

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Efecto insecticida e insectistático de una Lectina recombinante obtenida de la levadura (*Pichia pastoris*) en larvas del insecto *Plodia interpunctella*

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Biol. Bárbara María Cabello Ruíz

Dirigido por

Dr. Ricardo Cervantes Jiménez

Santiago de Querétaro
Julio 2024

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Efecto insecticida e insectistático de una Lectina recombinante obtenida de la levadura (*Pichia pastoris*) en larvas del insecto *Plodia interpunctella*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta
Biol. Bárbara María Cabello Ruiz

Dirigido por:
Dr. Ricardo Cervantes Jiménez

Dr. Ricardo Cervantes Jiménez
Presidente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Secretario

Dr. Santiago Pineda Vergara
Vocal

Dra. Mónica Elisa Figueroa
Suplente

Dr. Octavio Roldán Padrón
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio, 2024
México

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi mamá, quien siempre me impulsó a estudiar, a leer, a soñar y sobre todo a esforzarme y ser fuerte y valiente como ella siempre lo hizo, te amo mamá y te extraño todos los días.

A mi papá, quien siempre ha estado ahí para brindarme apoyo y ayuda, quien con su esfuerzo siempre me ha impulsado a ser así, a trabajar y luchar por las cosas, te amo papá.

A Johnny quien siempre ha creído en mí y me ha apoyado en cada paso que doy, te amo.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a Dios por permitirme terminar este periodo de mi vida personal y profesional y por permitirme conocer más de su creación.

A mis padres que sin su ayuda, amor e impulso todo sería más complicado.

A Johnny por su apoyo, paciencia y amor siempre, gracias amor.

Con mucho cariño a mi director Dr. Ricardo y a la Dra. Tere García Gasca por su apoyo, por hacerme parte de este proyecto, por su paciencia y conocimiento.

Con mucho cariño y agradecimiento especial al Dr. Santiago y Paola Puga, el Dr. Toño, gracias por recibirme en su laboratorio y brindarme su ayuda.

Gracias a la Dra. Moni Figueroa por su paciencia y amabilidad para mí y este proyecto.

A la Dra. Xochitl Zambrano por su ayuda en los cortes histológicos y compartirme de su conocimiento.

A Martín, amigo, jefe y compañero por su gran ayuda para que pudiera concluir este proyecto.

A mi universidad, la Universidad Autónoma de Querétaro que me vio crecer y ahora me permite concluir otra etapa de mi vida y Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca brindada durante la maestría.

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE ECOLOGÍA
FORESTAL A CARGO DEL DR. SANTIAGO VERGARA PINEDA Y EN EL
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR A CARGO DE LA DRA.
TERESA GARCÍA GASCA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.**

RESUMEN

En México, como en otras partes del mundo, son frecuentes e importantes los daños que causan las plagas de insectos en la vegetación cultivada y arbórea, siendo las enfermedades y las plagas las principales causas de estos procesos de disturbios en los ecosistemas. Entre estos insectos se encuentran los lepidópteros, uno de los que más producen pérdidas económicas es la polilla de la harina, *Plodia interpunctella*, que pertenece a la familia *Phycitidae* y se encuentra distribuido en todo el mundo.

Las lectinas son glicoproteínas de origen no inmune presente en casi todos los seres vivos, estas tienen un efecto nocivo en los insectos gracias a la interacción no covalente con los glicoconjugados que se encuentran en superficies celulares de su intestino medio, uniéndose no covalentemente a la superficie celular, reconociendo proteínas específicas de las membranas celulares. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto insecticida e insectistático de una lectina recombinante proveniente de la levadura *Pichia pastoris*, en larvas de una especie de Lepidoptero, *Plodia interpunctella*; con la finalidad de brindar alternativas sustentables de manejo de insectos plaga que sean menos agresivos para el medio ambiente y disminuyan los riesgos para la salud, siendo este control biológico un método de control de plagas más sensato y respetuoso con el medio ambiente y la salud pública.

Palabras clave: Frijol Tépari, Lectina recombinante, *Pichia pastoris*, *Plodia interpunctella*, insectos plaga

ABSTRACT

In Mexico, as in other parts of the world, the damage caused by insect pests to cultivated and tree vegetation is frequent and important, with diseases and pests being the main causes of these disturbance processes in ecosystems. Among these insects are lepidopterans, one of which causes the most economic losses is the flour moth, *Plodia interpunctella*, which belongs to the Phycitidae family and is distributed throughout the world.

Lectins are glycoproteins of non-immune origin present in almost all living beings. They have a harmful effect on insects thanks to the non-covalent interaction with the glycoconjugates found on cell surfaces of their midgut, binding non-covalently to the surface cell, recognizing specific proteins of cell membranes. The objective of this work is to determine the insecticidal and insectstatic effect of a recombinant lectin from the yeast *Pichia pastoris*, on larvae of a species of Lepidoptera, *Plodia interpunctella*; with the purpose of providing sustainable alternatives for managing pest insects that are less aggressive for the environment and reduce health risks, this biological control being a more sensible pest control method that is respectful of the environment and public health.

Keywords: Tepary beans, Recombinant lectin, *Pichia pastoris*, *Plodia interpunctella*, pest insects.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. ANTECEDENTES	17
2.1 Problemáticas ambientales	17
2.2 Insectos plaga.....	18
2.3 <i>Plodia interpunctella</i>	20
2.4 Insecticidas convencionales.....	25
2.5 Proteínas de defensa	27
2.6 Lectinas.....	29
2.7 Lectinas de frijol Tépari	31
2.8 <i>Pichia pastoris</i>	32
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo General	33
5.2 Objetivos específicos	34
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1 Diseño del estudio.....	34
6.2 Obtención de la lectina recombinante (rTBL-1).....	34
6.2.1 Preparación del medio.	35
6.2.2 Conservación de la cepa.	35
6.2.3 Preparación del Biorreactor.	35
6.2.4 Preparación del preinóculo y desarrollo de cinética en biorreactor.....	36
6.2.5 Determinación de biomasa	37
6.2.6 Extracción de la lectina recombinante (rTBL-1).	37
6.2.7 Purificación de rTBL-1	37
6.3 Preparación del alimento	38
6.4 Desarrollo de la cepa del insecto <i>Plodia interpunctella</i>	38
6.5 Tratamientos para determinar la concentración letal 50	41
6.6 Evaluación de tamaño y peso de las larvas, evaluación del consumo de alimento por tratamiento.	44
6.7 Criterios para la evaluación de la movilidad relativa (MR)	44
6.8 Estudios histológicos del intestino medio.....	45

6.9 Análisis Estadístico	46
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
7.1 Obtención de la rTBL-1	47
7.2 Desarrollo de una cepa viable del insecto <i>Plodia interpunctella</i>	47
7.3 Evaluación del tamaño, peso de las larvas y consumo del alimento.....	47
7.4 Evaluación de la movilidad.....	54
7.5 Daños morfológicos posteriores a la etapa larvaria	56
7.6 Estudio de la toxicidad por medio de cortes histológicos en el intestino medio.	63
VIII. CONCLUSIÓN	73
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diversos estudios de proteínas con efecto insecticida.....28

Tabla 2. Criterios en la Movilidad relativa (MR) para evaluar el efecto de los
tratamientos.....42

Tabla 3. Criterios para evaluar el efecto de los tratamientos de rTBL-1 sobre la
movilidad de las larvas de *Plodia interpunctella*.....44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de algunas funciones de las lectinas en la naturaleza.....	29
Figura 2. Ilustración de los contenedores de crianza.....	39
Figura 3. Ilustración del manejo y separación de adultos.....	39
Figura 4. Ilustración de la organización por sexo de los adultos.....	40
Figura 5. Esquema del diseño del experimento.....	43
Figura 6. Índice de la mortalidad de las larvas a través de los días.....	45
Figura 7. Incremento del peso de las larvas por tratamiento a través de los días.	48
Figura 8. Ilustración de la reducción de peso en larvas de <i>Plodia interpunctella</i>	49
Figura 9. Disminución del peso del alimento consumido por tratamiento a través de los días.....	50
Figura 10. Ejemplo del canibalismo observado en larvas de <i>Plodia interpunctella</i>	51
Figura 11. Movilidad relativa promedio de las larvas.....	52
Figura 12. Número de pupas reportadas para el día 10, último día del tratamiento.....	53
Figura 13. Ilustración de los errores presentados en las pupas.....	55
Figura 14. Relación de pupas con errores en su desarrollo y pupas sin errores en el desarrollo.....	57
Figura 15. Ilustración de los errores en el desarrollo presentados en los adultos de <i>Plodia interpunctella</i>	58
Figura 16. Relación de adultos con errores en su desarrollo y adultos sin errores en su desarrollo.....	59

Figura 17. Escala de daño observado en los cortes histológicos de intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i>	60
Figura 18. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> del día dos, tratamientos 1 y 2	61
Figura 19. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> del día dos, tratamientos 3 y 4.....	64
Figura 20. Micrografías de intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> del día cinco, tratamientos 1 y 2	66
Figura 21. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> del día cinco, tratamientos 3 y 4.....	67
Figura 22. Micrografías de intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> del día diez, tratamientos 1 y 2	68
Figura 23. Micrografías de intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> del día diez, tratamientos 3 y 4	70
Figura 24. . Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> 4	71
Figura 25. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de <i>Plodia interpunctella</i>	72

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad diversos trabajos de investigación científica han puesto su enfoque en posibles aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, basadas en compuestos bioactivos con el propósito de crear nuevas alternativas, al obtener dichas moléculas como moldes para su creación de manera sintética (Araujo y col. 2013; Schnider y col. 2023). La expresión de proteínas recombinantes a través de sistemas de expresión biológica, se han vuelto muy importantes dentro de la Ingeniería genética; hoy en día son utilizados diferentes sistemas de expresión huésped procarióticos y eucarióticos como bacterias, mohos, levaduras, plantas transgénicas, células de insectos y mamíferos para la producción de proteínas recombinantes. (Karbalaie y col. 2020) Manteniéndose a la vanguardia en el desarrollo de nuevas estrategias eficientes de bioprocesamiento para la producción de proteínas recombinantes a nivel industrial, ya que son de gran importancia terapéutica, profiláctica y de investigación científica (Tripathi y Shrivastava. 2019) Por eso mismo se ha convertido de forma vital el invertir en la investigación que se enfoque en la innovación de métodos sintéticos promoviendo la relación de las biomoléculas en la química sintética que ayude a desarrollar nuevas ideas y tecnologías que involucren el descubrimiento de nuevos métodos y estrategias de manera más rápida (Campos y col. 2019).

Algunas de estas moléculas de interés son las lectinas, debido a su gran especificidad han sido ampliamente utilizadas como parte de las herramientas biotecnológicas frecuentemente utilizadas en investigaciones acerca y contra el cáncer, microbiología clínica, inmunología, entre otras, por su capacidad para ser marcadores en la tipificación celular (Schnider y col. 2023). Encontrándose incluso hoy en día, comercializadas para utilizarlas en la investigación, Bojar y col. 2022 resume al menos 57 lectinas y la actividad de cada una (Bojar y col. 2022).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que se encuentran de forma ubicua conformando a todos los seres vivos, desde microorganismos, hasta plantas y animales, incluso virus, tienen un papel muy importante en muchos

procesos que involucran el reconocimiento e interacción de las células con diferentes moléculas, así como en la síntesis y transporte de proteínas, la inmunidad congénita, la fertilización, en la regulación de la división celular, entre otros y tienen la capacidad de unirse reversiblemente a carbohidratos (Casas-Corredor y col. 2016; Hendrickson y Zherdev 2018) ya que las lectinas son proteínas que presentan un alto grado de estereoespecificidad que les permite reconocer y formar enlaces reversibles con diversas estructuras de azúcar al interactuar con complejos de glicoconjugados (Yadav y Mishra. 2021) además de presentar capacidad aglutinante celular, por ejemplo, en varios grupos sanguíneos al aglutinar los eritrocitos (González y Prisecaru 2005; Ahmmed y col. 2022). Esto y su propiedad específica de reconocimiento de carbohidratos han sido estudiadas y utilizadas para el conocimiento de diferentes funciones biológicas en donde se lleva a cabo la detección, aislamiento y caracterización de glicoconjugados, el reconocimiento de proteínas y carbohidratos, entre las cuales se encuentran la histoquímica de células y tejidos, para el reconocimiento de células tumorales, entre muchas más (Yadav y Mishra. 2021), que permite conocer y diferenciar células cancerosas, ya que las lectinas tienen la capacidad de unirse no covalentemente a la superficie celular, reconociendo proteínas específicas de las membranas celulares y la interacción con los carbohidratos de la superficie celular se une de manera diferente en dichas células, ya que se ven alteradas con frecuencia en dichas células cancerosas, porque la transformación maligna se encuentra especialmente asociada con los glicanos alterados que están en la superficie celular (García-Gasca y col. 2012; Mazalovska y Kouokam 2020)

Diversos estudios han mostrado que las lectinas también pueden causar trastornos intestinales ya que son factores antinutricionales gracias a la capacidad que tienen para actuar como alérgenos tóxicos y gracias también a su cualidad hemaglutinante (Simpson y col. 2018) se unen de manera directa a la mucosa intestinal por su capacidad de interacción con los enterocitos y de esta manera interfieren con la absorción durante la digestión provocando lesiones epiteliales en la parte interna del intestino (Vikram y col. 2020). Esto sucede no sólo en niveles organizacionales superiores como en Seres humanos y animales, sino que las lectinas también se

encuentran dentro de algunas proteínas bioactivas de las plantas que por su interacción con los glicoconjugados de las superficie celular pueden tener un efecto insecticida atacando la organización y función del intestino medio de los insectos que está involucrado en la digestión, la inmunidad y la osmorregulación como parte de sus estrategias defensivas, provocando efectos negativos en el intestino medio como ejercer interferencia con las proteínas de absorción y transporte de nutrientes, efectos dañinos en los simbioses, así como, provocar alteraciones en la matriz peritrófica, en el borde de cepillo y la capa de las células secretoras, provocando también estrés oxidativo, apoptosis e incluso las lectinas pueden llegar a atravesar la barrera intestinal y llegar a la hemolinfa de los insectos (Napoleão y col. 2019; Lopez-Moreno y col. 2022) .

Por lo tanto, debido a la capacidad de las lectinas de interactuar con glicoproteínas de membrana han sido posibles diferentes tipos de reconocimiento específico y selectivo de glicoproteínas ya sea en el caso de glicoproteínas alteradas en células cancerosas (Park y col. 2001; Subramaniyan y Veerappan. 2024). Así como en la interacción con los glicoconjugados que se encuentran en superficies celulares del intestino medio de los insectos, produciendo un efecto negativo o antinutricio en ellos. (Napoleão y col. 2019; Singh y col. 2023)

La gran importancia de las lectinas por las características que presentan en las investigaciones biológicas y las futuras posibles aplicaciones biomédicas y de investigación, han puesto a las lectinas en gran interés para el desarrollo de estrategias que permitan la obtención de la proteína en una forma estable y pura y mejorar las bioactividades de dichas proteínas (Sudheendra y col. 2022; Simpson y col. 2018) Por eso mismo se ha convertido de forma vital el invertir en la investigación que se enfoque en la innovación de métodos sintéticos promoviendo la relación de las biomoléculas en la química sintética que ayude a desarrollar nuevas ideas y tecnologías que involucren el descubrimiento de nuevos métodos y estrategias de una manera más rápida que nos permita resolver problemáticas mundiales en el conocimiento científico, área de salud, farmacéutica e incluso agrícola (Campos y col. 2019).

Las pérdidas a causa de plagas en la producción agrícola del mundo van de un 20% a un 40%, provocando la destrucción de por lo menos un 10% de las cosechas por insectos y roedores en el grano almacenado; esto según la región, cultivo, temporada o tipo de plaga que lo ocasiona, además de la pérdida monetaria de miles de millones de dólares al año (FAO. 2011). Rubio Cota (2012), estimó que de la producción mundial de granos almacenados se pierde del 5 al 10% a causa de los insectos plaga que atacan los almacenes, esto estimó que es equivalente a la cantidad de granos que podrían alimentar anualmente a 130 millones de personas, considerando que *Plodia interpunctella* es la causante de al menos un 10% de pérdida, valor que equivale cientos de millones de dólares (Rubio Cota. 2012).

