



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE
PROTEASAS EN SEMILLAS DE PLANTAS SILVESTRES
DE ZONAS SEMIÁRIDAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ORIENTACIÓN EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

BIÓL. LETICIA SANTOS HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

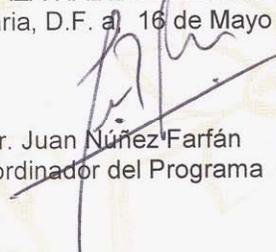
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de Marzo de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **LETICIA SANTOS HERNÁNDEZ** con número de cuenta **90086683** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE PROTEASAS EN SEMILLAS DE PLANTAS SILVESTRES DE ZONAS SEMIÁRIDAS"**, realizada bajo la dirección del **DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS**.

Presidente: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
Vocal: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Suplente: DR. ALEJANDRO BLANCO LABRA
Suplente: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 16 de Mayo de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

*La brisa del mar penetraba en mi mente
como diamantes que abren la rosa de mi alma
así es la radiación inexplicable
que desata los nudos del hilo de mi existencia...*

A mis Padres

Aunque tarde, es un objetivo más alcanzado en mi vida, muchas gracias por el ejemplo de trabajo, eficiencia y responsabilidad que me han inculcado.

A mis Hermanos

La distancia no limita y se valora más aún los aspectos superfluos de la existencia, los amo.

A Esmeralda y Damaris

Pequeñas, por ustedes renacen los más bellos sentimientos y emociones... gracias por existir.

AGRADECIMIENTOS

*A todas esas personas dedicadas a su profesión y que me apoyaron
en el transcurso de este trabajo*

La autora desea agradecer al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM.

Al Macroproyecto; Manejo de ecosistemas y desarrollo humano, por el apoyo en el trabajo de campo.

Agradezco al CONACYT por la beca recibida en los estudios de posgrado.

Dr. Jorge Campos, le agradezco el compartirme sus conocimientos y contribuir a mi formación académica. Por su estimación gracias....

Al Dr. Alejandro Blanco Labra por su inapreciable apoyo y co-asesoría en el desarrollo de la investigación. Gracias Doctor, por hacer de mi estancia en su laboratorio momentos llenos de satisfacción y aprendizaje.

A la Dra. Sofía Solórzano, le agradezco la cordialidad y simpatía. Y por no permitir que dejara en el olvido este trabajo.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, al Dr. José Guillermo Ávila Acevedo, al Dr. Ricardo Mejía Zepeda y Biól. Elizabeth Mendiola por sus valiosos comentarios y sugerencias que enriquecieron esta investigación.

A Angélica, Marychy, Jorge Ariel y José Luis por esos momentos agradables y su amistad en mi estancia. A Carlos y Alejandro de LBM por su apoyo en muchos momentos del trabajo en el laboratorio y en las clases.

ÍNDICE

RESUMEN

I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	5
III. Marco Teórico.	7
Inteligencia de las plantas.	7
Mecanismos de defensa.	7
Elicitores de herbívoros, patógenos y expresión de genes.	8
Funciones de los Inhibidores de Proteasas (IP's).	9
Inhibidores de Proteasas en semillas.	10
Interacción de Proteasas-Inhibidores de proteasas y mecanismos de inhibición.	11
Inhibidores de Serín-proteasas.	12
Inhibidores de Cistatín o Cisteín-proteasas.	14
Inhibidores de Aspártico y Metalo-proteasas.	14
Detección de Inhibidores de Proteasas mediante procedimientos electroforéticos.	14
IV. Objetivo e Hipótesis.	18
V. Metodología.	19
Extracción de proteínas.	19
Prepurificación de IP's utilizando una columna HiTrap Blue.	20
Precipitación con acetona.	21
Determinación de proteínas.	21
Determinación de actividad inhibitoria.	21
Electroforesis en una dimensión.	22
Electroforesis en dos dimensiones.	23
Determinación de actividad inhibitoria en gel (zimograma reverso).	24
Determinación de punto isoeléctrico (<i>pI</i>) y peso molecular relativo (PMr).	24
Búsqueda en base de datos Swiss-Prot.	24
VI. Resultados.	26
Escrutinio de la actividad inhibitoria contra proteasas a partir de semillas de distintas especies silvestres con gradientes diferenciales de infestación.	26
Prepurificación de proteínas utilizando una columna HiTrap Blue.	30
Precipitación con acetona.	30
Análisis por electroforesis en segunda dimensión y zimogramas reversos.	36
Búsqueda de similitudes en la base de datos de proteínas Swiss-Prot.	41
VII. Discusión.	43
VIII. Conclusiones	48
Bibliografía	50

Resumen

Introducción: En la constante búsqueda de proteínas de plantas con actividades inhibitorias de enzimas proteolíticas, como uno de los mecanismo de defensa contra la herbivoría y patogénesis, se han identificado a diversos inhibidores de proteasas (IP's) de semillas, principalmente de interés agrícola. No obstante, cobra interés la caracterización de nuevos IP's de plantas silvestres, debido a su constante exposición al daño por herbivoría. Resulta de gran relevancia cuando se trata de especies silvestres adaptadas a condiciones áridas y semiáridas, considerando que más del 60% de territorio mexicano corresponde a estos ecosistemas. En el presente trabajo se realizó una búsqueda de IP's en ocho especies de plantas, que habitan en la región semiárida del Valle de Tehuacán y que presentaron gradientes diferenciales de infestación: *Acacia farnesiana* y *Parkinsonia praecox* de la familia Fabaceae, *Mimosa luisana* (Mimoseae), *Pachycereus hollianus* (Cactaceae), *Beucarnea gracilis* (Nolinaceae), *Nicotiana glauca* y *Solanum americanum* (Solanaceae), y *Hechtia podanta*. **Métodos:** A partir de harina de semillas se hizo la extracción de proteínas solubles en agua; después de centrifugarse, las proteínas del sobrenadante se precipitaron con acetona para su posterior análisis por PAGE. Una vez corridos, los geles se incubaron con tripsina bovina. A las proteínas que presentaron resistencia a la digestión enzimática (zimograma reverso), se les estimó su peso molecular relativo (*PMr*) y su punto isoeléctrico (*pI*). Posteriormente las proteínas así caracterizadas, se cotejaron con la base de datos Swiss-Prot. **Resultados:** Como se esperaba, las similitudes principales de los IP's identificados de tres especies analizadas fueron con inhibidores de serín-proteasas. Se evidenció en *A. farnesiana* dos IP's con *pI* de 7.6 y 9.1, ambos con un *PMr* de 11.6 kDa, el primer IP's mostró similitud con inhibidores de tripsina de semillas de *Acacia confusa* y *Psophocarpus tetragonolobus*; el segundo IP's tuvo similitud con un inhibidor de semillas de *Leucaena glauca*. Para *B. gracilis* se detectaron dos IP's: 1) *pI* de 5.0 y *PMr* de 11.6 kDa, similar a un inhibidor de subtilisina de *Phaseolus angularis*. 2) *pI* de 9.1 y *PMr* de 13.7 kDa, similar a un inhibidor de tripsina/ α -amilasa de *Triticum*

aestivum. En *N. glauca* se observaron ocho IP's, pudiéndose establecer similitud de tres IP's con PMr de 22.5 kDa: 1) *pI* 5.9, afín a tres inhibidores de las familias Oryzeae, Brassicaceae y Fabaceae . 2) *pI* 6.1, similar a dos inhibidores de serín-proteasas del tubérculo de *Solanum tuberosum*. 3) *pI* 6.7, relacionado con dos inhibidores de aspártico proteasas del tubérculo de *Solanum tuberosum*.

Conclusiones: El desarrollo de una metodología sencilla de identificación de inhibidores de proteasas en PAGE, combinados con las novedosas técnicas de análisis de proteínas, permite analizar una cantidad considerable de este tipo de proteínas de diferentes orígenes y en un tiempo relativamente corto.

Summary

Introduction: In the continuing search for proteins from plants with inhibitory activities of proteolytic enzymes, as one of the defense mechanism against herbivory and pathogenicity, there have been identified several protease inhibitors (PI's) seed, mainly of agricultural interest. However, the interest has been focus on new IP's characterization from wild plants, due to their constant exposure to stress caused by herbivory. It is of great importance when it comes to wild species adapted to arid and semi-arid conditions, considering that over 60% of Mexican territory corresponds to these ecosystems. In the present work, we conducted a survey of IP's in eight plant species that inhabit the semi-arid region of Tehuacan Valley and also presenting differential infestation gradients: *Acacia farnesiana* and *Parkinsonia praecox* of the family Fabaceae, *Mimosa Luisana* (Mimoseae), *Pachycereus hollianus* (Cactaceae), *Beucarnea gracilis* (Nolinaceae), *Nicotiana glauca*, *Solanum americanum* (Solanaceae) and *Hechtia podanta*. **Methods:** From seed flour, water-soluble protein was extracted; after centrifuged, proteins from the supernatant were precipitated with acetone for further PAGE analysis. After running, the gels were incubated with bovine trypsin. Proteins that showed resistance to enzymatic digestion (reverse zymogram), were estimated on their molecular weight (*PMr*) and their isoelectric point (*pl*). Subsequently proteins well characterized, were cross-checked with the database Swiss-Prot. **Results:** As expected, the PI's identified in three analyzed species, their main similarities were with serine proteases inhibitors. Two PI's were identified in *A. farnesiana* with *pl* of 7.6 and 9.1 respectively, both with a *PMr* of 11.6 kDa, the first IP showed similarity with a trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa* and *Psophocarpus tetragonolobus*, the second PI had similarity with an inhibitor from *Leucaena glauca* seeds. In *B. gracilis* were detected two PI's: 1) *pl* of 5.0 and *PMr* of 11.6 kDa, similar to a subtilisin inhibitor of *Phaseolus angularis*. 2) *pl* of 9.1 and *PMr* of 13.7 kDa, similar to a trypsin/ α -amylase inhibitor from *Triticum aestivum*. In *N. glauca* eight PI's were observed, three PI's with *PMR* 22.5 kDa: 1) *pl* 5.9, related to three inhibitors from families Oryzeae, Brassicaceae and Fabaceae. 2) *pl* 6.1, which is similar to two-serine protease inhibitors of potato. 3) *pl* 6.7, similar to two aspartic

protease inhibitors from potato. **Conclusions:** The development of a simple methodology for identification of protease inhibitors in PAGE, combined with the novel protein analysis techniques allows the analysis of a considerable amount of these type of proteins from different sources and in a relatively short time.

Las plantas, como base de la cadena trófica, son una importante fuente de recursos para muchos organismos que interactúan entre sí, con otros seres vivos y con su ambiente físico de diferentes formas. Estas interacciones pueden ser benéficas, neutrales o dañinas, según la dinámica de las mismas poblaciones involucradas y los efectos para las plantas varían con las condiciones ambientales, físicas y biológicas (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002; Shatters *et al.*, 2004).

Dentro de las diversas estrategias de sobrevivencia que poseen las plantas, existen varios mecanismos de defensa en contra del ataque de depredadores y patógenos. Entre estos, se encuentran las barreras físicas, elaboración de metabolitos secundarios y de proteínas, entre otros (Bowles, 1990, citado por Wijaya *et al.*, 2000; Kessler y Baldwin, 2002).

Los insectos fitófagos, por medio del contacto con su saliva, inducen en las plantas la expresión de genes de defensa, mediados por una cascada de señalización, que activa la transcripción y acumulación de genes de proteínas de defensa, entre los que se encuentran los inhibidores de proteasas (IP's) (Doares *et al.*, 1995; Orcutt y Nilsen, 2000; Ryan, 2000; Rakwal *et al.*, 2001; Balestrazzi *et al.*, 2004; Heidel y Baldwin, 2004).

Los IP's son el producto de familias de multigenes y son capaces de inhibir diversas enzimas proteolíticas de insectos al interferir en su digestión (Wijaya *et al.*, 2000; Giri *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004; Aguirre *et al.*, 2004). La mayoría de los IP's son proteínas de bajo peso molecular, son abundantes en hojas y tubérculos, y se encuentran en altas concentraciones en las semillas (Ryan, 1990; Shewry *et al.*, 1999; Konarev *et al.*, 2002a; Nanasheh *et al.*, 2003). Debido a sus reservas nutritivas, las semillas se tornan vulnerables al daño por herbivoría y patógenos, tanto en su ambiente natural como en los denominados bancos de germoplasma, por lo que estos IP's llegan a representar más del 10% de sus proteínas de reserva (Murray, 1984; Rodrigues *et al.*, 2004; Tsybina *et al.*, 2004.)

La mayoría de los IP's son reconocidos como sustratos por su proteasa o proteinasa blanco. Los IP's interactúan con el sitio activo de la enzima debido a la similitud de la secuencia de aminoácidos entre los sitios reactivos de los IP's, con los sustratos naturales de las proteasas. La catálisis hidrolítica de los enlaces peptídicos en una proteína, efectuada por la proteasa, es inhibida por la formación del complejo proteasa-

inhibidor (E-I), al bloquear o alterar el acceso al sitio activo de la enzima (Ryan, 1990; Nikolay, 2003). Los IP's son específicos de la clase de proteasa que inhiben, por lo tanto se han clasificado como inhibidores de serín-proteasas, de cisteín-proteasas, de aspártico-proteasas, de metalo-proteasas y un grupo más reciente de treonin-proteasas. Los complejos E-I son reversibles o irreversibles dependiendo del mecanismo de inhibición de los IP's. La estabilización del complejo está en función de la composición de aminoácidos, de las interacciones hidrofóbicas, del número y posición de puentes disulfuro y puentes de hidrógeno que se establecen entre la unión del sitio reactivo del IP's con la proteasa blanco (Blanco-Labra *et al.*, 1995; Tiffin y Gaut, 2001; Lawrence y Koundal, 2002; Kowalska *et al.*, 2006).

De sumo interés, en este trabajo fue la búsqueda de nuevos IP's activos, principalmente de IP's en semillas de plantas silvestres adaptadas a condiciones áridas y semiáridas, pues más del 60% de territorio mexicano corresponde a estos ecosistemas.

