

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN
Y DESARROLLO, A.C**

**Estudio del mecanismo insecticida de la lectina de Palo
fierro PF2 sobre *Zabrotes subfasciatus*: resistencia
proteolítica y la interacción con glicoconjugados del
intestino medio**

POR:

IRLANDA LAGARDA DÍAZ

**TESIS APROBADA POR LA COORDINACIÓN DE CIENCIA DE
LOS ALIMENTOS**

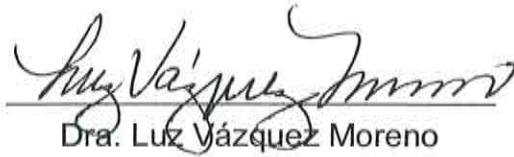
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA.

AGOSTO DE 2008

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Irlanda Lagarda Díaz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado en Maestría en Ciencias.



Dra. Luz Vázquez Moreno

Directora de Tesis



M. en C. Ana María Guzmán Partida



M. en C. María del Refugio Robles Burgueño




Dr. Gabriel Urbano Hernández

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin el permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de las tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por permitirme formar parte del Programa de Maestría en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

Con profunda admiración y respeto, agradezco a mi directora de tesis, Dra. Luz Vázquez Moreno por su espíritu de verdadera asesora que fue mi guía en estos dos años, en los cuales compartió siempre de manera sencilla y alegre su conocimiento.

Asimismo, agradezco a mis asesores, M. en C. Refugio Robles Burgueño, Dr. Gabriel Urbano Hernández y en especial a M. en C. Ana María Guzmán Partida por sus sugerencias y disponibilidad para la realización de este estudio.

A la Dra. Gabriela Ramos Clamont por compartir su experiencia y conocimiento.

A Sofía O. López Valenzuela del Hospital Infantil del Estado de Sonora por la disponibilidad y apoyo que siempre me mostró para enseñarme técnicas histoquímicas.

A el laboratorio de la Dra. Mayra de la Torre por facilitarme el uso del estereoscopio.

A mis compañeros del laboratorio: Ana I. Ledesma, Adriana Gándara, Fernando Félix y Andre-i Sarabia, por brindarme su apoyo y amistad.

A todos los maestros titulares y auxiliares de las asignaturas, por transmitir sus valiosos conocimientos.

A todos mis compañeros de maestría por compartir momentos gratos de convivencia.

A todo el personal administrativo y docente de CIAD.

A todas las personas que con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr ésta realidad.

DEDICATORIA

Con amor y admiración a mis padres por enseñarme el valor del trabajo y la responsabilidad, por darme la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprensido. Quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. Gracias, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su apoyo y amor incondicional. Mi superación se las debo a ustedes y esta será la mejor de las herencias.

Con amor a Emmanuel por todo su apoyo y compañía a lo largo de este tiempo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Lectinas de Leguminosas.....	3
Lectinas de Leguminosas Silvestres.....	5
Lectinas de Palo Fierro (<i>Olneya tesota</i>).....	5
Actividad Insecticida de las Lectinas de Plantas.....	6
Toxicidad de las Lectinas de Palo Fierro para <i>Z. subfasciatus</i>	12
Mecanismos de Toxicidad de Lectinas para Insectos.....	12
OBJETIVOS	17
General.....	17
Específicos	17
MATERIALES Y METÓDOS	18
Materiales	18
Extracción y Purificación de la Lectina de Palo Fierro PF2	19
Estabilidad de PF2 a la Proteólisis por Enzimas Digestivas de <i>Z. subfasciatus</i>	19
Ensayos lectino-histoquímicos	20
Preparación del Tejido	20
Interacción de PF2 con Estructuras del Intestino Medio de <i>Z. subfasciatus</i>	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
Extracción y Purificación de la Lectina de Palo Fierro (PF2).....	22

Estabilidad de PF2 a la proteólisis por enzimas digestivas de Z.	
<i>subfasciatus</i>	23
Ensayos Histoquímicos	25
Interacción de PF2 con Estructuras del Intestino Medio de Z.	
<i>subfasciatus</i>	25
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras de los oligosácaridos complejos de la fetuína reconocidos por PHA-E y por PF2	7
Figura 2. Sistema digestivo de insectos	13
Figura 3. Puntos clave involucrados en el mecanismo insecticida de lectinas	14
Figura 4. Cromatograma de purificación de la lectina PF2 de palo fierro (<i>Olneya tesota</i>) por afinidad en una columna de agarosa-fetuína	22
Figura 5. SDS-PAGE e inmunodetección de la digestión de la lectina PF2 por un extracto de enzimas digestivas de <i>Z. subfasciatus</i> incubada a diferentes tiempos	24
Figura 6. SDS-PAGE e inmunodetección de la digestión de la lectina PHA-E por un extracto de enzimas digestivas de <i>Z. subfasciatus</i> incubada a diferentes tiempos	24
Figura 7. Control negativo de intestinos de larvas de <i>Z. subfasciatus</i> teñidos con hematoxilina	26
Figura 8. Análisis comparativo del reconocimiento de las lectinas PF2 y PHA-E por glicoproteínas del intestino de larvas de <i>Z. subfasciatus</i>	28

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Lectinas de plantas que causan toxicidad al ingerirse por insectos	10
Tabla 2. Plantas transgénicas que expresan genes que codifican para lectinas que les confieren resistencia a insectos	11
Tabla 3. Número de huevos y emergencia de <i>Z. subfasciatus</i> en semillas naturales y artificiales	12
Tabla 4. Resumen de los resultados de la intensidad de marcaje de PF2 y PHA-E con el intestino medio de <i>Z. subfasciatus</i>	26

RESUMEN

Una de las plagas más importantes del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en muchos países es el brúquido *Zabrotes subfasciatus*. Así mismo, algunas semillas de leguminosas silvestres contienen compuestos que presentan actividad insecticida, tales como las lectinas. La lectina PF2 purificada de semillas de Palo fierro (*Olneya tesota*) ha mostrado ser tóxica para este insecto a concentraciones encontradas en cualquier semilla de leguminosa. En este trabajo se estudió el mecanismo insecticida de PF2 sobre *Z. subfasciatus*, determinando la estabilidad proteolítica y la interacción con los glicoconjugados del intestino medio del insecto. Para evaluar la estabilidad proteolítica, PF2 se incubó a diferentes tiempos con un extracto del intestino medio del insecto. A la par se comparó con PHA-E, lectina no tóxica para *Z. subfasciatus*. Los resultados de SDS-PAGE e inmunodetección indicaron que PF2 es resistente a la digestión hasta por 24 horas de incubación, mientras que PHA es digerida a partir de las 2 horas. Por otro lado, PF2 y PHA-E, previamente biotiniladas, fueron incubadas con secciones de intestinos medios de larvas de diferentes estadios y mostraron su afinidad hacia las células epiteliales del intestino, pero con diferente intensidad. PF2 interactuó con la membrana peritrófica y microvellosidades, mientras que PHA-E no. Las diferencias en la resistencia a la proteólisis y la interacción con glicoconjugados pueden explicar en parte que PF2 sea tóxica a *Z. subfasciatus* mientras que PHA-E no.

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas en la producción agrícola debido a plagas y enfermedades se estiman en el 37% de la producción mundial, del cual el 13% es causado por insectos. El incremento en las demandas agrícolas y la intensificación de sus prácticas han aumentado el problema del daño por plagas y por lo tanto su control (Macedo y col., 2007).

En Latinoamérica, una de las plagas de insectos más importantes es el brúquido *Zabrotes subfasciatus* que ataca las semillas de leguminosas durante su almacenamiento, afectando la calidad y estabilidad de la producción. *Z. subfasciatus*, mejor conocido como "gorgojo mexicano del frijol"; pertenece al orden Coleoptera y a la familia Bruchidae. Este insecto es la principal plaga para leguminosas como el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Howe y Currie, 1964; Macedo y col., 2002). Se estima que del 30 al 40 % de las pérdidas en la producción total de frijol en México es provocada por este gorgojo. Para su control, generalmente se requiere del uso de insecticidas químicos los cuales pueden llegar a ser tóxicos para humanos y animales domésticos dañando el medio ambiente (Vasconcelos y Oliveira, 2004).

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa contra sus depredadores. Como parte de este mecanismo, las plantas sintetizan una variedad de moléculas llamadas "proteínas de defensa" (Sauvion y col., 2004). Éstas pueden actuar como factores antifisiológicos de insectos y humanos. Las proteínas de defensa en leguminosas más conocidas son: las arcelinas, inhibidores de α -amilasa y las lectinas (Carlini y Grossi-de-

Sà, 2002). En particular, las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas clasificadas en base a su habilidad para unirse de manera específica y reversible a azúcares simples ó carbohidratos complejos. Su principal característica es la de interactuar específicamente con carbohidratos libres o con glicoconjugados en la superficie membrana celular (Lis y Sharon, 1986).

Las lectinas pueden reconocer glicoconjugados que están presentes en otros organismos, tales como bacterias, hongos, organismos vertebrados e invertebrados (Elgavish y Sanan., 2001; Loris y col., 1998). En insectos, como en otras especies, las glicoproteínas son los principales constituyentes del tracto digestivo y se ha demostrado que el intestino es un blanco para las lectinas de defensa en plantas (Macedo y col., 2004). Así mismo se ha reportado que el mecanismo insecticida mediado por lectinas involucra varios requisitos en los que se incluyen la resistencia a la proteólisis enzimática, interacción con glicoconjugados de la membrana peritrófica y con enzimas del tracto gastrointestinal (Du y col., 2000; Macedo y col., 2007).

