en los geles y facilita la comparación automática de manchas

('spots') en el análisis cuantitativo, en este trabajo los análisis se realizaron con el programa IMAGE MASTERS. Un gel típico de un análisis bidimensional para las fracciones eluídas de la cromatografía de afinidad se muestra en la figura 5, donde se aprecia que la cistatina tiene un peso molecular relativo de 28KDa y punto isoelectrico de 6.8.

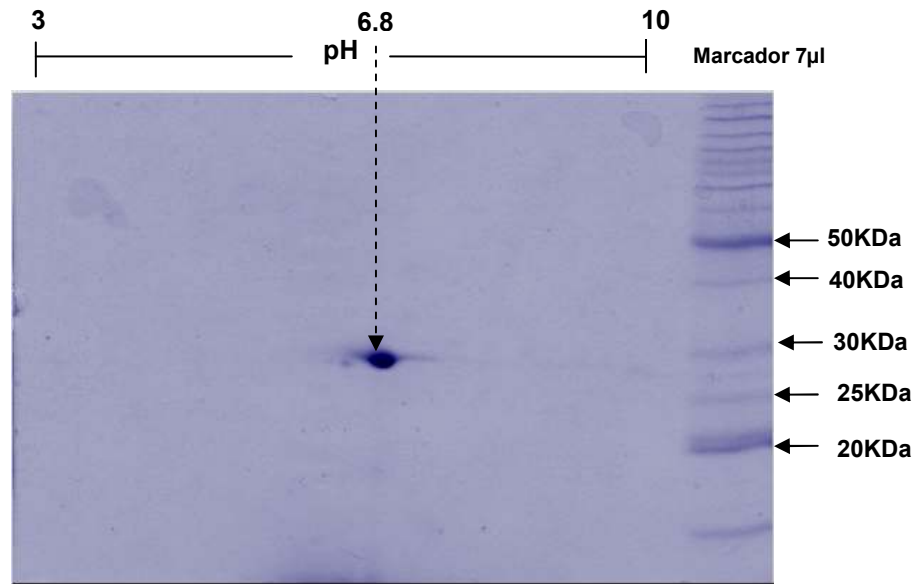


Figura 5. Electroforesis bidimensional. Se muestra la electroforesis bidimensional de una fracción purificada encontrando su peso molecular y su punto isoelectrico, analizado por un programa IMAGE MASTERS. Marcador (Bench-Mark™, Ladder (Invitrogen)).

Actividad proteolítica de enzimas digestivas de *Acantocelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*

Se determinó la actividad hidrolítica de proteasas digestivas presentes en *Acantocelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*, utilizando geles de poliacrilamida al 12.5% copolimerizados con gelatina al 0.1% como sustrato.

Para el caso de *Acanthoscelides obtectus*, la actividad proteolítica se visualizó utilizando una carga de proteína de 32.7µg. Después de la electroforesis el gel fue incubado bajo condiciones antes mencionadas en el apartado 5.4. (Zimogramas), una vez transcurrido el periodo de incubación los geles se fijaron y tiñieron con

negro amido, la actividad proteolítica se observó como bandas blancas sobre un fondo azul. El peso molecular relativo de las bandas visualizadas fue a (113.9), b (97.4), c (87.8), d (79.8), e (57.8) medidos en KDa de acuerdo a la comparación estándares de peso molecular conocidos por función lineal, mostrándose en figura 6 A.

Con la especie *C. maculatus* se utilizó una carga de proteína de 7µg, que de igual manera fueron sometidos a una separación electroforética. Para esta especie se detectaron 3 bandas de actividad proteolítica, con un peso molecular relativo de a'' (43.1), b'' (80.6), c'' (94.3) KDa estimado con respecto a estándares de peso molecular conocido, observándola en figura 6 B.

En la figura 6 C. se observa la actividad proteolítica presente en los intestinos de *Z. subfasciatus* también se visualizó en gel de poliacrilamida. La carga de proteína para estos extractos fue de 8µg que fueron analizados. Las bandas con actividad proteolítica en esta especie tuvieron un peso molecular relativo de a'' (124.1) y b'' (74.8) KDa respectivamente, estimado con estándares de peso molecular.

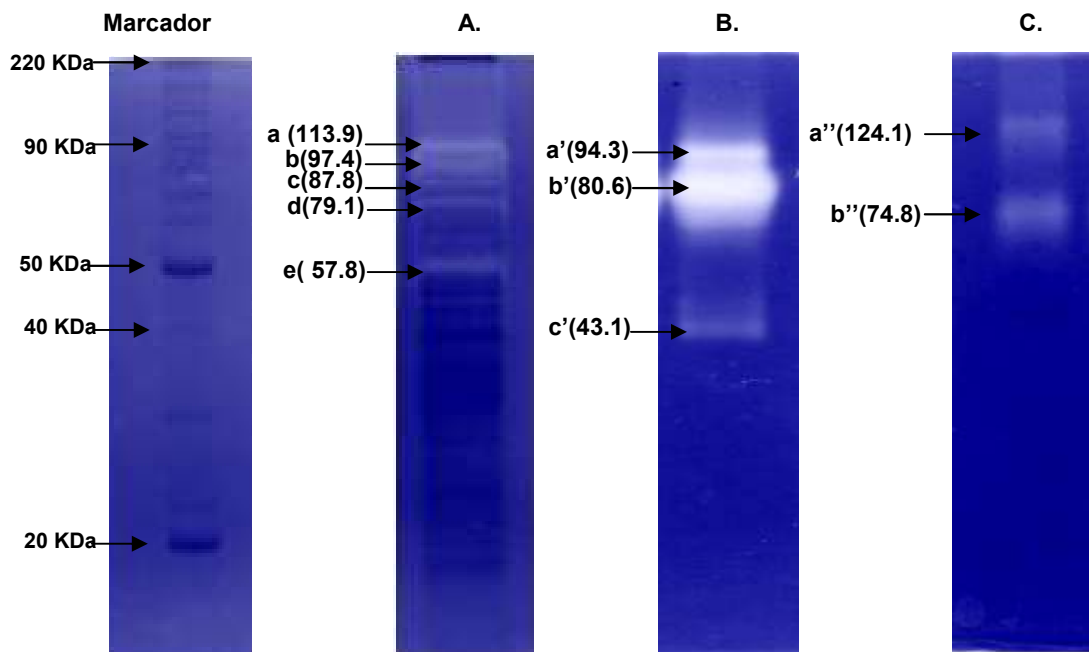


Figura 6. Perfiles proteolíticos de insectos plaga del frijol, A. *Acanthoscelides obtectus*; B. *Callosobruchus maculatus* y C. *Zabrotes subfasciatus*. Las bandas encontradas con actividad proteolítica y sus respectivos pesos moleculares dados en KDa, se indican con una flecha.

Efecto de Inhibición con E64 contra proteinasas digestivas de *Acanthoscelides obtectus*.

Una vez obtenido el patrón de actividad proteolítica para *Acanthoscelides obtectus*, se realizaron ensayos de inhibición con E-64 (inhibidor específico para cisteín proteinasas). El ensayo permitió ver si el tipo catalítico de las proteasas visualizadas pertenecía a la clase de cisteín proteinasas, además permitió ver la sensibilidad de las proteasas a la inhibición con E-64. Se utilizaron concentraciones graduales del inhibidor para ver en que concentración la actividad proteolítica perdía efecto.

