

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS AGRARIAS, MENCIÓN PROTECCIÓN DE CULTIVOS

**“Identificación de proteínas candidatas inhibidoras de
proteasas con efecto insecticida sobre cochinillas harinosas
(Hemíptera, Pseudococcidae)”**

Área de Investigación:

Proteómica Vegetal

Autor:

Br. Garay Salas, Deivis Vicente

Jurado Evaluador:

Presidente: Dr. Milton Huanes Mariños

Secretario: Dr. Blanca Flor Robles Pastor

Vocal: Dr. Miguel Ángel Barandiarán Gamarra

Asesor:

Dr. Cabrera La Rosa, Juan Carlos
Código Orcid: 0000-0002-82363352

Trujillo, Perú

2022

Fecha de sustentación: 09/08/2022

La presente tesis ha sido revisada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Milton Huanes Mariños

PRESIDENTE

Dr. Blanca Flor Robles Pastor

SECRETARIO

Dr. Miguel Ángel Barandiarán Gamarra

VOCAL

Dr. Juan Carlos Cabrera La Rosa

ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres,
Beatriz y Vicente,
por su amor y apoyo incondicional,
por siempre creer y confiar en mí.

A mis hermanos,
porque siempre me brindaron su apoyo,
sin el cual no podría haber llegado hasta aquí;
Gracias Edith, Grober, Margot, Fredy y Roemer.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Carlos Cabrera, porque más que un gran maestro, es un gran amigo. Por enseñarme y ayudarme en cada paso para la realización de esta tesis. Su apoyo y confianza, dentro y fuera del laboratorio, serán siempre invaluableles.

Al grupo del Laboratorio de Proteómica, por ser un gran equipo y brindar siempre apoyo cuando se necesita. Las reuniones de laboratorio que servían para deliberar nuevas ideas y dar consejos cuando eran necesarios.

A la universidad por permitirme usar sus ambientes y laboratorios para realizar la tesis.

El financiamiento del presente trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo del CONCYTEC, a través del Proyecto 107-2015-FONDECYT-UPAO “Eficacia de inhibidores de proteasas obtenidos de plantas endémicas del Perú como control biológico de las cochinillas harinosas (Hemiptera, Pseudococcidae) que afectan al cultivo de vid *Vitis vinífera* en el departamento de Piura”.

RESUMEN

Las cochinillas harinosas (Hemíptera, Pseudococcidae) son plagas que afectan a la vid. Su difícil control obliga a la búsqueda de soluciones más efectivas incluyendo a los inhibidores de proteasas de plantas (IPPs). De una colección de proteínas de plantas endémicas de Perú del laboratorio de Proteómica, Enzimas y Metabolitos Activos de la Universidad Privada Antenor Orrego, se realizó una serie de corridas electroforéticas de SDS-PAGE para visualizar proteínas de bajo peso molecular. En base a estas proteínas, se realizó una revisión en las bases de datos de inhibidores de proteínas para identificar las proteínas candidatas inhibidoras. Se encontró que en la mayoría de las familias de plantas endémicas estudiadas se expresan proteínas con pesos moleculares similares a los inhibidores de proteasas de las bases de datos, siendo una de ellas el inhibidor de la proteína fosfatasa. En el estudio, las familias con el mayor número de proteínas de bajo peso molecular son Fabaceae y Campanulaceae. La presencia del inhibidor de la proteína fosfatasa en las muestras estudiadas nos indican una alta posibilidad de inhibición a la enzima digestiva fosfatasa alcalina de las cochinillas harinosas. Futuros trabajos deben enfatizar el análisis de estas proteínas de bajo peso molecular de Campanulaceae, Asteraceae, Fabaceae y Calceolariaceae.

Palabras clave: Cochinillas harinosas, inhibidores de proteasas, SDS-PAGE, plantas endémicas Perú

ABSTRACT

Mealybugs (Hemiptera, Pseudococcidae) are pests that affect the vine. Its difficult control forces the search for more effective solutions including plant protease inhibitors (PPIs). From a collection of proteins from endemic plants of Peru from the Proteomics, Enzymes, and Active Metabolites laboratory of the Antenor Orrego Private University, a series of SDS-PAGE electrophoresis was carried out to visualize low molecular weight proteins. Based on these proteins, a review of protein inhibitor databases was performed to identify candidate inhibitory proteins. It was found that in most of the endemic plant families studied, proteins with molecular weights similar to the protease inhibitors in the databases are expressed, one of them being the protein phosphatase inhibitor. In the study, the families with the highest number of low molecular weight proteins are Fabaceae and Campanulaceae. The presence of the protein phosphatase inhibitor in the studied samples indicates a high possibility of inhibition of the digestive enzyme alkaline phosphatase of mealybugs. Future work should emphasize the analysis of these low molecular weight proteins from Campanulaceae, Asteraceae, Fabaceae, and Calceolariaceae.

Keywords: Mealybugs, Plant Proteinase Inhibitors (PPIs), SDS-PAGE electrophoresis, Endemic plants of Peru.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. MARCO DE REFERENCIA	13
2.1. Marco Teórico	13
2.1.1. Generalidades de las cochinillas	13
2.1.2. Enzimas digestivas	15
2.2. Marco de Referencia.....	22
2.2.1. Efecto de inhibidores de proteasas en insectos	22
2.2.2. Enzimas digestivas de las cochinillas.....	26
2.2.3. Efecto de inhibidores de proteasas en cochinillas.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Materiales.....	29
3.1.1. Insumos	29
3.1.2. Reactivos.....	29
3.1.3. Equipos.....	29
3.1.4. Materiales de oficina.....	29
3.2. Metodología	30
3.2.1. Material vegetal y colección	30
3.3. Pasos preliminares.....	31
3.3.1. Extracción de proteínas:.....	31
3.4. Evaluación principal	33
3.4.1. Separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE	35

3.4.2.	Análisis de bases de datos de inhibidores de proteasas.....	35
3.4.3.	Análisis de los inhibidores de proteasas y las enzimas digestivas de las cochinillas.....	36
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1.	Identificación de proteínas candidatas por electroforesis en SDS-PAGE.....	37
4.2.	Análisis de las bases de datos de inhibidores de proteínas por familias botánicas.....	49
4.3.	Análisis de los inhibidores de proteasas y las enzimas digestivas de las cochinillas.....	56
V.	CONCLUSIONES	60
VI.	RECOMENDACIONES	61
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
IX.	ANEXOS.....	70
	Anexo 1. Protocolo de la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Familias de inhibidores de proteasas reportados en la base de datos Plant-PIs y su código en la base interpro modificado de (De Leo et al., 2002).....	19
TABLA 2. Características estructurales y mecanísticas de inhibidores de proteasas (Otlewski, Jelen, Zakrzewska, & Oleksy, 2005).	23
TABLA 3. Relación de plantas colectadas en el proyecto. Los extractos forman parte de la colección conservada en el laboratorio de Proteómica de la UPAO...	30
TABLA 4. Lista de muestras de plantas que se usaron con los respectivos buffers con los que se clarificaron.....	34
TABLA 5. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 30 min y con buffer TRIS por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.	39
TABLA 6. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 60 min y con buffer tris por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.	40
TABLA 7. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento con TCA 2.5% y con buffer tris por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.	41
TABLA 8. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento con TCA 5% y con buffer tris por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.	42
TABLA 9. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 30 min o clarificación con TCA 2.5% y con tres buffers (DTT, EDTA, TRIS) o agua, por medio de electroforesis sds-page al 15%.	43
TABLA 10. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con TCA 5% o extractos puros y ambos grupos con tres buffers (DTT, EDTA, TRIS), por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.	44

TABLA 11. Lista resumen de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en las plantas endémicas con cuatro métodos de clarificación y tres buffers (DTT, EDTA Y TRIS) de la electroforesis SDS-PAGE al 15%. 47

TABLA 12. Número de proteínas candidatas que corresponden a inhibidores de la fosfatasa y número total de proteínas inhibidoras de proteasas que se han hallado en las bases de datos. 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los Inhibidores de Proteasas. Obtenido de Shamsi et al. (2016).	18
Figura 2. Electroforesis en SDS-PAGE al 15% de proteínas de plantas. Donde: La columna L representa a la escalera y 2A: <i>Arnaldoa weberbaueri</i> , 4A: <i>Buddleja</i> sp.3, 6A: <i>Buddleja</i> sp.2, 8A: <i>Buddleja</i> sp.1, 10A: <i>Coreopsis</i> sp., 12A: <i>Coreopsis celendinensis</i> , 14A: <i>Coreopsis sherffii</i> , 16A: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i> , 18A: <i>Monnina conferta</i>)	37
Figura 3. Promedio de bandas proteicas menores a 42 kDa, obtenidas de las 14 especies estudiadas y agrupadas por familia. A las que se les aplico una electroforesis SDS-PAGE al 15%.	45
Figura 4. Inhibidores de proteasas totales (para todas las proteasas en general) que se encontraron en la búsqueda realizada en la base de datos de inhibidores.	49
Figura 5. Inhibidores de la proteasa fosfatasa por banda electroforética, halladas en las bases de datos de proteínas e inhibidores.	56
Figura 6. Rendimiento de inhibidores candidatas (Inhibidores de la fosfatasa) en relación al número de bandas proteicas obtenidas por cada familia de plantas endémicas.	59

I. INTRODUCCIÓN

Las cochinillas harinosas son plagas de gran importancia económica en la vid y que afectan de forma directa la producción de este cultivo, ya que se sitúan entre las bayas y, si se encuentran racimos afectados, esto impide su comercialización a mercados internacionales (Cordova, 2015). Las piezas bucales, son un par de estiletes con una cubierta protectora, que están diseñadas para alimentarse de la savia por medio de la perforación y succión (Chandler y Watson, 1999 citado por Moreno, 2011), que alcanzan los sistemas vasculares de la planta (raíces, tronco, hojas, racimos y peciolos) y pudiendo provocar indirectamente la muerte de la planta (Daane et al., 2012).

Estos insectos plagas causan daños por la succión de la savia, por medio de la inyección de una saliva fitotóxica, así como la transmisión de virus y, como consecuencia de su alimentación, secretan grandes cantidades de sustancias azucaradas que se conoce como mielecilla. Sobre esta mielecilla se desarrollan patógenos del complejo fumagina que cubren frutos, sarmientos, brotes, hojas, brazos y tronco; esto impide la captación de luz y manchan los racimos. Asimismo, atraídas por esa melaza, existen hormigas que actúan como diseminadoras altamente eficientes de las cochinillas (Cucchi y col., 2009 citado por Gonzales Luna y La Rossa, 2016).

Sus hábitos crípticos, la serosidad de su cutícula que recubre todo su cuerpo y la hace hidrófoba, la presencia de todos los estadios a lo largo del año, así como su presencia en distintos órganos de la planta; hacen que el control de las cochinillas sea difícil. Esto limita la acción de muchos de los plaguicidas utilizados comúnmente para su control (Soler, Scatoni y Núñez, 2001).

El presente trabajo de investigación tiene por finalidad la identificación de proteínas candidatas obtenidas de 14 plantas endémicas del Perú; colectadas de los Andes de La Libertad, Perú; que actúan como inhibidoras de proteasas. El producto final está dirigido a determinar inhibidores de proteasas ideales para ser utilizadas en el

bloqueo de enzimas digestivas de tres especies plaga de cochinillas (*Planococcus ficus*, *Planococcus citri* y *Paracoccus marginatus*).

II. MARCO DE REFERENCIA

Marco Teórico

2.1.1. Generalidades de las cochinillas

2.1.1.1. Características biológicas

El género *Planococcus* Ferris, tiene alrededor de 35 especies. No es fácil diferenciar a *Planococcus* de los otros géneros similares; de los cuales, 4 de ellos se encuentran muy relacionados debido a que la evolución de estos insectos ha sido marcado más por un factor de pérdida de características que la ganancia de las mismas (Cox, 1989). Una de las principales características diferenciales y que se usan para la identificación de sus especies es “*Todos los cerarios abdominales anteriores al lóbulo anal se emparejan con solo 2 setas cónicas y sin setas auxiliares delgadas, cada uno con solo 2 setas cónicas*” y las tres especies pertenecen a la clase Insecta, orden Hemiptera, familia Pseudococcidae, género *Planococcus* (Cox, 1989; Danzig & Gavrillov, 2010).

Son de tamaño pequeño, 2 a 4.5 milímetros, de cuerpo suave, ovoide, planos y cuerpo claramente segmentado. La característica principal de estos insectos es que tienen una capa cerosa de color blanco que cubre todo su cuerpo, en los adultos esta cera sobresale en los márgenes de todo el cuerpo una forma de espinas (filamentos) que pueden ser cortos o más largos dependiendo de la especie (Cox, 1989; Flint, 2016).

En el caso de *Planococcus citri* Risso, es comúnmente conocida como cochinilla harinosa de los cítricos, es una especie polífaga presente en casi todas las regiones zoogeográficas. Es una cochinilla de setas cortas

y de cuerpo blando, con diferenciaciones muy sutiles de sus pares del mismo género (COX, 1981). El ciclo de vida puede variar de acuerdo a la temperatura, siendo que entre 24 a 30°C puede completar su ciclo biológico en 21 a 37 días, respectivamente; la hembra puede ovipositar hasta 600 huevos (N. Ahmed & Abd-Rabou, 2010; Asiedu, Afun, & Kwoseh, 2014). Las condiciones para su desarrollo y la distribución de los sexos está fuertemente influenciada por las condiciones ambientales y principalmente la fuente de alimentación que pueda tener (Ross, Dealey, Beukeboom, & Shuker, 2011).