Estudios previos demostraron que la lectina PF2 de Palo fierro es tóxica para *Z. subfasciatus* a niveles encontrados en las semillas de leguminosas (Muñoz-Hernández, 2001). Por lo tanto, estudios sobre el modo acción de PF2 sobre *Z. subfasciatus* aumentaran el entendimiento del mecanismo insecticida de lectinas, donde las interacciones lectina-glicoproteína juegan un papel central.

ANTECEDENTES

Lectinas de Leguminosas

Las lectinas de leguminosas son el grupo de fitohemagglutininas más estudiadas, habiéndose caracterizado a más de 1000 lectinas. Éstas constituyen hasta el 10 % de la proteína total de la semilla (Sharon y Lis, 1990; 1986). Su estructura se encuentra compuesta por dos o cuatro subunidades, idénticas o diferentes cuyas masas moleculares varían de 25–30 kDa, llegando en algunos casos hasta los 50 kDa (Lis y Sharon, 1986; Majumder y col., 2004). Los miembros de la familia de las lectinas de leguminosas conocidos a la fecha tienen un estado oligomérico, como dímeros o tetrámeros (Sharon y Lis, 1990). La capacidad que muestran algunas lectinas para unirse a carbohidratos puede depender directamente de la presencia de iones divalentes como Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} (Loris y col., 1998; Hernández y col., 2005).

Las lectinas vegetales de una misma familia muestran una alta similitud en su secuencia de aminoácidos, así como en sus estructuras secundarias y su organización tridimensional (Hernández y col., 2005). La estructura primaria de más de 80 lectinas de leguminosas se ha determinado mediante técnicas químicas y de biología molecular (Imberty y col., 2000). Estas secuencias han demostrado similitudes mayores al 35% (Loris y col., 1998). Mientras que en las regiones variables se encuentran los sitios de unión a carbohidratos.

Además de presentar una afinidad por monosacáridos, las lectinas pueden reconocer estructuras oligosacáridas más complejas. Este reconocimiento puede ser en la posición terminal o intermedia (Loris y col., 1998). El dominio de reconocimiento a carbohidratos de las lectinas se divide en dos subsitios, el

primero es el sitio donde se da la interacción con el monosacárido, mientras el segundo, permite una interacción con oligosacáridos más complejos. El sitio de reconocimiento de las lectinas de leguminosas está compuesto por tres aminoácidos invariantes: ácido aspártico, asparagina y un residuo aromático o una leucina. Lo anterior sugiere que la especificidad de las lectinas está dada por la orientación del carbohidrato en el sitio de reconocimiento (Hernández y col., 2005).

Las lectinas han sido clasificadas típicamente en base a su especificidad. Así, se han identificado lectinas que reconocen, manosa/glucosa, galactosa/N-acetil galactosamina, L-fucosa, N-acetilglucosamina, ácido siálico y oligosacáridos complejos (Loris y col., 1998; Van Damme y col., 1998). Sin embargo, la mayoría de las lectinas de plantas pueden ser clasificadas en base a su estructura molecular en la cual podemos distinguir siete familias de lectinas. Estas familias incluyen: (1) lectinas de tipo amaranto, (2) lectinas del floema de cucurbitáceas, (3) lectinas que unen quitina, (4) lectinas de tipo GNA, (5) lectinas de tipo jabalina, (6) lectinas de leguminosas y (7) lectinas con dominios tipo ricina (Van Damme y col., 1998). Recientemente ha sido reportada la presencia en plantas de lectinas homologas a *Agaricus bisporus* (Peumans y col., 2007) y lectinas homologas a la clase de quitinasas tipo V (Van Damme y col., 2007).

La interacción de la lectina con estructuras oligosacáridas es altamente específica. Las lectinas de *P. vulgaris* (PHA) consisten de tetrámeros con subunidades de dos tipos, PHA-E y PHA-L. Estas subunidades son muy similares entre sí, además de compartir similitudes con arcelinas e inhibidores de α -amilasa (Chrispeels y Raikhe, 1991). A pesar de esta alta similitud, las subunidades reconocen carbohidratos diferentes presentes en la superficie celular. Las lectinas de frijol PHA-E reconocen eritrocitos mientras que PHA-L leucocitos (Leavitt y col., 1977; Cummings y Kornfeld, 1982a; 1982b).

Información adicional sobre el sitio de unión a carbohidratos de las lectinas PHA ha sido proporcionada por estudios de lectinas expresadas en bacterias (Kaneda y col., 2002). Se sabe que las lectinas PHA son glicoproteínas y que aún cuando son expresadas en bacterias (con ausencia de la parte carbohidrato), retienen su afinidad por glicoproteínas. Otro punto muy importante, es que cambios en los aminoácidos que intervienen en el sitio de unión al carbohidrato provocan cambios en la especificidad de PHA (Kaneda y col., 2002).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que las lectinas están involucradas en actividades que requieren múltiples sitios de unión a carbohidratos, tales como estimulación mitogénica y aglutinación de células entre otras (Elgavish y Sanan, 2001).

Lectinas de Leguminosas Silvestres

Ortega-Fonseca (1996), Vázquez-Moreno y col. (2000) y Guzmán-Partida y col. (2004), purificaron y caracterizaron algunas lectinas de semillas de leguminosas silvestres del desierto de Sonora. En todos los casos las lectinas purificadas de *Cercidium praecox*, *Caesalpinia caladenia*, *Olneya tesota* y *Acacia constricta* reconocen oligosacáridos complejos de tiroglobulina, fetuina y asialofetuina. Este reconocimiento no requiere de la adición de metales, contrario a lo que sucede con PHA y otras lectinas de leguminosas cultivadas.

Lectinas de Palo Fierro (*Olneya tesota*)

El palo fierro (*Olneya tesota*) es una leguminosa silvestre del Desierto de Sonora. Sus semillas han servido como fuente de alimento para la población

nativa de la región sonorense. Se han purificado tres lectinas a partir de sus semillas, denominadas PF1, PF2 y PF3, siendo PF2 la que se encuentra en mayor proporción. La lectina PF1 es un trímero de subunidades de 45 kDa, PF2 es tetramérica, con subunidades de 33 kDa, mientras que PF3 es un monómero de 66 kDa (Vázquez-Moreno y col., 2000). La lectina PF1, presenta afinidad por monosacáridos libres como la mayoría de las lectinas de leguminosas, mientras que PF2 y PF3 son inhibidas exclusivamente por oligosacáridos complejos derivados de glicoproteínas (fetuina, asialofetuina y tiroglobulina) y no por mono o disacáridos. En particular, PF2 es una proteína glicosilada con oligosacáridos tipo N, principalmente altos en manosa (López-Laredo, 2005).

La lectina PF2 presenta varias isoformas, de las cuales la IF2 es la más abundante (López-Laredo, 2005). Por otro lado, se han analizado las secuencias amino terminal y algunas secuencias internas de la lectina PF2, mostrando una similitud de aproximadamente 80% con PHA-E. A pesar de que PF2 es tan parecida estructuralmente a PHA su reconocimiento por estructuras oligosacáridas es diferente. PF2 reconoce oligosacáridos del tipo complejo triantenario tetrasialilado, mientras que PHA-E y PHA-L reconocen estructuras del tipo biantenarias y tetrantenarias, respectivamente (Figura 1) (Urbano-Hernández, 2007).

Actividad Insecticida de las Lectinas de Plantas

Las lectinas de leguminosas desempeñan un papel de defensa en las plantas contra sus depredadores (Majumder y col., 2004). La importancia de la función que realizan las lectinas se ve reflejada en el hecho de que estas moléculas se han mantenido a través de la evolución. El papel de defensa de las lectinas se basa en la unión específica de éstas a receptores glicosilados localizados en los

organismos (Peumans y Van Damme, 1995). Esta característica representa su uso potencial como agentes insecticidas naturales.

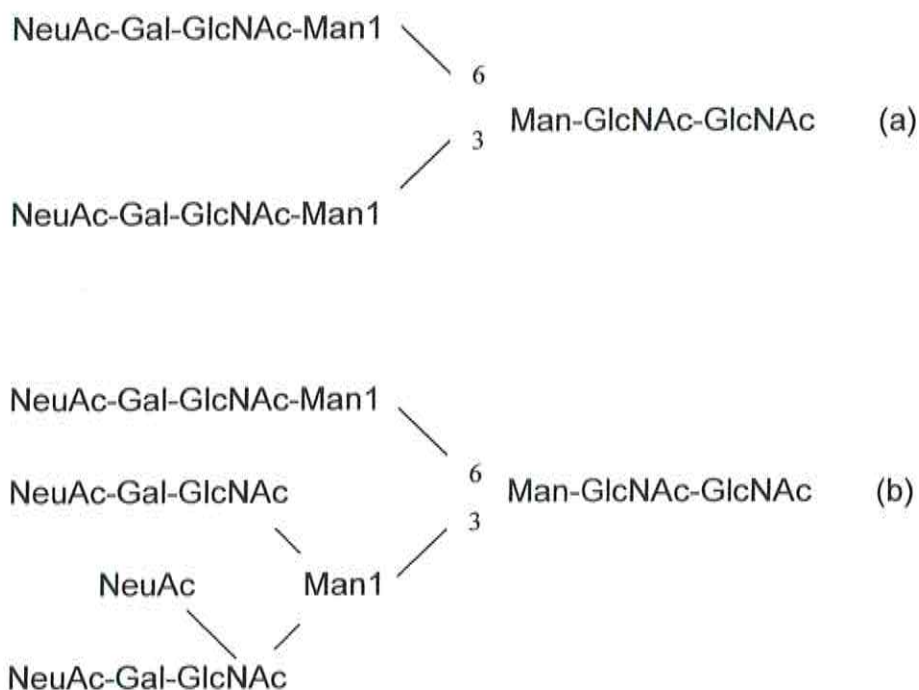


Figura 1. Estructuras de los oligosacáridos complejos de la fetuína reconocidos por (a) PHA-E y por PF2 (b). Tomado de: Urbano-Hernández, 2007.