Estos ecosistemas son idóneos en el escrutinio de mecanismos de defensa, porque las plantas, además de desarrollar diferentes estrategias de supervivencia en estos ambientes, divergen en la producción de IP's potenciales al estar persistentemente expuestas a daños mecánicos por herbivoría y a otros factores ambientales de estrés.

El propósito de este trabajo fue establecer una metodología ágil, novedosa y de alta resolución, con la que se pudiera analizar un gran número de especies de plantas y que a su vez permitiera la búsqueda rápida de un amplio espectro de IP's. Esta metodología se estableció a través del empleo de zimogramas reversos en electroforesis de dos dimensiones, los cuales permiten la identificación de IP's en geles de poliacrilamida e implica la localización visual mediante su actividad inhibitoria sobre una proteasa blanco, posterior a su separación electroforética, los péptidos resistentes a la digestión de una proteasa son visualizados como bandas (1D) o puntos (2D), obteniendo su peso molecular relativo y punto isoeléctrico, que posteriormente son comparados con secuencias de péptidos presentes en bases de datos.

La búsqueda de IP's se realizó en semillas de distintas especies de plantas silvestres de amplia distribución y endémicas, que además presentaron diferentes grados de infestación por insectos. Las especies fueron *Acacia farnesiana* y *Parkinsonia praecox* de la familia Fabaceae, *Mimosa luisana* (Mimoseae), *Pachycereus hollianus* (Cactaceae),

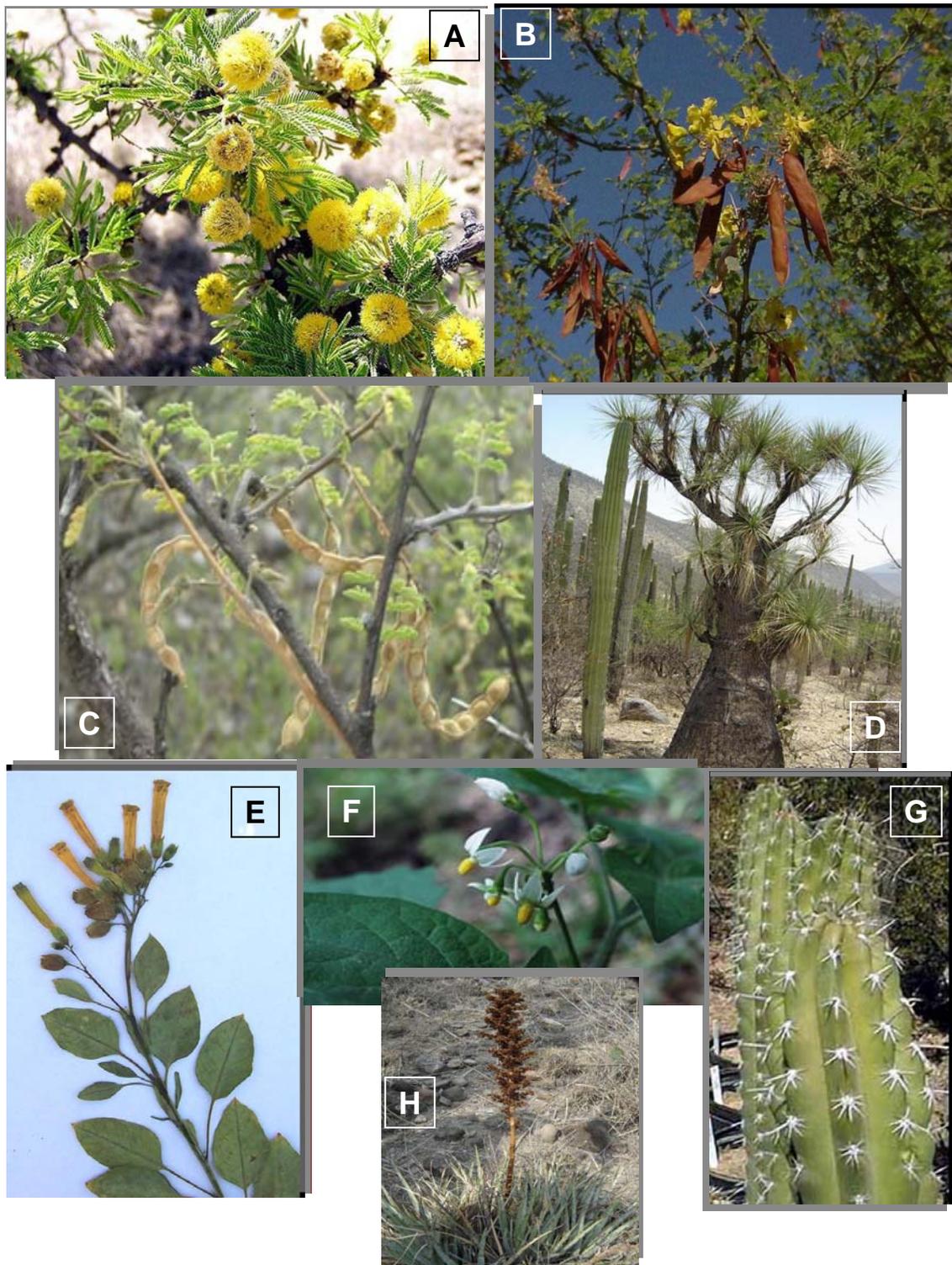


Figura 1. Especies de estudio que habitan en el Valle de Tehuacán, Puebla. A) *Acacia farnesiana* y B) *Parkinsonia praecox* de la familia Fabaceae, C) *Mimosa luisana* (Mimoseae), D) *Beucarnea gracilis* (Nolinaceae), E) *Nicotiana glauca* y F) *Solanum americanum* (Solanaceae), G) *Pachycereus hollianus* (Cactaceae) y H) *Hechtia podanta* (Bromeliaceae).

La función de los inhibidores de proteasas en plantas, como proteínas de defensa, posiblemente fue elucidado desde 1947, cuando Mickel y Standish observaron que las larvas de ciertos insectos eran incapaces de desarrollarse normalmente en presencia de productos de soya. Más tarde, inhibidores de tripsina encontrados en soya, resultaban tóxicos para las larvas del escarabajo de la harina *Tribolium confusum*. Estudios posteriores mostraron muchos ejemplos de IP's activos contra varias especies de insectos, tanto por bioensayos *in vivo* como *in vitro* (Lipke *et al.*, 1954; Pannetier *et al.*, 1997; Koiwa *et al.*, 1998; Urwin *et al.*, 1997; Vain *et al.*, 1998. Citados por Lawrence y Koundal, 2002) (Schuler *et al.*, 1998; García, *et al.*, 2004; Campos, *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 2005)

La mayoría de los IP's estudiados, en semillas, provienen de familias como Fabaceae, Brassicaceae, Poaceae y Solanaceae, principalmente de especies de interés agrícola y en la industria alimenticia. Aún son pocos los estudios, en semillas, de especies silvestres, entre ellos se encuentra la purificación de un inhibidor de tripsina del árbol xerófilo *Prosopis juliflora* (PjTI) (Sivakumar *et al.*, 2005). La identificación de proteasas en cultivares de *Cajanus cajan* (Leguminosa) y sus parientes silvestres, con fines de aplicación biotecnológica (Nanasaheb *et al.*, 2003). En otra investigación se determinó la distribución y polimorfismo de inhibidores de serín-proteasas, enfatizando en las enzimas tipo tripsina y quimotripsina y de una proteasa de microorganismos patógenos en cultivares y plantas silvestres de tres subfamilias de la Familia Compositae (Konarev *et al.*, 2002a).

Por otro lado, Tiffin y Gaut (2001) evaluaron la divergencia y evolución de un inhibidor de serín-proteasa inducido por lesión, entre maíz, arroz, trigo y sorgo. Konarev *et al.*, (2002b) realizaron un análisis de diversidad intra e inter específica de *Vigna* subgénero *Ceratotropis*, utilizando la expresión de IP's como marcadores moleculares para tratar de explicar las relaciones taxonómicas y presencia de loci resistentes al ataque de insectos. Mello *et al.*, (2003) evaluaron los patrones diferenciales evolutivos de inhibidores de proteinasa tipo Bowman-Birk en angiospermas, tratando de comprender la presión de selección ejercida en los genes de defensa.

Por décadas, diversas herramientas cinéticas, químicas y físicas han sido empleadas para el aislamiento e identificación de proteínas, actualmente numerosas

- Inducibles como la activación de una respuesta hipersensible que conduce en pocas horas a la muerte de las células y tejidos atacados. Las células muertas contienen altas concentraciones de compuestos, por ejemplo, antimicrobianos, lo que evita el ataque de otros organismos oportunistas. También, mediante la síntesis de componentes como precursores que activan enzimas inducidas por el elicitador, ejemplo, la liberación de precursores de ácido jasmónico, etc.
- Bioquímicos tales como la producción de especies reactivas de oxígeno (estallido oxidativo), señalización, síntesis de ácido jasmónico y respuesta sistémica a herida.
- Resistencia sistémica adquirida, entendida como los mecanismos defensivos que se incrementan al segundo contacto con el elicitador, además de que es un sistema de aviso, de la presencia del estrés, en órganos de la planta que no lo hayan detectado.

Necesariamente, para las plantas involucra un costo invertir en la biosíntesis de componentes de un mecanismo de defensa, y más aún cuando dicho mecanismo es inducido. Este costo se refleja en una disminución en el crecimiento, en la producción de semillas, en los renuevos, etc., sin embargo, el beneficio radica en no tener encendidos todos sus elementos de defensa, cuando la planta no está siendo atacada, y en preservar al mayor número de individuos de la población, (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002; Glawe *et al.*, 2003, Nicolay, 2003).

◆ Elicidores de herbívoros, patógenos y expresión de genes de defensa

Cualquier compuesto constituyente de la saliva de los herbívoros o fluidos de patógenos, como proteínas, péptidos, lípidos y/o polisacáridos son elicitores potenciales. A causa del daño producido en los tejidos de hojas o tallos, por insectos, patógenos o daños mecánicos, se origina un incremento local y transitorio de ácido jasmónico (fitohormona), que junto con el compuesto volátil metil jasmonato, inducen la llamada respuesta sistémica de resistencia. Los elicitores propician la liberación de un polipéptido

de 18 aminoácidos, denominado sistemina, que regula la expresión de alrededor de 20 genes de defensa, entre los que se encuentran a los inhibidores de proteasas (IP's). Este péptido es sintetizado a partir de la prosistemina (precursor de 200 aminoácidos). (Ryan, C. A. 2000; Kessler y Baldwin, 2002).

La cascada de señalización intracelular inicia con la interacción de la sistemina y su receptor de membrana plasmática, los eventos que ocurren son la despolarización de la membrana, la apertura de canales iónicos, un incremento en el Ca^{2+} intracelular, la activación de MAP kinasa y de la fosfolipasa A2. La fosfolipasa conduce a la liberación de ácido linolénico de las membranas y su subsecuente conversión a ácido jasmónico, tras un aumento de etileno, se induce la transcripción y acumulación de los péptidos inhibitorios de proteasas. Las respuestas son propagadas, en pocas horas, por toda la planta y requieren de señales eléctricas, hidráulicas o químicas que inducen la expresión de IP's en otras partes de la planta, como en las semillas, tubérculos y en tejidos vegetativos de la planta (Ryan, 2000; Rakwal *et al.*, 2001; Kessler y Baldwin, 2002). Los IP's también son sintetizados constitutivamente en algunos tejidos, durante el desarrollo de la planta (Ryan, 1990).

◆ Funciones de los Inhibidores de proteasas

Durante el ciclo de vida de las plantas, los IP's pueden estar involucrados en funciones regulatorias como:

- 1) el control de la actividad de proteasas endógenas durante la maduración y dormancia de semillas.
- 2) su acción como proteínas de reserva, las cuales son degradadas durante la germinación y crecimiento de la plántula.
- 3) regulador de producción de proteína en la diferenciación de elementos de las traqueidas y control temporal de la diferenciación de elementos cribosos.
- 4) implicación en procesos de degradación de proteínas envejecidas.
- 5) regulación de muerte celular programada.
- 6) regulan la efectividad de hidrolasas en tractos digestivos de animales.
- 7) compuestos de defensa que confieren resistencia contra organismos fitófagos e infestación por virus, bacterias, hongos y nemátodos, debido a la capacidad de

inhibir las enzimas digestivas. En el caso de los virus, los IP's pueden inhibir la (s) proteasas requeridas por estos para su liberación a la célula huésped. En los insectos las larvas decaen en su desarrollo larval y posteriormente pueden llegar a morir, al ser más susceptibles a la efectividad de los IP's que los adultos, debido a la limitación de aminoácidos libres provenientes de las proteínas como fuente de alimento (Ryan, 1990; Kumar *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 1999, citados por Carlini y Grossi-de-Sa', 2002. Richardson, 1991; Brzin y Kidric, 1995; Fukuda, 1997; Dannenhoffer *et al.*, 2001, citados por Balestrazzi *et al.*, 2004; Mosolov *et al.*, 2001).

◆ Los Inhibidores de Proteasas en semillas

Los principales componentes de reserva en las semillas de dicotiledóneas y monocotiledóneas son los carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, aceites y proteínas, los cuales varían en concentración de acuerdo a la especie. Los IP's constituyen más del 20% del total de las proteínas de reserva, los diferentes tipos de proteínas están depositadas en organelos celulares, denominados cuerpos proteicos. Estos cuerpos tienen un diámetro de 0.1 a 2.5 μm y generalmente se encuentran en la capa de la aleurona en las monocotiledóneas y en los cotiledones y/o endospermo de las dicotiledóneas (Bradford, 2004).

Los IP's se acumulan en las semillas, principalmente por su calidad nutricional, para asegurar la propagación y sobrevivencia de las especies. Los IP's bloquean la actividad de proteasas y amilasas de fitófagos y patógenos que se alimentan de semillas, impidiendo la digestión de las proteínas y el almidón, sin embargo, no interfieren con las proteasas propias que liberan los aminoácidos durante la germinación. La actividad defensiva de los IP's depende de la afinidad y especificidad hacia las proteinasas presentes en los intestinos de los herbívoros (Ryan, 1990, 2000; Giri *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2004).

