

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS**  
**Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos**

**Aislamiento, Purificación y Caracterización Cinética de Proteasas**  
**Glicosiladas de *Rhizopertha dominica***

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presenta:**

**I.T.A. Fernanda Sacnité Zavala Ibarra**

Hermosillo, Sonora

Abril 2022

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## APROBACIÓN

“Aislamiento, Purificación y Caracterización Cinética de Proteasas Glicosiladas de  
*Rhizopertha dominica*”



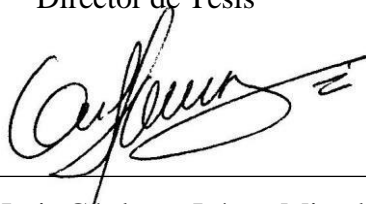
---

I.T.A. Fernanda Sacnité Zavala Ibarra



---

Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui  
Director de Tesis



---

Dr. José Luis Cárdenas López Miembro  
del Comité de Tesis



---

Dra. Oliviert Martínez Cruz  
Miembro del Comité de Tesis



---

Dr. Pablo Sergio Osuna Amarillas  
Miembro del Comité de Tesis

## CESIÓN DE DERECHOS

Hermosillo, Sonora a 04 de abril de 2022.

**Asunto:** Cesión de derechos

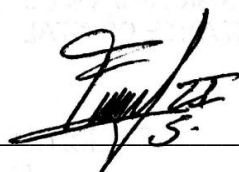
**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada “**Aislamiento, purificación y caracterización cinética de proteasas glicosiladas de *Rhizopertha dominica***”, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente. De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

**A T E N T A M E N T E**



---

I.T.A. Fernanda Sacnité Zavala Ibarra

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT y al proyecto SEP-CONACYT No. 169476, “**Inducción de la Actividad Enzimática Digestiva de *Rhyzopertha dominica* y su Relación con la Resistencia del Grano de Trigo: Interacción entre Inhibidores de Amilasas y Proteasas de Trigo y las Enzimas Digestivas de Progenies del Insecto**” por brindarme las herramientas para llevar a cabo el trabajo de investigación y la obtención de mi tesis.

A cada uno de los doctores que conformaron mi comité de tesis por su guía y apoyo, especialmente al Dr. Pablo Sergio Osuna por sus consejos, los cuales me motivaron a continuar por este camino, y a mi director de tesis Dr. Francisco Javier Cinco por depositar su confianza en mí aún cuando no había tenido la oportunidad de conocerlo, por su apoyo incondicional y por los consejos de vida que constantemente tendré presentes, por todo ello, estaré siempre agradecida.

Al Departamento de Investigación de Posgrado en Alimentos, al laboratorio de Entomología y al Laboratorio de Bioquímica y nutrición, por darme la oportunidad de realizar el trabajo experimental para crear esta tesis.

A las personas que tuve el placer de conocer durante la maestría que hoy tengo la dicha de llamarlos amigos, Carlos, Uriel y Freddy, por su apoyo y ánimo en cada momento de fragilidad. Especialmente a ti Freddy, que me enseñaste a confiar en mí y en mis capacidades, por tu soporte en cada uno de los momentos de mi vida, contigo aprendí que el tiempo no interviene en encontrar y querer a un buen amigo, conociste la parte más importante de mi vida y con ello, te convertiste en mi hermano. A ti, muchas gracias.

A aquellas personas que creyeron en mí para poder realizar este proyecto y que hoy nos encontramos por rumbos distintos, por su motivación y consejos, gracias.

## **DEDICATORIA**

Con amor y cariño dedico este trabajo a Dios y a los seres queridos que me han acompañado a lo largo de este trayecto.

A mis padres Manuelita Ibarra y Carlos Zavala quienes me brindaron su apoyo incondicional a pesar de las adversidades, por sus esfuerzos y enseñanzas que me sirvieron para convertirme en la persona que soy ahora. A ti hermana Nallely que me ofreciste siempre tu ayuda con amor.

Especialmente a ti mamá, que ahora te has convertido en mi ángel guardián, te dedico este logro por la confianza depositada en mí desde el primer momento, por alentarme a ser mejor cada día y darme la fuerza para seguir adelante cumpliendo mis metas. Son por y para ti cada uno de mis logros, te amo con toda mi alma.

## RESUMEN

Una de las principales estrategias utilizadas por las plantas para contrarrestar el ataque de insectos es la producción de inhibidores de enzimas. *Rhyzopertha dominica* es una plaga que se alimenta del grano de trigo ocasionando serias pérdidas económicas y de calidad. Sin embargo, la producción de enzimas insensibles a los inhibidores o la sobreproducción de enzimas como las enzimas glicosiladas son parte de una estrategia eficaz para que los insectos logren resistir este tipo de inhibición. En este trabajo de investigación, se observó la presencia de proteasas glicosiladas en el sistema digestivo de *R. dominica*. Se obtuvieron las enzimas proteolíticas del insecto a partir de las progenies emergidas de los trigos variedad Villa Juárez, Kronstad y Borlaug mismos que presentaron los niveles más bajo, intermedio y más alto de inhibición, con valores de 307.42 UI/mg (23.33 %), 627.21 UI/mg (55.56 %) y 824.41 UI/mg (74.44 %), respectivamente, ante el extracto enzimático de *R. dominica*. Estos extractos fueron purificados por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica y posteriormente por cromatografía de afinidad a Concanavalina-A. En los zimogramas se lograron detectar las mismas bandas en ambas cromatografías, con la característica de la modificación en la actividad específica enzimática.

En los ensayos se encontró que los parámetros cinéticos en proteasas glicosiladas de *R. dominica* los valores de  $K_m$  fueron menores que los valores correspondientes de las formas no glicosiladas (31.5 % del valor de  $K_m$  de las formas no glicosiladas). Por otra parte, los valores de velocidad máxima  $V_{max}$  de la actividad proteolítica glicosilada fueron más elevados que en la no glicosilada en las tres progenies. En consecuencia, la eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ), reveló que las proteasas glicosiladas en todas las progenies son catalíticamente más eficientes que las proteasas no glicosiladas. Se observó que existe una significativa correlación positiva ( $r = 0.99$ ) entre la actividad inhibitoria de los trigos respecto a la concentración de proteína glicosilada y no glicosilada en el extracto enzimático emergida del mismo trigo. En contraste, la actividad específica enzimática presentó una relación inversa ( $r = -0.80$ ) con la actividad específica inhibitoria de los trigos. Los resultados de este estudio mostraron que las proteasas glicosiladas de *R. dominica* poseen una alta afinidad con los inhibidores de proteasas de trigo permitiendo que las no glicosiladas actúen hidrolizando a las proteínas.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
Cereales.....	3
Trigo.....	3
Pérdidas postcosecha .....	5
Ataque de insectos en trigo almacenado.....	7
<i>Rhyzopertha dominica</i> .....	8
Métodos de control para insectos de granos almacenados .....	9
Tracto digestivo de insectos.....	11
Proteasas digestivas de <i>Rhyzopertha dominica</i> .....	13
Actividad enzimática .....	18
Inhibidores proteicos de la planta .....	19
Glicosilación .....	20
N- glicosilación.....	23
O-glicosilación.....	25
Funciones de la glicosilación.....	25
Glicosilación en la actividad enzimática .....	28
<b>HIPÓTESIS</b> .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
General.....	30
Específicos .....	30
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
Etapa I.....	32
Aislamiento y Purificación de las Proteasas Glicosiladas a partir del Extracto Enzimático de la Progenie de <i>R. dominica</i> y Determinación del Efecto de la Variedad	



del Trigo sobre la Producción de Enzimas Glicosiladas Respecto a su Actividad Inhibitoria .....	32
Materia Prima.....	32
Cultivo de Insectos.....	33
Obtención de extractos de albúmina de trigo en 6 variedades: Navojoa, Tacupeto, Borlaug, Cirno, Onavas y Kronstad. ....	33
Cromatografía de Exclusión Molecular en Extractos de Trigo .....	33
Actividad Inhibitoria de Extractos de Albúmina de Trigo en Extractos Enzimáticos de <i>R. dominica</i> variedad Borlaug.....	34
Determinación de la Actividad Proteolítica en Extractos Enzimáticos de <i>R. dominica</i> utilizando BApNA como Sustrato. ....	35
Obtención del Extracto Proteolítico de <i>Rhizopertha dominica</i> .....	35
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica .....	36
Cromatografía de Afinidad por Concanavalina-A .....	36
Determinación del Contenido de Proteína .....	37
Electroforesis por Gel de Poliacrilamida (PAGE) .....	37
Detección de proteína en gel por Tinción de Plata .....	37
Análisis de Actividad Proteolítica por Zimografía en Gel de Poliacrilamida....	38
Análisis de Actividad Proteolítica por Zimografía en Gel de Poliacrilamida con SDS y $\beta$ -mercaptoetanol .....	38
Detección de Proteasas Glicosiladas.....	39
Determinación del Peso Molecular .....	40
Análisis Estadístico.....	41
Etapa II.....	42
Caracterización Cinética de las Proteasas Glicosiladas del Insecto <i>Rhizopertha dominica</i> Desarrollado los Trigos Hexaploides de la Variedad: Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, e Identificación de las Diferencias entre las Proteasas Glicosiladas y No Glicosiladas de <i>R. dominica</i> con Relación a la Cinética, Energía de Activación y Constante de Inhibición. ....	42
Actividad Proteolítica de Tripsina .....	42
Efecto del $\beta$ -mercaptoetanol en la Actividad Proteolítica .....	43

Determinación de Parámetros Cinéticos .....	43
Determinación de la Energía de Activación ( $E_a$ ) .....	44
Determinación de la Constante de Inhibición $K_i$ de Enzimas Glicosiladas y No Glicosiladas del Extracto Enzimático de <i>R. dominica</i> .....	44
Análisis Estadístico .....	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	47
Etapa I .....	47
Aislamiento y Purificación de las Proteasas Glicosiladas a partir del Extracto Enzimático de la Progenie de <i>R. dominica</i> y Determinación del Efecto de la Variedad del Trigo sobre la Producción de Enzimas Glicosiladas Respecto a su Actividad Inhibitoria .....	47
Actividad Inhibitoria en Extractos de Trigo .....	47
Contenido de Proteína de la Fracción Albúmina de Trigos .....	49
Cromatografía de Filtración en Gel de Albúminas de Trigos .....	55
Purificación de Proteasas por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica .....	57
Purificación de Proteasas por Cromatografía de Afinidad con Concanavalina-A .....	59
Análisis por Zimografía de las Enzimas Proteolíticas .....	65
Determinación del Peso Molecular de Proteasas por Electroforesis (PAGE) ...	68
Análisis Electroforético de Extractos Proteolíticos .....	71
Efecto de SDS y $\beta$ -mercaptoetanol en la Actividad Proteolítica in gel .....	79
Detección de Proteasas Glicosiladas .....	82
Etapa II .....	85
Caracterización Cinética de las Proteasas Glicosiladas del Insecto <i>Rhizopertha dominica</i> Desarrollado los Trigos Hexaploides de la Variedad: Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, e Identificación de las Diferencias entre las Proteasas Glicosiladas y No Glicosiladas de <i>R. dominica</i> con Relación a la Cinética, Energía de Activación y Constante de Inhibición. ....	85
Influencia de $\beta$ -mercaptoetanol en Actividad Proteolítica.....	85
Determinación de los Parámetros Cinéticos $K_m$ y $V_{max}$ .....	88

Determinación de la Energía de Activación ( $E_a$ ) en Proteasas Glicosiladas y No Glicosiladas.....	91
Determinación de la Constante de Inhibición $K_i$ .....	97
Relación entre Actividad Inhibitoria de Triglos y Actividad Enzimática de Progenies.....	101
<b>CONCLUSIONES</b> .....	106
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	109
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	110

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Tracto digestivo de insectos.....	12
2	Determinación del peso molecular de proteasas de <i>R. dominica</i> .....	15
3	Estructura tridimensional de la tripsina.....	17
4	Órganulos celulares que participan en la producción de glicoproteínas y algunas rutas que siguen las mismas.....	22
5	Perfiles cromatográficos de la fracción albúmina inhibitoria de actividad triptica de trigos empleados para el cultivo y desarrollo de progenies de <i>Rhyzopertha dominica</i> . (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez. La separación cromatográfica se realizó empleando una columna de 2.5 x 100 cm empacada con Bio-Gel P-150 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). El buffer de elución fue fosfato de sodio dibásico 0.01 M, pH 8.....	56
6	Perfiles cromatográficos de los extractos enzimáticos de <i>R. dominica</i> obtenidos de la cromatografía de interacción hidrofóbica donde (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez. La separación cromatográfica se realizó empleando una columna de 1 x 5 cm empacada con una resina de fenil-sefariosa CL-4B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El buffer de elución fue fosfato de sodio dibásico 50 mM, pH 8 con etilenglicol al 50 %.....	58
7	Cromatografía de afinidad empleando Concanavalin A Sepharose <sup>TM</sup> 4B para la fraccionación de la actividad serina proteasa tipo tripsina, glicosilada y no glicosilada, del insecto <i>Rhyzopertha dominica</i> . Las progenies del insecto fueron cultivadas en los trigos (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez. Las flechas indican el inicio de la elución de proteínas glicosiladas unidas a la columna de Concanavalina-A. La elución se realizó con buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, conteniendo manopiranososa 0.05 M.....	60
8	Determinación actividad específica en POOLS. 1) Pool de proteínas a partir del extracto de progenies emergidas de la variedad Borlaug, 2) Pool de proteínas a partir del extracto de progenies emergidas de la variedad Kronstad, 3) Pool de proteínas a partir del extracto de progenies emergidas de la variedad Villa Juárez.....	64
9	Detección de proteasas por zimografía en gel de poliacrilamida. La separación de proteasas se realizó por medio de electroforesis. Las	

	muestras de extractos enzimáticos se obtuvieron de progenies que se desarrollaron en muestras de trigo (1) Villa Juárez, (2) Kronstad y (3) Borlaug.....	66
10	Perfil electroforético de extractos proteolíticos de progenies de <i>R. dominica</i> emergidas de trigos (1) Villa Juárez, (2) Kronstad y (3) Borlaug. Las enzimas fueron analizadas en (A) peso molecular empleando proteínas de peso molecular conocido, (B) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada, y (C) tinción de plata para detectar bandas de proteínas.....	70
11	Zimograma de proteasas obtenidas de la cromatografía de afinidad a la Concanavalina-A de la progenie emergida del trigo (A) Villa Juárez, (B) Kronstad y (C) Borlaug, donde (1) Extracto crudo y (2) Proteasas glicosiladas eluidas de la columna de afinidad.....	72
12	Tinción de plata de proteasas obtenidas de la cromatografía de afinidad a la Concanavalina-A de la progenie emergida del trigo (A) Villa Juárez, (B) Kronstad y (C) Borlaug, donde (1) Extracto crudo y (2) Proteasas glicosiladas eluidas de la columna de afinidad.....	73
13	Perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad a la Concanavalina-A de progenies emergidas del trigo Villa Juárez. Las enzimas fueron analizadas (A) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas), y (B) tinción de plata para detectar bandas de proteínas (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas).....	75
14	Perfil electroforético de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de afinidad a la concanavalina-A de progenies emergidas del trigo Kronstad. Las enzimas fueron analizadas (A) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada, y (B) tinción de plata para detectar bandas de proteínas.....	76
15	Perfil electroforético de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de afinidad a la concanavalina-A de progenies emergidas del trigo Borlaug. Las enzimas fueron analizadas (A) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada, y (B) tinción de plata para detectar bandas de proteínas.....	78
16	Perfil electroforético en condiciones desnaturalizantes con SDS y mercaptoetanol de extractos proteolíticos de progenies emergidas de trigos (1) Villa Juárez, (2) Kronstad y (3) Borlaug. Las enzimas fueron analizadas en (A) peso molecular empleando proteínas de peso molecular conocido, (B) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada, y (C) tinción de plata	

	para detectar bandas de proteínas.....	80
17	Zimograma de proteasas glicosiladas (bandas magenta) eluidas de una columna de lectina Concanavalina-A (AffiGel Con-A) y analizadas en electroforesis del extracto proteolítico de <i>R. dominica</i> emergida del trigo variedad Borlaug.....	83
18	Influencia del $\beta$ -mercaptoetanol en la actividad proteolítica de <i>Rhizopertha dominica</i> emergida del trigo variedad A) Villa Juárez, B) Kronstad y C) Borlaug. Los valores representan el promedio $\pm$ el error estándar de tres determinaciones.....	86
19	Representación gráfica del doble recíproco de Lineweaver-Burk de la actividad proteolítica tipo tripsina (●) glicosilada y (▲) no glicosilada de progenies de <i>Rhizopertha dominica</i> que emergieron de las variedades de trigo (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez.....	90
20	Relación entre la energía de activación $E_a$ de Arrhenius de la actividad serina proteasa del tipo tripsina (A) glicosilada y (B) no glicosilada de progenies de <i>Rhizopertha dominica</i> desarrolladas y emergidas de trigos con diferente actividad inhibitoria antitriptica.....	95
21	Diagramas de Dixon para la determinación de la constante de disociación $K_i$ de los extractos inhibitorios de trigo (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez unidos a las isoformas de serina proteasa tipo tripsina (I) glicosilada y (II) no glicosilada de progenies de <i>Rhizopertha dominica</i> cultivadas y desarrolladas en los mismos trigos. Se utilizaron dos concentraciones de N- $\alpha$ -Benzoil-DL-arginine <i>p</i> -Nitroanilida (BapNa) como sustrato: (p) 0.5 mM; (Ä) 1 mM. Cada punto es la media de dos réplicas $\pm$ desviación estándar.....	98
22	Relación gráfica entre la actividad específica inhibitoria de los trigos empleados para cultivar las progenies de <i>Rhizopertha dominica</i> y la cantidad de proteína (A) glicosilada y (B) no glicosilada de las progenies emergidas de cada trigo.....	102
23	Relación gráfica entre la actividad específica inhibitoria de los trigos empleados para cultivar las progenies de <i>Rhizopertha dominica</i> y la actividad específica enzimática del tipo tripsina (A) glicosilada y (B) no glicosilada de las progenies emergidas de cada trigo.....	105

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Funciones que desempeñan las glucoproteínas.....	27
2	Determinación de contenido de proteína en extractos de <i>R. dominica</i> cultivados en diferentes variedades de trigo.....	48
3	Determinación de contenido de proteína en extractos de trigo de diferentes variedades.....	50
4	Actividad inhibitoria en extracto enzimático <i>R. dominica</i> cultivado en la variedad Borlaug.....	52
5	Actividad inhibitoria (%) de la fracción de albúmina de tres variedades de trigo sobre la actividad del extracto enzimático del insecto <i>Rhyzopertha dominica</i> en variedad Borlaug.....	54
6	Purificación de serina proteasas glicosiladas de <i>Rhyzopertha dominica</i> por medio de cromatografía de afinidad con Concanavalina-A.....	62
7	Valores de parámetros cinéticos de la actividad de serina proteasas glicosiladas y no glicosiladas del tipo tripsina de progenies de <i>Rhyzopertha dominica</i> desarrolladas en distintas variedades de trigo.....	89
8	Valores de energía de activación $E_a$ de Arrhenius de la actividad serina proteasa tipo tripsina de progenies de <i>Rhyzopertha dominica</i> desarrolladas en diferentes trigos.....	94
9	Valores de la constante de inhibición $K_i$ de trigos utilizados para el cultivo de progenies de <i>R. dominica</i> .....	100

## INTRODUCCIÓN

El proceso de conservación y protección de granos en almacenamiento llega a ser una necesidad alimenticia, económica y social (Peña-Bautista *et al.*, 2007). Los principales cereales cultivados en México son el maíz, arroz y trigo (Benítez-Burraco, 2005), siendo este último el de mayor producción y aprovechamiento. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el Estado de Sonora aporta el 57 % de la producción de trigo a nivel nacional (FAO, 2019). Cuando el grano de trigo es cosechado y almacenado, se deben evitar diversos factores que llegan a alterar su calidad tanto fisiológica como tecnológica, entre éstos, la presencia de plagas. Se ha reportado una pérdida de hasta el 40 % de la producción agrícola mundial debido al ataque de plagas que llegan a afectar a los diversos cultivos, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2019).

Una de las principales plagas son los insectos. Éstos obtienen una gran cantidad de aminoácidos provenientes de la comida cruda (Gholamzadeh Chitgar *et al.*, 2013), debido a la alta digestibilidad por medio de hidrólisis que tienen hacia las proteínas de diferentes plantas (Zhu-Salzman y Zeng, 2015). Sus proteasas digestivas catalizan la hidrólisis de proteínas y son clasificadas de acuerdo con la naturaleza química de los grupos responsables de dicha catálisis: serina, treonina, cisteína, aspártico o metalo proteasas (Barrett *et al.*, 1998; López-Otín y Bond, 2008). Las serina-proteasas, específicamente aquellas del tipo tripsina, son utilizadas por el barrenador menor de trigo *Rhizopertha dominica* reconocido como una de las plagas más alarmantes en algunos países (Belda y Riudavest, 2012) debido a que es destructora de trigo almacenado (Cinco-Moroyoqui *et al.*, 2008; Priya *et al.*, 2010) que ha desarrollado resistencia a insecticidas piretroides y organofosforados dificultando su control (Edde, 2012; Oppert y Morgan 2013). Así mismo, se ha identificado la gran habilidad metabólica que presenta gracias a la actividad de las serina-proteasas, las cuales, son atacadas por los mecanismos de defensa de las plantas con las que se alimenta, mismas que producen inhibidores de proteasas (Mosolov y Valueva, 2004). La relación que existe entre la actividad enzimática de insectos y la exposición ante los inhibidores de proteasas ya ha sido investigada (Jongsma *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997; Wielkopolan *et al.*, 2017; Meriño *et al.*, 2018).



Los inhibidores de proteasas se encuentran en plantas como legumbres y cereales, actuando en la reducción del suministro de aminoácidos como respuesta al ataque de insectos y patógenos (Duffey, 1996). Aun así, los coleópteros, dípteros y lepidópteros logran adaptarse ante la presencia de estos inhibidores (Ashouri y Farshbaf, 2020; Spit *et al.*, 2016), sugiriendo que los inhibidores de la planta podrían inducir a la regulación de proteasas digestivas expresadas mediante la activación de genes específicos que generalmente no están activos (Silva *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2013). Como resultado, existe una sobreproducción de las enzimas digestivas existentes, expresión de diferentes enzimas insensibles a los inhibidores de la proteasa (Bown *et al.*, 2004) o la activación de la expresión de enzimas hidrolizantes que fragmentan los inhibidores (Brunelle *et al.*, 2004).

Algunas investigaciones han demostrado que insectos como *Tribolium castaneum* (gorgojo de la harina), *Bombyx mori* (gusano de seda), *Apis mellifera* (abeja de miel), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Acyrtosiphon pisum* (pulgón del guisante), utilizan proteasas glucosiladas para la digestión de proteínas y dicho efecto es específico dependiendo de la especie del insecto (Vanderborre *et al.*, 2011). Los insectos pueden ser capaces de modular la polaridad de la molécula glucosilando sus enzimas para superar las restricciones de solubilidad de la molécula, que limitaría su actividad (Wei *et al.*, 2006).

La actividad enzimática depende de diversos factores como la temperatura (Sotelo-Mundo *et al.*, 2007; Mehrabadi *et al.*, 2011), inhibidores presentes en las plantas (Mahbobe *et al.*, 2012), pH, así como también modificaciones en la postraducción como la fosforilación y glicosilación que alteran la polaridad de las moléculas, así como también, su actividad (Wei *et al.*, 2006; Vanderborre *et al.*, 2011). La glicosilación es un proceso bioquímico que modifica la estructura y función de proteínas debido a la unión de carbohidratos en los grupos laterales de aminoácidos, asparagina (Asn), serina (Ser) o treonina (Thr). Esta modificación en las moléculas de proteína afecta sus propiedades termodinámicas, cinéticas y estructurales, presentándose en dos tipos: N- y O-glicosilación (Nagai *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2013). La identificación y caracterización cinética de proteasas digestivas glucosiladas sería de interés para el estudio de la adaptación del insecto misma que le permite alimentarse y sobrevivir con granos almacenados.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Cereales

El maíz, arroz y trigo son los cereales que alimentan al mundo. La producción de cereales es de gran importancia, pues aporta productos que satisfacen las necesidades alimenticias de los seres humanos (Ramos, 2013). Existe una gran demanda y con ello, una gran oferta de cereales por países como Chile, Colombia, México y Perú, en los cuales destacan el arroz, maíz, sorgo y trigo (Reyes y Olis, 2019). El trigo ha sido de gran interés de estudio debido a su amplio uso en la alimentación, su importancia está en el alto contenido energético y proteico, siendo mayor que en otros cereales como el arroz y maíz (Peña-Bautista *et al.*, 2007).

### Trigo

El trigo es uno de los cereales que representa una mayor utilidad gracias a la gran diversidad de productos alimenticios que se pueden fabricar a partir de esta gramínea (Peña-Bautista *et al.*, 2008). Su importancia radica en el abasto ya que, según datos oficiales al año 2017, la FAO establece una producción de 3,503,521 ton de trigo en México. De igual forma, representa un papel fundamental en la economía a nivel mundial pues su cultivo, cosecha y venta proporciona un gran número de empleos en los diferentes sectores agroalimentarios.

El Estado de Sonora es uno de los mayores productores de trigo generando aproximadamente 57 % de la producción total del país según datos obtenidos hasta el mes de agosto del 2019 (SIAP, 2019). El trigo es cultivado en su mayoría en las regiones del Mayo y Yaqui debido a las condiciones agroclimáticas y tecnológicas con las que cuentan estas zonas (Márquez-Berber *et al.*, 2014). En el año 2019 el costo total de producción de trigo en Sonora rondaba entre los 21, 445 pesos por tonelada, lo que representa un gran riesgo la pérdida de dicho producto (SAGARPA, 2019). El 83 % de la producción de trigo en la entidad es del tipo cristalino utilizado en la elaboración de espagueti y sopa seca, mientras que el 17.0 % restante es panificable y utilizado en la elaboración de tortillas, galletas y repostería (SIAP, 2018).

Actualmente, la situación comercial de los tipos de trigo en México se ve influenciada por la demanda existente en el país. En el caso del trigo harinero, la principal fuente viene de países

como Estados Unidos y Canadá (SAGARPA, 2017) ya que, la producción resulta inferior a la demanda, mientras que el trigo cristalino se exporta una vez que ha satisfecho las necesidades nacionales (Garza *et al.*, 2016). La productividad y la calidad juegan un papel fundamental en las condiciones requeridas del trigo para colocarse en el mercado. Esto requiere mantener la integridad del grano de trigo tanto en su composición física como química que, finalmente, serán estas características las que contribuyan a su capacidad tecnológica (Sánchez, 2003).

La estructura física del grano de trigo se compone por el pericarpio y semilla. Así mismo, se subdivide en cubiertas de semilla, germen y endospermo. El pericarpio contiene 8.2 % en proporción media del grano de trigo, aleurona 6.6 %, germen 2.8 % y endospermo 82.4 % (Gil-Hernández y Ruíz-López, 2010). En el caso de los componentes químicos de esta gramínea se encuentran glúcidos digeribles, lípidos, sustancias minerales, fibra dietética y proteínas. En una porción comestible de 100 g, la distribución es de 56.9 %, 2.2 %, 1.6 %, 12.6 % y 12.7 %, respectivamente (Gil-Hernández y Ruíz-López, 2010). Las proteínas resultan ser el componente de mayor aprovechamiento ya que el trigo tiene una diferencia marcada en contenido en comparación de cereales como el maíz y el arroz. La cantidad de gluten que contiene representa un 80 % del total de las proteínas (Badui, 2012) y éste es el responsable de las propiedades viscoelásticas que requieren los procesos de panificación.

La cantidad de proteínas depende del tipo del cultivo que se trate. El factor genético es determinante, así como también las condiciones del cultivo (Gil-Hernández y Ruíz-López, 2010). Éstas se localizan en diversas partes formando el grano como el endospermo, germen y cubiertas externas. Las proteínas presentes en los granos de cereales se distribuyen en las diferentes estructuras anatómicas encontrándose un 4.4 % en el pericarpio, 19.7 % aleurona, 28.7 % endospermo y 60 % en germen (Gil y Ruíz, 2010).

Dentro de las proteínas del grano de trigo se encuentran las formadoras del gluten, el cual está constituido por gliadinas, que son prolaminas, y por las gluteninas, clasificadas como glutelinas. El 20 % restante corresponde a proteínas de función estructural globulinas y albúminas (Vázquez *et al.*, 2004). Las albúminas presentes en el grano de trigo son solubles en agua. La extracción de estas proteínas se lleva a cabo a temperatura ambiente y se requiere de varias etapas de purificación debido a la presencia de sales minerales mismas que son

extraídas de los tejidos, así como también precipitación repetitiva, centrifugación y diálisis (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2018). Las globulinas se encuentran en la parte de aleurona presente en el salvado de trigo. Las proteínas de la capa de aleurona tienen una estrecha relación con carbohidratos lo que permite la unión entre ellos y formar diversos complejos como el ácido fítico (Martínez *et al.*, 2002).

Las proteínas formadoras del gluten son de gran importancia en la panificación (Badui, 2012). Las gliadinas y gluteninas son los componentes del gluten, y se caracterizan por su solubilidad en soluciones de alcohol y en ácido acético, respectivamente. Por otro lado, las proteínas albúminas y globulinas son solubles en agua y en soluciones salinas, respectivamente (Goesaert *et al.*, 2005). La calidad de dichas proteínas se debe a varios factores tal como la variedad del trigo, las condiciones ambientales durante el cultivo, presencia de plagas en campo y condiciones de almacenamiento. Cualquier cambio en alguno de ellos provoca la alteración de la calidad y, en algunos casos, la pérdida total de producto (Girón-Calle *et al.*, 2005).

### **Pérdidas postcosecha**

Los cultivos de cereales pueden verse afectados desde la etapa de plantación hasta el producto final destinado al consumo, esto debido a la pérdida de calidad de estos (FAO, 2015). Se estima una pérdida de alrededor del 37 % a nivel mundial durante el periodo de producción (Gatehouse *et al.*, 1992) y de 6 al 20 % durante el periodo postcosecha, lo que ha representado un enorme problema a la economía este último alcanzando alrededor de 78 billones de dólares (Oerke *et al.*, 1994).

Existen una gran cantidad de factores que afectan el grano de trigo los cuales contribuyen a la pérdida de calidad de este. Un elevado nivel de respiración de los granos por temperatura y alta humedad, procesos de secado incorrectos, daño mecánico durante el movimiento interno de las plantas, incorrecta limpieza de los granos, conservación deficiente, daño de insectos y roedores (De la O *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2020). Además, mantener instalaciones inadecuadas de almacenamiento, propicia a una pérdida de trigo postcosecha (Garnero 2012). Según Pereira (1993) este deterioro puede evaluarse a través de la pérdida de la fuerza de las

semillas, desarrollo de hongos, pérdida de capacidad tecnológica de las harinas, incremento de la acidez, entre otros factores.

Los factores físicos influyen significativamente en el almacenamiento de los granos y las semillas. El trigo llega a su punto de madurez, en donde se convierte en un producto no perecedero. Al llevarse a cabo las siguientes etapas como es el almacenamiento, se presentan diversos factores que pueden alterar tanto la calidad fisiológica como tecnológica de los granos del trigo (Juárez *et al.*, 2014). La humedad y temperatura representan los factores principales ya que se relacionan directamente con la presencia de los factores biológicos (Carrero y Planes, 2007). Éstas deben mantenerse alejadas del valor óptimo de desarrollo de los microorganismos e insectos para asegurar el correcto almacenamiento de los granos.

Los cereales se almacenan por muchos meses sin presentar alguna alteración. Es importante mantener una humedad no mayor al 15 % ya que propicia su germinación y el crecimiento de diversos organismos (Badui, 2012). Dentro de los factores que contribuyen a la pérdida de granos se encuentra el consumo de los granos por plagas como aves, hongos y roedores, disminuyendo el rendimiento de los granos contaminándolo y reduciendo su calidad (Moreno-Martínez *et al.*, 1995). Lo anterior representa un gran peligro para la salud de los consumidores, ya que contaminan con sus heces y orina, o produciendo micotoxinas como el caso de aflatoxinas producidas por *Aspergillus spp* (OMS, 2018).