La actividad insecticida de las lectinas ha sido reportada para un gran número de insectos plagas (Tabla 1), pertenecientes a los ordenes de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera y Homoptera (Majumder y col., 2004). La aglutinina de germen de trigo WGA, es tóxica para lepidópteros y coleópteros (Carlini y Grossi-de-Sa, 2002). Mientras la aglutinina de *Galantus nivalis* (GNA) es tóxica para homópteros, coleópteros y lepidópteros (Du y col., 2000).

Esta actividad insecticida ha sido probada mediante ensayos biológicos de alimentación y estudios con plantas transgénicas (Macedo y col., 2002; Rahbe y

col., 1995; Gatehouse y col., 1997; Zhou y col., 1998). En general los niveles de lectina incorporados en las dietas artificiales para pruebas orales de toxicidad varían de 0.5 a 50 mg/g ó 1500 µg/mL en la dieta. Los parámetros que indican el efecto dañino de las lectinas en insectos son la disminución del peso y talla y un cambio de color en la larva. Por otro lado, un incremento en la mortalidad de la larva, inhibición de la alimentación, efectos anti-metabólicos, retraso en el tiempo total de desarrollo y reducción en la emergencia de adultos también son indicadores del daño provocado por lectinas en insectos (Vasconcelos y Oliveira, 2004).

Las lectinas de plantas monocotiledoneas, especialmente las que se unen a manosa y N-acetilglucosamina son altamente efectivas para atacar plagas (Majumder y col., 2004). Éstas provienen de diferentes familias incluyendo las de gramíneas como la lectina de trigo WGA. No obstante, la sensibilidad de diferentes especies de insectos a los efectos insecticidas por la ingestión de lectinas es variable (Bandyopadhyay y col., 2001).

Las semillas del frijol común, contienen un grupo de proteínas de defensa que forman parte de la familia fitohemaglutinina PHA-arcelina-inhibidor de alfa amilasa (Chrispeels y Raikhel, 1991; Mirkov y col., 1994; Peumans y Van Damme, 1995). Tanto PHA como arcelina reconocen carbohidratos complejos. Las proteínas de estas familias muestran actividades insecticidas y protegen al frijol contra el ataque de depredadores por mecanismos que aún no son completamente elucidados.

La mayoría de los bioensayos con lectinas han sido evaluados con dietas artificiales enfocándose principalmente en *Callosobruchus maculatus* y *Z. subfasciatus*. Para *Z. subfasciatus* se ha reportado que la lectina de *Talisia esculenta* (TEL) cuando fue introducida en una dieta artificial al 2% causó el 90% de la mortalidad del brúquido (Macedo y col., 2002). Mientras que la lectina

de *Bauhinia monandra* (BmoLL) causó sólo el 50% de la mortalidad (Macedo y col., 2007). Las lectinas específicas para N-acetilglucosamina (GlcNAc) son tóxicas para algunos insectos, como *C. maculatus* (Chrispeels y Raikhel, 1991; Macedo y col., 2003). La Concanavalina A (Con A) específica para manosa/glucosa ha presentado actividad insecticida para la plaga del tomate *Lacanobia oleracea* (Fitches y col., 1997).

Por otra parte, se han introducido los genes que codifican para lectinas en plantas que son susceptibles al ataque de insectos. Lo anterior con la finalidad de volver a las plantas resistentes al ataque de plagas (Tabla 1). La lectina de *Galanthus nivalis* (GNA), específica para manosa, es la que más se ha introducido en una variedad de plantas y es considerada para su posible utilización en la tecnología transgénica, debido a que es tóxica para un gran número de insectos plaga económicamente importantes (Tabla 2). (Vasconcelos y Oliveira, 2004).

Sin embargo, el uso de las lectinas como insecticidas naturales se encuentra limitado por varias razones. La primera es que si la lectina solamente reduce el crecimiento larval, entonces los insectos pueden compensar incrementando su ingesta de alimento (Bell y col., 2001; Melander y col., 2003). Así mismo, si una lectina interactúa solamente con azúcares simples, entonces los azúcares presentes en la dieta podrían competir por el sitio de unión al carbohidrato y reducir la toxicidad. Macedo y col. (2004) demostraron que la toxicidad de la lectina *Talisia esculenta* (TEL) para *C. maculatus* fue abolida cuando se agregó manosa en la dieta.

Tabla 1. Lectinas de plantas que causan toxicidad por ingestión en insectos.
Modificado de: Vasconcelos y Oliveira, 2004.

LECTINA	INSECTO	PLANTA
Específicas p/manosa		
ASA(<i>Allium sativum</i>)	<i>Laodelpha striatellus</i>	Arroz
	<i>Nilaparvata lugens</i>	
	<i>Myzus persicae</i>	Patata, durazno
	<i>Dysdercus cingulatus</i>	Algodón, maíz
GNA(<i>Galanthus nivalis</i>)	<i>Callosobruchus maculatus</i>	
	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Chícharo
	<i>Antitrogus sanguineus</i>	Caña de azúcar
	<i>Aulacorthum solani</i>	Patata
	<i>M. persicae</i>	Patata, durazno
	<i>Lacanobia oleracea</i>	Tomate
	<i>Maruca vitrata</i>	Judía
	<i>L. striatellus</i>	Arroz
<i>N. lugens</i>		
Específicas para manosa/ glucosa		
Con A (<i>Canavalia ensiformis</i>)	<i>A. pisum</i>	Chícharo
	<i>Aphis gossypii</i>	Algodón, melón
	<i>Aulacorthum solani</i>	Patata
	<i>Macrosiphum albifrons</i>	Pimiento
	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Manzana, frijol, brócoli
	<i>M. persicae</i>	Durazno, patata
	<i>T. proserpina</i>	Taro
	<i>A. pusim</i>	Chícharo
ACA (<i>Amaranthus caudatus</i>)	<i>C. maculatus</i>	Judía
GSII (<i>Griffonia simplicifolia</i>)	<i>C. maculatus</i>	Judía
TEL (<i>Talisia esculenta</i>)	<i>Z. subfasciatus</i>	Frijol
WGA (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>D. undecimpunctata;</i>	Maíz
	<i>O. nubilaris</i>	Maíz
	<i>Antitrogus sanguineus</i>	Caña de azúcar
	<i>H. postica</i>	Alfalfa
	<i>L. erysimi</i>	Mostaza
Específicas para galactosa		
BmoLL(<i>Bauhinia monandra</i>)	<i>C. maculatus</i>	Judía
	<i>Z. subfasciatus</i>	Frijol
RCA (<i>Ricinus communis</i>)	<i>D. undecimpunctat</i>	Maíz

Tabla 2. Plantas transgénicas que expresan genes que codifican para lectinas que les confieren resistencia a insectos. Tomado de: Vasconcelos y Oliveira, 2004.

Planta transformada	Lectina	Tipo de plaga
Maíz	WGA	<i>Ostrinia nubilalis</i> <i>Diabrotica undecimnotata</i>
Mostaza <i>Arabidopsis thaliana</i>	WGA	<i>Lipaphis erysimi</i>
	PHA-E, L	<i>Lacanobia oleracea</i>
Papa	GNA	<i>Aulacorthum solana</i> <i>Myzus persicae</i> <i>L. oleracea</i> <i>Aphidius ervi</i>
	Con A	<i>L. oleracea</i>
Arroz	GNA	<i>Nilaparvata lugens</i> <i>Nephotettix virescens</i> <i>Cnaphalocrocis medianalis</i> <i>Laodelphax striatellus</i>
Caña de azúcar	GNA	<i>Eoreuma loftini</i> <i>Diatraea saccharalis</i> <i>Parallorhagos pyralophagus</i>
Tabaco	PSA GNA	<i>Heliothis virescens</i> <i>M. persicae</i> <i>Helicoverpa zea</i>
Trigo	GNA	<i>Sitobion avenae</i>

En base a lo anterior es importante conocer si la presencia de los azúcares en la dieta de los insectos puede reducir la toxicidad de las lectinas y generar resultados erróneos en pruebas de toxicidad. Finalmente, el uso de muchas de las lectinas de leguminosas está restringido debido a su toxicidad para mamíferos y/o insectos no blanco (Carlini y Grossi de Sa, 2002).

Toxicidad de las Lectinas de Palo Fierro para *Z. subfasciatus*

Estudios realizados con semillas de palo fierro y semillas artificiales preparadas con harina de frijol común adicionadas con PF2 al 0.5% y 1%, demostraron una reducción en la oviposición con respecto a las semillas control (Tabla 3). Además en ninguno de los casos se observó emergencia del insecto (Muñoz-Hernández, 2001).

Tabla 3. Número de huevos y emergencia de *Z. subfasciatus* en semillas naturales y artificiales. Tomado de: Muñoz- Hernández, 2001

Semillas	Número de huevos	Oviposición (%)	Emergencia (%)
Naturales			
<i>O. tesota</i>	4.0 ± 1	6	0
<i>P. vulgaris</i>	63.0 ± 0	100	81
Artificiales			
0.5% lectina PF2	6.5 ± 0.5	34	0
1.0% lectina PF2	4.0 ± 0	21	0
Sin lectina PF2	19.0 ± 0	100	95

± Desviación estándar, todos los experimentos tuvieron 4 replicas

Mecanismos de Toxicidad de Lectinas para Insectos

A pesar de conocerse la actividad insecticida de algunas lectinas de plantas, se sabe poco sobre su mecanismo de acción. Se ha demostrado que el intestino es un blanco para las lectinas de defensa en plantas (Macedo y col., 2004). Por lo tanto, para entender el mecanismo de acción de las lectinas es importante conocer la morfología intestinal de los insectos.

