



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

Purificación y caracterización parcial de proteasas digestivas tipo tripsina presentes en el insecto *Prostephanus truncatus*

Tesis que presenta

IBT. Viviana Villalobos Murillo

Para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Biotecnología de Plantas

Director de la Tesis: Dr. Alejandro Blanco Labra

Irapuato, Guanajuato

Agosto, 2017

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de maestría otorgada para desarrollar este trabajo.

Al Cinvestav Unidad Irapuato por todas las facilidades para llevar a cabo la investigación.

A Javier Luévano y a todo el personal del insectario Cinvestav Unidad Irapuato, quienes proporcionaron el material biológico necesario para trabajar en el desarrollo de este proyecto.

A mi tutor, el Dr. Alejandro Blanco Labra, por haberme permitido colaborar con su equipo de trabajo, por todo el conocimiento transmitido tanto académico como personal, por impulsarme a crecer en el ámbito científico y por su confianza y apoyo para culminar este trabajo.

A mi comité de evaluación el Dr. Neftalí Ochoa y la Dra. Therese Markow, por sus valiosas aportaciones y su excelente disposición durante el desarrollo de este proyecto.

A Bety, quien participó activamente durante todo el desarrollo experimental, agradezco sus consejos y apoyo. A Jimena, por el trabajo realizado durante una parte del proceso experimental.

Al Laboratorio de Mecanismos de defensas de las plantas, Raque, Oli, Richie, Octavio, Carmen, Andrea, Marianita, Iovanna, Dania, que contribuyeron con consejos, guía, apoyo y quienes me brindaron su amistad e hicieron que este trayecto fuera más ameno. Por “las horas de café” y el tiempo compartido.

A Pandits, quien me apoyó durante la maestría, tanto personal como académicamente. Gracias por tus conocimientos brindados para el análisis de datos de espectrometría de masas. Pero sobre todo gracias por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del Cinvestav.

A mis amigos Jules, Ina, Chino, Kevin, Celso, Vlad, Shini, Mary, Shei, excelentes seres humanos, compañeros de estudio, de fiestas y de viajes, quienes me apoyaron en las buenas y en las malas, con los que aprendí, me divertí y compartí grandes cosas. ¡Gracias por su amistad!

A mi familia, mis hermanos Carlos e Ivan, por las vivencias a lo largo de mis 26 años de vida. Y por supuesto a mis padres, Roselia y Carlos, quienes me han apoyado incondicionalmente para llegar a ser lo que hasta ahora soy, por permitirme estudiar y enseñarme grandes cosas, por brindarme fortaleza, por su apoyo y todo su amor. Gracias familia, los amo.

El presente trabajo de maestría se realizó en el Laboratorio de Mecanismos de Defensa de las plantas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Alejandro Blanco Labra; fungiendo como asesores el Dr. Neftalí Ochoa Alejo y la Dra. Therese A. Markow

Contenido general

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Cereales y su importancia económica	3
Daños a cultivos de interés	3
Biología y ecología del insecto plaga <i>P. truncatus</i>	5
Morfología del insecto	5
Distribución geográfica de <i>P. truncatus</i>	6
Magnitud del problema/Status de plaga y pérdidas	7
Estrategias de control	8
Antecedentes.....	10
Proteasas.....	10
Clasificación de proteasas.....	10
Mecanismo de acción de las proteasas	12
Serín proteasas	13
Proteasas en insectos	15
Proteasas en genomas de insectos.....	17
Inhibidores de proteasas (IP's)	20
Clasificación de inhibidores de proteasas.....	20
Justificación.....	22
Objetivos.....	24
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Materiales y métodos	24
Reactivos y enzimas	24
Modelo de estudio.....	25
Purificación de proteasas tipo tripsina	25
Precipitación secuencial y extracción de proteasas digestivas.....	25
Localización de proteasas presentes en <i>P. truncatus</i>	27
Determinación de proteína total y medición de la actividad proteolítica	27
Separación de proteínas	28
Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH).....	28

Diálisis	29
Separaciones electroforéticas.....	29
Análisis post electroforético de la actividad proteolítica	30
Análisis por espectrometría de masas de alta resolución	31
Efecto de los inhibidores de proteasas sobre las proteasas tipo tripsina de <i>P. truncatus</i>	33
Resultados.....	33
Purificación de proteasas tipo tripsina	33
Precipitación secuencial.....	33
Localización de proteasas presentes en <i>P. truncatus</i>	35
Separación de proteínas	36
Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH).....	36
Análisis por espectrometría de masas	38
Análisis de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas	39
Efecto de los inhibidores de proteasas sobre las proteasas tipo tripsina de <i>P. truncatus</i>	45
Discusión	46
Optimización de la precipitación secuencial de serín proteasas digestivas de <i>Prostephanus truncatus</i>	46
Localización de proteasas presentes en <i>P. truncatus</i>	48
Separación de proteínas	48
Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH).....	48
Análisis por espectrometría de masas	48
Conclusiones	50
Referencias	51

Contenido de Figuras

Figura 1: Morfología de <i>Prostephanus truncatus</i> . a) vista dorsal; b) cabeza del insecto, vista frontal; c) vista lateral; d) protórax (Graham 2005).	6
Figura 2: Distribución mundial de <i>P. truncatus</i> (EPPO 2011).....	7
Figura 3: Nomenclatura estándar para residuos de sustrato y sus correspondientes sitios de unión. El sustrato se representa por la cadena polipeptídica dentro de la enzima (representada por los extremos que rodean al sustrato). Se enfatizan los sitios de interacción potenciales del sustrato (indicados con la letra P) con las cavidades de la enzima (cavidades S). El enlace escindible en el sustrato (marcado por la flecha) es el punto de referencia (Castro-Guillén 2012; Schechter & Berger 1968).....	11
Figura 4: Mecanismo de acción de las proteasas. (a) Serín proteasas, (b) cisteín proteasas, (c) aspártico proteasas y (d) metaloproteasas (Erez et al. 2009).	13
Figura 5: Representación de cinta de la tripsina (2PTN) (25), del N-terminal (violeta) a la C-terminal (rojo) (Di Cera 2009)	15
Figura 6: Protocolo para obtención de larvas del insecto <i>P. truncatus</i>	25
Figura 7: Precipitación secuencial con sulfato de amonio de un extracto crudo de larvas de <i>P. truncatus</i> . —●— Actividad tipo tripsina y —◆— concentración de proteína total (µg/mL).....	34
Figura 8: Electroforesis SDS-PAGE Schägger y zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina. EC= Extracto Crudo.	35
Figura 9: Zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina de intestinos disectados (I) y larvas completas (L) de <i>P. truncatus</i>	36
Figura 10: Actividad proteolítica obtenida de las fracciones de CIH.	37
Figura 11: Electroforesis SDS-PAGE y zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina de muestra proveniente de CIH.	37
Figura 12: Electroforesis SDS-PAGE de muestra proveniente de CIH, para análisis por espectrometría de masas de alta resolución.....	38
Figura 13: Alineamientos del péptido 2 en la base de datos MEROPS. La barra de colores indica el valor esperado en cada alineamiento.....	43
Figura 14: Electroforesis SDS PAGE y zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina para el extracto de CIH utilizando inhibidores de proteasas. Control E= Control del extracto enzimático, Control I= Control de Inhibidores (TBPI o Frijol Tépari), Complejo E-I TBPI= complejo formado entre la enzima en estudio y el TBPI recombinante, Complejo E-I_A= Complejo formado entre la enzima en estudio y el inhibidor purificado a partir de frijol tépari.	45

Resumen

Prostephanus truncatus (Horn) es un insecto barrenador que causa grandes pérdidas en productos almacenados, sobre todo en maíz y yuca seca; se trata de una plaga originaria de América central, que se introdujo accidentalmente en el Este de África a finales de los 1970's. Este insecto posee enzimas digestivas de la familia serín proteasas, las cuales se encuentran involucradas en diversos procesos de desarrollo y protección del insecto, dichas proteasas son blanco de estudio ya que pueden ser clave para desarrollar mecanismos para el control sobre la plaga.

En este trabajo se purificó parcialmente un conjunto de proteasas digestivas tipo tripsina, mediante una combinación de técnicas como extracción líquida, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de interacción hidrofóbica y ultrafiltración, que permitieron obtener los pesos moleculares de las proteasas, las cuales se encuentran entre 20-50kDa. Además, se logró caracterizar el comportamiento del complejo enzima-inhibidor, mediante zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina, utilizando dos inhibidores obtenidos a partir de frijol tépari. Aunado a esto, se comprobó mediante análisis por espectrometría de masas, que un fragmento del conjunto de enzimas obtenido pertenece a la subfamilia S1A de las proteasas tipo tripsina.

Los resultados obtenidos aportan información útil sobre el sistema de proteasas digestivas en el insecto, con estos datos, se podrán proponer nuevas estrategias basadas en este tipo de conocimiento.

Abstract

Prostephanus truncatus (Horn) is a borer insect that causes large losses in stored products, especially in maize and dry cassava. It is a pest native to Central America, which was accidentally introduced in East Africa in the late 1970's. Among others, this insect possesses digestive enzymes of the serine protease family, which are involved in insect's development and protection processes, these proteases have become a target of study as they may be key to develop mechanisms for pest control.

In this work, a set of digestive trypsin-like protease was partially purified by a combination of techniques such as liquid extraction, ammonium sulfate precipitation, hydrophobic interaction chromatography and ultrafiltration, which allowed us to obtain the molecular weights of the proteases, between 20-50kDa. In addition, it was possible to characterize the interaction of these enzymes with different protease inhibitors by zymography of trypsin-like proteolytic activity. Finally, it was found by mass spectrometry analysis that a fragment of the enzyme set obtained belongs to the subfamily S1A of trypsin-like proteases.

The results obtained provide useful information about the system of digestive proteases in the insect, which could help to set the basis for a new strategy to combat this pest.

Introducción

Cereales y su importancia económica

Los cereales son plantas que pertenecen a la familia de las gramíneas, los cuales se han cultivado durante milenios. Sus semillas comestibles tienen un papel importante en la dieta humana y son la fuente principal de calorías para la mayoría de las poblaciones (Awika 2011).

De acuerdo a las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se estima que la producción mundial total de cereales para el 2017-2018 será aproximadamente de 2,597 millones de toneladas; entre los principales productos agrícolas de interés se encuentran el maíz, frijol, trigo, arroz y sorgo (FAO 2017).

Se ha puesto especial interés en la producción de cereales debido al crecimiento esperado de la población mundial; por ello, los sistemas agrícolas deberán experimentar grandes cambios, con el fin de satisfacer las crecientes necesidades de alimentos de más de 6,000 millones de personas para el año 2050 (Tilman 2002).

Daños a cultivos de interés

Los insectos son las especies más diversas de animales sobre la tierra; aunque este gran número de insectos ha explotado casi todos los nichos en el medio terrestre, sólo una pequeña proporción de especies (alrededor del 5%) se ha convertido en plagas graves (Busvine 1980). Un insecto puede convertirse en una plaga cuando éste ocasiona daños al hombre, a sus cultivos, animales o a sus propiedades. En la agricultura, un insecto puede clasificarse como plaga si el daño que causa a un cultivo es suficiente para reducir significativamente el rendimiento y/o la calidad del producto cosechado (Dent 2000).

Las plagas son capaces de infestar los productos agrícolas en cualquiera de las etapas de desarrollo del cultivo y durante el almacenamiento de sus productos, atacando cualquier parte de la planta (García-Lara et al. 2007) Por ejemplo, algunas especies se alimentan del

endospermo causando pérdida de peso y calidad del grano, además se les asocia a enfermedades y otros riesgos sanitarios, como la presencia de hongos y toxinas.

Después que el cultivo es cosechado, éste es sometido a una serie de operaciones que, de realizarse de manera inapropiada, puede resultar en pérdidas severas (Sallam 1999). Los productos almacenados son una fuente de alimento ideal para los insectos, y la mayoría de las plagas de almacenamiento son capaces de aumentar drásticamente en número dentro de un tiempo relativamente corto (García-Lara et al. 2007). Debido al daño causado por los insectos, los granos pierden valor para la comercialización, el consumo o la siembra (Sallam 1999).

Dos grandes grupos de insectos contienen las mayores plagas post-cosecha de cultivos económicamente importantes: coleópteros (escarabajos) y lepidópteros (mariposas y polillas) (Sallam 1999). Existen algo más de 25 especies pertenecientes a los órdenes coleóptera y lepidóptera; de éstas, alrededor de 15 son las de mayor importancia. Los coleópteros son el orden de insectos más grande y contiene las plagas de productos almacenados más importantes. Los conocidos comúnmente como gorgojos barrenadores de los granos, clasificación a la que pertenece *P. truncatus*, son insectos que atacan vorazmente a los cereales y sus productos. Los adultos originan perforaciones en los granos y producen polvo abundante; las larvas se alimentan del endospermo, comen el interior del grano dejando la cubierta (Valdes et al. 2000).

El grano de maíz es una fuente importante de carbohidratos y proteínas, por lo que representa una fuente de alimento importante para diversos grupos sociales. Además, es el cultivo con mayor producción a nivel mundial. Aunque el maíz es originario de Mesoamérica, se puede adaptar a diferentes ambientes y hoy en día su consumo es a nivel mundial (García-Lara et al. 2007).

El constante ataque de insectos y de patógenos sobre las plantas y granos almacenados, produce pérdidas económicas muy elevadas. Se estima que en México existe una pérdida anual entre el 20% y el 50% de los principales granos y semillas, tales como maíz, frijol, trigo,

entre otros (CIMMYT 2013). Por ello, los agricultores han tenido que recurrir al uso intensivo de pesticidas para garantizar la disponibilidad de granos en la cantidad y calidad requeridas (Blanco-Labra & Aguirre Mancilla 2002).

Biología y ecología del insecto plaga *P. truncatus*

Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) o barrenador mayor de los granos es una plaga grave de los productos almacenados de maíz y yuca seca (Hodges 1994).

La comunidad científica internacional ha puesto gran atención para realizar investigación sobre este insecto como plaga asociada a cereales y tubérculos almidonosos almacenados (Nansen & Meikle 2002). Las condiciones óptimas para el desarrollo del insecto en maíz son aproximadamente 32 °C y 70-80% de humedad relativa; bajo estas condiciones, el periodo mínimo de desarrollo reportado es de 24 días en maíz molido o en los granos enteros (Dick 1988).

Morfología del insecto

Prostephanus truncatus pertenece a la familia Bostrichidae, los cuales son conocidos como falsos escarabajos pulverizadores. Su cabeza curvada, sus fuertes mandíbulas y la forma cilíndrica de su cuerpo son características típicas de los insectos xilófagos (Figura 1). El protórax largo protege la cabeza durante la perforación de granos y provee un gran soporte para los músculos de la mandíbula. *Prostephanus truncatus* tiene una gran habilidad para penetrar a través de material muy resistente y duro (Nansen & Meikle 2002).