Planococcus ficus (Signoret), también es conocida como cochinilla harinosa de la vid, comparte características visibles muy similares con las otras especies del mismo grupo (especialmente *P. citri*). Algunas de sus características observables que presentan es su cuerpo oblongo, la capa blanca cerosa y los filamentos, característica de las cochinillas. Los filamentos en este caso son más cortos y parecen un poco más gruesos que las otras especies de *Pseudococcus* (Cox, 1989; University of California, 2015). El tamaño promedio es de 4 mm de largo, 2 mm de ancho y 1.5 de grosor (Walton & Pringle, 2017); las temperaturas en las que se desarrolla son entre 24 a 30 °C, completando su ciclo entre 24 a 45 días, respectivamente; estos periodos pueden variar de acuerdo al hospedero e incluso el cultivar (Gonzales Luna & La Rossa, 2016).

Paracoccus marginatus Williams & Granara de Willink, es también una cochinilla harinosa, conocida como la cochinilla de la papaya. La hembra adulta tiene el cuerpo de color amarillo, está cubierto de una capa cerosa de blanca, la cual no es lo suficientemente gruesa como para cubrir el color amarillo de su cuerpo, el ovisaco se desarrolla debajo o detrás de la hembra adulta (Miller & Miller, 2002). *P. marginatus* se reproduce sexualmente y la hembra adulta puede llegar a tener un tamaño aproximado de 2.5 mm de largo y 1.5 mm de ancho (Muniappan et al., 2008). El ciclo de vida de esta cochinilla puede variar de acuerdo a las

condiciones ambientales a las que está expuesta, siendo desde 27 a 41 días con temperaturas promedio de 18 a 30°C, respectivamente, alcanzando la mayor tasa de reproducción a los 25°C (alrededor de 300 huevos) (Amarasekare, Chong, Epsky, & Mannion, 2008; Seni & Sahoo, 2014).

2.1.1.2. Forma de alimentación

Las cochinillas se alimentan básicamente de floema, utilizan sus piezas bucales largas y delgadas para aspirar los fluidos de las plantas; la mayoría de las cochinillas se pueden alimentar de la raíz, tronco, ramas, hojas y racimos (Daane et al., 2012). Aunque se alimentan de floema, aún no está claramente definido cómo es que encuentran los tubos cribosos (por donde se conduce el floema), pero se probablemente se guían por estímulos físico-químicos; muestran un comportamiento típico de penetración extracelular con secreciones salivales que serían las que conducen a hallar los vasos del floema, ya que la saliva lleva las enzimas y estímulos gustativos de estos insectos ayudando al estilete a la penetración de la corteza (Calatayud, Rahbé, Tjallingii, Tertuliano, & Le Rü, 1994). El papel de las enzimas generadas en la saliva también es importante en la fisiología nutricional de los insectos en general, ya que su fisiología está relacionada con el tipo de comida ingerida. Las cochinillas generalmente tienen una forma de alimentación típica de introducción extracelular con secreciones salivales que inducen daño y probablemente guían los estiletes hacía los vasos del floema. El tiempo mínimo que necesitan para hallar una célula es de 1.5 horas en plantas hospederas y hasta 2.8 en plantas no hospederas; una vez que encuentra las células del floema realizan picaduras de 20 segundos, y pueden realizar hasta 15-20 picaduras en una hora (Calatayud & Le Rü, 2006; Calatayud, Rahbé, Tjallingii, et al., 1994)

2.1.2. Enzimas digestivas

2.1.2.1. Inhibidores de proteasas

Las proteasas sirven como mediadores catalíticos para muchos procesos dentro de la mayoría de organismos vivos, tal es que, en organismos superiores, representan cerca del 2% del genoma total y 1-5% en organismos infecciosos. A pesar de su importancia y necesidad en todos los organismos vivos, si ocurre una sobreexpresión o se presenta en altas concentraciones, puede causar graves daños al organismo. Es por esta razón que, a pesar de que se puede tener algunos mecanismos de regulación y control, existen proteínas capaces de inhibir la actividad enzimática, llamados Inhibidores de proteasas (IPs) (Habib & Fazili, 2007; Shamsi, Parveen, & Fatima, 2016).

Los inhibidores de proteasas actúan como método de control de la actividad proteolítica de las proteasas objetivo o como mecanismo de defensa, bloqueando otras proteasas; son moléculas proteicas de bajo peso molecular, generalmente se les halla en una alta concentración en tejidos de almacenamiento (hasta el 10% del total de proteínas), pero también en otras estructuras de la planta. Los IP de plantas son un grupo heterogéneo que incluye proteínas (>15 kDa) como las serpin, fitocistatinas, inhibidores de Kunitz, así como péptidos (<15 kDa), como los inhibidores de Bowman-Birk (BBI), tripsina α -amilasa, inhibidores de tipo mostaza, del tipo papa I y papa II, inhibidores de metalocarboxipeptidasa de papa, calabaza e inhibidores de ciclotidos (Alonso et al., 2013; De Leo et al., 2002; Hellinger & Gruber, 2019). Aunque los IPs son proteínas pequeñas que contienen un solo dominio de inhibición, no es raro que puedan tener dos o más unidades de inhibición, algunos incluso pueden tener hasta 15 dominios de inhibición en tándem; a estos IPs se les denomina multifuncionales, las cuales tienen diferentes modos de actuar (inhibir) a las proteasas (Grosse-Holz & Van der Hoorn, 2016; Habib & Fazili, 2007; Zhu-Salzman & Zeng,

2015). Grosse-Holz & van der Hoorn (2016) clasifican estos IPPs en tres clases características, el primero es la de doble cabeza del tipo Jano, son proteínas con dos caras inhibitorias coincidiendo con distintos objetivos; el segundo es el tipo proteínas multidominio, algunas proteínas que se han diversificado con respecto a una especificidad, mientras otras como la cisteína macrocíclica que puede realizar funciones inhibitorias o no inhibitorias; el tercer tipo está representado por las serpin y α -macroglobulinas, estos inhibidores actúan como una trampa de ratas que inhiben diferentes proteasas por un drástico cambio conformacional uniéndose a la proteasa objetivo.

Por esta razón los IPs están siendo cada vez más estudiados y existe un gran interés en poder usarlos en programas de mejoramiento genético tanto para una mejor productividad de las mismas plantas y en aspectos de la salud humana para contrarrestar enfermedades del tipo infeccioso y viral. En agricultura se busca que una mayor y más eficiente producción de IPs y el uso de las misma como herramienta en el control integrado de las plagas, de tal manera que su uso permita un manejo de los cultivos sustentablemente y ambientalmente amigable (Alonso et al., 2013; Grosse-Holz & Van der Hoorn, 2016; Ryan, 1990; Shamsi et al., 2016; Zhu-Salzman & Zeng, 2015).

2.1.2.2. Clasificaciones

Anteriormente existía más que solo una forma de clasificar a los inhibidores de proteasas y era un tema aún en discusión, inicialmente la clasificación contenía 48 familias de IPs que podían agruparse en 26 superfamilias, con base en su estructura; así también, se podían clasificar de acuerdo al tipo de proteasa que podían inhibir, pero esto no resulto adecuado al descubrirse IPs que podían bloquear a más de un tipo de proteasa (Habib & Fazili, 2007; Lawrence & Koundal, 2002).

Actualmente también se les puede clasificar de acuerdo a su modo de acción o el tipo de proteasa que inhiben. En la figura 1 se describen las familias más importantes, sus características y sus funciones. Según MEROPS (base de datos que almacena proteasas e IPs) existen alrededor de 82 familias de IPs que se han clasificado por homología de secuencia y se han subdividido en 39 clanes según las similitudes de la estructura secundaria y terciaria, así como la función inhibidora (Hellinger & Gruber, 2019; Shamsi et al., 2016).

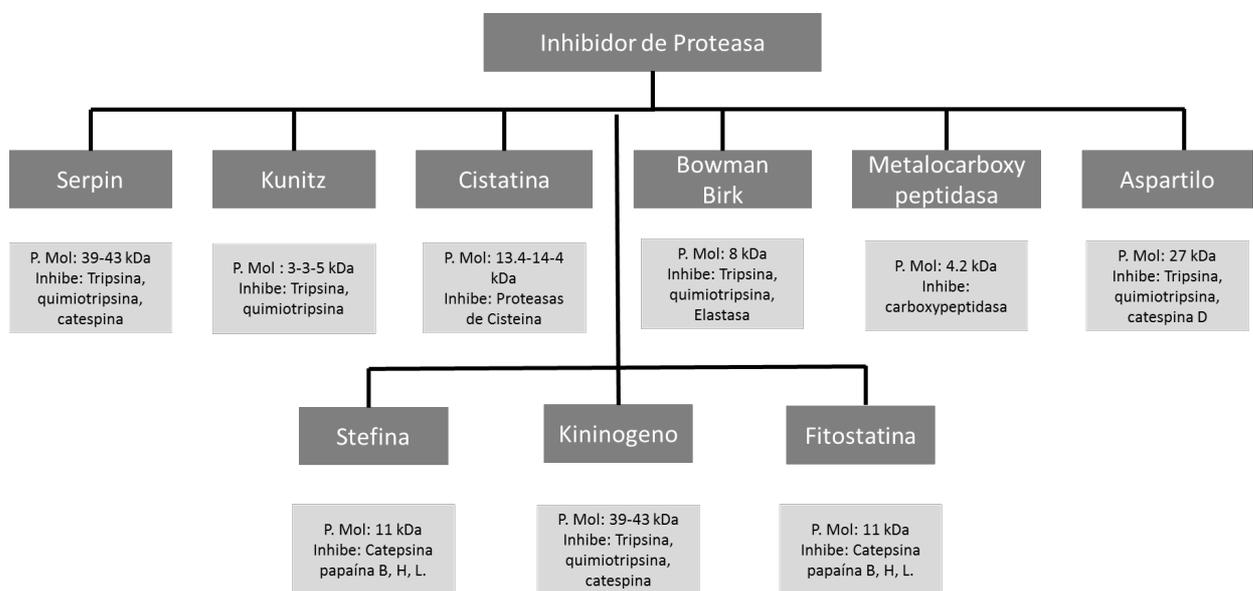


Figura 1. Clasificación de los Inhibidores de Proteasas. Obtenido de Shamsi et al. (2016).

La gran cantidad de datos secuencias de ácidos nucleicos o peptídicas, sobre la actividad, estructura y análisis de mutaciones concernientes a los IPs de plantas ha dado pie a que se genere una base de datos en la nube que almacena estos datos descartando los otros tipos de inhibidores de proteasas (ej. de origen animal). En la tabla 1 se puede ver la lista de familias de IPPs que alberga esta base de datos (<http://bighost.area.ba.cnr.it/srs/>) (De Leo et al., 2002).

Tabla 1. Familias de Inhibidores de Proteasas reportados en la base de datos PLANT-PIs y su código en la base InterPro Modificado de (De Leo et al., 2002)

Familia del Inhibidor de Proteasas	Código PLANT-PIs	Código en InterPro
Inhibidor de serino proteasa Bowman–Birk	BBI	IPR000877
Inhibidor de cereal tripsina/ α -amilasa	BRI	IPR001768
Inhibidor de proteinasa cisteína	CYS	IPR000010
Inhibidor metalocarboxypeptidasa	MCI	No disponible
Inhibidor de tripsina de mostaza	MSI	No disponible
Inhibidor tipo I de papa	PI1	IPR000864
Inhibidor de proteinasa tipo II de papa	PI2	IPR003465
Serpino	SPI	IPR000215
inhibidor de tripsina de soya (Kunitz)	KNI	IPR002160
inhibidor de tipo Squash	SQI	IPR000737

2.1.2.3. Mecanismo de acción

Si bien las enzimas cumplen un papel importante, una sobreexpresión podría ser muy dañino para el huésped, es por esta razón que los IPs tienen un papel igual de importante en la regulación de las proteasas, inhibiendo parcialmente su actividad o inactivando completamente su

expresión. En el caso de las plantas las respuestas defensivas inducidas hacia los patógenos o insectos son activados durante la fase temprana de la infección/ataque, actuando como proteínas anti-metabólicas, interfiriendo con el proceso digestivo, actuando efectivamente contra los fitófagos y microorganismos (Habib & Fazili, 2007; Ryan, 1990).

Los mecanismos de inhibición de los IPPs varían de inhibidor a inhibidor y de la proteasa que están inhibiendo, los mecanismos de inhibición que se presentan a continuación tratan de agrupar de acuerdo en su mecanismo de acción:

A. Inhibidores competitivos

La mayoría de los IPs son inhibidores competitivos. El mecanismo de inhibición más estudiado es el mecanismo de Laskowski que corresponde a las serin proteasas que incluyen la familia de inhibidores Kazal, Kunitz y Bowman-Birk. El mecanismo estándar inserta un bucle en el sitio activo de la proteasa que es complementario a la especificidad del sustrato de la proteína objetivo y se une en una lámina beta extendida con la enzima en una forma similar al sustrato (Farady & Craik, 2010). En este tipo de mecanismo de inhibición, la interacción proteasa-inhibidor induce la escisión de un enlace peptídico interno en la estructura del inhibidor, desencadenando un cambio conformacional. Esta reacción no es reversible, y el inhibidor nunca recupera su estructura inicial. Por esta razón, los inhibidores que participan en las reacciones de atrapamiento también se conocen como inhibidores suicidas (Clemente et al., 2019).

B. Inhibición competitiva con unión exosite

La unión exosite proporciona dos beneficios principales; aumenta el área de superficie de la interacción proteína-proteína, lo que conduce a una mayor afinidad, y puede tener un efecto significativo sobre la especificidad del inhibidor. Para algunos IPs, mientras que el dominio N-terminal se une e inhibe a través del mecanismo estándar, el segundo dominio de tipo Kazal ha evolucionado para unirse al exosito I en la trombina. Las afinidades de unión de los dominios individuales son más o menos aditivas y una especificidad por la trombina. Por lo tanto, el inhibidor gana potencia y especificidad a partir de la unión al exosito. En contraste existen otros IPs que utilizan sus exosito para proporcionar energía de unión y ampliar la promiscuidad del inhibidor y proteger a las bacterias de las proteasas del huésped. Un tercer caso, la calpastatina libre que es intrínsecamente desestructurada, pero al unirse a la calpaína, el polipéptido forma tres hélices, cadenas a través de la superficie de la enzima y se une en el sitio activo de la proteasa para actuar como un inhibidor competitivo, que es aproximadamente 3 veces el área de superficie inhibidores de proteasas de mecanismo estándar (Farady & Craik, 2010; Grosse-Holz & Van der Hoorn, 2016).