Para controlar este tipo de problemas ocasionado por insectos se ha tenido que recurrir al uso de plaguicidas químicos sintéticos tales como los clorados, organofosforados y piretroides, que, al inicio de su uso fueron exitosos en el control de plagas (Silva y col. 2002). Sin embargo, el uso excesivo de insecticidas sintéticos hoy día ha producido un impacto ambiental negativo, generando problemas de contaminación de cultivos, agua y aire, así como daños en la salud pública. Dichos problemas nos han obligado a buscar nuevas alternativas de manejo de insectos plaga de una manera menos agresiva para el medio ambiente y con menores riesgos para la salud, principalmente por medio del control biológico siendo este un método de control de plagas más sensato y respetuoso con el medio ambiente y más acorde con la filosofía de “desarrollo sustentable” (González-Castillo. 2012). Por lo anterior, el presente trabajo puede considerarse como el inicio para demostrar las propiedades insecticidas de la Lectina recombinante proveniente del frijol Tépari como consideración para su uso en programas de fitomejoramiento contra insectos plaga y variedades resistentes.

II. ANTECEDENTES

2.1 Problemáticas ambientales

Recientemente las problemáticas ambientales han sido de interés no sólo para la ciencia, sino también a nivel educativo, tecnológico, así como político, siendo una cuestión prioritaria en muchos aspectos y debido a su gran complejidad para poder entender y sobre todo controlar los impactos negativos que generan en muchos aspectos a nivel ecológico y socioeconómico (Márquez y col. 2021).

A medida que aumenta la población humana por ende la demanda de la producción de productos agrícolas se vuelve cada vez más grande, ya que, es a nivel mundial la agricultura una de las principales actividades como sustento de la humanidad, sin embargo se ha visto afectada por diversos factores, uno de ellos han sido los insectos plaga (Zelaya y col. 2022) Los insectos, forman parte de los artrópodos, uno de los grupos de organismos más diverso en todo el mundo, pues conforman el 80% de las especies vivas de animales. Los insectos poseen características que los ayudan a reproducirse en abundancia, tanto que llegan a convertirse en plagas que pueden dañar en gran manera a los cultivos perjudicando la economía y su consumo, también pueden afectar bosques acabando con gran parte de ellos de forma masiva. Algunas de estas características importantes son su ciclo reproductivo corto que les permite tener una alta tasa de reproducción o su gran adaptabilidad climática y en la vegetación entre otras haciendo más fácil que puedan volverse plagas rápidamente (Segura e Iñiguez. 2023). De igual manera, son varios los agentes que inciden en el daño y también diferentes los tipos de insectos plaga que atacan a los cultivos, entre ellos están las condiciones ambientales, la fenología del cultivo, así como los hábitos alimenticios y características biológicas de los insectos, pues algunos de ellos pueden tener preferencia a diversos cultivos y pueden llegar a atacar muchos insectos un mismo tipo de cultivo, como es el caso del maíz que hasta 70 especies diferentes de insectos plaga pueden dañarlo (Hernández y col. 2019) o el caso de la palomilla india de la harina que es afín a una gran variedad de granos almacenados (Jia X y col. 2018).

La gran influencia negativa que han tenido a través del tiempo los insectos plaga se han posicionado como uno de los principales problemas fitosanitarios a nivel mundial, por lo cual se han visto en la necesidad de usar diversos e innumerables insecticidas y pesticidas, que elevan los costos a los productores al incrementar el uso de ellos y en mayor frecuencia para proteger las plantas de estos ataques, (Contreras-Espinoza. 2019) todo esto genera una baja en los rendimientos esperados y un incremento en costos y en daños colaterales a causa de los químicos utilizados, generando efectos adversos como la contaminación ambiental, intoxicación de especies y humana, eliminación de enemigos naturales, así como ocasionar resistencia en las plagas (Hernández y col. 2019).

2.2 Insectos plaga

El término "plaga", es usado para referirnos a cualquier organismo que represente una competencia ante algunos recursos necesarios para los humanos, estas se conforman por un gran número de organismos como ácaros, nemátodos, insectos, garrapatas y otros artrópodos, roedores como ratas y ratones, babosas, caracoles, algunas plantas, bacterias virus y hongos entre otros patógenos y son clasificados según su preferencia o especificidad por ejemplo insectos fitófagos cuando son plagas de plantas y se pueden considerar plaga cuando incrementan su población a tal grado que causen daño significativo, afectando su rendimiento y la calidad de las plantas, por ejemplo cuando son cultivadas para consumo humano, siendo una problemática actual para la agricultura, por las grandes pérdidas que estas generan (Khan. 2018).

En México existen altas pérdidas de los granos almacenados por el ataque de plagas de insectos, sobre todo en regiones del país en donde se cultivan de manera principal para autoconsumo, reportando pérdidas de entre el 10% y 25%, de acuerdo a la FAO, las cuales se pueden llegar a elevar hasta un 30% y en ocasiones pueden llegar a alcanzar hasta el 80%, especialmente en zonas rurales (Salgado y col. 2006). Así mismo en México, como en otras partes del mundo, son frecuentes e importantes los daños que causan plagas de insectos en la vegetación cultivada y arbórea, siendo las enfermedades y dichas plagas las principales causas de estos

procesos de disturbio en los ecosistemas deforestados (Alatorre y col. 2000). Los insectos descortezadores, por ejemplo, son de las plagas que más afectan a las especies de árboles, ya que pueden manifestarse de forma epidémica, y cuando es así, acaban con grandes superficies de árboles, así como en las semillas de los granos almacenados (Salas y col. 2003), siendo reportados estimados más del 13% a nivel mundial de daños por insectos en granos almacenados y más de 25 especies de insectos plaga son los que atacan semillas y granos almacenados causando daños económicos en México, reduciendo así la calidad física y fisiológica de las semillas; de éstos algunos están dentro de los órdenes Coleóptera y Lepidóptera (Mendoza y col. 2016).

Estos gorgojos y polillas actúan siendo plagas de productos almacenados, atacando el grano de cereales y leguminosas. A su vez pueden encontrarse en troncos secos o raíces, heno, dispersándose y siendo plaga de lugares cerrados pequeños desde casas, graneros, hasta grandes como almacenes de alimentos (Hahn y col. 2013) y generando así un problema fitosanitario grave y de mucha importancia, pues presentan un régimen alimentario en el cual devoran las semillas, en especial las leguminosas, las cuales representan un cultivo hortícola de los más importantes a nivel mundial ya que estos cultivos tienen varios destinos, ya que una parte de estos granos y semillas va dirigida a la exportación e industria química y farmacéutica, pero gran parte es para alimentación humana (Ferraris y col. 2021).

Entre los insectos plaga más agresivos se encuentran los insectos del orden Lepidoptera: dentro de este orden se encuentran insectos que tienen una gran diversidad de diferencias morfológicas, así como de tamaños distintos y está compuesto por aproximadamente 120 000 especies en todo el mundo que son fitófagas, encontrándose en todos los continentes menos en la Antártica. Un número más limitado de polillas son las que atacan productos almacenados, variando en su grado de polifagia y/o estenofagia, es decir, que tal limitada sea su dieta alimenticia y su capacidad de digerir ciertos alimentos, pudiendo tener un impacto en la sensibilidad a los insecticidas para su control, sin embargo, no hay información sobre esta relación en Lepidópteros (Stejskal y col. 2021). Estos Lepidópteros además de ser insectos plaga en grandes cultivos, plantaciones forestales, así como

también en granos almacenados, donde la manera en que habitan en dichos granos, frutos secos y otros productos; deterioran y dañan el producto, haciéndolo imposible de consumir o vender, de esta manera producen grandes pérdidas económicas en todo el mundo (Urretabizcaya y col. 2010).

2.3 *Plodia interpunctella*

Plodia interpunctella conocida comúnmente como la polilla india de la harina (Lepidoptera: Pyraloidea, Pyralidae) es originaria de Europa, sin embargo, ahora es considerada una plaga cosmopolita y se alimenta de toda clase de harinas productos almacenados, que se encuentran ya procesados como cereales, nueces, alpiste, frutas secas, chocolate, semillas, leche en polvo, hasta alimento para mascotas. Ha sido complicado erradicar esta plaga ya que las larvas se encuentran consumiendo y viviendo en los productos almacenados mezclándose en los alimentos, haciendo que los insecticidas y plaguicidas convencionales no sean la mejor de las opciones (Jia X y col. 2018)

Plodia interpunctella ha sido considerada como una plaga mundial importante atacando tanto granos secos y sanos, por lo que es considerada una plaga secundaria, así como harinas, frutos secos y otros productos derivados o procesados, siendo considerada también como una plaga primaria, por lo que ha sido de gran importancia económica, produciendo grandes pérdidas y siendo de muy alto impacto económico ya que ataca una gran cantidad de diferentes productos, haciéndola posicionarse como la plaga de insectos más importante en cuestión de pérdidas económicas en dichos alimentos (Jia X y col. 2018; Mohandass y col. 2007) ya que consumen el embrión y/o el endospermo de las semillas contaminadas; como consecuencia de esto, el peso de las semillas tendrá una considerable disminución, generando una reducción en la germinación y sus reservas nutricionales; bajando su cotización en el mercado, dando como resultado que los consumidores industriales rechacen el producto (Fernández y col. 2009),

además de generar problemas en la salud humana y animal y tener repercusiones en la salud alimentaria (Stejskal y col. 2021).

Son de tamaño muy pequeño, miden de 15 a 20 mm de envergadura alar, es decir de largo y son identificadas como palomillas bandeadas por tener una banda de color marrón en la parte final o inferior de las alas, es decir un color más oscuro que la parte superior que es de un color grisáceo (Rubio-Cota. 2012). Las hembras pueden depositar de 50 a 300 huevos, pudiera ser en grupos de 20 o más huevecillos en los alimentos de los cuales se alimentan las larvas al eclosionar los huevos. Una vez eclosionados después de 3 a 15 días que dura el período embrionario, nacen las larvas blancas, con cabeza poco oscura y presentan placa anal., pueden permanecer en este estadio de 15 días, hasta 2 años si se mantienen como larvas hibernantes. Las larvas producen una tela densa con su excremento, entre otras cosas del medio como tierra en los granos que consumen, lo cual contamina el grano y lo hace poco deseable para consumo y venta, generando pérdidas. Después de 1 a 4 semanas emergen los adultos, que son de un ciclo de vida corto, cumpliendo un ciclo completo en aproximadamente 40 días, desarrollando normalmente de 5 a 6 generaciones anuales (Urretabizcaya y col. 2010). Como se conoce que la etapa inmadura de estos insectos, es la etapa más larga y dañina, aproximadamente la mitad de su ciclo de vida y la etapa donde se alimentan en mayor proporción de distintos granos y productos almacenados de manera voraz, destruyendo el embrión de los granos de las semillas que son para consumo o comercio (Rubio-Cota. 2012); además de contaminar el grano con hilos de seda que esta especie en particular va dejando a su paso cuando se arrastra, donde se acumulan gránulos fecales, dejando también excremento y residuos del producto o pedazos de insectos a su paso por la superficie de los granos, también induce la contaminación por microorganismos y ácaros u otros animales que se ven atraídos por dichos residuos (Milutinović. 2019).

Esta seda, en el quinto estadio de vida de las larvas, les brinda protección para evitar parásitos, para evitar la pérdida de agua, además de servir como almacenaje de energía, con aminoácidos esenciales en caso de insuficiencia de alimento, entre

otras cosas. Por lo cual ha sido de interés para fines médicos ya que, en otras larvas, como en *Bombix mori*, se han estudiado sus propiedades enfocándose sobre todo en medicina regenerativa e incluso podría ser un biomaterial con potencial anticancerígeno, ya que está compuesto por materiales activos con propiedades anticancerígenas, al mostrar actividad citotóxica en células de carcinoma colorrectal (Milutinović. 2019).

Por lo anterior, el manejo y control de estos tipos de plagas se ha vuelto un reto, sobre todo en la etapa larvaria para tener un mayor control y reducir en gran manera las pérdidas económicas en productos almacenados (Pérez y col. 2015).

Como método de erradicar las plagas se han usado constantemente y muchas veces de manera excesiva plaguicidas sintéticos, que son neurotóxicos, presentando así consecuencias como la resistencia a los insecticidas por parte de los insectos plaga, así como también su acumulación e impacto negativo en los alimentos, agua y medio ambiente, presionando a que se busquen nuevas alternativas de manejo de plagas para poder reemplazar estos métodos por algo más ecosostenible. Por lo tanto, se han estado haciendo trabajos de investigación a través de compuestos orgánicos, como plaguicidas botánicos, en los cuales se han observado ventajas como la alta selectividad, baja o nula toxicidad externa, bajos niveles de residuos y rápida degradación, aunque también no se conocen con exactitud los mecanismos de acción con los que se llevan a cabo y objetivos fisiológicos, como para hablar de posibles mecanismos de resistencia (Corzo y col. 2020).

Entre otras estrategias nuevas para el control de este insecto plaga, está el uso de feromonas sexuales afectando el comportamiento de *Plodia interpunctella* (Jia X y col. 2018). También se han probado como otras alternativas, compuestos de origen natural; entre estos compuestos se encuentran los aceites esenciales, donde también ha sido estudiada la respuesta de *Plodia interpunctella* indicando en sus resultados que *Lippia turbinata*, planta con efectos tóxicos en insectos, tuvo cierta eficiencia causando letalidad y retraso en la ecdisis, es decir la muda y desarrollo del insecto, *Plodia interpunctella* (Corzo y col. 2020).

Normalmente su control y tratamiento se ha estado llevando a cabo mediante prevención con constante monitoreo, saneamiento, tratamientos de control de plagas con enemigos naturales, aerosoles residuales y fumigación y atmósferas controladas, manipulación de la temperatura de los lugares donde se encuentran, así como sustancias alternativas provenientes de organismos como *Bacillus thuringiensis*. También han sido probados reguladores del crecimiento de insectos (IGR) como el hidropreno y el piriproxifeno, aplicándolo en las superficies para el control en las larvas de *Plodia interpunctella*, así como deltametrina, donde se encontró buena respuesta en el control del quinto estadio larvario de *Plodia interpunctella* (Stejskal y col. 2021).

En un laboratorio de la Oppert (USDA, Manhattan, KS) se realizaron bioensayos en dos colonias de *Plodia interpunctella* con diferentes toxinas, proteínas Cry, de Bt (*Bacillus thuringiensis*), con el objetivo de determinar el efecto de *B. thuringiensis* en relación a la susceptibilidad de colonias de *Plodia interpunctella* con respecto a la relación de su actividad enzimática, la flora microbiana, así como la expresión de la proteína hemolina, una proteína de inmunidad, a nivel del intestino medio de los lepidópteros. Se ha observado propiedad insecticida gracias a proteínas llamadas Cry, producidas durante la esporulación de la bacteria, utilizados como método de control biológico ante una variedad de insectos de orden diferente, alterando el equilibrio osmótico celular, teniendo efectos nocivos en los insectos, hasta incluso provocar la muerte Giles y col en el 2000 y Sedlacek y col en 2001, evaluaron semillas transgénicas con toxinas Cry de *B. Thuringiensis* en *Plodia interpunctella* como método de control (Giles y col. 2000; Sedlacek y col. 2001) ya que se han puesto como objetivos insectos coleópteros y lepidópteros con esta proteína Cry (Gryspeirt y Grégoire. 2012).

Sabbour y Abd El-Aziz en 2019 probaron extractos vegetales en nanoemulsiones en larvas de Lepidópteros, polillas que también llegan a infestar productos almacenados como *E. kuehniella* y *C. cautella*, polillas muy parecidas a *Plodia interpunctella* y que son pertenecientes a la misma familia, *Pyralidae* (Stejskal y col. 2021).

Anteriormente y durante años se utilizaron fumigantes para el control de estas plagas de productos almacenados, sin embargo, ahora están prohibidos en su mayoría, como el bromuro de metilo y la fosfina, por lo que se han buscado nuevas alternativas, además de que se conoce que *Plodia interpunctella* ha desarrollado resistencia a la fosfina. Por eso, en esta búsqueda de nuevas alternativas para su control, se han utilizado tratamientos con *Bacillus thuringiensis* (Berliner) subespecies *kurstaki* (*Bacillales: Bacillaceae*) y azadiractina como bioplaguicidas para el control biológico de esta plaga de productos almacenados (Mohandass y col. 2007; Nouri-Ganbalani y col. 2016).

En un estudio de Eliopoulus y col (2015) con aceites esenciales de albahaca y menta verde contra *Plodia interpunctella*, reportaron no hubo una actividad insecticida estadísticamente satisfactoria en larvas y pupas de esta especie, presentando más tolerancia, ni contra *E. kuehniella*, sin embargo, si hubo actividad insecticida en los adultos de ambas especies, ambas pertenecientes al orden Lepidoptera: *Pyralidae* (Eliopoulus y col. 2015).