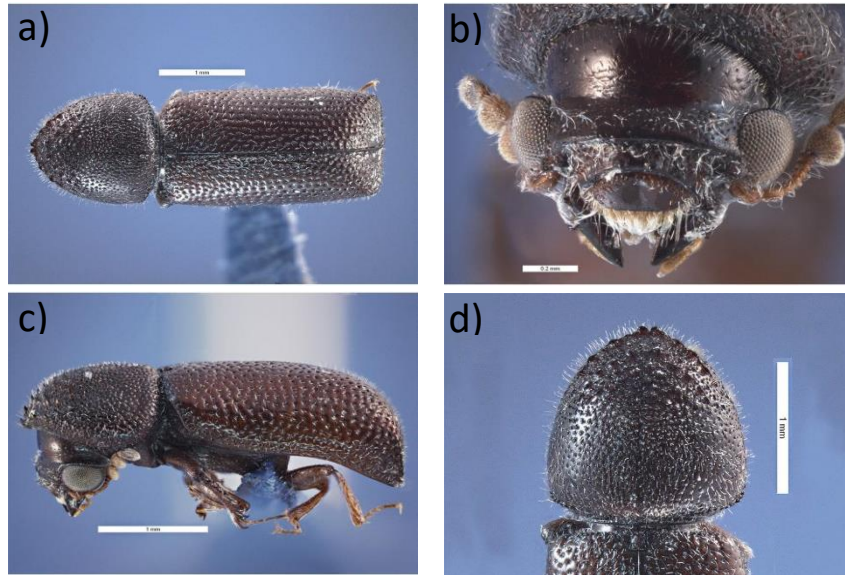


Figura 1: Morfología de *Prostephanus truncatus*. a) vista dorsal; b) cabeza del insecto, vista frontal; c) vista lateral; d) protórax (Graham 2005).

Distribución geográfica de *P. truncatus*

El insecto es nativo de América central, pero se introdujo accidentalmente en África, siendo Tanzania y Togo los países responsables de la dispersión de la plaga a finales de los 70's, causando grandes pérdidas económicas (Armienta-Aldana et al. 2003). Desde entonces, se ha reportado en al menos 14 países de ese continente, esto debido a que el maíz es ampliamente distribuido a lo largo de muchas rutas (Nansen & Meikle 2002; Hodges 1994).

La distribución actual de *Prostephanus truncatus* es muy amplia y es considerado una de las mayores plagas de almacenamiento en México, América Central y en el centro y sur de África (Figura 2).

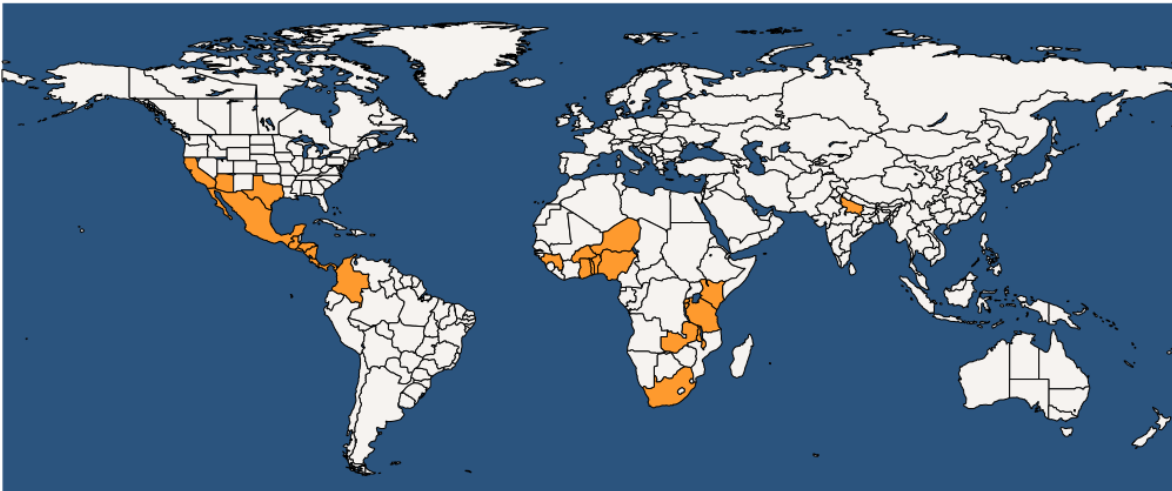


Figura 2: Distribución mundial de *P. truncatus* (EPPO 2011)

Magnitud del problema/Status de plaga y pérdidas

P. truncatus se ha convertido en una plaga grave de maíz y yuca seca que puede atacar tanto a productos almacenados, como a los cultivos en crecimiento; la seriedad del problema varía dependiendo del país o la región afectada, esto debido a las condiciones ambientales, los tratamientos postcosecha, entre otros (Hodges 1986).

Los productos infestados son destruidos físicamente debido a que los adultos de *P. truncatus* barrenan los granos de maíz y producen grandes cantidades de harina, de donde sus larvas se alimentan y pupan (Sallam 1999). También se conoce que la yuca seca almacenada es fuertemente atacada por este insecto; además, esta especie ha probado ser altamente tolerante a contenidos bajos de humedad relativa en los granos, las pérdidas del producto pueden ser de hasta el 50% del total en un plazo de 8 meses o menos (Muantinte et al. 2014).

El barrenador mayor de los granos también ataca a otros productos almacenados como trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), garbanzo (*Cicer arietinum*), papas (*Solanum tuberosum*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y muchos otros cultivos de leguminosas, incluso ha llegado a atacar madera de árboles y viviendas (Muantinte et al. 2014).

Existen diferencias varietales en la susceptibilidad de maíz a *P. truncatus* debido a que los granos más duros, como los de maíz palomero, sufren menos daños, pero no son

inmunes al ataque de insectos (Hodges 1986). La introducción de *P. truncatus* como insecto plaga ha mermado la economía de muchos países, especialmente de aquellos que dependen de la exportación del maíz, ya que muchos países se rehúsan a importar maíz de áreas infestadas con el barrenador mayor de los granos (Sallam 1999).

Estrategias de control

Se han propuesto métodos de control para diferentes estadios de desarrollo de *P. truncatus*, desde etapas larvales hasta insecto adulto, debido a que existe la posibilidad de una dispersión accidental de la plaga, y por lo tanto grandes pérdidas de cultivos que se reflejan en pérdidas económicas.

Los métodos de prevención y sanidad consisten de manera indirecta, en reglas generales de limpieza y procesamiento del grano (Valdes et al. 2000). Algunas de las técnicas utilizadas como métodos de prevención contra plagas, comienzan desde la forma en que se almacenan los cultivos después de la cosecha. Tradicionalmente, las mazorcas se someten a humo y a altas temperaturas, el calor hace que las cáscaras más externas de los granos de maíz se quemen, lo que ayuda a desinfectarlo para su almacenamiento (Golob 2002).

En los métodos directos, se utiliza algún agente químico, físico, mecánico y/o biológico, presentando cada uno ventajas y desventajas. Los agricultores tienen la necesidad de almacenar las semillas que seleccionan de un ciclo a otro y, para combatir las plagas de granos almacenados, invierten gran cantidad de dinero en fumigaciones e insecticidas sintéticos (Valdes et al. 2000). En muchos países, los insecticidas organofosforados, disponibles ya sea en forma de polvos o emulsiones concentradas para aplicarse en forma de "spray", son recomendados para proteger a las semillas en almacenamiento a largo plazo; a pesar de que los resultados han sido satisfactorios contra algunos de los insectos plaga primarios, el costo-beneficio no es el esperado, ya que disminuyen la calidad de los productos, aumentan los costos de almacenaje, no son efectivos a corto plazo y eventualmente existe resistencia adquirida por los insectos (Golob 2002; Valdes et al. 2000).

Como una plaga exótica que brotó en América y se dispersó rápidamente en África, *P. truncatus* se convirtió en un candidato para el control biológico clásico. La Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos define control biológico como la utilización de organismos naturales o modificados, genes o productos génicos, para reducir los efectos de organismos indeseables (plagas) y para favorecer organismos útiles para el ser humano, tales como cultivos, árboles, animales y microorganismos benéficos (Bellows & Fisher 1999).

El objetivo del control biológico, es una disminución significativa en la densidad de la plaga objetivo, en este caso la incidencia y la acumulación de la población de *P. truncatus* en almacenes de granos, sin afectar ambientes circundantes, cuidando la calidad del grano y haciéndolo un método accesible para la mayoría de los agricultores (Meikle et al. 2002).

Tomando en consideración el enorme impacto ecológico y el riesgo a la salud del ser humano por los agroquímicos utilizados (Haq et al. 2004), se han propuesto tratamientos alternativos de control biológico de *P. truncatus* que incluyen el uso de su depredador natural, *Teretrius nigrescens* (Schneider et al. 2004), la utilización de hongos entomopatógenos (Smith et al. 2006), el empleo de extractos de plantas (Popoola & Hassan 2011), así como la combinación de una variedad de maíz resistente y su depredador (Bergvinson & García-Lara 2011); todos ellos con resultados promisorios, pero cuya incidencia sobre la solución del problema clave aún no han sido completamente satisfactorios.

Alternativa para el control de P. truncatus

Actualmente, la protección de cultivos ante *P. truncatus* se basa principalmente en el uso exclusivo e intensivo de pesticidas químicos, lo que favorece que las plagas desarrollen resistencia, además de que disminuye su especificidad (Jamal et al. 2013). Aunado a lo anterior, los altos costos de los métodos de control, así como la preocupación del público y la comunidad científica por los daños que causan los insecticidas al ambiente, se han estudiado mecanismos alternos que puedan ser capaces de controlar esta plaga (Terra & Ferreira 2012).

Las plagas de insectos y los microorganismos patógenos utilizan enzimas proteolíticas para la digestión de proteínas. Como consecuencia de la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa que ayudan a contraatacar dichos agentes externos, mediante la síntesis constitutiva e inducida de inhibidores de proteasas (IP's). Los IP's presentan actividad tóxica contra patógenos; por lo tanto, pueden ayudar a inhibir enzimas digestivas del insecto, lo cual tendría efecto específicamente sobre la asimilación de alimentos, crecimiento y reproducción del insecto plaga (Castro-Guillén et al. 2012; Jamal et al. 2013).

Por ello, se ha puesto especial interés en el estudio bioquímico del intestino de insectos, debido a que se considera como un blanco potencial para el control de la plaga (Terra & Ferreira 2012).

Antecedentes

Proteasas

Un genoma típico contiene de 2-4% de genes que codifican a enzimas proteolíticas. Entre éstas, las proteasas, también denominadas peptidasas, surgieron durante la evolución como el grupo más abundante y funcionalmente diverso. Se caracterizan por romper el enlace peptídico de las proteínas y se dividen en dos grandes grupos: las endopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos internos de una proteína, y las exopeptidasas, que fragmentan aminoácidos externos de la cadena (Di Cera 2009; Müller-Esterl 2008).

La proteólisis juega un rol importante en muchos procesos biológicos tales como la digestión, el recambio de proteínas y la defensa contra patógenos (Runeberg-Roos et al. 1994).

Clasificación de proteasas

En la actualidad, más de 140,000 proteasas de diferentes orígenes, se han registrado en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>). La clasificación jerárquica, que

se estableció para las proteasas en 1993 y para los inhibidores de proteasas en 2004, implica el agrupamiento de conjuntos homólogos de proteasas y secuencias inhibitoras de la proteína, que luego se agrupan en familias y que a su vez se agrupan en clanes (Rawlings et al. 2016). De acuerdo a esta clasificación se dividen en serín, cisteín, aspártico, metalo y glutámico proteasas, las cuales son nombradas de acuerdo al mecanismo de acción con que efectúan la catálisis. De las anteriores, únicamente las cuatro primeras clases han sido reportadas formando parte de los procesos digestivos de los insectos (Wagner et al. 2002; Terra & Ferreira 2012).

La nomenclatura estándar utilizada para designar los residuos de aminoácidos tanto del sustrato, como de la enzima que interaccionan en la hidrólisis, se nombra con referencia al enlace peptídico que es hidrolizado como P1, P2, P3..., Pn en dirección al N-terminal y P1', P2', P3'..., Pn' en dirección al C-terminal del péptido; mientras que los subsitios correspondientes en la enzima, se nombran como S1, S2, S3..., Sn y S1', S2', S3'..., Sn', respectivamente, como se muestra en la Figura 3 (Schechter & Berger 1968; Hedstrom 2002).

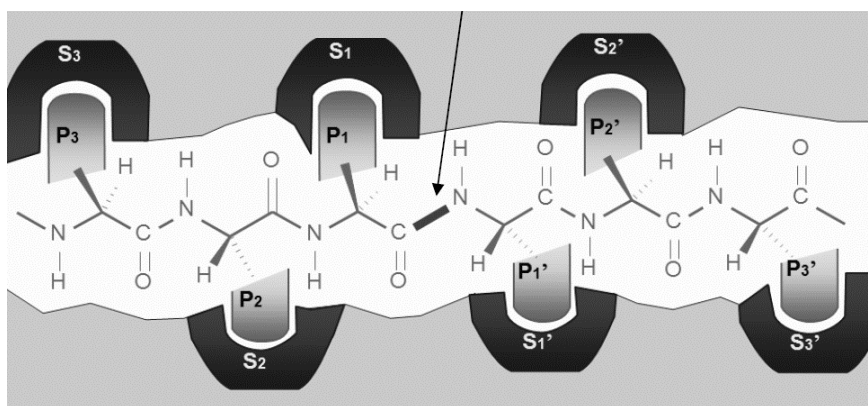


Figura 3: Nomenclatura estándar para residuos de sustrato y sus correspondientes sitios de unión. El sustrato se representa por la cadena polipeptídica dentro de la enzima (representada por los extremos que rodean al sustrato). Se enfatizan los sitios de interacción potenciales del sustrato (indicados con la letra P) con las cavidades de la enzima (cavidades S). El enlace escindible en el sustrato (marcado por la flecha) es el punto de referencia (Castro-Guillén 2012; Schechter & Berger 1968).

Mecanismo de acción de las proteasas

Los polipéptidos pueden escindirse tanto química como enzimáticamente. Las enzimas que catalizan la escisión hidrolítica de los enlaces peptídicos se denominan proteasas y se dividen en cuatro clases mecanicistas principales: serín, cisteín, aspártico y metaloproteasas (Erez et al. 2009).

En la hendidura del sitio activo catalítico se encuentran los grupos químicos que realizan la catálisis. Así, por ejemplo, en las serín proteasas (Figura 4a), la serina catalítica adquiere su reactividad por la interacción con otros dos aminoácidos, formando una triada catalítica entre la serina (Ser195, nucleófilo), la histidina (His57, base) y el aspártico (Asp102, electrófilo); dicha triada se encuentra altamente conservada a través de la evolución en muchos organismos (Di Cera 2009). Cada uno de estos tres aminoácidos tiene un papel importante en el mecanismo de la proteasa. La histidina, con la ayuda del aspartato que retira protones, desprotona el hidroxilo de la serina, lo que permite un ataque nucleofílico sobre el carbono del carbonilo del sustrato. La segunda característica de las serín proteasas es un agujero de oxianión, que estabiliza el estado de transición tetraédrico (Polgár 2013; Erez et al. 2009; Hedstrom 2002).