◆ Interacción de Proteasas-Inhibidores de Proteasas y Mecanismos de Inhibición

El término proteasa describe a enzimas (hidrolasas/peptidasas) que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en una proteína. Las proteasas se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas hidrolizan los enlaces del amino o carboxilo terminal de la cadena de péptidos, mientras las endopeptidasas catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de la cadena. La palabra proteinasa es usada como un sinónimo de endopeptidasa (Barrett 1986. Citado por Mikola 2001).

Las proteasas se clasifican de acuerdo a su mecanismo de catálisis y al aminoácido presente en el sitio activo en: 1) Serín-proteinasas, con los aminoácidos serina, 2) Cisteín-proteinasa, con una cisteína; 3) Aspártico-proteinasas con un grupo aspartato y 4) Metaloproteinasas con un ion metálico (Zn^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+}) (Neurath, 1984. Citado por Carlini y Grossi-de-Sá, 2002).

Los IP's son generalmente específicos para cada clase de proteasa. El mecanismo inhibitorio es a través de dominios o multidominios de interacción con las proteasas blanco. La mayoría de los IP's son inhibidores canónicos, ya que actúan como el sustrato de la proteasa, poseen un "loop" o protuberancia externo que actúa como el primer segmento de unión con la proteasa y contienen el sitio reactivo, este sitio reactivo bloquea el sitio activo de la enzima (P_1 - P_1'). Los IP's están estructurados con un solo sitio reactivo o dos sitios reactivos, esta última característica le permite a un solo IP's inhibir a más de un tipo de enzimas (Laskowski y Qasim, 2000; Mosolov *et al.*, 2001; Lawrence y Koundal, 2002; De Leo *et al.*, 2002).

Otros IP's no interactúan directamente con el sitio activo, pero tienen la capacidad de modificar la conformación estérica de la enzima, impidiendo la afinidad por el sustrato. En éste último mecanismo inhibitorio y en los inhibidores canónicos, la formación del complejo enzima-inhibidor es fuerte pero reversible. Existe otro mecanismo de IP's, denominado serpin, que ocasiona cambios estructurales en la proteasa blanco y el complejo se torna irreversible. Otra característica de la mayoría de los IP's, es que son altamente termoestables, es decir que su actividad inhibitoria se mantiene en rangos amplios de temperatura (Laskowski y Qasim, 2000; Mikola, 2001; De Leo *et al.*, 2002; Nikolay 2003).

◆ Inhibidores de Serín-proteasas

La mayoría de los IP's de esta clase o familia son rígidos, estables, conformados por una gran cantidad de β -plegadas o α -hélices, o bien como proteínas irregulares ricas en cisteínas y puentes disulfuro. Bloquean directamente el sitio activo de la proteasa (canónicos) en una interacción no covalente, semejante al del complejo Michaelis-Menten ($E+I \rightleftharpoons C \rightleftharpoons E+I^*$), no existen cambios conformacionales, se forma una estructura de β -plegada entre la enzima y el inhibidor, un residuo de cisteína es el nucleófilo catalítico en el sitio activo de la enzima (Laskowski y Qasim, 2000; Otlewski, *et al.*, 2005).

Los inhibidores de serín-proteasas inhiben a las enzimas tripsina, quimotripsina y elastasa, las cuales son responsables de iniciar la digestión de proteínas en el intestino de animales superiores y en el tracto digestivo de muchas familias de insectos. La identidad de residuos de aminoácidos determina la especificidad de los inhibidores de serín-proteasas: 1) cuando el sitio P_1 (anterior al sitio de hidrólisis) es ocupado por Arg o Lys son específicos de IP's de enzimas tipo tripsina. 2) sitio P_1 ocupado por Trp, Phe, Tyr, Leu o Met pueden ser encontrados en IP's de enzimas tipo quimotripsina y 3) sitio P_1 ocupado por Ala es específico para IP's de enzimas tipo elastasa (Ryan, 1990. Citado por De Leo 2002; Lawrence y Koundal, 2002).

Las dos familias más caracterizadas de IP's de serín-proteasas en plantas, son los inhibidores tipo Bowman-Birk y tipo Kunitz. Estas familias difieren en peso molecular, contenido de cisteínas y el número de sitios reactivos (Richardson, 1991. Citado por Alves *et al.*, 2004).

Los inhibidores tipo Bowman-Birk son polipéptidos pequeños (8-20 kDa), tienen un alto contenido de cisteínas y dos sitios reactivos, que los hace bifuncionales al inhibir simultáneamente e independientemente a las enzimas tripsina/tripsina, tripsina/quimotripsina o tripsina/elastasa (Rakwal *et al.*, 2001; Richardson, 1991; Bode y Huber, 1992. citados por Carlini y Grossi de Sá, 2002; Masanobu *et al.*, 2004).

Mediante estructuras tridimensionales se ha encontrado que los puentes disulfuro de dos residuos conservados de cisteínas mantienen la conformación activa de los sitios reactivos de los inhibidores. Evolutivamente, los sitios reactivos son conocidos por inhibir

tripsina y quimotripsina en plantas monocotiledóneas y tripsina, quimotripsina y elastasa en plantas dicotiledóneas (Mello *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004)

Los IP's tipo Kunitz poseen un peso molecular cercano a 20 kDa, tienen un contenido bajo de cisteínas y un solo sitio reactivo. Son inhibidores constituidos de una cadena polipeptídica con dos cadenas internas unidas por puentes disulfuro. En general estos IP's son pseudosustratos con un aminoácido (Arg o Lys) en la posición P₁ (sitio reactivo) que determina la especificidad por la proteasa blanco tripsina o quimotripsina. Su actividad inhibitoria es mediada por interacciones moleculares hidrofóbicas, puentes disulfuro y puentes de hidrógeno, los cuales están implicados en la estabilización de la estructura primaria del "loop" del sitio reactivo (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Carlini y Grossi de Sá, 2002; Rodrigues *et al.*, 2004; Delgado *et al.*, 2004; Bauw *et al.*, 2006).

Por cristalografía de rayos X, se ha encontrado un IP's tipo Kunitz α -quimotripsina, que muestra 12 cadenas β -plegadas antiparalelas unidas en forma de un β -trébol con dos sitios reactivos (Asn -Leu y Gln -Phe) en el loop externo (Ravichandaran *et al.*, 1999; Mukhopadhyay, 2000. Citado por Lawrence y Koundal, 2002).

◆ Inhibidores de Cistatín o Cisteín-proteasas

Un gran número de IP's de cisteína han sido identificados de una variedad de especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como maíz, arroz, papa, soya y manzana. Los pesos moleculares varían desde 5 hasta 87 kDa y se dividen en dos subfamilias: en la subfamilia I se encuentran las fitocistatinas que poseen un solo dominio y la subfamilia II está representada por fitocistatinas que tienen dominios múltiples, tales como las multicistatinas encontradas en tubérculos de papa, hojas de tomate y semillas de girasol. Algunos de estos IP's muestran homología con IP's de serina. (Walsh and Strickland, 1993; Turk *et al.*, 1997; Arai *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998; Pernas *et al.*, 1998; Wu y Haard, 2000; Kouzuma *et al.*, 2000. Citados por Carlini y Grossi de Sá, 2002).

A partir del aislamiento de proteinasas de los intestinos de larvas del gorgojo *Callosobruchus maculatus* y del brúquido *Zabrotes subfaceatus* se confirmó la presencia de mecanismos de inhibidores de proteasas de la clase cisteína. Se ha elucidado por

análisis de resonancia magnética nuclear la estructura tridimensional del IP's oryzacystatin (OC-I), se sabe que a partir de los aminoácidos Glu 13- Asp 97, la estructura está conformada por una α - hélice con cinco cadenas β -plegadas antiparalelas, mientras que los extremos N-terminal (Ser 2-Val 12) y C-terminal (Ala 98-Ala 102) están poco definidos. (Kitch and Murdock, 1986; Campos *et al.* 1989; Nagata *et al.*, 2000. Citados por Lawrence y Koundal, 2002).

◆ Inhibidores de Aspártico y Metalo-proteasa

En los tubérculos de papa se han encontrado inhibidores de aspártico proteinasas tipo Catepsina D (27 kDa), este IP's tiene una similitud considerable con la secuencia de aminoácidos del inhibidor de tripsina de soya (SBTI)

Los inhibidores de metalo-carboxypeptidasas identificados de tejidos de tomate y papa son polipéptidos de 4 kDa que inhiben fuertemente y de forma competitiva a un amplio espectro de carboxipeptidasas de animales, insectos y microorganismos.

◆ Detección de Inhibidores de Proteasas mediante procedimientos electroforéticos

Como resultado de amplios estudios durante más de 40 años, se han aislado, purificado y caracterizado a diversos inhibidores de proteasas mediante técnicas cinéticas, químicas y físicas. Una de las herramientas de gran resolución para la caracterización de IP's es la electroforesis en primera (1D), segunda dimensión (2D) y el isoelectroenfoque, que se basa en el principio físico de campos eléctricos. Otra herramienta de identificación resolutive de IP's lo constituye el método cinético a través de zimogramas reversos (Lehninger, *et al.*, 2001).

Electroforesis

La técnica de electroforesis consiste en la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico, es decir, son velocidades relativas de movimiento, donde estas partículas migran hacia el cátodo (-) o ánodo (+), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. De esta forma el campo eléctrico permite la separación analítica de biomoléculas como las proteínas. A

escala analítica, la electroforesis es de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad. Con éste método también se pueden conocer las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, determinar parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (García, 2000).

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, (PAGE), es una de las técnicas ampliamente usadas para caracterizar mezclas complejas de proteínas. Es un método viable, rápido y sensitivo a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína, la electroforesis bidimensional es capaz de detectar trazas de proteínas, además los geles PAGE son químicamente inertes, transparentes, estables y reproducibles en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica; y permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado (Görg *et al.*, 2000; Mikola, 2001; Sheen y Ali-Khan, 2005).

Una de las propiedades bioquímicas de las proteínas utilizada en la electroforesis, es que presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa, más rápida será la migración (Lehninger, *et al.*, 2001).

En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado), a lo largo del proceso electroforético, éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes: 1) Una electroforesis desnaturalizante, es la que somete a las proteínas a migración, asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En ésta situación la migración es proporcional al tamaño de la molécula. El agente desnaturalizante más empleado es el beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro. La electroforesis con dodecil sulfato de sodio (SDS) desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria, éste detergente al recubrir a la proteína, bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa y se separan las proteínas como cadenas polipeptídicas aisladas. De esta forma se puede determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína. 2) Una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización.

En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además, se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos (Souza *et al.*, 2000; García, 2000; Görg *et al.*, 2000; Mikola, 2001).

Isoelectroenfoque

La separación de las proteínas, basándose en la carga eléctrica, depende de sus propiedades ácido-básicas, que constituyen un reflejo de los grupos ionizables de la (s) cadena (s) polipeptídicas. Cada proteína posee un pH isoelectrico característico, en el cual deja de desplazarse en el campo eléctrico.

Esta técnica, se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Las moléculas anfotéricas (moléculas que se comportan como ácidos o bases), como los aminoácidos, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH. La región del ánodo (+) es ácida y la del cátodo (-) es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH tal que las moléculas que se han de separar tengan su punto isoelectrico dentro del rango. Las sustancias que se encuentran inicialmente en regiones de pH inferior a su punto isoelectrico estarán cargadas positivamente y migrarán hacia el cátodo, mientras que aquellas que se encuentren en medios con pH más altos que su *pI* tendrán carga negativa y migrarán hacia el ánodo. La migración les conducirá a una región donde el pH coincidirá con su *pI*, tendrán una carga neta nula (forma zwitterionica) y se detendrán. De esta forma las moléculas anfotéricas se sitúan en estrechas bandas donde coincide su *pI* con el pH (Görg *et al.*, 2000; Berkelman y Stenstedt, 2002).

El gradiente de pH estable entre los electrodos se consigue usando una mezcla de amfolitos de bajo peso molecular cuyos *pI* cubren un rango preestablecido de pH. Los amfolitos suelen ser ácidos poliamino policarboxílicos alifáticos sintéticos y son comercializados en mezclas que cubren determinados rangos de pH.

Electroforesis bidimensional (2 D)

La electroforesis bidimensional se basa en separar las proteínas de una mezcla según dos propiedades moleculares, una en cada dimensión. El procedimiento más usado se basa en la separación en una primera dimensión, mediante isoelectroenfoque y una segunda dimensión según su peso molecular, mediante electroforesis en poliacrilamida-SDS. Para el análisis de este tipo de electroforesis, actualmente existen bases de datos de geles bidimensionales capaces de comparar patrones proteicos. Estos sistemas electroforéticos permiten la comparación automática de puntos (spots) para la identificación precisa de los mismos, de esta forma también puede ser un análisis cuantitativo (Görg *et al.*, 2000; Berkelman y Stenstedt, 2002).

Zimogramas reversos

En 1957 Hunter y Markert, quienes acuñaron el término zimograma vigente hasta la fecha, utilizaron por primera vez metodologías histoquímicas en geles de almidón conteniendo muestras biológicas, con el fin de identificar en el gel electroforético zonas con actividad de esterasas. La identificación de enzimas en los zimogramas se realiza mediante su actividad específica sobre un sustrato cromogénico. La hidrólisis del sustrato por acción de las enzimas solubiliza fragmentos de la proteína junto con el colorante covalentemente combinado a ella, el análisis de los zimogramas es a través de zonas con ausencia o disminución de la intensidad de la coloración (Hunter y Markert, 1957. citados por Miranda, *et. al.*, 2006).

En este trabajo se estandarizó una técnica fundamentada en los zimogramas, además de aprovechar las ventajas de combinar los avances en electroforesis en geles de poliacrilamida con el procesamiento digital de los zimogramas reversos en la identificación de inhibidores de proteasas. A diferencia de los zimogramas convencionales, en los zimogramas reversos no se emplea un sustrato cromogénico, en esta metodología se identifica la actividad enzimática o inhibitoria sobre una proteasa blanco como péptidos resistentes a la digestión de una proteasa, de esta forma, se visualizan bandas o puntos, estos últimos obtenidos de la segunda dimensión, que permanecen después de la digestión, para su posterior tinción del gel electroforético.