Los geles obtenidos de este experimento se muestran en la Figura 7. Para analizar los ensayos de inhibición con E-64 se utilizó el programa 1D de Kodak. La

concentración más alta de Inhibidor (20 μ M) mostró una inhibición total de cuatro bandas de las cinco bandas detectadas, cuyo peso molecular estimado correspondía a las señaladas con las letras b, c, d, y e (Figura 6, panel A). Dicha concentración alcanzó una inhibición del 59% para la banda de mayor peso molecular (señalada con la letra a en el panel A de la figura 6). El efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración, debido a que en presencia de bajas concentraciones (10 μ M) solo se inhibieron las bandas c, d y e; mientras que, a concentraciones más altas se inhibieron todas las bandas. Se comprobó que las bandas de actividad proteolítica encontradas en *A. obtectus* pertenecen al grupo de cisteín proteinasas. Los porcentajes de inhibición se presentan en la Figura 8.

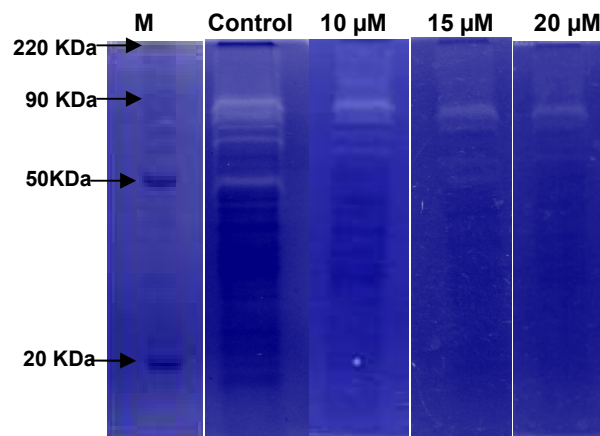


Figura 7. Experimento de inhibición con E-64 contra la actividad de proteasas digestivas de *A. obtectus* en geles de poliacrilamida. Como control se usó el extracto crudo del intestino de *A. obtectus*. La misma

cantidad de proteína fue cargada en los otros carriles en presencia de diferentes concentraciones de E64 (10, 15 y 20 μ M). A mayor concentración se inhiben todas las bandas. M. marcador de peso molecular.

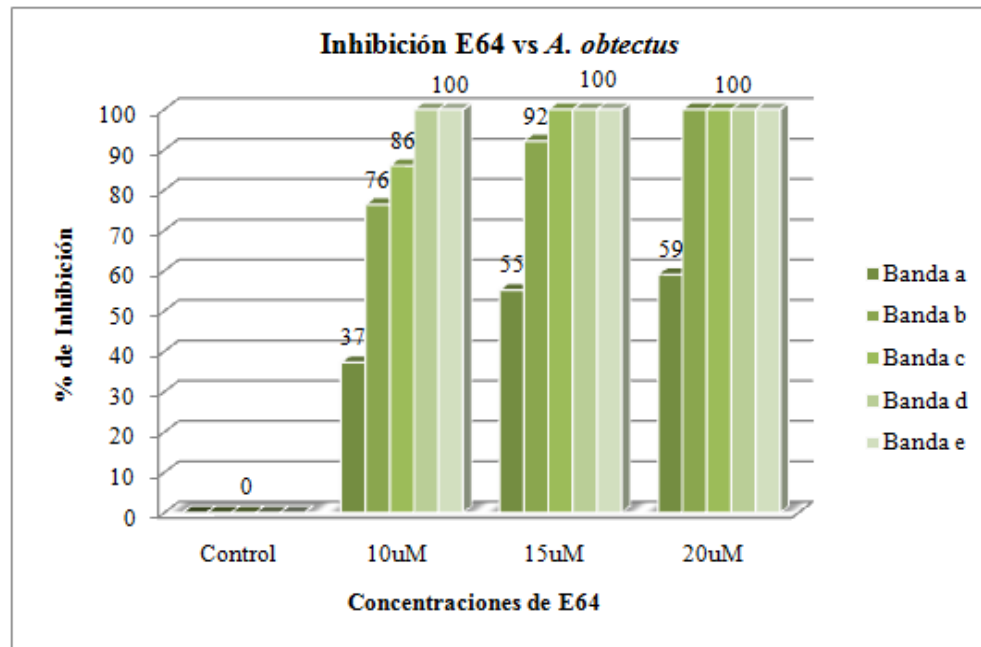


Figura 8. Porcentajes de inhibición con E-64 de la actividad proteolítica en intestinos de *A. obtectus* obtenidos con el programa 1D Image Analysis Software de Kodak. La inhibición de las diferentes concentraciones fueron analizadas bajo el programa 1D Kodak, tomando el control como 100% de actividad proteolítica. En la concentración de 20 mM la banda (a) aún retuvo el 59 % de la actividad proteolítica.

Efecto de Inhibitorio de la Cistatina recombinante de amaranto contra proteinasas digestivas de *A. obtectus*

Para verificar la capacidad inhibitoria de la cistatina recombinante de amaranto y reforzar su papel como un elemento potencialmente útil, se probó su efecto contra proteinasas intestinales de insectos plaga del frijol. Los resultados arrojados para la concentración de 30 μ M muestran una inhibición del 100% para las bandas “b” y “c”, y una inhibición menor para la banda “a” con una inhibición del 62%; para la banda “d” se logró una inhibición del 65% y un 94% de inhibición para la banda “e” (Figura 9) Este experimento muestra que todas las proteinasas presentes son susceptibles a la actividad inhibitoria por parte de la cistatina, pero que el efecto inhibitorio puede variar, ya que existe un efecto inhibitorio en porcentajes arriba del 80% para tres bandas y arriba del 60% para las otras dos (Figura 10).

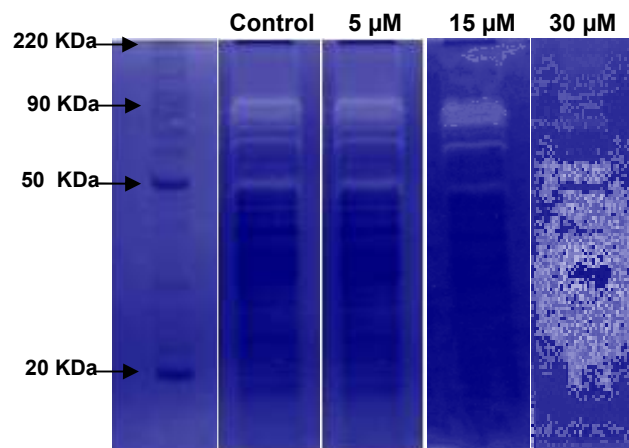


Figura 9. Perfil de actividad proteolítica presente en *A. obtectus* y el efecto de la cistatina recombinante. Como control se utilizó el extracto intestinal de *A. obtectus*. Los siguientes carriles muestran el efecto inhibitorio creciente de la cistatina recombinante.