C. Inhibición irreversible

También se les llama sustratos suicidas, este tipo de inhibición dependiente de la actividad, es poderosa y fundamentalmente diferente de los mecanismos competitivos descritos anteriormente; el inhibidor actúa como sustrato, luego utiliza la maquinaria catalítica de las enzimas para atrapar y luego inhibir la enzima. Estos tipos de inhibidores, que aprovechan la actividad catalítica de una proteasa para atrapar e inhibir la enzima, son inhibidores eficaces y potentes responsables de proteger al organismo de la actividad proteolítica aberrante de una amplia gama de proteasas. Por lo tanto, tienden a ser relativamente inespecíficos ya que, debido a la naturaleza reactiva de la cabeza nuclear, y las similitudes mecanicistas y estructurales que muestran las familias de

proteasas, la especificidad absoluta es difícil de lograr (Clemente et al., 2019; Farady & Craik, 2010).

Marco de Referencia

2.1.3. Efecto de inhibidores de proteasas en insectos

Varios y diversos estudios se han llevado a cabo con el fin de determinar la composición del intestino de los insectos, sobre todo de aquellos que se alimentan de plantas. Esto, para conocer mejor sus sistemas y en base a esto hallar algún método de control. Un caso es el aislamiento del intestino de los insectos (12 especies de lepidópteros en 5 familias) confirmaron la presencia de varios tipos proteasas, las mismas que son susceptibles a los inhibidores de proteasas enfrentados en el estudio. Esto demuestra los diferentes mecanismos de acción que pueden suscitarse en el intestino de los artrópodos. Para determinar las proteasas presentes en el intestino de los insectos, se han hecho pruebas de aislamiento del intestino, tomando todas las enzimas que se puedan encontrar allí presentes, para luego hacer estudios con inhibidores específicos y determinar cuáles responden inhibiendo estas enzimas de los fitófagos (Christeller, Laing, Markwick, & Burgess, 1992; Habib & Fazili, 2007; Lawrence & Koundal, 2002).

Los IPPs no inhiben proteasas vegetales endógenas, al contrario, tienen especificidad para las enzimas de origen animal y microbiano. Esto se ha demostrado en pruebas *in vitro* usando dietas artificiales (Sharma, 2015).

Los estudios en larvas de lepidópteros y algunos coleópteros muestran que el consumo de IPPs reduce el peso, tamaño de larva y pupa, la población e induce la mortalidad de las larvas, así mismo, la efectividad de estos IPPs puede variar de acuerdo a la planta y órgano del cual se

extraen (Abd El-latif, 2014; Dastranj, Bandani, & Mehrabadi, 2013; Stevens et al., 2013).

Tabla 2. Características estructurales y mecánicas de inhibidores de proteasas (Otlewski, Jelen, Zakrzewska, & Oleksy, 2005).

Tipo de Proteasa	Inhibidor	Muestras ejemplo	Característica inhibitoria	Peso molecular
Serino	Inhibidores canónicos	BPTI, OMTKY3, eglin c, CMTI I	A menudo, interacción no covalente extremadamente estrecha y rápida que semeja al complejo de Michaelis, bloqueando en forma directa el sitio activo, sin cambios conformacionales, hoja b antiparalela entre la enzima y el inhibidor.	3 - 21 kDa por dominio
	Inhibidores no canónicos	Hirudin, TAP, ornitodorrin	Interacción sumamente rápida, fuerte, y específica hasta ahora conocida solo para el factor Xa y la trombina, cinética de dos pasos. Que inhibe el sitio activo a través del terminal-N del inhibidor.	6-8 kDa por dominio
	Serpina	α -1-antitripsina, antitrombina	Complejo covalente acil-enzima irreversible, mecanismo de trampa para ratones, enormes cambios conformacionales en el inhibidor, papel importante de la posición P1, inhibición suicida, alteración del sitio activo de la proteasa.	-55 kDa

Cisteína	Cistatinas	Cistatina	Inhibición extremadamente estrecha de pollo, pero no específica, reversible y no covalente, interacción a través de C, stefin B, horquilla y N-terminal, Cys25 catalítica accesible en interacciones complejas e importantes por medio de la posición P2.	11-13 kDa, hasta 60-120 kDa (quininógeno)
	Tiropinas	p41, equistatina	Inhibición estricta fuerte, acción semejante a las cistatinas, aunque más específico, inhibición inusitada de cisteína y aspártico proteasas en diferentes dominios de equistatina.	7 kDa por dominio
	Inhibidores bromelicos	BI-VI	Inhibición medianamente fuerte a pH bajo y a pH neutro no hay inhibición, similitud estructural con los inhibidores canónicos de la familia Bowman-Birk.	6-8 kDa
	IAP	XIAP, cIAP1	Inhibición fuertemente específica, unión estrecha reversible, inhibición también entre dominios como unión no productiva.	9 kDa por dominio
		CrmA, PI-9	Inhibición fuertemente específica, similar a la inactivación basada en el mecanismo de serpina.	38 kDa
		P35	Inhibición inespecífica, acil-enzima inalterable, distorsión del sitio activo, p35 N-terminal protege a la Cys360 catalítica de las moléculas de agua,	35 kDa

		cambios estructurales importantes en el inhibidor.	
Metalo	PCI, LCI	Estrecho complejo enzima-producto, inhibición por medio del segmento C-terminal, función clave de Val38 (P1), sin cambios conformacionales en el inhibidor tras la complejación.	4 kDa
	SMPI	Inhibidor medianamente específico, forma de inhibición similar al mecanismo estándar de los inhibidores canónicos de serina proteasas, inhibición temporal.	11 kDa
	Inhibidor de <i>P. aeruginosa</i> , Inhibidor de <i>E. chrisantemi</i>	Se observó inhibición tanto fuerte como débil, interacciones principales a través de cinco residuos N-terminales, el grupo amino N-terminal forma un enlace coordinativo con el Zn catalítico, en analogía con los TIMP.	15 kDa
	TIMP1 - 4	Interacción no covalente estrecha pero no muy específica, N-terminal y cinco bucles inhibidores forman una cuña en contacto con el sitio activo, coordinación bidental de Zn catalítico a través del N-terminal, interacciones importantes a través del residuo P10.	20-22 kDa
Aspártica	IA3	Un tipo de inhibición fuerte, altamente específico y completamente único,	8 kDa

completamente extendido en estado libre, forma una larga hélice con el N-terminal del inhibidor, complejo no covalente.

PI3 Hoja b antiparalela fuerte pero no muy específica formada entre la enzima y el inhibidor, sin cambios conformacionales. 17 kDa

ITPB: inhibidor de tripsina pancreática bovina; OMTKY3: tercer dominio ovomucoide de pavo; CMTI I: inhibidor 1 de tripsina de Cucurbita maxima; TAP: péptido anticoagulante de garrapatas; BI-VI, inhibidor de bromelina VI de piña; IAP: inhibidor de la apoptosis; XIAP: IAP ligado a X; cIAP1: inhibidor celular de la proteína 1 de apoptosis; BIR: repetición de IAP baculoviral; CrmA: modificador A de la respuesta de citocinas; PI-9: inhibidor de proteasa 9; PCI: inhibidor de la carboxipeptidasa de patata; ICS: inhibidor de la carboxipeptidasa de sanguijuela; IMPS: inhibidor de metaloproteasas proteináceas de Streptomyces; ITMP: inhibidores tisulares de metaloproteasas; IA3: inhibidor de proteasa aspártica de levadura; PI-3, inhibidor de la pepsina Ascaris suum 3.

2.1.4. Enzimas digestivas de las cochinillas

De los estudios realizados en el intestino de los insectos picadores chupadores para determinar su composición y funcionamiento (Rahbé, Sauvion, Febvay, Peumans, & Gatehouse, 1995), las proteasas halladas en el intestino de las cochinillas o enzimas peptídicas, reportadas hasta ahora, ha sido la leucina aminopeptidasa; y las enzimas fosfatasa alcalina y la esterasa (Calatayud & Le Rü, 2006). Indicando que la dieta principal de las cochinillas son aminoácidos libres y compuestos secundarios del floema (Calatayud, Rahbé, Delobel, et al., 1994).

Las esterases forman parte importante de las estructuras de los insectos; ya sea en su formación corporal, metabolismo de hormonas, feromonas y componentes de otras funciones que se están estudiando; como es el caso de las esterases halladas en el intestino de las

cochinillas; así mismo se reporta que estas enzimas actuarían en la defensa contra interferentes o algunos tipos de insecticidas. El peso molecular de las esterasas puede variar entre los 22 – 65 kDa para la mayoría de ellas (Akoh, Lee, Liaw, Huang, & Shaw, 2004; Gilbert & Gill, 2010; Grizanova, Krytsyna, Surcova, & Dubovskiy, 2019; Sanburg, Kramer, Kezdy, Law, & Oberlander, 1975).

Las leucina aminopeptidasas (LAP) son parte del grupo de exopeptidasas que catalizan para quitar un aminoácido del terminal N de una proteína (Burley, David, Taylort, & Lipscomb, 1990). Existen diferentes variantes de LAP, desde la composición de la quitina, el esperma en moscas y formando parte de las estructuras del intestino de los insectos. Así como su variedad, es igual el tamaño que se puede encontrar dependiendo del tipo de LAP, que va desde los 52 hasta los 324 kDa en la composición de algunos insectos. En algunos insectos, cuando esta proteína se encuentra en el intestino puede ser la puerta para un control con una enzima o un inhibidor (Drinkwater, Malcolm, & McGowan, 2019; Kaur, Agrawal, & Bhatnagar, 2007; Liew, Tay, & Puthuchear, 2013; Rawlings, Barrett, & Bateman, 2012; Walker, Geer, & Williamson, 1980).

Otros estudios respaldan la idea de que las alcalino peptidasas (ALP) serían receptores de toxina proteicas, cuya expresión alterada está asociada con la unión reducida de las toxinas (proteicas) en el intestino medio de las larvas de *S. frugiperda* resistentes a estas. El peso de la ALP presente en este lepidoptero es de 59 kDa y otros lepidópteros entre 50 – 120 kDa, pero pueden variar en un rango mayor llegando hasta 360 kDa (Jakka et al., 2016; Teodoro Rezende et al., 2017; The Uniprot Consortium, 2019; Yuan et al., 2016; Zhao et al., 2017).

En conjunto, estas son las tres enzimas halladas que jugarían un rol importante para el desarrollo de alguna fórmula de control orientada hacia el intestino de las cochinillas.

2.1.5. Efecto de inhibidores de proteasas en cochinillas

Para el caso de las cochinillas, se han reportado estudios hechos sobre el desarrollo, sobrevivencia, peso del cuerpo y fecundidad de algunas especies (*Phenacoccus solenopsis* y *Planococcus citri*). Para estas especies, al momento de ser expuestas a plantas que presentan ciertos compuestos insecticidas, producto de extractos de *Azadirachta indica*, *Buxus sempervirens* y *Allium cepa*, los resultados muestran que existe cierta actividad enzimática y de control, pero no se reportan exactamente los inhibidores que estarían realizando esta acción (M. Ahmed et al., 2017; Fayyaz-ur-Rehman, Tariq, Aslam, Khadija, & Iram, 2009), en otros estudios realizados en estas mismas especies de cochinillas en el que la fuente de alimentación eran plantas transgénicas que codifican genes de inhibidores (inhibidores de tripsina del caupí) y otras proteínas no asociadas como inhibidores, muestran que la cochinilla puede alimentarse de ellas sin verse afectada; así mismo, también sugieren que esto puede deberse al tipo de alimentación de esta plaga, es decir, no se alimenta directamente las hojas (donde se encuentran estos compuestos en mayor medida), sino que se alimentan de la savia, principalmente floema (Wu et al., 2014; Zhang, Huang, Zhang, Wei, & Lu, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

3.1.1. Insumos

Hojas y tallos de plantas endémicas colectadas de los Andes de La Libertad, que mediante un proceso de extracción y clarificación forman parte de la colección de proteínas del laboratorio de Proteómica, Enzimas y Metabolitos Activos de la Universidad Privada Antenor Orrego.

3.1.2. Reactivos

Tris, acetona al 100%, metanol al 100%. BSA (albúmina de suero bovino), DTT (Ditiotreitol), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida), PVPP (polivinilpolipirrolidona), SDS (Dodecilsulfato sódico), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina), TCA (ácido tricloroacético).

3.1.3. Equipos

Centrífuga refrigerada, maquina electroforética vertical 2-D para proteínas (BioRad EE. UU.), congeladora de -40 °C, pipetas calibradas de 10, 200 y 1000 µl., incubadora térmica y microcentrífuga.

3.1.4. Materiales de oficina

Computadora de escritorio y cuaderno de laboratorio.

Metodología

3.1.5. Material vegetal y colección

El material vegetal fue colectado previamente por parte del equipo del Proyecto Nº 107-2015-FONDECYT-UPAO. La colección se realizó en los Andes de La Libertad en un viaje de expedición con el especialista botánico para la identificación correcta de las especies. Una vez en el laboratorio, se procedió a realizar extractos de cada uno y se conservaron como parte de la colección del laboratorio de Proteómica, Enzimas y Metabolitos Activos a -40°C.

Tabla 3. Relación de plantas colectadas en el proyecto. Los extractos forman parte de la colección conservada en el laboratorio de Proteómica de la UPAO.