El deterioro de trigo almacenado se ve exacerbado por la presencia de otras plagas, principalmente de una gran variedad de insectos debido a su alta actividad metabólica (Hassan *et al.*, 2020). Las plagas de almacenamiento contribuyen a la disminución del valor nutritivo de los granos, de la calidad y su valor comercial (García-Lara *et al.*, 2007). Éstas consisten principalmente en gorgojos y polillas, quienes afectan la calidad tanto del grano como de sus harinas (FAO, 1993) del orden Coleóptera y Lepidóptera, respectivamente. Estos organismos producen olores desagradables y la formación de huecos y polvillo en los granos, lo que provoca la pérdida de calidad de los mismos afectando principalmente a las proteínas del gluten, especialmente la fracción de gluteninas responsables de la esponjosidad del pan (Werteker y Kramreither, 2008). El ataque se debe a que encuentran las condiciones óptimas de crecimiento, lo que les permite alimentarse y reproducirse de forma espontánea (Marshesi,

1971). Su presencia se basa en la adaptación y supervivencia debido a la alta tasa de reproducción y su preferencia al sustrato (Bourne-Murrieta *et al.*, 2014).

### **Ataque de insectos en trigo almacenado**

El grano de cereal es dañado por una gran cantidad de insectos, ya que algunos logran desarrollarse en su interior alimentándose del endospermo interno y creando una especie de agujeros de donde emergen los adultos (Hagstrum *et al.*, 2012). El ciclo de vida que tiene este tipo de insectos inicia con el huevo, larva, pupa y adulto, en donde la emergencia de los nuevos individuos ocurre de 4 semanas hasta 3 meses, dependiendo de la especie que se trate (Howe, 1950). En donde la hembra coloca alrededor de 500 huevecillos en el grano infestado, logrando que la población se exprese 4 o 5 veces más de la cantidad inicial (García-Lara *et al.*, 2007).

Este tipo de organismos se clasifican en dos tipos: aquellos que forman el huevo, larva y pupa se colocan dentro del grano, sobreviviendo siempre y cuando haya granos enteros, y son conocidos como insectos de tipo primario. En este grupo se encuentra el gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais*), gorgojo arroz (*Sitophilus oryzae*), gorgojo de granero (*Sitophilus granarius*), barrenador de grano menor (*Rhyzopertha dominica*) y larvas de la polilla de grano (*Sitotroga cerealella*) (Hagstrum *et al.*, 2012). En el caso de aquellos que se alimentan de los granos huecos y el polvillo resultado del ataque de insectos mencionados anteriormente o consecuencia de un tratamiento deficiente a los granos, así como también el ataque a productos procesados como el caso de la harina, se conocen como insectos de tipo secundario. Ejemplo de ellos son los gorgojos de la harina *Tribolium castaneum* (gorgojo rojo) y *Tribolium confusum* (gorgojo confuso) (FAO, 2019).

El principal componente que aprovechan estos organismos son las proteínas encontradas en el trigo, lo que afecta directamente en las propiedades tecnológicas de las harinas, producto principal obtenido. Esta supresión de nutrientes repercute en la formación de alimentos aptos para los consumidores debido a que el ataque durante el almacenamiento presenta un efecto no deseado en los parámetros de calidad (Hassan *et al.*, 2020). Se han realizado estudios (Özkaya *et al.*, 2009) en los cuales muestran que el ataque de insectos como *R. dominica* tiene un efecto en la calidad de la harina de trigo, disminuyendo el contenido de proteínas y, por lo tanto, en

los parámetros reológicos en panificación. Sin embargo, este insecto ha logrado resistir diversos métodos de control como el uso de productos químicos y atmósferas modificadas (Edde, 2012; Levy- De la Torre *et al.*, 2019).

### ***Rhyzopertha dominica***

*R. dominica* es una de las plagas más alarmantes en algunos países (Belda y Riudavest, 2012). *R. dominica* es una plaga destructora de trigo almacenado (Cinco-Moroyoqui *et al.*, 2008; Priya *et al.*, 2010) que ha desarrollado resistencia a insecticidas piretroides y organofosforados dificultando así su control (Edde, 2012; Oppert y Morgan 2013). En un estudio realizado por Collins *et al.* (2017) identificaron la fuerte resistencia por parte de *R. dominica* ante la presencia de fosfina en centros de almacenamiento, esto debido a las recurrentes fumigaciones comparadas a las de campo realizadas con menor frecuencia. Estos compuestos químicos afectan el sistema nervioso central de los insectos; los piretroides llevan a cabo una acción neurotóxica en donde se producen daños del sistema nervioso central y periférico (Santos-Gally, 2001); por otra parte, los organofosforados actúan interrumpiendo la comunicación entre células del sistema nervioso a partir de la molécula de acetilcolina, suprimiendo los impulsos nerviosos y ocasionando la muerte (Baird, 2001).

El ciclo de vida del barrenador menor de trigo ha sido identificado en cuatro etapas larvales, en donde la temperatura es el factor principal de desarrollo desde el huevo a la emergencia del adulto. Al menos 30 días se puede definir para el desarrollo de *R. dominica* (Begum y Huda, 1974), considerando el óptimo de humedad entre 12 y 14 % a una temperatura de 26 °C (Edde, 2012). Se conoce que el ciclo biológico de los insectos se ve alterado por la temperatura, de tal forma que, en verano suele ser mucho más rápido que en invierno, generando un incremento en el número de generaciones anuales y puede traer consigo el aumento sustancial de los daños (Faroni y García-Mari, 1992; Edde, 2006).

Este insecto tiene una marcada preferencia por el trigo, dado que obtiene los carbohidratos necesarios para ganar energía en forma de moléculas de ATP a través de la cadena de transporte de electrones (ETC) y fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Levy-De la Torre *et al.*, 2019). Así mismo, se ha identificado que este insecto es capaz de alimentarse de los granos de

trigo aun cuando presentan actividad inhibitoria, es decir, que puede obtener los nutrimentos del trigo sin ningún problema (Osuna-Amarillas *et al.*, 2012).

Este barrenador de trigo es capaz de cambiar su proceso metabólico de aerobio a anaerobio con mayor producción de lactato, para adaptarse a un mecanismo de control conocido como atmósferas modificadas (Levy- De la Torre *et al.*, 2019). Debido a esto, se cree que el insecto tiene formas de asimilar ciertas sustancias a través de mecanismos de defensa expresados genéticamente. La importancia que ha tomado *R. dominica* se debe a la diversidad de estrategias que utiliza para mantenerse y alimentarse de los granos almacenados (Edde, 2012), ya que ningún método ha logrado eliminarlos por completo. Para evitar el ataque de insectos existe una gran diversidad de métodos para su control, pero en algunos casos no han resultado efectivos.

### **Métodos de control para insectos de granos almacenados**

Las pérdidas de cultivos se ha vuelto un problema importante debido la presencia de diversos insectos fitófagos que han presentado cierta resistencia a productos químicos utilizados para su control (Agrafioti *et al.*, 2019; JeongOh-Yang *et al.*, 2018; Zhu-Salzman y Zeng, 2015). Además, estas técnicas resultan peligrosas tanto para los consumidores como para el medio ambiente debido a los residuos generados en su aplicación. Los compuestos utilizados con mayor frecuencia son los organofosforados y piretroides, y en algunos casos carbamatos, siendo su característica principal su alta toxicidad. Aunado a esto, diversos insectos han creado un mecanismo de adaptación resistiendo altas concentraciones de estos productos químicos (JeongOh-Yang *et al.*, 2018).

Los insecticidas piretroides sintéticos actúan modulando los canales de sodio, lo cual produce convulsiones y temblores por la hiperexcitación y, en algunos casos, parálisis por bloqueo de la actividad neuronal (Shafer *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Darglish *et al.* (2018) observaron que el barrenador de trigo menor *R. dominica* presenta resistencia a la deltametrina, un piretroide utilizado para la protección del grano almacenado. Por otra parte, la toxicidad provocada por organofosforados se asocia con la inhibición de la



acetilcolinesterasa en el sistema nervioso, dando como resultado la acumulación de acetilcolina provocando una interrupción en la neurotransmisión (Sparks y Nauen, 2015).

Debido a la respuesta generada hacia los productos químicos, existe un gran interés en el uso de métodos alternativos que prevengan el daño al medio ambiente y confieran seguridad a los consumidores, como el caso de las atmósferas modificadas, exponiendo a los insectos en ambientes de hipoxia, es decir, con cantidades reducidas de oxígeno siendo eficiente al combinarse con otro método (Kells *et al.*, 2001). Un tratamiento aplicado a los insectos *Callosbruchus maculatus* (Coleoptera) nombrado comúnmente como gorgojo de cuatro manchas, y el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* (Coleoptera) en trigo, dieron como resultado una mortalidad total de la población cuando fueron expuestos a concentraciones menores del 5 % de oxígeno (Njoroge *et al.*, 2019). En el caso de *Rhyzopertha dominica*, se encontró que al ser expuesto a bajas concentraciones de oxígeno (5 %) y una elevada concentración de dióxido de carbono (10 %) durante 24 horas, este responde aumentando la concentración de lactato, comparado con condiciones normóxicas (21 % O<sub>2</sub> y 0.02 CO<sub>2</sub>) donde este insecto actúa cambiando su metabolismo aeróbico al anaeróbico como respuesta a la falta de oxígeno (Levy-De la Torre *et al.*, 2019), mientras que el uso del aceite esencial del naranjo dulce *Citrus sinensis* mostró un efecto sinérgico si se combina con caolín. al aumentar la mortalidad de *R. dominica* siendo una alternativa a los insecticidas sintéticos (Campolo *et al.*, 2014).

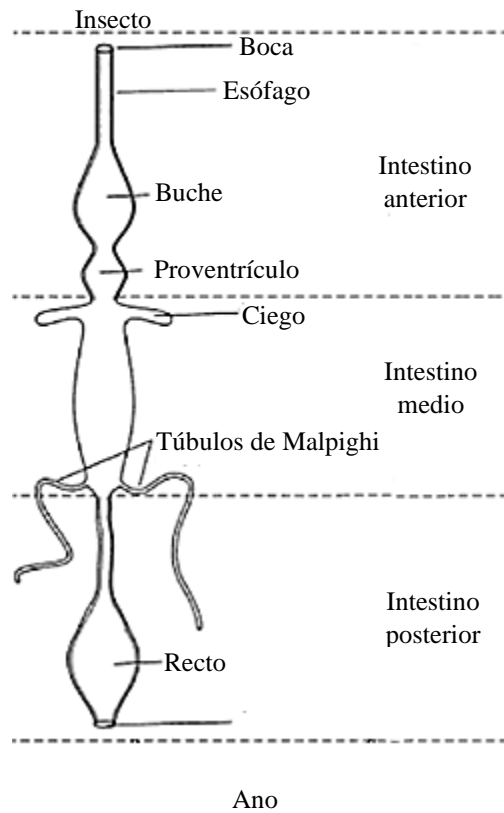
Los métodos biológicos consisten en exponer a los insectos plaga con organismos vivos que ayuden a reducirlas o eliminarlas, como el caso de patógenos, parasitoides y depredadores (Carballo y Guharay, 2004). Se han identificado dos enemigos naturales de *R. dominica*, encargados de eliminar la población debido a su menor tamaño, atacando principalmente a las etapas tempranas como los huevecillos y larvas como el bicho pirata de almacenamiento *Xylocoris flavipes* (Reuter) (Heteroptera: Antho-coridae) y la avispa parásita *Theocolax elegans* (Westwood) (Hymenoptera: Pteromalidae) (Adarkwah *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Er *et al.* (2018) observaron que aislamientos de *Beauveria bassiana* tuvieron efecto en el control de *R. dominica* al exponer los insectos en mezclas de esporas con granos de trigo, resultando una variación de mortalidad entre 13.67 a 100 %.

No obstante, se ha encontrado que *R. dominica* ha logrado adaptarse a diversos métodos de control. Éste adapta su metabolismo para resistir condiciones de hipoxia al aumentar la producción de lactato y poder sobrevivir bajo estas condiciones (Levy- De la Torre *et al.*, 2019). Con el uso de productos químicos como la deltametrina, este insecto ha logrado resistir las concentraciones permitidas de 0.5 mg kg<sup>-1</sup> aumentando el rango de mortalidad, disminuyendo de un 100 % hasta un 80.8 %, en comparación con aquella progenie sin tratamiento (Daglish y Nayak, 2018). Este insecto representa un gran peligro debido al daño que ocasiona a los granos de trigo, caracterizado por una alta actividad catalítica permitiéndole una alimentación rápida y eficiente.

### **Tracto digestivo de insectos**

Existe una gran variedad de especies de insectos, las cuales pueden consumir diferentes alimentos. La parte bucal dependerá del tipo de alimentación que tengan los insectos, así como la estructura intestinal estará en función de las propiedades mecánicas y de la composición nutrimental de los alimentos (Gullan y Cranston *et al.*, 2014). La digestión es sobre todo extracelular. El tracto digestivo de diversos insectos se reconoce por poseer un alto nivel de enzimas capaces de degradar las biomoléculas presentes en los alimentos (García-González *et al.*, 2017).

En los insectos y crustáceos es un proceso muy similar, además, que el bolo alimenticio es transportado a través del tubo digestivo por contracción muscular. Se ha descrito el tubo digestivo de un insecto en tres segmentos: intestino anterior (estomodeo), intestino medio (mesenterón) e intestino posterior (proctodeo) (Monteresino y De Brewer, 2001), como se muestra en la Figura 1. Estos segmentos se encuentran separados por válvulas, siendo la válvula cardíaca o esofágica aquella que comunica el estomodeo y el mesenterón, mientras que la válvula pilórica conecta el estómago con el duodeno separando el mesenterón y proctodeo (Jordán-Montés, 2012). Estos artrópodos poseen una cámara de almacenamiento ensanchada llamado *buche* que se localiza en el intestino anterior (Hill *et al.*, 2006).



**Figura 1.** Tracto digestivo de insectos

Fuente: Hill *et al.*, 2006.

Los insectos poseen una alimentación basada en un tipo de alimento ya sea sólido o líquido, tomando en cuenta el origen del mismo, animal o vegetal. Con ello se ha establecido una forma general de identificar el tracto digestivo, en el caso de una alimentación a base de sólidos, el intestino será corto, ancho y recto, reforzado con musculatura fuerte, mientras que, al alimentarse de líquidos, el intestino será largo y estrecho (Gullan y Cranston *et al.*, 2014). En el caso de insectos presentes en cereales, la clasificación corresponde a una alimentación basada en productos sólidos de origen vegetal, en donde se les conoce como insectos fitófagos, los cuales llevan a cabo su digestión a niveles de pH entre 9 y 12 para poder extraer los componentes de la planta con la que se alimentan (Gullan y Cranston *et al.*, 2014).

El intestino medio ocurre la producción y secreción de enzimas digestivas que llevarán a cabo los procesos metabólicos para la absorción de los nutrientes. El estomodeo actúa en la ingesta y triturado del alimento para ser dirigido al mesenterón. Una vez que llega al intestino medio (mesenterón) se secretan las enzimas y se absorben los nutrientes, finalizando el proceso en el proctodeo (Jordán-Montés, 2012).

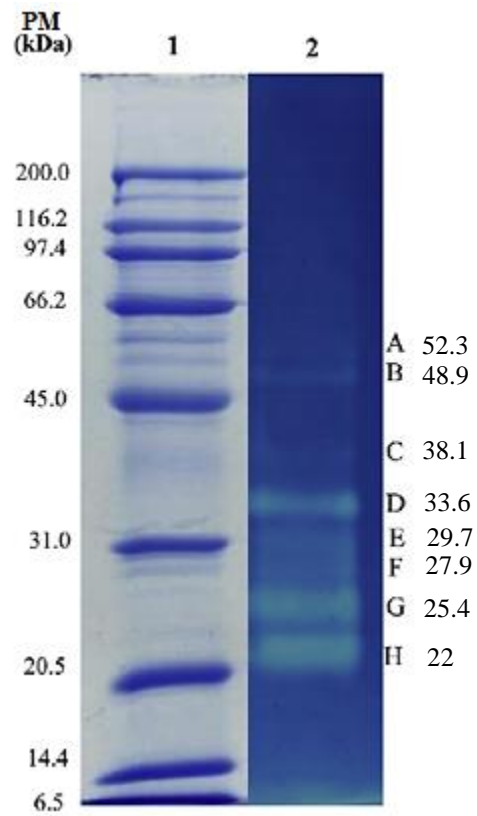
### **Proteasas digestivas de *Rhyzopertha dominica***

Las proteasas son biocatalizadores que van a hidrolizar los péptidos presentes en las proteínas contenidas en los productos alimentarios, para obtener los nutrimentos necesarios para el desarrollo y reproducción (Terra y Ferreira, 1994). La presencia de diversas proteasas en el tracto digestivo de los insectos depende principalmente de la composición química de la dieta que consumen.

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las proteínas. Normalmente actúan en condiciones dóciles de reacción a un pH óptimo entre 6 y 8 en todos los casos, siendo fáciles de manipular, no necesitan cofactores, son muy estables y, en general, relativamente simples en su arquitectura molecular (Fersht, 1980). Estas enzimas son capaces de hidrolizar ciertos componentes provenientes de los alimentos para su aprovechamiento, participando, además, en diversos procesos biológicos como digestión de las proteínas, replicación de genes, progresión del ciclo celular, crecimiento neuronal, curación de heridas e inmunidad (Sternlicht

Sternlicht y Werb, 2001). En relación con los grupos funcionales del centro activo, las enzimas proteolíticas se han clasificado como serina proteasas, aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas. El nombre que recibe cada una de ellas es debido al aminoácido activo dentro del sitio catalítico, serina, aspartato, cisteína y algunos metales, respectivamente (Rick, 1974).

Las enzimas serina-proteasa poseen este nombre ya que contienen un resto de serina singularmente reactivo, esencial para la actividad enzimática; así mismo, reaccionan irreversiblemente con organofosfatos, tales como el diisopropilfluorofosfato (Voet, 2006). Sus actividades son máximas a un pH cercano a 7.8. Se forma un “acilenzima” durante la reacción en la que la porción carboxílica del sustrato esterifica el hidroxilo de la serina reactiva (Fersht, 1980). Se ha identificado la actividad de serina proteasas tipo tripsina en algunos insectos, como el caso de larvas del semi looper verde de arroz *Naranga aenescens moore* (lepidoptera: Noctuidae) misma que se identificó a partir de la hidrólisis de BApNA como sustrato, siendo este específico para tripsina. Así como también, la inhibición de actividad de la enzima por medio del inhibidor sintético Clorhidrato de tosil-L-lisil-clorometano (TLCK), de igual forma, específico para tripsina (Zibae et al., 2011). En un estudio realizado por Osuna-Amarillas et al. (2012) se logró identificar a las enzimas que participan en la hidrólisis de proteínas en el tracto digestivo de *R. dominica* y que pertenecen al grupo de las serina-proteasas, específicamente aquellas del tipo tripsina, tal como se muestra en la Figura 2, siendo posible observar 8 bandas con actividad proteolítica a partir de ensayos específicos con caseína co-polimerizada como sustrato.



**Figura 2.** Determinación del peso molecular de proteasas de *R. dominica*.

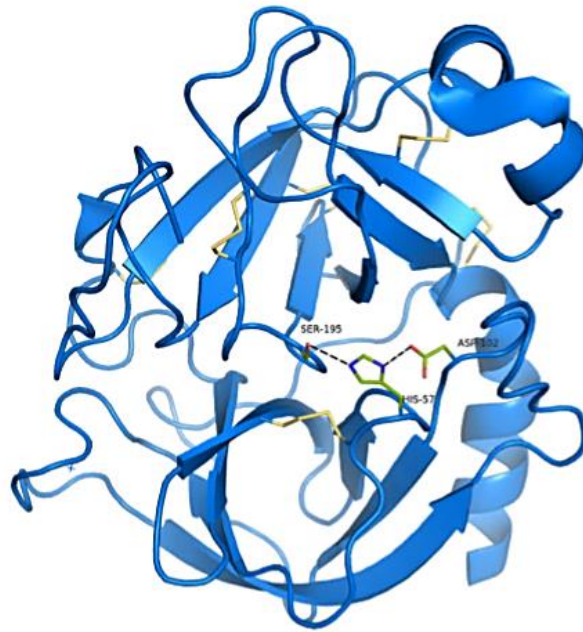
(1) Marcadores de peso molecular, y (2) zimograma de proteasas de *R. dominica*.

Fuente: Osuna-Amarillas *et al.* 2012.

La tripsina es específica para péptidos y ésteres de los aminoácidos lisina y arginina (Müller-Sterl, 2008). La diferencia en sus especificidades se debe a los cambios en sus bolsas catalíticas. En la quimotripsina hay una bolsa de fijación para las cadenas hidrofóbicas voluminosas, mientras que la tripsina en el fondo de ésta se encuentra un aspartato. El carboxilato cargado negativamente del Asp-189 forma un enlace salino con el amonio o guanidino cargado positivamente al final de la cadena lateral de la lisina o arginina (Fersht, 1980).

La tripsina (E.C. 3.4.21.4) es una enzima proteolítica, cuyo precursor inactivo es llamado tripsinógeno, mismo que se forma en las células exocrinas del páncreas y se secretan en el intestino (Rick, 1974). La proenzima se convierte en la enzima activa por una enteroquinasa y por la autocatálisis de la tripsina formada. El peso molecular de esta enzima es de 23.3 kDa (bovino y porcino), hablando específicamente de la forma inactiva, es decir, el tripsinógeno tiene un peso molecular alrededor de 24 kDa (Elgendy y Al-Ruweidi, 2016). El pliegue de tripsina se caracteriza por una estructura de dos barriles beta de seis cadenas. Los residuos catalíticos se encuentran en la interfaz entre estos barriles. His 57 y Asp 102 se originan en el barril beta N-terminal, mientras que Ser 195 se origina en el barril C-terminal (Di Cera, 2009).

La estructura se estabiliza mediante seis puentes disulfuro completamente conservados para resistir el entorno reductor extracelular del tracto gastrointestinal (Halfon y Craik, 1998). La tripsina tiene un Asp en el fondo de este bolsillo que forma un puente salino combinando dos interacciones no covalentes con Arg o Lys. La triada catalítica mostrada en la Figura 3 presente en la tripsina Ser 195- His 57- Asp 102 serán los encargados de romper el enlace peptídico de las proteínas, actuando principalmente en residuos de Lys y Arg (Müller-Esterl, 2008).



**Figura 3.** Estructura tridimensional de la tripsina

Los aminoácidos constituyentes de la triada catalítica (Ser-195, His-57 y Asp-102), en color amarillo se aprecian los puentes disulfuro.

Fuente: Walter *et al.*, 1982.



## Actividad enzimática

La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su plegamiento, es decir, su estructura tridimensional (Ramírez y Ayala, 2014). Además, se distinguen por tres características: fuerza catalítica, especificidad y regulación, las cuales facilitan los procesos biológicos (Copeland, 2000). La actividad enzimática depende de diversos factores como la temperatura (Sotelo-Mundo *et al.*, 2007; Mehrabadi *et al.*, 2011), inhibidores presentes en las plantas (Mahbobe *et al.*, 2012), pH, así como también, modificaciones en la postraducción como la glicosilación y fosforilación (Wei *et al.*, 2006; Vanderborre *et al.*, 2011). Según Josephraj Kumar *et al.* (2006), las características de proteasas intestinales de insectos pueden cambiar durante las etapas de crecimiento. La mayor actividad proteolítica en el semi looper verde de arroz *Naranga aenescens moore* (Lepidoptera: Noctuidae) fue identificada en el tercer estadio según Zibae *et al.* (2011).

Los procesos postraduccionales juegan un papel importante en la conformación final de la molécula, así como también en la función que va a desempeñar en el organismo. Dentro de éstos destaca la fosforilación permitiendo, en algunos casos, la activación de algunas enzimas, y la glicosilación, la cual estabiliza a la enzima confiriéndole estabilidad térmica (Zhou *et al.*, 2019; Scheys *et al.*, 2020). El proceso bioquímico de glicosilación es la unión covalente de una cadena de oligosacáridos a una cadena principal de proteínas considerándose una modificación proteica común (Harper *et al.*, 1911). Existe una gran diversidad de conformaciones debido al tamaño y la estructura de la cadena de carbohidratos presentes, mismos que pueden alterar las características fisicoquímicas de una proteína (Lam *et al.*, 2013). Se pueden distinguir dos tipos principales, denominados glicosilación ligada a N y O. De igual forma, el pH del intestino es un factor determinante en la actividad de las enzimas digestivas (Terra y Ferreira, 1994).

Otro factor importante son los inhibidores de proteasas (IP's) distinguidos por ser esenciales en la regulación de la actividad proteolítica, jugando un papel importante en diversos procesos biológicos relacionados al metabolismo y fisiología celular (Clemente *et al.*, 2019). La benzamidina es un potente inhibidor de la tripsina y la serina proteasa similar a la tripsina

(Tsuji y Yuasa, 2019). El mecanismo de acción que tienen estos inhibidores resulta en tres tipos: competitivo, incompetitivo y no competitivo (Müller-Esterl, 2008).

Los inhibidores de serina proteasa, por sus siglas en inglés *SPI*, de diferentes familias sobreexpresadas en varias especies de plantas presentan un mecanismo de defensa contra animales, insectos y microorganismos. Los *SPI* de las plantas son capaces de suprimir la actividad de serina-proteasas en el tracto digestivo de los insectos, evitando la asimilación de proteínas vegetales (Habib *et al.*, 2007).

### **Inhibidores proteicos de la planta**

Los inhibidores de proteasas participan en la defensa de las plantas contra plagas y microorganismos fitopatógenos (Usha y Jyothsna 2010). Con la evolución de diversos organismos, se ha identificado que las plantas adquieren un mecanismo de defensa para contrarrestar el daño provocado por insectos suprimiendo la actividad enzimática en su tracto digestivo, evitando la asimilación de proteínas vegetales (Ryan, 1990; Gatehouse *et al.*, 1999). En caso de que este mecanismo no sea suficiente, algunos componentes de la planta como son los anti-nutricionales (Belmar y Nava, 2000), podrían asegurar la prevención del daño al ser un producto de escaso valor nutricional. Un dato interesante fue que una fracción de albúmina presente en el grano de trigo logró inhibir la actividad catalítica de *R. dominica* (Osuna-Amarillas *et al.*, 2012).

Así mismo, se ha reportado que la presencia de inhibidores de albúmina de trigo tiene un efecto inverso relacionado con la inhibición (Cinco-Moroyoqui *et al.*, 2008). Es decir, a menor cantidad de albúmina mayor es la actividad inhibitoria hacia las amilasas contenidas en *R. dominica*. La actividad de las amilasas se encuentra dentro de un pH de 6.5 a 7. La concentración de  $\beta$ -mercaptoetanol aumenta lentamente la actividad enzimática de amilasas presentes en *R. dominica*. Se hace referencia a esto debido a la ruptura de enlaces disulfuro dentro de las mismas, lo que permite la interacción del sustrato con el sitio activo de la enzima (Cinco-Moroyoqui *et al.*, 2008). La actividad de BApNAasa en el intestino medio de *R. dominica* se redujo significativamente por el inhibidor de serina proteasa y los inhibidores

específicos de tripsina (Zhu y Baker, 1999). La actividad de BApNAasa no es sensible a inhibidores específicos de quimotripsina o aspártico proteasas.

La inhibición de las enzimas digestivas de los insectos con inhibidores proteicos o no proteicos podría ser un enfoque alternativo eficaz para controlar las infestaciones. Un dato interesante obtenido a partir de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas y proteasas presentes en el trigo (*Triticum aestivum*) fue su actividad inhibitoria hacia las enzimas digestivas de *R. dominica* y *Tenebrio molitor* según el estudio de Priya *et al.* (2013).

Se ha reportado que cuando los insectos se alimentan de algún sustrato, al encontrar una toxina o un inhibidor, muchos de ellos experimentan una serie de cambios adaptativos para continuar su desarrollo normal (Amirhusin *et al.*, 2007). Los insectos tienen una gran capacidad para expresar una serie de proteasas que no son identificadas por los inhibidores presentes en la planta (Qu *et al.*, 2003). Un método encontrado en *Drosophila melanogaster* fue la digestión de proteínas a partir de proteasas glicosiladas, permitiéndole una alimentación más eficiente (Tomasz *et al.*, 2017). La glicosilación es un proceso post-traducciona que le confiere ciertas funcionalidades a la molécula modificando su estructura tridimensional (Berg *et al.*, 2007).

## Glicosilación

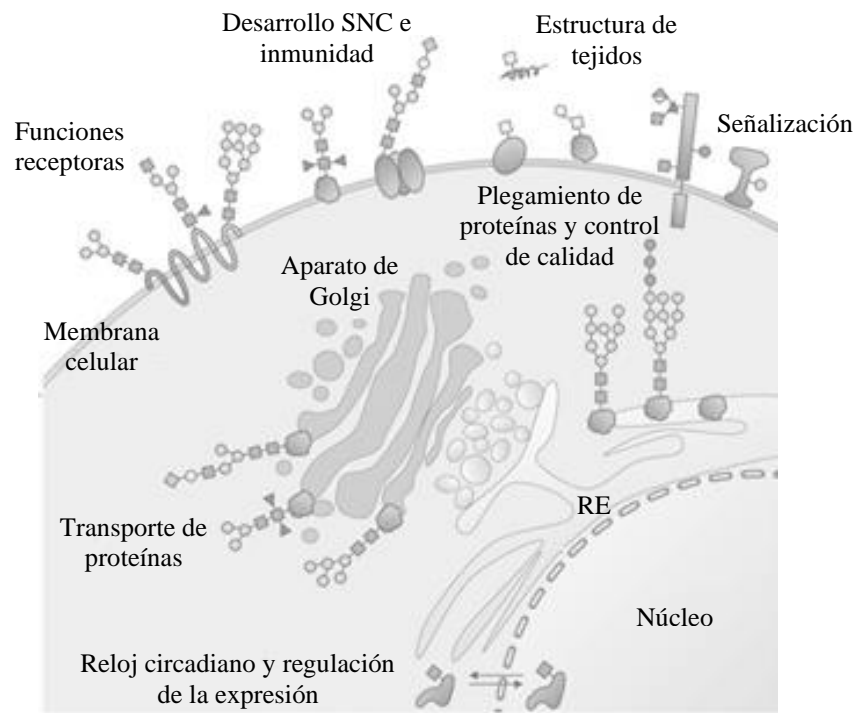
La glicosilación es un proceso bioquímico que modifica la estructura y función de proteínas debido a la unión de carbohidratos en los grupos laterales de aminoácidos, asparagina (Asn), serina (Ser) o treonina (Thr). Esta modificación en las moléculas de proteína afecta sus propiedades termodinámicas, cinéticas y estructurales, presentándose en dos tipos: N- y O-glicosilación (Nagai *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2013).

En la glicosilación de proteínas existe una gran variedad de enlaces formados entre trece monosacáridos diferentes y 8 aminoácidos, creando al menos 31 combinaciones entre estos dos componentes (Spiro, 2002). El contenido de carbohidratos unido a la cadena polipeptídica representa alrededor del 80 % de la estructura total variando de 1 hasta 30 residuos (Horton *et al.*, 2008). Las glicoproteínas, en su mayoría, se secretan de la célula o se adhieren a la superficie exterior de la membrana plasmática. Existe una menor cantidad de glucoproteínas

en el citoplasma y algunos orgánulos que participan en su producción se observan en la Figura 4. El grupo de glicoproteínas está formado por hormonas, enzimas, proteínas estructurales y de transporte; se forman por una cadena de oligosacáridos que pueden contener diferentes azúcares como hexosas, hexosaminas, ácidos siálicos y pentosas.

La glicosilación es específica de la especie y se determina por la estructura de la proteína y el sitio de unión del carbohidrato (Vanderborre *et al.*, 2011). Es decir, la glicosilación de cualquier proteína depende de la célula o tejido en el que se produce y que el polipéptido codifica información que dirige su propio patrón de glicosilación. En muchos casos, la proteína está unida a más de un solo carbohidrato en las diferentes uniones que se presentan (Reinders y Sickmann, 2007). La alteración de este proceso provoca graves consecuencias, entre ellas la interrupción de la metamorfosis o la mortalidad (Tomasz *et al.*, 2017). Los N-glicanos están unidos a los residuos Asn del esqueleto peptídico, mientras que los O-glicanos están conectados a los residuos Ser o Thr. Los glicanos ligados a N también pueden ser glicosilada en otros residuos de aminoácidos como Arg, Trp y His, y los residuos ligados a O en Tyr, hydroxyPro e hydroxyLys. Además, la glicosilación puede ocurrir en el grupo CH del indol anillo de Trp y el grupo tiol de Cys (glicosilación C y S, respectivamente) (Dutta y Mandal, 2017). Existe una tercera clasificación en la cual la unión se lleva a cabo entre el aminoácido carboxilo terminal por medio de una porción fosforiletanolamina unida a un oligosacárido que, a su vez, se encuentra unido al fosfatidilinositol (FI) (Harper *et al.*, 1911).