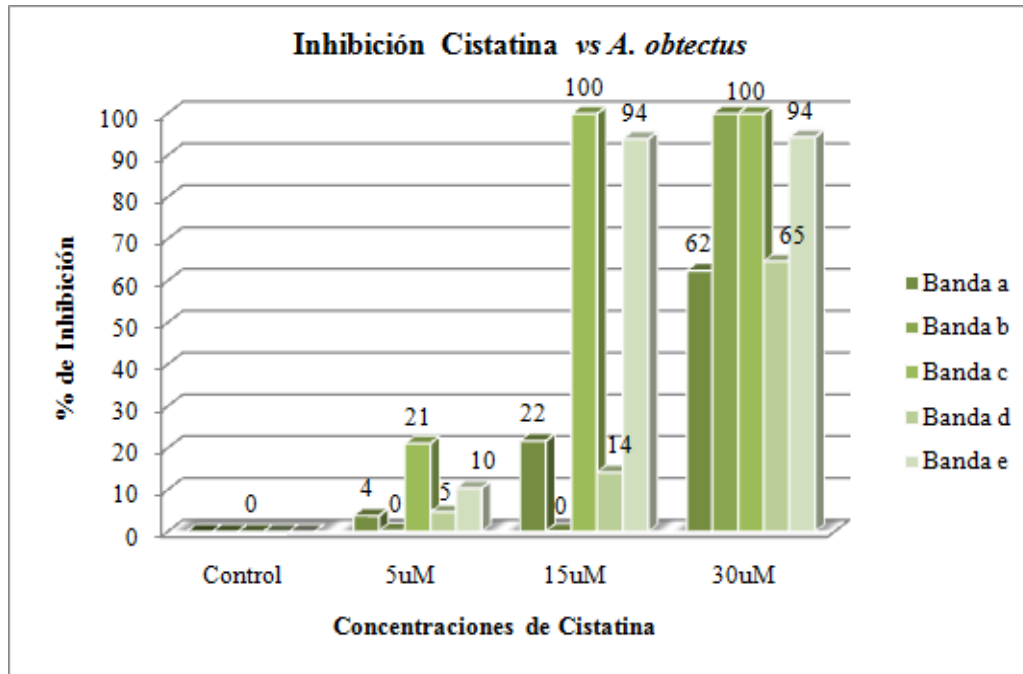


Figura 10. Porcentajes de inhibición con la cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica en intestinos de *A. obtectus* obtenidos con el programa 1D Image Analysis Software de KodaK.

Efecto de Inhibición con E-64 contra proteinasas digestivas de *Callosobruchus maculatus*.

En el caso de *Callosobruchus maculatus* una vez que se visualizó el patrón de actividad proteolítica se probó el efecto de actividad inhibitoria de E-64. Para verificar si las proteasas encontradas para esta especie pertenecen a cisteín proteinasas y a la vez observar su sensibilidad que muestra ante la inhibición de E-64, se utilizaron concentraciones graduales del inhibidor para observar en la cual la actividad proteolítica perdía efecto.

Los geles obtenidos para *C. maculatus* se muestran en la figura 11. Los ensayos de inhibición con E-64 se analizaron por el programa 1D Image Analysis de Kodak. En este caso la concentración más alta de inhibidor (12 μ M) mostró una inhibición del 100% sobre todas las bandas detectadas para esta especie, al no ser detectadas por

el programa bajo el cual se analizaron. El peso molecular estimado correspondía a las señaladas con las letras a', b', y c'. (Figura 6, panel B).

Para esta especie el efecto inhibitorio a la concentración más baja se presentó en porcentajes altos de inhibición, logrando inhibir totalmente a la banda de menor peso molecular que se representa con la letra c', y presentando una inhibición del 92% para la banda b' y un 63% para la banda a'. Los pesos moleculares se muestran en la figura 5. Se comprobó que las bandas de actividad proteolítica encontradas en *C. maculatus* pertenecen al grupo de cisteín proteinasas. Los porcentajes de inhibición se presentan en la Figura 12.

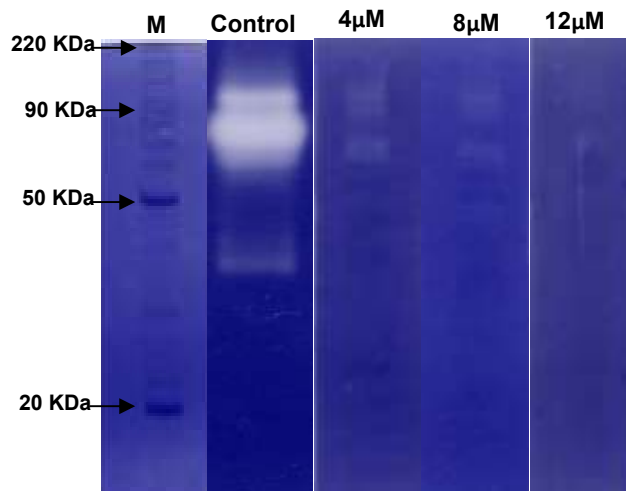


Figura 11. Experimento de inhibición con E-64 contra la actividad de proteasas digestivas de *C. maculatus* en geles de poliacrilamida. Como control se usó el extracto crudo del intestino de *C. maculatus*. La misma cantidad de proteína fue cargada en los otros carriles en presencia de diferentes concentraciones de E64 (4, 8 y 12μM). A la concentración más baja se muestra casi una inhibición de todas las bandas. M. marcador de peso molecular.

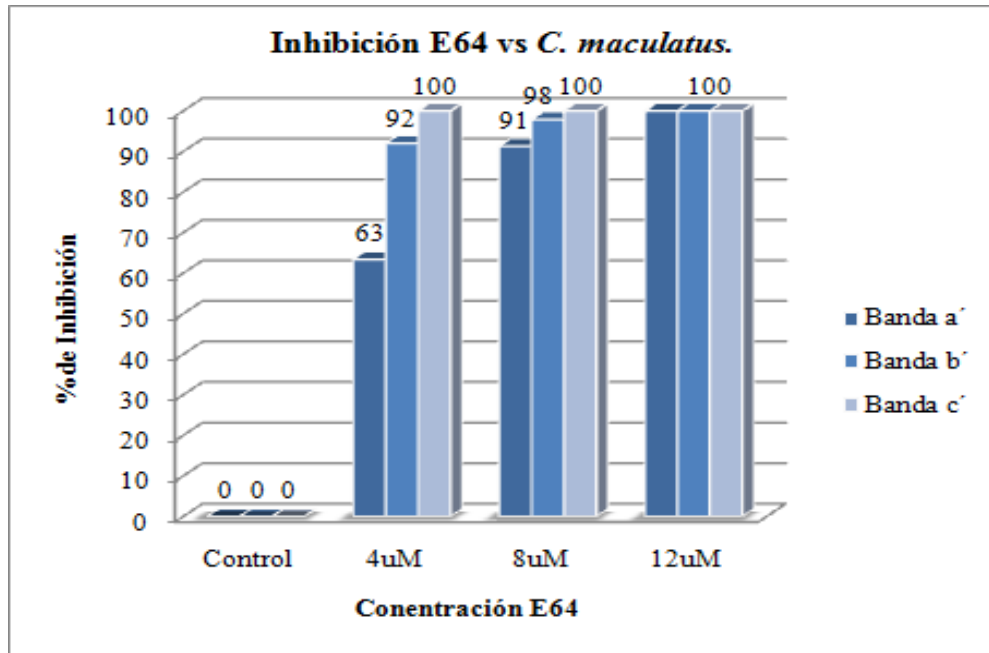


Figura 12. Porcentajes de inhibición con E-64 sobre la actividad proteolítica en intestinos de *A. obtectus* obtenidos con el programa 1D Image Analysis Software de Kodak.

Efecto de inhibición de la Cistatina recombinante de Amarantho contra proteinasas digestivas *C. maculatus*

El efecto de inhibición de la cistatina recombinante arrojó como resultados que para la concentración más alta (15µM) se logra inhibir al 100% a las bandas a' y c', y logrando inhibir solamente el 50% de la banda b.

Para la concentración más baja la inhibición no mostró gran significancia, aunque logró diferenciar las bandas a' y b', observando claramente la relación de la actividad proteolítica con la concentración a la que fue sometida para lograr la inhibición por la cistatina. Como se observa en la figura 13.

El experimento muestra la inhibición de las cisteín proteinasas presentes para *C. maculatus*, ya que las tres bandas presentes muestran una inhibición gradual, al

aumentar la concentración de cistatina recombinante, como se muestra en la figura 14.