Familia	Especie	Endémica	Forma vegetal	Parte colectada
Asteraceae	<i>Arnaldoa weberbaueri</i> (Muschl.) Ferreyra	Si	Arbusto espinoso	Tallos y hojas
	<i>Barnadesia hutchinsoniana</i> Ferreyra	Si	Arbusto espinoso	Tallos y hojas
	<i>Coreopsis celendinensis</i> Sagást. & Sánchez Vega	Si	Sufrútice	Tallos, hojas y flores
	<i>Coreopsis sherffii</i> Blake	Si	Sufrútice	Tallos, hojas y flores
	<i>Coreopsis sp 1</i>	Si	Sufrútice	Tallos, hojas y flores

	<i>Paranephelius uniflorus</i> Poepp. & Endl.	No	Hierba	Planta Completa
	<i>Senecio sp.</i>	Si	Hierba	Tallos, hojas y flores
Scrophulariaceae	<i>Buddleja sp. 1</i>	No	Árbol	Tallo joven y hojas
ae	<i>Buddleja sp.2</i>	Si	Arbusto	Tallo joven y hojas.
Calceolariaceae	<i>Calceolaria sp.</i>	Si	Hierba	Tallos y hojas
Campanulaceae	<i>Siphocampylus sp.</i>	Si	Hierba	Tallos y hojas
Fabaceae	<i>Aeschynomene weberbaueri</i> Ulbr.	Si	Hierba	Planta completa
	<i>Lupinus sp.</i>	Si	Hierba	Tallos y hojas
Loasaceae	<i>Mentzelia heterosepala</i> Weigend & E. Rodr.	Si	Hierba	Tallos, hojas y flores
Polygalaceae	<i>Monnina conferta</i> Ruiz & Pav.	No	Hierba	Tallos y hojas

Pasos preliminares

3.1.6. Extracción de proteínas:

3.1.6.1. Preparación de extractos acuosos a partir de plantas

Los extractos acuosos fueron preparados mediante homogenización de las hojas, tallos, raíz, frutos y/o semillas en

el tampón apropiado, en una relación 1:2 (m/v). Los tampones que se utilizaron para la extracción son Buffer Tris pH 8 y Buffer DTT pH 8.2. Los homogenizados se centrifugaron a 18 000 g a 4°C durante 20 minutos y filtrados a través de un embudo de vidrio con algodón. Se procedió a liofilizarlos y se conservaron a -40°C hasta su utilización hasta su posterior análisis.

3.1.6.2. Clarificación de los extractos

A partir de los extractos acuosos obtenidos en la etapa anterior, se tomaron 2 muestras de cada uno de ellos y se clarificaron mediante dos métodos diferentes: tratamiento térmico y tratamiento ácido, con el fin de evaluar cuál de las dos metodologías era la más adecuada para clarificar los extractos acuosos sin que esto afecte la su actividad inhibitoria.

A. Tratamiento térmico de los extractos

Se evaluaron diferentes temperaturas y tiempos, estos parámetros están sujetos a la estabilidad de los inhibidores presentes en los extractos. La estrategia general fue incubar los extractos a una temperatura y tiempo fijo. Luego se dejó enfriar rápidamente a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar las muestras a 18 000g a 4°C durante 20 minutos.

B. Tratamiento ácido

Se evaluaron dos concentraciones de ácido tricloroacético (TCA), 2.5% y 5%. El tratamiento consistió en incubar durante

10 minutos y en agitación los extractos con una concentración final de TCA al 2.5% o 5%, según correspondía. Se dejó la mezcla en reposo durante 1 hora y se centrifugó por 15 minutos a 10000 g a una temperatura de 4°C. Se neutralizó el sobrenadante hasta pH 7.0 con NaOH (2 mol/L).

Evaluación principal

Se presentan los resultados de los extractos que forman parte de la colección del laboratorio de Proteómica y que fue trabajado por el equipo del Proyecto 107-2015-FONDECYT-UPAO, las mismas que se enumeraron como se muestra más adelante, esto con el fin de llevar un control más eficiente. En la tabla 3 se presenta la lista completa de especies clarificadas con Buffer DTT+EDTA, Buffer TRIS y agua.

Se procedió a designar letras para cada uno de los tratamientos de clarificación, como se muestra a continuación:

- A: Clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 30 min.
- B: Clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 60 min.
- C: Clarificación con TCA 2.5%.
- D: Clarificación con TCA 5%.

Tabla 4. Lista de muestras de plantas que se usaron con los respectivos buffers con los que se clarificaron.

Muestra	Buffer DTT+EDTA	Buffer TRIS	Agua
1. <i>Arnaldoa weberbaueri</i>	•		
2. <i>Arnaldoa weberbaueri</i>		•	
3. <i>Buddleja</i> sp.3	•		
4. <i>Buddleja</i> sp.3		•	
5. <i>Buddleja</i> sp.2	•		
6. <i>Buddleja</i> sp.2		•	
7. <i>Buddleja</i> sp.1	•		
8. <i>Buddleja</i> sp.1		•	
9. <i>Coreopsis</i> sp.	•		
10. <i>Coreopsis</i> sp.		•	
11. <i>Coreopsis celendinensis</i>	•		
12. <i>Coreopsis celendinensis</i>		•	
13. <i>Coreopsis sherffii</i>	•		
14. <i>Coreopsis sherffii</i>		•	
15. <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	•		
16. <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>		•	
17. <i>Monnina conferta</i>	•		
18. <i>Monnina conferta</i>		•	
19. <i>Aeschynomene weberbaueri</i>	•		
20. <i>Aeschynomene weberbaueri</i>		•	
21. <i>Paranefelium uniflorus</i>	•		
22. <i>Paranefelium uniflorus</i>		•	
23. <i>Mentzelia heterosephala</i>	•		
24. <i>Mentzelia heterosephala</i>		•	
25. <i>Senecio</i> sp.			•
26. <i>Senecio</i> sp.		•	
27. <i>Senecio</i> sp.	•		

28. <i>Siphocampylus</i> sp.			•
29. <i>Siphocampylus</i> sp.		•	
30. <i>Siphocampylus</i> sp.	•		
31. <i>Lupinus</i> sp.		•	
32. <i>Lupinus</i> sp.	•		
33. <i>Calceolaria</i> sp.		•	
34. <i>Calceolaria</i> sp.	•		

3.1.7. Separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE

Se usó un gel SDS-PAGE para separar las proteínas. Aproximadamente, se prepararon 200 µg de proteína en 90 µl de tampón de corrida (Laemmli, 1970), seguidamente se procedió a incubar a 95°C por 5 min que sirve para la activación de las proteínas, se centrifugó a 10500 rpm por 5 min a 4°C y se usó el sobrenadante (Kehr, Buhtz, y Giavalisco, 2005). El armado del gel 1D SDS-PAGE se realizó de acuerdo con una metodología anteriormente descrita (Kehr y otros, 2005; Sridhar, 2015). Se usó un equipo MiniProtean para electroforesis (Bio-Rad, Hercules, CA) y se sometió a 100 V por 30 – 40 min hasta que las primeras bandas llegaron antes del final del gel. Para teñir el gel, se sumergió en azul de Coomassine por 25 – 35 min para que se puedan visualizar las bandas proteicas. A continuación, se lavaron con el tampón decolorante por 20-30 min y seguidamente con agua destilada para quitar todos los residuos. Finalmente se observaron las bandas de proteínas en el documentador de geles ThermoScientific, myECL imager (EE. UU.).

3.1.8. Análisis de bases de datos de inhibidores de proteasas

Una vez obtenidas las bandas de las proteínas, algunas de las cuales pueden ser inhibidores de proteasas, se procedió a buscar en las bases de datos más importantes de proteínas: MEROS, PLANT-IP, UniProt y RCSB PDB. Se realizó una lista de inhibidores de proteasas que correspondían a pesos moleculares similares en los encontrados en las muestras de los geles.

3.1.9. Análisis de los inhibidores de proteasas y las enzimas digestivas de las cochinillas.

A los inhibidores de proteasas seleccionados en el punto anterior, se analizaron con respecto a las enzimas digestivas que se encuentran en las cochinillas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de proteínas candidatas por electroforesis en SDS-PAGE.

Las proteínas de las muestras se observaron mediante electroforesis. Para la determinación de proteínas de bajo peso molecular se utilizaron geles SDS-PAGE al 15%. Los inhibidores de la proteasa variaron entre 3 y 42 KDa (datos no publicados).

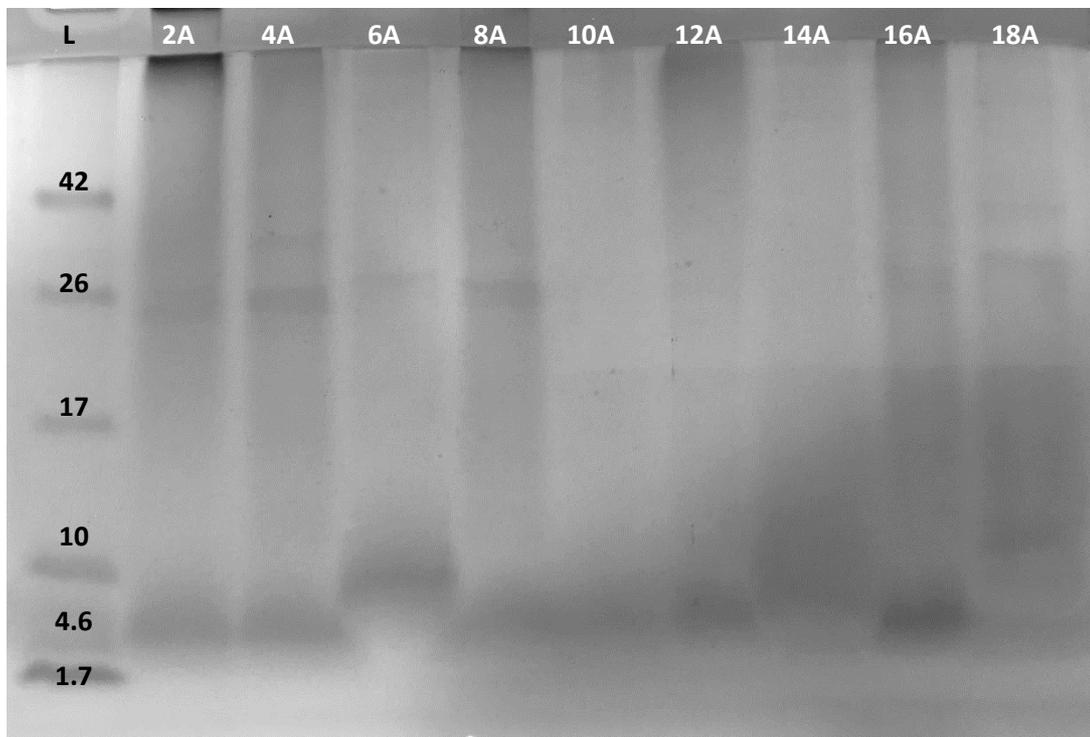


Figura 2. Electroforesis en SDS-PAGE al 15% de proteínas de plantas. Donde: La columna L representa a la escalera y 2A: *Arnaldoa weberbaueri*, 4A: *Buddleja* sp.3, 6A: *Buddleja* sp.2, 8A: *Buddleja* sp.1, 10A: *Coreopsis* sp., 12A: *Coreopsis celendinensis*, 14A: *Coreopsis sherffii*, 16A: *Barnadesia hutchinsoniana*, 18A: *Monnina conferta*)

El proceso de clarificación incluyó tratamiento térmico (a 60°C por 30 min.) y tampón TRIS. De este estudio, nueve especies de plantas endémicas produjeron varias bandas (Fig.2).

Se realizó la electroforesis a un total de 49 muestras, que fueron expuestas a 3 tratamientos de clarificación diferentes, de un total de 14 especies endémicas. El rango de búsqueda para este estudio ha sido proteínas de menos de 42 kDa. Todas las especies han reportado al menos una proteína en este rango (Ryan & Green, 1974). Una de las razones de que se haya presentado un bajo número de proteínas en algunas de las especies puede deberse a una variación según el estado fenológico de la planta y el nivel de estrés al que estén sujetas al momento de la colecta (Brzin & Kidric, 1996; Kudoh, 2016). Las muestras obtenidas para este estudio fueron recolectadas de diferentes etapas debido a que solo hubo una única colecta de las plantas. Por lo tanto cada especie ha estado sometida a un entrés y etapas diferentes.

Los inhibidores de proteasas son moléculas proteicas que se encuentran, por lo general, debajo de los 42 kDa, con algunas excepciones en las que pueden ser de mayor tamaño (Fabbro, 2015). Del total de proteínas obtenidas en la electroforesis que se ha realizado, existen dos rangos en los que se ubica el mayor porcentaje de estas proteínas, 3 -7 kDa con un 24% y 25-28 kDa con un 25%, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 30 min y con buffer TRIS por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Especies	Peso molecular de las proteínas (kDa)		
2A: <i>Arnaldoa weberbaueri</i>	5	25	-
4A: <i>Buddleja</i> sp. 3	5	25	34
6A: <i>Buddleja</i> sp. 2	9	26	-
8A: <i>Buddleja</i> sp.1	25	-	-
10A: <i>Coreopsis</i> sp.	-	-	-
12A: <i>Coreopsis celendinensis</i>	-	-	-
14A: <i>Coreopsis sherffii</i>	>42	-	-
16A: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	5	26	-
18A: <i>Monnina conferta</i>	27	34	>42

La tabla 5 muestra que las moléculas obtenidas más frecuentes pesan entre 25 y 27 kDa, seguidas por los de 5 kDa las que están presentes en todas las muestras de este grupo excepto en el género *Coreopsis*. Es importante mencionar que en *Coreopsis sherffii* y *Monnina conferta* se observan bandas de más de 42 kDa con una señal tenue. Es muy probable que estas no sean inhibidores de proteínas y aún menor probabilidad sean las esperadas (Fabbro, 2015).

La tabla 6 se presenta el resumen de los pesos moleculares obtenidos en la electroforesis con tratamiento de calor a 60°C por 60 minutos y con buffer TRIS.