El aparato digestivo de insectos está compuesto por tres regiones: el intestino anterior (estomodeo), medio (mesenterico) y posterior (proctodeo). El intestino

anterior conduce los alimentos desde la boca hacia el intestino medio, en el cual se lleva a cabo la digestión de los alimentos, ya que secreta enzimas y absorbe efectivamente los nutrientes. Y por último, en el intestino posterior se extraen las sales, el agua y minerales de los desechos alimenticios (Vázquez-Aristas y col., 2001). El intestino medio contiene una membrana semipermeable llamada matriz peritrófica (MP) no celular que separa el contenido del lumen de las células epiteliales (Figura 2), la cual está compuesta principalmente por quitina un carbohidrato que contiene residuos de N-acetilglucosamina y proteínas (Richards y Richards, 1977).

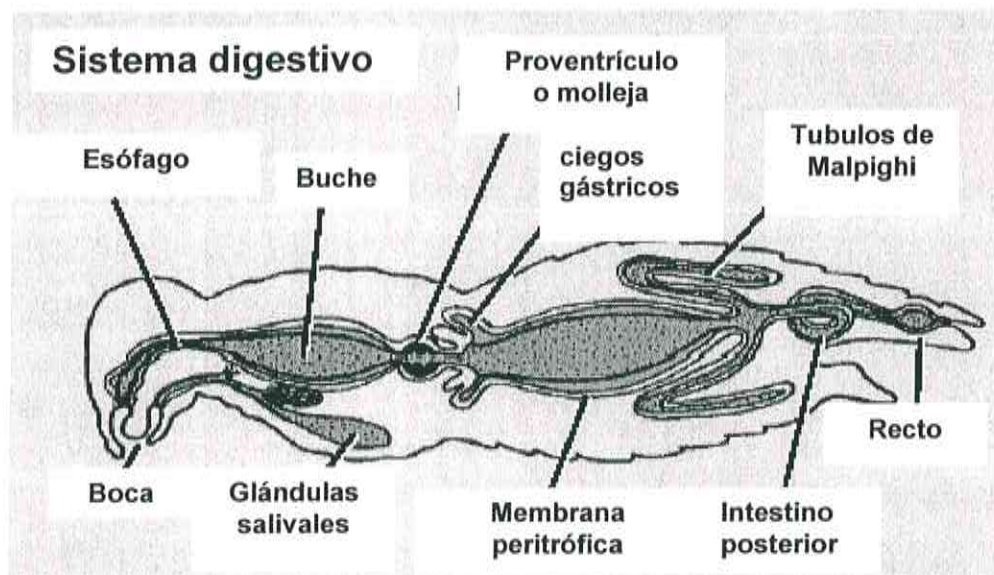


Figura 2. Sistema digestivo de insectos. Modificado de http://salinella.bio.uottawa.ca/bio3323/Lectures/PDFs/BIO3323_lct10Digestion_04X3.pdf

Un prerrequisito para la toxicidad de las lectinas es su supervivencia en los ambientes proteolíticos del intestino medio del insecto (Figura 3). Las lectinas de las plantas varían en su resistencia a la proteólisis por las enzimas digestivas del insecto (Zhu-Salzman y col., 1998; Carlini y Grossi de Sa, 2002; Murdock y Shade, 2002; Macedo y col., 2002; 2004).

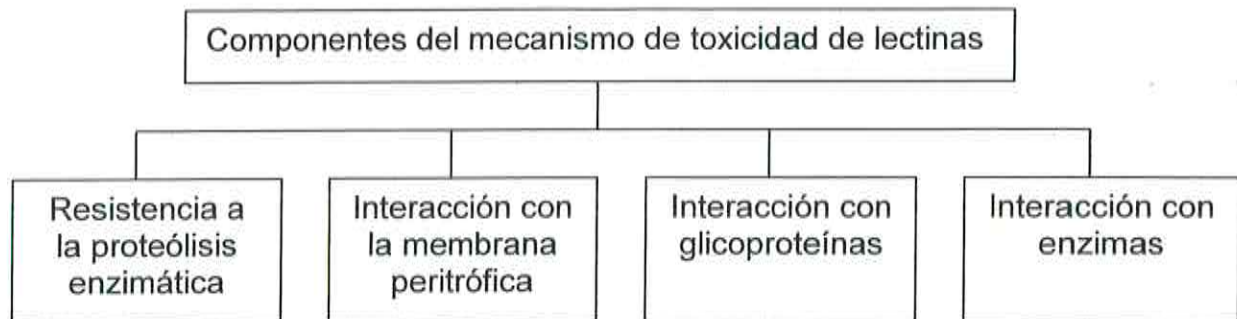


Figura 3. Puntos clave involucrados en el mecanismo insecticida de lectinas

Para las lectinas que resisten la degradación proteolítica, los estudios se apoyan en que la toxicidad de estas proteínas involucra la interacción de la lectina con las glicoproteínas presentes en la superficie apical de las células del intestino o dentro del lumen intestinal (Chrispeels y Raikhel, 1991; Du y col., 2000). Gatehouse y col. (1984) demostraron la unión de PHA a las células epiteliales del intestino del brúquido *C. maculatus*. Este conocimiento se ha ampliado a otras especies de insectos utilizando una extensa gama de lectinas donde la unión de la lectina y su actividad insecticida han sido demostradas (Vasconcelos y Oliveira, 2004).

Las lectinas pueden causar diferentes efectos en el intestino de insectos. Habibi y col. (1998; 2000) estudiaron el mecanismo de toxicidad de la lectina PHA a nivel celular en *Empoasca fabae* y *Lygus hesperus*. En el estudio se demostró que la lectina PHA causa severa destrucción, desorganización y elongación de las microvellosidades, así como inflamación de las células epiteliales en el lumen del intestino. Además, se demostró diferencias en la unión de la lectina en las dos especies investigadas, lo cual sugiere una diferente distribución de receptores GalNAc en regiones específicas del tracto digestivo de los insectos.

Por otra parte, las lectinas tienen diferentes formas de acción a niveles celulares. Sauvion y col. (2004), mediante estudios de inmunohistoquímica y microscopía electrónica, demostraron que Con A también induce en *Acyrtosiphon pisum* (plaga del chícharo) una severa inflamación de las células epiteliales. Sin embargo, no se observó una lisis del epitelio y tampoco la pérdida en la integridad de las células epiteliales. Por lo tanto las generalidades con respecto a las formas de acción de las lectinas deben ser tratadas con precaución.

A excepción de los homeópteros, la membrana peritrófica está presente en la mayoría de los insectos, tanto en el estado adulto como en el larvario (Tellam y col., 1999). Las lectinas pueden unirse a receptores del intestino medio presentes en la MP. Zhu-Salzman y col. (1998) propusieron que la actividad insecticida de la lectina *Griffonia simplicifolia* II (GSII) se liga funcionalmente a los carbohidratos de la matriz peritrófica.

Las lectinas también pueden unirse a la quitina de la matriz peritrófica. Eisemann y col. (1994) reportaron los mecanismos de acción de WGA y Con A en la larva de mosca *Lucilia cuprina*. Sus estudios mostraron una reducción en el crecimiento de la larva después de su exposición a las lectinas. Lo anterior debido a una reducción en la ingestión de la dieta promedio como resultado de una obstrucción de los poros de la membrana peritrófica, reduciendo su permeabilidad. Esta obstrucción conlleva a una restricción del movimiento bi-direccional de los nutrientes y enzimas digestivas o previene la formación de la misma membrana (Czapla y Lang, 1990).

Las lectinas también pueden interactuar con las glicoproteínas presentes en la matriz peritrófica. Du y col. (2000), aislaron una ferritina del intestino medio de *Nilaparvata lugens* usando cromatografía de afinidad con GNA. La secuencia deducida de la ferritina contiene una subunidad con un glicopéptido que

contiene manosa. Este sitio potencial de glicosilación se encuentra en otras ferritinas de insectos (Geiser y col., 2003). GNA es tóxica para *N.lugens* y su toxicidad se cree es el resultado de la interferencia que ejerce con el almacenamiento de hierro (Locke y Nichol, 1992). Fitches y col. (1997) han mostrado que GNA también afecta las actividades de las enzimas solubles y del borde del cepillo de otros insectos, tal como con *Lacanobia oleracea*.

Gatehouse y col. (1998) realizaron estudios de inmunolocalización de GNA en larvas de *Nilaparvata lugens* alimentadas con dietas artificiales que contenían la lectina, observándose la unión de GNA principalmente a los carbohidratos de la superficie luminal de las células epiteliales del intestino medio de insectos

Por otro lado, las lectinas pueden unirse a enzimas digestivas glicosiladas o interferir con la actividad de α -amilasas en el intestino del insecto. Las α -amilasas son conocidas como las principales enzimas hidrolíticas en insectos (Silva y col., 2001). Las amilasas catalizan la conversión del almidón a oligosacáridos para su uso en ciclos de energía. Cuando esas enzimas son inhibidas, la energía que es requerida por el insecto no puede ser utilizada (Franco y col., 2002). Macedo y col. (2007) demostraron que la lectina *Bauhinia monandra* (BmoLL) disminuía la actividad de las α -amilasas de larvas de *C. maculatus* y *Z. subfasciatus*. De esta manera las lectinas pueden interferir con la asimilación de proteínas o inhibir la digestión y absorción de los nutrientes.

OBJETIVOS

General

Estudiar el mecanismo insecticida de la lectina PF2 sobre el desarrollo de *Z. subfasciatus*, determinando su estabilidad proteolítica y su interacción con los glicoconjugados del intestino medio.