Stejskal y col (2021) revelaron en su trabajo que la edad de las larvas de *E. kuehniella* y *Plodia interpunctella* influyen de manera significativa en la eficacia del plaguicida, siendo las larvas más jóvenes más sensibles al plaguicida que las larvas con más tiempo de vida, también indicaron que los insecticidas hechos a base de metilo de pirimifós presentaron mayor efectividad en el control de *E. kuehniella* que *Plodia interpunctella* y los hechos a base de deltametrina que presentaron, por el contrario, mayor efectividad contra *Plodia interpunctella* que contra *E. kuehniella* (Stejskal y col. 2021)

Las larvas son polífitas en extremo, pues se alimentan en gran cantidad y de una gran variedad de alimentos, especialmente dietas que sean ricas en carbohidratos; posicionando a esta especie en las principales plagas de alimentos almacenados. Se ha visto que dietas ricas en grasas y proteínas como las nueces, avellanas, almendras, entre otras, tuvieron una mayor tasa de crecimiento en las larvas (Barrera-Illanes y col. 2017; Vukajlović. 2019). a comparación de frutos secos por ejemplo, que tienen menos proteína y grasa y más azúcares >30%, ya que las larvas

tenían mayor tamaño corporal, con una mayor aptitud física, así como una baja tasa de mortalidad entre ellas, concluyendo que una mala alimentación en esta etapa de la vida de *Plodia interpunctella* produce efectos negativos para la construcción de su vida en el futuro como adultos, como reducción en su tamaño, en su reproducción, teniendo una baja tasa de producción de descendencia, además de un tiempo de vida corto. Aunado a los alimentos y los macronutrientes que proveen al alimentarse de ellos, también otras partes de las plantas, como metabolitos, taninos, fenoles, flavonoides, podrían también tener un importante papel en la tasa de supervivencia, mortalidad y desarrollo de las larvas, ya que son biomoléculas de defensa de las plantas (Vukajlović. 2019).

2.4 Insecticidas convencionales

Según la FAO (Food and Agriculture Organization) en el código internacional de conducta sobre la distribución y uso de plaguicidas, define plaguicida como “una mezcla de sustancias o una sustancia, que es destinada a destruir o controlar plagas de cualquier tipo, dentro de los cuales se encuentran vectores de enfermedades, especies de plantas indeseables o animales que provoquen un daño, que interfieran en la producción, en la elaboración, en almacenamiento, transporte y/o comercialización de productos agrícolas, alimentos ya sea para humanos o animales, madera y que pueden ser administrados para control de arácnidos, insectos, entre otras plagas, ya sea corporales como ácaros, entre otros” (FAO. 2012).

Los plaguicidas han tenido un largo historial de uso, hoy en día se estima que los humanos llevan en su cuerpo aproximadamente 700 contaminantes, las cuales han sido inhaladas, absorbidas cutáneamente o puede ser ingeridas a través de agua o alimentos contaminados, incluso una madre puede pasarla al feto a través de la placenta o a su hijo en la lactancia. Dichas sustancias químicas pueden tener efectos distintos que van a depender de la cantidad de las sustancias químicas, duración de la exposición a dichas sustancias, entre otras, tanto en las personas como en la vida silvestre en general (Benítez. 2012). Estas sustancias químicas van

a ser clasificados según su función, ya sea por su objetivo a erradicar o controlar, por ejemplo dentro de los plaguicidas se encuentran los acaricidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas, herbicidas, molusquicidas, nematocidas, o pudiera ser por grupo químico de su ingrediente activo como la familia química de los organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, cloronitrofenólicos, derivados del ácidofenoxiacético, compuestos inorgánicos y compuestos de origen botánico, entre otros, cada uno con sus diferentes compuestos activos, así como por su toxicidad aguda, o su persistencia en el medio ambiente (Ramirez y Lacasaña. 2001). Los plaguicidas organoclorados, organofosforados y piretroides son los utilizados convencionalmente como insecticidas. Se encuentran ampliamente en ambientes acuáticos y terrestres ya que se utilizan en grandes cantidades contra plagas en la industria y agricultura, ya que son resistentes a la degradación biológica, lo cual también los hace una amenaza contra la salud pública por más tiempo. Estos son aplicados en las temporadas de siembra de principales cultivos como maíz, arroz, trigo, sorgo, soya y cártamo, así como en frutales de mango melón, naranja, sandía, piña y plantaciones importantes como el café y caña de azúcar, esto por sus propiedades acaricidas, insecticidas, fungicidas, herbicidas (Benítez y Montañez. 2014). Sin embargo, aunque muchos plaguicidas han sido prohibidos en diferentes países a través del tiempo, cuando empezó una preocupación en el siglo XX al presentar una amplia toxicidad humana, así como su bioacumulación y persistencia en el medio ambiente, aún se utilizan algunos de ellos y aún se encuentran en alimentos de consumo humano como la leche (Ferrer. 2003; Castilla y col. 2012).

En los años 40 se pensó que habían terminado la pérdida de cosechas por insectos plaga, gracias a la aparición de los insecticidas organosintéticos (DDT, paratión, malatión, dimetoato, entre otros) ya que estos estaban teniendo una gran eficacia además de que no eran de costos elevados, de esta manera empezaron a desplazar a los utilizados en ese tiempo, de origen vegetal. Sin embargo a través del tiempo se hizo un uso excesivo de ellos, lo cual provocó problemas ambientales, aumentos en los costos de producción, peligro en la manipulación de estos, problemas por los residuos generados, como de intoxicación por ingesta de estos residuos en

alimentos y agua, esto sin mencionar que surgió la resistencia a dichos insecticidas y por lo tanto aparecieron plagas secundarias, así como recientes revelaciones de que dichos insecticidas pueden penetrar los granos almacenados haciéndolos tóxicos, por lo tanto hoy en día se han ido retomando algunas alternativas de insecticidas vegetales (Silva y col. 2002; Adebisi y Tedela. 2012).

2.5 Proteínas de defensa

Diversas investigaciones han revelado una amplia base de conocimientos que nos han ayudado a comprender cada vez más las funciones biológicas de las plantas que les permiten relacionarse y mantenerse en un medio ambiente donde deben defenderse a través de biomoléculas importantes para su supervivencia y desarrollo como lo son las proteínas. Enfoques proteómicos han brindado un amplio espectro de proteínas involucradas en la resistencia y defensa de las plantas hacia los insectos herbívoros y demás patógenos. Diversos avances recientes y a lo largo del tiempo, demuestran dichas características importantes de las proteínas, las cuales son cruciales en el proceso de la defensa oxidativa y la transducción de señales (Belete. 2018).

Entre las proteínas más estudiadas, se encuentran las lectinas, las cuales presentan una alta entomotoxicidad por su gran resistencia a la degradación proteolítica por las enzimas digestivas de los insectos (**Tabla 1**); dichas proteínas, tienen la capacidad de interactuar con las glicoproteínas de membrana de las células epiteliales del intestino medio del insecto o incluso a la membrana peritrófica (PM), interfiriendo con procesos fisiológicos principales y dándoles una naturaleza tóxica que ha demostrado en diversos órdenes de insectos efectos insecticidas e insectistáticos (George y col. 2018).

Tabla 1. Estudios de lectinas con efecto insecticida.

Especie	Dosis utilizada	Proteína	Efectos presentados	Administración según peso alimento o de insecto	Referencia
Larvas de <i>Anagasta kuehniella</i> (Lepidoptero)	0,65 % de KpLec produjo una LD 50, mientras que 0,2 % de KpLec produjo una ED 50	Lectina de semillas de <i>Koeleria paniculata</i> (KpLec)	Reducción masa del 84%, por cada 0.1% incremento de KpLec incrementaba un 5.3% la mortalidad. Por cada aumento de dosis de KpLec al 0,1 %, hubo una disminución de peso de 0,35 mg	0.5 y 1.0% (w/w) de Lectina por peso de alimento.	(Macedo y col, 2003)
Larvas de <i>Mamestra brassica</i> Lepidoptera	(LD 50 ≈ 250 µg/g)	lectina del bulbo de ajo, ASAII recombinante	Afectó la sobrevivencia, no permitió un aumento de peso.	5-10 µL de muestras acuosas (que contienen 5-50 µg de proteína liofilizada) (10 mg protein / 5 g diet)	(Fitches y col, 2008)
Larvas de <i>Spodoptera exigua</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	concentración letal estimada del 50% de 79 µg/ml. (95%)	Lectina del arroz <i>Oryzata</i>	mortalidad significativa, reducciones en el aumento de peso de las larvas y un retraso en el desarrollo.	niveles de expresión oscilaron entre 38 y 71 µg/g FW, lo que corresponde al 0,6-1,1 % de la proteína soluble total.	(Al Atalah y col, 2014)
Larvas de <i>Helicoverpa armigera</i> Lepidoptera	1% DL50, 2% tuvo el 70% de mortalidad.	Lectina de <i>Polygonum persicaria</i> (PPA)	Afectó la sobrevivencia, alargó el estado larvario, no aumento masa corporal, malformaciones.	Dieta artificial, 4 concentraciones de PPA (0.1, 0.5, 1 and 2%) por peso de alimento.	(Rahimi y col, 2018)
psílido de la papa (<i>Bactericera cockerelli</i>)	Concentración de ConA de 2000 µg/mL Parafilm con 100 µL de la dieta líquida	concanavalina A (ConA) lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>	Mortalidad total en los psílidos, después del 6to día a diferencia del control, Apoptosis inducida por ConA en el intestino de psílidos	Concentración de ConA de 2000 µg/mL Parafilm con 100 µL de la dieta líquida	(Tang y col, 2020)
Adultos de gorgojo del arroz, <i>Sitophilus oryzae</i> L. (Coleoptera: Curculionidae)	LC 50 de 3,68 % (p / p). LC 30 de 1,82 % (p / p). La mayor mortalidad se observó en adultos alimentados con una dieta que contenía 8% (p / p) de PPA	Lectina de <i>Polygonum persicaria</i> L. (PPA)	causó trastornos digestivos y estrés oxidativo, mortalidad.	5 concentraciones del polvo liofilizado, lectina (0.5, 1, 2, 4 y 8% (p / p) mezclado con granos de arroz (30g)	(Khoobdel y col, 2022)

2.6 Lectinas

Las Lectinas son proteínas que tienen la capacidad de interactuar con carbohidratos y glicoconjugados de manera reversible, reconociendo proteínas específicas de las membranas celulares y uniéndose no covalentemente a la superficie celular (Lagarda-Díaz y col. 2017). Gracias a esta capacidad de interacción han sido posibles diferentes tipos de reconocimiento específico y selectivo de glicoproteínas para identificar células cancerosas donde las membranas celulares se ven alteradas (Park y col. 2001; García-Gasca y col. 2012). Además de ser de gran utilidad también en el desarrollo de aplicaciones prácticas en el rubro alimenticio, investigación sanitaria, agricultura y farmacéutica (Lagarda-Díaz y col. 2017).

Las lectinas se encuentran conformando a todos los seres vivos, sin embargo, son proteínas que juegan un importante papel en la defensa y resistencia de las plantas (Blanco-Labra y col. 2002; Tsaneva & Van Damme. 2020) Las lectinas han sido relacionadas a un amplio espectro de funciones en la naturaleza (**Figura 1**).

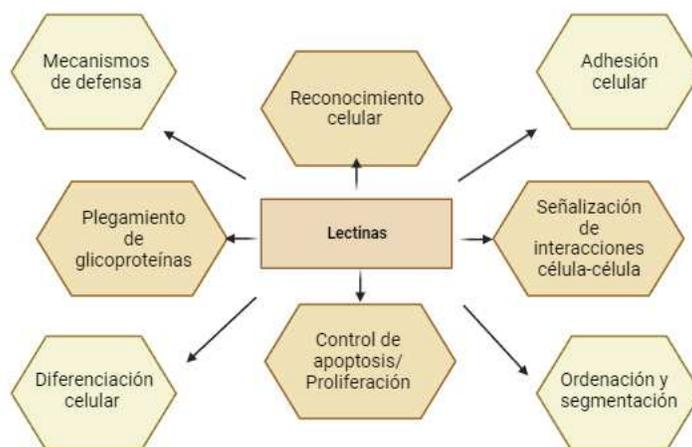


Figura 1. Algunas de las funciones que poseen las lectinas en la naturaleza (Ferriz-Martínez y col. 2015). (Creado con BioRender.com 2024)

Las lectinas de leguminosas aunque varían en sus estructuras cuaternarias y su especificidad de carbohidratos, son proteínas altamente homólogas y han tenido un principal interés gracias a las diferentes características que presentan, como

actividad antimicrobiana, antitumoral, e insecticida, encontrándose en mayor cantidad en las semillas, representando un punto muy importante en el estudio y entendimiento de las interacciones entre proteínas y carbohidratos, a través de la comprensión de sus bases moleculares (Lagarda-Díaz y col. 2017). Son las lectinas una de las alternativas de defensa y control de insectos (Camaroti y col. 2018), ya que presentan su actividad insecticida por la capacidad de unión a los azúcares que se encuentran en la superficie de las células epiteliales del intestino medio de los insectos, pues esta superficie es rica en glicoproteínas que ayudan a una función intestinal correcta, por ejemplo en insectos que carecen de membrana peritrófica, donde también las lectinas pueden interactuar y ejercer su efecto tóxico en la unión a dicha membrana (MP), en el gel peritrófico (GP), así como en las microvellosidades del borde de las células epiteliales (Lagarda-Díaz. 2017), produciendo un efecto nocivo en ellos. Esto se ha visto en insectos de diferentes órdenes y en todas las etapas del desarrollo, presentando estrés oxidativo, la rotura de la matriz peritrófica, rotura en el borde y la capa secretora celular, interferencia en la absorción de nutrientes necesarios para su crecimiento y correcto desarrollo, la inducción de apoptosis al provocar una reacción en cascada en contra de las mitocondrias provocando su muerte programada, hasta incluso el paso a la barrera intestinal hasta llegar a la hemolinfa, causando efectos sistémicos y de ésta manera afectar en la nutrición, crecimiento, desarrollo, supervivencia y reproducción de los insectos (França. 2022; Napoleão y col. 2019).

En la actualidad se tiene conocimiento de los efectos tóxicos producidos por la mayoría de las lectinas en una variedad de insectos fitófagos, entre estos efectos está el efecto insecticida o el efecto insectistático en el organismo, que es la inhibición del desarrollo y crecimiento normal, como se mencionó anteriormente, por ejemplo las lectinas de las leguminosas, se ha detectado que tienen un efecto negativo en la ovoposición, crecimiento, paso de estadios de pupa y larvario, afectando en la digestión, señalización y transporte a través del intestino medio y así la supervivencia de diferentes insectos que podrían ser plaga (Celis y col. 2008; Casas-Corredor y col. 2016; Sadeghi y col. 2006; Liu y col. 2019). Las lectinas de leguminosas han sido estudiadas por su toxicidad para insectos de diversos

órdenes; Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Hymenóptera, Isoptera, Homópera, Neuróptera, además de ser la familia de proteínas con propiedad de reconocimiento y unión a carbohidratos, más amplia, brindando bases moleculares muy importantes para el estudio de la interacción de proteína-carbohidrato (Lagarda-Díaz. 2017).

2.7 Lectinas de frijol Tépari

Las plantas tienen una gran influencia en la supervivencia de los insectos, ya que dichas características como su valor nutrimental, morfología, metabolitos secundarios o biomoléculas de resistencia y defensa, pueden tener efectos en su desarrollo, fecundidad, crecimiento poblacional, afectando de manera significativa en los insectos que se alimentan de ellas (Razazzian y col. 2015).

Un tipo de frijol del género *phaseolus*, familia *leguminoseae* o *fabaceae*, conocido como el frijol del desierto o frijol Tépari es el frijol *phaseolus acutifolius*; esta leguminosa es característica por su resistencia a climas áridos, resistencia a condiciones de baja humedad, altas temperaturas, altas concentraciones de sales y boro, así como a plagas de microorganismos como: *Pseudomonas phaseolicola* y *Xanthomonas phaseoli*, insectos y enfermedades del frijol común, además de ser tóxico cuando no se ha sometido a un proceso de cocción; por estas adaptaciones, su conjunto de propiedades físicas y químicas ligadas con su valor nutritivo lo hacen un recurso importante de proteínas, fibra, vitaminas y minerales (Valadez-Vega. 2004). A pesar de todas estas características, esta especie de frijol ha tenido escasez de información limitando su consumo y a su vez su producción, sin embargo, en los últimos años se ha puesto un especial interés en ciertas moléculas presentes en las leguminosas, en especial en las presentes en el frijol Tépari, como lo son inhibidores de proteasas, lectinas, etc. (López-Ibarra. 2018). Además de estudios que confirman su gran potencial nutricional y funcional como en un posible tratamiento contra el cáncer, gracias a las lectinas que tienen la capacidad de unión a carbohidratos de membrana e inducción a apoptosis e inhibición de crecimiento tumoral (García-Gasca y col. 2012).