Se reporta que los azúcares que forman parte de este tipo de complejos son hexosas como d-galactosa, 1-fucosa, d-glucosa y d-manosa, también forman parte algunas hexosaminas como es el caso de la N- acetil-d-galactosamina y N-acetil-glucosamina (Voet y Voet, 2006). Existe la presencia de ácidos siálicos caracterizados por poseer nueve carbonos en su estructura (N-acetilneuramínico) y d-xilosa perteneciente al grupo de las pentosas (Horton *et al.*, 2008). En estas conformaciones se puede encontrar enlaces  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo estos para el enlace O-glicosídico y N-glicosídico, respectivamente (Horton *et al.*, 2008). La estructura del oligosacárido sirve de referencia para realizar una clasificación de proteínas dependiendo de la ruta que deban seguir. La alteración de sus propiedades físicas y biológicas se da por la gran diversidad y cantidad de cadenas de oligosacáridos.



**Figura 4.** Órganulos celulares que participan en la producción de glicoproteínas y algunas rutas que siguen las mismas.

Fuente: Tomasz *et al.*, 2017.

La modificación en su forma, tamaño, solubilidad, carga eléctrica, así como su estabilidad se da por medio del tipo de azúcares unidos a la cadena polipeptídica. La rapidez de secreción y plegado se ven afectadas de igual forma (Wei *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2014; Marada, 2015). Las enzimas glicosiladas han resultado ser más estables con respecto a su propia degradación autolítica y a la de otras proteasas (Lis y Sharon, 1993). Por lo que se ha reportado que modificaciones en la autólisis y proteólisis se deben a la estabilidad adquirida sin revelar cambios significativos en sus parámetros cinéticos (Xu *et al.*, 2015).

El mecanismo de formación de una proteína glicosilada inicia con el ensamblaje y transferencia del oligosacárido a un compuesto de poliisopreno (Lis y Sharon, 1993). En el caso de células eucariotas es el dolicol, un compuesto de 17 a 20 unidades de isoprenoide. Para iniciar este compuesto se fosforila y se forma GluNAc-pirofosfordolicol (GluNAc-P-P-Dol), un lípido que acepta otros azúcares para ensamblarlos, sintetizado en las membranas del retículo endoplasmático a partir de Dol-P y UDP-GluNAc (Harper *et al.*, 1911).

## **N- glicosilación**

La N- glicosilación se conoce por el enlace del carbohidrato en la secuencia Asn-Xaa-Ser/Thr, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido, con excepción de la prolina (Davis *et al.*, 2006). Diversas investigaciones indican que los insectos pueden sintetizar glucanos formados por diferentes compuestos principalmente por ocho monosacáridos, entre los cuales se encuentran fucosa (Fuc), galactosa (Gal), glucosa (Glc), N-acetilgalactosamina, (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido glucurónico (GlcA), manosa (Man), xilosa (Xyl) y en algunos casos ácidos siálicos (SA), lo que significa la existencia de una gran diversidad de estructuras (Tomasz *et al.*, 2017).

Los oligosacáridos ligados a nitrógeno son diversos tanto en la composición como la secuencia de azúcares. Estos se dividen en tres tipos: alta manosa, complejos e híbridos (Nelson y Cox, 2009). Para la formación de cadenas altas en manosa se utilizan residuos de glucosa y de la propia manosa. En el caso de las secuencias complejas participan residuos de glucosa y residuos de manosa, mismas que interactúan por medio de glucosidasas en el

retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Las cadenas híbridas se forman por los dos tipos mencionados anteriormente, cadenas complejas y estructuras de manosa (Harper *et al.*, 1911).

En insectos como *T. castaneum* se ha identificado la presencia de N-glucanos mediante ensayos de ARN de interferencia (ARNi) de genes involucrados en los primeros pasos de glicosilación, éstos se relacionan principalmente con la metamorfosis, resultando crucial para su crecimiento y supervivencia; al realizar el bloqueo del desarrollo larval dieron un resultado del 100 % de mortalidad en los insectos (Walski *et al.*, 2016). Otro dato interesante, se vió en una xilanasa (Af-XYNA) de la familia 10 de glucósido hidrolasa (GH) de *Aspergillus fumigatus* fue objeto de estudio para determinar la función de la glicosilación, específicamente la ligada a nitrógeno o N-glicosilación. Af-XYNA exhibió una temperatura y un pH óptimos favorables (75 °C y pH 5.0) y una buena termoestabilidad (manteniéndose estable a 60 °C). Esta estructura modificada desempeña diversas funciones, entre ellas, presenta una alta actividad específica y mejor estabilidad térmica entre mayor grado de N-glicosilación exista (Chang *et al.*, 2017).

La retención de proteínas en el retículo endoplasmático, así como la disminución en la abundancia de ésta y el deterioro de transporte hacia la superficie celular ha dado como resultado una disminución en la actividad de *Drosophila chaoptin* debido a la disminución de la N-glicosilación (Hirai-Frujita *et al.*, 2008). Grinnel *et al.* (1991) encontraron que las propiedades de una enzima glicosilada se ven afectadas cuando este proceso se presenta en diferentes sitios. Por otra parte, Wang *et al.* (2018) encontraron que la N-glicosilación era importante para el plegamiento y el tráfico de corina en el retículo endoplasmático. Así mismo, demostraron que, en corina, enteroquinasa y protrombina, que tienen estructuras de dominio de proteína y funciones fisiológicas distintas, la N-glicosilación en sus dominios de proteasa tiene una función común en el plegamiento asistido por calnexina y la expresión extracelular. Es decir que, la N-glicosilación en el dominio de la proteasa ofrece una ventaja en la eficiencia del plegamiento de proteínas y, por lo tanto, en la producción de proteínas.

La mayoría de los procesos biológicos, como el metabolismo de las macromoléculas, la señalización celular, la transmisión sináptica, el desarrollo de tejidos, la diferenciación y la muerte celular, están mediados por proteínas N-glicosiladas (Zielinska *et al.*, 2012).

## **O-glicosilación**

O-GalNAc está unido al grupo hidroxilo, específicamente en el oxígeno de los residuos de serina o treonina de la proteína a través de un enlace  $\alpha$ , mientras que O-GlcNAc se une a través de un enlace  $\beta$  diferente a la glicosilación ligada a N (Charbonneau *et al.*, 2007). Las cadenas de oligosacáridos se unen a la proteína por medio de un azúcar al inicio, seguida por azúcares sencillos ensamblados en el extremo no reductor del mismo. Este proceso es llevado a cabo por las enzimas glicosiltransferasas, encargadas de enlazar los grupos glicosilo que provienen de coenzimas nucleótido-azúcar (Horton *et al.*, 2008). El tipo de enlace en O-glicosilación es inestable a una base, ya que, se disocia fácilmente en condiciones alcalinas diluidas para formar  $\alpha$ -aminopropeno y ácido  $\alpha$ -aminobutenoico (Zhou *et al.*, 2020). La formación de glucoproteínas O-ligadas se crean a partir de azúcares de nucleótido, mediante la transferencia progresiva de azúcares provenientes de la forma activa de los monosacáridos, es decir, de los azúcares de nucleótido (Hansen *et al.*, 1996). Las enzimas encargadas de este proceso se encuentran principalmente en el aparato de Golgi, específicamente llevando las reacciones de terminación en el compartimento *trans* del Golgi.

Actualmente, no se han reportado las funciones implicadas en dicha unión, diferenciando la importancia de encontrar tanto una glicosilación ligada a N u O. Es por ello que se ha tomado, de forma general, la contribución de dicha modificación hacia la estructura peptídica.

## **Funciones de la glicosilación**

Las proteínas glicosiladas presentan diversas funciones gracias a la presencia de los glicanos. Se ha mencionado aquellas del tipo fisicoquímico como la modificación de la solubilidad, carga eléctrica, masa, viscosidad, estabilidad en la estructura de la proteína, estabilidad térmica y le confiere protección ante la proteólisis (Vanderborre *et al.*, 2011). La capacidad de los grupos de carbohidratos para modular las propiedades físicas de la proteína a la que están unidos, especialmente el plegamiento general de la cadena nascente de polipéptidos, así como para protegerla contra la proteólisis, está bien documentada (Goldstein, 1980). Los carbohidratos actúan como determinantes de reconocimiento en una variedad de procesos



fisiológicos y patológicos, tal como se observa en la Tabla 1, y las funciones que confieren son extensas.

En el caso de las funciones biológicas que aporta la presencia del carbohidrato en una proteína se encuentra, la regulación del tráfico intracelular. Así mismo, modula la actividad de enzimas y hormonas, actúan como receptores de diversas moléculas como lectinas, anticuerpos, toxinas, entre otras (Vanderborre *et al.*, 2011). Algunas enzimas glicosiladas son más estables respecto a su propia degradación autolítica, en donde sus parámetros cinéticos no revelan cambios significativos debido a la estabilidad conferida por el proceso de glicosilación (Russell *et al.*, 2007).

Los glicanos pueden rigidizar la proteína formando enlaces de hidrógeno con el esqueleto del péptido. Dado que el área superficial de los restos de carbohidratos es bastante significativa en comparación con la del resto de péptidos. Además, pueden influir en otras propiedades de las proteínas, como la estabilidad al calor y la susceptibilidad a la proteólisis. El efecto depende del sitio particular de glicosilación dentro de la cadena de proteínas (Grinnel *et al.*, 1991). Una vía alternativa para la degradación de las glucoproteínas comienza con la proteólisis del esqueleto del polipéptido e implica la participación de endoglucosidasa (s) específica. En las glicoproteínas con más de un glicano, la mutagénesis proporciona información sobre la contribución de cada glicano a las propiedades generales de la molécula (Solá y Griebenow, 2006). Una aplicación importante que tiene este proceso de degradación se lleva a cabo en la determinación de parámetros cinéticos ya que, al conferirle ciertas propiedades la actividad enzimática se ve modulada por la presencia del azúcar.

**Tabla 1.** Funciones que desempeñan las glucoproteínas

<b>Función</b>	<b>Glucoproteínas</b>
Estructura molecular	Colágenas
Agente lubricante y protector	Mucinas
Molécula de transporte	Transferrina, ceruloplasmina
Molécula inmunológica	Inmunoglobulinas, antígenos de histocompatibilidad
Hormonas	Gonadotropina coriónica, hormona estimulante de la tiroides (TSH)
Enzima	Varias, por ejemplo, fosfatasa alcalina.
Sitio de reconocimiento de unión celular	Varias proteínas que participan en interacciones célula-célula (p. ej., espermatozoide-ovocito), virus-célula, bacteria-célula y hormona-célula.
Anticogelante	Algunas proteínas plasmáticas de los peces en agua fría.
Interactúan con carbohidratos específicos	Lectinas, selectinas (lectinas de adhesión celular), anticuerpos.

Fuente: Harper, H.A. 2001.

## **Glicosilación en la actividad enzimática**

Se reconocen varias funciones en los restos de carbohidratos en glucoproteínas siendo una de ellas la de impartir estabilidad a las proteínas, así como también, protección contra la degradación, control de solubilidad de proteínas y transporte. Además de crear un efecto en contra de la proteólisis, el proceso de glicosilación en proteasas resulta importante al tener un efecto significativo en la actividad catalítica (Goettig 2016). Así mismo, la presencia de glicanos puede alterar el reconocimiento al sustrato, modificar la especificidad y afinidad de las enzimas (Lam *et al.*, 2013).

En diversos estudios se ha encontrado que la presencia de oligosacáridos unidos a la cadena peptídica que forma parte de algunas enzimas, le confieren cierto aumento en la actividad catalítica (Vanderborre *et al.*, 2011). Como el caso de Vivas *et al.* (2010), los carbohidratos asociados a la barnetobina similar a la trombina, le confieren estabilidad catalítica y modulan su unión al sustrato, ya que se logró identificar que la actividad se ve reducida en un 60 % al desglicosilarse. En un caso estudiado por Subhash *et al.* (2005) los investigadores encontraron que la actividad proteolítica de una serina proteasa presente en la planta medicinal *Euphorbia mili* disminuye después de desglicosilación con ácido trifluoro-metanosulfónico (TFMS), encontrándose este proceso crucial para la actividad enzimática.

## **HIPÓTESIS**

La presencia de carbohidratos en las enzimas serina-proteasa de *R. dominica* modifican la afinidad hacia el sustrato en relación con el grado de glicosilación enzimática, permitiendo utilizar este tipo de enzimas como una herramienta útil para su alimentación debido al aumento en su actividad cinética, sugiriendo este proceso como un posible mecanismo de adaptación.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Caracterizar las propiedades cinéticas de proteasas glicosiladas presentes en *R. dominica*.

### **Específicos**

1. Aislar y purificar las proteasas glicosiladas a partir del extracto enzimático de la progenie de *R. dominica*.
2. Determinar el efecto de la variedad del trigo sobre la producción de enzimas glicosiladas presentes en el tracto digestivo de *R. dominica* respecto a su actividad inhibitoria.
3. Identificar los parámetros cinéticos las proteasas glicosiladas y no glicosiladas del insecto *R. dominica*.
4. Identificar las diferencias con relación a los parámetros cinéticos, energía de activación y constante de inhibición de las proteasas glicosiladas y no glicosiladas de *R. dominica*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar este trabajo de investigación, se dividió en dos etapas con la finalidad de cumplir completamente con los objetivos establecidos:

Etapa I: 1) Aislar y purificar las proteasas glicosiladas a partir del extracto enzimático de la progenie de *R. dominica* cultivados en los trigos Villa Juárez, Kronstad y Borlaug. 2) Determinar el efecto de la variedad del trigo sobre la producción de enzimas glicosiladas respecto a su actividad inhibitoria.

Etapa II: 1) Caracterizar cinéticamente las proteasas glicosiladas del insecto *Rhyzopertha dominica* desarrollado en los trigos hexaploides de la variedad: Villa Juárez, Kronstad y Borlaug. 2) Identificar las diferencias con relación a los parámetros cinéticos, energía de activación y constante de inhibición de las proteasas glicosiladas y no glicosiladas de *R. dominica*.

## Etapa I

### **Aislamiento y Purificación de las Proteasas Glicosiladas a partir del Extracto Enzimático de la Progenie de *R. dominica* y Determinación del Efecto de la Variedad del Trigo sobre la Producción de Enzimas Glicosiladas Respecto a su Actividad Inhibitoria**

El objetivo principal de esta etapa es la selección de las variedades de trigo con las cuales se realizarán los estudios correspondientes para llevar a cabo una correcta comparación respecto a la actividad específica inhibitoria que presenta la fracción de albúmina ante el extracto proteolítico de *R. dominica*, siendo aquellas que presenten la mayor, mediana y menor actividad específica inhibitoria.

#### Materia Prima

En este estudio, el trigo utilizado fue proporcionado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), unidad experimental de Cd. Obregón. Las variedades de trigos harineros (*Triticum aestivum* L.) utilizadas para comparaciones posteriores fueron Villa Juárez F2009, Kronstad F2004 y Borlaug 100. Las tres variedades tienen un hábito de crecimiento primaveral, la altura se encuentra entre 91 a 95 cm y el espigamiento se encuentra en un promedio de 77 días. El contenido de proteína en grano se ha reportado de 12.2 %, 13.4 % y 11.9 % para Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, respectivamente (Camacho-Casas *et al.*, 2010; Chavez-Villalba *et al.*, 2020; Valenzuela-Herrera *et al.*, 2012). Estas variedades de trigo presentan diferencias en la resistencia a plagas específicas del trigo como lo es la roya de la hoja (*Puccinia triticina*), en donde la variedad Borlaug presenta la mayor resistencia, seguido de Kronstad con una resistencia que va de moderada a moderadamente susceptible y, por último, la variedad Villa Juárez quien presenta resistencia tanto a la roya de la hoja, como la roya lineal o amarilla (*Puccinia striiformis*) y al carbón parcial del grano (*Tilletia indica*). Las tres variedades se cosecharon en el Campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB) (27° 20' longitud y 40 m, latitud oeste) en condiciones de riego normal, en el Valle del Yaqui, Sonora, durante los ciclos otoño-invierno.

### Cultivo de Insectos

Para obtener los insectos del presente estudio, primeramente, se llevó a cabo la limpieza del trigo *Triticum durum* L. (500 g) de las variedades Borlaug, Kronstad y Villa Juárez. Estos fueron colocados en frascos de vidrio e infestados con 100 insectos adultos sin sexar de la especie *R. dominica*, bajo condiciones de incubación 27° C y humedad relativa del 70 % en el laboratorio de Entomología del Departamento de Investigación y Posgrado (DIPA) de la Universidad de Sonora. A los 15 días, los adultos que se utilizaron para la infestación fueron retirados del trigo mediante un tamizado, pasando los granos infestados por un tamiz de 7/64''. Las muestras de trigo se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones (27 °C y 70 % H.R.) por 45 días adicionales para la emergencia de nuevos insectos. Las progenies emergidas se utilizaron para la preparación del extracto proteolítico.

### Obtención de extractos de albúmina de trigo en 6 variedades: Navojoa, Tacupeto, Borlaug, Cirno, Onavas y Kronstad.

Se obtuvo la harina de cada trigo a partir de la trituración de 10 g de trigo limpio en un molino (marca Hamilton Beach) durante 1 min y fue cernida en una malla de 60 mesh. Se tomó una muestra de 1 g de cada una de las variedades de estudio: Navojoa, Tacupeto, Borlaug, Cirno, Onavas y Kronstad. En cada caso, se agregaron 50 mL de buffer de fosfato de sodio 0.01 M, pH 8. Las muestras se agitaron mecánicamente en vasos de precipitado con la ayuda de un agitador magnético sobre una placa giratoria por 1 h a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). Los extractos fueron centrifugados a 10 000 g por 1 h a 4 °C y los sobrenadantes libres de impurezas fueron transferidos a tubos limpios.

### Cromatografía de Exclusión Molecular en Extractos de Trigo

Para llevar a cabo una cromatografía de exclusión molecular de la fracción de albúmina de trigo, la cual contiene inhibidores de proteasas del tipo tripsina, se prepararon extractos proteicos de trigo de las variedades Villa Juárez, Kronstad y Borlaug. Se pesaron 5 g de trigo limpio de cada variedad de trigo, se trituraron en un mortero y se tamizaron a través de una



malla 10XX para uniformizar el tamaño de partícula y optimizar la extracción de proteínas. De las harinas obtenidas se tomó 1 g de muestra y se combinó con 50 mL de buffer fosfato de sodio 0.01 M, pH 8. La extracción de proteína se llevó a cabo por 1 h a temperatura ambiente bajo agitación mecánica. Se centrifugaron las muestras a 10,000 g durante 1 h a 4 °C para obtener el sobrenadante y, finalmente, se filtraron a través de filtros de nylon Cameo 17N de 0.45 µm (Osmonics Laboratory Products, Minnetonka, MN).

Se inició la cromatografía de exclusión molecular inyectando 4 mL de extracto de trigo (aproximadamente 80 mg de proteína) en una columna de 2.5 cm de diámetro × 100 cm de longitud empacada con la resina Bio-Gel P-100 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) previamente equilibrada con buffer fosfato de sodio dibásico 0.01 M, pH 8. La proteína fue eluída de la columna con el buffer de equilibrio y se colectaron fracciones de 3 mL. La detección de proteína en las fracciones se llevó a cabo a 280 nm, deteniendo la colección de fracciones cuando se dejó de detectar proteína en las fracciones que eluían de la columna. Las fracciones cromatográficas fueron analizadas en su capacidad inhibitoria de la actividad proteolítica tipo tripsina de progenies de *Rhizopertha dominica*.

#### Actividad Inhibitoria de Extractos de Albúmina de Trigo en Extractos Enzimáticos de *R.*

##### *dominica* variedad Borlaug

Con el objetivo de seleccionar las variedades de trigo para el estudio, se llevó a cabo el análisis de actividad inhibitoria a partir de extractos de albúmina de trigo de 6 variedades: Navojoa, Tacupeto, Villa Juárez, Borlaug, Kronstad y Onavas. Para iniciar con la reacción, una dilución 1:4 (400 µL volumen total) se tomaron 30 µL de extracto enzimático de *R. dominica* variedad Borlaug y se aforó a 100 µL en volumen total con buffer fosfato de sodio monobásico 1 mM, pH 8. Así mismo, se agregó de una alícuota de 30 µL de extracto inhibitorio de la fracción de albúmina y los tubos se incubaron a una temperatura de 37°C durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió con el inicio de la reacción agregando 200 µL de sustrato *BApNA* 1 mM dejando incubar nuevamente a 37°C durante 10 min. La reacción se detuvo al añadir 150 µL de ácido acético al 30 %. Las

lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV/Vis NanoDrop 800 (Thermo Scientific, Waltham, MA) a una longitud de onda de 410 nm.

Las variedades seleccionadas para estudios posteriores fueron Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, las cuales mostraron una baja, mediana y alta actividad inhibitoria, con valores de actividad específica inhibitoria de 307.42 UA/mg, 627.21 UA/mg y 824.41 UA/mg, respectivamente.

#### Determinación de la Actividad Proteolítica en Extractos Enzimáticos de *R. dominica* utilizando BApNA como Sustrato.

La actividad proteolítica se midió en los diferentes extractos enzimáticos de las variedades Tacupeto, Onavas, Borlaug 1 y 2, Cirno 1 y 2, y Navojoa. Para iniciar se colocaron 60 µL de extracto enzimático en tubos aforando a 100 µL con buffer fosfato de sodio monobásico 1 mM, pH 8. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 37°C. Para iniciar con la reacción se agregaron 200 µL del sustrato BApNA (N $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) 1 mM y se dejó incubar durante 10 min a la misma temperatura. La reacción se detuvo al agregar 150 µL de ácido acético al 30 %. Las determinaciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV/Vis NanoDrop 800 a una longitud de onda de 410 nm.

#### Obtención del Extracto Proteolítico de *Rhyzopertha dominica*

La obtención del extracto proteolítico se obtuvo de acuerdo con Osuna-Amarillas *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Para iniciar, se llevó a cabo la remoción del tracto digestivo del insecto adulto con la ayuda de pinzas de microdissección y un estereoscopio. Los tractos digestivos de 100 adultos de *R. dominica* fueron macerados con la ayuda de una espátula para liberar las proteasas digestivas contenidas. Así mismo, se llevó a un tubo vial con en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8 conteniendo NaCl 20 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM sumergido en un baño de hielo. El extracto obtenido se centrifugó por 10 min a 10,000 g a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nylon Whatman de tamaño de poro de 0.45 µM (Whatman,

Inc.; Stanford, ME, USA) y se almacenó a 4 °C para utilizarlo como fuente de enzimas proteolíticas para análisis posteriores.

#### Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Se tomaron 20 mL del extracto enzimático crudo obtenido y se le agregó sulfato de amonio hasta llevarlo a una saturación del 25 % (2.68 g), dejándose reposar por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 g a 4 °C durante 60 min. El sobrenadante fue recuperado y purificado adicionalmente por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica.

Un volumen de 2 mL de extracto proteolítico (3,372 UA aproximadamente) se cargó a una resina de fenil-sefarosa CL-4B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La proteína que no se unió a la fase estacionaria se eluyó con buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8, y se leyó su absorbancia a 280 nm. En el caso de las proteínas unidas a la fase estacionaria, éstas fueron eluidas con etilenglicol al 50 % en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8, y se detectaron a una longitud de onda de 280 nm.

#### Cromatografía de Afinidad por Concanavalina-A

Tres mililitros de extracto proteolítico (aproximadamente 9,143 unidades de actividad tipo tripsina) fueron cargados a 0.8 x 15 cm en una columna de lectina Concanavalina-A (AffiGel Con-A, BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA) y equilibrados con 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, conteniendo 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Las proteínas no unidas a la columna fueron eluidas con buffer de equilibrio y se colectaron fracciones de 1 mL. La elución de proteínas unidas se realizó lavando la columna con buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, conteniendo manopiranososa 0.05 M. La detección de proteína se hizo a 280 nm.

### Determinación del Contenido de Proteína

La determinación del contenido de proteína de los extractos enzimáticos, así como de los extractos inhibitorios y sus respectivas fracciones obtenidas en la separación mediante cromatografía, se realizaron utilizando la técnica de Lowry (1951) con las adaptaciones propuestas por Hartree (1972). Una curva estándar elaborada con seroalbúmina bovina fue empleada para determinar el contenido de proteína de las muestras utilizando la ecuación de la recta que se obtuvo al graficar la absorbancia contra la concentración respectiva de proteína. La absorbancia de las muestras se leyó en un espectrofotómetro UV/Vis NanoDrop 800 (Thermo Scientific, Waltham, MA) a una longitud de onda de 650 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### Electroforesis por Gel de Poliacrilamida (PAGE)

El extracto crudo y las fracciones colectadas de la cromatografía de afinidad se analizaron en electroforesis en condiciones no desnaturizantes a un voltaje constante de 200 V durante 45 min (Laemmli, 1970). Alícuotas de proteasa obtenidas de extractos crudos y cromatografía de afinidad (aproximadamente 2 unidades de actividad BA<sub>p</sub>NAasa) fueron mezcladas en volúmenes iguales de buffer de fosfato sin β-mercaptoetanol y sin tratamiento térmico. Se cargaron 25 μL en un sistema de gel de poliacrilamida que consiste en la separación en gel de acrilamida (12 %) y un gel de apilamiento de acrilamida 3.83 % (Laemmli, 1970). La separación de proteínas se llevó a cabo en un equipo Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA).

### Detección de proteína en gel por Tinción de Plata

Una vez realizada la electroforesis de los extractos proteolíticos de las progenies emergidas de los trigos Villa Juárez, Kronstad y Borlaug se procedió a la detección de bandas proteicas por medio de tinción de plata siguiendo la metodología de Blum y Gross (1987). Una vez terminada la electroforesis, se incubó el gel con metanol, ácido acético y formaldehído durante 2 h, se lavó tres veces con etanol al 50 % y se agregó una solución de tiosulfato de sodio 2.5

mM y agua durante 1 min. Posteriormente, el gel se lavó con agua y se colocó con nitrato de plata 0.03 M durante 20 min. Se realizaron dos lavados por 20 segundos y se reveló el gel por al menos 10 min hasta que las bandas se apreciaran en el mismo, deteniendo finalmente la tinción con lavados con agua durante 2 min y la solución desteñidora por 10 min. Las bandas se observaron de color marrón en gel.

#### Análisis de Actividad Proteolítica por Zimografía en Gel de Poliacrilamida

Después de la separación de una alícuota del extracto proteolítico por electroforesis (107 UA aproximadamente) en geles de poliacrilamida se realizó el análisis de detección de bandas de actividad proteolítica por zimografía. Para ello, se preparó un gel de poliacrilamida con caseína co-polimerizada (0.27 %, w/v) de acuerdo con el método de Heussen y Dowdle (1980). Una vez que se llevó a cabo la separación de los extractos proteolíticos por electroforesis, el gel conteniendo las proteasas se colocó encima del gel conteniendo la caseína co-polimerizada. Ambos geles ya superpuestos se colocaron en un recipiente de plástico en baño de agua a 37°C durante 2 h para permitir que las proteasas hidrolizaran la caseína. Después de transcurrido ese tiempo, el gel con caseína co-polimerizada se sumergió por 2 h en una solución del colorante Amido Black al 0.1 % preparado en ácido acético al 7 % y metanol al 30 % (v/v). Después, para revelar bandas de caseína hidrolizada, el gel con caseína se destiñó con una solución de metanol-ácido acético (30 % - 7 %, v/v). Después de varios cambios de la solución de destinción, se observaron bandas claras contra un fondo oscuro revelando la posición en las que estaban las proteasas. A los zimogramas les fueron tomadas fotografías para su registro.

#### Análisis de Actividad Proteolítica por Zimografía en Gel de Poliacrilamida con SDS y $\beta$ -mercaptoetanol

Después de la separación de una alícuota del extracto proteolítico con  $\beta$ -mercaptoetanol por electroforesis con SDS (107 UA aproximadamente), en geles de poliacrilamida se realizó el análisis de detección de bandas de actividad proteolítica por zimografía. Para ello, se preparó

un gel de poliacrilamida con caseína co-polimerizada (0.27 %, w/v) con la presencia del agente reductor SDS, de acuerdo con el método de Heussen y Dowdle (1980). Una vez que se llevó a cabo la separación de los extractos proteolíticos por electroforesis, el gel conteniendo las proteasas se colocó encima del gel conteniendo la caseína co-polimerizada. Ambos geles ya superpuestos se colocaron en un recipiente de plástico en baño de agua a 37 °C durante 2 h para permitir que las proteasas hidrolizaran la caseína. Después de transcurrido ese tiempo, el gel con caseína co-polimerizada se sumergió por 2 h en una solución del colorante Amido Black al 0.1 % preparado en ácido acético al 7 % y metanol al 30 % (v/v). Después, para revelar bandas de caseína hidrolizada, el gel con caseína se destiñó con una solución de metanol-ácido acético (30 % - 7 %, v/v). Después de varios cambios de la solución de destinción, se observaron bandas claras contra un fondo oscuro revelando la posición en las que estaban las proteasas. A los zimogramas les fueron tomadas fotografías para su registro.

#### Detección de Proteasas Glicosiladas

La presencia de proteasas glicosiladas se llevó a cabo usando un kit de detección de glicoproteínas (Glycoprotein Staining Kit, Catalog number 24562, Pierce <sup>TM</sup> Thermo Scientific) siguiendo los términos del proveedor. Este kit contiene tres reactivos que sirven para detectar glicoproteínas en gel una vez que se realiza la separación por medio de electroforesis. El fundamento de este se basa en la oxidación de los grupos cis-diol de los azúcares presentes en las glicoproteínas formando grupos aldehídos que, a su vez, forman uniones base de Schiff produciendo bandas de color magenta. En este caso, el gel obtenido en la separación por electroforesis (59 UA aproximadamente) se sumergió en 100 mL de metanol al 50 % durante 30 min. Después el gel, se colocó en 100 mL de ácido acético al 3 % agitando gentilmente durante 10 min. Seguidamente, se transfirió el gel a la solución oxidante (25 mL) agitando durante 15 min; una vez transcurrido este tiempo, se lavó con 100 mL de ácido acético al 3 % por 5 min. A continuación, el gel fue colocado con la solución de tinción de glicoproteínas (25 mL) agitando durante 15 min y se transfirió a la solución reductora (25 mL) en donde se agitó suavemente durante 5 min. Finalmente, se lavó

el gel con ácido acético al 3 % y con agua ultrapura filtrada a través de filtros de 45  $\mu\text{m}$ . La presencia de glicosilación se detectó como bandas magentas en el gel de poliacrilamida.

### Determinación del Peso Molecular

El método electroforético de Laemmli (Laemmli, 1970) fue utilizado para determinar el peso molecular de proteasas de *R. dominica*. Las alícuotas de la preparación proteolítica (aproximadamente de 107 unidades de actividad de BApNAasa) y de un marcador de peso molecular (No. Cat. S8445-1VL, Sigma-Aldrich) fueron separados a 200 V durante 45 min en un Mini-Protean II Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando un gel de separación de acrilamida al 12 % y un gel concentrador de acrilamida al 3.83 %, ambos con 1.35 % de bisacrilamida. Para llevar a cabo la separación de las proteasas presentes en el extracto, se inyectaron 35  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}$  de proteína aproximadamente) en el sistema de geles de poliacrilamida donde el buffer de corrida contenía Tris-HCl 25 mM y glicina 192 mM a pH de 8.3.

Se obtuvo el zimograma de las proteasas presentes en el extracto a la par de la separación de los estándares comerciales de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Estos marcadores fueron: miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116.2 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), seroalbumina (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa) y aprotonina (6.5 kDa); los cuales antes de ser inyectados en el gel de electroforesis fueron mezclados con un buffer muestra disociante (15  $\mu\text{L}$  marcador combinados con 30  $\mu\text{L}$  de buffer muestra), el cual contenía SDS al 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5 %, Tris-HCl 0.0625 M y glicerol al 10 %, sometiendo las mismas a calentamiento a 90  $^{\circ}\text{C}$  por 60 s.

Una vez obtenido el zimograma de las proteasas presentes en el extracto proteolítico del insecto, se determinó el peso molecular de las proteasas comparando con las bandas de los marcadores comerciales. Este valor se obtuvo elaborando una gráfica del logaritmo de sus pesos moleculares contra el  $R_f$  de los marcadores de peso molecular.

## **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos de los ensayos de inhibición, actividad proteolítica y contenido de proteína se sometieron a un análisis de varianza llevando a cabo una comparación de medias por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) para determinar diferencias significativas entre variedades de trigo.