Específicos

1. Purificar la lectina de palo fierro PF2 mediante cromatografía de afinidad.
2. Evaluar la susceptibilidad de la lectina PF2 a la digestión por enzimas proteolíticas presentes en el intestino medio de *Z. subfasciatus*.
3. Determinar en cual estadio larval se expresa el (los) glicoconjugado (s) del intestino medio que interacciona con PF2 mediante técnicas de lectino-histoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Las colonias de *Z. subfasciatus* usadas en este trabajo fueron iniciadas con insectos proporcionados originalmente por el laboratorio de Entomología de la Universidad de Sonora. Los insectos fueron colocados en frascos de vidrio que contenían semillas de frijol peruano cv *P. vulgaris* y fueron mantenidos a 27° C y con una humedad relativa de 65-75% en una cámara de crecimiento. Los estadios larvales de *Z. subfasciatus* se determinaron de acuerdo al criterio de Rodríguez-Quiroz y col. (2000). En el que establecieron que para el día séptimo después de la ovoposición el insecto se encuentra en el estadio I, para el onceavo día en el estadio II, al veinteavo día le corresponde el estadio III y el estadio IV es observado al veinticincoavo día.

Se utilizó la harina de semillas de palo fierro previamente desgrasada con hexano, proporcionada por la M.C. Magdalena Ortega Nieblas, de la Universidad de Sonora.

La agarosa activada con divinil sulfuro (Mini-LeaK^R) fue de Kem-En-Tec, Hellerup, Denmark. Los estándares de peso molecular SDS-PAGE de amplio rango fueron de BioRad (Hercules, CA, USA). La fetuina bovina y todos los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). El anticuerpo policlonal, anti-PF2, fue obtenido a partir del suero de conejos a los que se les administro vía intravenosa PF2 en la Universidad de Arizona. El anticuerpo secundario, Anti-Ig biotinilado, fue de Bio Genex (San Ramon, CA, USA).

Extracción y Purificación de la Lectina de Palo Fierro PF2

La extracción y purificación de la lectina PF2 se realizó de acuerdo a lo establecido por Vázquez-Moreno y col. (2000). Para la extracción de proteínas de la harina de palo fierro se utilizó una solución salina al 0.9% (1:10 p/v) en presencia de inhibidores de proteasas, con agitación constante durante 2 horas a 4 °C. El extracto crudo se centrifugó a 10000 x g por 15 minutos y clarificó por filtración con fibra de vidrio. El extracto crudo se inyectó a una columna cromatográfica de agarosa-fetuína. Las fracciones de proteínas que no se unieron a la columna se lavaron con búfer de PBS (KH_2PO_4 / K_2HPO_4 20 Mm, 0.9 % NaCl y 0.02% NaN_3 a pH 7.2). Las proteínas retenidas se eluyeron con glicina-HCl (0.02 M, pH 2.5) y se neutralizaron con Trizma base (Sigma) 1 M pH 8. Estas fracciones fueron dializadas contra agua a 4° C, liofilizadas y almacenadas a -10 °C hasta su uso. El grado de pureza de la lectina PF2 fue evaluado mediante electroforesis en condiciones reductoras y desnaturizantes (SDS-PAGE, 8-22%) de acuerdo a Laemmli (1970) usando azul de Coomassie para revelar las bandas.

Estabilidad de PF2 a la Proteólisis por Enzimas Digestivas de *Z. subfasciatus*

El homogenizado de intestinos medios se obtuvo de acuerdo a lo establecido por Macedo y col., (2002) con ligeras modificaciones. Los intestinos de 30 larvas del estadio IV fueron extraídos en búfer de acetato 0.1 M pH 5.6, cisteína 1 mM y EDTA 3 mM. El tejido que no pertenece al intestino medio, así como los contenidos intestinales fueron removidos en la misma solución. El homogenizado fue incubado con la lectina PF2 (1mg/mL) ó PHA-E (control) en búfer de acetato 0.1 M pH 5.6, cisteína 1 mM y EDTA 3 mM (1:1 c/c) durante 0,

3, 6, 9, 12 y 24 h a 37° C. La digestión fue detenida sumergiendo los tubos en agua hirviendo por 5 min. Los productos de la digestión de las lectinas fueron observados por SDS-PAGE (8-22%). Después, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectadas. La membrana fue bloqueada con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) al 2% en PBS por 1.5 h. Posteriormente, la membrana fue incubada por 2 h con anti-PF2 (1:4000). El complejo antígeno- anticuerpo fue detectado con un anticuerpo secundario biotinilado anti-Ig (1:20) (BioGenex) y subsecuentemente incubado con el complejo estreptavidina-peroxidasa y revelado con 3,3'-diaminobencidina tetraclorhidrato (DAB) al 0.075%.

Ensayos lectino-histoquímicos

Preparación del Tejido

Esta técnica se realizó en base a lo establecido por Urbano- Hernández (2007) con ligeras modificaciones. Los intestinos medios de larvas del estadio III y IV, así como los de una etapa intermedia entre el estadio II y III (día 16), extraídos de acuerdo a lo establecido por Macedo y col., (2002), fueron colectados en etanol al 70%. Posteriormente, los intestinos fueron sometidos a un proceso de deshidratación en series graduales de alcohol (50–100%). En seguida se realizó la inclusión en parafina y las secciones de tejido fueron cortadas hasta 2 μ m de espesor empleando un microtomo, para ser montadas en un portaobjetos previamente tratado con poly-L-Lisina. El exceso de parafina de los tejidos fue removido en un horno a 37°C durante 12 h y posteriormente sumergido en xileno durante 2 minutos. Los tejidos fueron nuevamente hidratados a través de series graduales de alcohol (100-50%), terminando el proceso en agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y Purificación de la Lectina de Palo Fierro (PF2)

Debido a la capacidad de las lectinas para unirse específicamente a carbohidratos, se ha utilizado cromatografía de afinidad con carbohidratos inmovilizados para purificar a la mayoría de éstas proteínas. El cromatograma de purificación de PF2 (Fig. 4) muestra una fracción de proteína no absorbida (a) y otra fracción de elución correspondiente a la lectina PF2 (b). La presencia de la lectina PF2 fue confirmada por SDS-PAGE, encontrándose una banda con una masa de 33 kDa (inserto en la Fig. 4) que coincide con lo reportado por Vázquez-Moreno y col., (2000). Además se observa una banda débil que podría tratarse de una subunidad de PF2 más glicosilada que la otra.

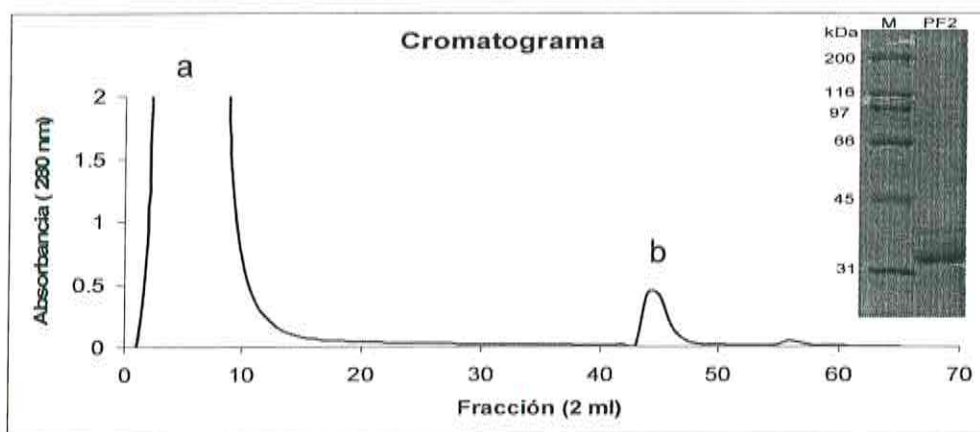


Figura 4. Cromatograma de purificación de la lectina PF2 de palo fierro (*Olnya tesota*) por afinidad en una columna de agarosa-fetuína. (a) Fracción de lavado no absorbida en PBS, (b) lectina PF2 eluída con glicina-HCl pH 2.5. Inserto: análisis de SDS-PAGE, (M) marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

Para el desenmascaramiento de los glicanos o receptores, los tejidos se colocaron en búfer de citrato de sodio pH 7.2 con Tween 20 al 1% y se calentaron durante 30 minutos. Las muestras se dejaron reposar hasta que alcanzaron la temperatura ambiente, y luego fueron lavadas tres veces con agua destilada. Las secciones de tejido fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos y posteriormente con agua destilada.

Interacción de PF2 con Estructuras del Intestino Medio de *Z. subfasciatus*

Las secciones de tejido fueron obtenidas como indica el apartado anterior. Después de bloquear los sitios inespecíficos con BSA, las secciones fueron incubadas por 45 minutos con las lectinas PF2 y PHA biotiniladas de manera independiente. La unión de las lectinas al tejido fue revelada mediante la incubación con el sistema estreptavidina-peroxidasa (Sigma), durante 30 minutos. Para revelar la interacción las secciones de tejido se revelaron con DAB (0.2 mg/ml) -H₂O₂ (0.005%) por 10 segundos. Finalmente, los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina y montados con resina para su observación en el microscopio.

Estabilidad de PF2 a la proteólisis por enzimas digestivas de *Z. subfasciatus*

Se sabe que las lectinas pueden causar cambios en la función y la morfología del intestino de insectos dependiendo de su resistencia a la degradación enzimática y su capacidad para unirse específicamente a receptores en el intestino medio (Pusztai y col., 1990). Asimismo, las lectinas pueden variar en su resistencia a la proteólisis por enzimas del intestino medio de insectos (Carlini y Grossi-de-Sa, 2002; Murdock y Shade, 2002; Macedo y col., 2004).