El mecanismo de las cisteín proteasas (Figura 4b) es similar al de las serín proteasas en el uso de un nucleófilo fuerte y la formación de un complejo enzima-sustrato covalente. Sin embargo, el nucleófilo es el átomo de azufre de un residuo de cisteína, en oposición al átomo de oxígeno de una serina. Las aspártico proteasas (Figura 4c) contienen dos residuos de ácido aspártico que actúan en un mecanismo ácido-base general. Una molécula de agua coordinada entre los ácidos aspárticos es activada por la abstracción de un protón, permitiendo que el agua polarizada ataque el carbono carbonílico del enlace escindible del sustrato. Las metaloproteasas (Figura 4d) utilizan un metal coordinado, generalmente zinc, en su mecanismo catalítico. En muchas metaloproteasas solubles, la coordinación se realiza mediante tres histidinas, o dos histidinas y una cadena lateral ácida. Una molécula de agua que sirve como un ligando de zinc adicional está unida a hidrógeno a un glutamato, que

abstrae un protón de la molécula de agua atacante. El propio ion zinc estabiliza el oxianión (Erez et al. 2009).

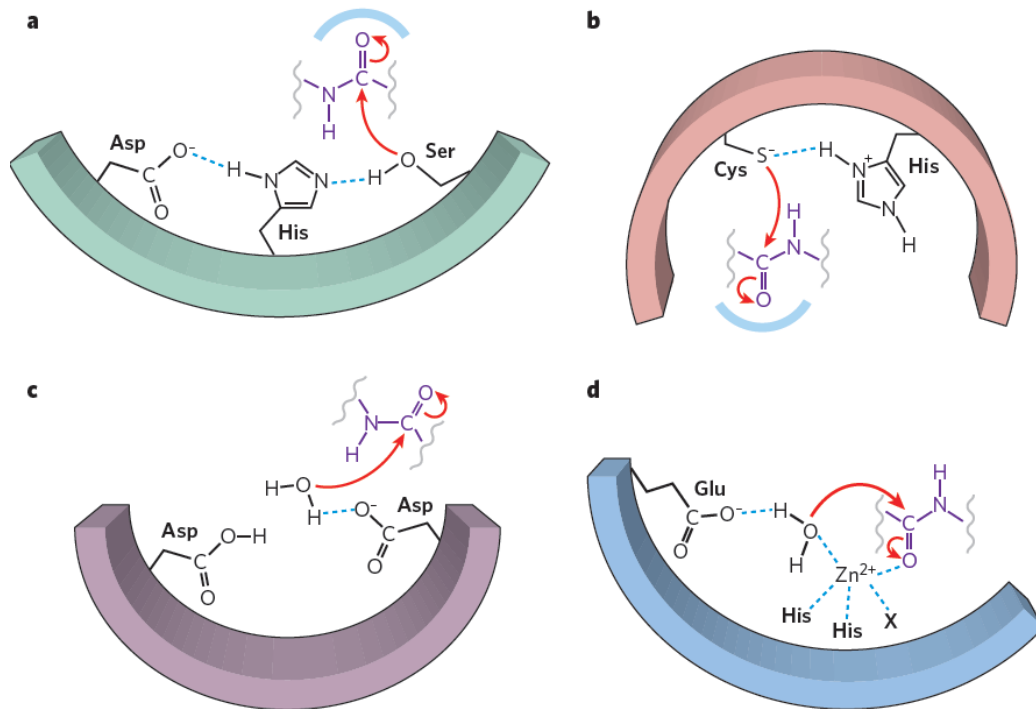


Figura 4: Mecanismo de acción de las proteasas. (a) Serín proteasas, (b) cisteín proteasas, (c) aspártico proteasas y (d) metaloproteasas (Erez et al. 2009).

Serín proteasas

Más de un tercio de todas las enzimas proteolíticas conocidas son serín proteasas. Existen en total alrededor de 50 familias que se distinguen basados en las secuencias de aminoácidos, a su vez se agrupan a la mayoría de estas familias en 14 clanes mediante la comparación de estructuras terciarias y el orden de los residuos catalíticos en las secuencias (Rawlings & Barrett 1999; Di Cera 2009).

Dentro de las serín proteasas, la primera reportada fue la quimotripsina bovina, la cual ha permitido dilucidar el mecanismo de acción de las serín proteasas (Polgár 2005). Ésta tiene un plegamiento con 2 barriles β , con el sitio activo en medio de la hendidura entre los dos barriles. En la hendidura del sitio activo catalítico se encuentran los grupos químicos que realizan la catálisis (Di Cera 2009).

Muchas de las serín proteasas de insectos pertenecen a la familia S1 del clan PA, que incluye dos subfamilias la S1A y S1B, las cuales son distintas filogenéticamente, pero comparten una estructura común de dos barriles β . Las proteasas S1B se encuentran en toda la vida celular y son las responsables del recambio proteico intracelular. Por otra parte, las proteasas S1A son las tripsinas que median una gran variedad de procesos extracelulares (Di Cera 2009).

Las proteasas del clan PA, clasificación a la que pertenecen las de tipo tripsina, son las más abundantes de las serín proteasas y quizás el grupo de enzimas mejor estudiado. Se encuentran en eucariotas, procariontes, archeas y virus. Estas enzimas participan en muchos procesos fisiológicos importantes como la digestión, coagulación de la sangre, fibrinólisis, desarrollo, apoptosis e inmunidad (Di Cera 2009; Hedstrom 2002). Las enzimas digestivas tipo tripsina rompen cadenas polipeptídicas en residuos cargados positivamente (Arg/Lys) en la posición P1 del sustrato. El plegamiento de la tripsina es importante para la distribución de los residuos catalíticos a través de toda la secuencia polipeptídica (Figura 5). Dos barriles β de 6 hebras se unen asimétricamente para acoger en su interfaz los residuos de la triada catalítica. H57 y D102 pertenecen al N-terminal del barril β con la S195 y el sitio activo albergado por el carboxilo – terminal (Di Cera 2009).

Los pesos moleculares de las enzimas tipo tripsina están en el intervalo de 20 a 35 kDa y tiene puntos isoeléctricos (pI) variables, la mayoría de ellos en el intervalo de 4-5. El pH óptimo es siempre alcalino entre 8 y 9. El sustrato con el que comúnmente se les identifica es la benzoil-Arg-*p*-nitroanilida (Bz-R-pNA) o la benzoil-arg-4-metilcumarina (BRMCA) (Terra & Ferreira 1994).

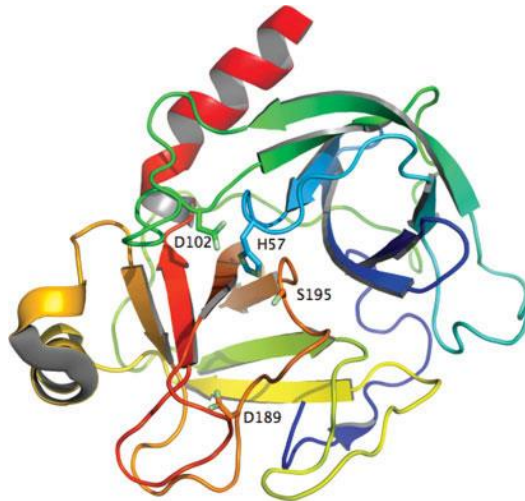


Figura 5: Representación de cinta de la tripsina (2PTN) (25), del N-terminal (violeta) a la C-terminal (rojo) (Di Cera 2009)

En años recientes, se ha encontrado un gran número de serín proteasas en plantas; por ejemplo, en semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.), soya (*Glycine max* [L.]) y arroz (*Oryza sativa* L.); en las raíces de papa (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) y maíz (*Zea mays* L.); en las hojas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Cesnjevec) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Antão & Malcata 2005).

Proteasas en insectos

Las proteasas juegan un papel importante en todos los organismos vivos. En un inicio, fueron reconocidas como enzimas proteolíticas del jugo gástrico en humanos, las cuales estaban involucradas en la degradación inespecífica de proteínas de la dieta. Sin embargo, estudios recientes han dado una nueva perspectiva al estudio de estas enzimas (Puentes et al. 2003).

Diferentes tipos de proteasas han sido aisladas del sistema digestivo de insectos y al caracterizarlas han resultado, en general, similares en su comportamiento catalítico a las encontradas en vertebrados; sin embargo, algunas presentan diferencias notables en sus características más importantes tales como su localización, el pH óptimo de actividad, las constantes cinéticas y la termoestabilidad, entre otras (Preciado Rodríguez et al. 2000).

Hasta el momento se han purificado y caracterizado parcial o totalmente algunas serín proteasas de insectos, las cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Serín proteasas reportadas en coleópteros (Castro-Guillén 2012)

Coleóptero	Actividad tipo Tripsina	Actividad tipo Quimotripsina	Actividad tipo Elastasa	Referencia
<i>Pterostichus melanarius</i>	1 peptidasa (16.6 KDa)	1 peptidasa (20.8 KDa)	-----	Gooding y Huang, 1969
<i>Costelytra zealytica</i>	1 peptidasa (23 KDa)	-----	-----	Chriteller <i>et al.</i> , 1989
<i>Anoplophora glabripennis</i>	-----	6 peptidasas ente 23-25 KDa	-----	Bian <i>et al.</i> , 1996
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	-----	2 peptidasas (64, ~100 KDa)	-----	Novillo <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhyzopertha dominica</i>	4 peptidasas ente 20 – 98 KDa	2 peptidasas ente 24 – 35 KDa	-----	Zhu y Baker, 1999; 2000
<i>Melolontha melolontha</i>	3 peptidasas (18, 56, 63 KDa)	-----	3 peptidasas (33, 36, 38 KDa)	Wagner <i>et al.</i> , 2002
<i>Lasioderma serricorne</i>	1 peptidasa (>105 kDa)	3 peptidasas (>105, >53, >17 kDa)	-----	Oppert <i>et al.</i> , 2002
<i>Catharsius molossus</i>	1 peptidasa (27 kDa)	-----	-----	Ahn <i>et al.</i> , 2003
<i>Pachnoda ephippiata</i>	-----	1 peptidasa (~30 kDa)	-----	Zhang y Brune, 2004
<i>Tenebrio molitor</i>	4 peptidasas (18.3, 24.3, 25.5 y 46 kDa) 4 peptidasas (1 catiónicas y 3 aniónicas) (peptidasas de 17 y 59 kDa)	1 peptidasa (23 kDa) 1 peptidasa (23 kDa) 4 peptidasas (1 catiónicas y 4 aniónicas) (peptidasas de 18.5, 22.5 y 26 kDa)	-----	Levinsky <i>et al.</i> , 1977; Terra <i>et al.</i> , 1985; Elpidina <i>et al.</i> , 2005; Tsybina <i>et al.</i> , 2005. Vinokurov <i>et al.</i> , 2006a; 2006b.

<i>Trogoderma granarium</i>	1 peptidasa (>80 kDa)	-----	-----	Hosseiniaveh <i>et al.</i> , 2007
<i>Zabrotes subfasciatus</i>	1 peptidasa (29 kDa)	-----	-----	Magalhães <i>et al.</i> , 2007
<i>Prostephanus truncatus</i>	-----	1 peptidasa (31 kDa)	-----	Aguirre <i>et al.</i> , 2009
<i>Tribolium castaneum</i>	5 peptidasas (3 catiónicas y 2 aniónicas)	3 peptidasas aniónicas	1 peptidasa aniónicas	Vinokurov <i>et al.</i> , 2009
<i>Tribolium confusum</i>	1 peptidasa aniónica	6 peptidasas aniónicas	1 peptidasa aniónicas	Vinokurov <i>et al.</i> , 2009
<i>Sitophilus zeamais</i>	2 peptidasas (56 y 70 kDa)	-----	-----	Silva <i>et al.</i> , 2010

Las enzimas tipo tripsina se encuentran en la mayoría de los insectos, con excepción de algunas especies de hemípteros y algunas especies de coleópteros. Las serín proteasas presentes en insectos tienen muchas similitudes en cuanto a su estructura con sus contrapartes en mamíferos, pero a diferencia de éstos, las tripsinas de insectos no son activadas o estabilizadas por iones calcio y son inestables en pH ácido (Terra & Ferreira 1994; Terra & Ferreira 2012).

Proteasas en genomas de insectos

El orden de insectos coleóptera contiene más de 400,000 especies descritas divididas en cuatro subórdenes: Adepfaga, Archostemata, Myxophaga y Polyphaga (Sheffield *et al.* 2008). A pesar del tamaño y la diversidad del grupo, sólo se ha publicado un genoma completo de coleópteros, correspondiente a una plaga de productos almacenados, el gorgojo rojo de la harina, *Tribolium castaneum*; sin embargo, existen algunos genomas mitocondriales publicados, los cuales se describen en la Tabla 2 (Keeling *et al.* 2013).

Tabla 2: Genomas mitocondriales descritos para insectos del orden coleóptero (Sheffield et al. 2008)

Especies	Clasificación	Localización	Referencia
<i>Tribolium castaneum</i>	Polyphaga Tenebrionidae: Tenebrionidae		Friedrich and Muqim (2003)
<i>Pyrocoelia rufa</i>	Polyphaga: Elateroidea: Lampyridae		Bae et al. (2004)
<i>Crioceris duodecimpunctata</i>	Polyphaga: Chrysomeloidea: Chrysomelidae		Stewart and Beckenbach (2003)
<i>Rhagophthalmus lufengensis</i>	Polyphaga: Elateroidea: Phengodidae		Li et al. (2007)
<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	Polyphaga: Elateroidea: Phengodidae		Li et al. (2007)
<i>Pyrophorus divergens</i>	Polyphaga: Elateroidea: Elateridae		Arnoldi et al. (2007)
<i>Anoplophora glabripennis</i>	Polyphaga: Chrysomeloidea: Cerambycidae		---
<i>Tetraphalerus bruchi Heller</i>	Archostemata: Ommatidae	Argentina	(Sheffield et al. 2008)
<i>Trachypachus holmbergi Mannerheim</i>	Adephaga: Trachypachidae	Canadá	(Sheffield et al. 2008)
<i>Sphaerius sp.</i>	Myxophaga: Sphaeriusidae	Estados Unidos	(Sheffield et al. 2008)
<i>Chaetosoma scaritides Westwood</i>	Polyphaga: Cleroidea: Chaetosomatidae	Nueva Zelanda	(Sheffield et al. 2008)
<i>Cyphon sp</i>	Polyphaga: Scirtoidea: Scirtidae	Estados Unidos	(Sheffield et al. 2008)
<i>Priasilpha obscura Broun</i>	Polyphaga: Cucujoidea: Priasilphidae	Nueva Zelanda	(Sheffield et al. 2008)

Algunos insectos han sido investigados a detalle y se ha encontrado que contienen un gran número de genes que codifican a proteasas. Por ejemplo, *Drosophila melanogaster*, es de los insectos con un alto contenido de genes, 200 aproximadamente, con homología a la familia de las serín proteasas en su genoma, la mayoría son de función desconocida (Ross et al. 2003); *Apis mellifera*, incluye 44 genes de serín proteasas y 13 enzimas homólogas (Zou et al. 2006) y *Tribolium castaneum* 31 (Zou et al. 2007); los genomas de mosquitos son ricos en genes que codifican a proteasas, *Anopheles gambiae* contiene 55 y *Aedes aegypti* 71 (Waterhouse et al. 2007); entre los lepidópteros, el genoma de *B. mori* contiene 15 proteasas (Tanaka et al. 2008), y 20 se han identificado en *M. sexta* (Jiang et al. 2005; Zou et al. 2009).