## Etapa II

### **Caracterización Cinética de las Proteasas Glicosiladas del Insecto *Rhyzopertha dominica* Desarrollado los Trigos Hexaploides de la Variedad: Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, e Identificación de las Diferencias entre las Proteasas Glicosiladas y No Glicosiladas de *R. dominica* con Relación a la Cinética, Energía de Activación y Constante de Inhibición.**

La idea principal de esta etapa es estudiar la cinética de las proteasas glicosiladas que fueron previamente purificadas por medio de cromatografía de afinidad a la Concanavalina-A y con ello, identificar la diferencia existente con las proteasas no glicosiladas presentes en el mismo extracto. Esto para elucidar la función de la glicosilación en las proteasas de *R. dominica*, así mismo, encontrar las diferencias en el comportamiento de los dos tipos de proteasas e identificar el efecto que ejerce la presencia de carbohidratos ante los parámetros cinéticos y energía de activación. Así mismo, se pretende obtener la constante de inhibición con relación a la fracción de albúmina de trigo en las tres variedades y determinar si existe o no relación con la expresión de enzimas glicosiladas.

#### Actividad Proteolítica de Tripsina

Para la determinación de la actividad proteolítica específica de tripsina se utilizó N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine *p*-Nitroanilida (BApNA) como sustrato. Se utilizaron 75  $\mu$ L de la preparación enzimática mezclado con 325  $\mu$ L de buffer fosfato a 1 mM, pH 8. Se agregaron 200  $\mu$ L de sustrato (BApNA) 1 mM finalizando la reacción con 150  $\mu$ L de ácido acético al 30 % (v/v). Se leyó la absorbancia a 410 nm estimando la *p*-nitroanilina producto de la reacción. Así mismo, se definió como una unidad de actividad tipo tripsina un cambio de 0.01 unidades de absorbancia en la lectura de las muestras al ser comparadas con un blanco sin actividad proteolítica.

### Efecto del $\beta$ -mercaptoetanol en la Actividad Proteolítica

Para determinar el efecto del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol en la actividad proteolítica de las enzimas de progenies de *R. dominica* emergidas de tres variedades de trigo se realizó un ensayo de actividad proteolítica bajo el efecto de  $\beta$ -mercaptoetanol de 10 a 50 mM en intervalos de 10 mM. Para la determinación de la actividad proteolítica específica de tripsina se utilizó N- $\alpha$ -Benzoil-DL-Arginine *p*-Nitroanilide (BApNA) como sustrato. Se utilizaron 75  $\mu$ L de la preparación enzimática mezclado con 325  $\mu$ L de buffer fosfato a 1 mM, pH 8 conteniendo  $\beta$ -mercaptoetanol, de tal forma que la concentración de este agente reductor estuviera en el rango de 10 a 50 mM en el volumen final de reacción después de agregar a cada tubo 200  $\mu$ L de sustrato (BApNA) 1 mM. La reacción fue detenida añadiendo 150  $\mu$ L de ácido acético al 30 % (v/v). Se leyó la absorbancia a 410 nm estimando la *p*-nitroanilina producto de la reacción.

### Determinación de Parámetros Cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  se llevó a cabo usando 0.5 M BApNA en el rango de 0.1 a 0.4 M y combinado con 2 unidades de actividad de BApNAasa en 100 mM buffer fosfato, pH 8.0 para la determinación de actividad proteolítica. En este análisis, la determinación de la actividad proteolítica específica de tripsina se utilizó N- $\alpha$ -benzoil-DL-arginine *p*-Nitroanilida (BApNA) en concentraciones variables de 0.1 a 0.4 M como sustrato. Se utilizaron 75  $\mu$ L de la preparación enzimática (equivalentes a aproximadamente 2 unidades de actividad tipo tripsina) que fueron mezclados con 325  $\mu$ L de buffer fosfato a 1 mM, pH 8. La reacción se inició agregando 200  $\mu$ L de sustrato (BApNA) en las concentraciones variables ya mencionadas finalizando la reacción con 150  $\mu$ L de ácido acético al 30 % (v/v). Se leyó la absorbancia a 410 nm estimando la *p*-nitroanilina producto de la reacción. Los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de una regresión lineal utilizando el gráfico de Lineweaver-Burk con la ayuda del software estadístico SigmaPlot.

### Determinación de la Energía de Activación ( $E_a$ )

Para determinar la energía de activación  $E_a$  de las proteasas glicosiladas y no glicosiladas de las progenies emergidas de las variedades de trigo Villa Juárez, Kronstad y Borlaug se emplearon temperaturas en el rango de los 30 a los 55 °C con intervalos de 5 °C. La actividad proteolítica determinada a cada temperatura se evaluó empleando N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine *p*-Nitroanilida (BApNA) como sustrato. Se utilizaron 75  $\mu$ L de la preparación enzimática (aproximadamente 2 unidades de actividad) se combinaron con 325  $\mu$ L de buffer fosfato a 1 mM, pH 8. Se agregaron 200  $\mu$ L de sustrato (BApNA) 1 mM finalizando la reacción con 150  $\mu$ L de ácido acético al 30 % (v/v). Se leyó la absorbancia a 410 nm estimando la *p*-nitroanilina producto de la reacción.

Esta determinación se realizó mediante el ensayo de actividad mencionado anteriormente utilizando BApNA como sustrato. Se utilizaron alícuotas de 10  $\mu$ l del extracto proteolítico La  $E_a$  se obtuvo del valor de la pendiente del gráfico de Arrhenius al graficar  $\ln V_0$  vs  $T^{-1}$  empleando la ecuación:

$$\ln V_0 = \ln(A) - E_a/RT$$

en la cual  $E_a$  es la energía de activación, T es la temperatura absoluta (°K) a la cual se lleva a cabo la reacción y R es la constante de los gases 8.314 J/mol °K

### Determinación de la Constante de Inhibición $K_i$ de Enzimas Glicosiladas y No Glicosiladas del Extracto Enzimático de *R. dominica*

Para la determinación de la constante de inhibición, se preincubó la enzima con el inhibidor en distinta proporción. Se utilizaron 10  $\mu$ l del extracto proteolítico y se mezclaron con alícuotas de la fracción de albúmina de trigo como inhibidor. Se incubaron por 60 min y después se obtuvo la actividad proteolítica en las condiciones mencionadas para el ensayo de determinación de actividad. Se utilizaron dos concentraciones (0.5 y 1 mM) del sustrato (BApNA) y diferentes concentraciones del inhibidor que fueron de 6, 12, 18, 24 y 30  $\mu$ l. Una vez obtenidos los valores, se elaboró la gráfica de Dixon para obtener el valor de  $K_i$  de acuerdo con el método de Burlingham y Widlanski, 2003. La obtención de la constante de

inhibición  $K_i$  se realizó graficando el recíproco de los valores de actividad obtenida para cada concentración del sustrato BApNA vs la concentración del inhibidor. El valor  $K_i$  se obtuvo en la intersección de las líneas del gráfico. Para esta determinación cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

## **Análisis Estadístico**

Para esta parte del trabajo se utilizó un diseño de una sola vía completamente al azar con tres repeticiones. Los tratamientos correspondieron a las variedades Borlaug, Kronstad y Villa Juárez. Los datos obtenidos de las determinaciones se sometieron a un análisis de varianza llevando a cabo una comparación de medias por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) para determinar diferencias significativas. Utilizando el programa Infostat.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Etapa I

### **Aislamiento y Purificación de las Proteasas Glicosiladas a partir del Extracto Enzimático de la Progenie de *R. dominica* y Determinación del Efecto de la Variedad del Trigo sobre la Producción de Enzimas Glicosiladas Respecto a su Actividad Inhibitoria**

#### **Actividad Inhibitoria en Extractos de Trigo**

Al realizar los estudios correspondientes a la actividad inhibitoria presente en los trigos de diferentes variedades, se pudo detectar la variedad con mayor y menor actividad específica inhibitoria. Inicialmente, se procedió con la determinación del contenido de proteína tanto en los extractos inhibitorios como en los extractos enzimáticos de estudio.

Los extractos de *R. dominica* cultivados en las diversas variedades de trigo mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en contenido de proteína con valores que no sobrepasaron los 10 mg (Tabla 2). Esto se debe a que el contenido de proteína varía según la etapa de desarrollo en la que se encuentren los insectos y la dieta que lleven (Rumpoldy Schlüter, 2013). En el caso específico de las progenies cultivadas en esta investigación, es evidente que el tipo de trigo influyó en la nutrición de los insectos que lo infestan ya que todas ellas tenían el mismo grado de desarrollo aproximadamente. De los valores de proteína a partir de los extractos enzimáticos obtenidos de diferentes progenies de *R. dominica* que se encuentran en la Tabla 2 puede inferirse que las progenies no se alimentaron de igual manera de cualquier trigo. Ello puede deberse a dos factores, uno es la calidad nutricional de los trigos y su contenido de inhibidores de enzimas proteolíticas, y dos la actividad y número de las enzimas proteolíticas que posea un determinado genotipo del insecto bajo estudio. Considerando que en todas las progenies se detectó el mismo genotipo de enzimas proteolíticas del tipo tripsina (resultados mostrados en la sección Patrón Electroforético de Enzimas Proteolíticas), el contenido de proteína en los extractos proteolíticos puede deberse a la ingesta de proteínas de los trigos infestados.

**Tabla 2.** Determinación de contenido de proteína en extractos de *R. dominica* cultivados en diferentes variedades de trigo.

Extracto enzimático	Proteína (mg/mL)
Cirno	9.65 ± 0.99 (a)
Tacupeto	8.23 ± 0.42 (a, b)
Navojoa	8.21 ± 0.16 (a, b)
Borlaug	7.77 ± 0.02 (b)
Onavas	5.01 ± 0.18 (c)
Borlaug 1	3.49 ± 0.16 (c)
Cirno 1	3.48 ± 0.24 (c)

Los valores son el resultado de dos repeticiones ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas. La comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Los extractos Cirno, Tacupeto y Navojoa mostraron la mayor cantidad de proteína en el extracto enzimático de *R. dominica* donde la variedad Cirno mostró el mayor valor proteico con 9.6 mg, seguido de las variedades Navojoa y Tacupeto con 8.2 mg de proteína. El valor menor fue encontrado en las variedades Cirno 1 y Borlaug 1, con 3.5 mg. La determinación de la actividad específica inhibitoria ante el extracto enzimático de *R. dominica* nos muestra el valor de unidades de inhibición por miligramo de proteína presente en la muestra, por ello, se determinó el contenido de proteína en cada uno de los extractos inhibitorios.

### **Contenido de Proteína de la Fracción Albúmina de Trigos**

Las albúminas de cereales están compuestas por diversas proteínas en donde se encuentran enzimas de diverso tipo, así como inhibidores de enzimas exógenas (Evers *et al.*, 1999). Es bien conocido que la fracción albúmina del grano de trigo contiene inhibidores de enzimas proteolíticas, específicamente los que inhiben a enzimas proteolíticas del tipo tripsina (Osuna-Amarillas *et al.*, 2012). El contenido de proteína en cada una de las variedades de trigo no presentó diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) ya que se encuentran dentro de un promedio de 11.03 mg. La variedad Tacupeto mostró una menor cantidad de proteína, en cambio las variedades Borlaug, Kronstad y Navojoa fueron las de mayor contenido con 12 mg, 11.8 mg y 11.7 mg, respectivamente. En el caso de Onavas y Villa Juárez presentaron valores intermedios de 11.3 mg y 10.1 mg, respectivamente, tal como se muestra en la Tabla 3.

Los extractos obtenidos a partir de la fracción de albúmina de trigo se estudiaron en relación con la actividad inhibitoria que presentaban ante el extracto enzimático de *R. dominica*. Esto debido a que diversos autores (Jamal *et al.*, 2012; Santamaría *et al.*, 2014) han observado la presencia de inhibidores de proteasa en plantas de diferente origen esto relacionado con el estrés biótico y abiótico quien ha regulado diversas proteínas para contrarrestar dicho estrés en las diferentes plantas (van der Hoorn y Jones, 2004) entre ellas, el trigo. Sin embargo, hay pocos estudios referentes a la fracción de albúmina de trigo respecto a la actividad de *R. dominica*.



**Tabla 3.** Determinación de contenido de proteína en extractos de trigo de diferentes variedades.

Extracto	Proteína (mg)
Borlaug	12.05 ± 0.30 (a)
Kronstad	11.82 ± 0.11 (a)
Navojoa	11.74 ± 0.24 (a)
Onavas	11.27 ± 0.14 (a)
Villa Juárez	10.12 ± 0.81 (a)
Tacupeto	9.25 ± 1.99 (a)

Los valores son el resultado de dos repeticiones ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas. La comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4, donde se pudo observar que las variedades de trigo Borlaug, Kronstad y Villa Juárez, presentan la más alta, intermedia y más baja actividad específica inhibitoria en la actividad proteolítica de dicho insecto, respectivamente.

La actividad inhibitoria se midió a una longitud de onda a 410 nm, en donde se obtuvo el porcentaje de inhibición y la actividad específica inhibitoria. La actividad específica inhibitoria establece las unidades de inhibición por miligramo de proteína. En los resultados obtenidos se observa que la actividad inhibitoria se encuentra en un rango de 307.42 UI/mg a 976.98 UI/mg. La variedad que presentó menor actividad inhibitoria fue Villa Juárez con 307.42 UI/mg (23.33 %), el valor medio fue en la variedad Kronstad con 627.21 UI/mg (55.56 %) y Navojoa con 428.92 UI/mg (37.78 %) de actividad y, por último, la variedad Borlaug mostró una elevada actividad específica inhibitoria de 824.41 UI/mg (74.44 %). Estos datos fueron comparados a partir de la concentración proteica presente en cada uno de los extractos enzimáticos.

Los diferentes valores obtenidos en actividad específica inhibitoria nos proporcionan información acerca de la regulación que se tiene de la actividad proteolítica. Debido a que las proteínas expresadas en las diversas plantas son utilizadas para inhibir peptidasas de diferentes plagas o patógenos que atacan directamente a las plantas (Horger *et al.*, 2013; Haq *et al.*, 2004), que a su vez ejercen su función al modular la actividad de las enzimas proteolíticas. (Martínez *et al.*, 2012). Como en el caso de *H. armigera* donde la actividad de la tripsina se inhibió aproximadamente en un 60 % ante el inhibidor GTPI expresado en la hoja de tabaco, sin tener efecto en quimotripsina y elastasa realizando éstas últimas un aumento de actividad del 26 % y 16 %, respectivamente (Wu *et al.*, 1997). Por otra parte, se observó que un nivel bajo de expresión del inhibidor de tripsina (0,16 % de la proteína total) en plantas transgénicas puede alterar la composición de las enzimas digestivas en el intestino de los insectos, lo que resulta en resistencia al inhibidor en algunos insectos (Jongsma *et al.*, 1995).

**Tabla 4.** Actividad inhibitoria en extracto enzimático *R. dominica* cultivado en la variedad Borlaug.

Trigo inhibidor	% Inhibición	Unidades de Inhibición	Unidades de inhibición por mL (UI / mL)	Actividad específica Inhibitoria (UI/mg)
Borlaug	74.44	74.44	9925.93	824.41 ± 52.21 (a,b)
Tacupeto	67.78	67.78	9037.04	976.98 ± 203.85 (a)
Kronstad	55.56	55.56	7407.41	627.21 ± 70.96 (a,b)
Navojoa	37.78	37.78	5037.04	428.92 ± 214.08 (b)
Onavas	36.67	36.67	4888.89	433.80 ± 55.77 (b)
Villa Juárez	23.33	23.33	3111.11	307.42 ± 62.11 (b)

Los valores son el resultado de dos repeticiones ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas. La comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Se realizó una comparación de medias por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) del efecto de la fracción de albúmina de cada variedad sobre la actividad proteolítica digestiva del insecto como se puede observar en la Tabla 5. De acuerdo con lo reportado por Cinco-Moroyoqui *et al.* (2006) en un estudio realizado en  $\alpha$ -amilasas del mismo insecto, observaron una relación inversa entre actividad inhibitoria y el contenido de albúminas de las diferentes variedades de trigo. Comparando este resultado con la sobreexpresión de enzimas., se ha observado en un estudio realizado por Perkin *et al.* (2017) que existe una adaptación de las enzimas proteolíticas de *T. castaneum* al sobreexpresarse los genes que las codifican como una respuesta de compensación al efecto de los inhibidores.

Las plantas están continuamente mejorando o desarrollando nuevas estrategias de defensa contra las plagas. Entre las respuestas de defensa más conocidas se encuentra la producción de proteínas como los inhibidores de proteasas de plantas (IP) que tienen efectos tóxicos, repelentes y / o antinutricionales sobre los insectos (Usha y Jyothsna 2010). Dado que en la fracción albúmina del grano de trigo se encuentran varios tipos de inhibidores de enzimas exógenas, se trató de encontrar una relación entre la concentración de albúmina de los trigos bajo estudio y la actividad inhibitoria contra la actividad proteolítica tipo tripsina. Los resultados (no mostrados) no revelaron alguna relación entre ambos factores.

La razón de ello puede deberse a que la fracción albúmina contenía varios tipos de proteínas incluyendo a los inhibidores de interés. Posiblemente las proteínas interferentes afectaron los valores reales de inhibición y solamente, se conjetura, la purificación de los inhibidores podría mostrar una relación entre su concentración y su capacidad inhibitoria contra la actividad proteolítica del tipo tripsina de progenies de *R. dominica*. No es posible que con la sola determinación del contenido de proteína del trigo se pueda predecir su actividad inhibitoria con actividad enzimática del insecto. Para ello se requieren estudios más sofisticados que evalúen la interacción enzima-inhibidor a nivel molecular.

**Tabla 5.** Actividad inhibitoria (%) de la fracción de albúmina de tres variedades de trigo sobre la actividad del extracto enzimático del insecto *Rhizopertha dominica* en variedad Borlaug.

Variedad	Proteína (mg/mL)	Porcentaje de inhibición (%)	Actividad específica inhibitoria (UI / mg)
Borlaug	12.05 ± 0.30	74.44	824.41 ± 52.21 (a, b)
Kronstad	11.82 ± 0.11	55.56	627.21 ± 70.96 (a,b)
Villa Juárez	10.12 ± 0.81	23.33	307.42 ± 62.11 (b)

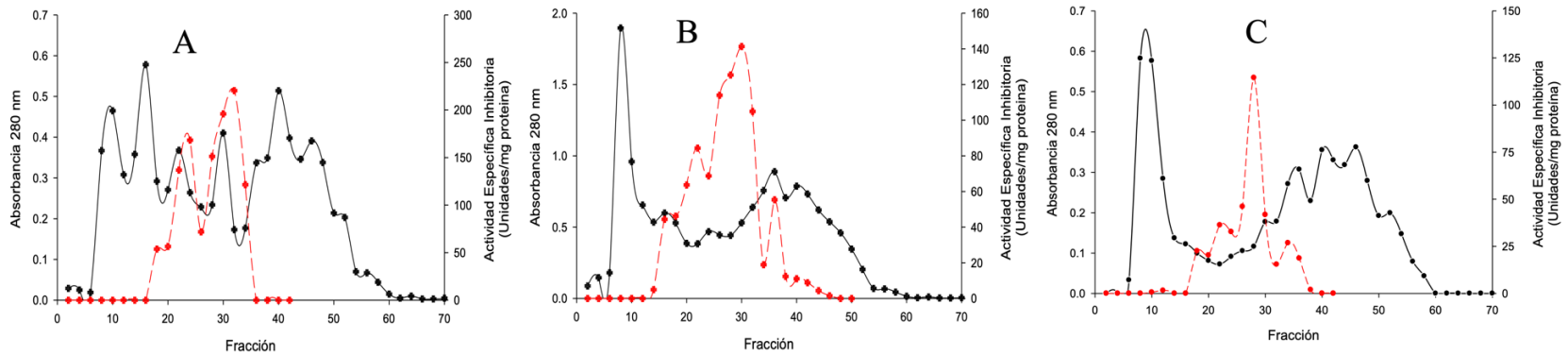
Los valores son el resultado de dos repeticiones ± DE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas. La comparación de medias se llevó a cabo por la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

## **Cromatografía de Filtración en Gel de Albúminas de Trigos**

El grano de trigo contiene diferentes tipos de proteínas, entre las cuales se encuentran las albúminas que comprende un grupo heterogéneo de proteínas. Las albúminas son proteínas monoméricas solubles en agua, compuestas principalmente por inhibidores enzimáticos y enzimas metabólicas (Dell'Aquila *et al.*, 1983). En el presente estudio se llevó a cabo el aislamiento y separación de las fracciones albúminas de trigos hexaploides por cromatografía de exclusión molecular, y en cuya composición se encuentran los inhibidores de la enzima tripsina altamente específicos contra la actividad serina proteasa de *R. dominica* (Osuna-Amarillas *et al.*, 2012).

La Figura 5 muestra los perfiles cromatográficos de las fracciones albúminas de los trigos Borlaug, Kronstad y Villa Juárez utilizados para el desarrollo y cultivo de progenies de *R. dominica*. Se puede observar en el arreglo de cromatogramas, que prácticamente la separación fue similar en todos los casos, con excepción de las albúminas de Borlaug (Figura 5 A) que mostró un mayor número de picos de proteínas y la separación claramente delineada de dos picos de inhibición. En contraste, las albúminas de Kronstad y Villa Juárez (Figura 5 B y C) mostraron un perfil similar en los picos de proteína observándose que se logró separar una cantidad mayor de proteína de alto peso molecular en las primeras 15 fracciones cromatográficas. A partir de ahí y hasta antes de aproximadamente la fracción 30 se colectó la proteína de peso molecular intermedio, para después empezar a eluir las proteínas de más bajo peso molecular. Las fracciones conteniendo inhibidores de serina proteasa tipo tripsina de *R. dominica* precisamente se detectaron en las fracciones de proteínas de peso molecular intermedio (líneas punteadas en los cromatogramas). En los tres cromatogramas, se observa que la máxima actividad inhibitoria fue detectada en las fracciones 28-30.

Por otro lado, es notoria la diferencia observada en los cromatogramas en relación con el área bajo la curva de inhibición en todos los casos. Si bien todas las áreas de inhibición comprendieron el rango de fracciones 20-40, la altura de los picos fue diferente. Los valores mayores de inhibición fueron detectados en Borlaug, seguido de Kronstad y, finalmente, Villa



**Figura 5.** Perfiles cromatográficos de la fracción albúmina inhibitoria de actividad trípica de trigos empleados para el cultivo y desarrollo de progenies de *Rhizopertha dominica*. (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez. La separación cromatográfica se realizó empleando una columna de 2.5 x 100 cm empacada con Bio-Gel P-150 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). El buffer de elución fue fosfato de sodio dibásico 0.01 M, pH 8.

Juárez. Sin embargo, la actividad específica inhibitoria depende de la cantidad de proteína que se encuentra en el extracto inhibitorio, por lo que es conveniente no hacer conjeturas adelantadas acerca de la capacidad inhibitoria de los trigos basándose en las separaciones cromatográficas.

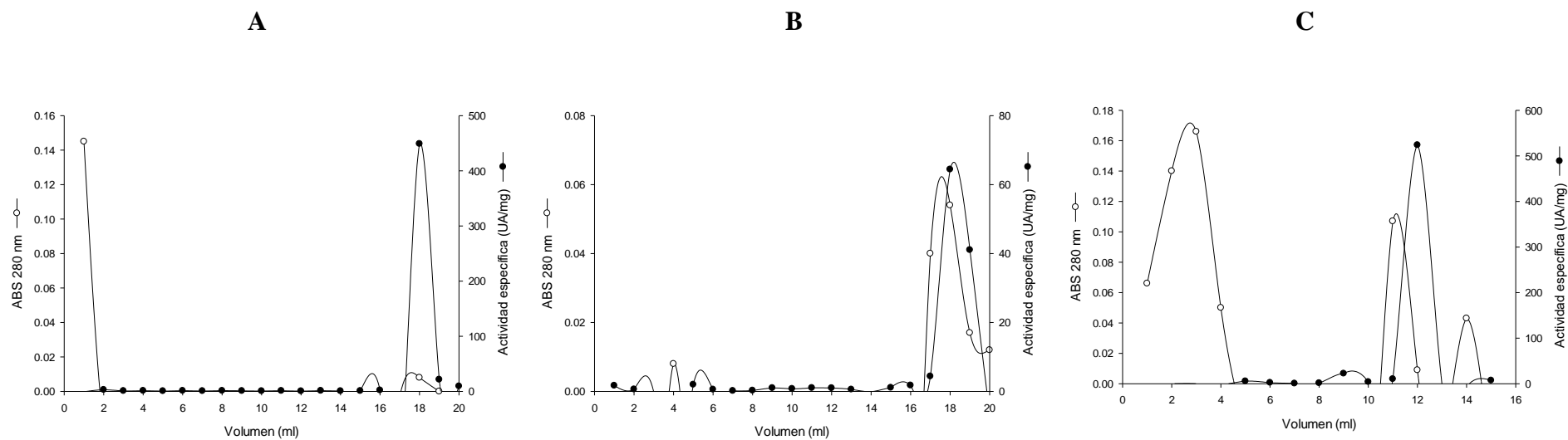
Adicionalmente, cabe aclarar que las preparaciones enzimáticas proteolíticas empleadas en este estudio fueron preparadas de las mismas progenies de *R. dominica* que emergieron de cada uno de los trigos del estudio. De esta manera, los resultados de inhibición fueron más apegados a la realidad de lo que sucede con las enzimas proteolíticas de *R. dominica* expuestas a las fracciones inhibitorias de los trigos empleados en el estudio.

### **Purificación de Proteasas por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

Los insectos poseen una gran cantidad de enzimas proteolíticas, en el caso de *R. dominica* la mayor actividad se da por medio de serina-proteasa, específicamente, del tipo tripsina (Osuna-Amarillas *et al.*, 2012). Estas enzimas poseen un carácter hidrofóbico y se activan en ambientes alcalinos (Kraut 1977). En este sentido, se separó por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica los extractos enzimáticos de las progenies emergidas de los trigos Villa Juárez, Kronstad y Borlaug.

Esta separación se da por medio del cambio en la hidrofobicidad de las moléculas, donde primeramente se realiza una saturación con sulfato de amonio, el cual va a permitir la solubilidad de las proteínas para separarlas posteriormente, en la columna cargada con fenil-sefariosa (Queiroz *et al.*, 2001). La Figura 6 muestra los perfiles cromatográficos de las fracciones de los extractos enzimáticos de las progenies de *R. dominica*. Se puede observar en el arreglo de cromatogramas, la separación fue similar en los casos de Borlaug y Kronstad, caso contrario con el extracto enzimático de la variedad Villa Juárez (Figura 6 C). En la figura 6 A se muestra el comportamiento de la variedad Borlaug, donde se identifican dos picos de elución de proteína, sin embargo, es hasta la fracción 17 donde se detecta actividad





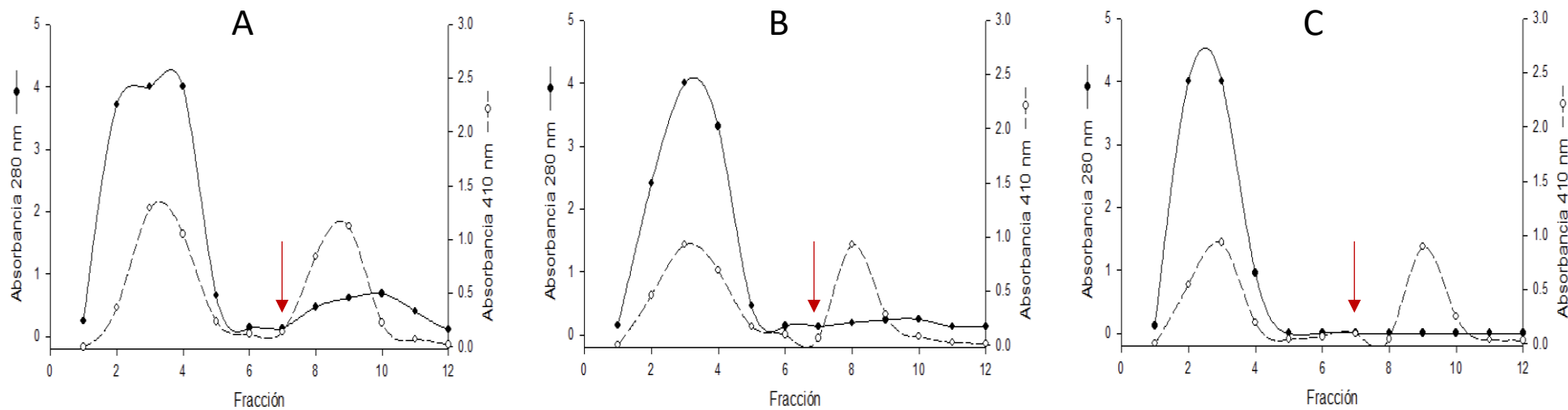
**Figura 6.** Perfiles cromatográficos de los extractos enzimáticos de *R. dominica* obtenidos de la cromatografía de interacción hidrofóbica donde (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez. La separación cromatográfica se realizó empleando una columna de 1 x 5 cm empacada con una resina de fenil-sefariosa CL-4B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El buffer de elución fue fosfato de sodio dibásico 50 mM, pH 8 con etilenglicol al 50 %.

proteolítica, dando como resultado el alto grado de hidrofobicidad que contienen estas moléculas. Por otra parte, en la Figura 6 B se pueden observar dos picos en el caso de la variedad Kronstad, lo que indica la elución de la proteína, sin embargo, la mayor actividad se detecta en la fracción 18. Estas variedades muestran un comportamiento similar al momento de eluir las proteínas con actividad, no obstante, se detecta mayor contenido de proteína en la variedad Kronstad en comparación con la variedad Borlaug.

Seguidamente, en la Figura 6 C se muestra el cromatograma obtenido de la variedad Villa Juárez, donde se observan tres picos de elución de proteína, observando la mayor actividad proteolítica entre los dos últimos picos, correspondiente a la fracción 12.

### **Purificación de Proteasas por Cromatografía de Afinidad con Concanavalina-A**

La cromatografía de afinidad a la lectina Concanavalina-A se utilizó para separar dos tipos de proteasas tipo tripsina de cada una de las progenies de *R. dominica* desarrolladas y emergidas de los trigos Villa Juárez, Kronstad y Borlaug. En esta separación cromatográfica se aplicó a la columna 1 mL de extracto enzimático (aproximadamente 200 unidades de actividad BapNAasa). Las proteínas no unidas a la columna fueron eluidas con buffer de equilibrio y se colectaron fracciones de 1 mL. La elución de proteínas unidas se realizó lavando la columna con buffer Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, conteniendo manopiranososa 0.05 M. La detección de proteína se hizo a 280 nm. La Figura 7 muestra los perfiles cromatográficos de la separación de los dos tipos de proteasas, glicosiladas y no glicosiladas. Se puede observar claramente que, para las tres progenies de *R. dominica*, las proteasas se separaron eluyendo las no glicosiladas y después las glicosiladas. Este procedimiento cromatográfico demostró ser muy eficiente para separar los dos grupos de proteasas basándose en la afinidad por la lectina. Así mismo, se puede observar que la cantidad de proteína no unida a la columna de Concanavalina-A, estimada a 280 nm, es significativamente elevada en los tres extractos de las progenies del insecto. De hecho, se podría considerar que la cantidad de proteína en las fracciones correspondientes a las proteasas glicosiladas fue relativamente escasa considerando los bajos valores de absorbancia, de tal manera que lo que hizo posible diferenciar claramente



**Figura 7.** Cromatografía de afinidad empleando Concanavalin A Sepharose<sup>TM</sup> 4B para la fraccionación de la actividad serina proteasa tipo tripsina, glicosilada y no glicosilada, del insecto *Rhyzopertha dominica*. Las progenies del insecto fueron cultivadas en los trigos (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez. Las flechas indican el inicio de la elución de proteínas glicosiladas unidas a la columna de Concanavalina-A. La elución se realizó con buffer Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, conteniendo manopiranososa 0.05 M.

los dos tipos de proteasas fue la actividad proteolítica determinada a cada una de las fracciones cromatográficas obtenidas.

La Tabla 6 muestra los valores de purificación mediante cromatografía de afinidad con Concanavalina-A de cada uno de los extractos proteolíticos de progenies de *R. dominica* desarrolladas y emergidas de las variedades de trigo Villa Juárez, Kronstad y Borlaug. En dicha tabla se puede observar que los extractos contenían diferentes concentraciones de proteína total, lo cual pudo deberse a la cantidad de insectos que se desarrollaron en cada una de las muestras de trigo. Sin embargo, se puede observar que las cantidades de proteína glicosilada de cada extracto recuperado de la columna de afinidad fue aproximadamente la misma cantidad, haciendo un promedio de  $1.83 \pm 0.14$  mg de proteína glicosilada. Lo anterior significa que, independientemente de la concentración de proteína total cargada a la columna, la proteína glicosilada conteniendo a las enzimas proteolíticas tipo tripsina era aproximadamente la misma en todos los extractos de las tres progenies de *R. dominica*. Esas mismas cantidades de proteína glicosilada representaron 6.5, 8.7 y 21.7 % de la proteína total de los extractos de las progenies Villa Juárez, Borlaug y Kronstad, respectivamente.