Los productos de la digestión de las lectinas sometidas al extracto enzimático del intestino medio de *Z. subfasciatus* fueron analizados por SDS-PAGE e inmunodetección. Los resultados mostraron que PF2 no fue susceptible a la degradación por enzimas digestivas, manteniéndose la integridad de su estructura hasta por 24 horas de incubación (Figura 5). En contraste, PHA-E fue digerida a partir de las 2 horas de incubación (Figura 6). Se conoce que lectinas insecticidas tales como *Griffonia simplicifolia II*, *Ulex europeus*, *Talisia esculenta* y *Bauhinia monadra* también han demostrado resistencia a la proteólisis por enzimas digestivas de insectos como *Z. subfasciatus* y *C. maculatus* (Zhu-Salzman y col., 1998; Macedo y col., 2003; 2006). La producción de lectinas resistentes a la proteólisis representa una efectiva estrategia desarrollada por algunas plantas contra sus depredadores (Brunelle y col., 2004). Con respecto a esto, las lectinas resistentes a la proteólisis podrían ser mas efectivas que las que no lo son (Zhu-Salzman y col., 1998).

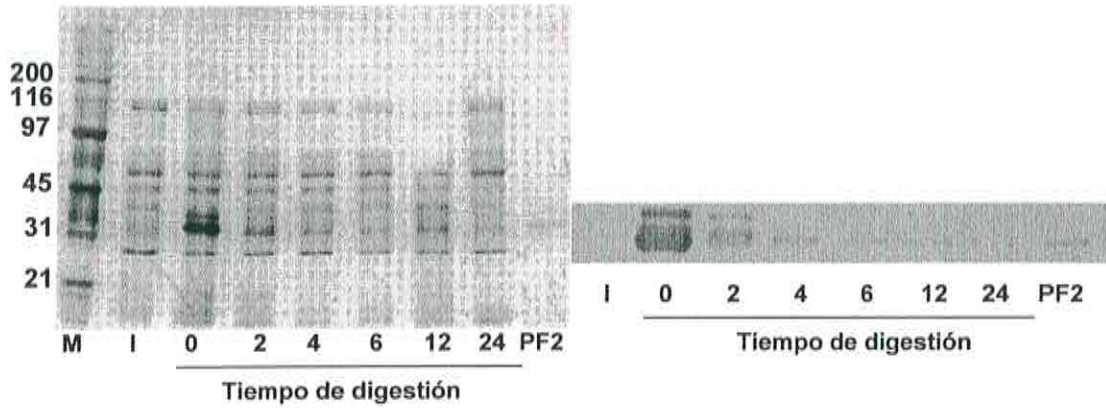


Figura 5. (A) SDS-PAGE y (B) inmunodetección de la digestión de la lectina PF2 por un extracto de enzimas digestivas de *Z. subfasciatus* e incubadas a diferentes tiempos. (I) Extracto proteico del intestino medio y (M) Marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

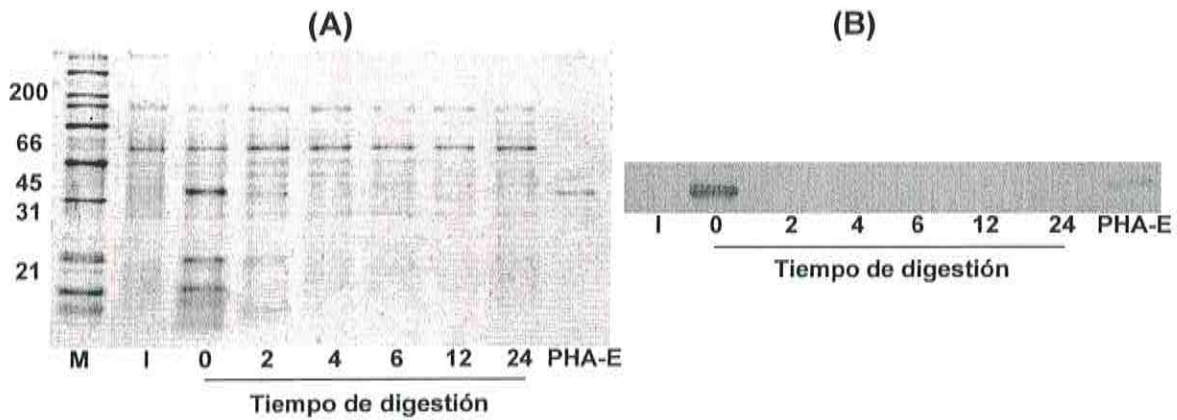


Figura 6. (A) SDS-PAGE y (B) inmunodetección de la digestión de la lectina PHA-E por un extracto de enzimas digestivas de *Z. subfasciatus* e incubadas a diferentes tiempos. (I) Extracto proteico del intestino medio y (M) Marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

La estabilidad a la proteólisis de lectinas como PF2 podría ser resultado de una estructura terciaria estable, amplios rangos de pH y temperaturas o a que los insectos sometidos a una dieta que incluya lectinas no posean las enzimas digestivas capaces de digerirlas (Peumans y Van Damme, 1995; Zhu-Salzman y col., 1998). Alternativamente, la unión de las lectinas a glicoconjugados en el intestino puede de alguna manera protegerlas de la actividad proteolítica (Zhu-Salzman y col., 1998). Experimentos con lectinas mutantes carentes del sitio de unión a carbohidratos revelaron que estas lectinas eran rápidamente digeridas por proteasas digestivas (Zhu-Salman y Salzman, 2001).

Ensayos Histoquímicos

Interacción de PF2 con Estructuras del Intestino Medio de *Z. subfasciatus*

La unión de una lectina a estructuras del intestino medio del insecto es un factor predominante para su actividad insecticida (Gatehouse y col., 1984; Chrispeels y Raikhel, 1991; Zhu-Salzman y col., 1998; Du y col., 2000; Bandyophyay y col., 2001; Macedo y col., 2006). PF2 y PHA-E mostraron diferentes intensidades de interacción con estructuras del tracto digestivo dependiendo de las diferentes etapas de desarrollo del insecto (la positividad de interacción se presenta de un color café claro hasta un café ocre), los resultados son resumidos en la tabla 4. La figura 7 muestra los controles negativos de los tejidos, en donde se puede observar el citoplasma de células epiteliales con sus núcleos, microvellosidades y membrana peritrófica teñidos con hematoxilina.

Tabla 4. Resumen de los resultados de la intensidad de marcaje de PF2 y PHA-E con el intestino medio de *Z. subfasciatus*.

	Edad de las larvas					
	16		20		25	
	PF2	PHA-E	PF2	PHA-E	PF2	PHA-E
Membrana peritrófica	++	-	-	-	-	-
Microvellocidades	-	-	+++	-	+	-
Citoplasma	+	+++	+++	++	+++	+++
Región perinuclear	++	+++	+++	++	+++	+++

Intensidad del marcaje: Ausente (-), leve (+), moderado (++), intenso (+++).

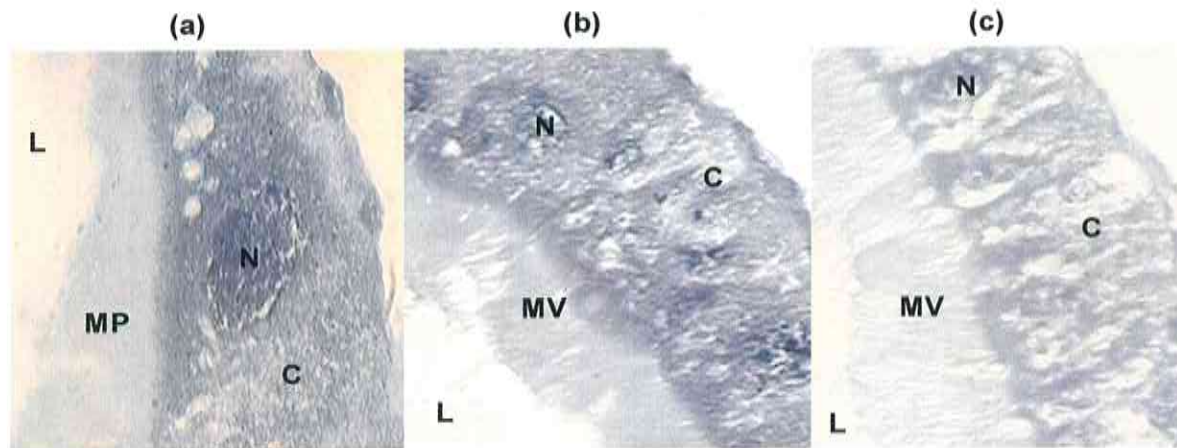


Figura 7. Intestinos de larvas de *Z. subfasciatus* teñidos con hematoxilina correspondientes a los días: a) 16, b) 20 y c) 25. Membrana peritrófica (MP), núcleo (N), citoplasma (C), microvellosidades (MV) y lumen (L). 100 X

Las lectinas pueden provocar efectos nocivos de acuerdo a su capacidad de unirse a la membrana peritrófica o microvellosidades de las células epiteliales. PF2 reconoce glicoconjugados presentes en la membrana peritrófica en larvas de 16 días de edad (estadio II y III), mientras que para las larvas de los estadios III y IV PF2 interactuó con las microvellosidades de las células epiteliales. En contraste, PHA-E no interactuó con estas estructuras (Figura 8) (Tabla 4).

La MP está constituida por una matriz de fibras de quitina y proteínas, en donde su función principal es la de proteger a las células epiteliales del intestino medio, del cualquier daño mecánico que pueda ser provocado por el paso del alimento. También regula el paso de moléculas entre diferentes compartimentos del intestino medio. Además, esta membrana tiene un rol muy importante en la compartimentación de enzimas digestivas (Terra, 2001).