Hay un gran número de secuencias de proteasas, tipo tripsina y quimotripsina, de insectos registradas en el GenBank. En estudios realizados sobre el tracto digestivo de algunos coleópteros se ha encontrado la presencia de diversas enzimas proteolíticas. Así por ejemplo, en *Tribolium castaneum* a pH entre 3.0 y 6.9, en *Callosobruchus maculatus* a pH entre 3.3 y 6.0, *Acanthoscelides obtectus* a pH entre 4.5 y 7.0, *Zabrotes subfasciatus* a pH 3.5 y 5.5, *Tribolium confusum* a pH entre 6.5 y 6.9, *Trogoderma* spp a pH entre 4.6 y 7.6, *Prostephanus truncatus* pH entre 7.2 y 9.0, *Sitophilus oryzae* pH entre 4.0 y 10, y en *S. zeamais* pH entre 2.5 y 10 (Preciado Rodríguez et al. 2000).

Se han secuenciado genes de proteasas tipo tripsina en los órdenes Hemíptera (Zeng et al. 2002), Coleóptera (Zhu & Baker 1999), Díptera (Ramalho-Ortigão et al. 2003), Siphonaptera (Gaines et al. 1999), Lepidóptera (Peterson et al. 1994).

La diversidad de proteasas entre diferentes especies pudo haber sido una consecuencia de la evolución en la fisiología digestiva de los insectos en respuesta a sus antiguos ambientes en los que inhibidores de serín proteasas potencialmente tóxicos podían ser utilizados como proteínas alimentarias (Ryan 1990).

Inhibidores de proteasas (IP's)

Las plagas de insectos y microorganismos patógenos usan enzimas proteolíticas para la penetración en los tejidos de la planta huésped en la mayoría de los casos. Tales avances perjudiciales son contrarrestados por las plantas al sintetizar inhibidores de proteasas constitutivos e inducidos (Jamal et al. 2013).

Los inhibidores de proteasas se encuentran en plantas, animales y microorganismos. La contribución de los IP's a los mecanismos de defensa de las plantas se basa en la inhibición de las proteasas presentes en el intestino de los insectos o producidas por microorganismos, causando una reducción en la disponibilidad de aminoácidos necesarios para su crecimiento y desarrollo (Leo et al. 2002).

Existen varias familias diferentes de IP's incluyendo aquellas que inhiben proteasas de serina, cisteína, aspartato y metaloproteasas (Jongsma & Bolter 1997). La actividad de los IP's se debe a su capacidad para formar complejos estables con proteasas diana, bloqueando, alterando o previniendo el acceso al sitio activo de la enzima (Leo et al. 2002).

Clasificación de inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas han sido agrupados en familias, subfamilias y clanes, según sus secuencias o estructuras de los dominios, respectivamente. Sin embargo, no pueden ser clasificados según el mecanismo catalítico que inhiben. Basados en la homología de secuencia de los dominios inhibitorios, los inhibidores de proteasas han sido clasificados en 48 familias. Basados en su estructura terciaria, 31 de las 48 familias han sido asignadas a 26 clanes, indicando así que una gran proporción de las familias no tiene relación en su estructura tridimensional (Rawlings et al. 2004).

Los inhibidores activos frente a serín proteasas constituyen el grupo mejor caracterizado hasta el momento (Rawlings et al. 2016). Estos incluyen los inhibidores más estudiados como los Bowman-Birk y Kunitz, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en leguminosas, como la soya. En la Tabla 3 podemos observar la clasificación de familias de inhibidores de proteasas (Blanco-Labra & Aguirre Mancilla 2002). La mayoría de las familias de inhibidores de serín proteasas en plantas, que se muestran en la Tabla 3, son inhibidores

competitivos y aparentemente, todos inhiben a las proteasas con un mecanismo estándar similar, al que se le conoce como mecanismo canónico (Laskowski & Kato 1980).

Los IP's de plantas (IPP's) son generalmente proteínas pequeñas que no sólo están restringidas a los tejidos de almacenamiento, sino también son expresadas en las partes aéreas de las plantas. Su expresión es inducida en respuesta a algún daño o ataque por insectos o patógenos (Jamal et al. 2013).

Las proteasas tipo tripsina son inhibidas específicamente por TLCK (Cloruro de N- α -Tosyl-L-lisina clorometil cetona), que actúa sobre la histidina (Terra & Ferreira 1994).

Tabla 3: Familia de inhibidores de proteasas (Blanco-Labra & Aguirre Mancilla 2002).

Familia	Monómero		Enzimas inhibidas	Distribución
	kDa	Cisteínas		
Bowman-Birk	8-9	14	Tripsina Quimotripsina Elastasa	Leguminosas Gramíneas
Kunitz	21-22	4	Tripsina Quimotripsina Subtilisina Kalikreina Amilasa	Leguminosas Gramíneas Aráceas Alismatáceas
Papa I	8-9	0-2	Tripsina Quimotripsina Subtilisina	Solanáceas Gramíneas Leguminosas Poligonáceas Cucurbitáceas
Papa II	6	8	Tripsina Quimotripsina	Solanáceas
Cucúrbitas	3	6	Tripsina Factor Hageman	Cucurbitáceas

Superfamilia cereales	12-13	10	Amilasa Tripsina Factos Hageman	Gramíneas Crucíferas Euforbiáceas Lecitidáceas Leguminosas
Ragi AI2/cebada arroz (LTP)	12-13	7-8	Amilasa	Gramíneas
Carboxi-peptidasas	4	6	Carboxipeptidasa	Solanáceas
Tipo Cistatina	12	0	Cisteín proteasa	Gramíneas Animales

Justificación

Los granos de cereales han sido el principal componente de la dieta humana durante miles de años, pues más del 50% de la ingesta calórica diaria mundial se deriva directamente del consumo de grano de cereales (Awika 2011). Sin embargo, existen factores que limitan su producción, entre ellos, los insectos, los roedores y las enfermedades, que no sólo menguan los rendimientos al alimentarse del grano, sino que lo contaminan y reducen su calidad (García-Lara et al. 2007).

El constante ataque de insectos ha sido contrarrestado, en la mayoría de los casos, con el uso intensivo de pesticidas, los cuales tienen la ventaja de ser eficaces, de efecto inmediato y de fácil manejo. Sin embargo, su utilización presenta graves 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 éstos también son blanco de su toxicidad (Blanco-Labra & Aguirre Mancilla 2002).

Entre los insectos plaga de mayor importancia, se encuentra el barrenador mayor de los granos *P. truncatus*, el cual se ha constituido como una de las principales amenazas a nivel mundial para los granos almacenados, produciendo graves daños y pérdidas de hasta el 50% de la producción total en un periodo corto; aunque se le ha asociado a cultivos de

maíz y yuca seca, también es capaz de causar daños en otros granos y productos como el trigo, frijol, trigo, cacahuate, cocoa, café y sorgo (Boxall 2002).

Hasta el momento se han realizado diversos análisis e investigaciones acerca de la biología, ecología y distribución geográfica del insecto, así como los daños y pérdidas causados por *P. truncatus* en cultivos de interés. Asimismo, se han evaluado y aplicado numerosas estrategias para llevar a cabo un control adecuado de la plaga. Se han considerado las variedades de maíz con resistencia a plagas, así como prácticas locales y tecnologías alternas que contribuyen a disminuir el ataque de la plaga y reducen las pérdidas durante el almacenamiento en ambientes adversos. Desafortunadamente, muchas de estas nuevas tecnologías y prácticas no han dado resultados satisfactorios y/o no están al alcance de los agricultores, a quienes beneficiarían enormemente.

Por lo anteriormente mencionado, es importante estudiar mecanismos alternos para el control biológico de *Prostephanus truncatus*, tales como la bioquímica del insecto, que involucra la caracterización de enzimas proteolíticas localizadas en su intestino, debido a que una estrategia ampliamente utilizada, está basada en el uso de proteínas naturales presentes en las plantas, conocidos como inhibidores de proteasas, las cuales son capaces de actuar sobre las enzimas digestivas del insecto, ya que tienen un papel decisivo sobre la asimilación de los alimentos para la nutrición, crecimiento y reproducción de los insectos plaga.

De este modo se amplía el conocimiento del insecto desde otro punto de vista, lo cual serviría para proponer nuevas estrategias eficientes para el control de la plaga, tales como obtener plantas resistentes a insectos, utilizando mecanismos naturales con elevada selectividad.

Objetivos

Objetivo general

- ❖ Purificar y caracterizar parcialmente una proteasa con actividad proteolítica tipo tripsina presente en el intestino del insecto plaga *Prostephanus truncatus*.

Objetivos específicos

- ❖ Realizar la caracterización bioquímica parcial de la actividad tipo tripsina de las enzimas.
- ❖ Evaluar y determinar el efecto de la interacción entre los inhibidores de proteasas, sobre el conjunto de proteasas tipo tripsina obtenidas.

Materiales y métodos

A continuación, se describirán los materiales y métodos utilizados durante el desarrollo del proyecto.

Reactivos y enzimas

Los reactivos químicos utilizados durante el desarrollo experimental fueron de grado analítico. Reactivos como el NH_4HCO_3 , NaCl, HCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el etilendiaminotetra-acetato (EDTA), cloroformo, metanol, etanol y ácido acético fueron obtenidos de Karal (Guanajuato, México). Se utilizó agua desionizada durante todo el desarrollo experimental. Los solventes dimetil sulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); las enzimas tripsina de páncreas bovino; los sustratos Bz-R-pNA (*N*-benzoil-Arginina-*p*-nitroanilida) y Suc-AAA-pNA (*N*-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida). Los reactivos Tris, el glicerol y los marcadores de peso molecular: “BenchMark™ Protein Ladder”, fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La cámara de electroforesis “Hoefer”, el sistema de IEF “IPGphor”, los sarcófagos “IPGphor strip Holders”, las tiras de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado y los reactivos utilizados para la electroforesis en segunda dimensión (2DE) tales como la urea, amberlita, yodoacetamida (IAA) y ditriotreitol (DTT) fueron obtenidos de Amersham

Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). La solución del reactivo de Bradford (Coomassie dye reagent), los reactivos utilizados para electroforesis, así como la columna de cromatografía de interacción hidrofóbica, fueron de Bio-Rad (Hercules, CA, E.U.).

Modelo de estudio

Se utilizaron larvas de *Prostephanus truncatus* (Horn) en el segundo y tercer estadio, aproximadamente 23 días de desarrollo, proporcionados por el insectario del Cinvestav- Unidad Irapuato. Los insectos adultos de *P. truncatus* fueron reproducidos en semillas de maíz, variedad cacahuazintle a una temperatura constante de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 60% de humedad relativa, bajo foto-periodos de luz/oscuridad de 12 h.

Las larvas fueron obtenidas mediante separación mecánica al tamizar con una malla del número 20 las semillas infestadas, posteriormente se utilizó un soplador para separar la mayor cantidad de larvas de las cascarillas remanentes de maíz, la harina y de insectos adultos, finalmente se hizo una separación manual para obtener las larvas de interés, las cuales se pesaron y almacenaron a -80°C hasta su uso. En la Figura 6 se observa la metodología antes especificada.



Figura 6: Protocolo para obtención de larvas del insecto *P. truncatus*.

Purificación de proteasas tipo tripsina

Precipitación secuencial y extracción de proteasas digestivas

Se realizó una precipitación secuencial (desde 30%-70%) a un extracto crudo de larvas de *P. truncatus*, para determinar los porcentajes de saturación con sulfato de amonio a los que precipitan las enzimas de interés (tipo tripsina) y la menor cantidad de proteína inespecífica. Se hizo la determinación de proteína total por el método de Bradford, así como

la determinación en placa de actividad proteolítica tipo tripsina. Además, se hizo una electroforesis SDS-PAGE utilizando el sistema Schägger y un análisis post electroforético mediante zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina para evaluar los resultados obtenidos.

Las proteasas digestivas del insecto fueron extraídas de acuerdo al protocolo establecido por Aguirre y colaboradores, con modificaciones (Aguirre et al. 2009). Como primer paso en la extracción, las larvas fueron pesadas (20 g) y maceradas en presencia del buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 8; posteriormente, se removió el material insoluble por centrifugación a 32,000x *g* a 4°C durante 60 min; se filtró el sobrenadante con papel filtro (Whatman 41) y se midió el volumen total. Debido a que la presencia de grasa en el extracto acuoso interfiere en la observación de proteínas en la electroforesis SDS-PAGE, se procedió a removerla mediante una extracción líquido-líquido con cloroformo en proporción 1:1 v/v a 4°C, durante 10 min con agitación suave por inversión. Después de haber recuperado el sobrenadante del extracto crudo desgrasado, se realizaron precipitaciones a diferentes porcentajes de saturación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, iniciando de 0 a 30%, 40%, 50%, 60% hasta 70%. En cada paso se agregó el total de la sal en 10 min y se agitó durante 30 min. Posteriormente se centrifugó durante 25 min bajo las condiciones previamente descritas, se recuperó el sobrenadante y se tomó una alícuota de cada porcentaje de saturación para posteriores análisis.

Lo anterior nos dio pauta para establecer el protocolo general para la extracción eficiente de proteasas digestivas. El proceso se llevó a cabo de acuerdo al protocolo propuesto por Aguirre y colaboradores (2009), con las siguientes modificaciones: después de realizar todo el proceso hasta la extracción líquido-líquido con cloroformo, se llevó a cabo la precipitación del extracto con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 50% de saturación a 4°C, durante 30 min, a partir de que se agregó el total de la sal; la proteína precipitada fue separada de las proteínas solubles por centrifugación de acuerdo a las condiciones mencionadas previamente. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una segunda precipitación al 70% de saturación, se centrifugó bajo las condiciones previamente establecidas. Se removió el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspendió en buffer de

fosfatos 0.1 M, pH 6.8, se hicieron alícuotas de 500 μ L del extracto y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Localización de proteasas presentes en *P. truncatus*

Se realizó una comparación de la actividad proteolítica tipo tripsina entre el extracto de larvas completas e intestinos disectados de larvas. Esto con el fin de corroborar la naturaleza digestiva de la proteasa en estudio.

Se utilizaron 150 larvas completas y se disectaron 150 intestinos de larvas en presencia de buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 8 para hacer la comparación de proteasas presentes en el insecto; lo anterior se realizó utilizando un protocolo previamente descrito (Aguirre et al. 2009). Se llevó a cabo una electroforesis en el sistema Schägger para observar el perfil proteico y se hizo zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina para detectar las proteasas presentes.

Determinación de proteína total y medición de la actividad proteolítica

La determinación del contenido total de proteína obtenido en cada paso de purificación se hizo mediante el ensayo de (Bradford 1976), utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (ASB).