Material biológico

Las semillas maduras de *Acacia farnesiana* y *Parkinsonia praecox* de la familia Fabaceae, *Mimosa luisana* (Mimoseae), *Hechtia podanta* (Bromeliaceae), *Beucarnea gracilis* (Nolinaceae) y *Nicotiana glauca* (Solanaceae) fueron colectadas de plantas del Jardín Botánico “Helia Bravo Hollis”, que está ubicado en el Valle de Tehuacán. Las semillas de *Pachycereus hollianus* (Cactaceae) y *Solanum americanum* (Solanaceae) fueron proporcionadas por el Banco de Semillas de la FES, Iztacala, previamente colectadas del valle. Se efectuaron observaciones del estado físico de las plantas y las semillas, en búsqueda de infestación por insectos.

Extracción de proteínas

- *Obtención de la harina*

Considerando que en las cubiertas, vainas y cápsulas de las semillas pudieron haber estado presentes los inhibidores proteicos (IP's), se realizó la limpieza y separación manual de las cubiertas, vainas, cápsulas y semillas mediante el uso de tamices de diferente apertura y se maceró cada estructura, por separado, hasta obtener una harina fina.

- *Desengrasado de la harina*

La fase de desengrasado permite eliminar ácidos grasos y aceites de las semillas, que forman parte de sus componentes de reservas. Se ha demostrado que estos componentes interfieren en la medición de la actividad inhibitoria de IP's (Campos, 1994). Se desengrasó tres veces la harina, de cada estructura, con una relación 1:4 (w/v), con cloroformo-metanol 2:1 (v/v), por 30 min, en agitación constante en frascos de polipropileno cerrados, se utilizó papel filtro # 2 y embudos pequeños para filtrar el solvente, finalmente se dejó secar la harina sobre el papel filtro.

- *Extracción de IP's*

Para solubilizar los distintos tipos de muestras proteicas se requiere de diferentes tratamientos y condiciones. Las proteínas se clasifican de acuerdo a su solubilidad en diferentes soluciones como: 1) proteínas tipo albúminas, son solubles en agua, 2) las globulinas son solubles en disolución salina, 3) las prolaminas son solubles en alcoholes y

4) las gluteínas son solubles en diluciones ácidas y básicas (Osborne, 1924. Citado por Mikola, 2001). Los inhibidores de proteasas (IP's), generalmente, son proteínas que pertenecen al grupo de las albúminas.

Con base en lo anterior, las harinas obtenidas de cubiertas, vainas, cápsulas y semillas se colocaron en relación 1:5 (w/v), en frascos independientes y cerrados, con soluciones de NaCl (0.5 M), Na₂HPO₄ (0.001 M, pH 7), etanol al 70% y H₂O desionizada. La extracción proteica se realizó en frío por 15 h (toda la noche) en constante agitación, posteriormente se centrifugó a 10 000 x g, durante 30 min. El extracto crudo de proteínas se liofilizó y resolubilizó a fin de obtener una concentración de 1 mg/ml con H₂O. Se monitoreó la actividad inhibitoria de cada extracto, contra la enzima proteolítica tipo (tripsina bovina).

Prepurificación de IP's utilizando una columna HiTrap Blue

Para tratar de obtener a los posibles IP's parcialmente puros, los cuales son generalmente de bajo peso molecular, en cada extracto crudo se realizó una prueba por cromatografía de afinidad a proteínas de bajo peso molecular.

HiTrap Blue (kit de purificación de proteínas de Amersham Biosciences), es una columna de afinidad cromatográfica (AC), mide 0.7 x 2.5 cm (1 ml) y el tamaño de partícula es de 34 µm. Esta columna de AC, separa proteínas con base en una interacción entre la proteína (s) y un ligando específico acoplado a una matriz preempaquetada de Sepharosa High Performance. La proteína blanco es unida en forma reversible y específica al ligando Cibacron Blue F3G-A, esta unión es debida a la similitud de la estructura de este colorante con los cofactores NAD⁺ y NADP⁺. La proteína es eluida, en forma concentrada, del ligando con cambios de soluciones. Con el primer buffer de elusión (Na₂HPO₄, 20 mM, pH 7.0) se colectaron las primeras 17 fracciones, el resto de las fracciones se colectaron haciendo un cambio con el segundo buffer (NaCl, 2 M, pH 7.0). Se realizó la lectura de absorbancia a 280 nm de las fracciones colectadas, detectando presencia de proteínas, posteriormente se midió la actividad inhibitoria contra tripsina bovina y se colectaron todas las fracciones que presentaron una fuerte actividad inhibitoria.

Precipitación con acetona

Cuando se encuentran concentraciones bajas de proteínas, estas se concentran por liofilización y/o se precipitan con acetona fría, el cual es un solvente orgánico y por esto, muchos contaminantes solubles orgánicos interferentes se quedan en la solución. Las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con 1 ml de acetona fría, por cada 500 μ l de extracto crudo, se homogenizó y centrifugó a 23,708 x g, durante 1.5 min. El sobrenadante se decantó y se realizaron 2 lavados a la pastilla con acetona fría al 70%, cada lavado se centrifugó a 10 000 x g, por 1 min. La acetona remanente se dejó evaporar a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 200 μ l de H₂O (Oliva *et al.*, 2000; Satoshi *et al.*, 2002; Van der Hoorn *et al.*, 2004; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Finnie *et al.*, 2006).

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas fue cuantificada a 562 nm mediante curvas de calibración, usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar, por medio del Kit (Sigma) de Acido Bicinconínico (BCA), el cual es una modificación del procedimiento de Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Stoscheck, 1990. citados por Campos, *et al.*, 1997).

Determinación de actividad inhibitoria

Se midió la actividad inhibitoria de la tripsina bovina por el procedimiento de Schwertz y Takenaka (1955). El sustrato sintético empleado fue el Ester-etílico de N- α -Benzoil-L-arginina (BAEE) disuelto (48 mg/ml) en buffer (Tris 0.15 M+CaCl₂·2 H₂O, 0.05 M, pH 8.1). Para permitir la formación del complejo enzima-inhibidor, antes de agregar el sustrato, se mezcló la enzima con el inhibidor en una reacción por 3 min a 30° C. Se usaron 15-30 μ l de tripsina (4×10^{-6} M) y diferentes concentraciones del inhibidor proteico desconocido, presente en cada uno de los extractos tanto crudos, los prepurificados por columna HiTrap Blue, los liofilizados-resuspendidos de los precipitados con acetona. Se comparó la actividad catalítica de la enzima utilizando 50 μ l BAEE en presencia y ausencia del inhibidor. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Beckman DU-65 a 253 nm.

Los cálculos se hicieron considerando que una unidad de actividad (UA) proteolítica de la tripsina bovina, es definida como un incremento de 0.01 de absorbancia (D.O.) o como 1 μ mol de sustrato hidrolizado por minuto de reacción (valor original).

$$UA/ml = \frac{D.O./min}{(0.01)(Alícuota)}$$

Una unidad de inhibición es definida como una unidad de actividad enzimática inhibida (UI/ml), para esto, se rastreó el I_{50} el cual es definido como la cantidad de inhibidor requerido para disminuir la actividad proteolítica de la tripsina al 50% del valor original.

Las unidades totales de inhibición (UT) se obtienen al multiplicar las UI/ml por el volumen total del extracto obtenido. La actividad específica inhibitoria es definida como las unidades de inhibición por mg de proteína del inhibidor (UI/ mg).

$$UI/ml = \frac{(D.O./min)_{Enzima} - (D.O./min)_{Inhibidor}}{(0.01)(Alícuota)_{Inhibidor}}$$

Electroforesis en una dimensión (1D).

Los extractos crudos fueron analizados por electroforesis (1D), en geles de poliacrilamida y condiciones desnaturizantes: 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), la concentración de poliacrilamida en el gel separador fue del 10% y en el gel concentrador de 4% (Schägger and Von-Jagow, 1987). Se usaron marcadores de peso molecular de 250-10 kDa (Protein™Standars Dual color) y de 220-10 kDa (BenchMark™ Protein Ladder). La corrida de electroforesis se realizó en una cámara Hoefer miniVE (50 volts 30 min, 120 volts 3:30 h). Los geles fueron teñidos con Phast Blue R 0.02%, en agitación, durante toda la noche y destañidos por 30 min, sumergiéndolos en una solución de metanol, ácido acético y H₂O en relación 3:1:6.

Electroforesis en dos dimensiones (2D).

En este caso, la primera dimensión (1D) consiste en llevar a cabo el isoelectroenfoco (IEF), proceso en el cual las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI). El IEF se basa en la característica de los aminoácidos, como moléculas anfotéricas (cargas positivas y negativas), que se separan con base en un gradiente de pH y una diferencia de potencial eléctrico (el ánodo (+), es ácido y el cátodo (-), es alcalino). La migración les condujo a una región en donde la carga neta de la proteína fue nula (forma zwitterion), es decir en donde el pH coincidió con su pI . Para el IEF, se usaron tiras de 7 cm (IPG strips) de amplio rango de pH continuo (3-10), la cantidad de muestra colocada en las tiras fue de 100 μ g de proteína, disueltos en 125 μ l de buffer de rehidratación. Las tiras fueron previamente embebidas en buffer de rehidratación, previamente tratado por 1 h con 0.01 mg/ml de Amberlite para desionizar la Urea y 2.8 mg/ml de ditioneitol (DTT). Se utilizó un equipo IPGphor, programado en cinco pasos: 1) 16 h de hidratación, 2) 1 h a 250 volts, 3) 30 min a 500 volts, 4) 30 min a 1000 volts y 5) 2 h a 8000 volts. Las tiras se equilibraron en un buffer de SDS, adicionado con 0.01 g/ml de DTT, posteriormente, las tiras se reequilibraron en nuevo buffer de SDS, adicionado con 0.025 g/ml de iodoacetamina (IAA), cada equilibrio se efectuó con agitación suave durante 15 min.

Para la 2D, se preparó un gel vertical de 80 x 90 x 1 mm, en matriz de SDS-poliacrilamida con una concentración de 12% (6.1 ml H₂O; 3.5 ml Tris-HCL 1.5 M, pH 8.8; 140 μ l SDS 10% w/v; 4.2 ml acrilamida 40%; 50 μ l persulfato de amonio y 10 μ l N, N, N, N'-tetrametilen-diamina, TEMED). Se colocaron las tiras (IPG strips), anteriormente equilibradas, en forma horizontal sobre el gel SDS-PAGE al 12%. Se colocaron 3 μ l de marcador de peso molecular (250-10, 220-10 kDa) sobre papel filtro, en un extremo del gel SDS-PAGE al 12%. Este gel se selló, junto con la tira (IPG strips), con un tapón delgado de agarosa al 0.5%. La corrida de electroforesis se realizó en una cámara Hoefer miniVE (50 volts 30 min, 120 volts 3:30 h). Después de teñir y desteñir los geles 2 D, se visualizaron manchas o puntos, que es donde coincidía el pI con el peso molecular relativo (PMr) de diferentes moléculas de péptidos.

Determinación de actividad inhibitoria en gel (zimograma reverso)

Tanto en los geles de 1 D y 2 D, se realizaron ensayos de tiempos de digestión o hidrólisis de péptidos inmersos en los geles, por tripsina bovina. Los geles fueron incubados a 37° C, en buffer 1 X (Tris-HCl, 50 mM+Ca₂Cl, 5mM, pH 7.5) en presencia de tripsina bovina (0.4 mg/ml), durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 12 h. Con el fin de detectar la presencia de péptidos resistentes a la hidrólisis, en cada ensayo de tiempo, los geles eran observados mediante tinción con Phast Blue R 0.02% en agitación durante toda la noche y destiñendo por 30 min con metanol, ácido acético y H₂O (3:1:6). En los geles se determinó que los péptidos inhibitorios de tripsina corresponderían a las bandas o puntos que no fueran degradados por la enzima por más de 8 h de digestión.

Determinación de Punto isoeléctrico (pI) y Peso molecular relativo (PMr)

A los puntos correspondientes a péptidos inhibitorios de tripsina bovina, de los geles 2 D, se les calculó en pI y PMr.

El pI de los péptidos se obtuvo por interpolación de los puntos medidos, en la graduación neta de la tira de pH (3-10), a escala en el gel 2 D.

El PMr de los péptidos se estimó a partir de la elaboración de una gráfica ($y=mx+b$) del logaritmo (Log10) del peso molecular de los estándares (220-10 kDa) contra su movilidad relativa (Rf) en los geles 2 D, se utilizó el programa AlphaEasy versión 4.

Búsqueda en base de datos Swiss-Prot.

Swiss-Prot es una base de datos de secuencias de proteínas, desarrollada por Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) en colaboración con European Bioinformatics Institute (EBI). Provee de información de análisis de proteínas reportadas en la literatura como la descripción de funciones, dominios, estructuras, modificaciones de traslación, variantes, etc. Además posee un nivel alto de integración con otras bases de datos. El servidor ExPASy (Expert Protein Analysis System) se dedica al análisis de secuencias de proteínas, estructuras y de electroforesis 2 D en geles de poliacrilamida (2 D PAGE). Para la búsqueda de datos se emplea la herramienta TagIdent, la cual genera tres aspectos: 1) una lista de proteínas que proporciona el puntos isoeléctricos y peso molecular aparente de las mismas, 2) la identificación de proteínas por apareamiento de secuencias cortas, de hasta 6 aminoácidos, contra proteínas contenidas en base Swiss-Prot y TrEMBL

Cuadro 1. Actividad inhibitoria* y actividad especifica inhibitoria vs tripsina bovina de diferentes semillas de especies, extraídas con diferentes soluciones.**

Actividad Especie	H ₂ O		ETOH al 70%		NaH ₂ PO ₄		NaCl	
	UI/ml	UI/mg	UI/ml	UI/mg	UI/ml	UI/mg	UI/ml	UI/mg
S-Ac	165	490	115	73	165	104	210	77
S-Ml	270	270	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S-Pp	242	283	70	368	120	120	55	23
C-Bg	28	10	5	4	50	25	15	7
S-Bg	217	203	2	7	90	69	50	22
C-Ng	63	51	20	14	15	8	2	2
S-Ng	216	651	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S-Sa	63	48	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S-Ph	44	138	15	16	90	141	65	69
C-Hp	95	78	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S-Hp	84	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*(UI/ml) x 10⁴ ** (UI/mg prot) x 10³

S: Semilla; C: cubiertas; Ac: *Acacia farnesiana*; Ml: *Mimosa luisana*; Pp: *Parkinsonia praecox*; Bg: *Beucarnea gracilis*; Ng: *Nicotiana glauca*; Sa: *Solanum americanum*; Ph: *Pachycereus hollianus*; Hp: *Hechtia podanta*; ND: no determinada.