Lectinas de diferentes especies de leguminosas, entre ellas del frijol común *Phaseolus vulgaris*, *P. sativum*, probaron en larvas y adultos de insectos tener efectos adversos en su desarrollo, retrasándolo, en su fecundidad, hasta incluso aumentando su mortalidad al ser proteínas que presentan actividad insecticida. Aunque se encuentran conformando a toda la naturaleza, incluyendo virus; las lectinas de leguminosas han sido las más estudiadas por sus características antitumorales, insecticidas, antimicrobianas.

Las lectinas tienen una gran cantidad de características particulares por su capacidad de reconocimiento y unión específica a glicoconjugados presentes en las superficies celulares, así como estructuras intracelulares, dándoles un gran potencial en aplicaciones prácticas en agricultura, investigación sanitaria, farmacéutica, alimenticia (Lagarda-Díaz. 2017).

2.8 *Pichia pastoris*

Pichia pastoris tiene la capacidad de producir glicoproteínas en altas concentraciones y también excretarlas, permitiendo así la producción de mayores cantidades en el medio de cultivo (Martínez-Alarcón y col. 2018) a diferencia de otros métodos de obtención de proteínas recombinantes. Las levaduras, como *Pichia pastoris* al ser una levadura metilotrófica capaz de emplear el metanol como única fuente de carbono y energía, utilizando su promotor (AOX1) regulado por metanol, ha mostrado ser una hospedera adecuada para la producción de proteínas heterólogas ya que tienen un rápido crecimiento en medios de cultivo, de bajo costo, capacidad para hacer modificaciones postraduccionales complejas y son de fácil manipulación genética (Serano y col. 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

Las plantas y sus moléculas bioactivas son una alternativa atractiva para el control de plagas, ya que, al ser moléculas termolábiles, tienen daños mínimos o ningún efecto en la calidad del grano, sobre la salud humana y/o el medio ambiente, a diferencia de los insecticidas químicos y sintéticos.

La Lectina del frijol Tépari ha mostrado efecto dañino en larvas de lepidópteros en otros estudios, además de en otras especies de insectos. Por lo tanto, gracias a la generación de una lectina recombinante utilizando a la levadura *Pichia pastoris* se busca generar de una manera masiva y eficaz esta proteína que tenga efectos nocivos para las larvas de un insecto plaga, que nos permita considerar este método como una posible forma de contrarrestar dichos insectos plaga y disminuir su problemática.

IV. HIPÓTESIS

Una lectina recombinante (rTBL-1) obtenida a través de la levadura *Pichia pastoris* presenta efectos insecticidas e insectistáticos en larvas del insecto *Plodia interpunctella*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la toxicidad de una lectina recombinante obtenida a través de la levadura *Pichia pastoris*, en larvas de una especie de insecto Lepidoptero; *Plodia interpunctella*.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener una lectina recombinante a partir de la levadura *Pichia pastoris*.
- Desarrollar un modelo viable en el laboratorio de la especie Lepidoptero; *Plodia interpunctella*.
- Probar diferentes concentraciones de lectina recombinante para determinar la toxicidad sobre larvas de *Plodia interpunctella*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

Este estudio fue experimental con un diseño completamente al azar. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética (44FCN2022) de la Facultad de Ciencias Naturales (FCN) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ).

6.2 Obtención de la lectina recombinante (rTBL-1)

Para la producción y purificación de la rTBL-1 se utilizó la metodología descrita por Palmerín-Carreño y col (2021) en el laboratorio de extracción y purificación de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

La fracción de lectina recombinante (rTBL-1) se obtuvo por medio de la levadura *Pichia pastoris*, la cual fue previamente modificada de forma genética. La construcción genética se encuentra en el vector pGAP α ZB para producción de la rTBL-1. Dicha transformación se llevó a cabo mediante el kit Pichia EasyComp™ tTransformation Kit de la casa comercial de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las indicaciones de los fabricantes, y una vez transformadas las células se pusieron a crecer en placas con medio de cultivo YPG con 50 μ g/mL como agente seleccionador y fueron incubadas a 30 °C durante 48 h. Tomado de Martínez-Alarcón (2017).

6.2.1 Preparación del medio.

Se prepararon 1.4 L de medio basal utilizando 1.18 g/L de sulfato de calcio*2H₂O, 18.2 g/L de sulfato de potasio, 14.9 g/L de sulfato de magnesio*7H₂O, 4.13 g/L hidróxido de potasio, 40g/L glicerol, 26.7 mL/L ácido fosfórico, 4.35 mL/L oligoelementos y 15 mg/L antiespumante VRF-30.

El sistema se llevó a cabo con una alimentación de 50% v/v glicerol con medio basal y 2 mL/min oligoelementos. Se debió ajustar el pH del medio a 5 con una solución de amoníaco al 32% (v/v). Se preparó una solución de antiespumante VRF-30 y una solución de medio basal con glicerol ambas a una concentración de 0.5% v/v. Seguido de esto se preparó una solución de amoníaco a una concentración de 32% v/v.

6.2.2 Conservación de la cepa.

Con el fin de conservar la cepa productora de lectina recombinante, se prepararon tubos de cultivo con glicerol al 15% (v/v). Se prepararon 200 mL de glicerol al 30 % (v/v) y se esterilizaron a 121°C, 15 psi durante 20 min. Se preparó en un matraz bafleado de 250 mL con 100 mL de medio basal, se esterilizó de igual forma a 121°C, 15 psi durante 20 min. El matraz se inoculó con una asada del cultivo de *P. pastoris* proveniente de caja o del cepario del laboratorio de Biología celular, en donde se incubó el matraz durante 24 a 48 hrs a 30°C, 200 rpm. Se extrajo 1 mL del cultivo, realizando una dilución (1:10) con agua destilada. Con ello, se midió la absorbancia a una longitud de 600 nm, corroborando una absorbancia de 0.2 a 0.4. Por otro lado, se prepararon 10 tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL, a los que se les adicionaron 500 µL de glicerol al 30% (v/v), seguido de esto a los tubos se les adicionaron 500 µL del cultivo de *P. pastoris*. Su conservación fue a -80°C.

6.2.3 Preparación del Biorreactor.

Se empleó un biorreactor de tanque agitado Applikon de 3 L con 2 impulsores tipo Rushton de 6 aspas planas, 4 baffles y un distribuidor de aire en forma de "L". Se vaciaron 1.4 L de medio de cultivo al biorreactor donde se colocaron, los sensores

de pH y oxígeno disuelto. Después se calibró el sensor de pH empleando un buffer de pH 4.0 y 7.0, el biorreactor se esterilizó a 121°C, 15 psi durante 20 min, seguido de esto se conectó con botellas de adición al controlador “in-control”. Las condiciones de operación se programaron a 30°C, 700 rpm, 1 vvm. Tras su operación, se adicionaron 3 mL de antiespumante VRF-30. Se dejó polarizando el sensor de oxígeno durante 12 h. Antes de la inoculación del biorreactor, se calibró el sensor de oxígeno a 100%. Finalmente se realizó el monitoreo en línea de los datos con el software Lucullus-lite.

6.2.4 Preparación del preinóculo y desarrollo de cinética en biorreactor.

Se preparó el preinóculo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio basal estéril. Seguido de esto, se inocularon los matraces con 100 µL de un cultivo en glicerol (15% v/v) de la cepa *P. pastoris* pGAPαZB, almacenado a -80°C. Los matraces se incubaron a 30°C a 200 rpm durante 24-48 h. Se realizó una dilución 1:10 con agua destilada a partir de 1 mL del preinóculo. Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de 600 nm y se corroboró a una absorbancia de 0.2-0.4 (1x10⁶ UFC/mL). Más adelante el reactor se inoculó con el 10% v/v de preinóculo. Los controles se prepararon en matraces Erlenmeyer de 500 mL de medio estéril y se inocularon con 10 mL de preinóculo, los controles se incubaron a 30°C, 200 rpm durante 7 días. Por otro lado, en el caso del biorreactor, se desarrolló la cinética a 30°C con un flujo de aire de 1 vvm y con control variable de la agitación que fue de 700 a 1000 rpm, en función del oxígeno disuelto en el medio al 30-50%. Se controló la adición de la base con un pH de 5, según se requirió. Más adelante, el muestreo del biorreactor se realizó de forma periódica a las: 0, 4, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80 y 96 h, tomando 8 mL de muestra. Con ello, se midió la densidad óptica a 600 nm, oxígeno disuelto, la producción de biomasa (peso seco) y la producción de proteína total.

6.2.5 Determinación de biomasa

La producción de biomasa se determinó de dos formas: por medición de la densidad óptica a 600 nm y por biomasa por peso seco. En el primer caso de la densidad óptica, se realizaron diluciones de las muestras para contar con lecturas de absorbancia en un rango de 0.1-0.8. En biomasa por peso seco, se midieron 2 mL del cultivo y se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con 500 μ L de agua estéril, donde se transfirió la pastilla a una charola de aluminio para el registro de su peso. El peso de la muestra con charola se registró por diferencias gravimétricas, se obtuvo el peso de biomasa y se consideró el volumen de la muestra para determinar la concentración de biomasa producida.

6.2.6 Extracción de la lectina recombinante (rTBL-1).

La extracción de la lectina recombinante (rTBL-1) se realizó en el orden del siguiente procedimiento: Preparación de buffer BB8x, pH 7.4, NaCl- 187.01 g/L y Fosfato de sodio dibásico 22.7g. Tanto para la muestra de biorreactor como de matraz, se midió 1L de cultivo y se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Los análisis se realizaron por triplicado. La pastilla celular se descartó y se conservó el sobrenadante, filtrando el sobrenadante 2 veces con papel Whatman No. 11. Finalmente se adicionaron 125 mL de buffer BB8X al medio.

6.2.7 Purificación de rTBL-1

La purificación de la lectina recombinante (rTBL-1) se realizó utilizando una columna de afinidad al níquel (GE Healthcare). Para fines prácticos por cada 250 mL de muestra: se pasaron 50 mL de agua destilada por la columna, 50 mL de buffer BB1X, 250 mL de muestra en su medio crudo, 50 mL de buffer BB1X y 50 mL de Imidazol a 200 Mm. Con el procedimiento descrito, se recuperó la muestra con Imidazol, Pasando 50 mL de agua destilada por la columna, se pasó 20 mL de etanol al 20% v/v. Se resguardó la columna a 4°C. En el Imidazol recuperado contenía la Lr (rTBL-1), por lo que se sometió a un proceso de diálisis. Una vez que se obtuvieron las

muestras dializadas se congelaron con hielo seco y acetona en vasos de precipitado. Las muestras permanecieron durante 5 días para un volumen aproximado de 1 L, finalmente el polvo recuperado se almacenó a 4°C.

La proteína obtenida se identificó utilizando el método de Bradford (1976) en geles de poliacrilamida al 13%. Y la rTBL-1 se analizó mediante geles SDS-PAGE (Laemmli. 1970) con 25 µg de proteína por gel. Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie por 12 horas, retirando el exceso de colorante y lavando los geles en solución de metanol/ácido acético 4:3 hasta que se pudieron observar las bandas en el gel.

6.3 Preparación del alimento

La preparación del alimento se desarrolló basado en el protocolo desarrollado por Heryanto y col. 2022 (con algunas modificaciones), de la siguiente manera: en un contenedor se mezcló (50% salvado de trigo grueso orgánico, 13% levadura de cerveza en hojuelas, 5% dextrosa anhidra, 22% glicerina líquida pura grado ups, 2% de aceite de canola y 8% de agua), los materiales se mezclaron hasta generar una masa semihúmeda y homogénea, posteriormente la mezcla se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

6.4 Desarrollo de la cepa del insecto *Plodia interpunctella*.

Basada en la metodología de Heryanto y col (2022) con modificaciones, para el establecimiento de pie de cría y cultivo de *Plodia interpunctella*, se realizaron colectas de ejemplares de diferentes partes de la ciudad, de graneros rústicos, mercados de semillas, hogares con ejemplares, entre otros y se tuvieron en contenedores de plástico duro LocknLock rectangulares de 350ml con tapa hermética, y en contenedores circulares transparentes de plástico grueso con tapa de rosca para evitar que se escaparan por caídas accidentales al abrirse, romperse ya sea la tapa o el contenedor completo o por aberturas que pudieran hacer los insectos en materiales delgados, además de ser adecuados para su uso a muy bajas temperaturas cuando era necesario; estos contenedores, además contaron

con un respiradero de malla de organza de 2 cm de diámetro adherido a la tapa del contenedor como respiradero para los insectos (**Figura 2**).

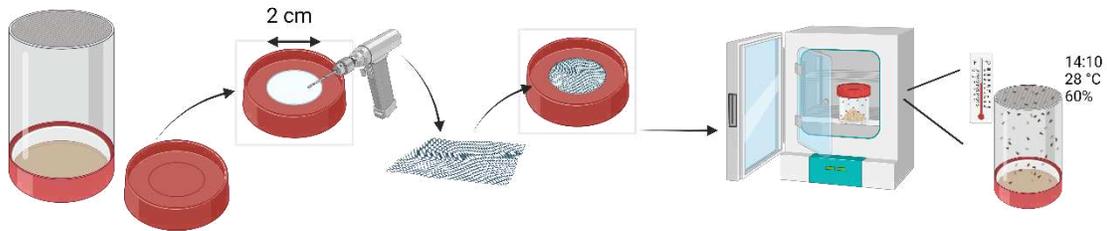


Figura 2. Ilustración de los contenedores de tapa en rosca con el respiradero de 2 cm de diámetro, en donde se mantuvieron a los insectos en condiciones controladas durante todo el experimento. (Creado con BioRender.com 2024)

Para separar a los adultos y sexarlos, para producir más huevos, se utilizaron vasos pequeños de plástico de 25 ml, tapados con malla fina y ligas de hule para reforzar el cerrado del bote dándole dos vueltas a la liga, esto para tener un mayor control al ser un número reducido de larvas y de alimento por réplica. Con ayuda de una caja de acrílico de 40x40 cm, con dos orificios en cada extremo se realizó la manipulación de los recipientes de crianza, sin la necesidad de realizar movimientos invasivos en los insectos. Los adultos se colocaron en los vasos pequeños de plástico antes mencionados (**Figura 3**).

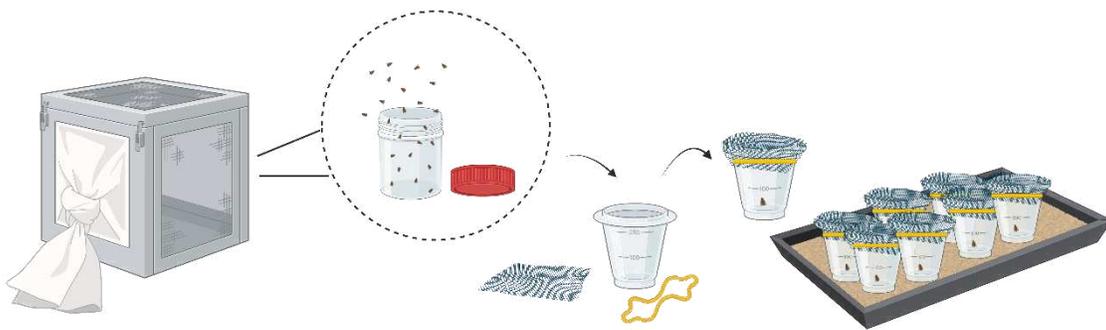


Figura 3. Ilustración de la forma en que se manipularon los organismos para los experimentos.

Para poder separar a los adultos, se colocaron en un congelador a -7°C durante 10 min, de esta manera se alentó el movimiento para poder manipularlos, en cada

contenedor se colocaron 70 gr de alimento previamente realizado y se depositaron 4 hembras y 4 machos en cada uno para su apareamiento (**Figura 4**).



Figura 4. Ilustración de la forma en que se sexaron y se organizaron los adultos previamente separados individualmente. (Creado con BioRender.com).

Se colocó de 10-12 mg de huevo por 50 gr de dieta artificial en los contenedores, con una humedad relativa de 60%, y 28°C , en un periodo de luz oscuridad de 14:10 respectivamente.

Las larvas desde la eclosión del huevo hasta el tercer instar, estuvieron en los contenedores de crianza con la dieta artificial sin rTBL-1 para su posterior evaluación con los tratamientos.

Las larvas de tercer instar fueron diferenciadas por los días de eclosión, su tamaño y coloración. El primer instar tiene una duración de $5,31 \pm 0,60$ días después de la eclosión, es decir durante la primera semana, después del segundo instar en la segunda semana aproximadamente desde la eclosión, la coloración de estos instar es un poco transparente; el tercer instar, que es el instar de interés, es durante la tercera semana desde la eclosión y la coloración de su tegumento es más rojizo y sólido, por último, el cuarto y quinto instar, cuarta y quinta semana respectivamente, su coloración es más amarillenta con su tegumento más firme; clasificación indicada por (Pérez y col. 2012)

Una vez estuvieron en el periodo de tiempo de vida que se requería, es decir, que se encontraban en el tercer instar, fueron separadas el número de larvas a evaluar en pequeños vasos de plástico y se alimentaron con su dieta habitual adicionando a su dieta artificial normal las 4 diferentes concentraciones de rTBL-1 para su posterior evaluación durante diez días.