En los insectos de la familia Coleoptera gran parte de la digestión ocurre en el interior de la membrana peritrófica debido a la presencia de enzimas que se encuentran asociadas con las membranas microviliares (Terra y col., 2006). La unión de lectinas tales como PF2 a esta membrana puede provocar un decremento en su permeabilidad y afectar el movimiento de moléculas entre los espacios endo y exo peritrófico, o bien interferir con las enzimas digestivas evitando la absorción de nutrientes y dando como resultado final la muerte del insecto (Van Damme, 2008; Du y col., 2000). La importancia de las funciones de la MP sugiere que ésta puede ser blanco para el control de plagas.

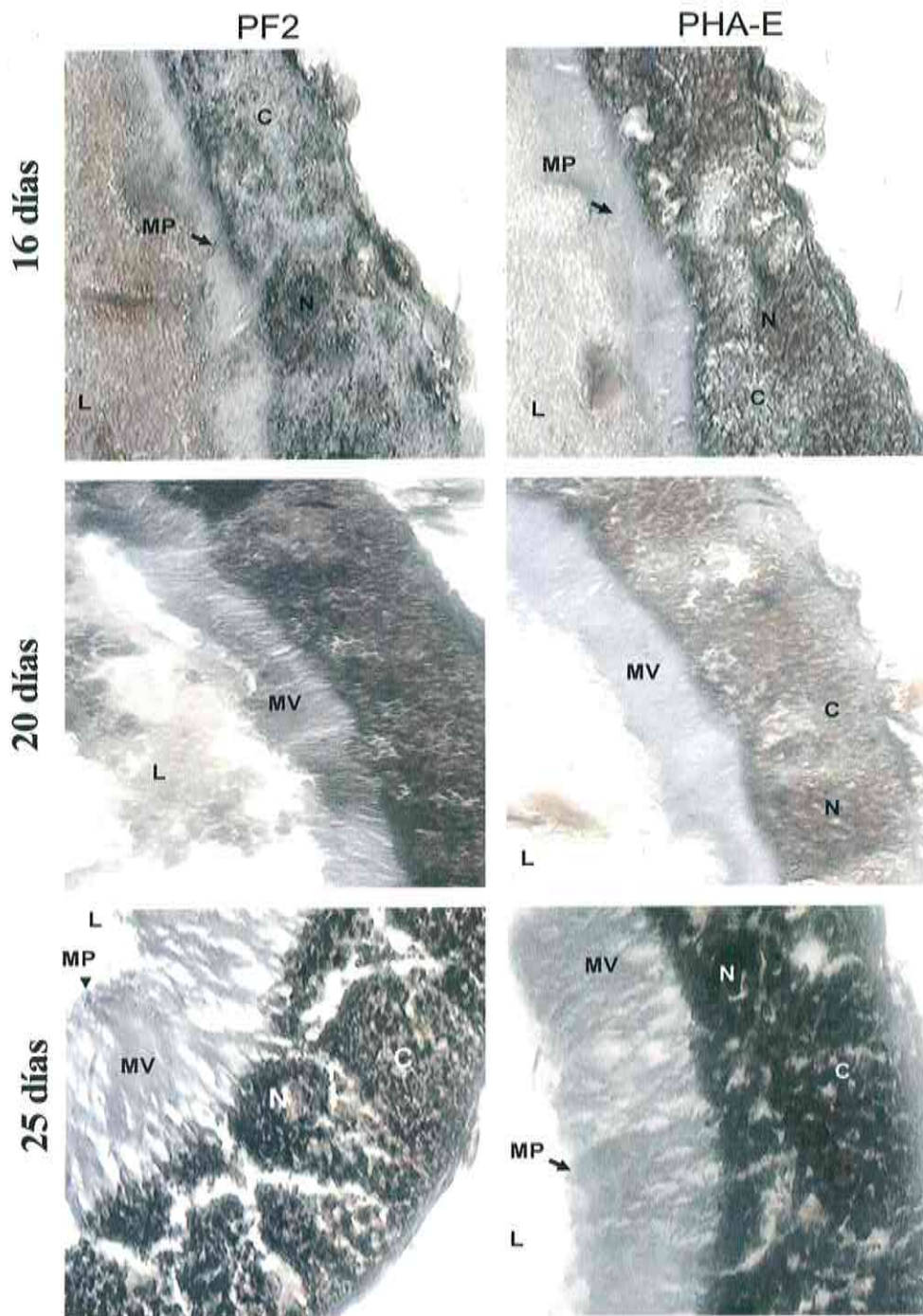


Figura 8. Análisis comparativo del reconocimiento de las lectinas PF2 y PHA-E en el intestino de larvas de diferentes etapas de desarrollo de *Z. subfasciatus*.. Membrana peritrófica (MP), núcleo (N), citoplasma (C), microvellosidades (MV) y lumen (L). 100 X

Por otro lado ambas lectinas reconocen glicoconjugados de las células epiteliales (en la región perinuclear y citoplasma) en todas las etapas de desarrollo estudiadas pero con diferente intensidad. Las diferencias en la interacción de ambas lectinas indican que la expresión de glicanos es diferente en distintas etapas del desarrollo larvario. La composición y seguramente la estructura de carbohidratos complejos a lo largo de la superficie luminal puede variar entre las diferentes secciones del intestino y en diferentes grupos de edad (Alcoy y col., 1989; Pohlmeyer y col., 2005). Esto ha sido observado en muchas especies y es un marcador importante en la evolución.

La unión de una lectina particular al intestino de un insecto no implica necesariamente que sea tóxica (Bandyopphay y col., 2001). En los estudios *In vitro* PHA-E, al igual que PF2, se une a estructuras glicosídicas del intestino medio de *Z. subfasciatus*, sin embargo PHA-E no causa efectos nocivos para el insecto. La falta de resistencia a la proteólisis de PHA-E por enzimas digestivas de *Z. subfasciatus* podría ser uno de los factores que determinara que ésta lectina no sea tóxica para el insecto. Zhu-Salzman y col. (2001) evaluaron la unión de la lectina GSII recombinante al intestino de larvas de *C. maculatus* y su digestión por catepsinas provenientes del insecto. Ellos sugieren que la unión de la lectina a los carbohidratos del intestino del insecto y la resistencia proteolítica es independiente. Sin embargo ambas propiedades facilitaron la eficacia de GSII como molécula de defensa en la planta.

Una particularidad de PF2, que no ha sido reportada en otras lectinas insecticidas, es su unión a la región perinuclear de células epiteliales (Figura 7). PF2 interacciona intensamente con esta región en todas las etapas del desarrollo larval. En humanos, este mismo patrón de interacción ha sido reportado con la lectina *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) y Con A en la región perinuclear de células epiteliales y parietales mediante microscopía de luz. Estudios de microscopía electrónica acerca de esta interacción han demostrado

la unión de DBA a las cisternas y vesículas del aparato de Golgi y la unión de Con A a las cisternas de la envoltura nuclear y el retículo endoplasmático rugoso (Ito y col., 1985). PF2 podría estar interactuando de manera similar a DBA y Con A, inhibiendo o alterando la síntesis de glicoproteínas, la cual ocurre asociada a estos organelos.

CONCLUSIONES

- PF2 cumple con los primeros dos requisitos del mecanismo de toxicidad ya que mostró ser resistente a la proteólisis e interaccionó con glicoconjugados de MP y microvelocidades del intestino medio de *Z. subfasciatus*.
- PF2 y PHA-E mostraron diferencias en la resistencia a la proteólisis y en la interacción con el intestino de larvas de *Z. subfasciatus*, lo cual explica en parte que PF2 sea tóxica para el insecto mientras que PHA-E no.
- El estadio larval que mejor expresa los glicoconjugados que interactuaron con PF2 fue el estadio III (20 días).

BIBLIOGRAFÍA

Alcoy J, Goyal V, Lukacs N W, Taylor R L, Strout R G, , Ward H D, Pereira M E. 1989. Glycoconjugates of the intestinal epithelium of domestic fowl (*Gallus domesticus*): a lectins histochemistry study. *Histochem. J.* 21: 187-193.

Bandyopadhyay S, Roy A, Das S. 2001. Binding of Garlic (*Allium sativum*) Leaf Lectin to the Gut Receptors of Homopteran pests is correlated to its insecticidal Activity. *Plant Sci.* 161:1025-1033.

Bell H A, Fitches E C, Marris G C, Bell J, Edwards J P, Gatehouse J A, Gatehouse A M. 2001. Transgenic GNA expressing potato plants augments the beneficial biocontrol of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera; Noctuidae) by the parasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera; Eulophidae). *Transgenic Res.* 10: 35-42.

Brunelle F, Cloutier C, Michaud M. 2004. Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55:103–113.

Carlini C R, Grossi-de-Sa M F, 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon.* 40:1515-39.

Chrispeels M J, Raikhel N V. 1991. Lectins genes and their role in plant defense. *Plant Cell* 3: 1-9.

Cummings R D, Kornfeld S. 1982a. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked

oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins. J. Biol. Chem., 257: 11230-4.

Cummings R D, Kornfeld S. 1982b. Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-Agarose affinity chromatography. A rapid, sensitive, and specific technique. J. Biol Chem. 257: 11235-40.

Czapla T H, Lang B A. 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), J. Econ. Entomol. 83: 2480– 2485.

Du J, Foissac X, Carss A, Gatehouse A M R, Gatehouse J A. 2000. Ferritin acts as the most abundant binding protein for snowdrop lectin in the midgut of rice brown planthoppers (*Nilaparvata lugens*). Insect Biochem. Mol. Biol., 30: 297-305.