Tabla 6. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 60 min y con buffer TRIS por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Muestras	Peso molecular de las proteínas (kDa)		
2B: <i>Arnaldoa weberbaueri</i>	18	25	36
4B: <i>Buddleja sp. 3</i>	25	34	-
6B: <i>Buddleja sp. 2</i>	26	-	-
8B: <i>Buddleja sp. 1</i>	25	-	-
10B: <i>Coreopsis sp.</i>	-	-	-
12B: <i>Coreopsis celendinensis</i>	-	-	-
14B: <i>Coreopsis sherffii</i>	>42	-	-
16B: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	26	-	-

Las bandas entre 25 y 26 kDa continúan siendo las más frecuentes (tabla 6). La ausencia de bandas de 5 kDa puede deberse al tiempo de exposición con calor en el proceso de clarificación, comparando con los datos de la tabla 5. Las especies de *Coreopsis* no presentan bandas con pesos menores a 42 kDa, con excepción de *Coreopsis sherffii*.

La tabla 7 muestra el resumen de los pesos moleculares obtenidos en la electroforesis de las muestras con clarificación con TCA al 2.5% y con buffer TRIS. Las bandas más frecuentes en este grupo se encuentran entre 5 y 11 kDa. En las especies de *Coreopsis* no se presentan bandas de menos de 42 kDa, a excepción de *Coreopsis sherffii*. Al igual que las especies *Buddleja sp. 1* y *B hutchinsoniana*; esto puede deberse a la degradación en el almacenamiento, el tiempo o una pequeña alza en la temperatura al momento del proceso de extracción o preparación de muestras (Murby, Uhlén, & Ståhl, 1996).

Tabla 7. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento con TCA 2.5% y con buffer TRIS por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Muestras	Peso Molecular de las proteínas (kDa)		
4C: <i>Buddleja</i> sp. 3	5	-	-
6C: <i>Buddleja</i> sp. 2	8	-	-
8C: <i>Buddleja</i> sp.1	-	-	-
10C: <i>Coreopsis</i> sp.	-	-	-
12C: <i>Coreopsis celendinensis</i>	>42	-	-
14C: <i>Coreopsis sherffii</i>	5	-	-
16C: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	-	-	-
18C: <i>Monnina conferta</i>	11	28	>42

En la tabla 8 se presenta el resumen de los pesos moleculares obtenidos en la electroforesis de las muestras con clarificación con TCA al 5% y con buffer TRIS. Las bandas más frecuentes se encuentran entre 4 y 6 kDa, seguidas de 25 a 27 kDa. Para el caso de las especies de *Coreopsis* no se han presentado bandas con pesos menores de 42 kDa, a excepción de *Coreopsis sherffii*. Este grupo de muestras con esta metodología de clarificación muestra un mayor número de proteínas, casi un 45% más que la clarificación con TCA al 2.5%.

Tabla 8. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento con TCA 5% y con buffer TRIS por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Muestras	Peso molecular de las proteínas (kDa)		
4D: <i>Buddleja</i> sp. 3	4	-	-
6D: <i>Buddleja</i> sp. 2	6	-	-
8D: <i>Budleja</i> sp.1	5	25	26
10D: <i>Coreopsis</i> sp.	-	-	-
12D: <i>Coreopsis celendinensis</i>	>42	-	-
14D: <i>Coreopsis sherffii</i>	5	-	-
16D: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	4	-	-
18D: <i>Monnina conferta</i>	4	5	27

En la tabla 9 se exhibe el resumen de los pesos moleculares obtenidos en la electroforesis de nueve muestras con dos tipos de clarificación y tres buffers. En la tabla 9 se observa 4 grupos de proteínas: las de bajo peso molecular entre 3 a 9 kDa, las de peso molecular intermedio entre 12 a 18 kDa, las de peso molecular alto entre 24 a 27 kDa y las de mayor peso molecular entre 32 a 35 kDa. Las especies que no presentaron bandas en los geles fueron *Aeschynomene weberbaueri* y *Paranefelius uniflorus*. Con estos métodos de clarificación y estos buffers se observan una mayor diversidad de proteínas con diferentes pesos moleculares. La obtención de proteínas con este método de calentar a 60°C y usar TCA 2.5% ha mejorado el número de bandas óptimas en casi 4 veces comparado usar solo TCA 2.5% y cerca del doble para TCA al 5%.

Tabla 9. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con tratamiento de calor a 60 °C por 30 min o clarificación con TCA 2.5% y con tres buffers (DTT, EDTA, TRIS) o agua, por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Muestras	Peso molecular de las proteínas (kDa)				
Clarificación a 60°C por 30 min.					
25A. <i>Senecio</i> sp. (AGUA)	3	25	-	-	-
30A. <i>Siphocampylus</i> sp. (Buffer DTT+EDTA)	9	12	17	35	-
32A. <i>Lupinus</i> sp. (Buffer DTT+EDTA)	3	14	18	25	27
Clarificación con TCA al 2.5%					
10C. <i>Coreopsis</i> sp. (Buffer TRIS)	7	-	-	-	-
20C. <i>Aeschynomene weberbaueri</i> (Buffer TRIS)	-	-	-	-	-
22C. <i>Paranefelius uniflorus</i> (Buffer TRIS)	-	-	-	-	-
24C. <i>Mentzelia heterosephala</i> (Buffer TRIS)	17	-	-	-	-
32C. <i>Lupinus</i> sp. (Buffer DTT+EDTA)	5	16	18	25	32
34C. <i>Arnaldoa weberbaueri</i> (Buffer DTT+EDTA)	16	24	25	-	-

La tabla 10 presenta el resumen de los pesos moleculares obtenidos en la electroforesis de nueve muestras con clarificación con TCA 5%, extracto puro y ambos grupos con tres buffers. Las bandas en el grupo de TCA 5% se ha combinado con otros tampones, mostrando que para este grupo de plantas no es el adecuado, ya que solo algunas muestras han resultado en una banda. Indicando que es preferible descartar esta combinación para este tipo de plantas.

En el caso en caso del extracto puro y su combinación con el buffer EDTA más DTT, muestra un mejor rendimiento en cuestión de bandas en el rango de 3 a 40 kDa. Para el caso de las especies de *Paranefelius uniflorus*, *Mentzelia heterosephala* y *Arnaldoa weberbaueri* no se muestran bandas de proteínas.

Tabla 10. Pesos moleculares en kDa obtenidos para cada muestra con clarificación con TCA 5% o extractos puros y ambos grupos con tres buffers (DTT, EDTA, TRIS), por medio de electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Relación de plantas	Peso Molecular de las proteínas (kDa)						
Clarificación con TCA al 5%							
10D. <i>Coreopsis</i> sp. (Buffer TRIS)	7	-	-	-	-	-	-
20D. <i>Aeschynomene weberbaueri</i> (Buffer TRIS)	18	-	-	-	-	-	-
22D. <i>Paranefelius uniflorus</i> (Buffer TRIS)	-	-	-	-	-	-	-
24D. <i>Mentzelia heterosephala</i> (Buffer TRIS)	-	-	-	-	-	-	-
32D. <i>Lupinus</i> sp. (Buffer DTT+EDTA)	3	7	9	-	-	-	-
34D. <i>Arnaldoa weberbaueri</i> (Buffer DTT+EDTA)	-	-	-	-	-	-	-
Extracto puro							
30. <i>Siphocampylus</i> sp. (Buffer DTT+EDTA)	12	17	20	35	-	-	-
32. <i>Lupinus</i> sp. (Buffer DTT+EDTA)	5	7	8	10	15	34	36
34. <i>Calceolaria</i> sp. (Buffer DTT+EDTA)	10	12	14	18	25	26	40

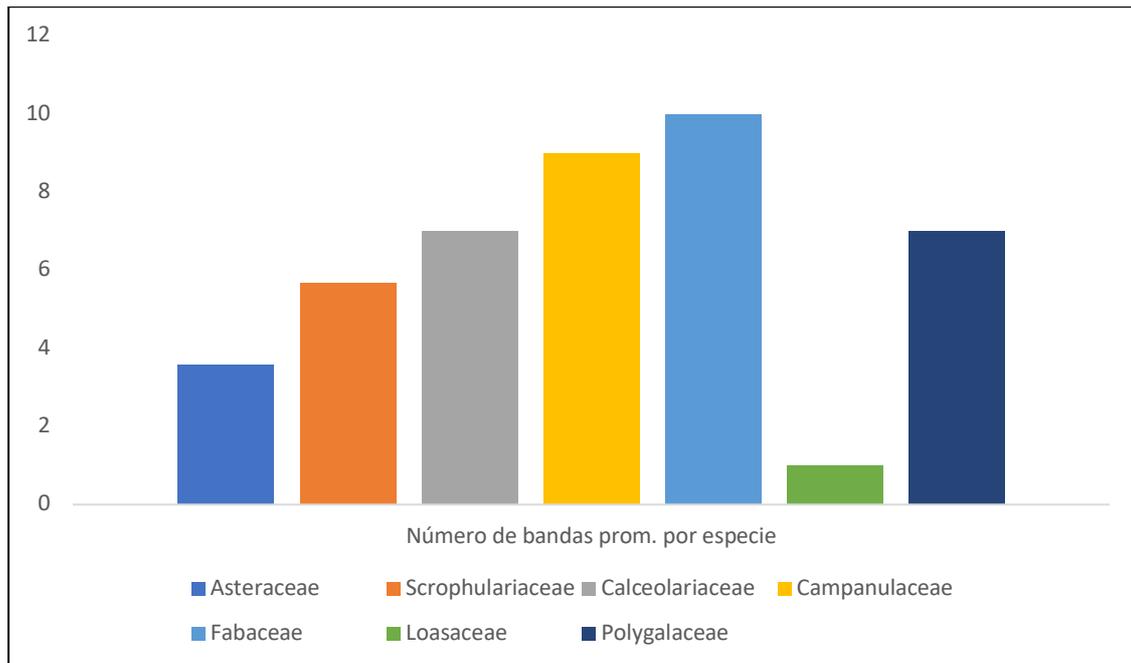


Figura 3. Promedio de bandas proteicas menores a 42 kDa, obtenidas de las 14 especies estudiadas y agrupadas por familia. A las que se les aplico una electroforesis SDS-PAGE al 15%.

En la tabla 11 se muestra el resumen de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en las plantas endémicas con cuatro métodos de clarificación; donde A: clarificación con tratamiento de calor a 60°C por 30 min., B: clarificación con tratamiento de calor a 60°C por 60 min., C: clarificación con TCA al 2.5%, D: clarificación con TCA al 5%

De las 14 especies estudiadas, Fabaceae y Campanulaceae son las dos familias con mayor promedio de proteínas por especie, con 23% y 21% cada una. Calceolariaceae y Polygalaceae con 16% cada una, figura 3. Combinadas con un buen método de clarificación DTT + TRIS, estas especies pueden proporcionar aún más bandas proteicas y consecuentemente más inhibidores. Las muestras que presentaron mejores rendimientos fueron aquellas en las que la clarificación de proteínas se realizó con DTT y EDTA, seguidas de tampón TRIS con 50% y 30%, cada uno. En la tabla 5 se muestra el resumen de los pesos moleculares obtenidos

en la electroforesis con tratamiento de calor a 60°C por 30 minutos y con buffer TRIS.

Del total de bandas obtenidas en la electroforesis SDS-PAGE al 15%, el mayor número pertenece a Fabaceae (n=21), seguido de Asteraceae (n=18) y Scrophulariaceae (n=17). El alto rendimiento de Asteraceae puede deberse a que se estudió un mayor número de especies.

Tabla 11. Lista resumen de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en las plantas endémicas con cuatro métodos de clarificación y tres buffers (DTT, EDTA y TRIS) de la electroforesis SDS-PAGE al 15%.

Familia	Especie	Peso molecular de las proteínas (kDa)						
	2A: <i>Arnaldoa weberbaueri</i>	5	25	-	-	-	-	-
	2B: <i>Arnaldoa weberbaueri</i>	18	25	36	-	-	-	-
	34C: <i>Arnaldoa weberbaueri</i>	16	24	25	-	-	-	-
	10C: <i>Coreopsis</i> sp.	7	-	-	-	-	-	-
	10D: <i>Coreopsis</i> sp.	7	-	-	-	-	-	-
Asteraceae	14C: <i>Coreopsis sherffii</i>	5	-	-	-	-	-	-
	14D: <i>Coreopsis sherffii</i>	5	-	-	-	-	-	-
	16A: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	5	26	-	-	-	-	-
	16B: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	26	-	-	-	-	-	-
	16D: <i>Barnadesia hutchinsoniana</i>	4	-	-	-	-	-	-
	25A: <i>Senecio</i> sp.	3	25					
	4A: <i>Buddleja</i> sp. 3	5	25	34	-	-	-	-
	4B: <i>Buddleja</i> sp. 3	25	34	-	-	-	-	-
Scrophulariaceae	4C: <i>Buddleja</i> sp. 3	5	-	-	-	-	-	-
	4D: <i>Buddleja</i> sp. 3	4	-	-	-	-	-	-
	6A: <i>Buddleja</i> sp. 2	9	26	-	-	-	-	-

	6B: <i>Buddleja</i> sp. 2	26	-	-	-	-	-	-
	6C: <i>Buddleja</i> sp. 2	8	-	-	-	-	-	-
	6D: <i>Buddleja</i> sp. 2	6	-	-	-	-	-	-
	8A: <i>Buddleja</i> sp.1	25	-	-	-	-	-	-
	8B: <i>Buddleja</i> sp.1	25	-	-	-	-	-	-
	8D: <i>Buddleja</i> sp.1	5	25	26	-	-	-	-
Calceolariaceae	34. <i>Calceolaria</i> sp.	10	12	14	18	25	26	40
Campanulaceae	30. <i>Siphocampylus</i> sp.	12	17	20	35	-	-	-
	30A. <i>Siphocampylus</i> sp.	9	12	17	35	-	-	-
	20D. <i>Aeschynomene</i> <i>weberbaueri</i>	18	-	-	-	-	-	-
Fabaceae	32. <i>Lupinus</i> sp.	5	7	8	10	15	34	36
	32A. <i>Lupinus</i> sp.	3	14	18	25	27		
	32C. <i>Lupinus</i> sp.	5	16	18	25	32		
	32D. <i>Lupinus</i> sp.	3	7	9	-	-	-	-
Loasaceae	24C. <i>Mentzelia heterosephala</i>	17	-	-	-	-	-	-
	18A: <i>Monnina conferta</i>	27	34	-	-	-	-	-
Polygalaceae	18C: <i>Monnina conferta</i>	11	28	-	-	-	-	-
	18D: <i>Monnina conferta</i>	4	5	27	-	-	-	-

Análisis de las bases de datos de inhibidores de proteínas por familias botánicas

El análisis realizado a las proteínas obtenidas de plantas endémicas arroja un total de 426 coincidencias con la base de datos de inhibidores de proteasa Uniprot. Este resultado es para los inhibidores en general, utilizando la relación de tamaño y peso molecular. De estas muestras, las que han presentado mayor porcentaje de coincidencia por familias son las Polygalaceae y Calceolariaceae, con un 47% y un 16% cada una.