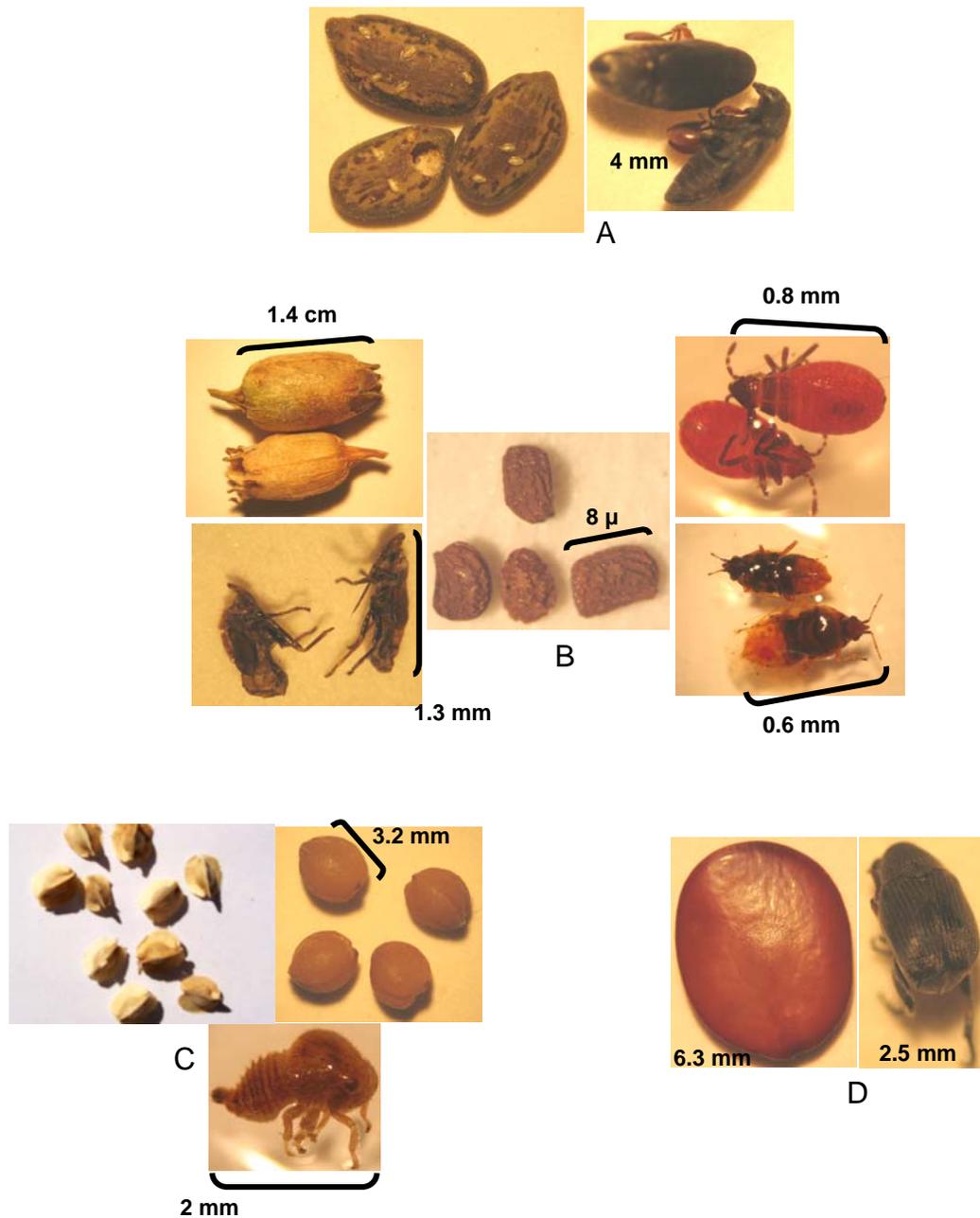


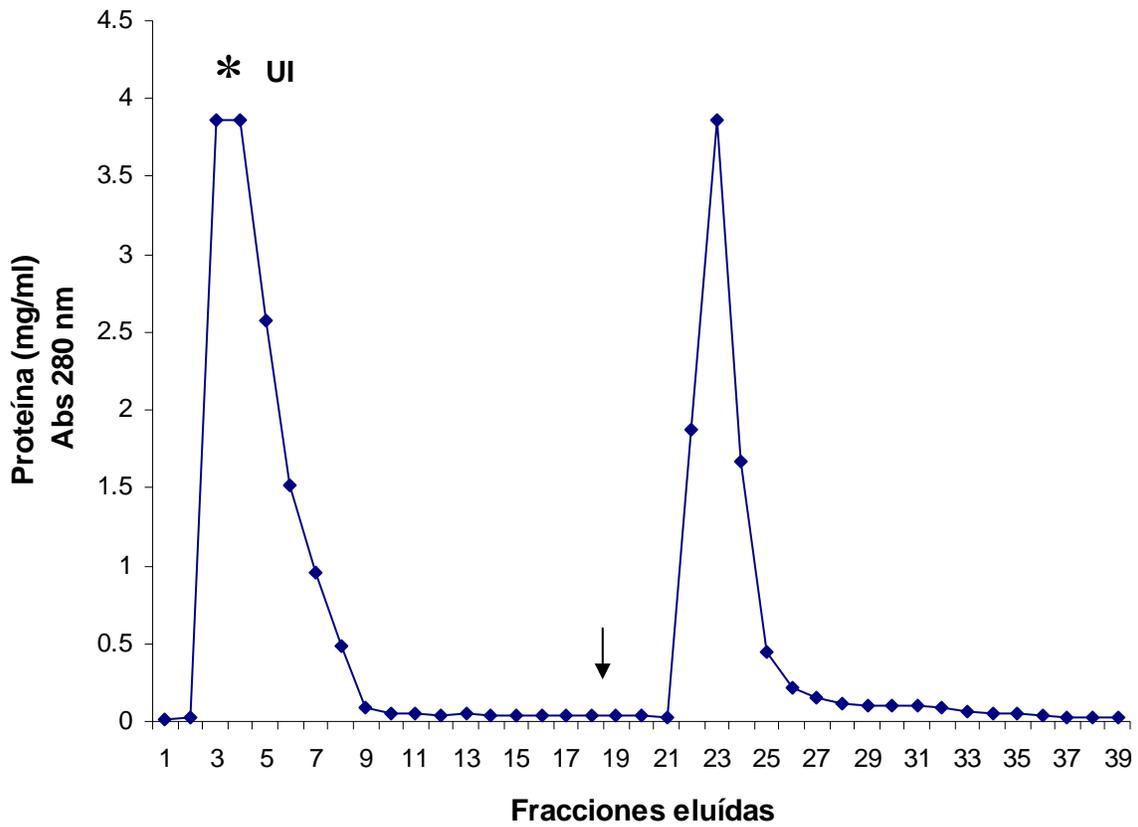
Figura 2. Semillas, cápsulas, cubiertas de semillas con gradiente diferencial de infestación e insectos y huevecillos de varias familias de insectos encontrados. A) *Parkinsonia praecox*, B) *Nicotiana glauca*, C) *Beucarnea gracilis* y D) *Acacia farnesiana*.

Prepurificación de proteínas utilizando una columna HiTrap Blue

En los extractos de las tres especies se observó un comportamiento similar de elusión de proteínas de bajo peso molecular (Figuras 3-5). Todas las fracciones colectadas mostraron cierto grado de actividad inhibitoria contra tripsina bovina y en cada gráfica se pueden apreciar dos picos. Cada una de las especies alcanzó un pico máximo en las fracciones 3-7 (*), correspondientes a las fracciones de proteínas eluidas que presentaron una fuerte actividad inhibitoria (UI). Sin embargo, aunque se lograba una exitosa purificación de proteínas a través de esta columna de afinidad, la cantidad de proteína eluida, de las tres especies, resultaba insuficiente para llevar a cabo análisis necesarios, es decir, se obtenía una baja recuperación en las proteínas, razón por la cual se precipitó con acetona para concentrar a las proteínas.

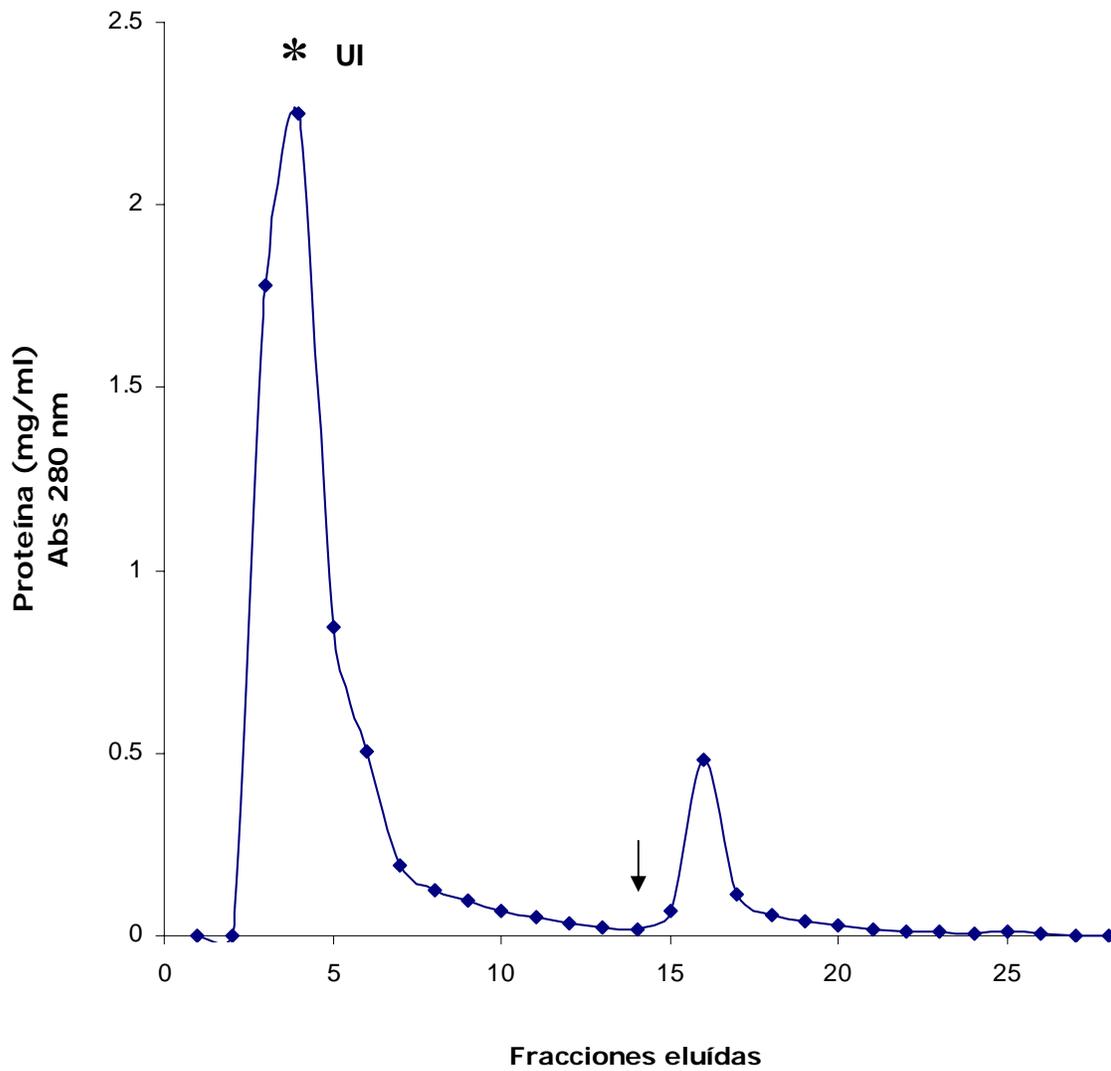
Precipitación con acetona

Se logró una concentración de proteínas a través de la precipitación con acetona, observándose un considerable incremento en los valores de actividad específica (UI/mg) en cada paso (Cuadros 2 y 3). Con el factor de purificación se señala el grado de este incremento de valores. La especie *Acacia farnesiana* fue la que presentó mayor actividad específica inhibitoria de las tres especies analizadas.