Eisemann C H, Donaldson R A, Pearson R D, Cadogan L C, Vuocolo T R L, Tellam. 1994. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action. Entomol. Exp. Appl. 72: 1-10.

Elgavish S, Sanan B. 2001. Family Chemical characteristics of dimer interfaces in the legume lectin. Protein. Sci. 10:753-761.

Fitches E, Gatehouse A M R, Gatehouse J A. 1997. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of the tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. J. Insect Physiol. 43: 727–739.

Franco O L, Rigden D J, Melo F R, Grossi-de-Sá M F. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases structure, function and potencial for crop protection. *J. Biochem.* 269: 397-412.

Gatehouse A M R, Davison G M, Newell C A, Merryweather A, Hamilton W D O, Burgess E P J, Gilbert R J C, Gatehouse J A. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trial. *Mol Breeding* 3: 49–57.

Gatehouse A M R, Dewey F M, Dove J, Fenton K A, Pusztai A. 1984. Effect of seed lectins from *Phaseolus vulgaris* on the development of the larvae of *Callosobruchus maculatus*: mechanism of toxicity. *J. Sci. Food Agric.* 35:373–380.

Gatehouse A M, Gatehouse J A, Bharathi M, Spence J, Powell K S. 1998. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *Insect Biochem. Physiol.* 44: 529-539.

Geiser D L, Chavez C A, Flores-Munguia R F, Winzerling J J, Pham D Q. 2003. *Aedes aegypti* ferritin: A cytotoxic protector against iron and oxidative challenge?. *Eur. J. Biochem.* 270: 1-8.

Gúzman-Partida A, Robles-Burgeño M R, Ortega-Nieblas M M, Vázquez-Moreno L. 2004. Purification of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* (Vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectin. *Biochemie.* 86: 335-342.

Habibi J, Backus E A, Czapla T C. 1998. Subcellular effects and localization of binding sites of phytohemagglutinin in the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). *Cell Tissue Res.* 294: 561-571.

Habibi J, Backus E A, Huesing J E. 2000. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug *Lygus hesperus* Knight. *J. Insect Physiol.* 46: 611–619.

Hernández P, Pérez E, Martínez L, Martínez G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB* 24:21-27.

Howe R W, Currie J E. 1964. Some laboratory observations of the rates of development, mortality and oviposition of several species of Bruchidae breeding in stored pulses. *Bull. Entomol. Res.* 55: 437-477.

http://salinella.bio.uottawa.ca/bio3323/Lectures/PDFs/BIO3323_lct10Digestion_04X3.pdf

<http://www.crchul.ulaval.ca/crchul/en/serv/Default.htm>)

Imberty A, Gautier C, Lescar J, Pérez S, Wyns L and Loris R. 2000. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complex with sialic acid-containing oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 275: 17541-17584.

Ito M, Takata K, Saito S, Aoyagi T, Hirano H. 1985. Lectin-binding pattern in normal human gastric mucosa. *Histochem.* 83:189:193.

Kaneda Y, Whittier R F, Yamanaka H, Carredano E, Gotoh M, Sota H, Hasegawa Y, Shinohara Y. 2002. The high specificities of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leukoagglutinating lectins for bisecting GlcNAc or beta 1-6-linked branch structures, respectively, are attributable to loop B. J. Biol. Chem. 277: 16928-35.

Laemmli U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Leavitt R D, Felsted R L, Bachur N R. 1977. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. J. Biol. Chem. 252: 2961-6.

Lis H, Sharon N. 1986. Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem. 55: 35-67.

Locke M, Nichol H. 1992. Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. Annu. Rev. Entomol. 37: 195-215.

López-Laredo A R. 2005. Caracterización de los oligosacáridos de las lectinas de *Onleya Tesota* PF2 y su isoforma más abundante (IF2) y establecer la relación con la función de reconocimiento. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A.C., Hermosillo, Sonora, México.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. 1998. Legume lectin structure. Acta Biochem. Biophys. 1383: 9-36.

Macedo M L R, Damico D C S, Freire M G M, Toyama M H, Marangoni S, Novello J C. 2003. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koeleria paniculata* seeds and its effect on the larval

development *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Agric. Food Chem. 51:2980–2986.

Macedo M L R, Freire M G M, Novello J C, Marangoni S. 2002. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). Biochim. Biophys. Acta 1571:83–88.

Macedo M L R, Freire M G, Barbosa M, Breitenbach L C. 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Biochem Physiol A Mol. Integr. Physiol. 146: 486-98.

Macedo M L, de Castro M M, Freire M G. 2004. Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Arch. Insect Biochem. Physiol. 56: 84-96.

Majumder P, Banerjee S, Das S. 2004. Identification of Receptors Responsible for Binding of the Mannose Specific Lectin to the Gut Epithelial Membrane of the Target Insects. Glycoconjugate J. 20: 525-530.

Melander M, Ahman I, Kamnert I and Stromdahl A C. 2003. Pea lectin expressed transgenically in oilseed rape reduces growth rate of pollen beetle larvae. Transg. Res. 12: 555-67.

Mirkov T E, Wahlstrom J M, Hagiwara K, Finardi-Filho F, Kjemtrup S, Chrispeels M J. 1994. Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin-alpha-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. Plant Mol. Biol. 26: 1103-13.

Muñoz-Hernández. 2001. Estudio de la expresión diferencial de las lectinas de Palo fierro (*Onleya tesota*) en distintos tejidos y etapas de desarrollo. Tesis de maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, México.

Murdock L L, Shade R E. 2002. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. J Agri Food Chem 50: 6605-6611.

Ortega-Fonseca X F. 1996. Aislamiento y caracterización de las lectinas de leguminosas silvestres del Desierto de Sonora: *Cercidium praecox* (Palo de brea) y *Caesalpinia caladenia* (Palo Dorado). Tesis de Maestría Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Peumans W J, Fouquaert E, Jauneau A, Rougé P, LannooN, Hamada H, Alvarez R, Devreese B, Van Damme E J M. 2007. The liverwort *Marchantia polymorpha* expresses orthologs of the fungal *Agaricus bisporus* agglutinin family. Plant Physiol. 144: 637-647.

Peumans W J, Van Damme E J M. 1995. Lectins as Plants Defense Proteins. Plant Physiol. 109: 347-352.

Pohlmeyer I, Jorns J, Schumacher U, Van Damme E J M, Peumans W J, Pfüller U. 2005. Lectin Histochemical Investigations of the Distal Gut of Chicks with Special Emphasis on the Follicle- associated Epithelium. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol Clin. Med. 52: 138-146.

Pusztai A, Ewen S W B, Grant G, Peumans W J, Van Damme E J M, Rubio L, Bardocz S.1990. Relationship between survival and binding of plant lectins

during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion* 46: 308–316.

Rahbe 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*. *Entomol. Exp. Appl.* 76:43–155.

Richards A G, Richards P. 1977. The peritrophic membranes of insect. *Ann. Rev. Entomol.* 22: 219-40.

Rodriguez-Quiroz M, Valdez-Carrasco J, Vera-Graziano J y Castillo-Morales A. 2000. Identificación de instares larvales de *Zabrotes subfasciatus* (boh.)(coleoptera: bruchidae) mediante las dimensiones de sus cápsulas cefálica. *Agrociencia* 31:349-352.

Sauvion N, Nardon C, Febvay G, Gatehouse A M R, Rahbe Y. 2004. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. *J. Insect Physiol.* 50: 1137-1150.

Sharon N, Lis H . 1990. Legume lectins a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4: 3198-208.

Silva C P, Terra W R, de Sá M F G, Samuels R I, Isejima E M, Bifano T D, Almeida J S. 2001. Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor I. *J. Insect Physiol.* 47:1283–1290.

Tellam R L, Wijffels G, Willadsen P. 1999. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:87-101.

Terra W R, Costa R H, Ferreira C. 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78: 255-269.

Terra W R. 2001. The Origin and Functions of the Insect Peritrophic Membrane and Peritrophic Gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47, 47-61.

Urbano-Hernández. 2007. Identificación de Estructuras Glicosídicas reconocidas por la lectina PF2 en Fetuína y Tejido linfoides. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, México.

Van Damme E J M, Culerrier R, Barre A, Alvarez R, Rougé P, Peumans W J. 2007. A novel family of lectins evolutionarily related to class V chitinases: an example of neofunctionalization in legumes. *Plant. Physiol.* 144: 662-672.

Van Damme E J M, Peumans W J, Barre A, Rougé P. 1998b. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 575-692.

Vasconcelos I M, Oliveira J T. 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon.* 44: 385-343.

Vázquez-Arista M, Basurto-Cadena M G L y Walter M H. 2001. La membrana peritrófica en *Prostephanus truncatus* (horn) (coleóptera: bostrichidae): ¿Blanco para su control?. *Acta universitaria* 11: 21-25.

Vázquez-Moreno L, Ortega-Nieblas M, Robles-Burgueño M R, Ramos-Clamont G, 2000. Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olneya Tesota* seeds using tandem affinity chromatography. IJBC 5: 83-90.

Zhou Y, Tian Y, Wu B, Mang K. 1998. Inhibition effect of transgenic tobacco plants expressing snowdrop lectin on the population development of *Myzus persicae*. Chin. J. Biotechnol. 14: 9–16.

Zhu-Salzman K, Salzman R A. 2001. Functional mechanics of the plant defensive *Griffonia simplicifolia* lectin II: resistance to proteolysis is independent of glycoconjugate binding in the insect gut. J. Econ. Entomol. 94: 1280-1284.

Zhu-Salzman K, Shade R E, Koiwa H, Salzman R A, Narasimhan M, Bressan R A, Hasegawa P M, Murdock L L. 1998. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5123-8.