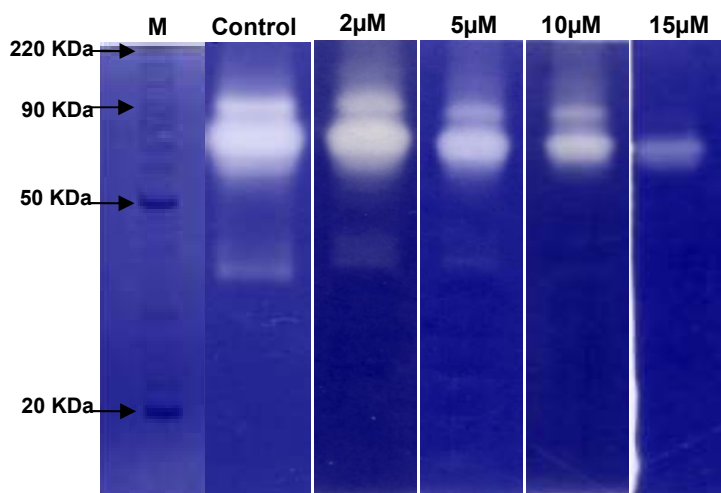


Figura 13. Perfil de actividad proteolítica presente en *C. maculatus* y el efecto de la cistatina recombinante a concentraciones diferentes. Como control se utilizó el extracto intestinal de *C. maculatus*. Los siguientes carriles muestran el efecto inhibitorio creciente de la cistatina recombinante a las diferentes concentraciones. M marcador de peso molecular.

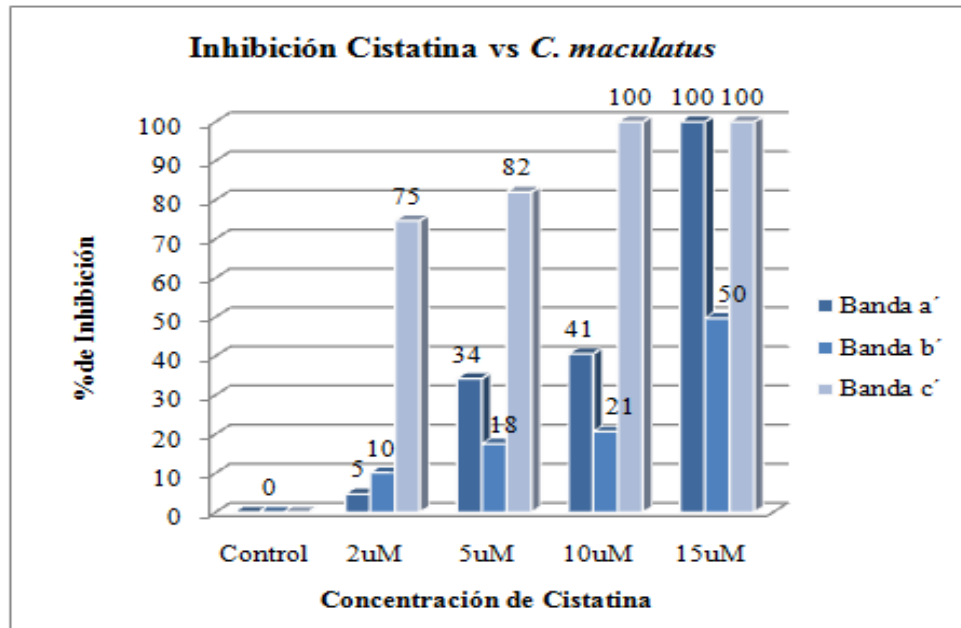


Figura 14. Porcentajes de inhibición de la cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica en intestinos de *C. maculatus* obtenidos con el programa 1D Image Analysis de Kodak.

Efecto de inhibición de E-64 contra proteinasas digestivas de *Zabrotes subfasciatus*.

La actividad proteolítica detectada en geles de poliacrilamida para el caso de *Zabrotes subfasciatus* con 8µg de proteína total, presenta alta sensibilidad incluso desde la concentración más baja (0.2µM), la cual logró inhibir al 100% la banda de menor peso molecular b'' e inhibió un 50 % de la banda de mayor peso molecular a'' que se muestran en la figura 15 y 16.

Aunque a diferencia a las otras especies en estudio mencionadas anteriormente, conforme se aumenta la concentración ya no se ve una inhibición de la banda de mayor peso a'' que represente un valor significativo ya que a la concentración más alta (30µM) solo se logra inhibir un 88% y cabe mencionar que la concentración es aumentada considerablemente a diferencia de la concentración más baja (0.2µM).

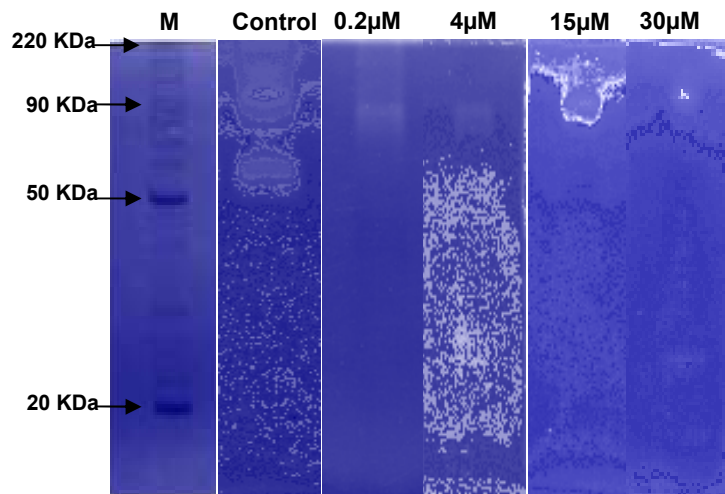


Figura 15. Experimento de inhibición con E-64 contra la actividad de proteasas digestivas de *Z. subfasciatus* en geles de poliacrilamida. Como control se usó el extracto crudo del intestino de *Z. subfasciatus*. La misma cantidad de proteína fue cargada en los otros carriles en presencia de diferentes concentraciones de E64 (0.2, 4, 15 y 30µM. M marcador de peso molecular.

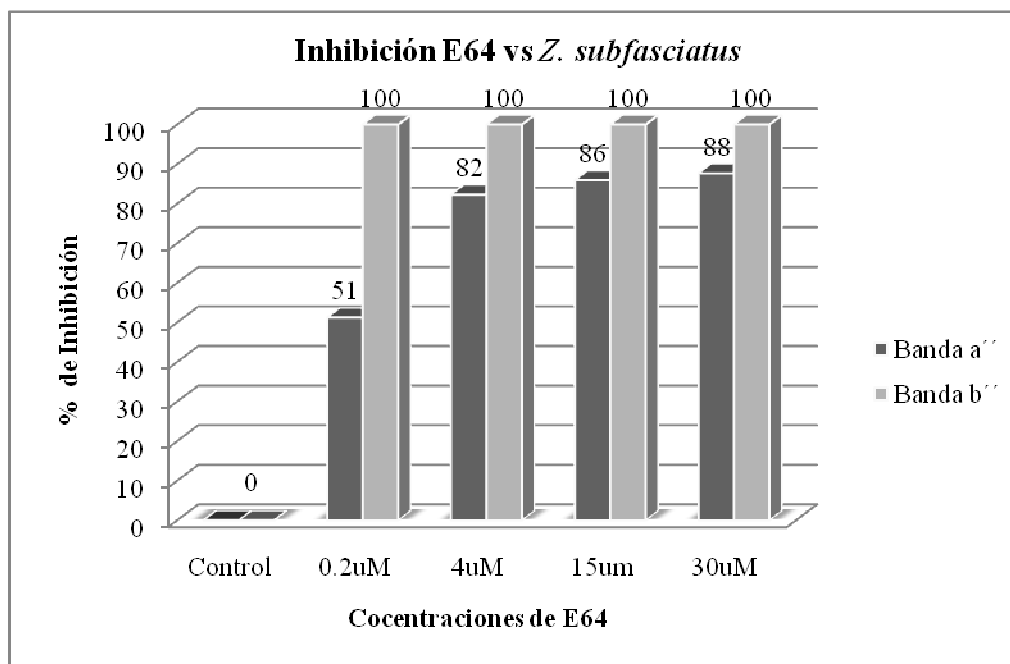


Figura 16. Porcentajes de inhibición E-64 contra la actividad proteolítica en intestinos de *Z. subfasciatus* obtenidos con el programa 1D Image Analysis de Kodak.