La evaluación de la actividad específica enzimática de la proteína glicosilada eluida de la columna de afinidad reveló que se logró recuperar una elevada actividad enzimática por medio de la técnica de separación cromatográfica utilizada. Lo anterior se corroboró al estimar el porcentaje de rendimiento que, en promedio, arrojó un valor de  $80.4 \pm 6.3$  unidades porcentuales de rendimiento. Sin embargo, a pesar de la elevada tasa de recuperación, la purificación no fue similar para todos los extractos glicosilados. El grado de purificación se obtiene dividiendo la actividad específica del extracto recuperado de la columna entre la actividad específica del extracto enzimático aplicado a la columna. En la Tabla 6 se puede observar que el grado de purificación más elevado se obtuvo para el extracto glicosilado de la progenie Villa Juárez (13.5 veces) seguido de Borlaug (8.9 veces) y Kronstad (3.5 veces).

**Tabla 6.** Purificación de serina proteasas glicosiladas de *Rhizopertha dominica* por medio de cromatografía de afinidad con Concanavalina-A.

Progenie	Fracción	Actividad Total (UA)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (UA/mg)	Rendimiento <sup>b</sup> (%)	Factor de Purificación <sup>c</sup>
Villa Juárez	Extracto crudo	185.7	30.5	6.08	100	1.0
	EEG <sup>a</sup>	162.9	2.0	82.3	87.7	13.5
Kronstad	Extracto crudo	202.8	8.3	24.3	100	1.0
	EEG <sup>a</sup>	155.2	1.8	85.7	76.5	3.5
Borlaug	Extracto crudo	231.4	19.6	11.8	100	1.0
	EEG <sup>a</sup>	178.1	1.7	104.7	77.0	8.9

<sup>a</sup>EEG, extracto enzimático glicosilado eluido de la columna de afinidad con Concanavalina-A.

<sup>b</sup>Valor obtenido al dividir las unidades de actividad de EEG entre la actividad del extracto crudo.

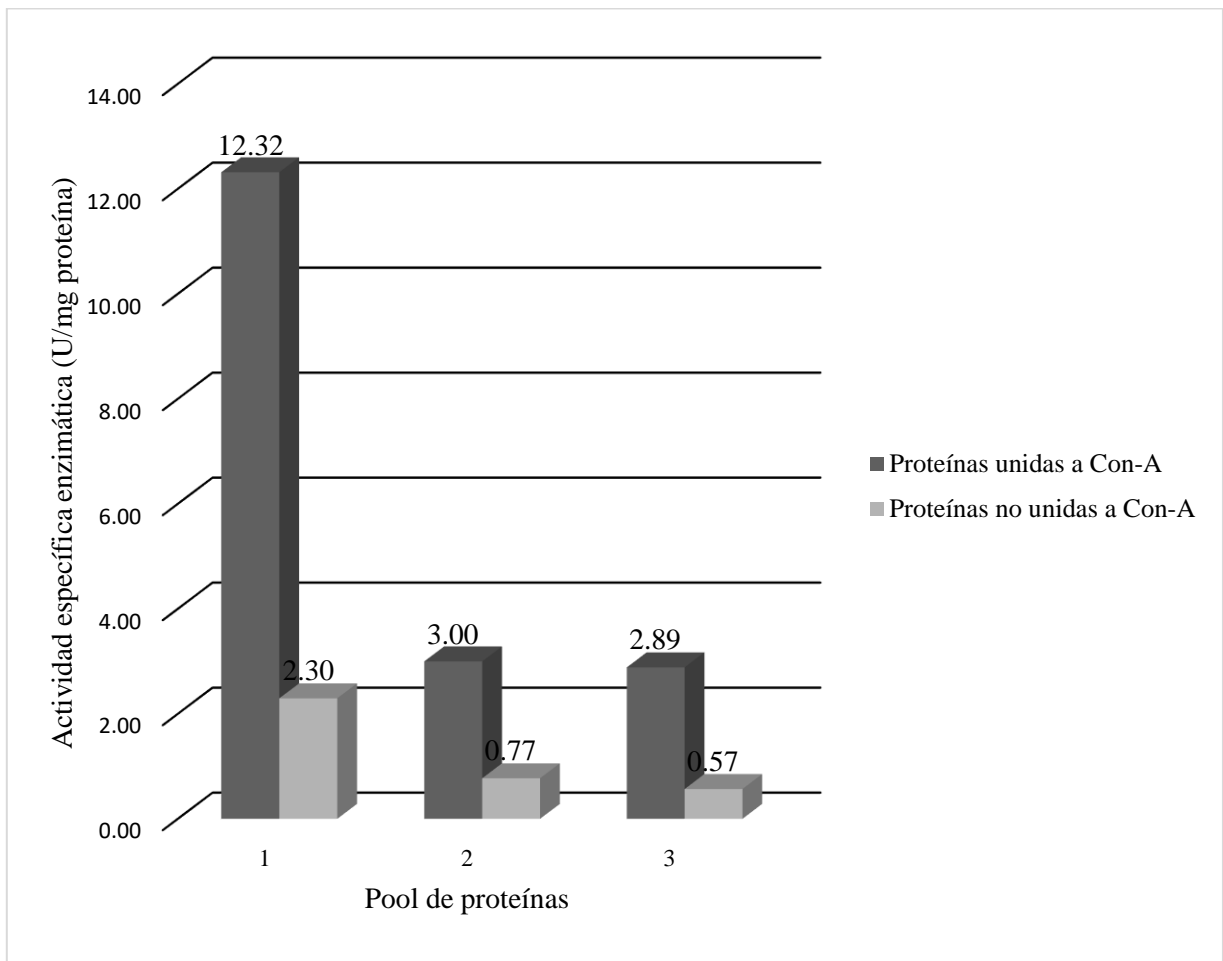
<sup>c</sup>Valor obtenido al dividir la actividad específica de EEG entre la del extracto crudo.

Los resultados de purificación demostraron que las progenies sintetizaron aproximadamente la misma cantidad de proteína glicosilada con aproximadamente la misma actividad específica (datos mostrados en la Tabla 6), pero lo que hizo la diferencia es que, en relación con el total de la proteína extraída de las progenies, la actividad específica relativa fue diferente en todos los casos ignorándose si tiene alguna implicación fisiológica para el desarrollo de las progenies de *R. dominica*.

A partir de las fracciones obtenidas por medio de la cromatografía de afinidad a la lectina Concanavalina-A se obtuvieron los extractos de enzimas glicosiladas de cada una de las progenies emergidas de los trigos Villa Juárez, Kronstad y Borlaug.

Se determinó la actividad específica enzimática en los extractos enzimáticos previamente purificados por cromatografía de afinidad (Figura 8), encontrándose diferencias significativas en la variedad Borlaug respecto a las variedades Kronstad y Villa Juárez, superando en actividad específica con un porcentaje del 75 % en proteínas unidas y alrededor de un 70 % en proteínas no unidas a la columna. Sin embargo, el comportamiento de las tres progenies es similar, en donde se muestran valores más altos en la actividad de enzimas glicosiladas (en este caso, las proteínas unidas a la columna) encontrándose una diferencia entre 70-80 % en actividad respecto a las proteínas no unidas a la columna (enzimas no glicosiladas). Estos datos indican que las enzimas glicosiladas muestran valores más altos en actividad específica, teniendo en cuenta que el 83 % aproximadamente de la actividad específica enzimática se da por medio de enzimas glicosiladas.

La alteración en la actividad específica de las enzimas glicosiladas de *R. dominica* demuestra que este tipo de enzimas se ve alterada con la presencia de carbohidratos, al mantener parcialmente la enzima rígida o como consecuencia del amontonamiento molecular lo cual modifica la eficiencia catalítica (Delgado *et al.*, 2014). Ligado a esta información, se ha reportado que una metaloproteasa (ADAM17) expresado en células de insecto con N-glicanos



**Figura 8.** Determinación actividad específica en extractos proteicos de *Rhyzopertha dominica*. 1) Pool de proteínas a partir del extracto de progenies emergidas de la variedad Borlaug, 2) Pool de proteínas a partir del extracto de progenies emergidas de la variedad Kronstad, 3) Pool de proteínas a partir del extracto de progenies emergidas de la variedad Villa Juárez.

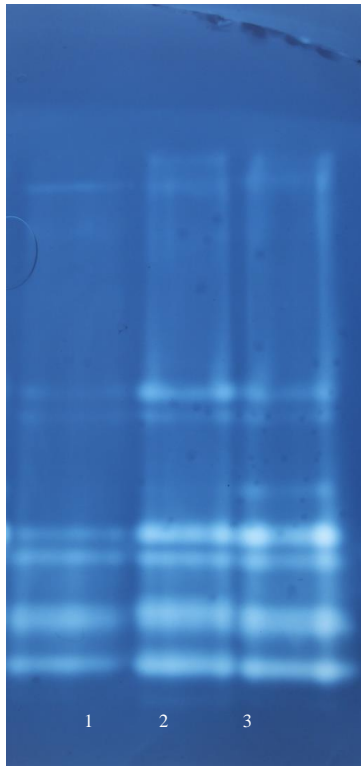
cortos tuvo un aumento de 30 veces la eficiencia catalítica (Chavaroche *et al.*, 2014), aunado a esta información, una enzima similar a la trombina (serina proteasa) presentó un incremento en actividad proteolítica glicosilada del 60 % (Vivas *et al.*, 2010). Otro caso similar, se observó en la proteasa alcalina de *Bacillus stearothermophilus* ya que la actividad específica enzimática en su forma glicosilada se incrementó en un 25.85 % en comparación con la proteasa alcalina no glicosilada utilizando un volumen total de reacción de 2 mL (1:1) a 40 °C por 30 min y caseína como sustrato (Abdel-Naby *et al.*, 2017).

### **Análisis por Zimografía de las Enzimas Proteolíticas**

El análisis de zimografía fue llevado a cabo utilizando extractos enzimáticos obtenidos a partir del cultivo de *R. dominica* en tres variedades de trigo: Borlaug, Kronstad y Villa Juárez, las cuales fueron seleccionadas al presentar un alta, media y baja actividad inhibitoria, respectivamente. La Figura 9 muestra un gel de poliacrilamida al 10 % (p/v) copolimerizado con caseína al 0.2 % (p/v) en el cual se detectaron bandas de caseína hidrolizada denotando la actividad de bandas de enzimas proteolíticas, en este caso del tipo tripsina, de progenies que se desarrollaron en tres variedades de trigo. El análisis por zimografía es solamente cualitativo, y sirve para detectar la presencia de enzimas, en este caso, proteolíticas.

En general, se puede observar en la Figura 9 que los tres extractos enzimáticos contienen igual número de proteasas. Sin embargo, cada extracto se distingue por presentar ciertas particularidades en su perfil zimográfico. Por ejemplo, las proteasas de la progenie Kronstad, la emergida en el trigo de actividad inhibitoria intermedia, presentaron más baja intensidad que las proteasas de las otras progenies. Aparte de eso, la actividad proteolítica contra caseína demostró que la progenie Kronstad presentó trazas de actividad de las proteasas tanto las de más alto peso molecular como las de peso molecular intermedio. En contraste, las progenies Villa Juárez y Borlaug, las que emergieron de los trigos con la más baja y alta actividad inhibitoria, presentaron un perfil zimográfico casi idéntico, con la diferencia en que la progenie Borlaug presentó una banda proteolítica de aproximadamente 16 kDa, que no se observó en los otros carriles. Lo más relevante quizás, es que la técnica de zimografía reveló





**Figura 9.** Detección de proteasas por zimografía en gel de poliacrilamida. La separación de proteasas se realizó por medio de electroforesis. Las muestras de extractos enzimáticos se obtuvieron de progenies que se desarrollaron en muestras de trigo (1) Villa Juárez, (2) Kronstad y (3) Borlaug.

que las proteasas de más bajo peso molecular poseen mayor actividad proteolítica, algo que contrasta con las de más alto peso molecular.

Una situación que no ha sido posible demostrar, es referente a la posibilidad de que ciertas enzimas de *R. dominica* tengan tendencia a formar agregados de alto peso molecular. Es posible que las proteasas formen agregados *in vitro* y que la agregación les impida tener más actividad ya sea porque el sitio activo queda con poca accesibilidad para el sustrato, o bien la formación de agregados con otras subunidades de proteínas, ciertos aminoácidos cercanos al sitio activo formen nuevas interacciones con otros grupos, ya sea polares o no polares. Si lo anterior es así, sería sumamente interesante investigar si el proceso de agregación sucede *in vivo* para encontrar su significancia fisiológica que le permita al insecto usar este mecanismo de agregación para un determinado propósito.

El análisis de zimografía fue llevado a cabo utilizando extractos enzimáticos obtenidos a partir del cultivo de *R. dominica* en tres variedades de trigo: Borlaug, Kronstad y Villa Juárez, las cuales fueron seleccionadas al presentar un alta, media y baja actividad inhibitoria, respectivamente como se muestra en la Figura 9. A partir de la detección de la presencia de proteasas, los tres extractos enzimáticos fueron utilizados en análisis posteriores.

## **Determinación del Peso Molecular de Proteasas por Electroforesis (PAGE)**

En la Figura 10 se observa el patrón electroforético de extractos proteolíticos de las progenies de *R. dominica* desarrolladas y emergidas de trigos Villa Juárez (más baja actividad inhibitoria), Kronstad (actividad inhibitoria intermedia) y Borlaug (más alta actividad inhibitoria) con sus respectivos valores de peso molecular (Figura 10B). La presencia de bandas se pudo detectar a través de la hidrólisis de caseína co-polimerizada en el gel de acrilamida utilizado para zimografía. La Figura 10C muestra un gel de poliacrilamida con las proteínas de los extractos proteolíticos de las progenies teñidos por un procedimiento que emplea nitrato de plata. Se puede observar que en los extractos enzimáticos se encuentran otras proteínas de peso molecular de 40-42 kDa y de 20 kDa) que acompañan a las proteasas que no presentan actividad en el zimograma (Figura 10B).

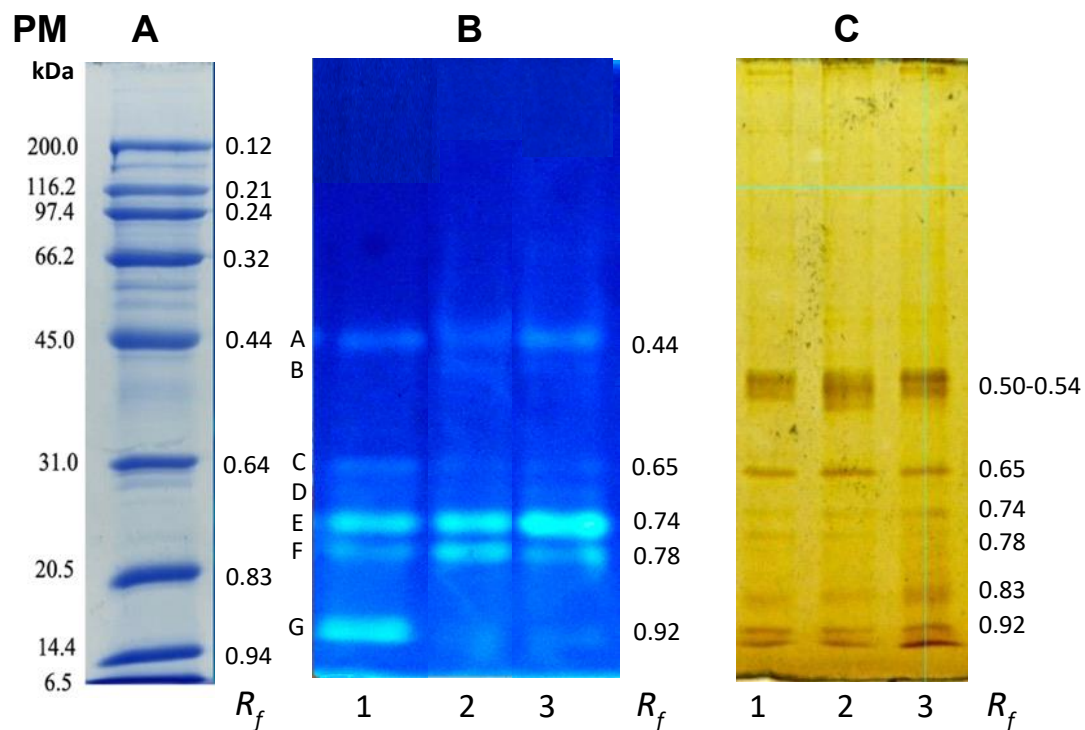
Dado que esas proteínas eluyen en conjunto con las proteasas de la columna de interacción hidrofóbica, es razonable pensar que tienen algún grado de interacción entre ellas formando agregados moleculares. Sin embargo, en esta investigación no fue posible demostrar la formación de dichos agregados proteicos en los extractos enzimáticos de las progenies emergidas de *R. dominica* de las diferentes variedades de trigo ya que la técnica cromatográfica que se pudiera emplear no funciona en estos casos. Lo anterior se debe a que las proteasas tipo tripsina de *R. dominica* son hidrofóbicas y en presencia de solventes acuosos tienden a agregarse, por lo que tienden a eluir como agregados, pero por el tipo de solvente acuoso que es común emplear en filtración en gel.

En el caso particular de la detección del peso molecular, éstos fueron comparados con proteínas de peso molecular conocido (Figura 10A). En el caso de la variedad Villa Juárez se observaron seis bandas con pesos moleculares entre 45-14.6 kDa. La banda con mayor peso molecular fue de 45 kDa (A), mientras que cuatro bandas con pesos moleculares medios fueron de 29.5 (C), 27 (D), 25.4 (E) y 23.6 (F) kDa en orden descendente y, finalmente, se observó una banda de menor peso molecular de 15.2 kDa (G). Las bandas que visualmente mostraron mayor actividad fueron E y G (24.4 y 15.2 kDa, respectivamente), mientras que las

bandas con actividad proteolítica media fueron A, C y F (45, 29.5 y 25.4 kDa, respectivamente) y, por último, la banda D presentó menor actividad, con un peso molecular de 27 kDa.

Las variedades Kronstad y Borlaug mostraron un patrón electroforético muy similar, observándose siete bandas. Dos bandas con mayor peso molecular fueron de 45 y 43 kDa, mientras que las bandas con pesos moleculares medios se encontraron entre 29.5-23.6 kDa (valores similares a la variedad Villa Juárez), además que se observó una banda de menor peso molecular de 14.9 kDa. Por otra parte, la actividad en gel permitió visualizar las bandas E y F (25.4 y 23.6 kDa, respectivamente) que mostraron mayor actividad. La actividad media se pudo observar en las bandas A, B, C y D (45, 43, 29.5 y 27 kDa, respectivamente), mientras que la menor actividad se observó en la banda G de menor peso molecular (15.2 kDa).

La diferencia entre progenies de distintas variedades fue la presencia de una banda con actividad proteolítica media en las variedades Kronstad y Borlaug, y que no se observó en la progenie de la variedad Villa Juárez, siendo una proteasa con un peso molecular de 43 kDa. Además, la banda con menor peso molecular (15.2 kDa) encontrada en las tres variedades, difiere en la visualización de actividad, ya que la progenie de la variedad Villa Juárez mostró mayor actividad proteolítica en comparación con las variedades Kronstad y Borlaug que presentaron menor actividad proteolítica. En algunos estudios de proteasas donde su identificación se ha realizado por medio de zimografía se observaron pesos moleculares similares a nuestro estudio. Según datos de Budatha y Meur (2008) se identificaron cinco proteasas en la oruga crotón (*Achaea janata* L.) de las cuales tres eran de actividad tipo tripsina con pesos moleculares de 29, 80 y 90 kDa, dato similar encontrado con la proteasa de 29.5 kDa en nuestro estudio. En consecuencia, pudieron inferir que los insectos utilizan diversas isoformas, por eso la diferencia en peso molecular. También, observaron que las diferencias en actividad en *A. janata* L. se deben no sólo al uso de serina proteasa para su metabolismo sino también por la presencia de elastasa.



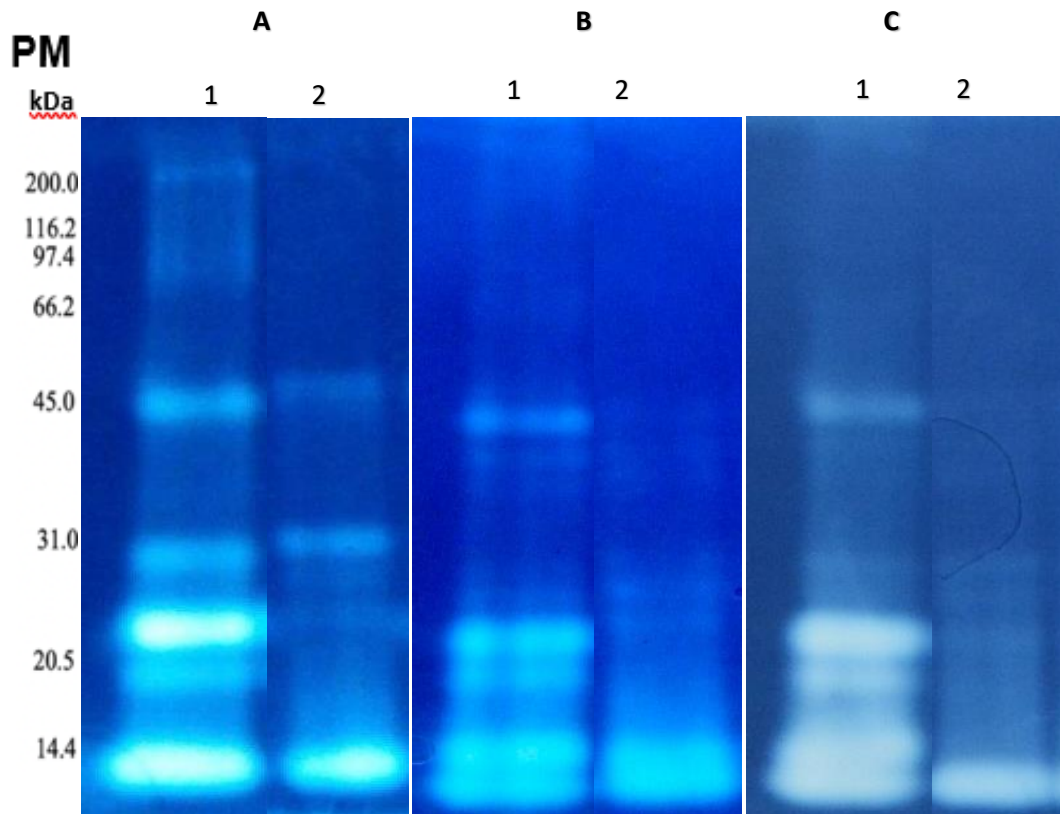
**Figura 10.** Perfil electroforético de extractos proteolíticos de progenies de *R. dominica* emergidas de trigos (1) Villa Juárez, (2) Kronstad y (3) Borlaug. Las enzimas fueron analizadas en (A) peso molecular empleando proteínas de peso molecular conocido, (B) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada, y (C) tinción de plata para detectar bandas de proteínas.

En el caso de la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) se le identificó una serina proteasa digestiva con actividad similar a la tripsina de aproximadamente 28 kDa (Sudha *et al.*, 2008). En otros insectos, tal como como el del maíz *Eurygaster integriceps*, se pudieron detectar ocho bandas con actividad proteolítica presente en las glándulas salivales a través de análisis de zimografía que corresponden a proteasas con actividad tanto quimotripsina como tripsina (16-81 kDa). La banda con actividad específica de tripsina mostró un peso molecular de 165 kDa (Hosseininaveh *et al.*, 2009). Por otra parte, en el gusano cogollero *Helicoverpa armígera* se encontraron 5 bandas con actividad trípica con pesos moleculares de 23, 27, 38, 40 y 66 kDa (Akbar y Sharma, 2017).

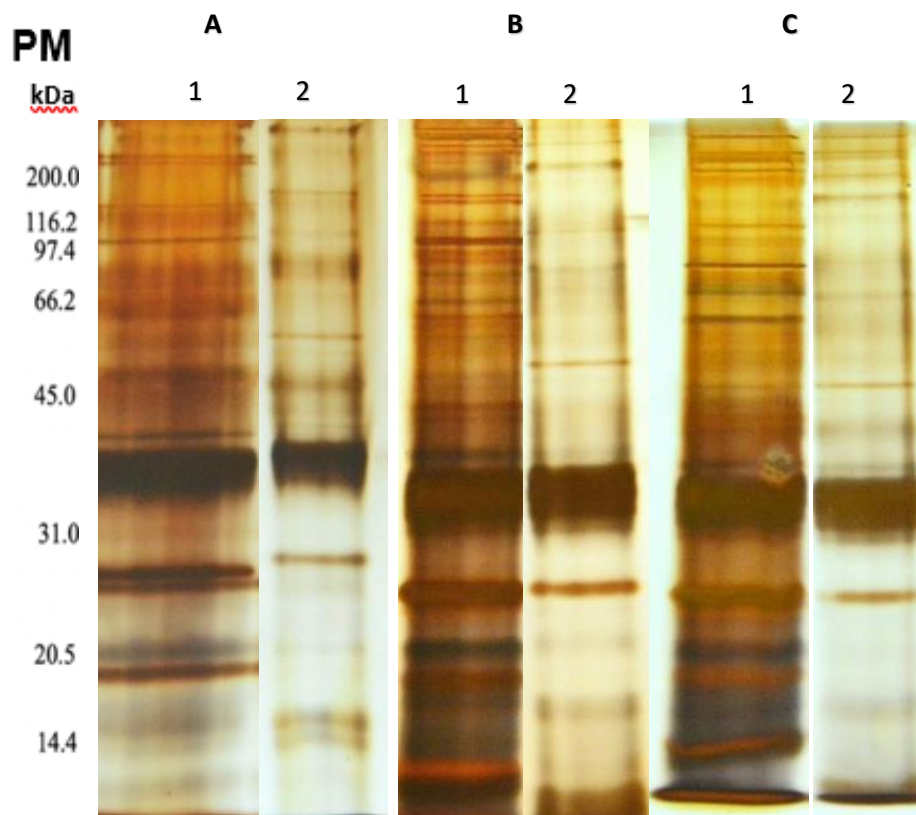
### **Análisis Electroforético de Extractos Proteolíticos**

Los extractos crudos de todas las progenies, así como la proteína que se unió a la columna de afinidad con Concanavalina-A, fueron analizados electroforéticamente en condiciones no disociantes. En la Figura 11 se muestra el zimograma de las proteasas presentes en extractos enzimáticos de la progenie *R. dominica* cultivada en tres variedades de trigo, así como, en la Figura 12 se muestra la técnica de tinción de plata para ver el comportamiento electroforético del total de proteínas presentes en extractos crudos y extractos previamente purificados por cromatografía de afinidad; carril 1 y 2, respectivamente.

La Figura 13A muestra el perfil electroforético del extracto crudo de la progenie Villa Juárez. Se puede observar que, en el zimograma del extracto crudo, en el carril 1, se encuentran las seis proteasas que observó Osuna-Amarillas *et al.* (2012), pero en el carril 2, correspondiente a las glicoproteínas unidas a la columna de afinidad, se observan la mayoría de las proteasas del extracto crudo, excepto las proteasas de peso molecular aproximado de 215 y 20.5 kDa, precisamente correspondiente a proteasas de alto y bajo peso molecular, respectivamente. Estos resultados sugieren que posiblemente la banda de proteasa de alto peso molecular esté formada por varias proteasas que, al separarse, da lugar a la separación de otras bandas de bajo peso molecular. Por otro lado, llama la atención que la proteasa de más bajo peso molecular, aproximadamente 15 kDa, mantuvo su intensidad mientras que el resto se vieron atenuadas



**Figura 11.** Zimograma de proteasas obtenidas de la cromatografía de afinidad a la Concanavalina-A de la progenie emergida del trigo (A) Villa Juárez, (B) Kronstad y (C) Borlaug, donde (1) Extracto crudo y (2) Proteasas glicosiladas eluidas de la columna de afinidad.

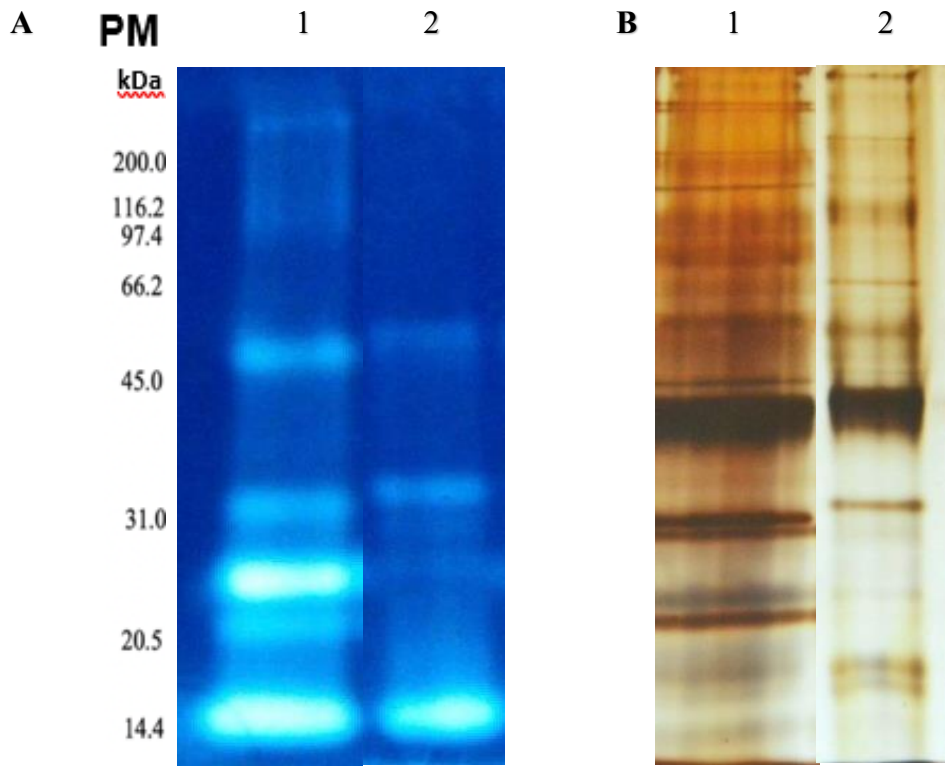


**Figura 12.** Tinción de plata de proteasas obtenidas de la cromatografía de afinidad a la Concanavalina-A de la progenie emergida del trigo (A) Villa Juárez, (B) Kronstad y (C) Borlaug, donde (1) Extracto crudo y (2) Proteasas glicosiladas eluidas de la columna de afinidad.

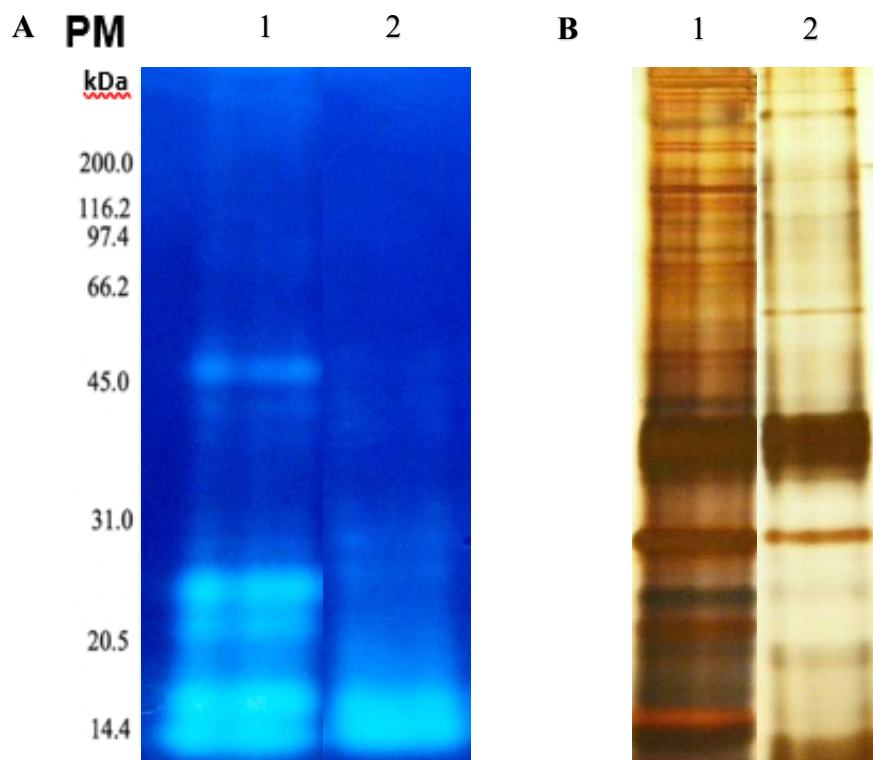


sugiriendo que las proteasas glicosiladas y no glicosiladas son de peso molecular parecido que únicamente la cromatografía de afinidad fue capaz de separarlas. En el caso del número de proteasas glicosiladas, la progenie de Villa Juárez mostró un mayor número de bandas en comparación que las progenies de Kronstad y Borlaug. En el caso de las proteasas glicosiladas de Villa Juárez se observaron 4 bandas intensas en actividad (45, 29, 24 y 15 kDa, aproximadamente) y otras de menor intensidad, siendo la de más bajo peso molecular la más activa. Por otro lado, la Figura 13B que muestra la tinción de plata de las proteínas del extracto crudo reveló una composición heterogénea y compleja en el perfil electroforético. En el carril 1 se muestra el extracto crudo de la progenie Villa Juárez y en el carril 2 se encuentra la separación de proteínas correspondientes a la proteína glicosilada del mismo extracto. Haciendo una comparación de los perfiles electroforéticos, se observa que las proteínas glicosiladas teñidas con plata coinciden en gran medida con las bandas del perfil electroforético de las proteasas mostradas en la Figura 13A, carril 2.