Para esto, se pesó su dieta habitual y se le fue adicionando la respectiva cantidad de rTBL-1 para cada tratamiento como se indica a continuación en la (**Figura 5**).

6.5 Tratamientos para determinar la concentración letal 50

Previo a todos los posteriores experimentos, se realizó un experimento piloto para conocer la cantidad de alimento que consumían las larvas en un ambiente normal y sin presión, para esto se colocaron 5 larvas por 4 réplicas y un control, con 2.6 gr durante 7 días para saber cuánto consumían de alimento, se pesó diariamente el alimento restante, así como el peso de las larvas en conjunto. Y se obtuvo que consumían 5 larvas 0.52 gr de alimento en 7 días, esto para que, en el experimento posterior, no hubiera demasiado alimento sobrante y así se pudiera controlar de una mejor manera que las larvas consumieran el total de la lectina recombinante rTBL-1.

Para todos los tratamientos previos al experimento final, así como los experimentos piloto en los que se utilizó la lectina rTBL-1 fue perfectamente mezclada junto con la dieta artificial totalmente nueva y separada para cada tratamiento, distribuyendo la rTBL-1 en las dietas con ayuda de un vórtex y compactando por cada uno de los contenedores pequeños para experimento. Las muestras control no llevaron ninguna dosis de rTBL-1.

Para determinar la concentración letal de la lectina recombinante contra el insecto *Plodia interpunctella*, se realizó un abanico de dosis basado en la literatura reportada de lectinas contra diversos insectos (Macedo y col. 2003). Con este abanico se realizaron pruebas piloto para conocer el mínimo de lectina recombinante capaz de producir un daño en las larvas para de ahí tomar las concentraciones con las que podríamos encontrar la concentración letal para las

larvas de *Plodia interpunctella*. En dicho experimento piloto se hicieron cortes transversales a la cabeza y longitudinales del intestino medio para evaluar el daño generado en las larvas expuestas a la rTBL-1. Con base en el experimento piloto pudimos evaluar que la lectina recombinante rTBL-1 tenía un efecto nocivo en el crecimiento y desarrollo normal de las larvas, así como daños irreversibles en el intestino medio, sin embargo las larvas no tuvieron un índice de mortalidad inmediato y alto, por lo que se ajustaron las dosis incrementándolas 10 veces más a lo que se usó, sin embargo, como podemos observar en el presente estudio, el índice de mortalidad no fue inmediato ni más del 30% total de las larvas, aunque si tuvieron daños irreversibles en su crecimiento y desarrollo normal y exitoso.

Una vez que se obtuvieron las concentraciones a evaluar y que se separaron las larvas de tercer instar en grupos de 14 larvas en los respectivos vasos de 25 ml se agregó poco a poco la lectina liofilizada en el alimento y se colocó en un vórtex para homogenizar el alimento, esto se realizó para cada tratamiento, las dosis de proteína se muestran en la (**Tabla 2**). Para el caso del control se colocó 0.75 gr de alimento y se agregaron 14 larvas que se encontraban en el tercer instar, en un vaso de 25 mL tapado con malla sin concentración de lectina recombinante.

Tabla 2. Concentración de lectina recombinante por tratamiento disuelta en alimento.

Tratamiento	Concentración (µg de Lr)	Peso alimento (gr)
1	0.0788508	0.75
2	0.131418	0.75
3	0.1839852	0.75
4	0.262836	0.75

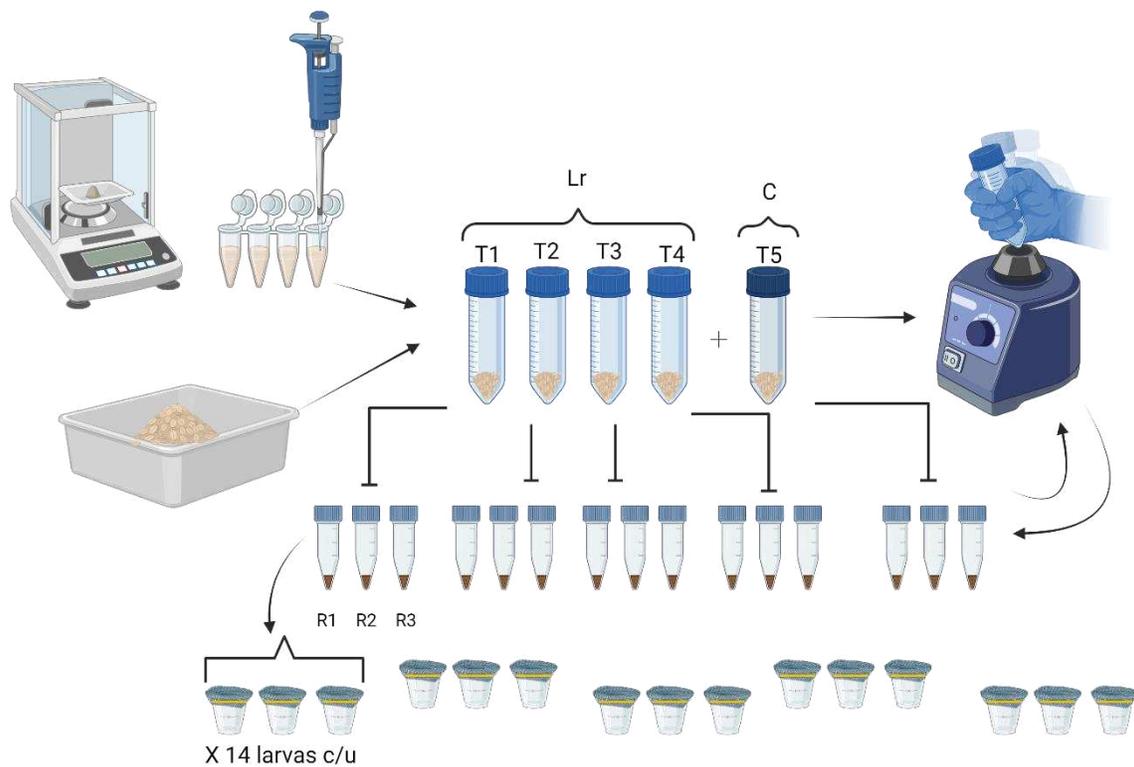


Figura 5. Esquema que ilustra el diseño experimental. (Creado con BioRender.com).

El tratamiento tuvo una duración de 10 días, a lo largo de estos días, se realizó una revisión diaria a la misma hora para determinar la sobrevivencia de las larvas, se evaluó la movilidad y su crecimiento longitudinal en mm, así como su peso en cada réplica de cada tratamiento; de igual forma se pesó el alimento restante, se contó el total de larvas sobrevivientes y muertas, las cuales se fueron retirando para colocarlas en formol para su posterior evaluación histológica.

Durante el tratamiento se tomaron tres larvas control, una en el segundo día del tratamiento, otra en el día el día cinco y otra el día nueve para evaluar y comparar con las larvas que fueron expuestas a los cuatro tratamientos con la rTBL-1 durante los diez días.

6.6 Evaluación de tamaño y peso de las larvas, evaluación del consumo de alimento por tratamiento.

Para determinar el largo de las larvas se utilizó un aumento de 8x y se compararon con los datos conocidos de las medidas para cada instar en condiciones favorables y controladas dentro del laboratorio según Pérez y col (2015), además de su peso, se hizo una comparación con las larvas control para poder determinar cambios y deficiencias en su desarrollo y crecimiento para las larvas expuestas a las diferentes concentraciones de la rTBL-1, en el paso de los días que fueron sometidas a los tratamientos.

Además de esto, se evaluó diariamente el consumo de alimento por tratamiento, con la finalidad de saber si la toxina contribuía a que las larvas dejaran de comer al estar siendo intoxicadas con la lectina recombinante (rTBL-1)

6.7 Criterios para la evaluación de la movilidad relativa (MR)

Para la movilidad, las larvas fueron evaluadas individualmente en un lugar controlado dentro de una caja Petri limpia, en donde se les cronometró el tiempo (30 s) y se observó la movilidad y la distancia aproximada recorrida en esos segundos. La puntuación correspondiente se atribuyó a cada larva según haya sido su movimiento específico en ese periodo de tiempo, como se indica en la (**Tabla 3**).

Tabla 3. Criterios para evaluar el efecto de los tratamientos de rTBL-1 sobre la movilidad de las larvas de *Plodia interpunctella*; el valor de (P) corresponde al Puntaje dado a la Movilidad relativa (MR) observada.

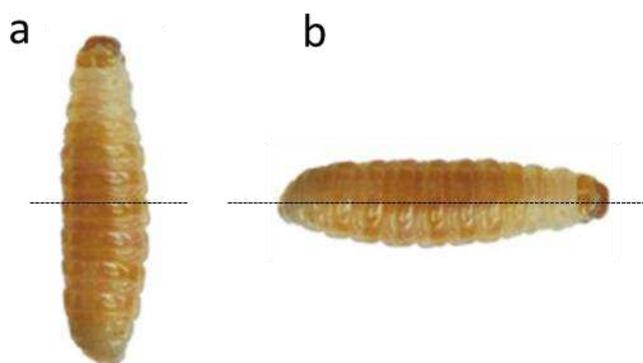
(P)	Movilidad de la larva
0	Larva inmóvil pero no muerta
1	Larva sin desplazamiento, pero no inmóvil, aletargada
2	Larva muy aletargada, movimiento disparejo
3	Movimiento lento, todo el cuerpo involucrado, larva aletargada

4	Movimiento intermedio, todo el cuerpo involucrado
5	Movimiento rápido, todo el cuerpo involucrado, larva alerta y vivaz

6.8 Estudios histológicos del intestino medio

Las larvas tomadas para evaluación y las larvas muertas en los diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de rTBL-1 a lo largo de los diez días, así como las larvas control, fueron disectadas en cortes transversales a la cabeza y longitudinales para observar daños en el intestino medio (**Figura 6**). Las disecciones se hicieron en solución de Ringer, donde, los intestinos de las larvas se aislaron y se fijaron con Bouin acuoso por 24 hrs, posterior a esto, fueron puestos en alcohol etílico al 70%, se deshidrataron en series alcohólicas que van de forma ascendente y fueron aclarados en aceite de madera de cedro y puestos en cera de parafina, las muestras se montaron en parafina y se realizaron cortes de un grosor de 8 μm . Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina de Mayer y fueron montadas en bálsamo de Canadá, finalmente se observaron los cortes en un microscopio óptico, se obtuvieron fotografías para su posterior análisis comparativo de los cuatro tratamientos y el control como lo indica (Mahmoud y col. 2021).

Figura 6. a) Ilustración del corte transversal para observación del intestino medio de las larvas b) Ilustración de corte longitudinal.



6.9 Análisis Estadístico

Los porcentajes de eficacia de cada una de las concentraciones fueron calculados mediante la fórmula de Abbott (1925).

La mortalidad acumulada al décimo día por tratamiento se evaluó con un análisis de varianza. Para los resultados obtenidos en las variables de peso, tamaño y peso del alimento se evaluaron empleando análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas. Se realizaron pruebas post hoc con el método de Tukey empleando un nivel de significancia de 0.05. Y para el efecto de la concentración sobre la movilidad se exploró con una regresión ordinal.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de la rTBL-1

Una vez obtenida la cantidad necesaria de la rTBL-1 para los tratamientos en larvas, de un rendimiento similar al reportado por Palmerín-Carreño y col (2021) el cual fue de 265 ± 13 mg/L, se iniciaron las pruebas de toxicidad en los diferentes tratamientos.

7.2 Desarrollo de una cepa viable del insecto *Plodia interpunctella*

Se estableció el pie de cría viable de la especie *Plodia interpunctella*, obteniendo hasta más de 11 generaciones viables y exitosas de dicha especie, la sobrevivencia fue de hasta 80% por generación, la dieta presentó buena combinación para el desarrollo de las larvas, se pudo observar que las condiciones necesarias para el buen desarrollo de los insectos basado en lo mencionado por Heryanto (2020), donde también reportó el 90% de la población como exitosa.

7.3 Evaluación del tamaño, peso de las larvas y consumo del alimento

Las larvas de los tratamientos de *Plodia interpunctella* se observaron todos los días a la misma hora y se determinaron los siguientes valores: mortalidad, peso larvario, peso en alimento consumido, cambios morfológicos y longitud de larva. Hubo un 30% de larvas muertas en total durante todo el tratamiento. Para el día diez el control tuvo un 4.7% de larvas muertas acumuladas, la proporción más alta de larvas muertas acumuladas fue del 16% (**Figura 8**). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la mortalidad. Para el día 6 hubo un pico de incremento de muertes, así como en el último día, sobre todo en el T3 y T4, sin embargo, el T2 tuvo más larvas muertas constantemente, en el día 8 y 9 no hubo larvas muertas de ningún tratamiento. En un estudio similar, utilizando bulbos híbridos de *Hippeastrum (Amaryllis)*, (HHA) contra larvas recién emergidas del gusano de la hoja del algodón (*Spodoptera littoralis*), después de los seis días no se detectó más mortalidad, las larvas sobrevivientes tuvieron una notable

disminución en su crecimiento y aumento de peso comparadas contra el control, así como una disminución en el porcentaje de larvas que lograron pasar al tercer instar (Caccia y col. 2012). Esto es similar a lo registrado en el presente estudio, ya que hubo una disminución en el porcentaje de larvas que lograron pasar a los siguientes instar alargando su periodo de tiempo en cada instar, atrasando su correcto tiempo de desarrollo, además de una notable disminución en el peso y crecimiento longitudinal de las larvas, así como la mortalidad que después de ciertos días no se prolongó más, tal como lo reportan algunos otros estudios, entre ellos el de Caccia y col. (2012) (**Figura 7**).

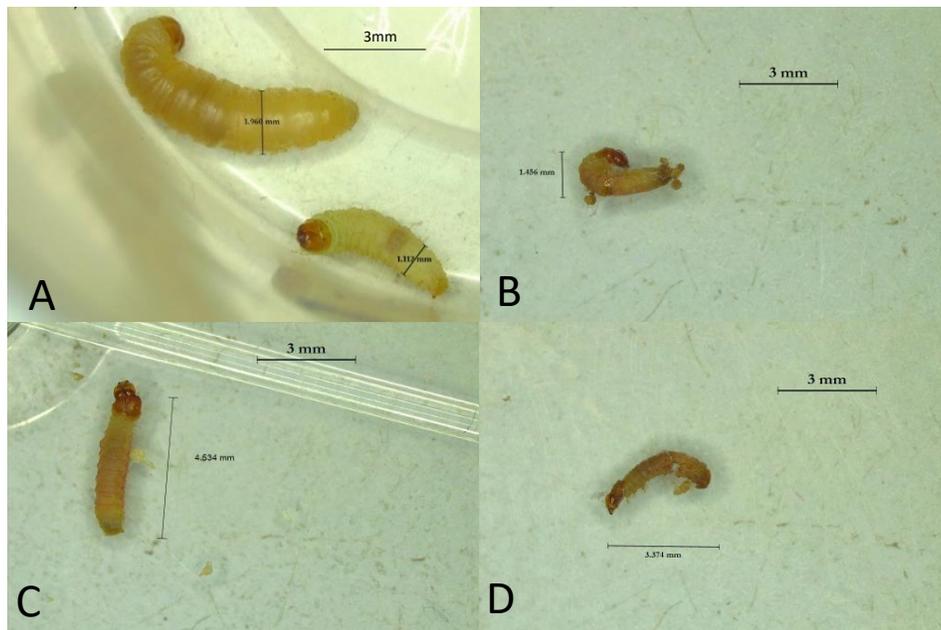


Figura 7. Larvas que no pudieron completar exitosamente el proceso de muda para pasar al siguiente instar, muriendo en ese proceso. **(A)** larva control con coloración, peso y tamaño normal, **(B)** Larva en proceso de mudar su exuvia, sin éxito. **(C)** larva que en el proceso de muda no logró completar exitosamente el proceso de retirar la exuvia por completo. **(D)** larva que en proceso de muda no pudo concluir el retiro de la exuvia de manera exitosa.