Efecto de Inhibición de la cistatina contra enzimas digestivas de *Zabrotes subfasciatus*

El efecto de la cistatina recombinante para *Zabrotes subfasciatus* logró inhibir hasta un 90% para la banda de mayor peso molecular a'' y un 51% para la banda de menor peso b'' con la concentración más alta (30μM). Para la concentración más baja (10μM) la inhibición no es un valor significativo ya que logra inhibir un 36% para la banda a'' y un 3% para b''.

Al ser sometidas las enzimas digestivas de *Z. subfasciatus* con la cistatina recombinante se inhibió principalmente la banda de menor peso molecular b'' y se puede observar que a diferencia del inhibidor E-64 sucede lo contrario ya que este inhibe a la banda de manera significativa a la de mayor peso molecular a'' como se muestra en la figura 17 y 18.

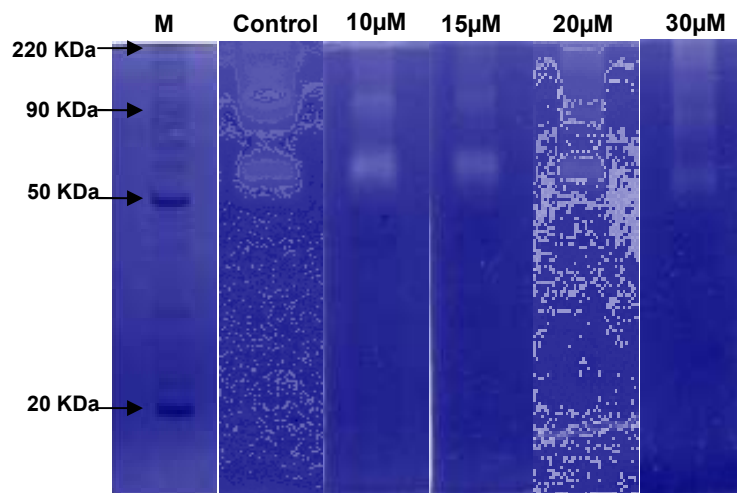


Figura 17. Perfil de actividad proteolítica presente en *Z. subfasciatus* y el efecto de la cistatina recombinante a concentraciones diferentes. Como control se utilizó el extracto intestinal de *Z. subfasciatus*. Los siguientes carriles muestran el efecto inhibitorio creciente de la cistatina recombinante a las diferentes concentraciones. M marcador de peso molecular.

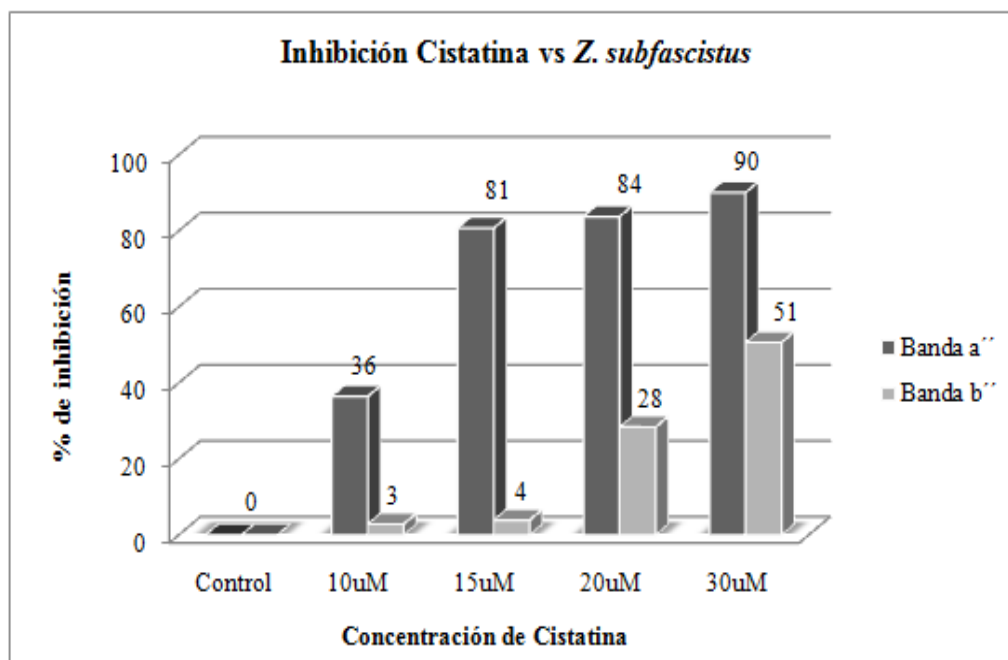


Figura 18. Porcentajes de inhibición de la cistatina recombinante sobre la actividad proteolítica en intestinos de *Z. subfasciatus* obtenidos con el programa 1D Image Analysis de Kodak.

8. Discusión

La tecnología del DNA recombinante y la utilización de vectores de expresión permite la manipulación y obtención de grandes cantidades de una misma proteína lo cual facilita el estudio de las características bioquímicas y propiedades biológicas de la misma. En este trabajo se partió de una cistatina recombinante clonada en un vector de expresión inducible en células de *Escherichia coli*.

Existen reportes previos acerca de la producción de cistatinas recombinantes mediante la sobreexpresión de sus secuencias en cultivos bacterianos acoplados a procesos de purificación mediante diferentes técnicas, entre la cuales destacan el uso de cromatografía de afinidad la cual permite obtener proteínas recombinantes prácticamente purificadas y con rendimientos elevados comparando con los métodos tradicionales.

En el caso de la cistatina recombinante de amaranto se logro obtener un rendimiento de 24.6mg/L, lo cual es comparable con lo obtenido con la canecistatina, la primer

cistatina descrita en caña de azúcar, clonada en *E. coli* usando el vector de expresión pET28, que permitió obtener rendimientos de hasta 20mg/L de proteína recombinante (Gianotti, *et al.*, 2006).

Otro rendimiento similar se reporto para la cistatina recombinante de mijo, en la cuales se obtuvieron rendimientos de 20mg/l, aunque la purificación fue a través de cromatografía de filtración en gel y HPLC (Kouzuma *et al.*, 2000). Sin embargo, existen reportes contrastantes como en le caso de la cistatina del tallo de la piña, la cual fue clonada en vectores de expresión pET29 a y pET28, en la cual los rendimientos fueron de 3.7 mg/L y de 63.7 mg/L de cultivo, respectivamente. (Shyu *et al.*, 2004).

Se logró purificar la cistatina de amaranto a homogeneidad como lo demostró el perfil electroforético obtenido en geles de dos dimensiones, en el cual se detecto la presencia de una sola proteína, con punto isoeléctrico (pI) de 6.8. Esta caracterización ha sido poco reportada en trabajos similares, generalmente utilizan geles de poliacrilamida -SDS para corroborar su pureza. El punto isoeléctrico de la cistatina de amaranto es más o menos similar al reportado para la cistatina de *Castanea sativa*. Pernas *et al.*, 1998. Sin embargo difiere considerablemente del reportado para *Elianthus annus* de 9.6. Kouzuma *et al.*, 1996; siendo esta muy similar estructuralmente con la cistatina de amaranto. Esto sugiere diferentes características funcionales entre ambas proteínas.

La purificación de la cistatina en grandes cantidades permitió evaluar su efecto sobre la actividad de enzimas digestivas de insectos. Las enzimas proteolíticas de los insectos utilizados en este trabajo se han caracterizado ampliamente, siendo principalmente del tipo de cisteín proteinasas (Gatehouse *et al.*, 1985; Lemos *et al.*, 1990; Wieman y Nielsen 1988). En este trabajo corroboramos la identidad de las proteinasas digestivas de los insectos utilizados, mediante la inhibición producida por el inhibidor E-64, específico de cisteín proteinasas.