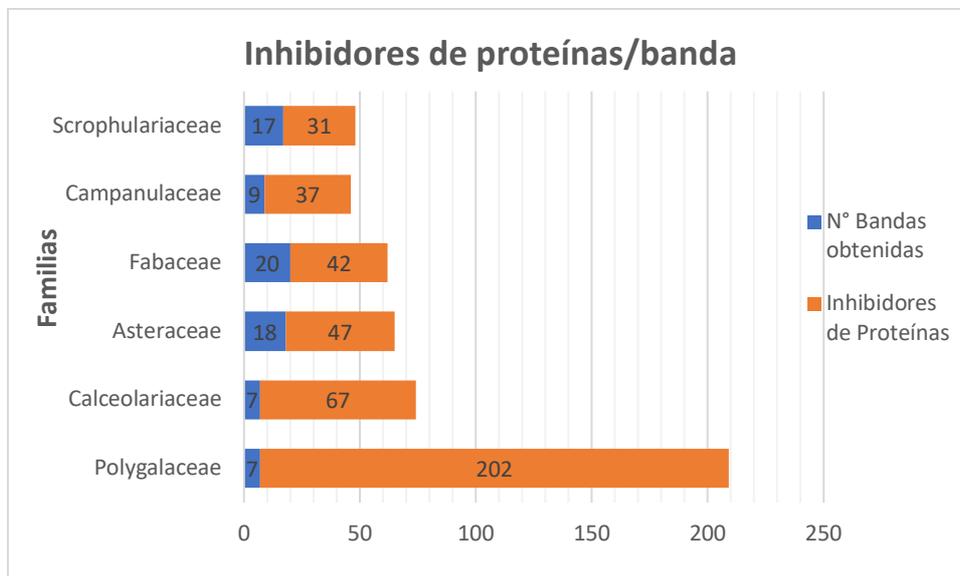


Figura 4. Inhibidores de proteasas totales (para todas las proteasas en general) que se encontraron en la búsqueda realizada en la base de datos de inhibidores.

Polygalaceae es la familia que más inhibidores tiene, esto se debe a usado esta familia y su taxonomía e ir un nivel más arriba, llegando al orden perteneciente a esta familia en la que existe una mayor colección de datos y que es muy probable que exista alguna o algunas especies que sean motivo de estudios profundos . Al no ser una familia de plantas conocidas, tuvo que hacerse una relación para determinar la existencia de inhibidores para esta familia, al igual que para la familia Calceolariaceae. Es necesario realizar esta afiliación para determinar si las especies que hemos trabajado, y que

por motivos de la investigación no era facultad llegar a la caracterización de estas proteínas en un espectrómetro de masas (MS/MS), dentro de estas proteínas pueden tener la presencia de inhibidores de proteasas.

Para el caso de las familias Asteraceae, Scrophulariaceae, Campanulaceae y Fabaceae la búsqueda se ha realizado de la misma forma. En este caso se buscó solo para las familias y se encontró inhibidores que corresponden a este nivel taxonómico. Lo que indica que las plantas de este estudio pueden guardar similitud y relación con las halladas en la base de datos.

La base de datos consultada y que contiene el mayor número de proteínas es Uniprot. Al realizar un búsqueda avanzada, esta nos arroja los siguientes datos para cada una de las familias en estudio.

A. Familia Asteráceas

En esta familia se analizaron cinco especies, en *Arnaldoa weberbaueri* se han visualizado seis bandas de proteínas cuyos pesos van desde 5 hasta 36 kDa. Analizando las bases de datos de inhibidores se ha identificado para la proteína de 5 kDa el inhibidor de la tripsina. Para la molécula de 16 kDa se han registrado los inhibidores de cisteína, del ARNr N-glicosidasa, del dominio de la cistatina y quinasa dependiente de la ciclina. Para la proteína de 18 kDa se han registrado los inhibidores de policétido ciclasa/deshidrasa, receptores de ABA e inhibidores aún no caracterizados. Para la proteína de 24 kDa se han identificado los inhibidores de la ciclina dependiente de la quinasa, policétido ciclasa/deshidrasa, de contenedor del dominio de la cistatina e inhibidores aún no caracterizados. Para la molécula de 25 kDa se han identificado los inhibidores la ciclina dependiente de la quinasa, de la cistatina e inhibidores no caracterizados. Para la molécula de 36 kDa no se han identificado inhibidores.

Para *Coreopsis*, se ha encontrado bandas de proteínas en *Coreopsis* sp. y *Coreopsis sherffii* que son 5 y 7 kDa. Al consultar las bases de datos encontramos al inhibidor de la tripsina para la proteína de 5 kDa y, el inhibidor de cisteína y un inhibidor no caracterizado para la proteína de 7 kDa.

Para *Barnadesia hutchinsoniana* se ha conseguido conseguido cuatro bandas de proteínas que están en el rango de 4 a 26 kDa. Al consultar las bases de datos se halla para la proteína de 4 kDa no existen inhibidores caracterizados. Para la proteína de 5 kDa se ha identificado el inhibidor de tripsina. Para la proteína de 26 se hallan el inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina e inhibidores sin caracterizar que inhiben la quinasa y la fosfatasa.

Para la especie *Senecio* sp., se ha conseguido dos bandas de proteínas con pesos de 3 y 25 kDa cada una. Revisando las bases de datos no encontramos ningún inhibidor que coincide con la banda de 3 kDa. Para la proteína de 25 kDa se han identificado inhibidores de cisteína y la proteína quinasa.

B. Familia Scrophulariaceae

En esta familia se han analizado tres especies; *Buddleja* sp. 1, *Buddleja* sp. 2 y *Buddleja* sp. 3, de estas tres especies se han encontrado 17 proteínas que se encuentran en un rango de 4 hasta 34 kDa. Para la proteína de 4 kDa se ha identificado un inhibidor de la tripsina. Para la proteína de 5 kDa se han identificado inhibidores del ácido abscísico. Para la proteína de 6 kDa se ha identificado los inhibidores del ácido abscísico y otro aún por caracterizar. Para la proteína de 8 kDa se han encontrado inhibidores del tipo II, proteína contenedora del dominio de la cistatina y otras por caracterizar que pertenecen a los inhibidores de la proteasa de la papa tipo II (I20). Para la proteína de 9 kDa se registra inhibidores de la cisteína proteasa y de la proteína contenedora del dominio de la cistatina. Para la proteína de 25 kDa se ha encontramos inhibidores de la cisteína, receptor del ácido abscísico, quinasa dependiente de la ciclina, ARNr N-glucosidasa y otros por

caracterizar. Para la molécula de 26 kDa encontramos inhibidores de la cisteína proteasa, ARNr N-glucosidasa, quinasa dependiente de la ciclina y del receptor del ácido abscísico. La proteína de 34 kDa registra al inhibidor de ARNr N-glucosidasa.

C. Familia Calceolariaceae

En *Calceolaria* sp, se presentan siete proteínas que se encuentran entre 10 a 40 kDa. Para la proteína de 10 kDa se han identificado inhibidores de la proteína contenedora del dominio de cistatina, de la cisteína y un inhibidor no caracterizado de la familia I20. Para la proteína de 12 kDa se hallan inhibidores de la cisteína, de la proteína contenedora del dominio de cistatina y de la cisteína B. Para la banda de 14 kDa se ha registrado inhibidores de la proteinasa cisteína 1, de la proteína contenedora del dominio de cistatina, de ARNr N-glicosidasa y de la proteinasa cisteína. Para la molécula de 18 kDa se han identificado inhibidores de la proteína contenedora del dominio de cistatina, receptores de la familia del ácido abscísico de la familia PYR/PYL, del ARNr N-glicosidasa, receptor del ácido abscísico PYL 6, de la quinasa dependiente de la ciclina y otros inhibidores aún por caracterizar de la familia del receptor intracelular del ácido abscísico PYR/PYL/RCAR. La proteína de 25 kDa registra en las bases de datos al inhibidor de la proteinasa cisteína, del receptor del ácido abscísico de la familia PYR/PYL, de la quinasa dependiente de la ciclina e inhibidores sin caracterizar de las familias CDI y del receptor intracelular del ácido abscísico PYR/PYL/RCAR. Para la proteína de 26 kDa se registran inhibidores de la proteinasa cisteína, del receptor del ácido abscísico PYR/PYL, de la quinasa dependiente de la ciclina y tres inhibidores sin caracterizar que pertenecen a las familias CDI y del receptor intracelular del ácido abscísico PYR/PYL. La proteína de 40 kDa no registra inhibidores en las bases de datos con pesos similares.

D. Familia Campanulaceae

Para *Siphocampylus* sp. se han obtenido cinco bandas de proteínas en el rango de 9 a 35 kDa. Consultando las bases de datos para la molécula de 9 kDa se han identificado los inhibidores de la proteinasa cisteína y de la proteinasa cisteína A. Para la molécula de 12 kDa se encuentran inhibidores de la proteinasa cisteína, de la proteína contenedora del dominio de cistatina, de proteinasa de cisteína tipo 5, de la quinasa dependiente de la ciclina y la cistatina. Para la molécula de 17 kDa se han encontrado el inhibidor de la proteína contenedora del dominio de cistatina, del policétido ciclasa/dehidrasa y de la ARNr N-glicosidasa. Para la molécula de 20 kDa se listan los inhibidores de la cistatina, del componente regulador del receptor ABA 1, de la quinasa dependiente de la ciclina putativa, del policétido ciclasa/dehidrasa (proteína del dominio tipo START), receptor del ABA y del policétido ciclasa/dehidrasa putativa. Para la molécula de 35 kDa no se ha hallado ningún inhibidor con un peso similar en las bases de datos.

E. Familia Fabaceae

En el caso de *Aeschynomene weberbaueri*, se ha conseguido una proteína de 18 kDa y analizando las bases de datos se ha identificado cinco inhibidores con un peso molecular similar, que pertenecen a la misma tribu Dalbergieae. Entre estos se encuentran el inhibidor de la proteinasa cisteína, de la proteína contenedora del dominio de cistatina y proteínas no caracterizadas pertenecientes a la familia del receptor intracelular del ácido abscísico.

Para *Lupinus* sp. se observaron quince proteínas que se encuentran entre 3 a 36 kDa. Para la molécula de 3 kDa se reporta en las bases de datos consultadas un inhibidor con similar peso que corresponde al inhibidor de la proteína fosfatasa. Para la molécula de 5 kDa, se ha encontrado a los inhibidores de la proteína quinasa, nudo inhibidor de cistina (Knottin), de la proteasa tiol (cistatina WCPI-3), de la cistatina de bajo peso molecular, de la cisteína, de la tripsina tipo Kunitz de la

cadena alfa y de la proteinasa tipo Bowman-Birk. Para molécula de 7 kDa se ha registrado el inhibidor de la proteinasa cisteína. Para la proteína de 8 kDa se listan dos inhibidores con peso similar, estas son inhibidores de la proteinasa cisteína. Para la proteína de 9 kDa se listan dos inhibidores que corresponden al inhibidor policétido ciclasa/deshidrasa putativa que inhibe la proteína fosfatasa, la otra corresponde a un inhibidor sin caracterizar que inhibe la quinasa. Para la molécula de 10 kDa se han registrado al inhibidor de la cisteína y el inhibidor putativo de la quinasa dependiente de la ciclina. Para la proteína de 14 kDa se han identificado al inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina y dos inhibidores sin caracterizar que inhiben la fosfatasa. Para proteína de 15 kDa se han registrado al inhibidor policétido ciclasa/deshidrasa putativo que inhibe la proteína fosfatasa. Para la proteína de 16 kDa se ha encontrado al inhibidor policétido ciclasa/deshidrasa putativo que inhibe la proteína fosfatasa y otro sin caracterizar que inhibe la fosfatasa. Para la molécula de 18 kDa se han identificado a los inhibidores de la quinasa dependiente de la ciclina, al inhibidor policétido ciclasa/deshidrasa putativo que inhibe la proteína fosfatasa e inhibidores sin caracterizar que corresponden inhibidores de la fosfatasa y quinasa. Para la proteína de 25 kDa se han registrado los inhibidores de la proteína contenedora del dominio de la cistatina. Para la proteína de 27 kDa se han hallado a la proteína putativa que contiene el dominio de cistatina, al inhibidor de la proteinasa tipo Bowman-Birk y una sin caracterizar que corresponde a un inhibidor de la serinoproteasa. Para la molécula de 32 kDa, se han caracterizado los inhibidores de la proteasa cisteína y la contenedora del dominio de la cistatina. Para la proteína de 34 kDa, se han registrado los inhibidores del factor lacrimatorio sintasa, que inhibe la fosfatasa y el inhibidor de la cisteína. Para la proteína de 36 kDa se ha identificado al inhibidor de la cisteína proteasa.