La actividad proteolítica de las serín proteasas se determinó mediante un ensayo multi reacción de acuerdo al protocolo propuesto por (Erlanger et al. 1961) con algunas modificaciones. Para detectar la actividad tipo tripsina el sustrato utilizado fue el Bz-R-pNA; para la actividad tipo quimotripsina se utilizó Suc-AAA-pNA. Ambos reactivos se usaron en una concentración 0.01 M, disueltos en DMSO. El volumen final de reacción en la placa Elisa de 96 pozos fue de 120 μ L, agregando 10 μ L de sustrato y variando la relación de enzima y buffer Tris-HCl 0.01 M, pH 8. La reacción se monitoreó a 405 nm y 37°C; esta reacción iniciaba al agregar el sustrato para después tomar la primera lectura (tiempo 0 de reacción) a los 15 segundos, con ello se aseguraba que el sustrato estuviera homogéneo en la

reacción; después se tomaron varias lecturas, generalmente cada 10 min, hasta que se alcanzaban absorbancias de 1.

La actividad proteolítica se expresó como la concentración de μM de *p*-nitroanilina (*p*NA) producida en un intervalo de 1 min, en relación a la proteína del insecto utilizada; por lo que la unidad de actividad fue descrita como μM de *p*NA/min/mg de proteína. Para obtener la concentración de la *p*NA, se elaboró una curva estándar con diferentes concentraciones en μM de *p*NA, a la cual se le realizó una regresión lineal para obtener la ecuación que permitió encontrar la concentración de *p*NA a partir de la absorbancia obtenida.

Para la mayoría de los ensayos de actividad proteolítica se utilizaron de 2 a 3 μg de proteína específica proveniente del extracto de *P. truncatus*.

Separación de proteínas

Debido a que las enzimas con actividad tipo tripsina y quimotripsina no se lograron separar exitosamente mediante la cromatografía de exclusión molecular (G75), cromatografía de intercambio aniónico y HPLC, se optó por realizar una separación con base a sus características hidrofóbicas.

Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH)

La cromatografía de interacción hidrofóbica, como su nombre lo indica, consiste en separar biomoléculas con base a su hidrofobicidad superficial, y se caracteriza por la absorción de las biomoléculas a la superficie débilmente hidrofóbica de la resina en una solución fuertemente salina y su posterior elución mediante un gradiente salino negativo.

La CIH se llevó a cabo en una columna Macro-Prep Methyl HIC Resin (Bio Rad), la cual fue lavada de acuerdo al protocolo del fabricante y equilibrada con sulfato de amonio 2.4 M disuelto en buffer de fosfato de sodio 100 mM, pH 6.8.

Se utilizaron 500 μL de extracto precipitado al 70% de saturación (P70) por corrida. La elución se realizó utilizando un gradiente lineal descendente con sulfato de amonio de

2.4 M a 0 M en fosfato de sodio 100 mM pH 6.8. Se colectaron fracciones de 4 mL a una velocidad de 2 mL/min. A cada una de las fracciones se le midió absorbancia a 220 nm para determinar la cantidad de proteína total en la muestra y actividad proteolítica tipo tripsina y quimotripsina.

Diálisis

Las fracciones que mostraron actividad proteolítica específica, se concentraron por ultrafiltración en Amicon®, utilizando una membrana de 10 kDa de exclusión. Se recuperó la muestra en 500 µL de agua desionizada filtrada. Además, se probó otro tipo de diálisis mediante centrifugación usando Amicon-Ultra de 10 kDa de exclusión molecular, realizando varios ciclos de lavados con agua desionizada a 3913xg y 4°C, para eliminar el exceso de sales, lo que se comprobó mediante conductividad eléctrica. La muestra se recuperó en 1 mL de agua desionizada.

Separaciones electroforéticas

Se evaluó la pureza de las enzimas tipo tripsina, obtenidas en los diferentes pasos, mediante una electroforesis SDS-PAGE de acuerdo al método de Schägger y Von Jagow (1987) y mediante zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina.

Electroforesis monodimensional (SDS-PAGE) y tinción de geles

La electroforesis en geles de poliacrilamida fue llevada a cabo en condiciones semi-desnaturalizantes con el detergente no reductor SDS (SDS-PAGE), usando el sistema Schägger (Schägger & von Jagow 1987). La concentración de los geles separadores fue del 10% y de los concentradores 4%. Las corridas fueron llevadas a un máximo de 110 V. Posterior a la electroforesis, los geles fueron fijados con una solución de metanol:ácido acético (40:10) durante 30 min, teñidos con solución que contiene Coomassie G, durante toda la noche y finalmente fueron desteñidos con una solución de ácido acético al 10%.

Electroforesis bidimensional (2DE)

La electroforesis se llevó a cabo a partir de la proteína con actividad específica tipo tripsina obtenida de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Todas las soluciones

utilizadas y el protocolo general, se realizaron de acuerdo al manual descrito por el proveedor, con modificaciones. Se utilizaron tiras con pH inmovilizado de 3 a 10 (3/10 immobilized pH gradient – IPG-gel strips), de 7 cm de longitud. El protocolo consistió en la rehidratación de la tira durante 15 h en un sarcófago (IPGphor strip holder), a temperatura ambiente y sin voltaje. La solución de rehidratación contenía 30 µg de proteína del extracto parcialmente puro de las larvas de *P. truncatus*.

El isoelectroenfoco se realizó en un programa de 3 fases: S1= 500 V durante 30 min, S2= 1000 V durante 30 min y S3= 8000 V durante 2 h. Este proceso se llevó a cabo en el equipo “IPGphor Isoelectric focusing system” (Amersham pharmacia Biotech). Previo a la electroforesis las tiras enfocadas fueron equilibradas con un buffer que contenía DTT y otro con IAA; se colocó la tira en la parte superior de los geles SDS-PAGE, previamente preparados y se sellaron con agarosa. Se cargaron los marcadores de peso molecular y la electroforesis se efectuó de acuerdo al protocolo descrito previamente.

Análisis post electroforético de la actividad proteolítica

Zimografía usando sustratos derivados de la p-Nitroanilina (pNA)

La detección de actividad proteolítica tipo tripsina en los geles de poliacrilamida, se realizó basada en los protocolos de (Ohlsson et al. 1986; Vinokurov et al. 2005). El sustrato utilizado fue Bz-R-pNA. La solución inicial del sustrato fue preparada a una concentración de 20 mM en DFM, para después diluirse en una relación de 1:20 con el buffer de actividad (Tris-HCl 0.01M, pH8), teniendo una concentración final de 1 mM.

Después de la electroforesis SDS-PAGE, los geles separadores fueron lavados con el buffer de actividad para equilibrarlos al mismo pH y eliminar el SDS remanente. Al mismo tiempo, una membrana de nitrocelulosa (cortada del tamaño del gel) fue sumergida en la solución del sustrato BapNA diluido, durante 40 min, en agitación constante. Una vez equilibrados los geles de separación, la superficie del gel fue secada con papel filtro; posteriormente, la membrana previamente embebida con el sustrato, fue puesta en la superficie seca del gel, y ambos fueron incubados a 37°C hasta la aparición de bandas de color amarillo tenue.

Finalizada la incubación, el revelado de las bandas se efectuó mediante 3 lavados consecutivos de 5 min, con los siguientes buffers: nitrito de sodio al 0.1%, en HCl 1 M; sulfamato de amonio al 0.5% en HCl 1 M, y N-(1-naftil)-etilendiamina en 47.5% de etanol. La actividad proteolítica fue indicada por bandas de color rosa. Las membranas fueron escaneadas y almacenadas a -20 °C.

Análisis por espectrometría de masas de alta resolución

Utilizando 25 µg de proteína total de una muestra obtenida por CIH, se hizo una electroforesis SDS-PAGE. Se corrió el gel de poliacrilamida a 70 V durante 1 h, posteriormente a 100 V durante 3 h. Al finalizar el tiempo de corrida se tiñó el gel con azul de Coomassie G y se dejó en agitación suave durante 2 h. Al cumplir este tiempo, se destiñó el gel y se hicieron lavados con agua desionizada filtrada, para remover la mayor cantidad posible de solución para desteñir.

La muestra procesada se mandó a analizar al Laboratorio Universitario de Proteómica del IBT-UNAM, donde se realizó la secuenciación manual (*de novo*). A continuación, se describe el protocolo general que se utilizó.

Procesamiento de las muestras

La muestra fue reducida con DTT (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquilada con IAA (Sigma-Aldrich) y digeridas con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). Como buffer se utilizó bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8.2) y la digestión se incubó a 37°C por 18 horas.

Análisis espectrométrico

Los péptidos obtenidos de la digestión fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y analizados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), con un cromatógrafo ACCELA (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (nanoESI).

La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation) en el analizador Orbitrap. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo.

Análisis de datos de espectros de masas

Con los espectros obtenidos se llevó a cabo secuenciación manual de péptidos utilizando los espectros de fragmentación, se describe solamente uno de los aminoácidos isobáricos I (isoleucina) y L (leucina), ya que ambos poseen exactamente la misma masa molecular (113.08406 Da).

Búsqueda en bases de datos e identificación de proteínas

Los péptidos identificados por secuenciación manual fueron comparados utilizando el programa BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>), contra la base de datos Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) y contra las secuencias de proteínas no redundantes, con filtro específico para insectos (taxid:6960).

También se realizó la comparación utilizando la base de datos MEROPS, ya que en ésta se encuentran las secuencias reportadas para proteasas e inhibidores de diferentes organismos (https://www.ebi.ac.uk/merops/submit_searches.shtml).

Adicionalmente se utilizó Peptide Match de PIR (Protein Information Resource), y como base de datos All UniProtKB plus isoform sequences (Swiss-Prot), con 88,627,637 secuencias, con la opción de equivalencia para leucina e isoleucina (Chen et al. 2013).

Efecto de los inhibidores de proteasas sobre las proteasas tipo tripsina de *P. truncatus*

Los ensayos para determinar el efecto de inhibidores en la actividad proteolítica de enzimas tipo tripsina de *P. truncatus*, se llevaron a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando el sistema Schägger y con un análisis post electroforético por zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina.

Se evaluó el efecto del inhibidor TBPI (Tepary bean protease inhibitor) recombinante y un inhibidor purificado a partir de frijol tépari, en el laboratorio de Mecanismos de Defensas de plantas, en Cinvestav-Unidad Irapuato. La cantidad de enzima/inhibidor utilizada para formar el complejo se determinó mediante ensayos previos realizados por Aguirre *et al.* (2004), en los cuales se demostró que la cantidad mínima para formar el complejo se da en una relación de 4:1 enzima/inhibidor. Por lo tanto, se utilizaron 12 µg de enzima y 3 µg de inhibidor, se incubaron a 37°C durante 10 min y posteriormente se cargó al gel de electroforesis SDS-PAGE, previamente preparado. Al término de la electroforesis, se realizó un lavado al gel con agua desionizada para remover el buffer de corrida, se secó con papel filtro y se incubó con una membrana de nitrocelulosa previamente embebida en sustrato específico para tripsina (Bz-R-pNA), a 37°C durante 2 h. Al finalizar la incubación, se reveló la membrana y el gel se tiñó con solución de Coomassie G durante 1 h, para después remover el colorante con solución para desteñir.

Resultados

Purificación de proteasas tipo tripsina

Precipitación secuencial

Se realizó la precipitación secuencial con la finalidad de determinar el porcentaje de saturación con sulfato de amonio con el que precipitaba la mayor cantidad de proteína específica. Se utilizaron extractos a pH 8, ya que previamente se había reportado que a ese pH se obtenía la mayor cantidad de actividad proteolítica. A cada uno de los precipitados

(P30, P40, P50, P60, P70) se les determinó el contenido total de proteína, así como las unidades de actividad proteolítica tipo tripsina que hidrolizaba Bz-R-pNA.

De acuerdo a la cuantificación de actividad por mg de proteína, en la Figura 7 podemos observar que la proteína con actividad proteolítica tipo tripsina, graficada en rojo, y la menor cantidad de proteína inespecífica, graficada en azul, la encontramos en los precipitados al 50% y 60% de saturación con sulfato de amonio. A pesar de que el precipitado al 30% de saturación mostró la mayor cantidad de actividad proteolítica, decidimos descartarlo como primera precipitación para purificar, debido a que a ese porcentaje de saturación también se obtenía la mayor cantidad de proteína con actividad proteolítica tipo quimotripsina, lo que podría dificultar su separación.

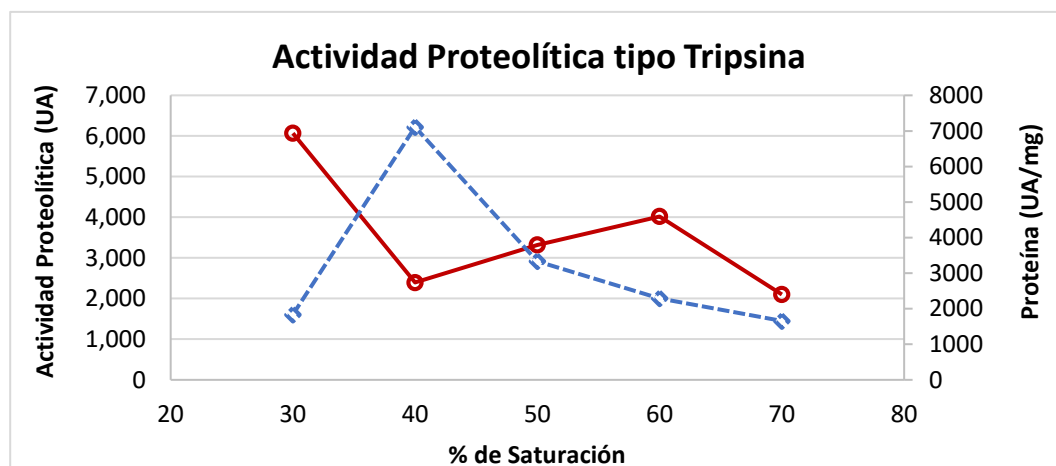


Figura 7: Precipitación secuencial con sulfato de amonio de un extracto crudo de larvas de *P. truncatus*. —●— Actividad tipo tripsina y —▲— concentración de proteína total ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

El perfil proteico de la precipitación secuencial, obtenido mediante electroforesis con el sistema Schagger en geles de poliacrilamida al 10% se muestra en la Figura 8A. Se utilizó como control positivo un extracto crudo (EC) de larvas de *P. truncatus*, con el fin de comparar las bandas de proteína en cada una de las precipitaciones. Como era de esperarse, el perfil de bandeo fue similar en cada precipitado; sin embargo, fue a los porcentajes de 50% y 60% de saturación (P50 y P60) donde vimos la mayor cantidad de proteína a un peso molecular aproximado de 40 kDa.

También se realizó el análisis post electroforético, Figura 8B. Las bandas teñidas de color rosa representan las proteínas con actividad proteolítica tipo tripsina; por lo tanto, observamos que a lo largo de las precipitaciones obtuvimos proteínas específicas de tres pesos moleculares aproximados a 120 kDa, 40 kDa y 28 kDa.