Finalmente pudimos demostrar que la cistatina recombinante de amaranto fue capaz de inhibir las diferentes cisteín proteinasas detectadas para cada una de las especies de insectos. La efectividad en la inhibición producida por la cistatina recombinante de amaranto fue diferente para cada una de las especies. Los resultados sugieren que la cistatina inhibe preferencialmente cisteín proteinasas (banda c') de *C. maculatus*, siguiendo las de *A. obtectus* y finalmente las *Z. subfasciatus*. Sin embargo son datos que se requieren corroboran con cinéticas enzimáticas en presencia de diferentes concentraciones de la cistatina para determinar con precisión la afinidad existente entre cada proteinasa y la cistatina.

9. Conclusión

Durante el desarrollo del presente trabajo se logro establecer la metodología de purificación de la cistatina de amaranto.

La metodología de purificación implementada permitió purificar a homogeneidad y con altos rendimientos la cistatina recombinante de amaranto.

Se establecieron las condiciones para la detección de las cisteín proteinasas presentes en los tractos digestivos de *A. obtectus*, *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*.

Se demostró que la cistatina recombinante es capaz de inhibir cisteín proteinasas de estas especies.

Esto plantea la posibilidad de utilizar esta información a futuro para diseñar experimentos que permitan corroborar el efecto de la cistatina sobre el crecimiento y desarrollo de estos insectos.

10. REFERENCIAS

- Barret A. J. McDonald J. K. 1986.** Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J.*, 237:935.
- Barret A. J. Rawilings N. D. Woessner J. F. 1998.** Handbok of porteolytic enzymes. London: Academic Press.
- Beer, E. P., B. J. Woffenden, and C. Zho. 2000.** Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* **44**:399-415.
- Belenghi B, Acconcia F, Trovato M et al. 2003.** AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *European Journal of Biochemistry*, 270: 2593-2604.
- Benchekroun, A., Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Overney, S., Desjardins, Y., and Yelle, S. 1995.** Siynthesis of active oryzacistatin I in transgenic potatoplants. *Plants cell Rep.*, 14:585-588.
- Birk Yehudith. 2003.** Plant Protease Inhibitors. Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering. Springer. Berlyn Germany.
- Broadway, R. M. and Duffer, S. S. 1986.** Plant proteinase inhibitor: Mechanics of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua* *J. insect Physiol.*, 32:827-833.

- Chrispeels, M.J., Raikhel, N.V. 1991.** Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* 3:1-9.
- Connors, B.J., N.P. Laun, C.A. Maynard, and W.A. Powell. 2002.** Molecular characterization of a gene encoding a cystatin expressed in the stems of American chestnut (*Castanea dentata*). *Planta* **215**: 510-514.
- Cygler, M. and Morb, J. S. (1997).** Proregion structure of members of the papain superfamily, mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochem.*, 79:687-698.
- Delledonne, M., Allegro, G., Belenghi, B., balastrazzi, A., Picco, F., Levine, A., Velasco, S., Calligari, P. and Confalonieri, M. 2001.** Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding*, 7:35-42.
- Espitia, R. E. 1992.** Amaranth germplasm development and agronomic studies in México. *Food Rev. Int*; 8:71.
- Espitia-Rangel, E. 1986.** Plagas y enfermedades del amaranto en México, In Primer Congreso Nacional de Amaranto, 233.
- Espitia-Rangel, E. 1989.** Guía para cultivar el amaranto en los Valles altos de La Mesa Central, Folleto para productores 18 INIFAP-SARH, Chapingo México, 12.
- Espitia-Rangel, E. 1991.** Recursos genéticos de Amaranto (*Amaranthus* sp.), in Avances en el estudio de recursos filogenéticos de México, Ortega, P. R., H. G. Palomino, G. F. Castillo, H. V. González and M. M. Livera, Eds., SOMEFI, Chapingo, México, 197.
- Fritz, H. 2000.** Foreword. In K. von der Helm, B.D. Korant, and J.C. Cheronis (eds.), Proteases as Targets for Therapy. Berlin: Springer-Verlag, pp. V-VI.
- Gatehouse, A.M.R., Boulter D. & Hilder, V.A. 1992.** Biotechnology in Agriculture, N° 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection CAB International, 155-181.
- Gatehouse, A.M.R., Helder, V.A., Boulter, D. 1992.** Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. *Biothechnology in Agriculture n° 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*, CAB International. 155-181.
- Gholizadeh A, Santa I. M., Kohnchrouz B. B., et al. 2005.** Cystatin may confer viral resistance in plants by inhibition of a virus-induced cell death phenomenon in which cysteine proteases are active: cloning and molecular characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor (celostatin) from *Celosia cristata* (crested cock's comb). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42: 197-204.
- Gianotti, A. Rios, W. M., Soares, C. A., Nogaroto V, Carmona, A. K., Oliva M. L.V., Andrade, S. S. and Silva, F. H., 2006.** Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). Protein expression and purification., Volume 47, Issue 2, June 2006, Pages 483-489
- Haq, S.K. and R.H. Khan. 2003.** Characterization of a proteinase inhibitor from *Cajanus cajan* (L.) J. Protein. Chem. **22**: 543-554.
- Hartley, B. S. 1960.** Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 29:45-72.
- Herford, G. M. 1935:** A key to the members of the family of economic importance in Europe. *Trans. Soc. Brit. Ent.*, t. II, págs. 1-32.

- Hilder, V. A., Gatehouse, A. M: R., Sherman , S: E., Barker , R, F., and Boulter, D. 1987.** A novel mechanics of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* , 300:321-334.
- Iturbide, G. A. y M Gispert 1992.** Amarantos de granos (*Amaranthus* sp.) En: J. E. Hernández-Bermejo J. León (Eds), *Cultivos marginados, otra perspectiva de 1942.* FAO, Roma.
- Kauffman C. S., Weber. L. E. 1990.** Grain Amaranth seeding dates in the Northern Great Plains. *Agronomy Journal* 90 (3): 339-344.
- Kauffman, C. S. 1992.** Realizing the potential of grain amaranth. *Food Rev. Int.*, 8:5.
- Kenny, A. J. 1999.** Introduction: Nomenclature and classes of peptidases. In E.E. Sterchi and W. Stocker (eds.), *Proteolytic Enzymes. Tools and targets* Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-8.
- Khuton, S. Muhammad, S., and Hasan , R: 2004.** Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pest and pathogens: natural and engineered phytoprotection . *Arch. Biochem Biophys.*, 431:145-159.
- Kouzuma, Y.; Kawano, K.; Kimura, M.; Yamasaki, N.; Kadowaki, T. and Yamamoto, K. (1996),** Purification, characterization, and sequencing of two cysteine proteinase L. inhibitors, Sca and Scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *J. Biochem.*, 6, 1106-1113.
- Kuroda, M., T. Kiyosaki, I. Matsumoto, T. Misaka, S. Arai, and K. Abe. 2001.** Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 22-28.
- Laemmli, U. K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, Lond.* 227:680-685.
- Larson, A. O. 1927:** The host-selection as applied to *Bruchus quadrimaculatus* F. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, t. XX, págs. 37-53.
- LasKowski, M., Jr. and Qasim, M. A. 2000.** What can structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about structures of enzyme substrate complex *Biochim. Biophys. Acta*, 1477:324-337.
- Lemos, F. J. A.; Campos, F. A. P.; Silva, C. P. and Xavier-Filho, J. 1990,** Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.*, 56, 219-227.
- Leocardonnel, A., Chauvin, L., Jouanin, L. Beaujean, A., Prevost, G., and Sangwan-Norreel, B1999.** Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.*, 140:87-98.
- Lespesme, P. 1945:** Les coléptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés. *Ed. P. L'échevalier*, Paris; 335 págs.
- Lim CO, Lee SI, Chung WS et al. 1996.** Characterization of a cDNA encoding a cysteineproteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. *Plant Molecular Biology*, 30: 373-379.
- Mares, M., B. Meloun, M. Pavlik, V. Kostka, and M. Baudys, 1989.** Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* 251: 94-98.
- Martinez M, Abraham Z, Gambardella M et al. 2005.** The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1821-1829.