F. Familia Loasaceae

En el caso de *Mentzelia heterosephala* se ha obtenido una proteína de 17 kDa. Consultando las bases de datos se han encontrado inhibidores a nivel del orden Cornales , donde se registran el inhibidor putativo de cisteína tipo B, de la cisteína y de la contenedora del dominio de la cistatina.

G. Familia Polygalaceae

Para *Monnina conferta*, la búsqueda de las bases de datos se ha realizado al nivel de orden Fabales y sus proteínas se encuentran en el rango de 4 a 34 kDa. Para la molécula de 4 kDa se ha encontrado los inhibidores de la tripsina, tripsina de cadena beta DE5, tripsina tipo Kunitz, proteinasa tipo Bowman-Birk, cliotida T26 y de la cisteína. Para 5 kDa se han identificado los inhibidores de la quinasa dependiente de la ciclina, la contenedora del dominio I de la albúmina, cistatina WCPI-3, cistatina, tripsina tipo Kunitz y la proteinasa tipo Bowman-Birk. Para la proteína de 11 kDa se han caracterizado los inhibidores del receptor del ácido abscísico PYL6, albúmina 1 (Knottin), tripsina Bowman-Birk, proteína contenedora del dominio Bowman-Birk, proteasa tipo Bowman-Birk, cliotida T36 (Knottin), cistatina, proteína contenedora del dominio de la cistatina, de la cisteína, Bowman-Birk de doble cabeza, de la tripsina, de la elastasa/tripsina, albúmina putativa 1, tripsina putativa, serina putativa, de la serinoproteasa, tripsina/quimiotripsina e inhibidores sin caracterizar de la familia BetVI y la familia I20. Para 27 kDa han caracterizado los inhibidores de alfa-amilasa, alfa-amilasa 1, 4 y 5, de la cisteína, de la isoforma parecido al factor sintasa lacrimatorio X1 e inhibidores sin caracterizar de la quinasa y la fosfatasa. Para la proteína de 28 kDa, se encuentran los inhibidores del receptor del ácido abscísico PYL6, de alfa amilasa, de la quinasa dependiente de la ciclina, quinasa dependiente de la ciclina putativa, policétido ciclasa/deshidrasa putativa, del ARNr N-glicosilasa y tres inhibidores aún por caracterizar que inhiben la quinasa, la proteasa tiol y la fosfatasa. Para la proteína 34 kDa se han encontrado los inhibidores del factor lacrimatorio sintasa y de la cisteína.

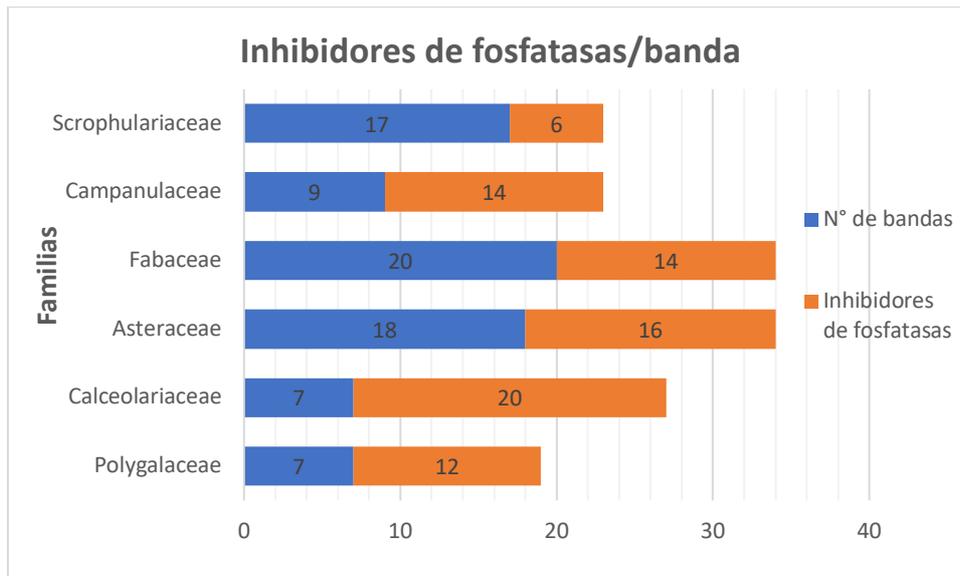


Figura 5. Inhibidores de la proteasa fosfatasa por banda electroforética, halladas en las bases de datos de proteínas e inhibidores.

De estos 426 inhibidores, se ha buscado identificar específicamente los inhibidores de la fosfatasa y se obtuvieron 82 de estos inhibidores. En este caso, la familia Calceolariaceae es la que presenta mayor porcentaje (24%), seguida de la familia Asteraceae (20%). Esto se observa en la tabla 12.

Análisis de los inhibidores de proteasas y las enzimas digestivas de las cochinillas.

Las enzimas digestivas halladas en el intestino de las cochinillas harinosas, reportadas hasta ahora, han sido la leucina aminopeptidasa, fosfatasa alcalina y la esterasa. En este estudio nos estamos enfocando en la búsqueda de fosfatasa porque se reporta como la enzima en la que se obtiene mayor reacción y encuentra en un área importante del insecto que permitiría una mayor eficacia de los inhibidores (Calatayud & Le Rü, 2006).

De estos 426 inhibidores, se ha buscado identificar específicamente los inhibidores de la fosfatasa y se obtuvieron 82 de estos inhibidores. En este caso, la familia

Calceolariaceae es la que presenta mayor porcentaje (24%), seguida de la familia Asteraceae (20%). La tabla 12 presenta el número de inhibidores que se han considerado como posibles candidatos, que corresponden a inhibidores de proteasas, y el número total de inhibidores identificados en las bases de datos. Estos, corresponden a cada banda obtenida en la electroforesis en SDS-PAGE al 15% ordenadas para cada familia de plantas.

Tabla 12. Número de proteínas candidatas que corresponden a inhibidores de la fosfatasa y número total de proteínas inhibidoras de proteasas que se han hallado en las bases de datos.

Familia	Bandas de proteínas obtenidas	Número de proteínas de las bases de datos por banda	Inhibidores candidatos (Fosfatasas)
Asteraceae	3	0	0
	4	0	0
	5	1	0
	7	2	0
	16	5	1
	18	8	8
	24	18	6
	25	9	0
	26	4	1
	36	0	0
	4	1	0
Scrophulariaceae	5	2	2
	6	2	1
	8	6	0
	9	1	0
	25	6	2
	26	10	1
	34	3	0
	10	8	0
Calceolariaceae	12	7	0
	14	13	0
	18	23	17
	25	6	2
	26	10	1
Campanulaceae	40	0	0
	9	3	0
	12	9	0

	17	8	4
	20	17	10
	35	0	0
	3	1	1
	5	8	0
	7	1	0
	8	2	0
	9	1	1
	10	4	0
	14	4	2
Fabaceae	15	1	1
	16	2	2
	18	8	6
	25	2	0
	27	3	0
	32	2	0
	34	2	1
	36	1	0
Loasaceae	1	4	0
	4	6	0
	5	8	0
Polygalaceae	11	128	5
	27	35	2
	28	23	4
	34	2	1

Todas las familias, con excepción de la familia Loasaceae, presentan al menos una banda proteica que corresponde a un inhibidor de la proteína fosfatasa (tabla 12), lo cual sugiere un posible bloqueo de la enzima alcalina fosfatasa de las cochinillas para estas familias de plantas endémicas. Se han identificado 82 inhibidores de fosfatasas, de un total global de 426 inhibidores.

La figura 6 presenta el rendimiento de proteínas inhibidoras candidatas menores a 42 kDa, que corresponden a inhibidores de la proteína fosfatasa, obtenidas de las bases de datos y que pertenecen a cada familia de plantas endémicas. Se ha considerado el número de bandas que se obtuvo en la electroforesis por cada familia y del total de inhibidores reportados se rescató a los inhibidores candidatos.

Las familias en las que se ha obtenido el mayor rendimiento de inhibidores de la fosfatasa (proteínas candidatas) son Asteráceas, Campanuláceas, Fabáceas y Calceolariaceae; con 37, 34, 33 y 29 % respectivamente. Esto concuerda con la literatura, que nos indica que las familias de plantas con más número de inhibidores ya caracterizados y estudiados se encuentran estas mismas familias (Cotabarren et al., 2020; Shamsi et al., 2016; The Uniprot Consortium, 2019).

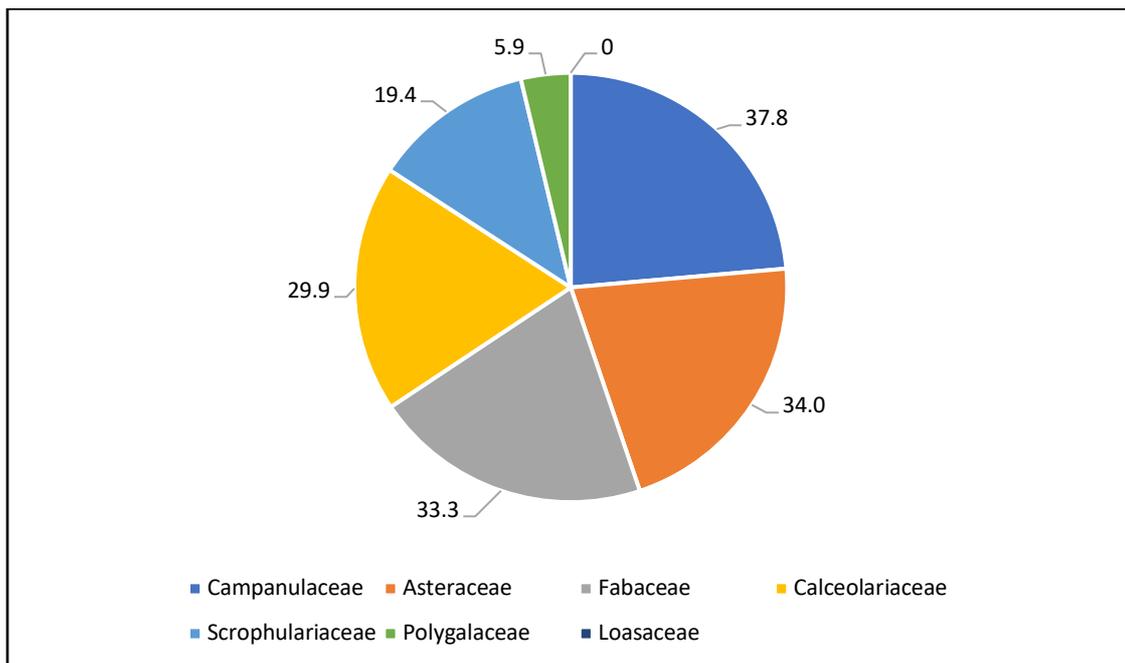


Figura 6. Rendimiento de inhibidores candidatas (Inhibidores de la fosfatasa) en relación al número de bandas proteicas obtenidas por cada familia de plantas endémicas.

A partir del estudio de plantas endémicas podemos valorizar la biodiversidad en múltiples formas, desde la obtención de material genético y proteínas hasta el nivel alimenticio. En ese sentido, lo que se ha encontrado en este estudio es que las proteínas inhibidoras pueden ser una alternativa muy importante para el control de plagas; esto es especialmente importante debido a la especificidad en su modo de acción, quiere decir que, al momento de controlar la plaga, no afectará a otros insectos benéficos para las plantas, generando una agricultura más sustentable y ecoamigable. En esta investigación se ha buscado obtener proteínas que puedan servir como insecticidas de una plaga de un cultivo muy importante para la agroexportación en el país, como lo es la uva de mesa.

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir que:

Se ha logrado determinar que existen al menos 84 inhibidores de la proteína fosfatasa dentro de todas las especies que se han trabajado en este estudio y que podrían hacer efecto contra las especies de cochinillas arenosas.

Se ha determinado que la proteína diana con potencial para inhibir la enzima fosfatasa alcalina presente en el sistema digestivo de las cochinillas es el inhibidor de la proteína fosfatasa.

Las familias de plantas endémicas en las que se ha obtenido mayor número de bandas medias por muestra son las Fabaceae y Campanulaceae.

Las familias de plantas endémicas que exhiben los rendimientos más altos del número de proteínas candidatas son Campanulaceae, Asteraceae, Fabaceae y Calceolariaceae.

VI. RECOMENDACIONES

Secuenciar el genoma de las plantas candidatas de manera que ayude a dilucidar los genes que codifican los inhibidores de la proteasa.

Se han estudiado 16 plantas endémicas, de las cuales las Asteraceae son la familia vegetal importante en el país. Por lo tanto, es necesario buscar estudiar más especies endémicas de esta familia.

Enfatizar esfuerzos en la búsqueda de inhibidores de otras enzimas de grupos importantes de plagas, ya que es un método de control amigable con el ambiente.