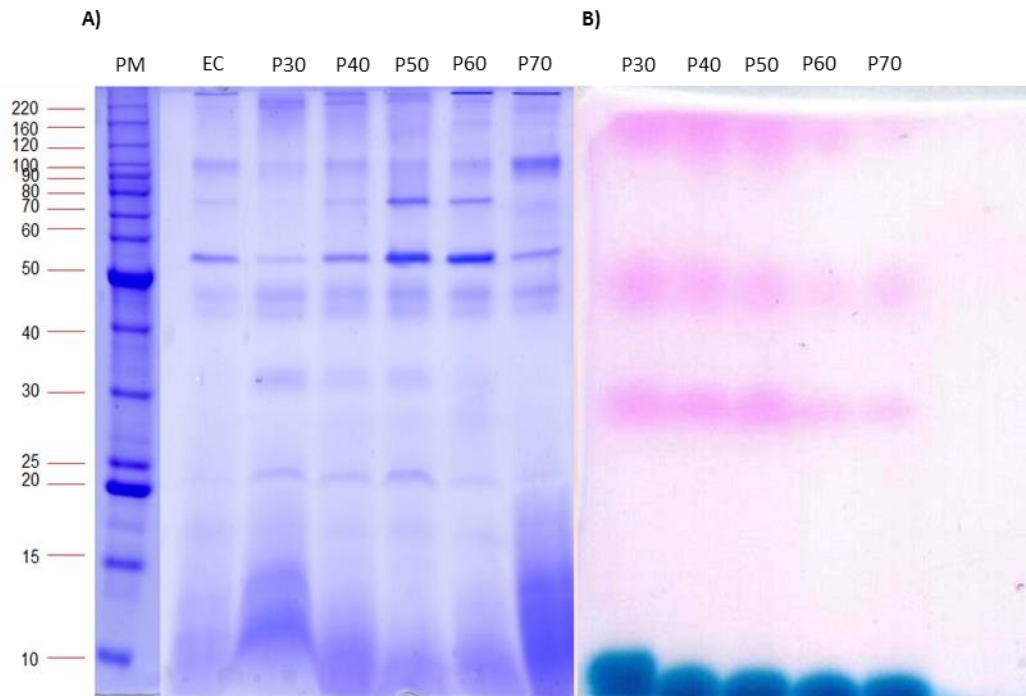


Figura 8: Electroforesis SDS-PAGE Schägger y zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina. EC= Extracto Crudo.

Localización de proteasas presentes en *P. truncatus*

De acuerdo a los resultados obtenidos en el zimograma de la Figura 9, utilizando el sustrato específico para tripsina, podemos observar que se presentó el mismo patrón de bandeo en los extractos de intestino disectado (I), como en el correspondiente a larva completa (L). Este dato es importante, porque nos facilita la obtención de la muestra, al demostrar que el origen de las proteasas que estudiamos es intestinal, aun cuando se utiliza la larva completa.



Figura 9: Zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina de intestinos disectados (I) y larvas completas (L) de *P. truncatus*.

Separación de proteínas

Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH)

El precipitado al 70% obtenido de la extracción de proteasas de *P. truncatus*, se pasó por una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica. La gráfica de actividad proteolítica, obtenida mediante esta técnica se observa en la Figura 10.

. Las fracciones con actividad tipo tripsina se graficaron en rojo, las de tipo quimotripsina en verde, la cantidad de proteína total cuantificada mediante espectrofotometría UV a 220 nm en azul y en morado el gradiente de elución con sulfato de amonio.

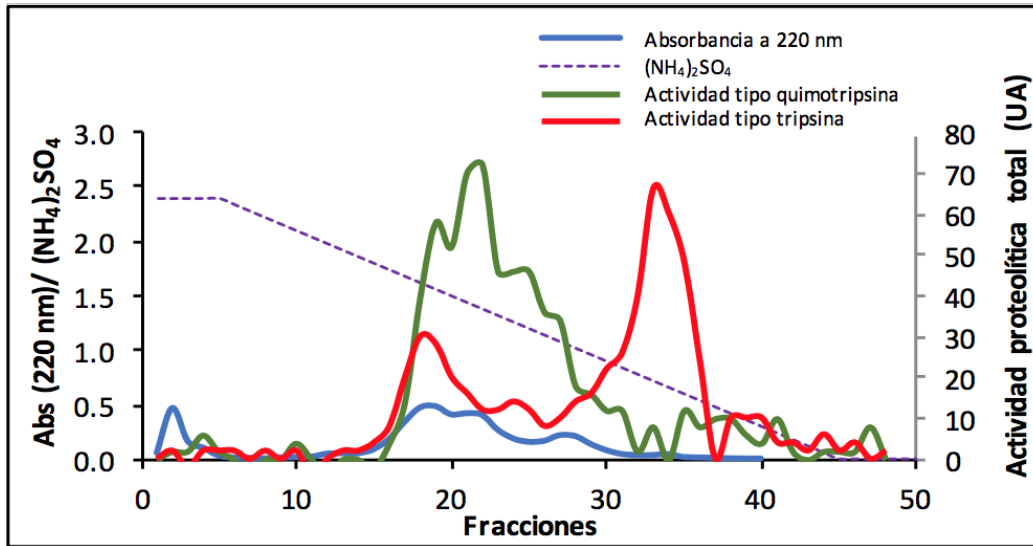


Figura 10: Actividad proteolítica obtenida de las fracciones de CIH.

El conjunto de fracciones que forman un pico de actividad proteolítica, obtenido de esta separación, se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE y por zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina. En la Figura 11A podemos observar los resultados obtenidos de la separación electroforética, en el primer carril se muestran los marcadores de peso molecular, en el carril 2 vemos un extracto obtenido por CIH con réplica en el carril 3, el cual se separó en 6 bandas definidas de proteínas; en la Figura 11B se muestra el zimograma de la misma muestra, en donde observamos tres bandas de actividad proteolítica tipo tripsina.

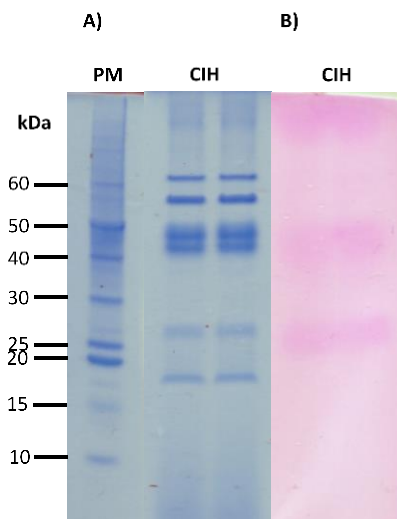


Figura 11: Electroforesis SDS-PAGE y zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina de muestra proveniente de CIH.

Análisis por espectrometría de masas

El gel de electroforesis SDS-PAGE, que se utilizó para preparar la muestra para el análisis por espectrometría de masas, se muestra en la Figura 12. El primer carril, corresponde a los marcadores de peso molecular y el segundo carril a la muestra obtenida mediante cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH). El peso molecular aparente de la muestra utilizada fue de 40 kDa, que corresponde a la banda de mayor concentración. También observamos otras bandas de peso molecular aparente de 19 kDa, 53 kDa y 60 kDa.

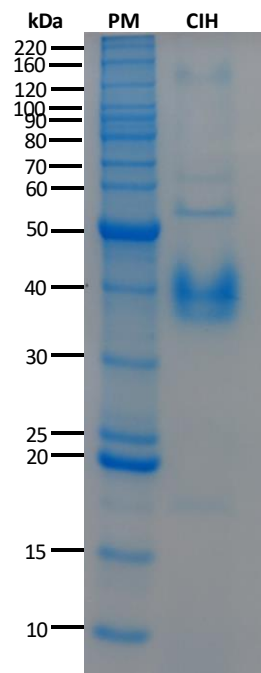


Figura 12: Electroforesis SDS-PAGE de muestra proveniente de CIH, para análisis por espectrometría de masas de alta resolución.

En la Tabla 4 se muestran los péptidos que fueron reportados por el servicio de espectrometría de masas. Las secuencias marcadas con un asterisco se refieren a que éstas pueden ser en sentido inverso. Esta información es útil para realizar las comparaciones con las secuencias reportadas en las bases de datos.

Tabla 4: Información de los péptidos obtenidos de la secuenciación *de novo*, resultado de la espectrometría de masas de alta resolución.

ION	CARGA (z+)	SECUENCIA	Identificador
953.79	3	...NGVLEKAVS.. (...SVAKELVGN...)*	Péptido 1
992.48	3	VGLVSWGLGCAR	Péptido 2
1163.07	3	...MLQLLYLVY.. (YVLYLLQLM...)*	Péptido 3
1210.62	3	VSGWGTLAES	Péptido 4
584.27	2	DECAGFPENK	Péptido 5

* Las secuencias pueden ser en sentido inverso.

Cabe recalcar que no se pudo verificar la secuencia por no contar con los espectros fragmentados.

Análisis de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas

Cada uno de los péptidos fue comparado individualmente contra la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes, específicamente para insectos del programa Blastp. Tomando en cuenta los valores esperados (e-value) y los “scores” que presentan, el péptido 2 y el péptido 4 arrojaron secuencias relacionadas con proteasas; en la Tabla 5 y Tabla 6 se muestran las 10 secuencias más significativas para cada péptido y sus equivalencias con Leucina e Isoleucina. Esto se refiere al número de secuencias, respecto al tamaño de la base de datos que usamos, que obtendrían la misma puntuación por azar al ser alineadas. Por lo tanto, cuanto mayor es el tamaño de la base de datos que estamos explorando, más significativos serán los “e-values”. Este valor es una simple interpretación estadística que nos ayuda a inferir sobre la posible similitud con secuencias de otros organismos. Los péptidos 1, 3 y 5 correspondieron a otro tipo de proteínas y sus valores esperados fueron altos y los “scores” bajos.

Tabla 5: Resultados obtenidos de Blastp al hacer la comparación del péptido 2 obtenido por espectrometría de masas.

Péptido 2	VGIVSWGIGCAR				
Proteína	Accesion	Identities	Region	E-value	Total score
PREDICTED: venom protease [Trachymyrmex septentrionalis]	XP_018357262.1	100	274-285	5.27E-05	41.8
Hypothetical protein FF38_12329, partial [Lucilia cuprina]	KNC27535.1	100	232-243	5.29E-05	41.8
Trypsin-like serine protease [Ctenocephalides felis]	AAD21834.1	100	232-243	5.29E-05	41.8
Acp74, partial [Drosophila straubae]	APG58499.1	100	243-243	5.30E-05	41.8
Acp74, partial [Drosophila parisiena]	APG58495.1	100	243-254	5.30E-05	41.8
Acp74, partial [Drosophila straubae]	APG58471.1	100	243-254	5.30E-05	41.8
Acp74, partial [Drosophila parisiena]	APG58465.1	100	243-254	5.30E-05	41.8
Uncharacterized protein Dvir_GJ20753 [Drosophila virilis]	XP_002049423.1	100	222-233	5.30E-05	41.8
Uncharacterized protein Dmoj_GI18353 [Drosophila mojavensis]	XP_002006876.1	100	220-231	5.30E-05	41.8
Uncharacterized protein Dmoj_GI18354, isoform D [Drosophila mojavensis]	XP_002006875.1	100	220-231	5.30E-05	41.8
	VGLVSWGIGCAR				
PREDICTED: mite allergen Der f 3-like, partial [Rhagoletis zephyria]	XP_017462155.1		147-158	7.47E-05	41.4
PREDICTED: trypsin beta-like [Musca domestica]	XP_005175134.1	100	237-248	7.47E-05	41.4
Peroxisomal membrane protein PEX16 [Trachymyrmex septentrionalis]	KYN42919.1	100	602-612	0.001	38
PREDICTED: peroxisomal membrane protein PEX16-like [Trachymyrmex septentrionalis]	XP_018337291.1	100	596-606	0.001	38

Trypsin-like serine protease [<i>Ctenocephalides felis</i>]	AAD21835.1	100	354-365	0.001	38
PREDICTED: venom protease [<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>]	XP_018357262.1	91.67	274-285	0.001	38
Hypothetical protein FF38_12329, partial [<i>Lucilia cuprina</i>]	KNC27535.1	91.67	232-243	0.001	38
Trypsin-like serine protease [<i>Ctenocephalides felis</i>]	AAD21834.1	91.67	232-243	0.001	38
Acp74, partial [<i>Drosophila straubae</i>]	APG58499.1	91.67	243-254	0.001	38
Acp74, partial [<i>Drosophila parisienae</i>]	APG58495.1	91.67	243-254	0.001	38

Tabla 6: Resultados obtenidos de Blastp al hacer la comparación del péptido 4 obtenido por espectrometría de masas.

Péptido 4	VSGWGTLAES				
Proteína	Accesion	Identities	Region	E-value	Total score
PREDICTED: trypsin alpha-like [<i>Zeugodacus cucurbitae</i>]	XP_011196810.1	100	197-205	1.2	29.1
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: polyserase-2-like [<i>Nicrophorus vespilloides</i>]	XP_017769449.1	88.89	632-640	1.7	28.6
PREDICTED: kallikrein-11-like [<i>Rhagoletis zephyria</i>]	XP_017463682.1	88.89	16-24	1.7	28.6
PREDICTED: transmembrane protease serine 9-like [<i>Dendroctonus ponderosae</i>]	XP_019757652.1	88.89	370-378	2.4	28.2
Hypothetical protein D910_06745 [<i>Dendroctonus ponderosae</i>]	ERL89374.1	88.89	162-170	2.4	28.2
PREDICTED: trypsin-7-like [<i>Dendroctonus ponderosae</i>]	XP_019773713.1	88.89	302-310	2.4	28.2
Hypothetical protein YQE_00344 [<i>Dendroctonus ponderosae</i>]	ENN83297.1	88.89	104-112	2.4	28.2
Hypothetical protein YQE_01486 [<i>Dendroctonus ponderosae</i>]	ENN83419.1	88.89	36-44	2.4	28.2
PREDICTED: trypsin 3A1 [<i>Zeugodacus cucurbitae</i>]	XP_011185400.1	88.89	171-179	2.4	28.2
Trypsin-1 [<i>Orchesella cincta</i>]	ODN05704.1	88.89	166-174	2.4	28.2

	VSGWG TIAES				
PREDICTED: trypsin alpha [<i>Bactrocera dorsalis</i>]	XP_011202255.1	90	196-205	0.83	29.5
Uncharacterized protein Dmoj_GI21247 [<i>Drosophila mojavensis</i>]	XP_002006765.1	100	165-172	2.4	28.2
PREDICTED: replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit-like [<i>Trichogramma pretiosum</i>]	XP_014233078.1	80	170-179	2.4	28.2
Uncharacterized protein Dwil_GK19454 [<i>Drosophila willistoni</i>]	XP_002062897.2	80	418-427	6.7	26.9
PREDICTED: trypsin alpha-like [<i>Bactrocera latifrons</i>]	XP_018786813.1	88.89	196-204	6.8	26.9
PREDICTED: uncharacterized protein LOC108034378 [<i>Drosophila biarmipes</i>]	XP_016964751.1	88.89	965-973	9.5	26.5
PREDICTED: uncharacterized protein LOC108034378 [<i>Drosophila biarmipes</i>]	XP_017057683.1	88.89	932-940	9.5	26.5
PREDICTED: trypsin 3A1 [<i>Bactrocera dorsalis</i>]	XP_011199986.2	88.89	169-177	14	26.1
PREDICTED: trypsin 3A1 [<i>Bactrocera latifrons</i>]	XP_018786127.1	88.89	169-177	14	26.1
PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: polyserase-2-like [<i>Nicrophorus vespilloides</i>]	XP_017769449.1	77.78	886-894	19	25.7

Se hizo el alineamiento de nuestros péptidos contra la base de datos MEROPS (MEROPS-MPRO, MEROPS-MPEP y MEROPS-MP), la cual contiene secuencias de proteasas e inhibidores. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos, únicamente para el péptido 2 hubo secuencias con homología a proteasas de la subfamilia S1A; dentro de estos resultados vemos que existe homología con tripsinas de bacterias como *Streptomyces griseus*, también con *Drosophila melanogaster*, aunque los valores esperados no fueron bajos.