- Morán A. y Segovia L. 2001.** Instituto de Biotecnología UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Av. Universidad .
- Nagata K, Kudo N, Abe K et al. 2000.** Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of rice , *Oryza sativa* L. japonica. *papaya* cystatin produced in *Escherichia coli* . Gene, 162: 221-224.
- Oliveira A.S., J. Xavier-Filho. 2003.** Cysteine proteinases and cistatins. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 46 No. 1 pp. 91-104.
- Oliveira, S. A., Xavier-Filho J. and Sales, P. M. 2003.** Cystein proteinasas and cystatins, Brazilian Archives of Biology and Technology. *Aninternational Journal.*, 46:91-104.
- Outchkourv N. S. W. J. Kogel, A. Schuurma-de Bruin, M. Abrahamson and M. A. Jongsma. 2004.** Specific cysteine protease inhibitors act as deterrents of western flower thrips, *Frankliniella occidentales* (Pergande), in transgenic potato. Plant Biotechnology Journal. Vol. 2, pp. 439-448.
- Pernas M, E. López-Solanilla, R. Sánchez-Monge, G. Salcedo and P. Rodríguez-Palenzuela. 1999.** Antifungal activity of plant cystatin. Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol. 12, No. 7, pp. 624-627.
- Pernas, M.; Sanchez-Monge, R.; Gomez, L. and Salcedo, G. 1998,** A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. *Plant Mol. Biol.*, **38** : (6), 1235-1242.
- Rassam M, Laing W. A. 2004.** Purification and characterization of phytocystatins from kiwi cortex and seeds. Phytochemistry, 65: 19-30.
- Rawlings, N.D. and A.J. Barrett. 1993.** Evolutionary families of peptidases. Biochem. J. **290**: 205-218.
- Romero- Nápoles, J. 2002.** Los Bruchidae de México (Insecta: Coleoptera). In: Llorente, J.B. y J.J Morrone (Eds.). 2002. *Biodiversidad, Taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento*. Vol. III. Fac. Ciencias, UNAM. 710 pp.
- Romero-Nápoles, J. & C.D. Johnson. 2000.** Revision of the genus *Zabrotes* Horn of Mexico (Coleoptera: Bruchidae: Amblycerinae). *Trans. Amer. Ent. Soc.* 126(2): 221-274
- Ryan, C. A. 1990.** Proteinase inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 425-449.
- Schaller, A. (2004).** A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220: 183-197.
- Schoonhoven, A; Cardona C; García J.E 1988.** Principales Insectos que Atacan el Grano de frijol Almacenado y su control. Centro internacional De Agricultura Tropical CIAT. Cali, CO. 46 p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación 2007.** www.siap.sagarpa-gob.mx/AnxInfo/.
- Serrano C. L. M., 2004.** La situación del cultivo del frijol en México. Producción e investigación. Programa de frijol del INIFAP; Apdo. postal No. 10. Chapingo Edo de México.
- Serrano, M.; Schoonhoven, A., Valor, J.; Cardona C. 1983.** Fuentes de resistencia en materiales silvestres de frijol al ataque del gorgojo común del frijol

- Acanthoscelides obtectus* (Say). Revista Colombiana de entomología. Vol9 No. 1, 2, 3 y 4 p. 13-18.
- Skiles, J.W., N.C. Gonnella, and A.Y. Jeng. 2004.** The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **11**:2911-2977.
- Solomon M, Belenghi B, Delledonne M et al. 1999.** The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell*, **11**: 431-443.
- Song I, Taylor M, Baker K et al. 1995.** Inhibition of cysteine proteinases by *Carica*
- Summers, C. B., Felton, G. F. 1994.** Prooxidant effects of phenolic acid on the generalist herbivore *Helicoverpa zea*: potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **24**:943-953.
- Toyooa, K. Okamoto, T., Minamikawa, T. 2000.** Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J. Cell. Biol.*, **148**:453-463.
- Turk, V. 1999.** Proteases: New Perspectives. Basel: Birkhauser Verlag.
- Valdés-Rodríguez S., A. Guerrero-Rangel, C. Melgoza-Villagómez, A. Chagolla López, F. Delgado-Vargas, N. Martínez-Gallardo, C. Sánchez-Hernández, J. Délano-Frier. 2007.** Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry.* Vol 45, pp 790-748.
- Vivanco M. J., Cosio E., Loyola-V. V. M. y Flores H. E. 2005.** Mecanismos químicos de defensa de las plantas. *Investigación y Ciencia*, febrero, 2005. pp. 68-75
- Waldrom C, Weigrich LM, Merlo PAO et al., 1993.** Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight domain cysteine proteinase inhibitor. *Plant Molecular Biology*, **23**: 801-812.
- Webber L. E. (1990).** La producción comercial de amaranto en los Estados Unidos. *In: el amaranto Amaranthus spp, su cultivo y aprovechamiento.* Comp: A. Trinidad S, F. Gómez L, G. Suárez R. Colegio de Posgraduados. pp:274-279.
- Wieman, K. F. and Nielsen, S. S. 1988,** Isolation and partial characterization of a major gut proteinases from larval *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae). *Comp Biochem Physiol.*, **89B** : (2), 419-426.
- Wolson, J. L., Murdock, L. L. 1995.** Potential use of protease inhibitors for host plant resistance: A test case. *Envirom. Entomol.* **24**: 52-57.
- Yoza, K., S. Nakamura, M. Yaguchi, K. Haraguchi, and K. Ohtsubo. (2002).** Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor, cystatin, from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. Mayuen Stapf). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2287-2291.
- Yus Ramos. R. 1976.** Las especies de Brúquidos (gorgojos de las leguminosas) de interés agrícola y fitosanitario (Col. *Bruchidae*)» *Bol. Serv. Plagas*, **2**:1-35

- Zacher, F. 1930:** Untersuchungen zur Morphologie und Biologie der Samenkafer (Bruchidae-Lariidae). Arb. Biol. Reischs. Land. Forstw., t. XVIII, págs. 223-230.
- Zhao, Y., Botella, M. A., Subramanian, L., Niu, X., Nielson, S. S., Bressan, R. A. and Hasegawa, P. M. 1996.** Two wound inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. Plant Physol.,m 111:1299-1306.