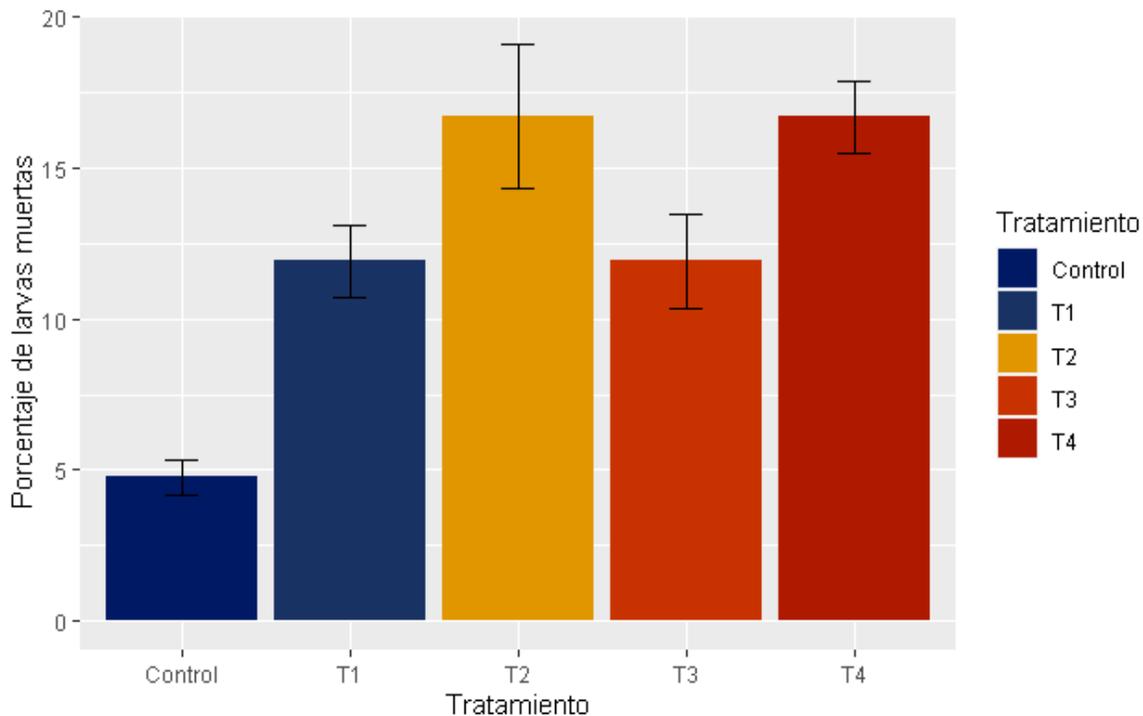


Figura 8. Porcentaje de larvas muertas a través de los días, por tratamiento, el T2 tuvo más larvas muertas constantemente, en el día 8 y 9 no hubo larvas muertas de ningún tratamiento.

La disminución o el aumento normal del peso de las larvas correspondiente a la ingesta de alimento, esto es un parámetro importante para la evaluación toxicológica, ya que por medio de estas mediciones puede detectarse de forma casi inmediata la toxicidad de los compuestos administrados, así como el reconocimiento y respuesta de los individuos a ella (Repetto Jiménez y Repetto Khun 2009). En este caso, aunque las larvas dejaron de comer de manera normal y hubo disminución en el peso de algunas larvas, no hubo diferencias significativas en el peso entre réplicas, como se muestra en la (**Figura 9**), sin embargo, las larvas expuestas a concentraciones más altas de rTBL-1 disminuyeron el consumo de alimento en relación a las larvas expuestas a concentraciones más bajas. Como podemos observar, el control está por encima de las demás líneas y el tratamiento 4, que es el que tuvo mayor concentración de rTBL-1, está por debajo de todas las demás, no se observa diferencia significativa entre los tratamientos.

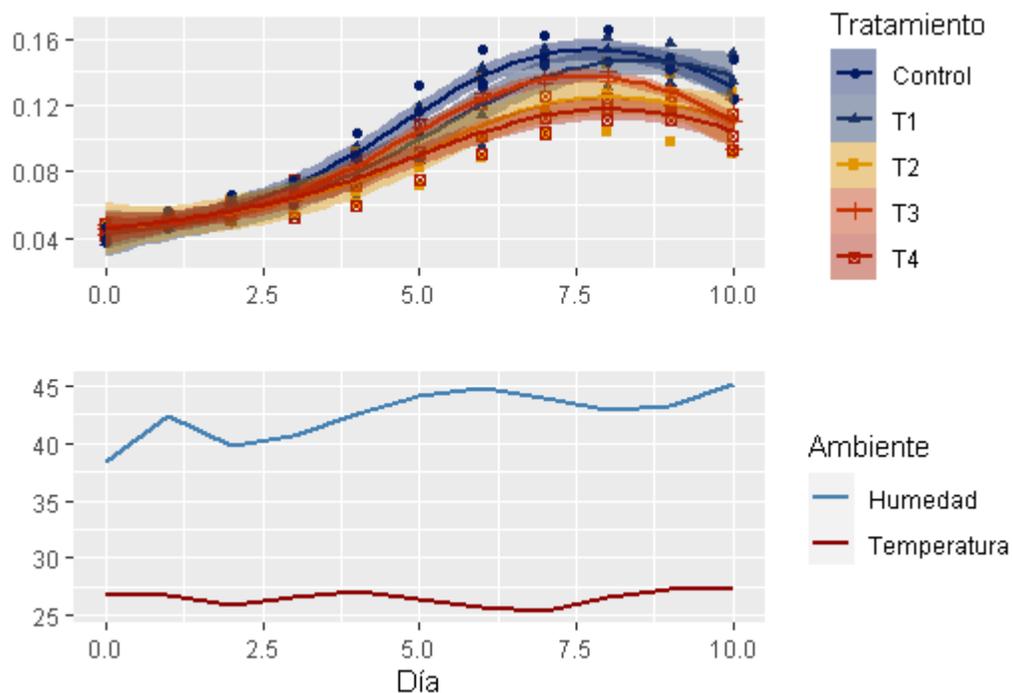


Figura 9. Incremento del peso de las larvas por tratamiento a través de los días, mediante un análisis de varianza comparando cada tratamiento contra el control, donde no existieron diferencias significativas entre los tratamientos para esta variable.

Registros indican sobre los efectos nocivos de las lectinas en los insectos, Eisemann y col en 1994 reportaron que una lectina ConA podía unirse a las membranas peritróficas de una especie de mosca, *Lucilla cuprina* provocando un aumento en la permeabilidad, restringiendo el movimiento bidireccional de los nutrientes, así como de enzimas digestivas, dando como resultado una privación de nutrientes, teniendo efectos adversos en su crecimiento y desarrollo (Eisemann y col. 1994; Macedo y col. 2007). En el caso de las larvas de *Plodia interpunctella*, en el presente estudio, pudimos observar dichos efectos al encontrar larvas con una disminución considerable en peso y coloración (**Figura 10**), aunque no fueron un número estadísticamente importante para poder decir que hubo cambios significativos en un gran número de larvas, podemos decir que la lectina fue tóxica, pero quizás algo no permitió que tuvieran un alcance equitativo de ella, o en cuanto detectaron la toxina pudieron evitar su consumo.



Figura 10. (A) Larva control, quinto instar, coloración del tegumento normal, tamaño y peso normal, aproximadamente 14mm. **(B)** Larva con reducción de tamaño muy notorio (3.8 mm), coloración rojiza y baja movilidad.

Por otra parte, hubo un aumento significativo en el peso del alimento restante en el consumo diario (**Figura 11**) a diferencia del control; en donde hubo una disminución de alimento restante diario, es decir, que lo estaban consumiendo de forma normal e indiscriminada, por lo que las larvas control tuvieron un aumento normal en su peso diario, es decir, no hubo ninguna que tuviera una disminución corporal considerable y su alimento disminuía a lo largo de los días de forma normal.

El consumo de alimento tuvo un comportamiento semejante en todos los tratamientos, haciendo muy evidente que la presencia de la proteína de alguna manera disminuye el consumo de alimento en todos los tratamientos comparados con el control, sin embargo, en los tratamientos 2, 4 y 3 se tienen diferencias significativas con respecto al control a diferencia del tratamiento 1, en donde casi no hubo diferencias significativas con respecto al control ($P= 0.0569$).

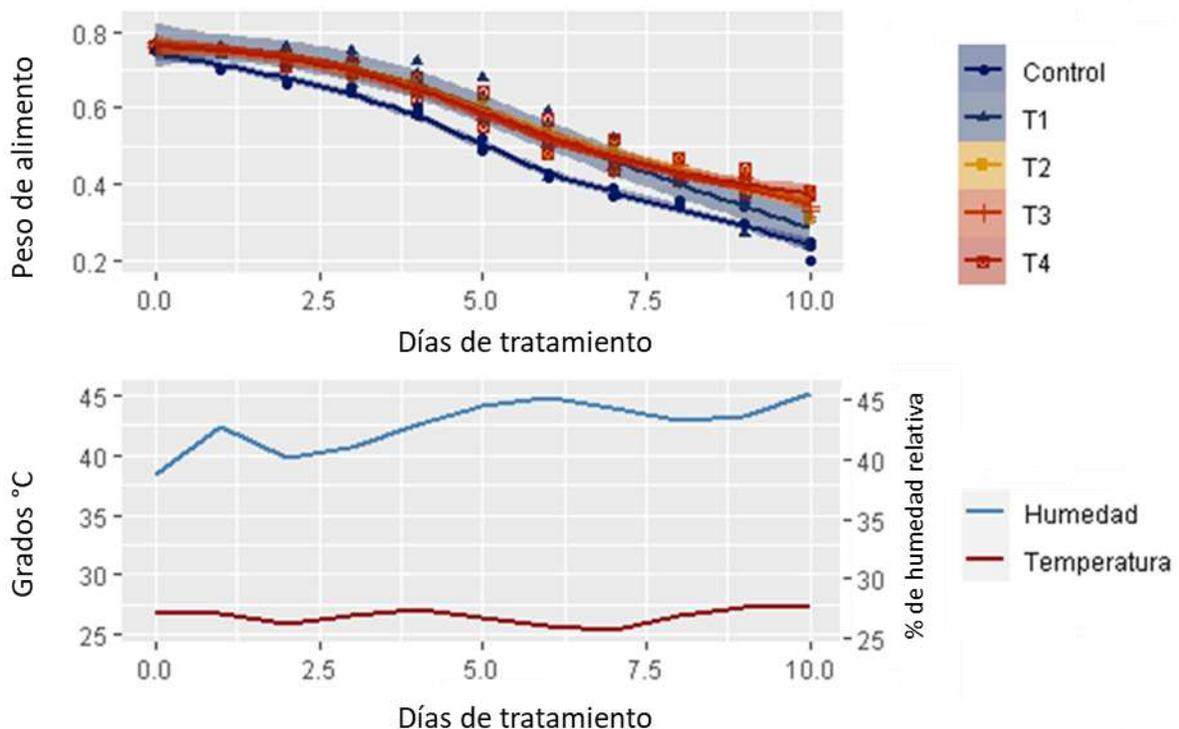


Figura 11. Disminución del peso del alimento consumido por cada tratamiento a través de los días, mediante un análisis de varianza comparando cada tratamiento contra el control.

Cabe mencionar, que además de haber presentado una disminución significativa en el consumo de alimento por la presencia de la proteína, el alimento adicionado con ella incitó a las larvas al canibalismo, lo cual no se había observado con anterioridad durante el desarrollo de este estudio en todo el proceso de establecimiento de la cepa (**Figura 12**) Rharrabe y col (2007), reportaron la misma situación en *Plodia interpunctella* al adicionarle a su alimento *harmalina* proveniente de semillas de *Peganum harmala* y causar estrés en las larvas afectadas con la toxina.

Tang y col (2016), reportaron que el canibalismo suele ser más intenso cuando las larvas se ven afectadas por factores de disponibilidad de alimentos, como cantidad y distribución de los mismos, así como por la temperatura, arriba de los 30°C, la competencia, entre otros; por ejemplo notaron un aumento de canibalismo en alimentos de un solo tipo lo que representa condiciones naturales a diferencia de dietas artificiales compuestas por varios tipos de alimento, esto nos sugiere que

podrían estar buscando la opción para encontrar nutrientes de manera adicional, o la competencia incrementa al no tener una disponibilidad variada de nutrientes, incluso reportaron que podía influir el estadio en que se encontraran las larvas, pues notaron que las larvas a partir del tercer instar en adelante presentaron más casos de canibalismo que los estadios anteriores a ese.

Chilcutt y col (2006) reportaron en larvas de *Helicoverpa zea*, que fueron criadas con maíz transgénico que tenía *Bacillus thuringiensis*, que hubo canibalismo al generar una dieta que resultó muy estresante para las larvas, instigándolas a atacarse entre ellas.

Podemos resaltar que, en los estudios mencionados con anterioridad, los organismos detectaron que había algo que les estaba haciendo daño en el alimento, el estrés, la competencia, quizás la búsqueda de otra forma de adquirir nutrientes, llevan a las larvas a eliminar competencia, y/o a buscar alimentarse consumiéndose entre sí, son razones que podrían responder el porqué del canibalismo entre las larvas en esas condiciones. Además, también el canibalismo aumenta al tener un espacio reducido que permita que las larvas fácilmente se encuentren entre sí, lo cual provoca que tengan ese comportamiento atacando y comiendo a las más débiles (Tang y col. 2016).

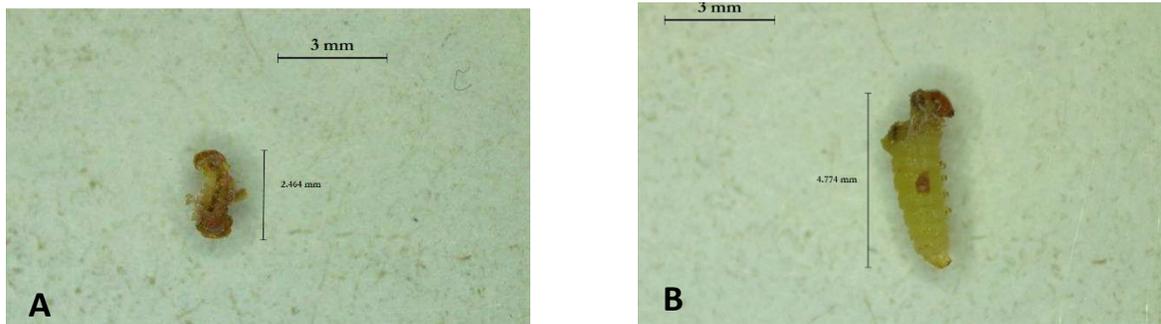


Figura 12. Ejemplo del canibalismo observado en larvas muy pequeñas. **(A)** larva de 2.46 mm de longitud, de coloración rojiza, frágil tegumento y con signos de mordeduras por parte de otras larvas. **(B)** larva de 4.77 mm de longitud, de aspecto encogido, con mordeduras en la parte superior de la cabeza; se alcanza a percibir seda en la zona afectada, lo que muestra que quizás las larvas atacantes al desplazarse sobre ella y morderla la fueron dejando a su paso.

7.4 Evaluación de la movilidad

Para el promedio de la movilidad relativa (MR) de las larvas de *Plodia interpunctella*, fueron evaluadas por tratamiento y a su vez todos los tratamientos fueron comparadas con el control. Los resultados mostraron que la movilidad de las larvas fue más baja cuando se expusieron a diferentes concentraciones de rTBL-1 a diferencia de las larvas control no expuestas a la proteína recombinante. Podemos observar que el control incrementa su movilidad a lo largo de los días mientras que el resto de los tratamientos permanecen más o menos iguales a lo largo del tiempo. No obstante, el tratamiento 3 tiene más movilidad que el resto de los tratamientos. Existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con respecto al control, valor $p < 0.01$ (**Figura 13**), Sin embargo, esta variable pudo verse influenciada por diferentes factores externos generando ruido, por ejemplo, muchas veces las larvas al ser separadas del grupo y de su alimento se ponían en forma de alerta, quizás esperando ser depredadas, o al no reconocer el entorno, se movían de forma cautelosa y dudosa. También pudo ser en ocasiones que se encontraran en etapa de muda y por lo tanto, estaban en reposo para mudar y pasar a un instar superior, por otra parte, aunque las larvas control si tenían un aspecto más saludable y eficaz para moverse hasta incluso lograban en el tiempo medido salirse de la caja Petri, es una variable muy subjetiva puesto que pueden ser varias las razones por las que tenían ese comportamiento, sin embargo podemos observar claramente que si hubo diferencias en cuanto a los tratamientos contra el control, podemos asumir en esta evaluación, que, aunque esta variable tiene mucho ruido externo, hubo diferencias notorias que sugieren que las larvas expuestas a la rTBL-1 eran larvas más aletargadas por la alimentación escasa y/o malestar a causa de la toxina a diferencia de las larvas control, quienes se encontraban en un perfecto estado de alerta y movilidad ágil y acelerada.