En el caso de la progenie de Kronstad, el zimograma de la Figura 14A, carril 1 y 2, respectivamente, mostró similitudes y diferencias a los correspondientes de la progenie de Villa Juárez. En primer lugar, la proteasa de alrededor 200 kDa de Villa Juárez no se observó en Kronstad, ni tampoco la de 29 kDa. El resto de las proteasas glicosiladas fue similar en número a la de Villa Juárez, e incluso la banda de más bajo peso molecular fue la más intensa. En cuanto a la tinción de las bandas de proteína con plata (Figura 14B, carril 1 y 2), el perfil de bandas fue muy similar al observado en los extractos de Villa Juárez. Lo que resulta interesante de estos resultados de la progenie de Kronstad, es el hecho de que *R. dominica* no haya expresado la síntesis de las dos proteasas antes mencionadas, lo que sugiere que el insecto modula la expresión de las proteasas de manera diferente en cada progenie desarrollada en diferentes trigos.



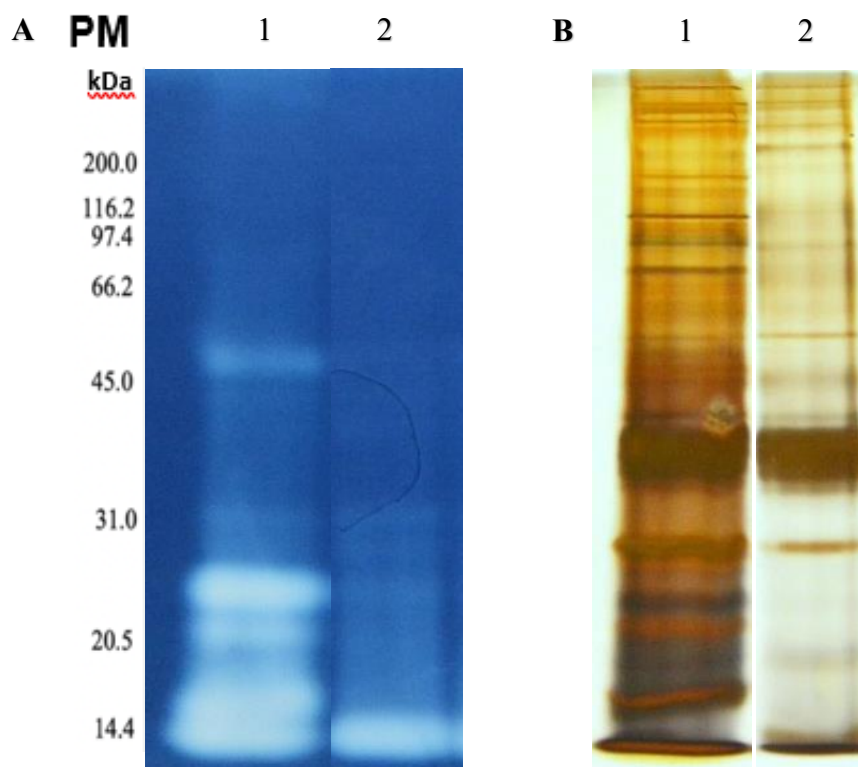
**Figura 13.** Perfil electroforético de las fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad a la Concanavalina-A de progenies emergidas del trigo Villa Juárez. Las enzimas fueron analizadas (A) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas), y (B) tinción de plata para detectar bandas de proteínas (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas).



**Figura 14.** Perfil electroforético de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de afinidad a la concanavalina-A de progenies emergidas del trigo Kronstad. Las enzimas fueron analizadas (A) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas), y (B) tinción de plata para detectar bandas de proteínas (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas).

Los perfiles electroforéticos de la progenie de Borlaug se muestran en la Figura 15A, carril 1 y 2. En este caso los patrones electroforéticos fueron similares, si no idénticos, a los observados en los extractos de la progenie de Kronstad. De manera similar se encontraron similitudes en la tinción con plata (Figura 15B, carril 1 y 2) tanto el extracto crudo como de la proteína eluída de la columna de afinidad. Estos resultados, y los correspondientes a los de las progenies de Villa Juárez y Kronstad, demuestran que, independientemente de la cantidad de proteína que expresaron para su síntesis las progenies de *R. dominica*, siempre se detectaron las mismas bandas. La diferencia en estos casos fue que la cantidad de proteasas glicosiladas y no glicosiladas no coincidieron en las tres progenies, específicamente las desarrolladas en los trigos Kronstad y Borlaug con la de Villa Juárez.

Lo anterior hace pensar que el insecto *R. dominica* modula la síntesis de sus proteasas, pero en este caso, y utilizando el perfil electroforético obtenido mediante zimografía, solamente se puede llegar a esta conclusión dado que electroforesis únicamente muestra el número de bandas con actividad. Tal vez pueda ser útil conjeturar que cada progenie proviene de trigos distintos a los que se evaluó en capacidad inhibitoria contra la actividad proteolítica de las progenies. Sin embargo, se requiere realizar estudios más que relacionen las propiedades de los trigos empleados en este estudio con el perfil zimográfico proteolítico de las progenies del insecto.



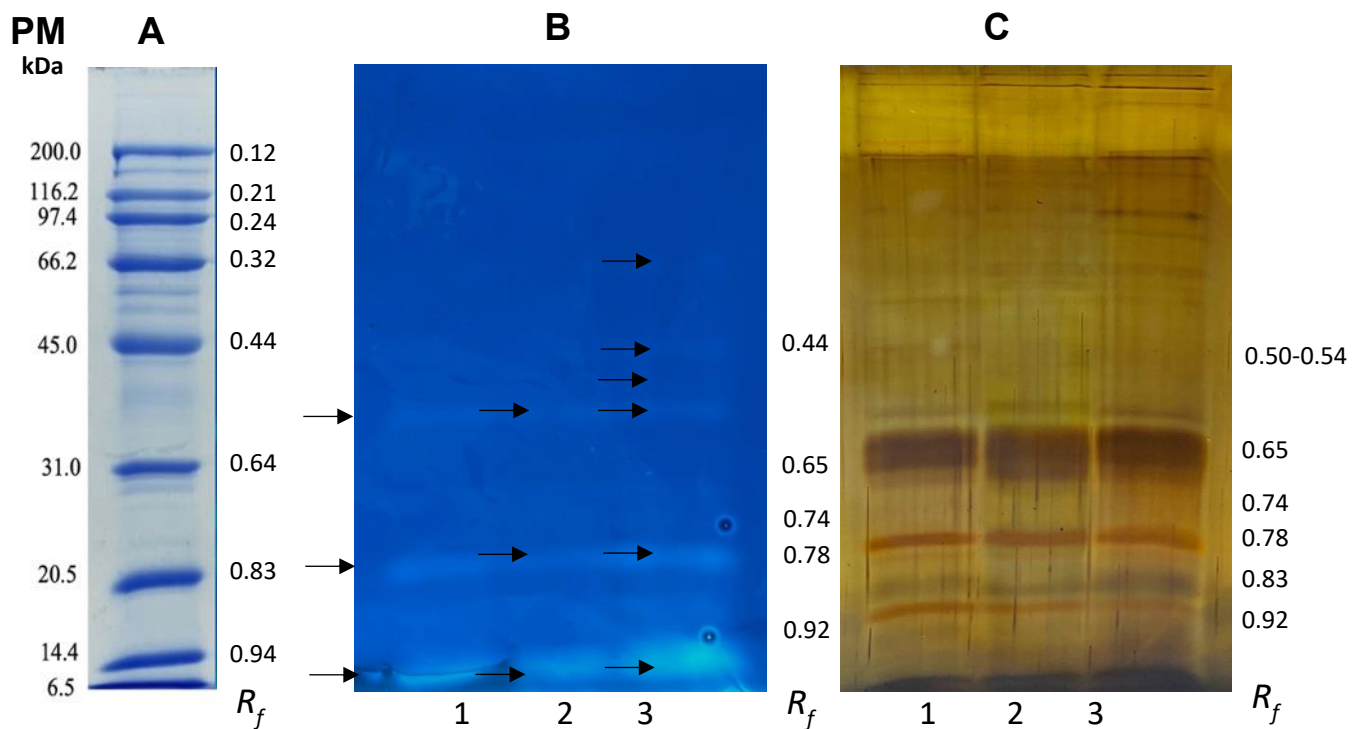
**Figura 15.** Perfil electroforético de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de afinidad a la concanavalina-A de progenies emergidas del trigo Borlaug. Las enzimas fueron analizadas (A) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas), y (B) tinción de plata para detectar bandas de proteínas (carril 1: extracto proteolítico crudo; carril 2: pool de glicoproteínas).

### **Efecto de SDS y $\beta$ -mercaptoetanol en la Actividad Proteolítica *in gel***

Usualmente la separación de proteínas por medio de la técnica de electroforesis se lleva a cabo bajo condiciones disociantes, es decir, las proteínas se desnaturalizan por efecto del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS, siglas en inglés),  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) y un tratamiento térmico por varios minutos a 90 °C. Sin embargo, dichas condiciones usualmente no se aplican cuando se trata de detectar actividad enzimática *in situ*, es decir, en el gel propiamente dicho. El SDS rompe puentes de hidrógeno y le confiere una carga neta negativa a la proteína, mientras que el  $\beta$ -ME ejerce un efecto reductor sobre los puentes disulfuro escindiéndolos, por lo que la cadena polipeptídica se abre perdiendo sus estructuras secundarias de hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  plegadas. El tratamiento térmico severo desnaturaliza aún más a la proteína, abriendo su estructura, y exponiendo los grupos laterales de los aminoácidos al SDS con lo que la carga neta de la cadena polipeptídica es negativa. En este proceso de desnaturalización toda actividad enzimática se pierde.

La actividad proteolítica del tipo tripsina de *R. dominica* es elevada bajo condiciones alcalinas (Osuna-Amarillas *et. al*, 2012), lo que indica que la carga neta de las moléculas es negativa actuando como aniones. El SDS, comúnmente empleado en la separación de proteínas bajo condiciones disociantes en las técnicas electroforéticas, confiere carga negativa total, no carga neta, a las moléculas de proteínas. Las enzimas del tipo tripsina de *R. dominica* no pierden actividad bajo el tratamiento con SDS indicando que los aminoácidos ácidos ionizados y cargados negativamente, son requeridos para tener afinidad por el sustrato. Con el objetivo de determinar si el SDS y  $\beta$ -ME afectan negativamente la actividad proteolítica de los extractos enzimáticos de *R. dominica*, se procedió a realizar una electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

En comparación con el gel de tinción de plata obtenido anteriormente en condiciones no disociantes, se puede observar en la Figura 16C la presencia de las mismas bandas, a excepción de bandas con alto peso molecular correspondientes a proteínas presentes en el extracto sin aparente actividad proteolítica.



**Figura 16.** Perfil electroforético en condiciones desnaturalizantes con SDS y mercaptoetanol de extractos proteolíticos de progenies emergidas de trigos (1) Villa Juárez, (2) Kronstad y (3) Borlaug. Las enzimas fueron analizadas en (A) peso molecular empleando proteínas de peso molecular conocido, (B) en el número de enzimas proteolíticas por zimografía utilizando caseína co-polimerizada, y (C) tinción de plata para detectar bandas de proteínas.

En el caso de zimografía (Figura 16B), se observan diferencias tanto en la presencia de bandas como en la intensidad de alguna de ellas, correspondiente a una alteración en la actividad catalítica. En el caso de la variedad Villa Juárez se puede observar la presencia de 3 bandas que difieren en intensidad. Como diferencia ante el zimograma anterior, en esta variedad desapareció la banda de mayor peso molecular (45 kDa). En el caso de la variedad Kronstad, se observaron 3 bandas con actividad proteolítica, donde la banda con peso molecular de 23 kDa fue inactivada desapareciendo totalmente. Otro dato interesante fue que se redujo la actividad en la banda de 25.4 kDa mientras que aumentó en la de 29.5 kDa. Por último, en el extracto de la variedad Borlaug se observaron 6 bandas que difieren en intensidad como indicativo de la actividad presente. Dos bandas con pesos moleculares superiores a los 23 kDa presentaron baja actividad, así como la permanencia de la banda con alto peso molecular de 45 kDa presente en el zimograma no disociante en los tres extractos enzimáticos, presentando baja actividad. Sin embargo, se pudo observar la presencia de una nueva banda entre 50-52 kDa con muy poca actividad.

Con relación a los tres extractos enzimáticos, todos mostraron una nueva banda con peso molecular de aproximadamente 54 kDa. Villa Juárez y Kronstad no mostraron la banda de 45 kDa, mientras que ésta apareció en la variedad Borlaug. Las bandas localizadas en 30 y 24 kDa permanecieron, sin embargo, la banda de 24 kDa resultó con menor intensidad, lo que indicó una menor actividad proteolítica en cada uno de los extractos. Una revisión de la literatura muestra que las proteasas del pez corvina *Argyrosomus regius* presentan pesos moleculares entre 15 y 75 kDa (Guerreiro et al., 2020). En otro estudio realizado por Villalobos (2017) se reportó el peso molecular de tres proteasas tipo tripsina en el barrenador de grano más grande *Prostephanus truncatus*, con pesos moleculares de 28 kDa, 40 kDa y 120 kDa. Similar a este reporte, se ha encontrado que en el intestino medio del mosquito *Anopheles albimanus* se encuentra la actividad enzimática de tipo tripsina con un peso molecular de 29 kDa (Cázares-Raga et al., 2014). Por otra parte, datos específicos de proteasas de *R. dominica* muestran pesos moleculares de 23.7 kDa para quimotripsina (Zhu y Baker, 2000) y enzimas con actividad caseinolítica en un rango de 22-51.3 kDa (Osuna-Amarillas et al., 2012). Los pesos moleculares encontrados en la literatura coinciden con lo

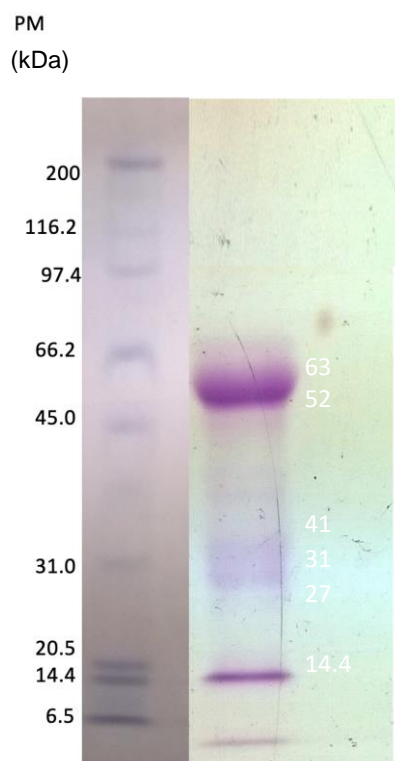


encontrado en nuestro estudio, sugiriendo la presencia de serina-proteasas. Los extractos de las progenies de Kronstad y Borlaug presentaron ambos una banda de menor peso molecular (15.2 kDa) que mostró una mayor intensidad en el zimograma, lo que significa que la actividad catalítica aumentó. Esto se puede relacionar con la ruptura de puentes disulfuro con el uso de  $\beta$ -ME.

### **Detección de Proteasas Glicosiladas**

Una vez separadas las proteínas obtenidas de las fracciones de cromatografía de afinidad a la lectina Concanavalina-A, se llevó a cabo la detección de proteasas glicosiladas mediante el kit de detección (Glycoprotein Staining Kit, Catalog No. 24562, Pierce <sup>TM</sup> Thermo Scientific) las cuales mostraron una coloración magenta. La Figura 17 muestra la separación electroforética de proteasas glicosiladas de *R. dominica* del extracto proteolítico a partir de la variedad Borlaug. Se encontraron dos bandas con coloración magenta intensa en el rango de peso molecular de 52-63 kDa, 14.4 kDa y 4.7 kDa. Se observó que la intensidad de la coloración fue proporcional al grado de glicosilación, es decir, a la cantidad de carbohidratos presentes en la estructura de las enzimas glicosilada, siendo los grupos aldehídos transformados mediante la oxidación de los grupos hidroxilos, quienes interactúan con el colorante (Roth *et al.*, 2012). Se pueden observar bandas color magenta, aunque menos intensas, que corresponden a pesos moleculares de 28-36 kDa. También se observaron bandas con menor glicosilación en los rangos de 31-41 kDa y 27-18 kDa.

En un estudio realizado por Vivas-Ruíz *et al.* (2012) se reportó el peso molecular de una enzima similar a la trombina presente en el veneno de la serpiente *Bothrops barnetti*, perteneciente al grupo de las serina-proteasa de 27.57 kDa. La existencia de una  $\beta$ -glucosidasa de un peso molecular de 123.4 kDa fue reportada por Zhou *et al.* (2019) la cual presentó en su estructura molecular la presencia de carbohidrato y lo cual fue confirmando por espectroscopía por transformada de Fourier y dicroísmo circular. Un dato interesante encontrado es el de una serina proteasa de 51 kDa detectada en la planta medicinal *Euphorbia milii* (Yadav *et al.*, 2006), lo cual coincide con el peso molecular de una proteasa de nuestro



**Figura 17.** Zimograma de proteasas glicosiladas (bandas magenta) eluidas de una columna de lectina Concanavalina-A (AffiGel Con-A) y analizadas en electroforesis del extracto proteolítico de *R. dominica* emergida del trigo variedad Borlaug.

estudio, lo que lleva a pensar que el molecular de enzimas serina proteasas ronda en un amplio rango de valores. Actualmente, existe poca información acerca de la caracterización de proteasas glicosiladas en insectos, lo cual evidencia que se requieren más estudios de caracterización de estas enzimas considerando que son organismos que se alimentan de los mismos recursos alimenticios naturales que utilizan los animales y humanos.

El proceso de glicosilación lleva a cabo diversas modificaciones en las proteínas y, a su vez, le confieren cierta funcionalidad a la molécula dependiendo de la especie y etapa reproductiva del organismo (Vanderborre *et al.*, 2011). En el caso de los carbohidratos asociados a una enzima similar a la trombina, éstos le confieren estabilidad catalítica modulando su unión al sustrato (Vivas-Ruíz *et al.*, 2012). En el caso de las glucosidasas este proceso se asocia con la capacidad catalítica (Nascimento *et al.*, 2017) y puede pensarse que es posible que una situación similar exista en las proteasas del tipo tripsina de *R. dominica*.

Comparando la Figura 15A carril 1 y Figura 17, se puede apreciar que existe una posible relación entre la actividad enzimática de los extractos de *R. dominica* con la presencia de glicosilación ya que las bandas que presentaron menor actividad en gel mostraron bandas color magenta intenso. En el caso contrario, cuando la actividad proteolítica era mayor, las bandas color magenta eran casi traslúcidas. Se ha observado que la N-glicosilación en algunos insectos como el gorgojo de la harina *T. castaneum* puede afectar la actividad enzimática pues la especificidad del sustrato o la afinidad de unión cuando la cadena de oligosacáridos está muy próxima al sitio activo de la enzima y puede influir estéricamente en la accesibilidad del sustrato (Scheys *et al.*, 2020; Fuzita *et al.*, 2020). La glicosilación puede prevenir la agregación a las proteínas desplegadas o parcialmente plegadas donde ambos elementos están estrechamente vinculados al grado de glicosilación (Skropeta, 2009). En este contexto, se puede inferir que este proceso bioquímico altera la actividad enzimática de *R. dominica* y se encuentra relacionado con el grado de glicosilación.

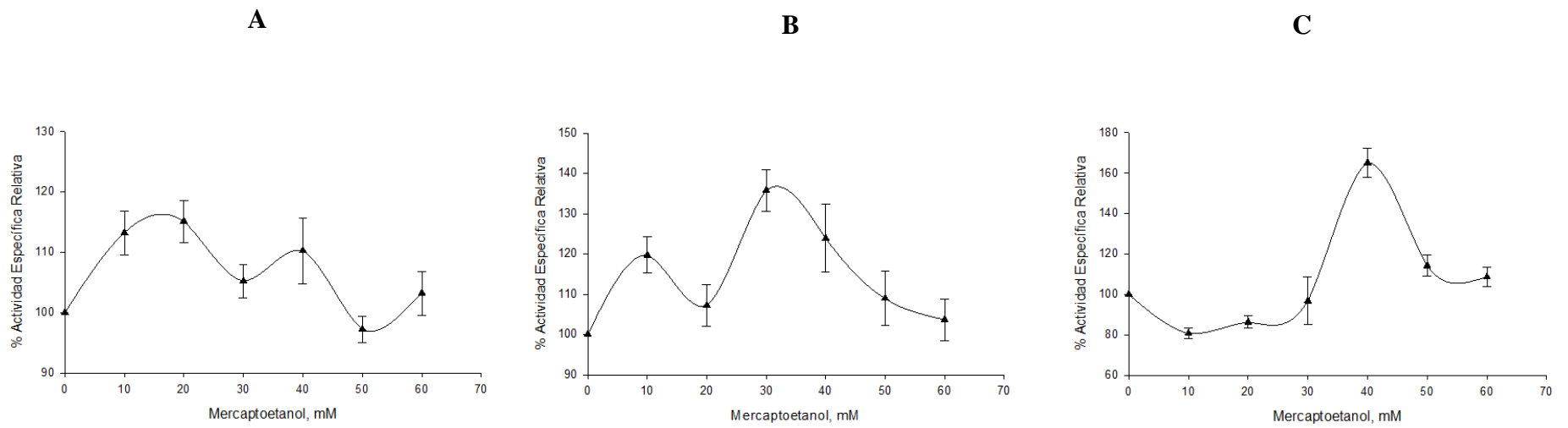
## Etapa II

**Caracterización Cinética de las Proteasas Glicosiladas del Insecto *Rhyzopertha dominica* Desarrollado los Trigos Hexaploides de la Variedad: Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, e Identificación de las Diferencias entre las Proteasas Glicosiladas y No Glicosiladas de *R. dominica* con Relación a la Cinética, Energía de Activación y Constante de Inhibición.**

### **Influencia de $\beta$ -mercaptoetanol en Actividad Proteolítica**

El  $\beta$ -mercaptoetanol es un agente reductor que actúa en los puentes disulfuro y se utiliza con el objetivo de separar cadenas polipeptídicas distintas para analizar el estado de oligomerización de las proteínas. Para ello se analizaron tres extractos enzimáticos obtenidos de progenies de *R. dominica* emergidas de las variedades de trigo Villa Juárez, Kronstad y Borlaug. Los extractos enzimáticos fueron incubados a distintas concentraciones (0-50 mM) del agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol. Los resultados se muestran abajo en distintas gráficas.

En la Figura 18A se observa el comportamiento en actividad proteolítica de la progenie emergida de la variedad de trigo Villa Juárez bajo la influencia del  $\beta$ -ME a distintas concentraciones. Se pudo observar que la actividad proteolítica se incrementó aproximadamente 35 % alcanzando ese valor máximo a 20 mM de  $\beta$ -ME. A concentraciones mayores hasta de 50 mM de  $\beta$ -ME el extracto enzimático mantuvo una actividad de 15-20 % de la observada sin  $\beta$ -ME. Estos resultados sugieren que la progenie de *R. dominica* emergida del trigo Villa Juárez posee dos tipos o grupos de enzimas proteolíticas con diferente susceptibilidad a la acción reductora del  $\beta$ -ME. Un primer grupo, el que mostró un mayor incremento en actividad, posiblemente posea una menor cantidad de grupos disulfuro requiriéndose, en consecuencia, bajas concentraciones de  $\beta$ -ME. Un segundo grupo de enzimas proteolíticas, las cuales presentaron un menor incremento en actividad enzimática a mayores concentraciones de  $\beta$ -ME, probablemente posean una estructura más rígida, posiblemente conferida por un mayor número de interacciones hidrofóbicas y un mayor



**Figura 18.** Influencia del  $\beta$ -mercaptoetanol en la actividad proteoítica de *Rhyzopertha dominica* emergida del trigo variedad A) Villa Juárez, B) Kronstad y C) Borlaug. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de tres determinaciones.

número de puentes de hidrógeno. Sin embargo, es posible que también el peso molecular de las enzimas esté relacionado con la sensibilidad a la acción reductora del  $\beta$ -ME, con un menor número de puentes disulfuro con moléculas de menor tamaño y viceversa.

En el caso del extracto enzimático proteolítico de la progenie de *R. dominica* emergida del trigo Kronstad, se observó que el  $\beta$ -ME causó un incremento en la actividad (Figura 18B) la cual se pudo observar en dos picos. El primer incremento en actividad se observó a 10 mM de  $\beta$ -ME, representando aproximadamente 20 % de aumento de actividad, mientras que el segundo pico alcanzó un máximo a aproximadamente 30 mM de  $\beta$ -ME, representando aproximadamente 35 % de incremento en actividad, para después disminuir a niveles normales a concentraciones igual o mayor de 50 mM de  $\beta$ -ME. Estos datos proporcionan información de la composición de puentes disulfuro en la estructura proteica, pudiendo inferir que se encuentra constituida por puentes disulfuro intramoleculares, debido a la permanencia de la actividad relativa, el agente reductor no fue necesario para modificar la estructura y exponer el sitio activo. Mientras que, a una concentración de 60 mM (Figura 18B) la enzima aumentó su actividad relativa siendo esta concentración suficiente para romper los enlaces que tienen relación directa con la bolsa catalítica permitiendo una mayor interacción sustrato-sitio activo.

En el caso del extracto enzimático proteolítico de la progenie de *R. dominica* emergida del trigo Kronstad, se observó que el  $\beta$ -ME no causó un incremento en la actividad de manera significativa (Figura 18B). En contraste a lo que se observó con el extracto proteolítico de la progenie emergida de la muestra de trigo Villa Juárez, la emergida de Kronstad no presentó un incremento en actividad con la presencia de  $\beta$ -ME.

En la Figura 18C se muestra el comportamiento de la actividad enzimática con relación a la concentración de  $\beta$ -ME en el extracto enzimático de la progenie Borlaug. En contraste con los extractos enzimáticos de las progenies emergidas de los trigos Villa Juárez y Kronstad, en ésta no se observó un primer pico de incremento de actividad a bajas concentraciones de  $\beta$ -ME. Sin embargo, a concentraciones de alrededor de 30-40 mM de  $\beta$ -ME detectó un pico de incremento en actividad de aproximadamente 65 %. Este comportamiento de la actividad enzimática en relación con el efecto reductor del  $\beta$ -ME no tiene explicación lógica debido a que se detectaron en este extracto enzimático los dos tipos de enzimas, las no glicosiladas y glicosiladas, al igual que en las dos progenies tanto la variedad Villa Juárez como Kronstad. Tal vez este comportamiento no tenga relación alguna con el tipo de glicosilación.

### **Determinación de los Parámetros Cinéticos $K_m$ y $V_{max}$**

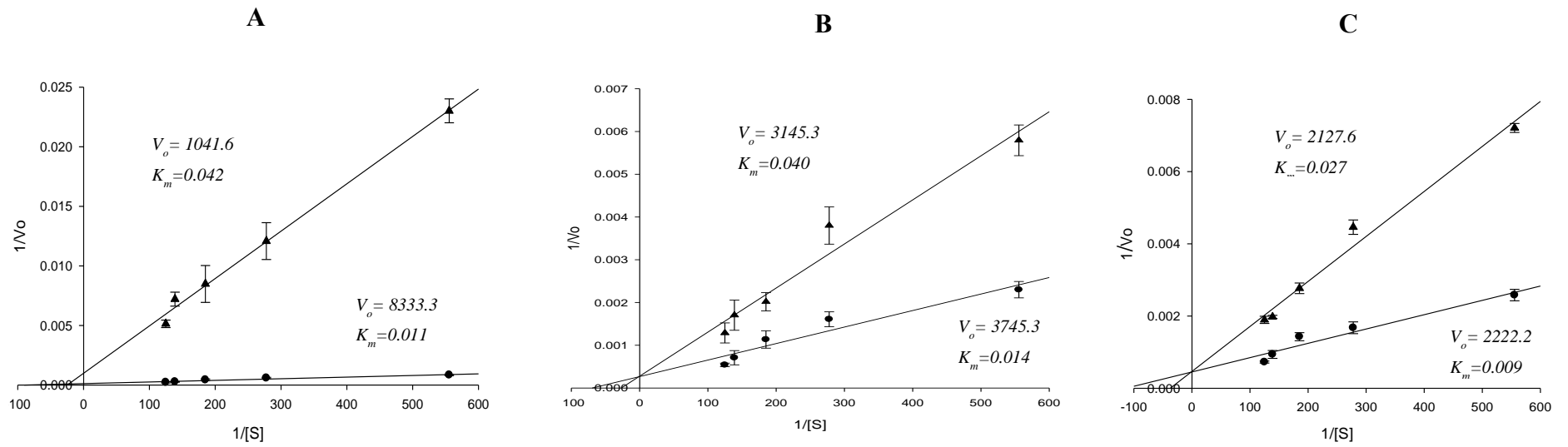
Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  revelaron la afinidad diferencial de las proteasas glicosiladas y no glicosiladas por el sustrato BApNA (Tabla 7). La Figura 19 muestra las gráficas del doble recíproco de Lineweaver-Burk de las proteasas glicosiladas y no glicosiladas de las progenies que emergieron de las variedades de trigo Borlaug, Kronstad y Villa Juárez. Los valores de  $K_m$  de las proteasas glicosiladas fueron menores que los valores correspondientes de las formas no glicosiladas, sin observarse diferencias mayores entre los valores de las glicosiladas (en promedio el valor de  $K_m$  fue de 0.011, lo cual representó el 31.5 % del valor de  $K_m$  de las formas no glicosiladas). Es de interés que los valores de  $K_m$  de las proteasas no glicosiladas en todas las progenies estuvieron en el rango de 65-73 % más elevado, es decir, este tipo de proteasas al presentar un valor de  $K_m$  más alto indica una menor afinidad por el sustrato.

Los valores de velocidad máxima  $V_{max}$  de la actividad proteolítica glicosilada fueron más elevados que en su contraparte no glicosilada en todas las progenies. En un caso observado en el gorgojo de la harina *Tribolium castaneum* se observó la presencia del gen Tc-CTLP-5C<sub>2</sub> expresado en el intestino medio se encuentra glicosilado en la posición N-137 situado de forma opuesta a la hendidura catalítica. Demostraron las diferencias existentes entre la forma no

**Tabla 7.** Valores de parámetros cinéticos de la actividad de serina proteasas glicosiladas y no glicosiladas del tipo tripsina de progenies de *Rhizopertha dominica* desarrolladas en distintas variedades de trigo.

Progenie	Actividad Proteolítica	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (mM min <sup>-1</sup> ) (10 <sup>3</sup> )	Eficiencia Catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) (10 <sup>4</sup> )
<i>Borlaug</i>	Glicosilada	0.011	8.33	75.8
	No Glicosilada	0.042	1.04	2.5
<i>Kronstad</i>	Glicosilada	0.014	3.74	26.7
	No Glicosilada	0.040	3.14	7.8
				34.5
<i>Villa Juárez</i>	Glicosilada	0.009	2.22	24.6
	No Glicosilada	0.027	2.13	7.9





**Figura 19.** Representación gráfica del doble recíproco de Lineweaver-Burk de la actividad proteolítica tipo tripsina (●) glicosilada y (▲) no glicosilada de progenies de *Rhyzopertha dominica* que emergieron de las variedades de trigo (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez.

glicosilada y glicosilada de la enzima, en donde la N-glicosilación disminuye la  $V_{max}$  y la  $K_{cat}$  mientras que la  $K_m$  permanece sin cambios aparentes (Albaum *et al.*, 2017).