11. Apéndice

MEDIO SUPER BROTH pH 7.5	
Bacto-triptona	3.2gr
Extracto de levadura	2gr
NaCl	0.5gr
Para 100ml	
<i>Se disuelve con agua desionizada y se ajusta pH a 7.5</i>	

Antibióticos (concentración final)	
Carbenicilna	100µg/µl
Kanamicina	25µg/µl

BUFFER DE ELUSIÓN pH 8

NaH₂PO₄ 50mM	3.45gr
NaCl 300mM	8.77gr
Imidazol 250mM	8.5gr
Para 500ml	
<i>Ajustar a pH 8 NaOH</i>	

BUFFER DE LISIS pH 8

NaH₂PO₄ 50Mm	3.45gr
NaCl 300mM	8.77gr
Imidazol 10mM	0.34gr
Para 500ml	
<i>Ajustar pH 8 NaOH</i>	

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida – SDS Laemmli (1970)

PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA: VOLUMENES PARA 2 GELES EN LA CAMARA Mini Protean III (BIO-RAD)

Geles de Poliacrilamida	Concentrador	Separador
% Acrilamida (Bio-Rad)	4%	12%
Acrilamida/Bis. 29.2%T / 0.8%C	655µl	4800µl
Buffer del Concentrador	1250µl	-
Buffer del Separador	-	3000µl
SDS 10%	50µl	120µl
Agua desionizada	3000µl	4000µl
APS (Persulfato de Amonio) 10%	45µl	70µl
TEMED (N,N,N,N'-tetrametildiamina)	1.25µl	5µl

%T: Porcentaje de acrilamida + bisacrilamida

%C: Porcentaje de bisacrilamida respecto a T ("cross-linking")

Acrilamida/Bis: 29.2% /0.8% C: 30 g de acrilamida (Bio-Rad) y 0,8 g de bisacrilamida (Bio-Rad) en 100 ml de agua destilada, filtrar y guardar a 4°C preservada de la luz.

Para la electroforesis bidimensional se uso un gel típico SDS-PAGE, pero a diferencia de este sin gel concentrador ni pozos.

**ELECTROFORESIS PARA PROTEINAS DE VAJO PESO MOLECULAR (SHAGER Y VON JAGOW.
(1997)). Analbiochen. 166., 368-379**

PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA: VOLUMENES PARA 2 GELES EN CAMARA Mini Protean III (BIO-RAD)

Geles de poliacrilamida	Concentrador	Separador
% de Acrilamida(Bio-Rad)	4%	12%
Acrilamida-Bis-acrilamida	400 µl	4160µl
Buffer del gel, 8.45	750 µl	3330 µl
Glicerol (gr/ml)	-----	1330 µl
Agua estéril	1850 µl	1330 µl
APS 10%	25 µl	45 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Siempre la se agrega gelatina B en agua estéril a una concentración de 0.01%		

BUFFER DE CORRIDA pH 8.35 (sin ajustar pH)

TRIS 25Mm	3.03gr
Glicina 192Mm	14.4gr
SDS 0.1%	1gr
Para 1000ml	

BUFFER DEL GEL pH 8.45

TRIS 3M 72.6gr

SDS 0.3% 0.6gr

Para 200ml

BUFFER DE CORRIDA pH 8.25 (cátodo)

TRIS 0.1M 12.1gr

Tricina 0.1M 17.92

SDS 0.1% **1gr**
Para 1000 ml

Intensidad de la Banda (pixel)					Porcentaje de Inhibición						
	a	b	c	d	e		a	b	c	d	e
Control	45	30	15	13	25	Control	0	0	0	0	0
10uM	29	7	2	0	0	10uM	37	76	86	100	100
15uM	20	2	0	0	0	15uM	55	92	100	100	100
20uM	19	0	0	0	0	20uM	59	100	100	100	100

BUFFER DE CORRIDA (Ánodo) pH 8.9

TRIS 0.2 M **24.2 gr**
Para 1000 ml

BUFFER DE LA MUESTRA **2X**

SDS 4% **0.8 gr**

GLECEROL 12% **2.4 gr**

TRIS 50Mm pH 6.8 **2ml**

Azul de Coomassie 0.1% **0.002gr**

Volumen final de 10ml se afora con agua desionizada estéril.

Cuadro 3. Inhibición E-64 vs *A. obtectus*, intensidad de la banda y porcentaje de inhibición analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.

Cuadro 4. Inhibición de Cistatina vs *A. obtectus*, intensidad de la banda y porcentaje de inhibición analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.

Intensidad de la Banda (pixel)					Porcentaje de Inhibición						
	a	b	c	D	e		a	b	c	d	e
Control	45	30	15	13	25	Control	0	0	0	0	0
5uM	44	30	12	13	23	5uM	4	0	21	5	10
	a'	b'	c'				a'	b'	c'		
Control	95	153	42			Control	0	0	0		
2uM	91	138	11			2uM	5	100	100	75	
5uM	63	126	8			5uM	34	18	82		
10uM	57	121	0			10uM	41	21	100		
15uM	0	77	0			15uM	100	50	100		

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición de E-64 vs *C. maculatus* analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición de Cistatina vs *C. maculatus* analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición de E-64 vs *Z. subfasciatus* analizado por el

Intensidad de la Banda (pixel)			Porcentaje de inhibición				
	a'	b'	c'		a'	b'	c'
Control	42	153	95	Control	0	0	0
4uM	15	12	0	4uM	63	92	100
8uM	4	3	0	8uM	91	98	100
12uM	0	0	0	12uM	100	100	100

programa 1D Image Analysis Kodak.

Intensidad de la banda (pixel)			Porcentaje de Inhibición		
	a''	b''		a''	b''
Control	20	22	Control	0	0
10uM	13	21	10uM	36	3
15uM	4	21	15uM	81	4
20uM	3	16	20uM	84	28
30uM	2	11	30uM	90	51

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de Cistatina vs *Z. subfasciatus* analizado por el programa 1D Image Analysis Kodak.

Intensidad de la banda			Porcentaje de inhibición		
	a''	b''		a''	b''
Control	20	22	Control	0	0
0.2uM	10	0	0.2uM	51	100
4uM	4	0	4uM	82	100
15um	3	0	15um	86	100
30uM	2	0	30uM	88	100

Símbolos y Abreviaturas

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
2D	Dos dimensiones (IEF- SDS PAGE)
BI	Buffer de incubación
BL	Buffer de lavado
Cb	Antibiótico Carbenicilina
Cb	Carbenicilina
cDNA	ADN complementario

cm	Centímetros
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
gr	Gramos
h	Horas
KDa	Kilo Dalton
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
LB	Luria Bertani (medio de cultivo)
M	Molar
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
ph	Potencial de hidrogeno
pl	Punto isoeléctrico
pm	Peso molecular
pQE2	vector de expresión pQE2 (Qiagen)
rpm	Revoluciones por minuto
SB	Super Broth
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
Xg	Fuerza centrifuga relativa

Resumen

En trabajos anteriores se aisló el cDNA de una cistatina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), la secuencia codificante se modificó añadiendo sitios de restricción Nde I y Pst I en el extremo N-terminal y C-terminal respectivamente, para después clonarla en el vector de expresión pQE2, el cual permitió obtener proteína recombinante fusionada en el extremo N-terminal a 6 residuos de Histidina. La cistatina recombinante se expresó en la cepa bacteriana M15 de *Escherichia coli* en medio de cultivo Super Broth. Logrando obtener buenos rendimientos de la proteína recombinante.

En el presente trabajo se purificó Cistatina recombinante utilizando una columna de alta afinidad Ni-NTA (Níquel-Acido-Nitrilo-Tricloro-Acético), corroborando su pureza

en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y en geles bidimensionales. (IEF- SDS-PAGE)

Se probó la cistatina recombinante purificada contra proteinasas extraídas del tracto digestivo de tres insectos que atacan a granos almacenados: *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus*, y *Zabrotes subfasciatus*. Primeramente se determinó la actividad proteolítica presente en los intestinos de estos insectos empleando ensayos enzimáticos en Zimogramas

Se probó el efecto inhibitorio de un inhibidor comercial E64 específico para cisteín proteasas, demostrando que todas las bandas de actividad proteolítica detectada en cada insecto pertenecen al grupo de cisteín proteinasas. Así también se demostró que estas enzimas son inhibidas de manera diferencial por la cistatina recombinante de amaranto.

Los resultados obtenidos evidencian el posible potencial biotecnológico de la cistatina recombinante de aislada de *Amaranthus hypochondriacus* para el control de plagas de insectos que atacan a los granos almacenados. Con lo cual se contribuirá a abatir las pérdidas que ocurren durante el almacenamiento de diferentes granos y semillas.