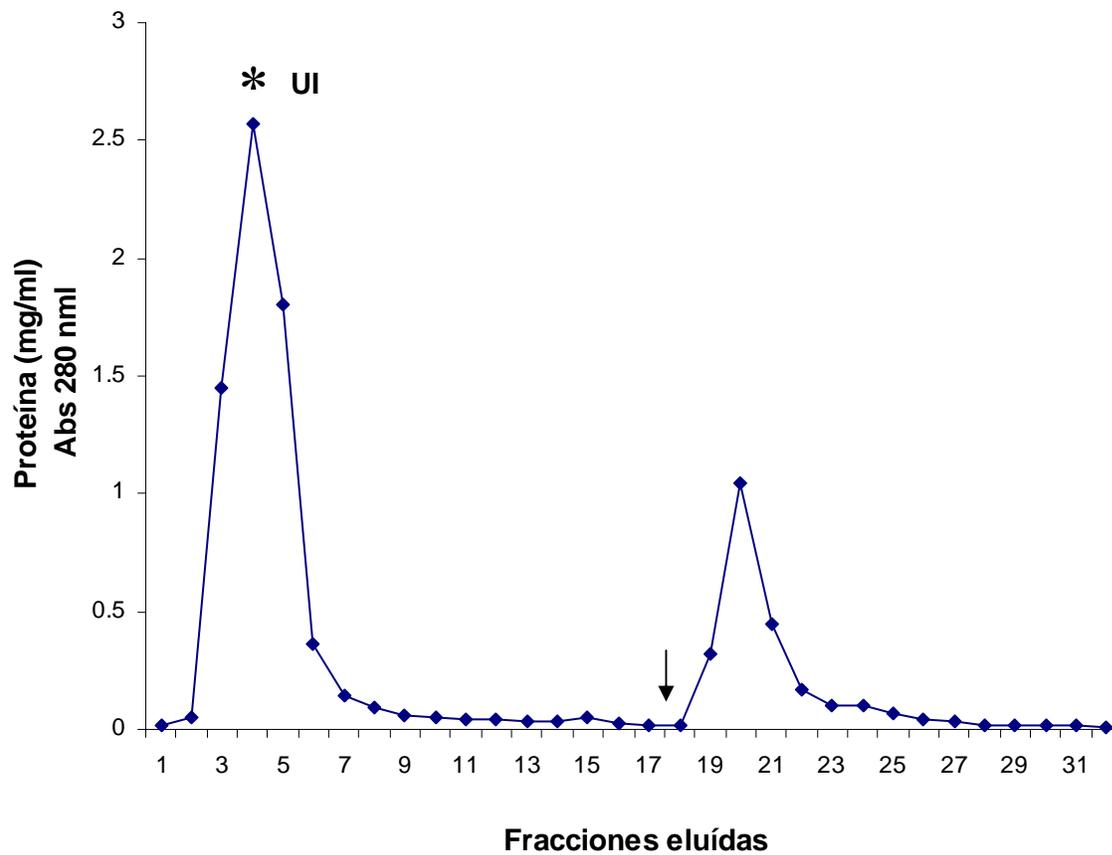
* Unidades de inhibición
↓ Cambio de buffer de elusión

Figura 3. Fracciones de *Acacia farnesiana* de 3 ml, obtenidas de columna HiTrap Blue. UI: unidades de inhibición por mililitro.



* Unidades de inhibición
↓ Cambio de buffer de elusión

Figura 4. Fracciones de *Beucarnea gracilis* de 3 ml, obtenidas de columna HiTrap Blue



* Unidades de inhibición
↓ Cambio de buffer de elusión

Figura 5. Fracciones de *Nicotiana glauca* de 3 ml obtenidas, de columna HiTrap Blue

Cuadro 2. Proteína total y actividad inhibitoria vs tripsina del extracto crudo, liofilizado y precipitado de *Acacia farnesiana*.

	Proteína total (mg)	Unidades (UI/ml)	Actividad total (UT)	Actividad Específica (UI/mg)	FP
Ec	403.5	43000	894400	107	
Ec L	123	48000	72000	390	1
Ec PA	6.7	29222	5844	4362	11.18

Ec: Extracto crudo; L: Liofilizado; PA: Precipitado con acetona; FP: Factor de purificación.

Cuadro 3. Proteína total y actividad inhibitoria vs tripsina del extracto crudo, liofilizado y precipitado de *Beucarnea gracilis*.

	Proteína total (mg)	Unidades (UI/ml)	Actividad total (UT)	Actividad Específica (UI/mg)	FP
Ec	78.1	96	1056	1.2	
Ec L	9.1	166	166	18.2	1
Ec PA	3.24	202	40.5	62.3	3.42

Ec: Extracto crudo; L: Liofilizado; PA: Precipitado con acetona; FP: Factor de purificación.

Cabe resaltar que en el extracto de *Nicotiana glauca*, el porcentaje de inhibición (I_{50}) no se detectaba o tendía a encontrarse usando altas concentraciones del inhibidor, debido a la presencia de contaminantes interferentes; por esta razón el paso de la precipitación con acetona fue acertado ya que eliminó los contaminantes y permitió encontrar el I_{50} y, consecuentemente, la actividad específica inhibitoria (Cuadro 4).

Cuadro 4. Proteína total y actividad inhibitoria vs tripsina del extracto crudo, liofilizado y precipitado de *Nicotiana glauca*.

	Proteína total (mg)	Unidades (UI/ml)	Actividad total (UT)	Actividad Específica (UI/mg)
Ec	14.8	ND	ND	ND
Ec L	5.2	ND	ND	ND
Ec PA	0.44	103	20.6	234

Ec: Extracto crudo; L: Liofilizado; PA: Precipitado con acetona; ND: No detectada.

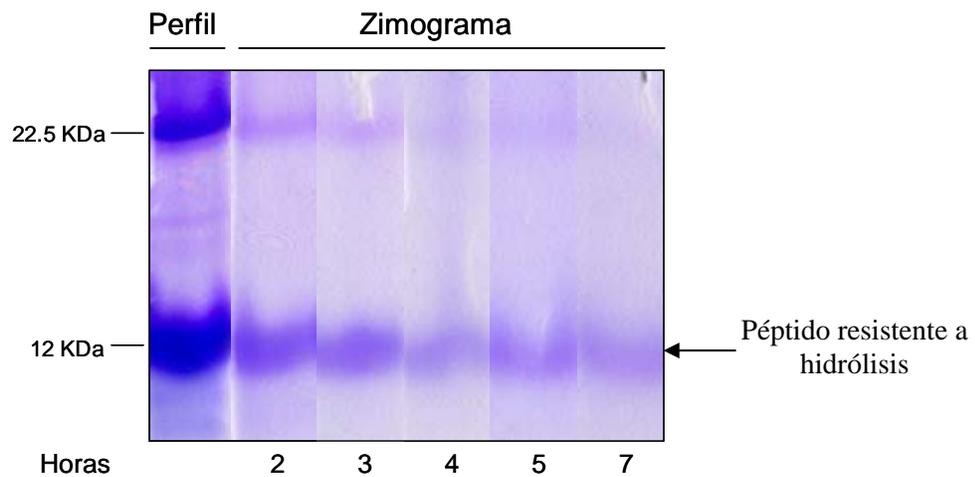


Figura 6. Tiempos de digestión en SDS-PAGE con 0.4 mg/ml de tripsina bovina incubados a 37°C para evidenciar la presencia de posibles IP's en las bandas que no fueron hidrolizadas por la tripsina. El tiempo óptimo de digestión quedó establecido a 3:30 h para emplearse en los zimogramas de geles de 2D.

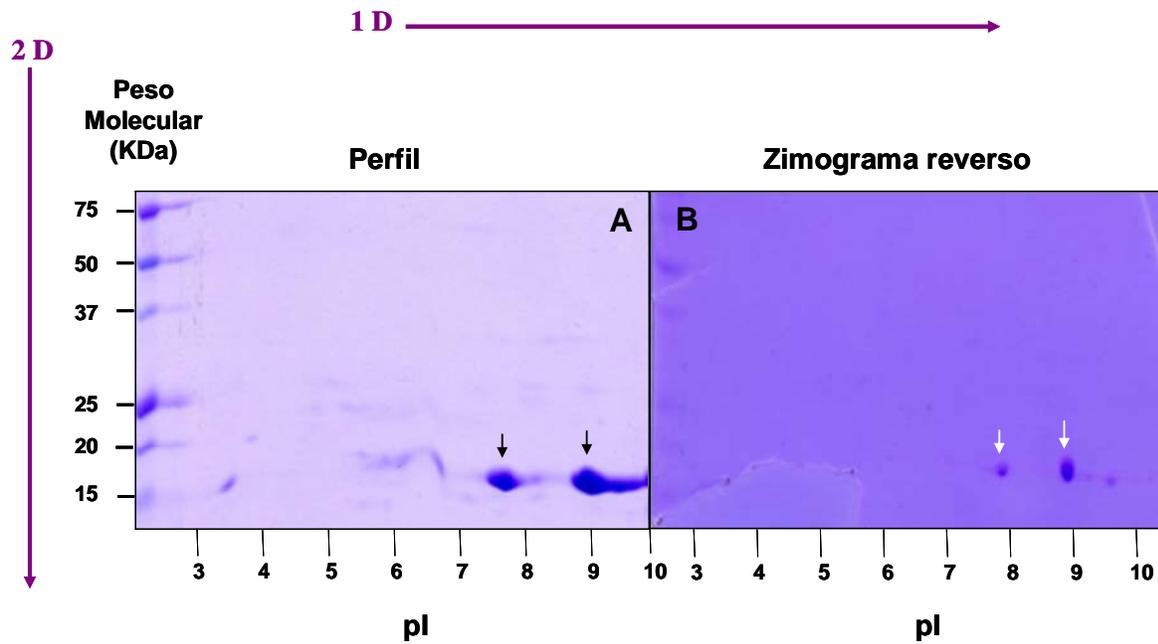


Figura 7. Evidencia de la presencia de dos posibles inhibidores de proteasas de *Acacia farnesiana* identificados de geles 2D (A) y zimograma (B). Inhibidores obtenidos a partir del precipitado con acetona y separados por enfoque isoeléctrico (IPG) pH 3-10 en la 1^{era} dimensión y 13% SDS/PAGE en la segunda dimensión. Ambos con una masa molecular estimada de 16.4 kDa y con diferente *pI* 7.6 y 9.1 respectivamente.

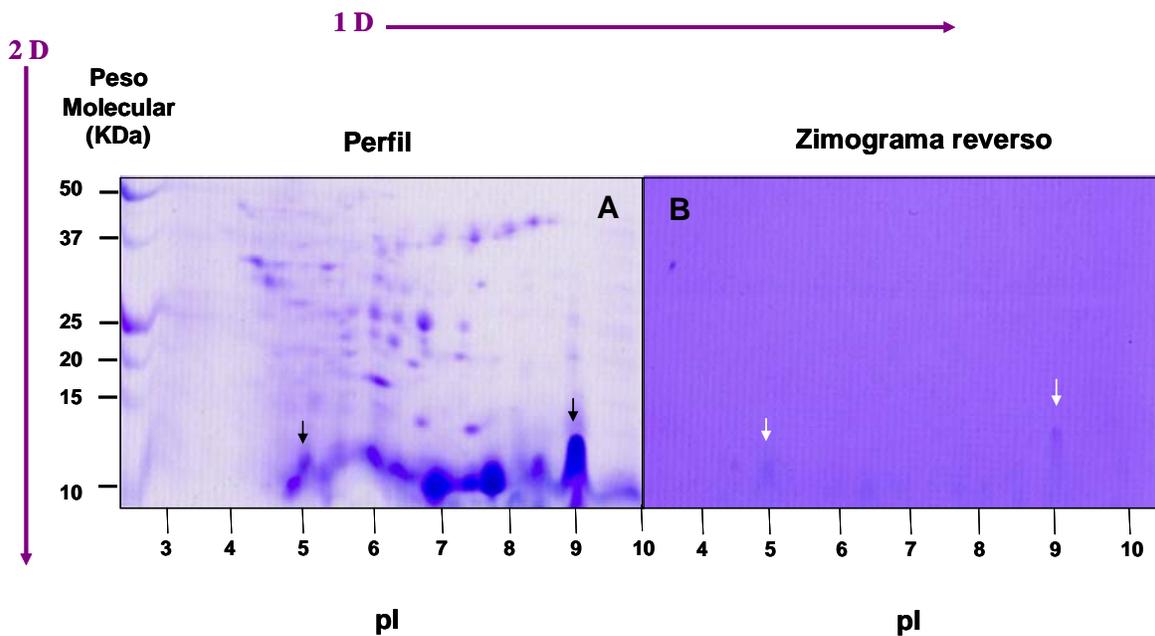


Figura 8. Presencia de dos posibles inhibidores de proteasas en *Beucaernea gracilis*, identificados de geles 2D (A) y zimograma (B). Inhibidores obtenidos a partir del precipitado con acetona y separados por enfoque isoeléctrico (IPG) pH 3-10 en la 1^{era} dimensión y 13% SDS/PAGE en la segunda dimensión. Con una masa molecular estimada de 11.6 y 13.7 kDa y un pI de 5.0 y 9.1 respectivamente.

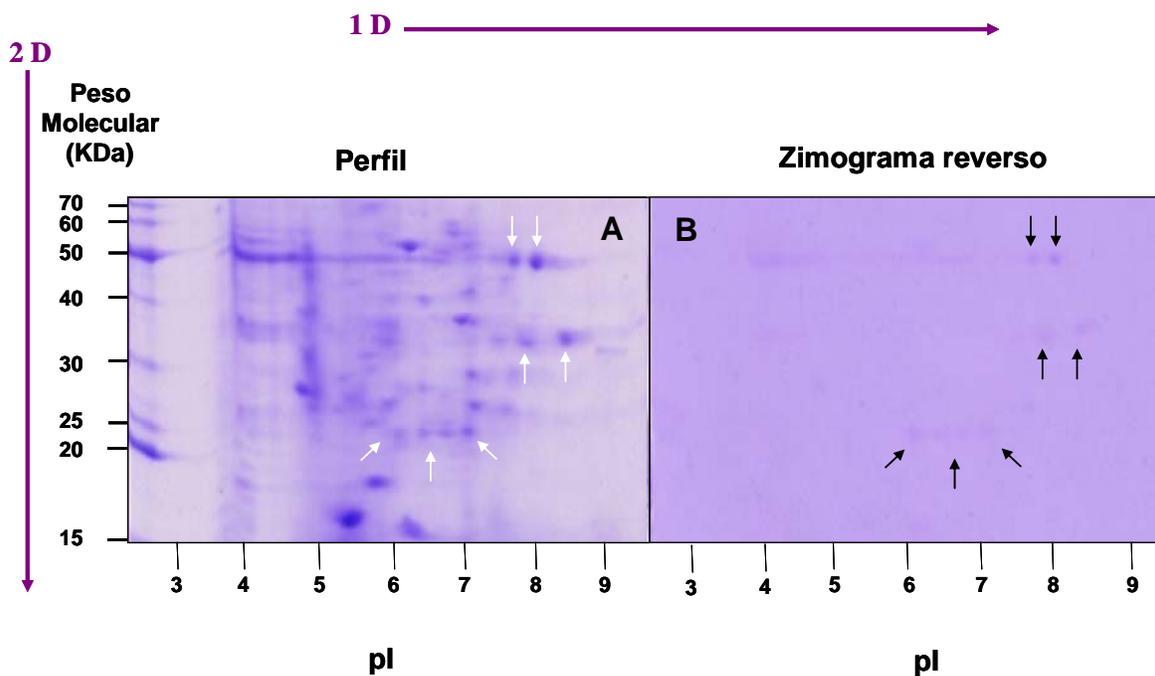


Figura 9. Se observó la presencia de ocho posibles inhibidores de proteasas en *Nicotiana glauca*, identificados de geles 2D (A) y zimograma (B). Inhibidores obtenidos a partir del precipitado con acetona y separados por enfoque isoeléctrico (IPG) pH 3-10 en la 1^{era} dimensión y 13% SDS/PAGE en la segunda dimensión. Con masas moleculares estimadas en un rango de 22 a 48 kDa y sus puntos isoeléctricos en un rango de 5.9 y 8.6.