Caracterizar por espectrometría de masas (MS) las bandas de proteínas candidatas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El-latif, A. O. (2014). In vivo and in vitro inhibition of *Spodoptera littoralis* gut-serine protease by protease inhibitors isolated from maize and sorghum seeds. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 116, 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.09.009>
- Ahmed, M., Shah, A., Rauf, M., Habib, I., Shehzad, K., Mukhtar, Z., & Saeed, N. (2017). Ectopic Expression of the *Leptochloa fusca* and *Allium cepa* Lectin Genes in Tobacco Plant for Resistance against Mealybug (*Phenacoccus solenopsis*). *Journal of Genetics and Genome*, 1(2), 2–7.
- Ahmed, N., & Abd-Rabou, S. (2010). Host plants, geographical distribution, natural enemies and biological studies of the citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology*, 3(1), 39–47.
<https://doi.org/10.21608/eajbsa.2010.15207>
- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H., & Shaw, J. F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43(24), 534–552. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.09.002>
- Alonso, M., González, Y., Pascual, I., Gacía, R., Delfín, J., Díaz, J., & Chávez, M. A. (2013). Multifunctional proteases inhibitors of proteic nature. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 2(1), 1–9.
- Amarasekare, K. G., Chong, J.-H., Epsky, N. D., & Mannion, C. M. (2008). Effect of Temperature on the Life History of the Mealybug *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(6), 1798–1804. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-101.6.1798>
- Asiedu, E., Afun, J. V. K., & Kwoseh, C. (2014). Biology of *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae) on Five Yam Varieties in Storage. *Advances in Entomology*, 02(04), 167–175.
<https://doi.org/10.4236/ae.2014.24025>

- Brzin, J., & Kidric, M. (1996). Proteinases and Their Inhibitors in Plants : Role in Normal Growth and in Response to Various Stress Conditions. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 421–468.
<https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647936>
- Burley, S. K., David, P. R., Taylort, A., & Lipscomb, W. N. (1990). Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2 . 7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 87(September), 6878–6882.
- Calatayud, P. A., & Le Rü, B. (2006). Cassava–Mealybug Interactions. In *IRD éditions. Didactiques*. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1654-1_77
- Calatayud, P. A., Rahbé, Y., Delobel, B., Khuong-Huu, F., Tertuliano, M., & Le Rü, B. (1994). Influence of secondary compounds in the phloem sap of cassava on expression of antibiosis towards the mealybug Phenacoccus manihoti. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 72(1), 47–57.
<https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01801.x>
- Calatayud, P. A., Rahbé, Y., Tjallingii, W. F., Tertuliano, M., & Le Rü, B. (1994). Electrically recorded feeding behaviour of cassava mealybug on host and non-host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 72(3), 219–232.
<https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01821.x>
- Christeller, J. T., Laing, W. A., Markwick, N. P., & Burgess, E. P. J. (1992). Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(7), 735–746. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(92\)90052-G](https://doi.org/10.1016/0965-1748(92)90052-G)
- Clemente, M., Corigliano, M. G., Pariani, S. A., Sánchez-López, E. F., Sander, V. A., & Ramos-Duarte, V. A. (2019). Plant serine protease inhibitors: Biotechnology application in agriculture and molecular farming. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061345>
- Cordova Huanqui, A. G. (2015). *INFORME POR SERVICIOS PROFESIONALES REALIZADO EN VID (Vitis vinífera) cv. “Thompson Seedless” PARA UVA DE MESA DE EXPORTACIÓN EN AGRÍCOLA PAMPA BAJA S.A.C.*
- Cotabarren, J., Lufrano, D., Graciela, M., David, W., Investigación, C. De, Vegetales, D. P., ... La, U. N. De. (2020). Biotechnological , biomedical , and

- agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability : A systematic review. *Plant Science*, 292(October 2019), 110398.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110398>
- Cox, J. M. (1989). The Mealybug Genus *Planococcus* (Homoptera: Pseudococcidae). *Bulletin British Museum (Natural History)*, 58(1), 130.
- COX, J. M. (1981). Identification of *Planococcus citri* (Homoptera: Pseudococcidae) and the description of a new species. *Systematic Entomology*, 6(1), 47–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1981.tb00012.x>
- Daane, K. M., Almeida, R. P. P., Bell, V. A., Walker, J. T. S., Botton, M. S., Fallahzadeh, M., ... Zaviezo, T. (2012). Biology and management of mealybugs in Vineyards. In *Biology and Management of Mealybugs in Vineyards*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7>
- Danzig, E. M., & Gavrilov, I. A. (2010). Mealybugs of the genera *Planococcus* and *Crisicoccus* (Sternorrhyncha: Pseudococcidae) of Russia and adjacent countries. *Zoosystematica Rossica*, 19(1), 39–49.
- Dastranj, M., Bandani, A. R., & Mehrabadi, M. (2013). Age-specific digestion of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) and inhibition of proteolytic and amylolytic activity by plant proteinaceous seed extracts. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 16(3), 309–315.
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.04.009>
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., & Ceci, L. R. (2002). PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 347–348. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.347>
- Drinkwater, N., Malcolm, T. R., & McGowan, S. (2019). M17 aminopeptidases diversify function by moderating their macromolecular assemblies and active site environment. *Biochimie*, 166, 38–51.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.01.007>
- Fabbro, D. (2015). 25 Years of small molecular weight kinase inhibitors: Potentials and limitations. *Molecular Pharmacology*, 87(5), 766–775.
<https://doi.org/10.1124/mol.114.095489>

- Farady, C. J., & Craik, C. S. (2010). Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. *ChemBioChem*, 11(17), 2341–2346.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201000442>
- Fayyaz-ur-Rehman, M., Tariq, M. I., Aslam, M., Khadija, G., & Iram, A. (2009). Inhibition Studies of Cellulolytic Activities Isolated from *Planococcus Citri*. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 2(1), 8–11.
<https://doi.org/10.2174/1874940200902010008>
- Flint, M. L. (2016). Pest Notes: Mealybugs. *University of California Statewide IPM Program*, 74174.
- Gilbert, L., & Gill, S. (2010). *Insect pharmacology* (1st ed.). Retrieved from <https://www.elsevier.com/books/insect-pharmacology/gilbert/978-0-12-381447-0>
- Gonzales Luna, M., & La Rossa, F. (2016). Parámetros biológicos y poblacionales de *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) sobre dos cultivares de *Vitis vinifera*. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 75(1–2), 45–54.
- Grizanova, E. V, Krytsyna, T. I., Surcova, V. S., & Dubovskiy, I. M. (2019). The role of midgut nonspecific esterase in the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 166(March), 107208. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107208>
- Grosse-Holz, F. M., & Van der Hoorn, R. A. L. (2016). Juggling jobs: Roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. *New Phytologist*, 210(3), 794–807. <https://doi.org/10.1111/nph.13839>
- Habib, H., & Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(3), 68–85.
<https://doi.org/ISSN 1538-2273>
- Hellinger, R., & Gruber, C. W. (2019). Peptide-based protease inhibitors from plants. *Drug Discovery Today*, 24(9), 1877–1889.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.05.026>
- Jakka, S. R. K., Gong, L., Hasler, J., Banerjee, R., Sheets, J. J., Narva, K., ...

- Jurat-Fuentes, J. L. (2016). Field-evolved mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1023–1034.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02871-15>
- Kaur, R., Agrawal, N., & Bhatnagar, R. (2007). Purification and characterization of aminopeptidase N from *Spodoptera litura* expressed in Sf21 insect cells. *Protein Expression & Purification*, 54(March), 267–274.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.03.003>
- Kehr, J., Buhtz, A., & Giavalisco, P. (2005). Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, 5, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-11>
- Kudoh, H. (2016). Molecular phenology in plants: In natura systems biology for the comprehensive understanding of seasonal responses under natural environments. *New Phytologist*, 210(2), 399–412.
<https://doi.org/10.1111/nph.13733>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lawrence, P. K., & Koundal, K. R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(1), 93–109.
<https://doi.org/10.2225/vol5-issue1-fulltext-3>
- Liew, S. M., Tay, S. T., & Puthuchery, S. D. (2013). Enzymatic and molecular characterisation of leucine aminopeptidase of *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Microbiology*, 13(110). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-110>
- Miller, D. R., & Miller, G. L. (2002). Redescription of *Paracoccus marginatus* Williams and Granara de Willink (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae), including descriptions of the immature stages and adult male. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 104(1), 1–23.
- Moreno Salmerón, J. (2011). *Prospección e identificación de cochinillas algodonosas (Hemiptera: Pseudococcidae) y búsqueda de parasitoides asociados en cultivos hortícolas protegidos del poniente almeriense*.

Universidad de Almeria.

- Muniappan, R., Shepard, B. M., Watson, G. W., Carner, G. R., Sartiami, D., Rauf, A., & Hammig, M. D. (2008). First Report of the Papaya Mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae), in Indonesia and India. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 25(1), 37–40.
<https://doi.org/10.3954/1523-5475-25.1.37>
- Murby, M., Uhlén, M., & Ståhl, S. (1996). Upstream Strategies to Minimize Proteolytic Degradation upon Recombinant Production in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 7(2), 129–136.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/prep.1996.0018>
- Otlewski, J., Jelen, F., Zakrzewska, M., & Oleksy, A. (2005). The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO Journal*, 24(7), 1303–1310.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600611>
- Rahbé, Y., Sauvion, N., Febvay, G., Peumans, W. J., & Gatehouse, A. M. R. (1995). Toxicity of lectins and processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 76(2), 143–155.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2012). MEROPS : the database of proteolytic enzymes , their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 40(D), 343–350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr987>
- Ross, L., Dealey, E. J., Beukeboom, L. W., & Shuker, D. M. (2011). Temperature, age of mating and starvation determine the role of maternal effects on sex allocation in the mealybug *Planococcus citri*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(5), 909–919. <https://doi.org/10.1007/s00265-010-1091-0>
- Ryan, C. A. (1990). Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), 425–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>
- Ryan, C. A., & Green, T. R. (1974). Proteinase inhibitors in natural plant protection. In *Recent Advances in Phytochemistry* (Vol. 8, pp. 123–140). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-612408-8.50012-3>

- Sanburg, L., Kramer, K. J., Kezdy, F. J., Law, J. H., & Oberlander, H. (1975). Role of Juvenile Hormone Esterases and Carrier Proteins in Insect Development. *Nature*, 253(24), 266–267.
- Seni, A., & Sahoo, A. K. (2014). Biology of the papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* Williams and *granara de willink* (Hemiptera: pseudococcidae). *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(4), 875. <https://doi.org/10.5958/2230-732x.2014.01399.0>
- Shamsi, T. N., Parveen, R., & Fatima, S. (2016). Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 1120–1133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069>
- Sharma, K. (2015). Protease inhibitors in crop protection from insects. *Int J Curr Res Aca Rev*, 3(2), 55–70.
- Soler, R., Scatoni, I., & Núñez, S. (2001). *Bioecología y estrategia de control del "Chanchito blanco" de la vid en la zona sur del Uruguay*. (1930).
- Sridhar, V. (2015). *Proteomic Studies of Grape Xylem Tissue and S*Sridhar, V. (2015). *Proteomic Studies of Grape Xylem Tissue and Sap*. The Florida Agricultural and Mechanical University.ap. The Florida Agricultural and Mechanical University.
- Stevens, J. A., Dunse, K. M., Guarino, R. F., Barbeta, B. L., Evans, S. C., West, J. A., & Anderson, M. A. (2013). The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(2), 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.11.006>
- Teodoro Rezende, T. M., Romão, T. P., Batista, M., Berry, C., Adang, M. J., & LoboSilva-Filha, M. H. N. (2017). Identification of Cry48Aa/Cry49Aa toxin ligands in the midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 88, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.08.001>
- The Uniprot Consortium. (2019). UniProt : a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), 506–515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>

- University of California, I. (2015). UC IPM: UC Management Guidelines for Vine Mealybug on Grape. Retrieved November 25, 2019, from UC ANR Publication 3448 website: <http://ipm.ucanr.edu/PMG/r302301911.html>
- Walker, V. K., Geer, B. W., & Williamson, J. H. (1980). Dietary modulation and histochemical localization of leucine aminopeptidase activity in *Drosophila melanogaster* larvae. *Insect Biochemistry*, *10*(5), 543–548.
- Walton, V. M., & Pringle, K. L. (2017). Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: Pseudococcidae), a Key Pest in South African vineyards. A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, *25*(2), 54–62. <https://doi.org/10.21548/25-2-2140>
- Wu, H., Zhang, Y., Liu, P., Xie, J., He, Y., Deng, C., ... Pang, H. (2014). Effects of transgenic Cry1Ac + CpTI cotton on non-target mealybug pest *Ferrisia virgata* and its predator *Cryptolaemus montrouzieri*. *PLoS ONE*, *9*(4), 32–35. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095537>
- Yuan, X., Zhao, M., Wei, J., Zhang, W., Wang, B., Khaing, M. M., & Liang, G. (2016). New insights on the role of alkaline phosphatase 2 from *Spodoptera exigua* (Hübner) in the action mechanism of Bt toxin Cry2Aa. *Journal of Insect Physiology*, *98*, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.12.004>
- Zhang, P. J., Huang, F., Zhang, J. M., Wei, J. N., & Lu, Y. Bin. (2015). The mealybug *Phenacoccus solenopsis* suppresses plant defense responses by manipulating JA-SA crosstalk. *Scientific Reports*, *5*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep09354>
- Zhao, M., Yuan, X., Wei, J., Zhang, W., Wang, B., Myint Khaing, M., & Liang, G. (2017). Functional roles of cadherin, aminopeptidase-N and alkaline phosphatase from *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa. *Scientific Reports*, *7*(7), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep46555>
- Zhu-Salzman, K., & Zeng, R. (2015). Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. *Annual Review of Entomology*, *60*(1), 233–252. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020816>

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Gel de Electroforesis

- a. En un tubo de Eppendorf se prepara aproximadamente 200 μg de proteína en 90 μl de tampón de corrida (Laemmli, 1970), seguidamente se procede a incubar a 95°C por 5 min que sirve para la activación de las proteínas.
- b. Luego se centrifugó a 10500 rpm por 5 min a 4°C y se usó el sobrenadante (Kehr, Buhtz, y Giavalisco, 2005).
- c. El armado del gel 1D SDS-PAGE se realizó de acuerdo con una metodología anteriormente descrita (Kehr y otros, 2005; Sridhar, 2015).
- d. Se usó un equipo MiniProtean para electroforesis (Bio-Rad, Hercules, CA) y se sometió a 100 V por 30 – 40 min hasta que las primeras bandas llegaron antes del final del gel.
- e. Para teñir el gel, se sumergió en azul de Coomassine por 25 – 35 min para que se puedan visualizar las bandas proteicas. A continuación, se lavaron con el tampón decolorante por 20-30 min y seguidamente con agua destilada para quitar todos los residuos.
- f. Una vez que se ha quitado el azul de comassine del gel se lleva al fotodocumentador para geles de poliacrilamida para observar las bandas que se han generado en la corrida electroforética.
- g. Se puede guardar el gel para realizar la digestión en tripsina y posterior caracterización de las bandas de interés.