Sin embargo, el cálculo de la eficiencia catalítica (calculada como el resultado de la relación de  $V_{max}/K_m$ ), fue mejor indicador porque reveló que las proteasas glicosiladas en todas las progenies son catalíticamente más eficientes que las proteasas no glicosiladas presentando valores porcentuales de  $V_{max}/K_m$  de 74 % (en el caso de la progenie de Villa Juárez) y hasta 97 % (en el caso de la progenie de Borlaug). Como en el caso observado por Rudd *et al.* (1994) donde la RNAasa glicosilada es más estable que la no glicosilada, además, la actividad se ve afectada dependiendo del tamaño de todos los oligosacáridos asociados, los cuales reducen de forma variable el ajuste general entre la enzima y el sustrato. Además de la disminución de la flexibilidad, un factor importante que contribuye a esta interacción puede ser la protección estérica de uno o más sitios susceptibles que están en el rango de todos los oligosacáridos. El aumento de la rigidez puede contribuir al aumento de la resistencia a la proteasa y a la disminución de la actividad funcional de las variantes glicosiladas en comparación con las no glicosiladas. Datos similares encontrados por Mahdavi *et al.* (2013) donde la variación en la actividad y contribución de cada enzima (proteasas de serina y cisteína) en el sistema digestivo del minador de la hoja de café *Leucoptera coffeella* se encuentra asociada con las relaciones filogenéticas entre insectos y sus respuestas a diferentes dietas, como el hecho de cambiar a vías alternativas donde las enzimas presenten una especificidad de sustrato intercambiable (Bhattacharyya *et al.*, 2007).

Este punto es de interés ya que esta isoforma, la glicosilada, podría servir como indicador de la susceptibilidad para unirse a los inhibidores de la serina proteasas del tipo tripsina que se encuentran en el grano de trigo. Cabe recordar que el tipo de inhibición que exhiben estos inhibidores es competitivo (Osuna-Amarillas *et al.*, 2012) de tal forma que compiten con el sustrato por el sitio activo de las enzimas proteasas.

Otros estudios sobre la inhibición de la enzima han observado un aumento de la  $K_m$  y una reducción de la  $V_{max}$  debido al incremento de la concentración de los inhibidores (Chen *et al.*, 2010; Mehrabadi *et al.*, 2012). Se observaron resultados similares para la tripsina (Silva *et al.*, 2010) y la actividad  $\alpha$ -amilasa (Lopes *et al.*, 2010) de cepas de *Sitophilus zeamais* resistentes y susceptibles a los insecticidas. Esta información es altamente significativa y reviste gran importancia desde el punto de vista científico práctico, ya que permite entender la estrategia que emplea el insecto para evadir el efecto negativo que ejercen los inhibidores de serina proteasas en su organismo. Posiblemente esto conduzca a un gasto metabólico, tal como lo observó Lopes *et al.* (2010), quienes evaluaron los parámetros cinéticos de la  $\alpha$ -amilasa de progenies del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* susceptibles y resistentes a los piretroides, observando que la amilasa de esta última mostraba un valor de  $K_m$  más bajo que el de la cepa susceptible. Por lo tanto, los granos de trigo podrían contener inhibidores específicos para cada amilasa que estimulan su activación en el gorgojo mientras se alimenta y se desarrolla.

Julio *et al.* (2017) reportaron varias enzimas involucradas en la resistencia a múltiples insecticidas en el escarabajo rojo de la harina *Tribolium castaneum*, siendo las esterasas las más inhibidas secuestrando los insecticidas bifentrina y pirimifos-metilo formando complejos estrechos con ellos y confiriendo resistencia metabólica de esta manera. Además, las variantes de la glutatión s-transferasa pi 1, modificadas genéticamente para su expresión en *Escherichia coli*, que presentaban propiedades cinéticas diferentes y una sensibilidad variable a la inhibición por metales pesados, demostraron servir como herramientas fisiológicas para su eliminación y desintoxicación (Goodrich y Basu, 2012). Varias poblaciones de la plaga del arroz *Oxya chinensis*, expuestas a diferentes concentraciones del insecticida malatión, mostraron distinta afinidad por el sustrato y, en consecuencia, constantes cinéticas distintas (Wu *et al.*, 2009).

## **Determinación de la Energía de Activación ( $E_a$ ) en Proteasas Glicosiladas y No Glicosiladas**

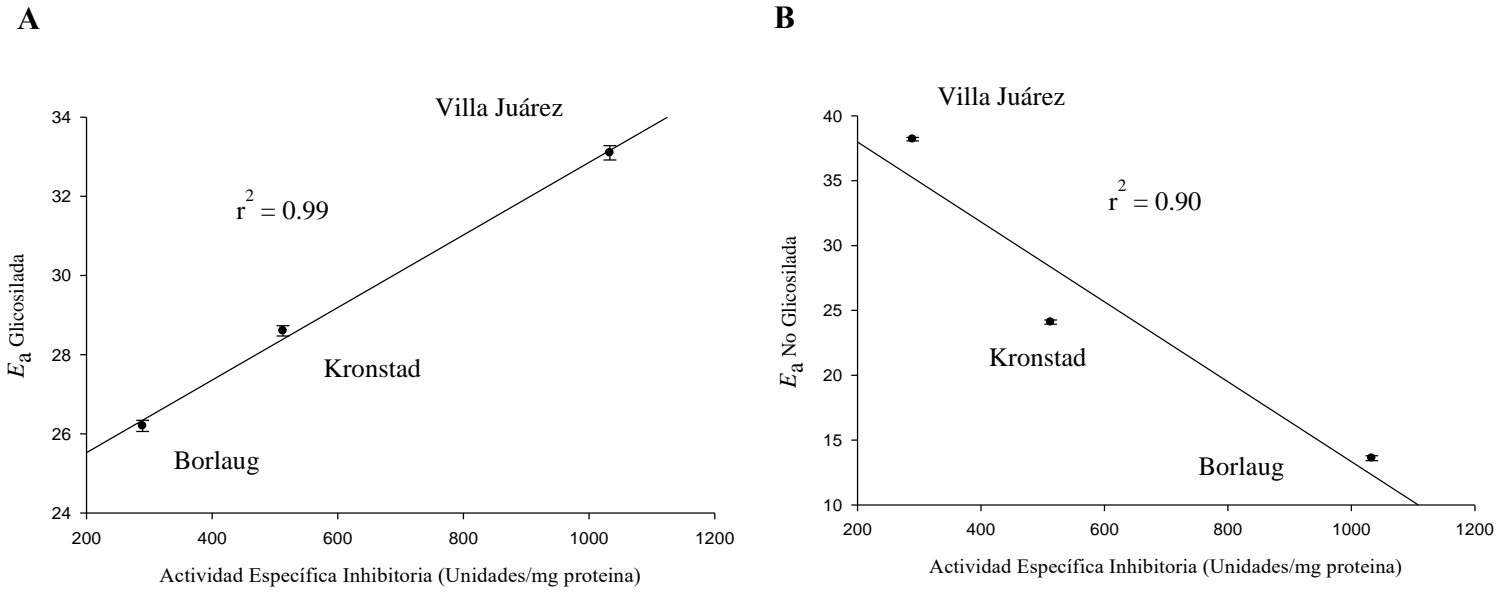
La energía de activación es un parámetro que proporciona información acerca de la influencia que tiene la temperatura en la velocidad de reacción, en este caso, de las enzimas. Para ello, se realizaron los ensayos correspondientes de actividad con la variante de la temperatura que fue desde los 30 °C a los 55 °C (en un gradiente de 5 °C). Con los valores obtenidos se procedió a la aplicación de la ecuación de Arrhenius para la determinación de la  $E_a$  (Tabla 8).

Como se puede observar en la Figura 20 se muestran los gráficos de Arrhenius respecto a las enzimas glicosiladas y no glicosiladas de las tres variedades de trigo. En la Figura 19A se observan los valores obtenidos a partir de la determinación de la energía de activación ( $E_a$ ) en las enzimas glicosiladas, sin obtener diferencias significativas entre las progenies emergidas de las tres variedades de trigo, sin embargo, los datos presentados en la Figura 20B correspondiente a las enzimas no glicosiladas, se observan diferencias significativas entre las variedades Borlaug y Kronstad, respecto a la variedad Villa Juárez. Al obtener una pendiente grande en la representación de Arrhenius nos da a conocer que la velocidad de reacción es muy sensible a la temperatura, por otra parte, al obtener una pendiente pequeña, se puede inferir que la velocidad de reacción es relativamente insensible a las variaciones de temperatura y se necesita menor energía para llevar a cabo la interacción enzima-sustrato (Javed *et al.*, 2008).

La energía de activación ( $E_a$ ) resulta ser menor en las estructuras glicosiladas, lo que indica que no existe una elevada dependencia hacia la temperatura para llevar a cabo la reacción, y es que las estructuras que conforman los polisacáridos le confieren esta característica. Un ejemplo de ello es la ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa) de la bacteria *Bacillus cereus* que al estar glicosilada presenta una menor energía de activación donde se reduce a 3.3 respecto a la forma nativa de 5.62 (Abdel-Naby *et al.*, 2015). Otro caso similar, fue la queratinasa de la bacteria *Bacillus pumilus* que al encontrarse en su forma glicosilada presenta una reducción en la energía de activación con 5.04 kcal mol<sup>-1</sup> comparada con la forma nativa de 6.13 kcal mol<sup>-1</sup>, disminuyendo este valor en un 17.78 % (Abdel-Naby *et al.*, 2017).

**Tabla 8.** Valores de energía de activación  $E_a$  de Arrhenius de la actividad serina proteasa tipo tripsina de progenies de *Rhyzopertha dominica* desarrolladas en diferentes trigos.

Progenie	$E_a \pm DS$ (kJ/mol)	
	Glicosilada	No glicosilada
<i>Borlaug</i>	$26.2 \pm 0.14$	$38.2 \pm 0.13$
<i>Kronstad</i>	$28.6 \pm 0.13$	$24.1 \pm 0.16$
<i>Villa Juárez</i>	$33.1 \pm 0.18$	$13.6 \pm 0.19$



**Figura 20.** Relación entre la energía de activación  $E_a$  de Arrhenius de la actividad serina proteasa del tipo tripsina (A) glicosilada y (B) no glicosilada de progenies de *Rhyzopertha dominica* desarrolladas y emergidas de trigos con diferente actividad inhibitoria antitriptica.

En un estudio reportado por Abdel-Naby *et al.* (2017) de la proteasa alcalina presente en la bacteria *Bacillus stearothermophilus* se demostró que la energía de activación presenta un decremento de aproximadamente 16 % obteniendo valores de  $E_a$  de  $14.43 \pm 0.24$  KJ.mol<sup>-1</sup> comparado con la estructura no glicosilada de  $17.31 \pm 0.36$  KJ.mol<sup>-1</sup>. En general, estos resultados indicaron que la glicosilación comparada con la forma no glicosilada presentó valores menores en  $E_a$  con los cuales mejora su calidad aumentando la eficiencia catalítica de la enzima al reducir la energía requerida para hacer el complejo activado (enzima-sustrato).

En el caso específico de cada una de las variedades, la variedad Borlaug presentó el valor mayor de  $E_a$  con 38.2 y la variedad Villa Juárez con el valor más bajo de 13.6 en enzimas no glicosiladas; en el caso de las enzimas glicosiladas, la variedad Villa Juárez presentó la mayor  $E_a$  con 33.1 y la variedad Borlaug con la menor  $E_a$  con un valor de 26.2. Estos datos relacionados con la actividad específica inhibitoria en cada una de las variedades, se puede concluir que la variedad Borlaug al presentar menor porcentaje de inhibición, la velocidad de reacción se da principalmente por sus enzimas glicosiladas al ser menos sensibles a los cambios de temperatura. Por otra parte, la variedad Kronstad con actividad media inhibitoria presenta valores medios de  $E_a$  sin diferencias significativas en enzimas glicosiladas y no glicosiladas, infiriendo que la velocidad de reacción se encuentra equilibrada entre ambos tipos de enzima. Por último, la variedad Villa Juárez, con mayor actividad inhibitoria presenta diferencias significativas entre ambas enzimas, obteniendo el valor mayor en las enzimas glicosiladas, lo que significa, que son altamente sensibles a la temperatura en comparación con las no glicosiladas; siendo estas últimas las que llevan a cabo la mayor parte de la actividad.

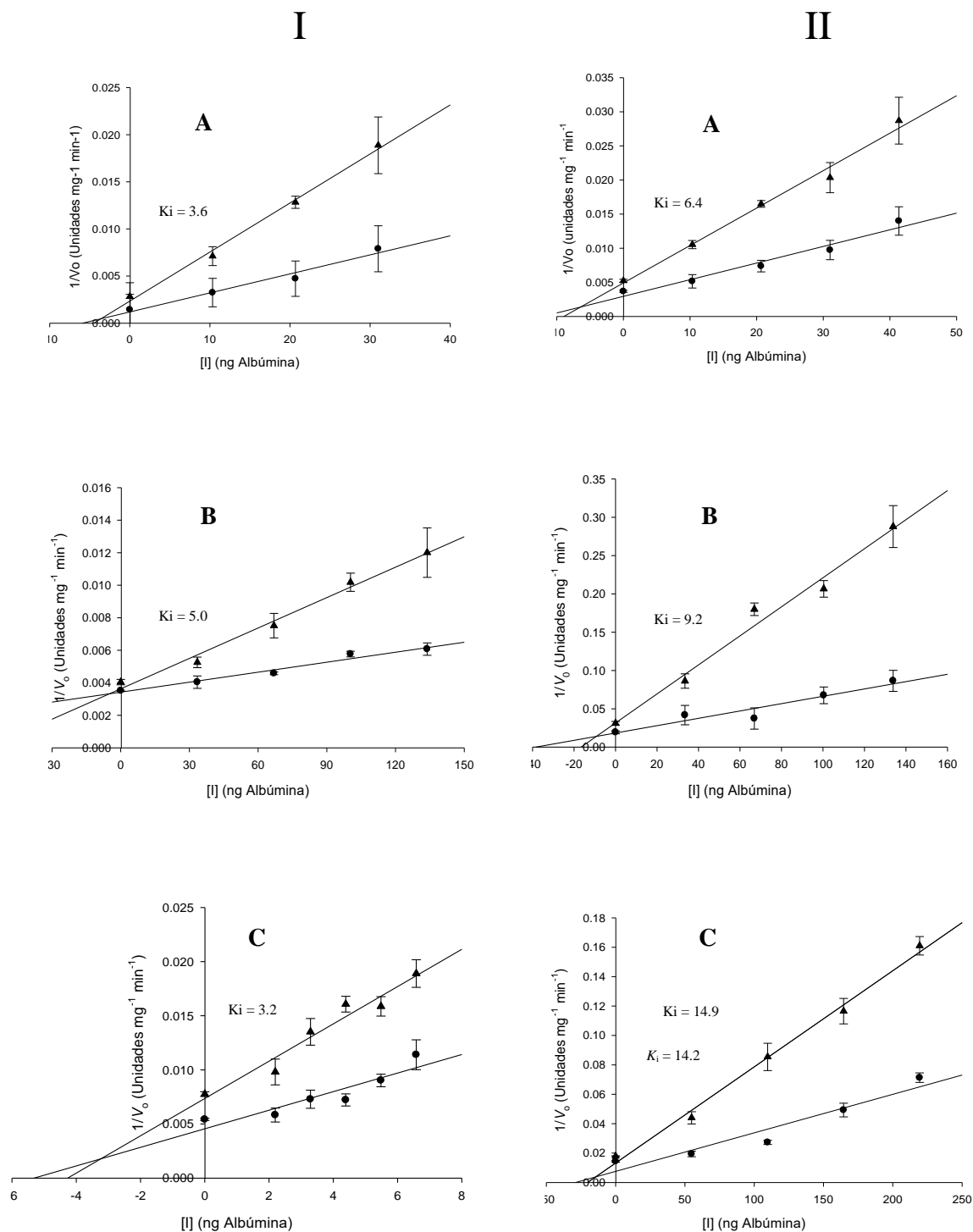
## **Determinación de la Constante de Inhibición $K_i$**

La separación de las proteasas glicosiladas y no glicosiladas por medio de la cromatografía de afinidad con Concanavalina-A permitió contar con los dos tipos de formas de serina proteasas, glicosiladas y no glicosiladas, de tipo tripsina de progenies de *R. dominica*. Por otro lado, la separación de las albúminas de los trigos Borlaug, Kronstad y Villa Juárez por medio de la cromatografía de filtración en gel, permitió detectar y separar aquellas fracciones cromatográficas que mostraron la más alta actividad inhibitoria hacia la actividad proteolítica del insecto. Tomando esas dos circunstancias, se determinó la constante de inhibición  $K_i$  de las fracciones cromatográficas de albúminas inhibitorias de alta actividad proteolítica de las formas glicosiladas y no glicosiladas.

La constante de equilibrio de disociación del complejo enzima-inhibidor  $K_i$ , que indica la potencia de un inhibidor, se determinó mediante el método gráfico de Dixon (Burlingham y Widlanski, 2003) graficando el recíproco de  $V_0$  contra diferentes concentraciones del inhibidor de trigo. Cuanto mayor sea  $K_i$ , más débil será la unión del inhibidor a la enzima haciendo que el complejo se separe fácilmente, dejando disponible el sitio activo de la enzima. Los valores de  $K_i$  para las formas glicosiladas y no glicosiladas de las progenies en las variedades de trigo Borlaug, Kronstad y Villa Juárez se muestran en la Figura 21.

El método gráfico mostró que la inhibición de todas las fracciones de albúminas utilizadas en el ensayo era de tipo competitivo, ya que las líneas rectas se intersectan a la izquierda del eje vertical (Burlingham y Widlanski, 2003). Sin embargo, el exceso de sustrato, que aumenta las posibilidades de unión de la enzima y el sustrato, supera la inhibición competitiva permitiendo que las proteasas con valores de  $K_i$  más altos permanezcan activas. Los valores de  $K_i$  para las proteasas glicosiladas fueron menores que de las formas no glicosiladas (Tabla 9). Un cálculo porcentual de la actividad entre ambas formas mostró que las glicosiladas mostraron alrededor del 56 % y 54 % (Borlaug y Kronstad, respectivamente) del valor de  $K_i$  de las no glicosiladas, excepto la de Villa Juárez que mostró un valor 22.5 % con respecto a su contraparte no





**Figura 21.** Diagramas de Dixon para la determinación de la constante de disociación  $K_i$  de los extractos inhibitorios de trigo (A) Borlaug, (B) Kronstad y (C) Villa Juárez unidos a las isoformas de serina proteasa tipo tripsina (I) glicosilada y (II) no glicosilada de progenies de *Rhyzopertha dominica* cultivadas y desarrolladas en los mismos trigos. Se utilizaron dos concentraciones de N- $\alpha$ -Benzoil-DL-arginine *p*-Nitroanilida (BapNa) como sustrato: ( $\blacktriangle$ ) 0.5 mM; ( $\bullet$ ) 1 mM. Cada punto es la media de dos réplicas  $\pm$  desviación estándar.

glicosilada. Un valor  $K_i$  alto significa que existe una baja afinidad al inhibidor entre la enzima y el inhibidor y viceversa.

De acuerdo con los resultados, parece que existe un mecanismo de regulación de las propiedades cinéticas de las diferentes formas de proteasas en *R. dominica* en presencia de inhibidores. Esa hipotética situación permitiría que el resto de las proteasas se mantuvieran activas, lo que puede deducirse de los valores más elevados de  $K_i$  observado para las formas no glicosiladas. Esta deducción se sustenta en otros estudios que reportan de una actividad enzimática y un efecto inhibitorio diferencial en alozimas de glutatión s-transferasa (Goodrich y Basu, 2012), esterasas (Julio *et al.*, 2017) e isoformas de serina hidroximetiltransferasa (Tramonti *et al.*, 2018). Del mismo modo, existe similitud con los resultados del presente estudio con la inhibición diferencial por parte de los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas de trigo sobre las isoformas de  $\alpha$ -amilasas de *Ephestia kuehniella* que permite que el sistema amilolítico en dicho insecto sea menos vulnerable al complejarse las moléculas inhibitorias (Pytelková *et al.*, 2009) y con los reportados recientemente por Gonzalez-Ruiz (2021). En un estudio realizado por Zhu *et al.* (2013) observaron la función que cumplía una glicoproteína ante la capacidad de ataque sobre la interacción huésped-patógeno. El rol que cumplía dicha glicoproteína se relacionaba con la actividad de recepción en la superficie, donde una vez pasando por el proceso de reducción en la glicoproteína huésped, se puede inhibir potencialmente la invasión del patógeno. Así mismo, reportaron que la diferencia en la composición de glicanos representa la capacidad de susceptibilidad o resistencia a la cepa.

Esto relacionado a lo observado en la actividad específica inhibitoria de nuestros extractos, pudiendo atribuir el porcentaje de inhibición a la presencia de estructuras glicosiladas con glicanos complejos, permitiéndole llevar a cabo la mayor parte de la actividad enzimática siendo ésta de alrededor del 70-80 % en cada una de las progenies. Los cambios estructurales pueden afectar a la interacción de los inhibidores de trigo con las proteasas de *R. dominica*, pero estas relaciones no han sido probadas y realizadas hasta el momento según nuestros conocimientos.

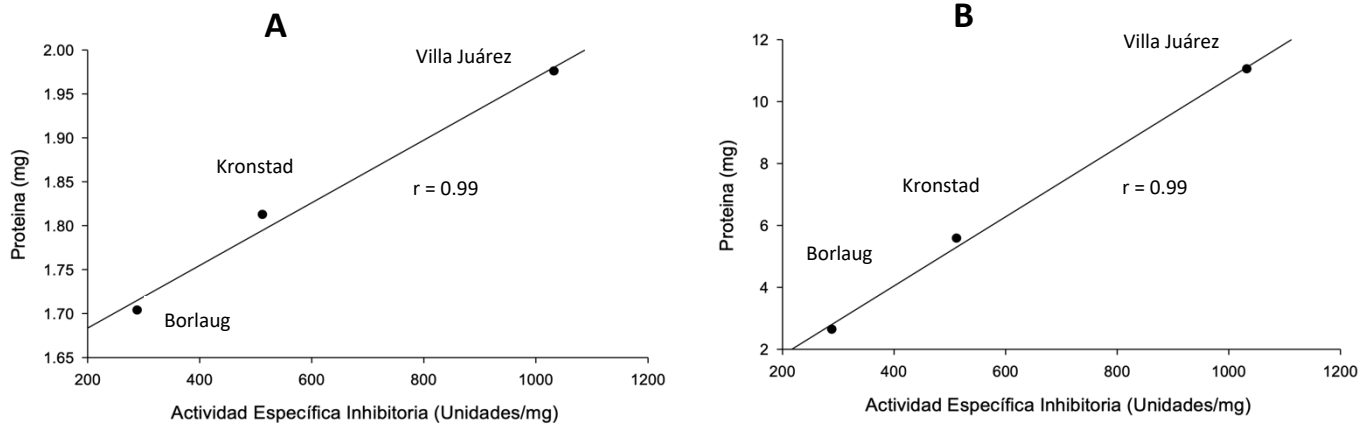
**Tabla 9.** Valores de la constante de inhibición  $K_i$  de trigos utilizados para el cultivo de progenies de *R. dominica*.

Variedad de Trigo		$K_i$ (M)
Borlaug	Glicosilada	$3.6 \pm 0.7$
	No Glicosilada	$6.4 \pm 0.4$
Kronstad	Glicosilada	$5.0 \pm 0.4$
	No Glicosilada	$9.2 \pm 0.6$
Villa Juárez	Glicosilada	$3.2 \pm 0.3$
	No Glicosilada	$14.9 \pm 0.7$

## **Relación entre Actividad Inhibitoria de Trigos y Actividad Enzimática de Progenies**

El grano de trigo contiene inhibidores de enzimas, entre otras proteínas que desempeñan un papel en el metabolismo del grano. Cada tipo de trigo en su madurez contiene una concentración de proteína como resultado de varios factores, entre los cuales la genética de la planta y las condiciones ambientales (nutrición del suelo, disponibilidad de agua, temperatura, luz, etc.) ejercen su principal influencia. Los inhibidores de enzimas del grano de trigo son antinutrientes que inhiben la acción de enzimas exógenas tales como las de los insectos que se alimentan de los granos. Como resultado de la adaptación metabólica que sucede en el insecto con la ingesta de los inhibidores que se encuentran en los granos de cereales, el insecto produce una mayor concentración de proteínas, entre las cuales se encuentran las enzimas.

Con el objetivo de conocer si la actividad inhibitoria de los trigos empleados en el estudio ejerce un efecto inductor en la concentración de proteína glicosilada y no glicosilada, se elaboró una gráfica que se muestra en la Figura 22. Puede observarse que existe una significativa correlación positiva ( $r = 0.99$ ) entre ambos parámetros. Sin embargo, se considera que el número de muestras de trigo y progenies es muy limitado, de tal forma que es conveniente realizar estudios del mismo tipo, pero con un número mayor de variedades de trigo. A pesar de ello, el comportamiento gráfico puede tomarse como un indicador de lo que se podría esperar en resultados con este tipo de estudios ampliados. Un análisis más detallado del resultado de la Figura 22 sugiere que la actividad inhibitoria de los trigos induce el consumo de un mayor contenido de alimento y, por ende, de proteínas las cuales se detectaron en las progenies de *R. dominica* que se alimentaron de los granos de trigo. Mientras más elevada sea la actividad inhibitoria proteolítica, mayor será la concentración de proteína en las progenies del insecto y viceversa. En otras palabras, puede interpretarse que la elevada actividad inhibitoria de los trigos ejerce un estímulo para el consumo de mayor alimento. Si esto es así, estos resultados serían útiles para la selección de variedades de trigo resistentes al ataque de plagas durante el almacenamiento, especialmente contra *R. dominica*, aunque no se descarta la posibilidad que otros coleópteros y especies de insectos, tengan igual comportamiento en su actividad digestiva.



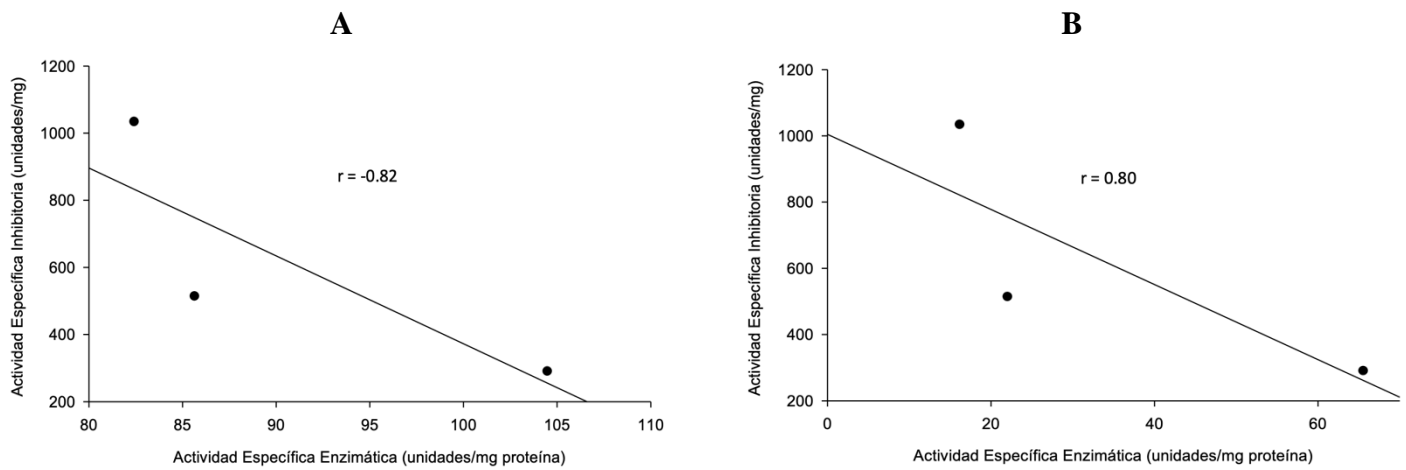
**Figura 22.** Relación gráfica entre la actividad específica inhibitoria de los trigos empleados para cultivar las progenies de *Rhizopertha dominica* y la cantidad de proteína (A) glicosilada y (B) no glicosilada de las progenies emergidas de cada trigo.

Los inhibidores enzimáticos que se encuentran de forma natural en los granos de trigo han sido otro factor que confiere resistencia al ataque de insectos (Franco *et al.*, 2002; Kuwar *et al.*, 2015). Los insectos evitan el efecto de inhibición mediante la sobreproducción de enzimas (Markwick *et al.*, 1998) o sintetizando otras nuevas insensibles a los inhibidores (Bown *et al.*, 1997; Brioschi *et al.*, 2007) haciendo frente a la inhibición de la producción de azúcar que sustenta la supervivencia y la reproducción. Sin embargo, la resistencia a los inhibidores de proteasas en los insectos podría causar un costo metabólico que llevaría a una alta síntesis de enzimas, pero con baja actividad específica, y serina-proteasas en particular, de forma similar a la observada en cepas de *Sitophilus zeamais* resistentes a los piretroides (Araújo *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2010) y las progenies de *R. dominica* expuestas al efecto insecticida de aceites esenciales de Eucalyptus (Reyes-Guzman *et al.*, 2012). La actividad de los inhibidores contra las amilasas (Cinco-Moroyoqui *et al.*, 2006) y proteasas (Osuna-Amarillas *et al.*, 2012) de *R. dominica* mostró una relación inversa en el número de prole supervivientes del insecto y sus niveles de actividad enzimática. Sin embargo, no se habían realizado estudios para determinar cómo *R. dominica* expresa la actividad enzimática de los supervivientes desarrollados en las mismas variedades de trigo.

El hecho de que la proteína esté significativamente más elevada en la prole Villa Juárez que en las progenies Kronstad y Borlaug merece atención. Estos resultados demuestran que los inhibidores de enzimas presentes en los granos de trigo ejercen una regulación de la cantidad y actividad de las enzimas de *R. dominica*, particularmente proteasas. Esta situación se ha observado con las isoenzimas de la amilasa de la polilla de la harina *Ephesia kuehniella* que son reguladas en larvas alimentadas con una dieta enriquecida con un inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa (Pytelkova *et al.*, 2009). Del mismo modo, las tres isoformas de  $\alpha$ -amilasa de *Zabrotes subfasciatus* se produjeron en mayores cantidades cuando las larvas fueron alimentadas con una dieta que contenía inhibidores de amilasas (Silva *et al.*, 2001). En cambio, Lopes *et al.* (2010) observaron que las cepas susceptibles a los insecticidas producían menos proteínas con actividad amilásica que las cepas resistentes a los insecticidas.

Los informes citados anteriormente evidencian que los insectos utilizan diferentes estrategias para hacer frente a la acción de los inhibidores enzimáticos. Según las cantidades de proteína, *R. dominica* sobreproduce las isoformas de proteasas existentes provocando un costo metabólico. Dado que los insectos adoptan varias estrategias para evitar los efectos de los inhibidores enzimáticos, entre las que se encuentra el aumento de la expresión de isoformas enzimáticas insensibles a los inhibidores (Zhu-Salzman *et al.*, 2003), como el caso de *H. armigera*, ya que, un estudio realizado por Kuwar *et al.* (2015) reportó una modificación en la expresión de serina proteasas ante la presencia del inhibidor de tripsina Kunitz (SKTI) en la dieta, demostrando que la expresión de tripsina disminuye y quimotripsina aumenta, esto como un mecanismo de defensa al inducir la expresión de enzimas insensibles a SKTI presente en la dieta del lepidóptero. Es posible que *R. dominica* pueda utilizar una estrategia de este tipo.

Sin embargo, y en contraste a los resultados anteriores, un resultado totalmente opuesto se observó cuando se realizó una correlación entre la actividad específica inhibitoria de los trigos con la actividad específica enzimática proteolítica de las progenies cultivadas en las distintas variedades de trigo del estudio. Este resultado se muestra en la Figura 23. Se puede observar que existe una correlación negativa (en promedio  $r = -0.8$ ) significativa entre ambos parámetros, tanto para la actividad proteolítica glicosilada y no glicosilada. Este resultado indica que la actividad proteolítica es dependiente en forma opuesta a la actividad específica inhibitoria. Ello sugiere, también, que las progenies de *R. dominica* son afectadas por los inhibidores de proteasas del grano de trigo de manera negativa afectando la actividad proteolítica de las progenies. Eso no significa necesariamente una menor expresión y síntesis de enzimas proteolíticas del tipo serina proteasa, sino que tal vez una fracción de la actividad total fue inhibida y no se logró detectar mediante el ensayo *in vitro*.



**Figura 23.** Relación gráfica entre la actividad específica inhibitoria de los trigos empleados para cultivar las progenies de *Rhizopertha dominica* y la actividad específica enzimática del tipo tripsina (A) glicosilada y (B) no glicosilada de las progenies emergidas de cada trigo.