Búsqueda de similitudes en la base de datos de proteínas Swiss-Prot

Utilizando la herramienta TagIdent de la base de datos Swiss-Prot, se cotejaron los puntos isoelectricos y pesos moleculares identificados de los geles 2 D para cada especie analizada, y se encontraron similitudes con IP's ya reportados. Para *Acacia farnesiana* se encontró un IP's del mismo género de la especie *Acacia confusa* y dos más, uno de la especie *Psophocarpus tetragonolobus* (Fabaceae) y otro de la especie *Leucaena glauca* (Fabaceae). Para *Beucarnea gracilis* se encontró un inhibidor de subtilisina de *Phaseolus angularis* (Fabaceae) y un Inhibidor de tripsina/ α -amilasa de *Triticum aestivum* (Poaceae). En *Nicotiana glauca* de los ocho posibles IP's obtenidos de los geles 2 D, sólo se pudieron encontrar similitudes con los *pI* de 22.5 kDa, que correspondieron a IP's de la familias Oryzeae, Brassicacea, Fabaceae y Solanaceae, *N. glauca* pertenece a esta última familia (Cuadro 5). Estos datos nos dan una gran aproximación de los IP's que pueden estar presentes en las semillas de las especies silvestres en estudio, sobre todo que en algunos casos corresponde hasta al mismo género, como con *Acacia confusa*. Además, se demuestra que con el empleo directo de las herramientas de proteómica se pueden elucidar más rápidamente la presencia de IP's los cuales podrían ser estudiados más a fondo, por ejemplo con posteriores estudios de secuenciación peptídica por espectrometría de masas.

Cuadro 5. Inhibidores de proteasas con características similares encontradas en la base de datos de proteínas Swiss-Prot, usando la herramienta TagIdent

Especie	Peso Molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)	Similitud en Swiss-Prot No. de acceso, Nombre y Origen
<i>Acacia sp.</i>	16.4	7.6	P24924 Inhibidor de tripsina de <i>Acacia confusa</i>
			P10821 Inhibidor de tripsina (WTI-1A) de <i>Psophocarpus tetragonolobus</i>
<i>Beucarnea gracilis</i>	16.4	9.1	P83036 Inhibidor de tripsina tipo Kunitz de <i>Leucaena glauca</i>
	11.6	5.0	P16064 Inhibidor de subtilisina (ASI-I) de <i>Phaseolus angularis</i>
<i>Nicotiana glauca</i>	13.7	9.1	Q43723 Inhibidor de tripsina/ α -amilasa (ITRL-1/ITRL-3) de <i>Triticum aestivum</i>
	22.5	5.9	P09229 Inhibidor de cisteín-proteasa (OC-I) de <i>Oryza sativa</i>
	“	“	Q8H0X6 Inhibidor de cisteín-proteasa (AtCYS-6) de <i>Arabidopsis thaliana</i>
	“	“	P25273 Inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KT12) de <i>Glycine max</i>
	22.5	6.1	Q41484 Inhibidor de serin-proteasa (gCDI-B1) de <i>Solanum tuberosum</i>
	“	“	P30941 Inhibidor de serin-proteasa (PIGEN 1) de <i>Solanum tuberosum</i>
	22.5	6.7	P17979 Inhibidor de aspártico proteasa (PI-8) de <i>Solanum tuberosum</i>
	“	“	P58521 Inhibidor de aspártico proteasa (NID) de <i>Solanum tuberosum</i>

pertenecen a las familias Membracidae, Miridae y Escolytidae (Identificados por el Laboratorio de Entomología de la FESI) (Fig. 2).

De estas especies, *N. glauca*, *A. farnesiana* y *B. gracilis* fueron las que presentaron mayor actividad inhibitoria contra tripsina bovina (Cuadro 1). Este tipo de enzima proteolítica y las enzimas quimotripsina y elastasa, pertenecientes a la clase de serin-proteasas, son las responsables de la digestión inicial de proteínas en el tracto digestivo de varias familias de insectos y de animales superiores. Por esta razón se realizaron los ensayos con tripsina bovina por su disponibilidad y utilidad para analizar proteasas empleando sustratos sintéticos como el Ester-etílico de N- α -Benzoil-L-arginina (BAEE) (Lawrence y Koundal, 2002). En el cuadro 1, se observa un mayor grado de actividad inhibitoria contra tripsina al extraer las proteínas con H₂O. De los diferentes tratamientos y condiciones que se requirieron para solubilizar las muestras de proteínas, la extracción en H₂O indicó: 1) mayor estabilidad de los IP's; 2) que los inhibidores se encuentran en la fase acuosa, comportándose como proteínas tipo albúminas y 3) que el proceso de desengrasado de la harina evita turbidez e interferencia en la determinación de la actividad enzimática, esto previamente reportado por Campos (1994).

Al lograr concentrar la proteína, precipitándola con acetona, y encontrar niveles mucho más altos de unidades de inhibición para las tres especies, principalmente en *A. farnesiana* y siendo crucial para los valores encontrados en *N. glauca* (cuadros 2-4), se concluye que la acetona funcionó como un buen agente precipitante, que por sus características de solvente orgánico, permitió maximizar y agilizar el proceso de extracción de las proteínas.

El identificar a los inhibidores proteicos existentes en las semillas de *A. farnesiana*, *B. gracilis* y *N. glauca*, sólo por métodos electroforéticos de primera y segunda dimensión (1 D y 2 D) con los extractos crudos precipitados con acetona (Figs. 7A, 8A y 9A), se debe a que estos métodos permiten realizar un análisis de alta resolución de muchas proteínas, sin una purificación exhaustiva de las mismas. Particularmente, la electroforesis 2 D es una tecnología con suficiente poder de resolución debido a las siguientes características: 1) ser altamente sensitiva, capaz de detectar cantidades pequeñas o trazas de proteínas, 2) ser semicuantitativa, pues detecta desde 200 fg, 1 ng, 15 ng hasta 100 ng de proteínas, dependiendo de los procesos de visualización de los resultados, 3) ser altamente reproducible, 4) ser relativamente práctica y rápida y, 5) permitir separar y caracterizar

diferentes tipos de proteínas de una mezcla, de acuerdo a dos características: su punto isoeléctrico (pI) y a su peso molecular relativo (PMr), donde cada punto (spot) visualizado que resulta de la electroforesis 2 D, corresponde a un solo tipo de proteína de la muestra (Görg *et al.*, 2000; Satoshi *et al.*, 2002; Marouga *et al.*, 2005; Bauw *et al.*, 2006).

El presente estudio es el primer reporte del uso de zimogramas reverso en geles de electroforesis en 2D, donde se pudo observar la presencia de los posibles inhibidores de proteasas con resistencia a la digestión enzimática, indicado por los puntos resultantes, permitiendo una caracterización parcial de estas proteínas por su pI y PMr (Figs. 7B, 8B y 9B). De forma similar, utilizando sólo electroforesis en 1 D, Sivakumar *et al.*, (2005), mediante un análisis por patrones de zimogramas, detectó la inhibición de proteasas de dos insectos fitófagos por el inhibidor de tripsina purificado de semillas de *Prosopis juliflora* (PjTI). Aguirre *et al.*, (2004) a través de zimogramas en 1 D, mostró la presencia de un inhibidor de tripsina bovina y de proteasas tipo tripsina del barrenador *Prostephanus truncatus*, del extracto crudo y purificado de semillas de *Hyptis suaveolens* (HSTI). Finnie *et al.*, (2006) encontraron la presencia o ausencia de IP's al realizar un sondeo diferencial-temporal, a través de 2 D, en el proteoma de la semilla de cebada. Ellos observaron que la mayoría de los puntos, identificados por espectrometría de masas, correspondieron a inhibidores de serín-proteasas que están presentes desde el inicio del desarrollo de la semilla, las cuales también actúan como proteínas de reserva de la semilla, mientras que otros puntos que se expresaron al final de la maduración de la semilla de cebada, en menor abundancia, concluyeron que fueron inhibidores de subtilisina/quimotripsina y sugirieron que su función es únicamente de defensa. De esta forma, los resultados de estos trabajos dejan ver que los puntos remanentes después de la digestión con tripsina, corresponden a IP's que se encuentran de forma constitutiva en las semillas y cuya función consiste en protegerlas del ataque de insectos

Al cotejar el pI y PMr de cada proteína resistente a la digestión enzimática (Figs. 7-9), de cada especie, con IP's de la base de datos Swiss-Prot, se encontraron similitudes principalmente, con inhibidores tipo serín-proteasas (Cuadro 5). De forma preliminar, se puede decir que estas aproximaciones se debe a la similitud con las regiones conservadas de las proteínas ya reportadas; por lo tanto, la expresión de IP's hallados en las semillas de *A. farnesiana*, *B. gracilis* y *N. glauca*, tienen similitud con IP's ya conocidos

que inhiben tripsina y quimotripsina en plantas monocotiledóneas y tripsina, quimotripsina y elastasa en plantas dicotiledóneas (Mello *et al.*, 2003).

Para los dos péptidos inhibitorios encontrados en *A. farnesiana*, de la familia Fabaceae, se encontraron similitudes con IP's presentes en semillas y cotiledón de especies de la misma familia. Es así que se hallaron dos posibilidades para el primer péptido inhibitorio de **16.4 kDa** y **pI** de **7.6** con: 1) un precursor del inhibidor de tripsina/ α -quimotripsina, tipo Kunitz, el cual es un heterodímero con una cadena α y una β , unidas por puentes disulfuros, este precursor fue encontrado en cotiledones de *Acacia confusa*, y 2) con otro inhibidor tipo Kunitz, aislado de semillas de *Psophocarpus tetragonolobus*. El segundo péptido inhibitorio de *A. farnesiana* de **16.4 kDa** y **pI** de **9.1** fue similar a un inhibidor tipo Kunitz, identificado de semillas de *Leucaena glauca*.

En *B. gracilis*, perteneciente a la familia Nolinaceae, el péptido inhibitorio de **11.6 kDa** con un **pI** de **5.0** tuvo similitud con un inhibidor de subtilisina, tipo proteinasa I (PIN I) de semillas de *Phaseolus angularis* (Fabaceae). El otro péptido inhibitorio de **13.7 kDa** con **pI** de **9.1** fue similar al precursor del inhibidor de tripsina/ α -amilasa del endospermo de *Triticum aestivum*, (Poaceae).

Estos resultados encontrados en las semillas de *B. gracilis*, son el primer reporte de la presencia de IP's en una especie endémica de la región semiárida del Valle de Tehuacan, Puebla.

En *N. glauca*, de la familia Solanaceae, el primer péptido inhibitorio de **22.5 kDa** y **pI** de **5.9** encontró similitud con tres inhibidores: 1) con el precursor del inhibidor 1 de cisteín-proteasa de *Oryza sativa* (Oryzae), 2) con el precursor del inhibidor 6 de cisteín-proteasa de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) y 3) con un inhibidor de tripsina tipo Kunitz de semillas de *Glycine max* (Fabaceae). El péptido inhibitorio de **22.5 kDa** y **pI** de **6.1** presentó similitud con los precursores de dos inhibidores: 1) el inhibidor de serín-proteasa 5, el cual es un heterodímero con cadenas α y β unidos por puentes disulfuros (gCDI-B1) y 2) con el inhibidor de serín-proteasa 7 (PIGEN 1), ambos del tubérculo de *Solanum tuberosum*. Finalmente, el péptido inhibitorio de **22.5 kDa** y **pI** de **6.7** fue similar a dos inhibidores: 1) con el precursor del inhibidor de aspártico proteasa 8 (PI-8) y 2) con el

Conclusiones

- Se analizaron semillas, cápsulas y vainas de ocho especies de plantas silvestres, de amplia distribución y endémicas de una región semiárida, encontrándose en las semillas un gradiente diferencial de infestación por insectos fitófagos, en su mayoría de la familia de los Scolytidos.
- Las semillas más susceptibles al ataque de insectos fueron las especies *Nicotiana glauca* y *Acacia farnesiana*. En *Beucarnea gracilis* la infestación fue mínima.
- En las semillas de las tres especies mencionadas se encontraron los valores más altos de actividad inhibitoria específica contra la enzima proteolítica tripsina, utilizando H₂O como medio de extracción.
- Las unidades de inhibición por mg de proteína se incrementaron al llevar a cabo la precipitación con acetona de los extractos crudos, principalmente para la especie *A. farnesiana* y determinante para *N. glauca*.
- El aprovechar las tecnologías de electroforesis 2 D y zimogramas reversos, permitió revelar parcialmente a los IP's detectados en *A. farnesiana*, *B. gracilis* y *N. glauca* por similitud con IP's de diferentes especies ya reportados en Swiss-Prot. Similitudes en su mayoría con inhibidores de serín-proteasas.
- En *A. farnesiana* se evidenció la presencia de dos IP's con *pI* de 7.6 y 9.1, ambos de 11.6 kDa y afines a inhibidores de tripsina de *Acacia confusa* y *Psophocarpus tetragonolobus* para el primero y *Leucaena glauca* para el segundo.
- Para *B. gracilis* se detectaron dos IP's, uno con *pI* de 5.0 y 11.6 kDa, análogo a un inhibidor de subtilisina de *Phaseolus angularis* y el otro con un *pI* de 9.1 y 13.7 kDa, similar a un inhibidor de tripsina/ α -amilasa de *Triticum aestivum*.
- En *N. glauca* se observaron ocho IP's, pudiéndose detectar tres de 22.5 kDa: 1) con un *pI* de 5.9, afín a un tres inhibidores de las familias Oryzaceae, Brassicaceae y Fabaceae. 2) con un *pI* de 6.1, similar a dos inhibidores de serín-proteasas del tubérculo de *Solanum tuberosum* y 3) con un *pI* de 6.7, relacionado con dos inhibidores aspártico proteasas del tubérculo de *Solanum tuberosum*.