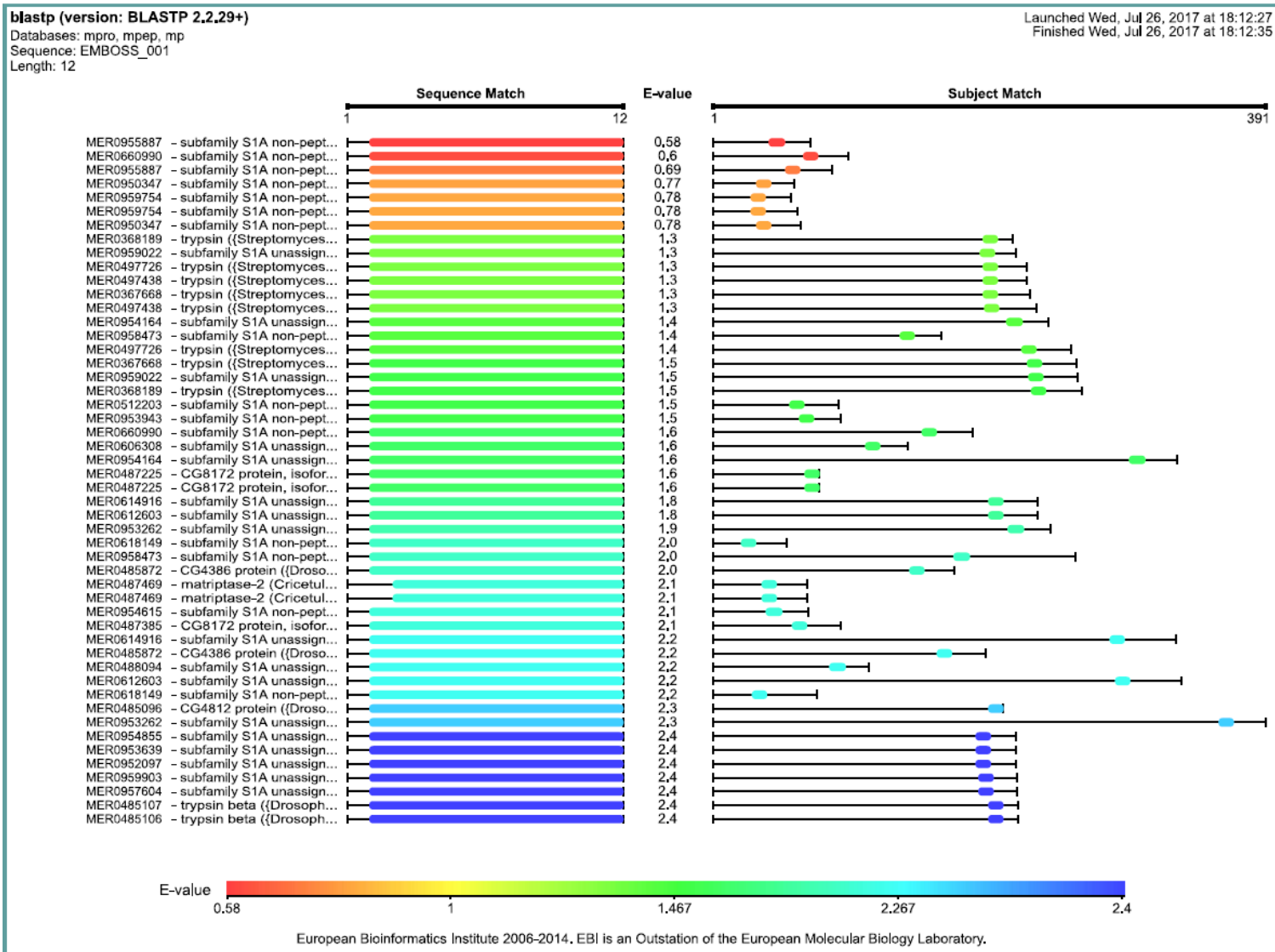


Figura 13: Alineamientos del péptido 2 en la base de datos MEROPS. La barra de colores indica el valor esperado en cada alineamiento.

Al llevar a cabo la búsqueda utilizando Peptide Match, del sitio Protein Information Resource (PIR), con la equivalencia de leucina e isoleucina. No se encontraron resultados para los péptidos, a excepción del péptido 2, el cual nuevamente dio “match” para 67 proteínas de las cuales un 58% fueron tripsinas bacterianas, específicamente de actinomicetos. 21 de las 67 proteínas correspondieron a insectos. En la Tabla 7, se muestran los primeros 14 insectos que dieron homología y las características de las proteínas. Todas, a pesar de ser fragmentos o proteínas no caracterizadas, pertenecen a una clasificación inter pro familia de Proteasas S1 clan PA, con actividad endopeptidasa y sitio activo de Serina e histidina en algunos casos.

Tabla 7: Características de las proteínas que fueron significativas, de acuerdo al valor esperado, al realizar el alineamiento del péptido 2 en el Peptide Match

Proteína ID	Nombre	Longitud	Organismo	Rango de match
A0A0L0C5H6	Uncharacterized protein (Fragment)	268	<i>Lucilia cuprina</i> (Green bottle fly) (Australian sheep blowfly)	232-243 VDGKLVGIVSWGIGCARDGFPG
A0A0Q9XBC4	Uncharacterized protein, isoform B	90	<i>Drosophila mojavensis</i> (Fruit fly)	56-67 EDGKLVGIVSWGIGCARKDYPG
A0A1I8NHQ7	Uncharacterized protein	273	<i>Musca domestica</i> (House fly)	237-248 VDGKLVGLVSWGIGCAREGFPG
A0A1L3J009	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila straubae</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J018	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila parisiens</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J024	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila parisiens</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J025	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila parisiens</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J026	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila straubae</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J027	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila straubae</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J028	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila parisiens</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J034	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila parisiens</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J040	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila parisiens</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J041	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila parisiens</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP
A0A1L3J049	Acp74 (Fragment)	258	<i>Drosophila straubae</i>	243-254 KAGKLVGIVSWGIGCARKEYP

Efecto de los inhibidores de proteasas sobre las proteasas tipo tripsina de *P. truncatus*

Con el fin de proporcionar más información de las proteasas en estudio, se realizó una electroforesis SDS-PAGE y un zimograma de actividad proteolítica tipo tripsina para evaluar el comportamiento de las enzimas en presencia de inhibidores. En la Figura 14, podemos observar que los inhibidores utilizados no presentaron efecto sobre las proteasas evaluadas, dado que, en el zimograma aún se detectó la presencia de actividad proteolítica revelada por la coloración rosa intensa en los carriles correspondiente a la enzima incubada con el inhibidor (E-I TBPI y E-I_A, carriles 3 y 5). Se podría sugerir la posible presencia de complejo enzima-inhibidor con actividad proteolítica de tipo tripsina.

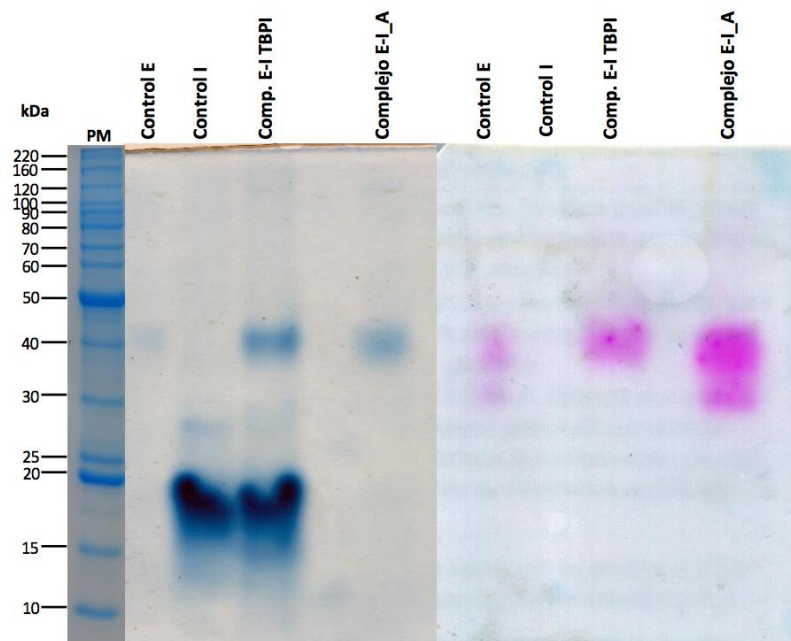


Figura 14: Electroforesis SDS PAGE y zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina para el extracto de CIH utilizando inhibidores de proteasas. Control E= Control del extracto enzimático, Control I= Control de Inhibidores (TBPI o Frijol Tépari), Complejo E-I TBPI= complejo formado entre la enzima en estudio y el TBPI recombinante, Complejo E-I_A= Complejo formado entre la enzima en estudio y el inhibidor purificado a partir de frijol tépari.

Discusión

Los insectos plaga se han convertido en blanco de estudio debido a que generan grandes pérdidas de cultivos de interés y que, a su vez, se ve reflejado en el ámbito económico y social. Las interacciones planta-insecto dependen del nivel nutricional de los tejidos vegetales durante el desarrollo y crecimiento del insecto, y de las defensas químicas y mecánicas de la planta. Algunos coleópteros, como *P. truncatus*, poseen enzimas con actividad hidrolítica, las cuales están involucradas en diversos procesos de desarrollo y protección del insecto, pero es en el intestino medio donde se encuentra la principal fuente de enzimas digestivas y también uno de los principales sitios para la absorción de material digerido. En este trabajo se evaluaron las enzimas con mayor actividad proteolítica tipo tripsina, presentes en el intestino de *P. truncatus*.

Optimización de la precipitación secuencial de serín proteasas digestivas de *Prostephanus truncatus*

Para la extracción de proteasas de *P. truncatus*, se comenzó utilizando el protocolo previamente establecido por Aguirre *et al.* (2009). Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron baja recuperación de proteína, bajo rendimiento en unidades de actividad proteolítica, así como baja especificidad con la que se obtenían las muestras de interés, por lo que decidimos estandarizar el proceso para la extracción de enzimas digestivas del insecto. Para ello, se utilizó como base el protocolo propuesto por Aguirre *et al.* (2009), tomando algunas modificaciones hechas por Castro-Guillén *et al.* (2012) y complementando con lo reportado previamente en la literatura para la purificación de proteasas de insectos coleópteros, tales como *Tenebrio molitor* (Tsybina *et al.* 2005), y *Ryzophertha dominica* (Osuna-Amarillas *et al.* 2012), entre otros.

Se comenzó con una precipitación secuencial con sulfato de amonio de las proteínas en estudio. Los resultados obtenidos, dieron la pauta para modificar y optimizar el protocolo de extracción y purificación parcial para la obtención de proteasas digestivas a partir de larvas de *P. truncatus*. La optimización se hizo con base en la eficiencia y reproducibilidad de los datos obtenidos; por ello, se estableció como primer paso una

extracción acuosa a una relación 1:4 p/v con buffer Tris-HCl a pH 8, ya que anteriormente se había demostrado que a ese pH se obtenía el mayor rendimiento de actividad proteolítica para enzimas digestivas (Castro-Guillén et al. 2012).

Posteriormente se determinó que el mejor intervalo de precipitación con sulfato de amonio correspondió a 50% - 70% de saturación, debido a que, a estos porcentajes precipitó la mayor cantidad de enzima tipo tripsina y la menor cantidad de proteína inespecífica. Además, se implementó el desgrasado de la muestra mediante una extracción líquido-líquido con cloroformo en proporción 1:1 v/v, lo cual mejoró significativamente la resolución y tinción de los geles SDS-PAGE; finalmente, se hizo una cromatografía de interacción hidrofóbica para separar las proteínas con actividad tipo tripsina de las proteínas tipo quimotripsina, que anteriormente no se habían logrado separar eficientemente por otros métodos utilizados en los protocolos mencionados.

Para remover las sales presentes en la muestra, se utilizó Amicon Ultra-15 con exclusión molecular de 3,000 Da, ya que fue mediante este protocolo que se perdió la menor cantidad de enzima tipo tripsina y las unidades de actividad proteolítica resultaron significativas en comparación con los métodos previamente establecidos en el laboratorio, tales como, diálisis con agua desionizada usando membrana de exclusión molecular de 3,000 Da, diálisis mediante ultrafiltración con Amicon o liofilización de la muestra; debido a que dichos métodos requieren más manipulación de la enzima, por lo que se ve afectada la recuperación final de la muestra.

Utilizando la nueva metodología desarrollada en el presente estudio, se optimizó la purificación de enzimas tipo tripsina en función del tiempo; sin embargo, aún no fue posible la purificación total para la obtención de una sola enzima, debido a que se requiere explorar otros métodos y parámetros, tales como HPLC, elución de geles de electroforesis, etc. para lograr la separación entre las proteasas con actividad tipo tripsina; sin embargo, tendríamos que evaluar la recuperación final de la muestra. Debido a lo anterior, los análisis posteriores se hicieron en función del conjunto de enzimas que se logró obtener.

Localización de proteasas presentes en *P. truncatus*

Se evaluaron dos extractos del insecto *P. truncatus*, larva completa e intestinos disectados, para comparar la actividad proteolítica tipo tripsina y la obtención eficiente de material. En los resultados obtenidos mediante zimografía de actividad proteolítica, se observó el mismo patrón de bandeo en ambos extractos; nuestros resultados concuerdan con los reportados anteriormente por (Vázquez-Arista et al. 1999), lo que demuestra que utilizar el extracto de larva completa es justificable, ya que éstos presentaron actividad proteolítica similar a la obtenida en los intestinos disectados. A pesar de que la actividad proteolítica tipo tripsina fue menor utilizando las larvas completas, no se vio afectada la obtención ni la separación de las proteasas deseadas. Por lo anterior, se decidió utilizar larvas completas de *P. truncatus* durante todo el desarrollo experimental, ya que se optimiza el tiempo de extracción y por ende el de purificación.

Separación de proteínas

Cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH)

Con base en estas características de las proteínas, se logró una separación eficiente y reproducible entre tripsinas y quimotripsinas, resultados que no se habían logrado obtener mediante otros métodos. Además, en el pico correspondiente a las fracciones con actividad tipo tripsina, se observó poca proteína inespecífica, lo que sugiere una buena purificación parcial del conjunto de proteasas digestivas. A pesar de obtener una buena separación de las proteínas, aún quedan protocolos por probar para optimizar el proceso hasta obtener una sola banda de proteína con actividad específica.