Parece que, hasta cierto punto, la fracción de albúmina de trigo fue capaz de inhibir la actividad proteolítica del intestino medio, ya que, las progenies respondieron aumentando los niveles de proteasas glicosiladas llevando a cabo un aumento de hasta el 80 % de la presencia de proteasas insensibles a inhibidores en relación con la actividad proteolítica total. Un caso relacionado con estos resultados fue el de *Helicoverpa armigera* (Wu *et al.*, 1997) donde se observó una insensibilidad por parte de las proteasas contenidas en el intestino medio del gusano cogollero, reportando una disminución de aproximadamente el 13 % de la actividad en las larvas alimentadas con tabaco expresando GTPI (inhibidor de proteasa de taro gigante) o una dieta que contenga GTPI respecto a la actividad proteolítica total. Por otra parte, los ensayos de inhibición *in vitro* revelaron un aumento de hasta un 17 % de la actividad proteínica insensible a GTPI. No obstante, el cambio provocado por la glicosilación en las enzimas de *R. dominica* puede tener efectos diferentes, debido al tipo de molécula o el tipo de estudio realizado (*in vivo* o *in vitro*). Debido a lo anterior, es difícil determinar las funciones que el carbohidrato le confiere.

Por otro lado, cabe la posibilidad que los inhibidores de la actividad proteolítica ejercen un efecto represor de la expresión y síntesis de serina proteasas, de tal manera que un estudio de expresión de genes conduciría a elucidar esta interrogante que sería de utilidad para lograr obtener un mejor conocimiento de la(s) estrategia(s) que emplea *R. dominica* para alimentarse del grano de trigo y desarrollarse y reproducirse. Hasta nuestro conocimiento, no existen estudios avanzados como el que aquí se presentan sus resultados, relacionando la expresión genética con la actividad inhibitoria proteolítica de los trigos. Eso sería de gran utilidad dado que el trigo representa un cultivo de alto consumo a nivel mundial y las pérdidas por ataque de insectos se lograrían minimizar con estrategias derivadas de este tipo de estudios.

## CONCLUSIONES

### Etapa I

Con los resultados obtenidos en la purificación de los extractos enzimáticos de las progenies de *R. dominica* emergidas de las variedades Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, así como de los extractos de la fracción de albúmina de trigo, indican que existe la presencia de enzimas glicosiladas de distintos pesos moleculares en los extractos proteolíticos, mostrando un mayor contenido de bandas proteolíticas glicosiladas en la variedad Villa Juárez en comparación con las variedades Kronstad y Borlaug. Estos datos sugieren que *R. dominica* modula la expresión de las proteasas de manera diferente en cada progenie a partir del trigo donde se alimenta y desarrolla. De la misma forma, se confirmó que la fracción de albúmina de trigo ejerce un efecto inhibitorio ante los tres extractos proteolíticos, sin encontrar relación aparente entre la concentración de albúmina de los trigos respecto a la actividad proteolítica tipo tripsina, donde la actividad se inhibe un 23.33 %, 55.56 % y 74.44 %, en Villa Juárez, Kronstad y Borlaug, respetivamente. Sugiriendo que *R. dominica* utiliza la producción de enzimas glicosiladas para contrarrestar la inhibición causada por la albúmina presente en el trigo.

### Etapa II

De acuerdo con los datos mostrados, los extractos enzimáticos obtenidos a partir de las progenies de *R. dominica* emergidos de las variedades de trigo Villa Juárez, Kronstad y Borlaug mostraron una alteración en actividad proteolítica ante la presencia del agente reductor  $\beta$ -ME por lo cual se considera la presencia de puentes disulfuro intramoleculares en diferente proporción para cada una de las progenies, debido a la diferencia en el comportamiento de la actividad proteolítica. Estas enzimas conforman las estructuras no glicosiladas presentes en el intestino medio del insecto, y al comparar los parámetros cinéticos con las enzimas glicosiladas se observó que fueron menores que los valores correspondientes de las formas no glicosiladas. Igualmente, los valores de velocidad máxima  $V_{max}$  de la actividad proteolítica glicosilada fueron más elevados que en su contraparte no glicosilada en

todas las progenies. Como consecuencia, la eficiencia catalítica en proteasas glicosiladas en todas las progenies es catalíticamente más eficiente que las proteasas no glicosiladas, debido a que la energía de activación ( $E_a$ ) resultó ser menor en las proteasas glicosiladas, presentando valores porcentuales de  $V_{max}/K_m$  de 74 % (en el caso de la progenie de Villa Juárez) y hasta 97 % (en el caso de la progenie de Borlaug).

Por otro lado, el estudio a partir de la constante de inhibición arrojó datos que mostraron que la inhibición de todas las fracciones de albúminas utilizadas en el ensayo era de tipo competitivo, sin embargo, el exceso de sustrato, supera la inhibición competitiva permitiendo que las proteasas con valores de  $K_i$  más altos, en este caso, las proteasas no glicosiladas, permanezcan activas. Consecutivamente, se identificó que la actividad inhibitoria de los trigos empleados en el estudio ejerce un efecto inductor en la concentración de proteína glicosilada y no glicosilada, en contraste, con la actividad específica enzimática proteolítica de las progenies cultivadas en las distintas variedades de trigo del estudio que presenta una correlación negativa. Estos resultados demuestran que los inhibidores de enzimas presentes en los granos de trigo ejercen una regulación de la cantidad y actividad de las enzimas de *R. dominica*, particularmente proteasas.

## RECOMENDACIONES

Analizar los cambios bioquímicos en las proteasas digestivas glicosiladas en generaciones del insecto *R. dominica* para determinar si existen modificaciones relacionadas con en el número de población, contenido proteico y actividad proteolítica de las enzimas glicosiladas.

Determinar la posible secuencia polipeptídica de las enzimas glicosiladas para identificar los posibles puntos de glicosilación, así como identificar el tipo de carbohidratos que presentan con el objetivo de clasificar el tipo de glicosilación y elucidar completamente la función del carbohidrato presente en la estructura.

Determinar la expresión y síntesis de serina proteasa con el objetivo de responder a la interrogante sobre el efecto que ejerce ante la presencia de inhibidores de proteasa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Naby, M. A., Ahmed, S. A., Wehaidy, H. R., & El-Mahdy, S. A. (2017). Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 265–271. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.09
- Abdel-Naby, M. A., A. Ibrahim, M. H., & El-Refai, H. A. (2016). Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of *Bacillus pumilus* FH9 keratinase conjugated with activated pectin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 238–245. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.12.078
- Abdel-Naby, M. A., Fouad, A. A., & El-Refai, H. A. (2015). Catalytic and thermodynamic properties of glycosylated *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 132–137. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.01
- Adarkwah, C., Obeng-Ofori, D., Opuni-Frimpong, E., Ulrichs, C., & Schöller, M. (2019). Predator-parasitoid-host interaction: biological control of *Rhyzopertha dominica* and *Sitophilus oryzae* by a combination of *Xylocoris flavipes* and *Theocolax elegans* in stored cereals. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. doi:10.1111/eea.12760
- Araújo, R. A., Guedes, R. N. C., Oliveira, M. G. A., & Ferreira, G. H. (2008). Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, 44(4), 354–359. doi:10.1016/j.jspr.2008.03.006
- Badui, S. 2012. La ciencia de los alimentos en la práctica. México. Editorial: PEARSON. Pp: 172-173.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., & Woessner, J.F. 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes. San Diego, CA: Academic
- Belmar, R. y Nava, R. 2000. Factores antinutricionales en la alimentación de animales monogástricos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán y Centro Regional Universitario Península de Yucatán.
- Benítez-Burraco, A. 2005. Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Editorial Reverté, S.A. España.

- Bhattacharyya, A., Mazumdar Leighton, S., & Babu, C. R. (2007). Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145(4), 669–677. doi:10.1016/j.cbpc.2007.03.003
- Bourne-Murrieta, Luz R., Wong-Corral, Francisco J., Borboa-Flores, Jesús, & Cinco-Moroyoqui, Francisco J. (2014). Daños causados por el barrenador mayor de los granos *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: bostrichidae) en maíz y ramas de plantas silvestres. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 20(1), 63-75. doi:[10.5154/r.rchscfa.2013.03.008](https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.03.008)
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., & Gatehouse, J. A. (1997). Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(7), 625–638. doi:10.1016/s0965-1748(97)00043-x
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Brioschi, D., Nadalini, L. D., Bengtson, M. H., Sogayar, M. C., Moura, D. S., & Silva-Filho, M. C. (2007). General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1283–1290. doi:10.1016/j.ibmb.2007.07.016
- Burlingham, B. T., & Widlanski, T. S. (2003). An Intuitive Look at the Relationship of  $K_i$  and  $IC_{50}$ : A More General Use for the Dixon Plot. *Journal of Chemical Education*, 80(2), 214. doi:10.1021/ed080p214
- Edde, P. A. (2012). A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. *Journal of Stored Products Research*, 48, 1–18. doi:10.1016/j.jspr.2011.08.007
- Er, M. K., Işıkber, A. A., Aydin, F., Ücük, C., & Tunaz, H. (2018). *Rhyzopertha dominica* adult mortalities after exposure to indigenous *Beauveria bassiana* isolates from stored-grain pests: Effects of certain factors in sampling process. *Journal of Stored Products Research*, 77, 205–210. doi:10.1016/j.jspr.2018.05.003
- Camacho Casas, M.A., Figueroa López, P., Fuentes Dávila, G., Chávez Villalba, G., Peña Bautista, R. J., Valenzuela Herrera, V., Félix-Fuentes, J.L. y Mendoza Lugo, J.A. (2010).

- Kronstad F2004, nueva variedad de trigo harinero para el sur de Sonora. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 1 (1), 111-113.
- Carrero, J.M. y Planes, S. (2007). *Plagas de campo*. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 978-84-8476-326-0. Pág. 178.
- Chavez-Villalba, G., Camacho-Casas, M., Alvarado-Padilla, J., Huerta-Espino, J., Villaseñor-Mir, E., Ortiz-Monasterio, J. & Figueroa-López, P. (2021). Borlaug 100, variedad de trigo harinero para condiciones de riego del noroeste de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 44 (1): 123 – 125.
- Cinco-Moroyoqui, F. J., Díaz-Malvárez, F. I., Alanís-Villa, A., Barrón-Hoyos, J. M., Cárdenas-López, J. L., Cortez-Rocha, M. O., & Wong-Corral, F. J. (2008). Isolation and partial characterization of three isoamylases of *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(2), 153–160. doi:10.1016/j.cbpb.2008.02.008
- Chang, X., Xu, B., Bai, Y., Luo, H., Ma, R., Shi, P., & Yao, B. (2017). Role of N-linked glycosylation in the enzymatic properties of a thermophilic GH 10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* expressed in *Pichia pastoris*. *PLOS ONE*, 12(2), e0171111. doi:10.1371/journal.pone.0171111
- Chaquilla-Quilca, G., Balandrán-Quintana, R.R., Mendoza-Wilson, A. M., Mercado-Ruíz, J.N. 2018. Properties and application possibilities of wheat bran proteins. *Biotechnology and Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v12i2.883>
- Chen, C.-Q., Li, Z.-C., Pan, Z.-Z., Zhu, Y.-J., Yan, R.-R., Wang, Q., ... Chen, Q.-X. (2009). Inactivation Kinetics of Polyphenol Oxidase from Pupae of Blowfly (*Sarcophaga bullata*) in the Dimethyl Sulfoxide Solution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7), 2166–2174. doi:10.1007/s12010-009-8714-9
- Chen, H., Zhu, Y. C., Whitworth, R. J., Reese, J. C., & Chen, M.-S. (2013). Serine and cysteine protease-like genes in the genome of a gall midge and their interactions with host plant genotypes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8), 701–711. doi:10.1016/j.ibmb.2013.05.006
- Chen, Y.-Z., Tang, Y.-R., Sheng, Z.-Y., & Zhang, Z. (2008). Prediction of mucin-type O-glycosylation sites in mammalian proteins using the composition of k-spaced amino acid pairs. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 101. doi:10.1186/1471-2105-9-101

- Chittenden, F.H., (1911). The lesser grain borer and the larger grain borer. Bulletin of United State Bureau of Entomology 96, 29-47.
- Collins, P. J., Falk, M. G., Nayak, M. K., Emery, R. N., & Holloway, J. C. (2017). Monitoring resistance to phosphine in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, in Australia: A national analysis of trends, storage types and geography in relation to resistance detections. Journal of Stored Products Research, 70, 25–36. doi:10.1016/j.jspr.2016.10.006
- Daglish, G. J., & Nayak, M. K. (2018). Prevalence of resistance to deltamethrin in *Rhyzopertha dominica* (F.) in eastern Australia. Journal of Stored Products Research, 78, 45–49. doi:10.1016/j.jspr.2018.06.003
- Davis, C. W., Mattei, L. M., Nguyen, H.-Y., Ansarah-Sobrinho, C., Doms, R. W., & Pierson, T. C. (2006). The Location of Asparagine-linked Glycans on West Nile Virions Controls Their Interactions with CD209 (Dendritic Cell-specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin). Journal of Biological Chemistry, 281(48), 37183–37194. doi:10.1074/jbc.m605429200
- Delgado, Y., Morales-Cruz, M., Hernández-Román, J., Martínez, Y., & Griebenow, K. (2014). Chemical glycosylation of cytochrome c improves physical and chemical protein stability. BMC Biochemistry, 15(1), 16. doi:10.1186/1471-2091-15-16
- Dell'Aquila, A., Colaprico, G., Taranto, G., & Carella, G. (1983). Endosperm protein changes in developing and germinating *T.aestivum*, *T.turgidum* and *T.monococcum* seeds. *Cereal Research Communications*, 11(2), 107–113. <http://www.jstor.org/stable/23781475>
- Dutta, D., Mandal, C., & Mandal, C. (2017). Unusual glycosylation of proteins: Beyond the universal sequon and other amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(12), 3096–3108. doi:10.1016/j.bbagen.2017.08.025
- Evers, A. D., Blakeney, A. B., & O'Brien, L. (1999). Cereal structure and composition. *Aust. J. Agric. Res.* 50:629-650.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). Consultado 09-10-2019 en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). Materiales para capacitación en semillas – Módulo 6: Almacenamiento de semillas. Roma.



- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. *European Journal of Biochemistry*, 269(2), 397–412. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02656.x
- García-González, F., Gutiérrez-Benicio, G., Iturriaga, G., Raya-Pérez, J., Blanco-Labra, A., Ramírez-Pimentel, J., García-Gasca, T. y Aguirre-Mancilla, C. (2017). Biocontrol de insectos plaga: origen de las estrategias y tendencias actuales. *Biocontrol de insectos plaga*. Vol. 5, Núm. 2:1 – 10.
- Garza, M.C., & Taddei, C. (2016). Definición del mercado de trigo cristalino en el valle del Yaqui, México. *Economía: teoría y práctica*, (44), 193-215.
- Gil-Hernández, A., Ruíz-López, M.D. (2010). Tratado de nutrición. 2da. Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. España.
- Girón-Calle, J. (2005). Proteínas alimentarias y coloides de interés industrial. Universidad de Sevilla. ISBN 8447208842.
- Gholamzadeh Chitgar, M., Ghadamyari, M., & Sharifi, M. (2013). Identification and characterisation of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). *Plant Protection Science*, 49(No. 1), 19–26. doi:10.17221/55/2011-pps
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 12–30. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.011
- Goldstein, I. J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature* 66: 285-286.
- González-Ruiz, C.R., Del Toro-Sánchez, C.L., Cornejo-Ramírez, Y.I., Rodríguez-Félix, F., Wong-Corral, F.J., Márquez-Ríos, E., Cárdenas-López, J.L., & Cinco-Moroyoqui, F.J. (2021). Differential biochemical and kinetic properties of  $\alpha$ -amylases from *Rhyzopertha dominica* (F.) progenies reared on wheat varieties differing in  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *Journal of Stored Products Research*, 90, 101748.
- Goodrich, J.M. & Basu, N. (2012). Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. *Toxicol. In Vitro* 26, 630-635. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.02.005>.

- Guerreiro, I., Serra, C. R., Coutinho, F., Couto, A., Castro, C., Rangel, F., ... Enes, P. (2020). Digestive enzyme activity and nutrient digestibility in meagre (*Argyrosomus regius*) fed increasing levels of black soldier fly meal (*Hermetia illucens*). *Aquaculture Nutrition*, 27(1), 142–152. doi:10.1111/anu.13172
- Gullan, P. & Cranston, P. (2014). *The insects an outline of entomology*. 5th edition. John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-1-118-84615-5.
- Hansen, J. (1996). O-GLYCBASE: a revised database of O-glycosylated proteins. *Nucleic Acids Research*, 24(1), 248–252. doi:10.1093/nar/24.1.248
- Hassan, M. W., Sarwar, G., Farooqi, M. A., & Jamil, M. (2020). Extent and pattern of damage in wheat caused by three different species of storage insect pests. *International Journal of Tropical Insect Science*. doi:10.1007/s42690-020-00246-0
- 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), 145–159. doi:10.1016/j.abb.2004.07.022
- Hörger, A. C., & van der Hoorn, R. A. (2013). The structural basis of specific protease–inhibitor interactions at the plant–pathogen interface. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(6), 842–850. doi:10.1016/j.sbi.2013.07.013
- Howe, R. W. (1950). The development of *Rhyzopertha dominica* (Col., Bostrichidae) under constant conditions. *The Entomologists Monthly Magazine*, 86, 1-5.
- Jamal, F., Pandey, P. K., Singh, D., & Khan, M. Y. (2012). Serine protease inhibitors in plants: nature’s arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 1–34. doi:10.1007/s11101-012-9231-y
- Javed, M. R., Rashid, M. H., Nadeem, H., Riaz, M., & Perveen, R. (2008). Catalytic and Thermodynamic Characterization of Endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(3), 483–497. doi:10.1007/s12010-008-8331-z
- Jongsma, M. A., Bakker, P. L., Peters, J., Bosch, D., & Stiekema, W. J. (1995). Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 8041–8045. doi:10.1073/pnas.92.17.8041

- Jordán, F. (2012). El universo de los insectos. Ediciones Mundi-Prensa. España. ISBN: 978-84-8476-638-4.
- Juárez, Z.N., Bácnas-Pozos, M.E. y Hernández, L.R. (2014). El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas, Puebla.
- Julio, A. H. F., Gigliolli, A. A. S., Cardoso, K. A. K., Drosdoski, S. D., Kulza, R. A., Seixas, F. A. V., ... Lapenta, A. S. (2017). Multiple resistance to pirimiphos-methyl and bifenthrin in *Tribolium castaneum* involves the activity of lipases, esterases, and laccase2. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 195, 27–43. doi:10.1016/j.cbpc.2017.01.011
- Konarev, A. V. (1996). Interaction of insect digestive enzymes with plant protein inhibitors and host-parasite coevolution. *Euphytica*, 92(1-2), 89–94. doi:10.1007/bf00022833
- Kraut, J. (1977). Serine Proteases: Structure and Mechanism of Catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, 46(1), 331–358. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.
- Kuwar, S. S., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2015). Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 18–29. doi:10.1016/j.ibmb.2015.01.016
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Lam, P. V. N., Goldman, R., Karagiannis, K., Narsule, T., Simonyan, V., Soika, V., & Mazumder, R. (2013). Structure-based Comparative Analysis and Prediction of N-linked Glycosylation Sites in Evolutionarily Distant Eukaryotes. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(2), 96–104. doi:10.1016/j.gpb.2012.11.003
- Levy-De la Torre, V. A., Cinco-Moroyoqui, F. J., López-Zavala, A. A., Wong-Corral, F. J., & Martínez-Cruz, O. (2019). Mitochondrial response of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (F.) to modified atmospheres. *Journal of Stored Products Research*, 83, 338–346. doi:10.1016/j.jspr.2019.08.005

- Lis, H., & Sharon, N. (1993). Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *European Journal of Biochemistry*, 218(1), 1–27. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18347.x
- Lopes, K. V. G., Silva, L. B., Reis, A. P., Oliveira, M. G. A., & Guedes, R. N. C. (2010). Modified  $\alpha$ -amylase activity among insecticide-resistant and -susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Insect Physiology*, 56(9), 1050–1057. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.02.020
- Mahbobe, S., Moloud, G., Mohammad, G., and Maryam, A. (2012). Identification and characterization of midgut digestive proteases from the rosaceous branch borer, *Osphranteria coerulescens* Redtenbacher (Coleoptera: Cerambycidae). *Romanian Journal of Biochemistry*, 49(1):33-47.
- Marchesi, E. (1971). El trigo en el Uruguay. Universidad de la República.
- Martínez, M., Cambra, I., González-Melendi, P., Santamaría, M. E., & Díaz, I. (2012). C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 85–94. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01569.x
- Martinez, M., Cambra, I., Carrillo, L., Diaz-Mendoza, M., & Diaz, I. (2009). Characterization of the Entire Cystatin Gene Family in Barley and Their Target Cathepsin L-Like Cysteine-Proteases, Partners in the Hordein Mobilization during Seed Germination. *Plant Physiology*, 151(3), 1531–1545. doi:10.1104/pp.109.146019
- Markwick, N. P., Laing, W. A., Christeller, J. T., Mchenry, J. Z., & Newton, M. R. (1998). Overproduction of Digestive Enzymes Compensates for Inhibitory Effects of Protease and  $\alpha$ -Amylase Inhibitors Fed to Three Species of *Leafrollers* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 91(6), 1265–1276. doi:10.1093/jee/91.6.1265
- Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Mehrabadi, R., & Alizadeh, H. (2012). Inhibitory activity of proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors from Triticale seeds against *Eurygaster integriceps* salivary  $\alpha$ -amylases: Interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(3), 220–228. doi:10.1016/j.pestbp.2012.01.008
- Mehrabadi, M., Bandani, A.R., Saadati, F.S., & Mahmudvand, M. (2011).  $\alpha$ -Amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13, 1173-1182.

- Nagai, K., Ihara, Y., Wada, Y., & Taniguchi, N. (1997). N-Glycosylation is requisite for the enzyme activity and Golgi retention of N-acetylglucosaminyltransferase III. *Glycobiology*, 7(6), 769–776. doi:10.1093/glycob/7.6.769
- Njoroge, A. W., Mankin, R. W., Smith, B., & Baributsa, D. (2019). Effects of Hypoxia on Acoustic Activity of Two Stored-Product Pests, Adult Emergence, and Grain Quality. *Journal of Economic Entomology*, 112(4), 1989–1996. doi:10.1093/jee/toz110
- Oerke EC, Dehne HW & Schonbeck F, Weber, A. (1994). Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam, Elsevier.
- de la O, M., Espitia, E., López, H., Villaseñor, H. E., Peña, R. J., & Herrera, J. (2018). Calidad física de grano de trigos harineros (*Triticum aestivum* L.) mexicanos de temporal. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 3(2), 271–283. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i2.1462>
- Oppert, B., & Morgan, T. D. (2013). Improved high-throughput bioassay for *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research*, 52, 68–73. doi:10.1016/j.jspr.2012.11.001
- Oppert, B., Elpidina, E. N., Toutges, M., & Mazumdar-Leighton, S. (2010). Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 5(4), 280–287. doi:10.1016/j.cbd.2010.08.001
- Osuna-Amarillas, P. S., Cinco-Moroyoqui, F. J., Cárdenas-López, J. L., Ezquerro-Brauer, J. M., Sotelo-Mundo, R., Cortez-Rocha, M. O., ... Borboa-Flores, J. (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, 41–48. doi:10.1016/j.jspr.2012.06.005
- Perkin, L. C., Elpidina, E. N., & Oppert, B. (2016). RNA interference and dietary inhibitors induce a similar compensation response in *Tribolium castaneum* larvae. *Insect Molecular Biology*, 26(1), 35–45. doi:10.1111/imb.12269
- Peña-Bautista, R.J., Pérez-Herrera, P., Villaseñor-Mir, E., Gómez-Valdez, M.M., Mendoza-Lozano, M.A. y Monterde-Gabilondo, R. (2007). Calidad de la cosecha del trigo en México. Ciclo otoño-invierno 2005-2006. Publicación Especial del CONASIST. Av. Cuauhtémoc No. 1617. Mezzanine, Col. Sta. Cruz Atoyac, México, D.F. 24p.

- Pereira, Fernando A. (1993). Manual de manejo postcosecha de granos a nivel rural. Capítulo V. Conservación y protección de los granos almacenados.
- Priya, S., Kumar, S., Kaur, N., & Gupta, A. (2013). Specificity of  $\alpha$ -amylase and trypsin inhibitor proteins in wheat against insect pests. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 41(1), 49–56. doi:10.1080/01140671.2012.722112
- Pytelková, J., Hubert, J., Lepšík, M., Šobotník, J., Šindelka, R., Křížková, I., ... Mareš, M. (2009). Digestive  $\alpha$ -amylases of the flour moth *Ephestia kuehniella*- adaptation to alkaline environment and plant inhibitors. *FEBS Journal*, 276(13), 3531–3546. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07074.x
- Priya, S., Kaur, N., & Gupta, A. K. (2010). Purification, characterization and inhibition studies of  $\alpha$ -amylase of *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(2), 231–237. doi:10.1016/j.pestbp.2010.06.012
- Usha Rani, P., & Jyothsna, Y. (2010). Biochemical and enzymatic changes in rice plants as a mechanism of defense. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), 695–701. doi:10.1007/s11738-009-0449-2
- Reyes-Guzman, R., Borboa-Flores, J., Cinco-Moroyoqui, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Osuna-Amarillas, P. S., Wong-Corral, F. J., Ortega-Nieblas, M. M., & Leon-Lara, J. D. D. (2012). Insecticidal activity of essential oils from two eucalyptus species on *Rhyzopertha dominica* (coleoptera: Bostrichidae) and its effects on digestive enzymes of progenies. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 385–394. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.02.015>
- Reyes, G. E. & Olis Barreto, I. M. (2019). Producción de cereales en los países de la Alianza del Pacífico 1980-2017. *Espacios*, 40(6), 24. [10]. <https://revistaespacios.com/a19v40n06/a19v40n06p24.pdf>
- Roth, Z., Yehezkel, G., & Khalaila, I. (2012). *Identification and Quantification of Protein Glycosylation. International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, 1–10. doi:10.1155/2012/640923
- Rudd, P. M., Joao, H. C., Coghill, E., Fiten, P., Saunders, M. R., Opdenakker, G., & Dwek, R. A. (1994). Glycoforms modify the dynamic stability and functional activity of an enzyme. *Biochemistry*, 33(1), 17–22. doi:10.1021/bi00167a003

- Russell, D., Oldham, N. J., & Davis, B. G. (2009). Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydrate Research*, 344(12), 1508–1514. doi:10.1016/j.carres.2009.06.033
- Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(5), 802–823. doi:10.1002/mnfr.201200735
- Sánchez, M.T. (2003). *Procesos de elaboración de alimentos y bebidas*. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- Santamaría, M., Diaz-Mendoza, M., Diaz, I., & Martinez, M. (2014). Plant protein peptidase inhibitors: an evolutionary overview based on comparative genomics. *BMC Genomics*, 15(1), 812. doi:10.1186/1471-2164-15-812
- Santos, V. (2001). *No más problemas de salud causados por insectos*. Editorial Pax México librería de Carlos cesarman, S.A. México.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). Consultado 14-04-2020 en [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256434/B\\_sico-Trigo\\_Cristalino\\_y\\_Harinero.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256434/B_sico-Trigo_Cristalino_y_Harinero.pdf)
- Shafer, T. J., Meyer, D. A., & Crofton, K. M. (2004). Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. *Environmental Health Perspectives*, 113(2), 123–136. doi:10.1289/ehp.7254
- Scheys, F., Van Damme, E. J., Pauwels, J., Staes, A., Gevaert, K., & Smagghe, G. (2020). N-glycosylation site analysis reveals sex-related differences in protein N-glycosylation in the rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp.RA119.001823. doi:10.1074/mcp.ra119.001823
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2018). Consultado 03-10-2019 en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Silva, C. P., Terra, W. R., de Sá, M. F. G., Samuels, R. I., Isejima, E. M., Bifano, T. D., & Almeida, J. S. (2001). Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1. *Journal of Insect Physiology*, 47(11), 1283–1290. doi:10.1016/s0022-1910(01)00115-9

- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., ... Weiner, M. L. (2002). *Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment*. *Toxicology*, 171(1), 3–59. doi:10.1016/s0300-483x(01)00569-8
- Sotelo-Mundo, R. R., López-Zavala, A. A., Garcia-Orozco, K.D., Arvizu-Flores, A.A., Velázquez-Contreras, E.F., Valenzuela-Soto, E.M., Rojo-Dominguez, A. & Kanost, M.R. (2007). The Lysozyme from Insect (*Manduca sexta*) is a Cold-Adapted Enzyme. *Protein & Peptide Letters*, 14(8), 774–778. doi:10.2174/092986607781483688
- Sparks, T. C.; Nauen, R. (2015). Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol*, v. 121, p. 122-8. ISSN 0048- 3575.
- Spiro, R. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptides bonds. *Glycobiology* 12(4):43-56.
- Tramonti, A., Paiardini, A., Paone, A., Bouzidi, A., Giardina, G., Guiducci, G., ... Cutruzzolà, F. (2018). Differential inhibitory effect of a pyrazolopyran compound on human serine hydroxymethyltransferase-amino acid complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 653, 71–79. doi:10.1016/j.abb.2018.07.001
- Valenzuela-Herrera, V., Fuentes-Dávila G., Figueroa-López P., Chávez-Villalba G., Félix-Fuentes J. L., & Mendoza-Lugo, J. A. (2018). Villa Juárez F2009, variedad de trigo harinero para el noroeste de México. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 3(7), 1447–1451. <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i7.1351>
- Vandenborre, G., Smagghe, G., Ghesquière, B., Menschaert, G., Nagender Rao, R., Gevaert, K., & Van Damme, E. J. M. (2011). Diversity in Protein Glycosylation among Insect Species. *PLoS ONE*, 6(2), e16682. doi:10.1371/journal.pone.0016682
- Van der Hoorn, R. A., & Jones, J. D. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 400–407. doi:10.1016/j.pbi.2004.04.003
- Vázquez, C., Cos, A. y López, C. (2004). *Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico*. 2da. Edición. Editorial Díaz de Santos. Argentina.
- Wang, H., Li, S., Wang, J., Chen, S., Sun, X. L., & Wu, Q. (2018). N-glycosylation in the protease domain of trypsin-like serine proteases mediates calnexin-assisted protein folding. *eLife*, 7, e35672. <https://doi.org/10.7554/eLife.35672>



- Wei, Y. D., Lee, K. S., Gui, Z. Z., Yoon, H. J., Kim, I., Je, Y. H., ... Jin, B. R. (2006). *N-linked glycosylation of a beetle (Apriona germari) cellulase Ag-EGase II is necessary for enzymatic activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(6), 435–441. doi:10.1016/j.ibmb.2006.03.007
- Wielkopolan, B., Walczak, F., Podleśny, A., Nawrot, R., & Obrepalska-Stęplowska, A. (2015). Identification and partial characterization of proteases in larval preparations of the cereal leaf beetle (*Oulema melanopus*, Chrysomelidae, Coleoptera). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 88(3), 192–202. doi:10.1002/arch.21223
- Wiesch, P.S., Engelstder, J., & Bonhoeffer, S. (2010). Compensation of Fitness Costs and Reversibility of Antibiotic Resistance Mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2085–2095. doi:10.1128/aac.01460-09
- Wu, H.-H., Yang, M.-L., Guo, Y.-P., & En-bo, M.A. (2009). The Susceptibilities of *Oxya chinensis* (Orthoptera: Acridoidea) to Malathion and Comparison of the Esterase Properties from Three Collected Populations in Tianjin Area, China. *Agricultural Sciences in China*, 8(1), 76–82. doi:10.1016/s1671-2927(09)60011-0
- Zibae, A., Bandani, A. R., Fazeli-Dinan, M., Zibae, I., Sendi, J. J., & Maleki, F. A. (2011). A trypsin-like protease in rice green semi-looper, *Naranga aenescens moore* (Lepidoptera: Noctuidae): purification and characterization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 78(1), 1–16. doi:10.1002/arch.20435
- Zhou, Y., Ma, Y., Li, L., & Yang, X. (2019). Purification, characterization, and functional properties of a novel glycoprotein from tartary buckwheat (*Fagopyrum tartaricum*) seed. *Food Chemistry*, 125671. doi:10.1016/j.foodchem.2019.12567
- 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), 1053–1063. doi:10.1016/s0965-1748(99)00081-8
- Zhu, Y.-C., & Baker, J. E. (2000). Molecular cloning and characterization of a midgut chymotrypsin-like enzyme from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 43(4), 173–184. doi:10.1002/(sici)1520-6327(200004)43:4<173::aid-arch3>3.0.co;2-8

Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Salzman, R. A., Shade, R. E., & Ahn, J.-E. (2003). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 12(2), 135–145. doi:10.1046/j.1365-2583.2003.00395.x