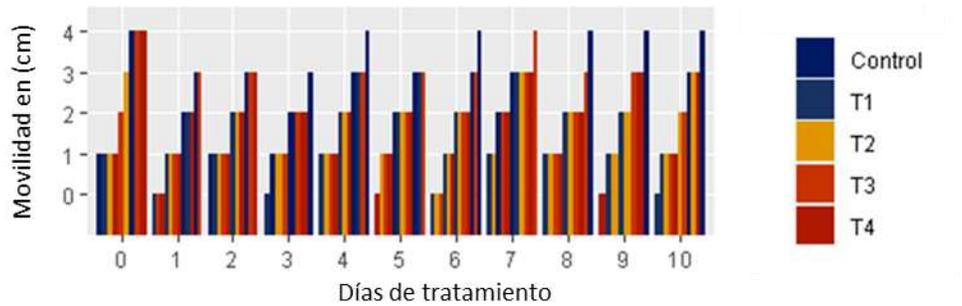


Figura 13. Movilidad relativa (MR) de las larvas de *Plodia interpunctella* por réplicas expuestas a diferentes concentraciones de rTBL-1. Cada tratamiento con sus réplicas es representado con un color distinto. Todos los tratamientos fueron comparados contra el control, el cual supera a todos los tratamientos e incrementó a lo largo de los días, el tratamiento 3 presentó mayor movilidad entre los tratamientos, dejando al tratamiento 4 al último con menor movilidad a lo largo de los días, existen diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control $p < 0.01$.

Los cambios en la movilidad puede ser una característica observable complementaria e indicativa de que algo está generando dificultad en el movimiento normal de la especie involucrada en algún tratamiento nocivo, como es el caso de la Lectina. En el estudio realizado por Villamizar y col (2009) se utilizó carga viral para enfermar a las larvas de Lepidóptero a utilizar, se reconocía a las larvas infectadas por una coloración parcial, frágil tegumento y poca movilidad, lo cual nos indica que es una característica significativa de larvas que presentan contacto con un agente tóxico y nocivo para ellas.

Incluso esta característica se ha visto, no solo en insectos, sino en otros animales como es el caso del estudio de Conga-Pachín (2017), que reportó un deterioro en la movilidad en larvas del anuro *Rhinella spinulosa* al medir el efecto toxicológico del cloruro de mercurio, en este estudio se menciona que la disminución o pérdida de la movilidad está asociada con el incremento del costo metabólico que se ve afectado por el intento de depuración, de desintoxicación celular, al requerir una mayor cantidad de aminoácidos para sintetizar, así como la reducción de actividad en algunas enzimas, por lo que se ve directamente afectado a altos costos

metabólicos que provocan una disminución en el peso, así como en la disminución de la movilidad, como también lo reporta Muñoz y Palacio (2010) en una especie de anfibio *Dendrosophus bogerti*, donde observaron inmovilidad total y contracciones musculares espasmódicas en las larvas a causa de la toxicidad del mercurio.

7.5 Daños morfológicos posteriores a la etapa larvaria

La alimentación que se les suministró a las larvas de *Plodia interpunctella* adicionada con rTBL-1, provocaron una toxicidad significativa y físicamente visible en su morfología, principalmente en la transición a las siguientes etapas, así como interrupciones fisiológicas muy notorias.

Se observó un retraso en el desarrollo de las larvas en el último periodo larvario, como vemos en la (**Figura 14**) sólo el control fue capaz de pupar en una cantidad importante a diferencia de las larvas que fueron alimentadas con la lectina recombinante. El control para el día 10 tuvo un mayor y total número de larvas a diferencia de los tratamientos, donde el T4 fue el que menos pupas tuvo para el día 10, el cual es el tratamiento con más concentración de rTBL-1.

Rahimi y col (2018) reportaron en larvas de lepidoptero *Helicoverpa armígera*, al probar la toxicidad de una lectina obtenida de *Polygonum persicaria* L. (PPA) adicionando 1% en su dieta, duraciones larvales prolongadas en los estadios larvarios quinto y sexto como lo reportado en el presente trabajo.

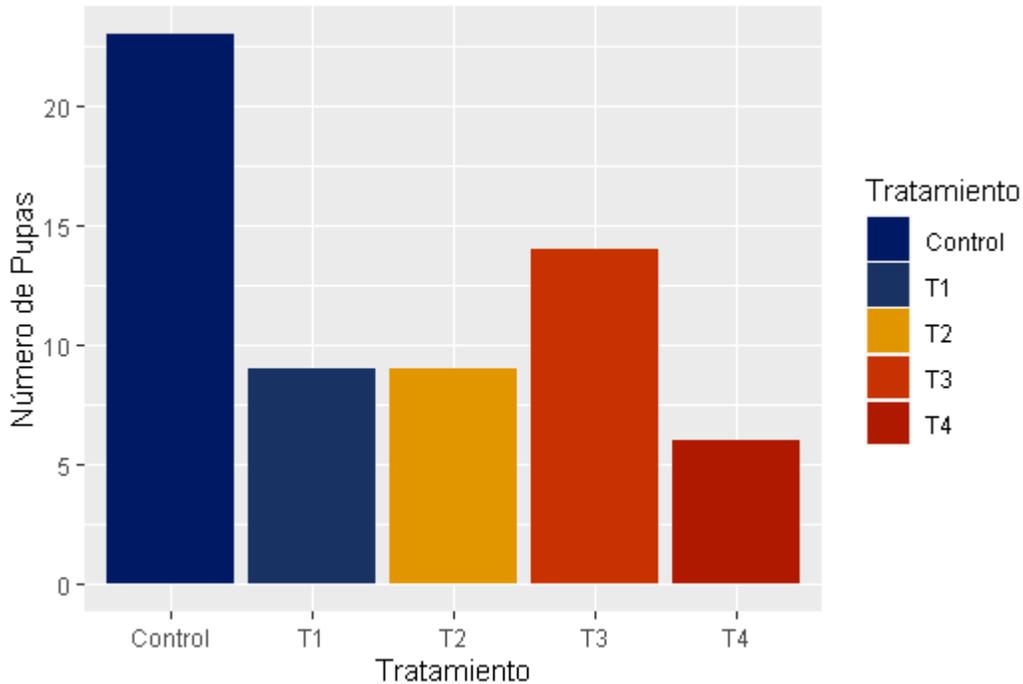


Figura 14. Número de pupas reportadas para el día diez, último día del tratamiento, por tratamiento. El control tuvo muchas más pupas para ese día a comparación de los demás tratamientos, donde el T4 fue el que menos pupas tenía para ese día.

Similar a lo reportado por Rahimi y col (2018) se observó una disminución de peso y tamaño en larvas, coloración negruzca, tegumento frágil, así como peso en pupas significativamente menor y cambio en coloración, además de presentar errores en la capacidad para alcanzar el estado o la etapa de pupa y la etapa adulta de forma total, resultados muy parecidos a los encontrados por nosotros (**Figura 15**) quedando incompleta la transición de larva a pupa e incluso de pupa a adulto. En nuestro caso, (**Figura 16**) Las pupas que presentaron errores no pudieron pasar a la siguiente etapa, únicamente las pupas que no tenían errores aparentes pudieron emerger como adultos, sin embargo, no todos los adultos pudieron salir correctamente o sin malformaciones.

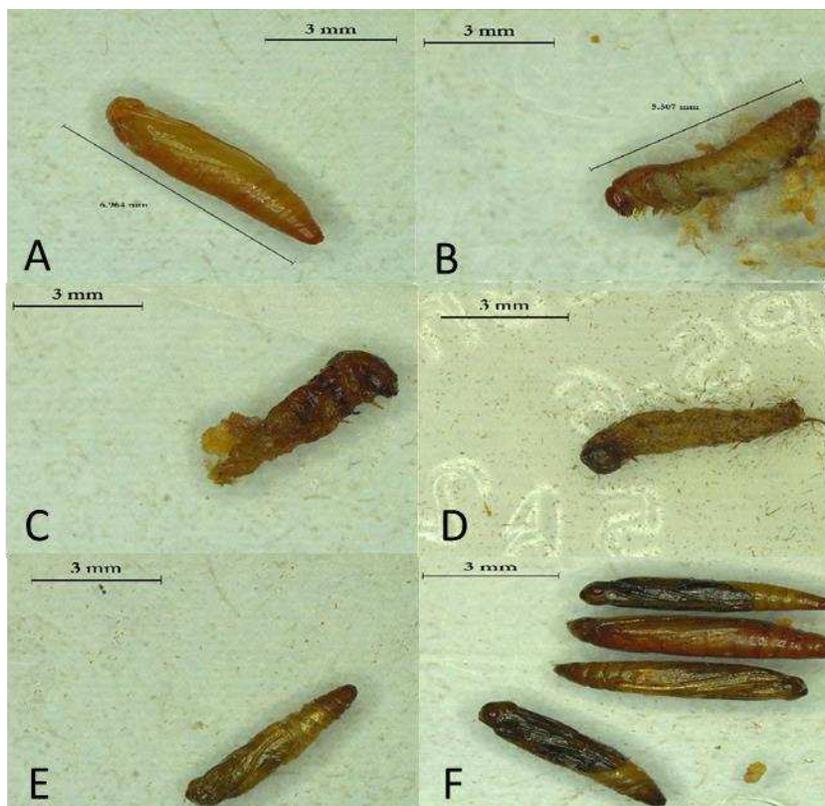


Figura 15. Ilustración de la morfología presentada en las pupas; **A)** Pupa control, coloración buena, tamaño y forma, **B)** T1, pupa incompleta con características de larva, **C)** T2 pupa con características incompletas de larva, coloración negruzca, **D)** T3 larva con error en la transición a pupa, forma y coloración erróneos **E)** T4, pupa con coloración, tamaño y morfología general errónea, **F)** otras pupas de coloración negra y formas erróneas presentadas.

Se han reportado hallazgos similares en otros insectos que fueron tratados con lectinas de origen vegetal también como Salama y col (1981) que reportaron en sus ensayos con endotoxina de *Bacillus thuringiensis* contra tres diferentes especies de Lepidopteros (*Sodoptera littoralis*, *Sodoptera exigua* y *Heliothis armígera*) al igual que en el presente estudio, retraso en el desarrollo, una reducción importante en el tamaño y peso de las pupas, así como deformidades en las mismas y disminución en la cantidad de adultos y deformidades en los que lograron emerger (**Figura 17**). Además de esto ellos observaron una reducción en la fertilidad y en la producción de huevos y periodo generacional prolongado (Salama y col. 2020).

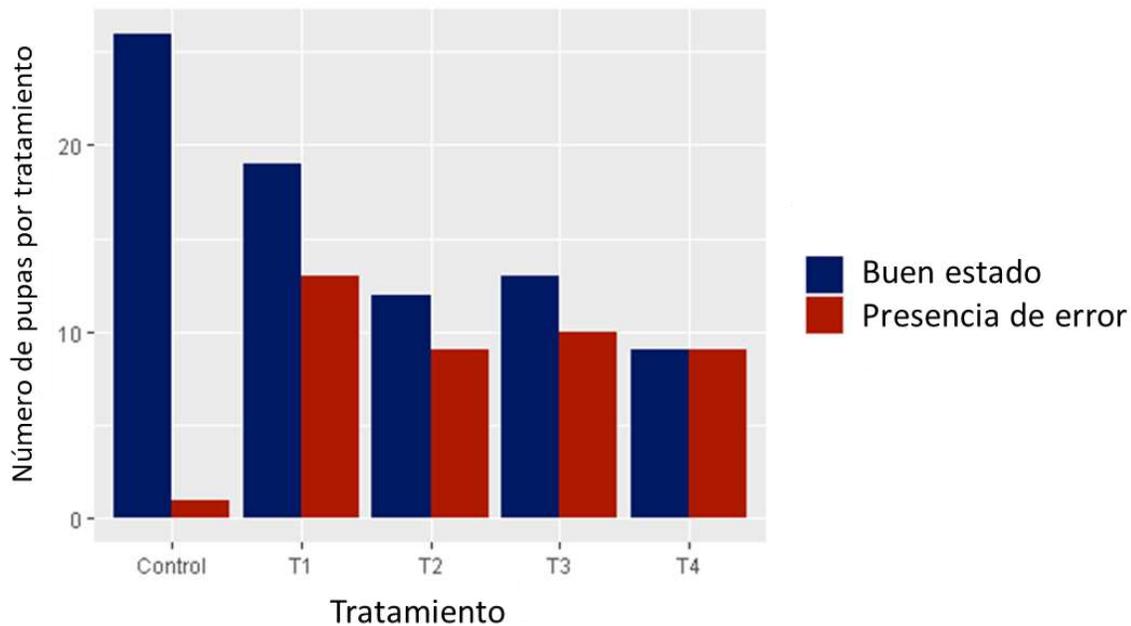


Figura 16. Relación de pupas con errores en total por tratamiento, el T1 fue el tratamiento con un mayor número de larvas que llegaron a pupa y de pupas sin errores, sin embargo, tuvo un mayor número de pupas mal a diferencia de los demás tratamientos, seguido del T3 y el T2 que estuvieron proporcionales entre ellos, aunque el T3 tuvo más larvas que llegaron a pupa, pero un alto número de pupas mal, por último, el T4 tuvo menos larvas que llegaron a pupa, además de tener el mismo número de pupas mal que de pupas bien, el T4 fue el tratamiento con mayor concentración de rTBL-1.

Además de lo anterior, se observó un menor peso y errores morfológicos en los adultos resultantes que lograron llegar hasta esta etapa, lo que es indicativo de la intervención del metabolismo intermediario o de mecanismos hormonales durante el período larval. No hubo un gran número de mortalidad durante el periodo de muda, pero si se observaron muchos insectos adultos con malformaciones, todos estos individuos se vieron afectados gravemente al haber entrado en contacto con la rTBL-1 en su alimentación, generándoles problemas a corto para algunos y a largo plazo para muchos otros (**Figura 17**). Se observaron malformaciones como el no poder eclosionar totalmente de la crisálida, incluso algunos lograron salir parcialmente pero no por completo, algunos adultos tuvieron problemas para sacar totalmente las alas y otros tuvieron una forma totalmente inmóvil.



Figura 17. Ilustración de los errores presentados en los adultos, fue muy común observar que no lograban eclosionar por completo la crisálida, sobre todo las alas; **A)** T1, adulto inmóvil con una morfología que le impedía volar e incluso moverse, **B)** T2, Adulto incapaz de sacar las alas de la crisálida **C)** T3, Adulto que no logró salir de la crisálida, sólo una parte de la cabeza **D)** T4, Uno de los adultos que logró salir por completo pero aletargado, casi inmóvil, de aspecto extraño, más delgado y de aspecto frágil **E)** Ilustración de un adulto que no logró sacar una de sus alas de la crisálida **F)** Adulto control, con coloración y tamaño normal totalmente fuera de la crisálida.

Las pupas que aparentemente se encontraban de forma normal en su desarrollo y lograron completar el tiempo de preparación para lograr eclosionar un adulto, a pesar de que completaron este tiempo y su aspecto era aparentemente normal, tuvieron una serie de características anormales en su forma adulta, así como deficiencias para lograr completar este proceso como podemos observar en la **(Figura 17 y 18)**.

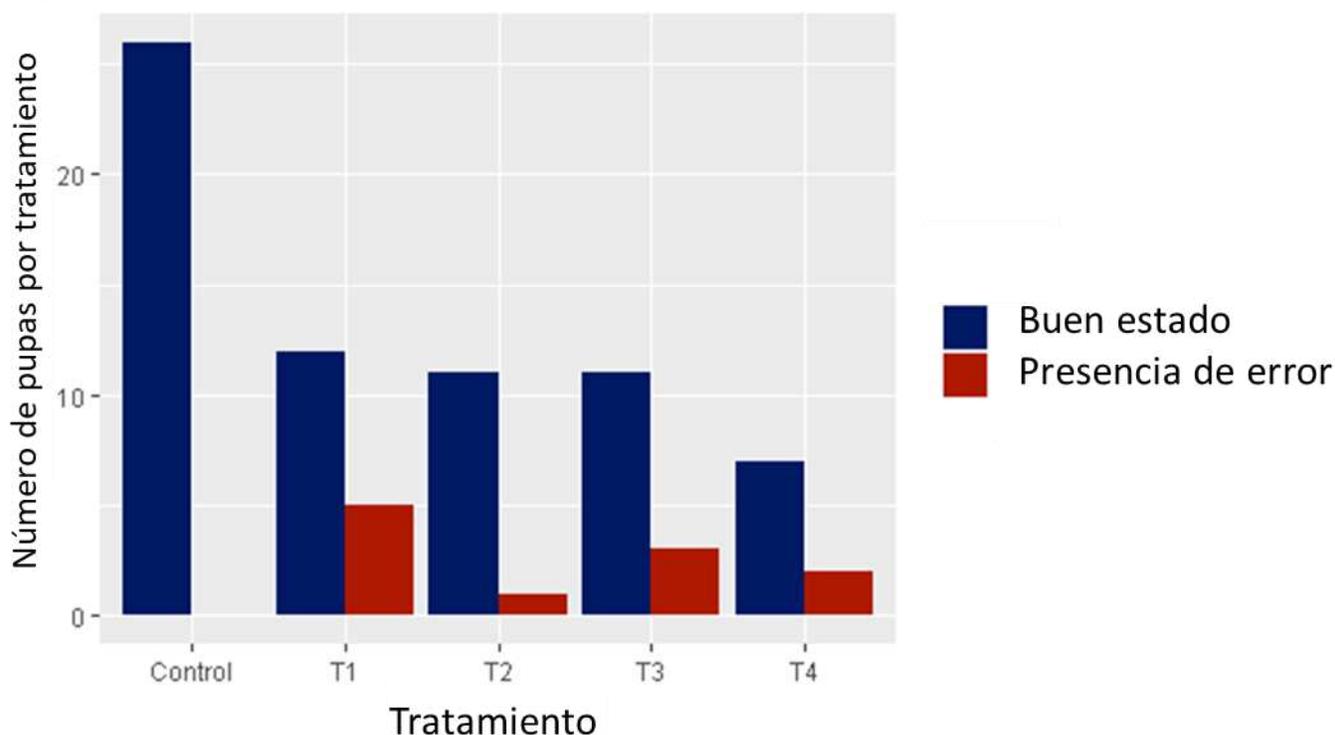


Figura 18. Relación de adultos con problemas en el desarrollo normal en total por tratamiento. El T1 tuvo un mayor número de larvas que llegaron a adultos y de adultos sin problemas en su desarrollo, tuvo un mayor número de adultos con presencia de problemas en su desarrollo que los demás tratamientos, seguido del T3 y el T2 que estuvieron proporcionales entre ellos, el T2 tuvo menos adultos con errores morfológicos que todos los tratamientos, por último, quedó el T4 el cual tuvo menos adultos en total, pero tuvo menos adultos con errores morfológicos que el T3 y el T1.