Análisis por espectrometría de masas

La banda de proteína extraída del gel que se mandó secuenciar al parecer contenía más de una proteína; sin embargo, la baja homología de los péptidos 1, 3 y 5 con la base de datos de secuencias con las que fueron comparadas nos puede sugerir 2 opciones: la primera, que se trata de regiones únicas de nuestra proteína y la segunda, que no fueron secuenciadas adecuadamente; esto se podría corroborar si existiera la secuencia del

genoma de este organismo o por medio de una nueva secuenciación de la misma utilizando espectrometría de masas o por secuenciación Edman con una proteína más pura.

En el caso del péptido 4, la búsqueda dio resultados que relacionan al péptido con tripsinas y proteasas; además, los valores esperados (“e-value”) obtenidos fueron bajos. Sin embargo, la búsqueda de homología con Peptide Match, que solamente incluye secuencias proteicas curadas y provenientes de proteomas de referencia, no dio resultados. Los datos obtenidos con Blastp podrían sugerir que se trata de un fragmento de la proteasa en nuestra banda.

El péptido 2 se trata, sin duda, de un fragmento perteneciente a una serín proteasa del intestino de *P. truncatus*, dado que las proteasas se encuentran altamente conservadas, aunque no se cuente con información genómica de este insecto específico, podemos inferir que se trata de esta proteína. Al realizar la comparación del péptido en diferentes bases de datos, todos los resultados fueron similares, dando homología con proteasas de la subfamilia S1A y en algunos casos específicamente con tripsinas de diferentes organismos, siendo las más frecuentes de bacterias y de algunos insectos. Debido a que el péptido 2 es sólo un fragmento muy pequeño, es necesario tener la secuencia completa o mejorar la purificación de nuestras enzimas para tener mayor información significativa.

Las proteínas que resultaron de la búsqueda en Peptide Match para el péptido 2 estuvieron alrededor de los 250-280 aminoácidos correspondientes a un peso aproximado de 25-30 kDa, el cual coincide con diversas proteasas tipo tripsina reportadas en animales, incluyendo la tripsina bovina, que ha servido como referencia en el estudio de estas enzimas. Sin embargo, algunos fueron fragmentos entre 40 y 50 kDa, los cuales corresponden al peso molecular aparente obtenido mediante electroforesis SDS-PAGE para la muestra de proteasas de *P. truncatus* proveniente de la purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica.

Estos resultados generan información a partir de la cual podemos continuar explorando técnicas para la purificación total y de este modo completar la caracterización

de las proteasas del intestino del insecto *P. truncatus*, con la finalidad de encontrar algún método eficiente de control biológico para la plaga.

Con las nuevas tecnologías y conocimientos, se han generado grandes avances en cuanto a la estructura y función de las proteasas de insectos, sobre todo de aquellas que tienen funciones relacionadas con la digestión de los alimentos, aunque aún queda mucho por estudiar. Además, a través de las secuencias del genoma, estudios científicos han revelado que los insectos tienen un gran número de genes que codifican a proteasas y que muchos de ellos no han sido estudiados, por lo que tienen funciones desconocidas. Una característica común de las proteasas es que se sintetizan como zimógenos inactivos, activados por proteólisis cuando es el momento adecuado, y luego inhibidos rápidamente por inhibidores específicos. Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de esta estricta regulación de múltiples y variadas vías de la cascada de proteasas afectará muchas áreas de la biología de los insectos.

Conclusiones

Al término de este trabajo de investigación podemos concluir que:

- Se logró optimizar el proceso de purificación parcial del conjunto de enzimas de tipo tripsina presentes en *P. truncatus*.
- Se comprobó que las enzimas obtenidas forman parte del intestino de *P. truncatus*
- Se logró caracterizar el comportamiento del complejo enzima-inhibidor, mediante zimografía de actividad proteolítica tipo tripsina, utilizando dos inhibidores obtenidos a partir de frijol tépari.
- Se comprobó mediante análisis por espectrometría de masas, que un fragmento del conjunto de enzimas obtenidas pertenece a la subfamilia S1A de las proteasas tipo tripsina.

Referencias

- Aguirre, C. et al., 2009. Partial characterization of a chymotrypsin-like protease in the larger grain borer (*Prostephanus truncatus* (Horn)) in relation to activity of *Hyptis suaveolens* (L.) trypsin inhibitor. *Journal of Stored Products Research*, 45(2), pp.133–138.
- Antão, C.M. & Malcata, F.X., 2005. Plant serine proteases: Biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7), pp.637–650.
- Armienta-Aldana, E. et al., 2003. Estabilidad Proteolítica de *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) en México. *Acta Universitaria*, 13(1).
- Awika, J.M., 2011. Major cereal grains production and use around the world. In *ACS Symposium Series*. pp. 1–13.
- Bellows, T.S. & Fisher, T. w., 1999. *Handbook of biological control: principles and applications of biological control*, San Diego: Elsevier Science. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-257305-7.50092-8>.
- Bergvinson, D.J. & García-Lara, S., 2011. Synergistic effects of insect-resistant maize and *Teretrius nigrescens* on the reduction of grain losses caused by *Prostephanus truncatus* (Horn.). *Journal of Stored Products Research*, 47(2), pp.95–100.
- Blanco-Labra, A. & Aguirre Mancilla, C., 2002. Proteínas Involucradas en los Mecanismos de Defensa de Plantas. *Acta Universitaria*, 12. Available at: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41612201>.
- Boxall, R.A., 2002. Damage and loss caused by the Larger Grain Borer *Prostephanus truncatus*. *Integrated Pest Management Reviews*, 7(2), pp.105–121.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp.248–254.
- Busvine, J.R., 1980. Insects & Hygiene. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), p.568.
- Castro-Guillén, J.L., 2012. *Caracterización parcial de las serin peptidasas de Prostephanus truncatus (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae)*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados campus Irapuato, Guanajuato.
- Castro-Guillén, J.L. et al., 2012. Partial characterization of serine peptidases in larvae of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), reveals insensitive peptidases to some plant peptidase inhibitors. *Journal of Stored Products Research*, 50, pp.28–35.
- Di Cera, E., 2009. Serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), pp.510–515.
- Chen, C. et al., 2013. A fast peptide match service for UniProt knowledgebase. *Bioinformatics*, 29(21), pp.2808–2809.

- CIMMYT, 2013. Más grano y menos pérdidas poscosecha con MasAgro. Available at: <http://conservacion.cimmyt.org/index.php/eventos/753-mas-grano-y-menos-perdidas-poscosecha-con-masagro> [Accessed June 25, 2016].
- Dent, D., 2000. *Insect Pest Management* 2nd ed., New York: CABI Publishing. Available at: https://books.google.com/books?id=y3_Ig1ffcY0C&pgis=1.
- Dick, K., 1988. *A review of insect infestation of maize in farm storage in Africa - with special reference to the ecology and control of*, Available at: <http://gala.gre.ac.uk/10351%0ACopyright>.
- EPPO, 2011. EPPO Global Database *Prostephanus truncatus* (PROETR).
- Erez, E., Fass, D. & Bibi, E., 2009. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459(7245), pp.371–8.
- Erlanger, B.F., Kokowsky, N. & Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95(2), pp.271–278.
- FAO, 2017. FAO. Available at: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/> [Accessed June 25, 2016].
- Gaines, P.J. et al., 1999. Cloning of a family of serine protease genes from the cat flea *Ctenocephalides felis*. *Insect Molecular Biology*, 8(1), pp.11–22.
- García-Lara, S., Espinosa Carrillo, C. & Bergvinson, D.J., 2007. *Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control*,
- Golob, P., 2002. Chemical , physical and cultural control of *Prostephanus truncatus*. *Integrated Pest Management Reviews*, 7, pp.245–277. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:IPMR.0000040817.59207.3a>.
- Graham, R., 2005. Larger grain borer (*Prostephanus truncatus*). *PaDIL*. Available at: <http://www.padil.gov.au>.
- Haq, S.K., Atif, S.M. & Khan, R.H., 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: Natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431(1), pp.145–159.
- Hedstrom, L., 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), pp.4501–4523.
- Hodges, R.J., 1994. Recent advances in the biology and control of *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). In *6th International Working Conference on Stored-product Protection*. Available at: <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwscpp/pdf2/6/929.pdf>.
- Hodges, R.J., 1986. The biology and control of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae)-A destructive storage pest with an increasing range. *Journal of Stored Products Research*, 22(1), pp.1–14.
- Jamal, F. et al., 2013. Serine protease inhibitors in plants: Nature’s arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), pp.1–34.

- Jiang, H., Wang, Y. & Gu, Y., 2005. Molecular identification of a bevy of serine proteinases in *Manduca sexta* hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(8), pp.931–943.
- Jongsma, M.A. & Bolter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43(10), pp.885–895.
- Keeling, C.I. et al., 2013. Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major forest pest. *Genome Biology*, 14(3), p.R27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4053930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://genomebiology.com/content/14/3/R27>.
- Laskowski, M. & Kato, I., 1980. Protein Inhibitors of Proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49(1), pp.593–626. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.003113>.
- Leo, F. De et al., 2002. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, 30(1), pp.347–348. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/30/1/347.abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99076/pdf/gkf020.pdf>.
- Meikle, W.G., Rees, D. & Markham, R.H., 2002. Biological control of the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Horn)(Coleoptera: Bostrichidae). *Integrated Pest Management*, 7, pp.123–138.
- Muantinte, B.L., Berg, J. Van Den & Santos, L.A., 2014. *Prostephanus truncatus* IN AFRICA : A REVIEW OF BIOLOGICAL TRENDS AND PERSPECTIVES ON FUTURE PEST MANAGEMENT STRATEGIES The Larger grain borer , *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera : Bostrichidae) was first recorded in Africa in the Tambora regio. *African Crop Science Journal*, 22(3), pp.237–256.
- Müller-Esterl, W., 2008. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*, Reverté.
- Nansen, C. & Meikle, W.G., 2002. The biology of the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Integrated Pest Management Reviews*, 7(2), pp.91–104.
- Ohlsson, B.G., Weström, B.R. & Karlsson, B.W., 1986. Enzymoblotting: A method for localizing proteinases and their zymogens using para-nitroanilide substrates after agarose gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose. *Analytical Biochemistry*, 152(2), pp.239–244.
- Osuna-Amarillas, P.S. et al., 2012. Biochemical and kinetic characterization of the digestive trypsin-like activity of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research*, 51, pp.41–48.
- Peterson, A.M., Barillas-Mury, C. V. & Wells, M.A., 1994. Sequence of three cDNAs encoding an alkaline midgut trypsin from *manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24(5), pp.463–471.

- Polgár, L., 2013. Catalytic mechanisms of serine and threonine peptidases. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*. pp. 2524–2534.
- Polgár, L., 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19–20), pp.2161–2172.
- Popoola, K.O.K. & Hassan, A.T., 2011. Insecticidal Effects of Four Plants Extract Against *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) in Infested Dried Cassava Chips. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(1), pp.1–5.
- Preciado Rodríguez, D.P., Bustillo Pardey, Á.E. & Valencia Jiménez, A., 2000. Caracterización parcial de una proteinasa digestiva proveniente de la broca del café (Coleoptera: Scolytidae). *Cenicafé*, 51(1), pp.20–27.
- Puente, X.S. et al., 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*, 4(7), pp.544–558.
- Ramalho-Ortigão, J.M. et al., 2003. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(2), pp.163–171.
- Rawlings, N.D. & Barrett, A.J., 1999. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 27(1), pp.325–331.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Finn, R., 2016. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), pp.D343–D350.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. & Barrett, A.J., 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical journal*, 378(Pt 3), pp.705–716.
- Ross, J. et al., 2003. Serine proteases and their homologs in the *Drosophila melanogaster* genome: an initial analysis of sequence conservation and phylogenetic relationships. *Gene*, 304, pp.117–131. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12568721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12568721).
- Runeberg-Roos, P. et al., 1994. The aspartic proteinase of barley is a vacuolar enzyme that processes probarley lectin in vitro. *Plant physiology*, 105(1), pp.321–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=159360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ryan, C.A., 1990. PROTEASE INHIBITORS IN PLANTS: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28, pp.425–449.
- Sallam, M.N., 1999. Insect damage: Damage on Post-Harvest D. Mejia & B. Lewis, eds. *FAO*, pp.1–37. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compndium_-_Pests-Insects.pdf [Accessed May 22, 2016].

- Schägger, H. & von Jagow, G., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), pp.368–379.
- Schechter, I. & Berger, A., 1968. On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochemical and biophysical research communications*, 32(5), pp.898–902. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X68903264>.
- Schneider, H. et al., 2004. Biological control of the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) by its predator *Teretrius nigrescens* (Lewis) (Coleoptera: Histeridae) in Togo and Benin. *Biological Control*, 30(2), pp.241–255.
- Sheffield, N.C. et al., 2008. A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. *Molecular Biology and Evolution*, 25(11), pp.2499–2509.
- Smith, S.M. et al., 2006. Effect of wood ash and conidia of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin on mortality of *Prostephanus truncatus* (Horn). *Journal of Stored Products Research*, 42(3), pp.357–366.
- Tanaka, H. et al., 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12), pp.1087–1110.
- Terra, W.R. & Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 109(1), pp.1–62.
- Terra, W.R. & Ferreira, C., 2012. Molecular and Evolutionary Physiology of Insect Digestion. In J. R. Parra, ed. *Insect Bioecology and Nutrition for Integrated Pest Management*. CRC Press, pp. 93–119. Available at: <https://doi.org/10.1201/b11713-6>.
- Tilman, 2002. Agriculture sustainability and intensive production practices. , 418(August), pp.671–677.
- Tsybina, T.A. et al., 2005. Digestive proteinases of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae: Purification and characterization of a trypsin-like proteinase. *Biochemistry (Moscow)*, 70(3), pp.300–305.
- Valdes, A., Mariano Mendoza, E. & Nieto, F., 2000. Control de *Prostephanus truncatus* (Horn) en semilla de maíz almacenada. *Agronomía Mesoamericana*, 11, pp.95–101. Available at: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711114>.
- Vázquez-Arista, M. et al., 1999. Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research*, 35(2), pp.167–174.
- Vinokurov, K.S., Oppert, B. & Elpidina, E.N., 2005. An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates. *Analytical Biochemistry*, 337(1), pp.164–166.

- Wagner, W., Möhrlein, F. & Schnetter, W., 2002. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(7), pp.803–814.
- Waterhouse, R.M. et al., 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science*, 316(5832), pp.1738–1743. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2042107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1139862>.
- Zeng, F., Zhu, Y.C. & Cohen, A.C., 2002. Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(4), pp.455–464.
- Zhu, Y.C. & Baker, J.E., 1999. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(12), pp.1053–1063.
- Zou, Z. et al., 2006. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: Possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Molecular Biology*, 15(5), pp.603–614.
- Zou, Z. et al., 2007. Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome biology*, 8(8), p.R177. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-36749066016&partnerID=tZOtx3y1>.
- Zou, Z. et al., 2009. Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(6), pp.677–682.