Conclusiones

Conclusiones◆————◆

- Finalmente se logró establecer una metodología ágil y confiable que permitió en un corto plazo la exploración de la presencia de IP's potenciales de diferentes especies.

Conclusiones

- Se analizaron semillas, cápsulas y vainas de ocho especies de plantas silvestres, de amplia distribución y endémicas de una región semiárida, encontrándose en las semillas un gradiente diferencial de infestación por insectos fitófagos, en su mayoría de la familia de los Scolytidos.
- Las semillas más susceptibles al ataque de insectos fueron las especies *Nicotiana glauca* y *Acacia farnesiana*. En *Beucarnea gracilis* la infestación fue mínima.
- En las semillas de las tres especies mencionadas se encontraron los valores más altos de actividad inhibitoria específica contra la enzima proteolítica tripsina, utilizando H₂O como medio de extracción.
- Las unidades de inhibición por mg de proteína se incrementaron al llevar a cabo la precipitación con acetona de los extractos crudos, principalmente para la especie *A. farnesiana* y determinante para *N. glauca*.
- El aprovechar las tecnologías de electroforesis 2 D y zimogramas reversos, permitió revelar parcialmente a los IP's detectados en *A. farnesiana*, *B. gracilis* y *N. glauca* por similitud con IP's de diferentes especies ya reportados en Swiss-Prot. Similitudes en su mayoría con inhibidores de serín-proteasas.
- En *A. farnesiana* se evidenció la presencia de dos IP's con *pI* de 7.6 y 9.1, ambos de 11.6 kDa y afines a inhibidores de tripsina de *Acacia confusa* y *Psophocarpus tetragonolobus* para el primero y *Leucaena glauca* para el segundo.
- Para *B. gracilis* se detectaron dos IP's, uno con *pI* de 5.0 y 11.6 kDa, análogo a un inhibidor de subtilisina de *Phaseolus angularis* y el otro con un *pI* de 9.1 y 13.7 kDa, similar a un inhibidor de tripsina/ α -amilasa de *Triticum aestivum*.
- En *N. glauca* se observaron ocho IP's, pudiéndose detectar tres de 22.5 kDa: 1) con un *pI* de 5.9, afín a un tres inhibidores de las familias Oryzaceae, Brassicaceae y Fabaceae. 2) con un *pI* de 6.1, similar a dos inhibidores de serín-proteasas del tubérculo de *Solanum tuberosum* y 3) con un *pI* de 6.7, relacionado con dos inhibidores aspártico proteasas del tubérculo de *Solanum tuberosum*.

Conclusiones

Conclusiones

- Finalmente se logró establecer una metodología ágil y confiable que permitió en un corto plazo la exploración de la presencia de IP's potenciales de diferentes especies.

Bibliografía

Aguirre, C; Valdés-Rodríguez, S; Mendoza- Hernández, G; Rojo-Domínguez, A y Blanco-Labra, A. 2004. A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hypitis suaveolens* L. inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncates* (Coleoptera: Bostrichidae). C Biochem & Physiol, 138: 81-89.

Alves, G. V; Machado, F. M; Camillo, N. J; Marangoni, S y Rodrigues, M. M. L. 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. The Prot J, 23(5): 343-350.

Balestrazzi, A; Confalonieri, M; Odoardi, M; Ressegotti, V; Allegro, G; Tava, A y Carbonera, D. 2004. A trypsin inhibitor cDNA from a novel source, snail medic (*Medicago scutella* L.): cloning and functional expression in response to wounding, herbivore, jasmonic and salicylic acid. Plant Scien, 167: 337-346.

Bauw, G; Nielsen, V. H; Emmersen, J; Nielsen, L. K; Jorgensen, M y Welinder, G. K. 2006. Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. FEBS J, 273: 3569–3584.

Berkelman, T y Stenstedt, T. 2002. 2-D Electrophoresis, principles and methods. Amersham Biosciences.

Bhattacharyya, A; Mazumdar, S; Leighton, M. S y Babu, R. C. 2006. Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. Phytochem, 67: 232–241.

Blanco-Labra, A; Chagolla-López, A; Martínez-Gallardo, N; Valdés-Rodríguez, S. 1995. Further characterization of the 12 kDa protease / alpha amylase inhibitor present in maize seeds. J. Food Biochem. 19, 27-41.

Borges, M. R. 2005. Do plants and animals differ in phenotypic plasticity?. J. Biosci, 30 (1): 41–50.

Bradford, J. K. 2004. Seed Production Quality. Spring, USA.

Calderon, L. A; Teles, R. C. L; Leite, J. R. S. A; Franco, O. L; Grossi-de-Sá, M. F; Medrano, F. J; Bloch, C. Jr y Freitas, S. M. 2005. Purification of a 6.5 kDa protease inhibitor from amazon *Inga umbratica* seeds effective against serine proteases of the boll weevil *Anthonomus grandis*. Prot & Peptide Let, 2005 (12): 583-587 583.

Campos, J. E; Martínez, G. N; Mendiola, O. E y Blanco, L. A. 1997. Purification and partial characterization of a proteinase inhibitor from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) seeds. J Food Biochem, 21: 203-218.

Campos, J. E; Whitaker, J. R; Yip, T. T; Hutchens, W. T y Blanco-Labra, A. 2004. Unusual structural characteristics and complete aminoacid secuencias of a protease inhibitor from *Phaseolus acutifolius* seeds. Plant Physiol & Biochem, 42: 209-214.

Campos, C. J. E. 1994. Purificación y caracterización de un inhibidor de proteasas presente en frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*). Tesis de Maestría, Cinvestav 76 p.

- Carlini, R. C y Grossi-de-Sá, M. F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Tox*, 40: 1515–1539.
- Delgado, V. F; López, V. H. E; Valdés, R. S; Blanco, L. A; Chagolla, L y López, V. E. J. 2004. Isolation and properties of a Kunitz-Type protein inhibitor obtained from *Pithecellobium dulce* seeds. *J. Agric. Food Chem*, 52: 6115-6121.
- De Leo, F; Volpicella, M; Licciulli, F; Liuni, S; Gallerani, R y Ceci, L. R., 2002. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucl. Acids Res*, 30, 347–348.
- Doares S.H; Narvaez-Vasquez J; Conconi A; Ryan C y Clarence C.A. 1995. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol*, 108:1741–1746.
- Finnie, C; Bak-Jensen, K. S; Laugesen, S; Roepstorff, P y Svensson, B. 2006. Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome. *Plant Sci*, 170: 808–821.
- García, A. V; Freire, M. M; Novelo, J. C; Marangoni, S y Macedo, R. L. 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization and activity against pest proteases. *The Prot J*, 23 (5): 343-350.
- García, P. H. M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ Diag*, 1 (2): 31-41.
- Giri, A.P; Harsulkar, A.M; Ku, M.S.B; Gupta, V.S; Deshpande, V.V; Ranjekar, P.K y Franceschi, V.R. 2003. Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinases from winged bean seeds. *Phytochem*, 64 (5): 523-532.
- Glawe, G. A; Zavala J. A; Kessler A; Van Dam N. M y Baldwin I. T. 2003. Ecological costs and benefits correlated with trypsin protease inhibitor production in *Nicotiana attenuata*. *Ecol*, 84, 79.
- Görg, A; Obermaier ,C; Boguth, G; Harder, A; Scheibe, B; Wildgruber, R y Weiss, W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21: 1037–1053.
- Heidel, A. J y Baldwin, I. T. 2004. Microarray analysis of salicylic acid and jasmonic acid-signalling in responses of *Nicotiana attenuata* to attack by insects from multiple feeding guilds. *Plant, Cell & Environ*, 27 (11): 1362-1365.
- Jongsma, M.A y Boulter, C.J.1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J Insect Physiol*, 43: 885–895.
- Kane, A. L; Yung, K.C; Agnetti, G; Neverova, I y Van Eyk, J. 2006. Optimization of paper bridge loading for 2-DE análisis in the basic pH region: Application to the mitochondrial subproteome. *Proteom*, 6: 5683–5687.
- Kessler, A y Baldwin, I, T. 2002. Plant responses to insect herbivory. *Annu. Rev. Plant Biol*, 53: 299–328.

Konarev, V. A; Anisimovab, N. I; Gavrilovab, V. A; Vachrushevab, T. E; Konechnayac, Y.G; Lewisd, M y Shewry, R.P. 2002a. Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. *Phytochem*, 59 (3): 279-291.

Konarev, V. A; Tomooka, N. y Vaughan, A. D. 2002b. Proteinase inhibitor polymorphism in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its biosystematic implications. *Euph*, 23: 165–177, 2002.

Kowalska, J; Zabłocka, A y Wilusz, T. 2006. Isolation and primary structures of seven serine proteinase inhibitors from *Cyclanthera pedata* seeds. *Biochim & Biophys Act*, 1760:1054–1063.

Laskowski, Jr, M y Qasim, A. M. 2000. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?. *Biochim & Biophys Act*1477: 324-337.

Lawrence, K. P y Koundal, R . K. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Elec J Biotech*, 5 (1): 93-109.

Lehninger, A., Nelson, D. y Cox, M. (2001). *Principios de Bioquímica*. 3a. ed. Omega.

Marouga, R; Stephen, D y Hawkins, E. 2005. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*, 382: 669–678

Masanobu, D; Shingo, Y; Seijiro, S and Shigeyuki, T. 2004. Multigene family for Bowman-Birk type proteinase inhibitor of wild soja and soybean: the presence of two BBI-A genes and psedogenes. *Biosci Biotechnol & Biochem*, 68 (86): 1279-1286.

Mello, O. M; Tanaka, S. A y Silva-Filho, C. M. 2003. Molecular evolution of Bowman–Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. *Mol Phylog & Evol*, 27: 3–112.

Mikola M. 2001. Electrophoretic studies on endoproteinase of oat grain. EKT series 1219. University of Helsinki. Department of Food Technology. 58 pp.

Miranda, M. E; Liébana, H. E; López, A. M; Mendoza de Gives, P y Cossío, B. R. 2006. Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nemátodo parásito gastroentérico de rumiantes *Haemochus contortus*. *Bioq*, 31 (1): 6-12.

Mosolov, V. V; Grigor'eva, I. L y Valueva, A. T. 2001. Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins. *App Biochem & Microbiol*, 37 (6): 545–551.

Murray, R. D. 1984. *Seed physiology. Development*. Vol. 1, Academic Press. 217p.

Nanasaheb P. C; Vandana K. H; Pavanjeet J. C; Ashok P. G y Manvendra S. K. 2003. Differential inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases by proteinase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and its wild relatives. *Phytochem*, 64 (3): 681-687.

Nikolay, S. 2003. Protease inhibitor mediated resistance to insects. Ph.D. Thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.135 p.

Oliva, V. M. L; Souza-Pinto, J. C; Batista, F. C. I; Araujo, S. M; Silveira, F. V; Ennes A. Auerswald c, Reini Mentele. 2000. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema¹. *Biochim & Biophys Acta* 1477: 64-74.

Orcutt, M. A y Nilsen, T. E. 2000. *Physiology of plants under stress. Soil and biotic factors.* Jonh Wiley & Sons. INC. 684 p.

Otlewski, J; Jelen, F; Zakrzewska, M y Oleksy, A. 2005. The many faces of protease–protein inhibitor interaction. *The EMBO J*, 24: 1303–1310.

Rakwal, R; Agrawal, K. G y Jwa, N-S. 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene*, 263: 189-198.

Richardson, M. 1991. *Seed storage proteins: The enzyme inhibitors in methods in plant biochemistry.* Ed. L. Rogers. Academia Press. 305 p.

Rodrigues, M. M. L; Mara de Sá, C; Machado, F. M y Postali, P. J. R. 2004. A Kunitz- tipe inhibitor of Colepteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food. Chem*, 52: 2533-2540.

Ryan, C.A., 1990. Proteinase inhibitors in plants, Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann Rev Phytopathol* 28: 425–449.

Ryan, C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim & Biophys Acta*, 1477: 571-575.

Satoshi, M; Tadashi, K; Hidetaka, H y Toshiaki, M. 2002. Technical improvement to 2D-Page of rice organelle membrane proteins. *Biosci Biotechnol & Biochem*, 66 (5):1170-1173.

Schwartz, G. W y Takenaka, Y. A. 1955. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin activity. *Biochim & Biophys Acta*, 16 (1-2): 112-121.

Schuler, T.H; Poppy, G.M; Kerry, B.R and Denholm, I. 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotech*, 16:168–175.

Shagger, H y Von-Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilimide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166: 368-379.

Shatters, G. R; Bausher, G. M; Hunter, B. W; Chaparro, X. J; Dang, M. P; Niedz, P. R; Mayer, T. R; McCollum, T. G y Sinisterra, X. S. 2004. Putative protease inhibitor gene discovery and transcript profiling during fruit development and leaf damage in grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Gene*, 326: 77–86.

Sheen, H y Ali-Khan, Z. 2005. Protein sample concentration by repeat loading onto SDS-PAGE. *Anal Biochem*, 343: 338-340.