Podemos observar en lo anterior, que, aunque las larvas aparentemente se encuentren bien y sin daño alguno, posteriormente tenían daños en la siguiente etapa de su vida, es decir que las que sobrevivían y no morían en el paso de los días se iban reduciendo al presentar malformaciones y errores en su desarrollo. Un estudio realizado en *Chlosyne lacinia*, demostró que una toxina Cry 1Ac que se le fue suministrada, en una dosis subletal fue transferida a los huevos de la siguiente generación, lo cual provocó una baja sobrevivencia y también prolongó el tiempo de desarrollo de las larvas de la generación F1, lo cual demostró que fue transferida de manera intraespecífica a la siguiente generación, y esto podría estar sucediendo en las larvas de *Plodia interpunctella* alimentadas con la rTBL-1 (Andow y col. 2014). Lo cual podría comprobarse observando si los adultos que lograron llegar a la etapa

final de su desarrollo fueron capaces de reproducirse y no sólo eso si no que fueron reproductivamente exitosos, además de observar la cantidad de huevos que fueron capaces de poner y de ellos cuantos pudieron eclosionar una larva de aspecto normal, posterior a esto, conocer el desarrollo y su capacidad para formar una cepa o un pie de cría que pueda mantenerse por generaciones de forma exitosa, o si todo eso no fue posible y hasta qué punto y así de esta forma tener un conocimiento del alcance de la lectina recombinante en larvas de este insecto plaga.

Dulmage y Martínez (1973) en un estudio con larvas del lepidóptero *Heliothis virescens* observaron un marcado atraso en el desarrollo de las larvas, no todas las larvas lograron llegar a la fase de pupa y las que lograron llegar no tuvieron la capacidad de emerger como adultos. Concluyendo en su trabajo que no se pueden basar únicamente en la tasa de mortalidad para determinar que una cepa de *B. thuringiensis* es activa o no contra una especie, sino que también son de alguna manera letales al provocar una serie de eventos biológicos que reducen indirectamente y de alguna manera la efectividad de la vida del insecto y por lo tanto el daño que provoca en ese caso en las plantas (González-Pombo. 2018).

Estos daños observados podrían tener lugar en el efecto antinutricio que se sabe provocan las lectinas a nivel intestino medio, lo cual estaría impidiendo que tengan la energía metabólica necesaria para realizar las mudas y tener un desarrollo adecuado.

De Oliveira y col (2017) describieron los efectos negativos en el desarrollo de un insecto lepidoptero, *Anagasta kuehniella*, de una lectina de las semillas de *Moringa oleífera* (WSMoL), donde WSMoL provocó una disminución en el peso de las larvas de hasta un 50%, afectando la actividad normal de enzimas digestivas importantes, comprometiendo la digestión de proteínas en un 90%, resistiendo a la digestión, los resultados sugirieron que la WSMoL pudo desencadenar apoptosis en las células del intestino medio, así como desorganizar y provocar espacios endo y ectoperitróficos, además de alterar la membrana peritrófica al afectar la actividad enzimática normal, provocando un retraso en el desarrollo de las larvas que no pudieron pasar al siguiente instar, quedándose en el tercer instar durante todo el

experimento, sin embargo, no disminuyó considerablemente la mortalidad de las larvas tratadas con WSMoL a diferencia de las larvas control, muy parecido a lo reportado en el presente estudio, lo que nos indica que las lectinas poseen efectos insectistáticos nocivos para el correcto desarrollo de los insectos por la privación nutricional que provoca, aunque quizás no en todas las especies de insectos provoca una mortalidad inmediata o al mismo grado pero no por eso debe descartarse como un posible tratamiento (de Oliveira y col. 2017).

7.6 Estudio de la toxicidad por medio de cortes histológicos en el intestino medio.

En el caso de los cortes realizados, únicamente los cortes transversales pudieron observarse con claridad, pues los cortes longitudinales del intestino medio no permitieron tener una visión clara del área a evaluar ya que el intestino tiene formas irregulares por lo tanto el corte no fue uniforme del área y esto puede resultar en confusión al brindarnos una información incorrecta proporcionando datos falsos sobre lo que se observa, por eso se tomaron los cortes transversales omitiendo los longitudinales en la evaluación.

La ingesta de una Lectina recombinante (rTBL-1) adicionada en la dieta de larvas de *Plodia interpunctella* provocaron daños severos a nivel intestino medio. Para identificar y clasificar el nivel de daño ocasionado en las larvas, se realizó una escala de daño conforme a los niveles de daño observado en los cortes histológicos como se muestra en la (**Figura 19**);

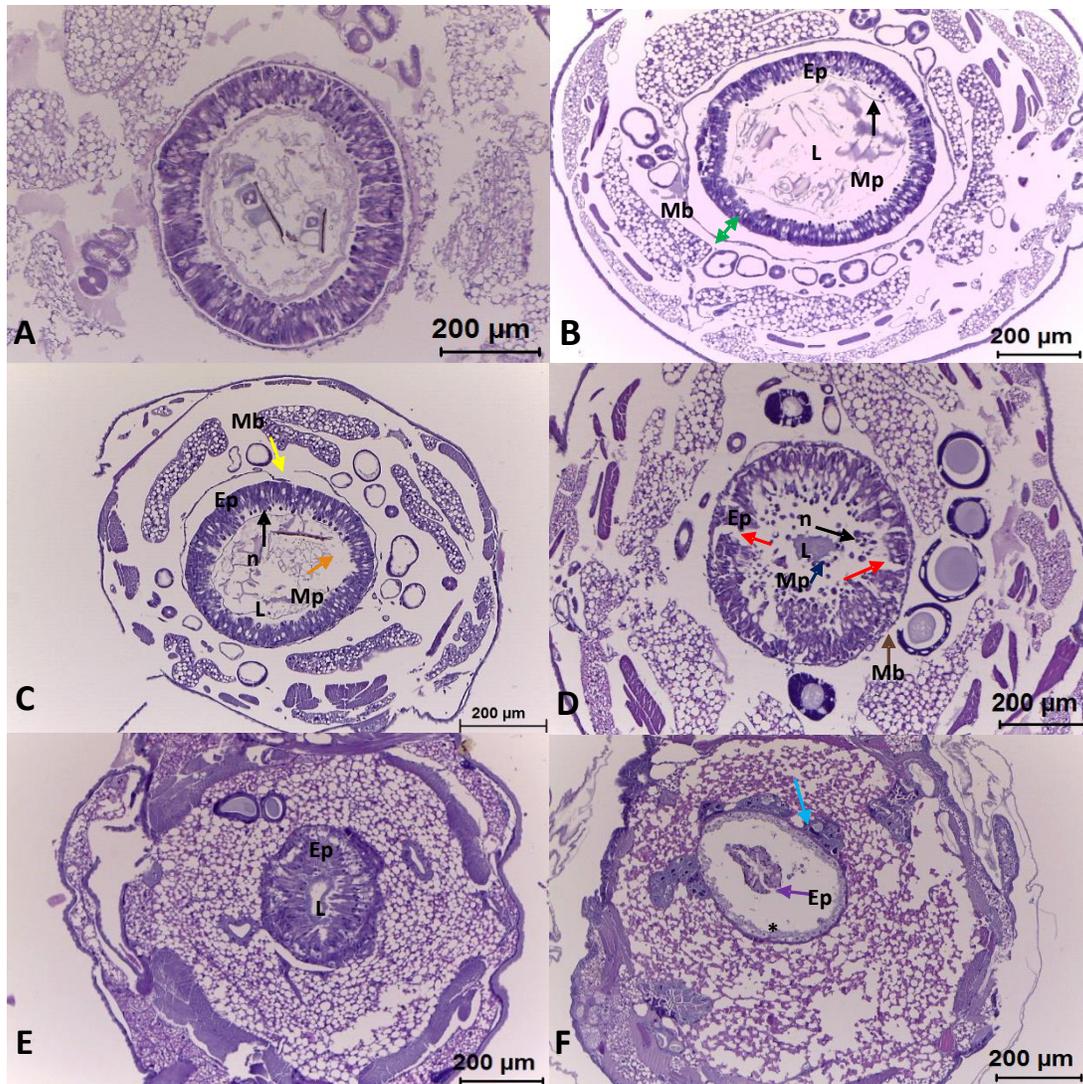


Figura 19. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de *Plodia interpunctella*. En cortes transversales teñidos con Hematoxilina-eosina que representan una escala de daño conforme a lo observado en el paso de los días, donde **(A) 0**, es daño leve o ningún daño: control, donde se observa el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica completa (Mp), Membrana basal completa (Mb) el Lumen o luz del intestino (L). **(B) 1**, es muy poco daño, se observa el epitelio uniforme (Ep), hay una separación notable de la membrana basal (flecha verde), aunque no está rota (Mb), la matriz peritrófica está completa (Mp) y hay muy poca picnosis (n) (flecha negra) **(C) 2**, es poco daño, el Epitelio esta uniforme (Ep) se nota algo de picnosis (n) (flecha negra) hacia el Lumen (L), hay separación y rotura de la membrana basal (Mb) (flecha amarilla) y rotura de la matriz peritrófica (Mp) (flecha naranja) **(D) 3**, es daño moderado, donde podemos observar un epitelio no uniforme (Ep), se observan huecos en él muy prolongados (flecha roja), picnosis alta (n) (flecha negra), el lumen está muy reducido (L) pudiera estar rota totalmente la matriz peritrófica (Mp) (flecha

azul), la membrana basal, aunque está unida al epitelio, tiene una abertura (Mb) (flecha café) **(E)** 4, es daño alto, la coloración y la conformación del epitelio se ve alterado (Ep) todo se ve reducido de tamaño y se ha ido hacia el Lumen (L). **(F)** 5, es daño extremadamente alto, el epitelio se ha reducido y se ha ido por completo a la zona del lumen (L) (flecha morada), se ha perdido totalmente la forma, no existe ya matriz peritrófica (Mp), la membrana basal está rota (Mb) y hubo fuga del contenido del intestino medio como se señala (flecha azul claro). Se observa un epitelio pegado a la membrana basal que se está restaurando (Ep) (asterisco negro), sin embargo, el daño ya es irreversible.

Una vez establecida la escala de daño y reconociendo lo observado, se clasificaron los cortes histológicos por día (día 2, día 5 y día 10, que fue el día último) en que fueron tomadas las muestras para observar el daño con el paso de los días, donde cada tratamiento fue comparado entre sí y contra el control.

En el día 2 de tratamiento se puede observar daño moderado, el cual también incrementa conforme al tratamiento, donde a mayor dosis de rTBL-1 el daño es más alto **(Figura 20 y 21)**.

Wang y col, (2019) reportaron que 48 h después de exponer larvas de *Bombyx mori* con acetamipridex, se observaron cambios histopatológicos y microestructurales, pues la morfología de las células del intestino medio cambiaron de forma negativa, la capa basal se hizo más delgada, las microvellosidades se fueron perdiendo, la pared intestinal se fue degradando y se formaron vacuolas en la membrana de las células calciformes las cuales también perdieron sus microvellosidades intracelulares, a diferencia de las larvas control que tenían las células epiteliales uniformes e intactas.

Ellos descubrieron que los genes implicados estaban relacionados con el metabolismo de los nutrientes, así como la respuesta a la inflamación y al estrés, por lo que mencionan que es posible que la ineficiente digestión y absorción de nutrientes escasa por el daño ocasionado en el intestino medio provocaran dichos efectos negativos y nocivos para las larvas pues dependen casi en su totalidad del intestino medio para obtener los nutrientes necesarios para llevar un desarrollo normal y exitoso (Wang y col, 2019).

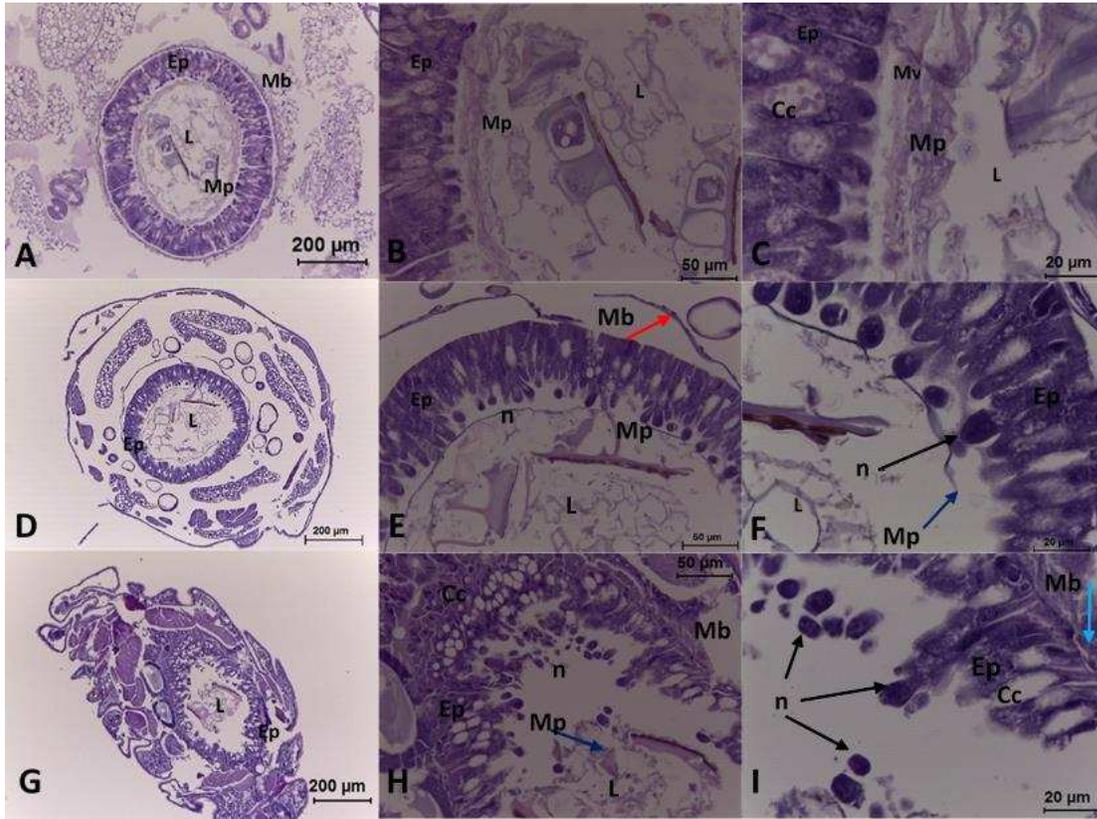


Figura 20. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de *Plodia interpunctella*. En cortes transversales teñidos con Hematoxilina-eosina que representan el día 2 de los tratamientos 1 y 2. Donde **(A)** control con 0 en la escala que es daño leve o ningún daño: donde se observa a 10x el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica completa (Mp), Membrana basal completa (Mb) el Lumen o luz del intestino (L). **(B)** 40x del control, se observa el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica está completa (Mp) **(C)** toma 100x del control, se observa la matriz peritrófica completa (Mp) el Epitelio esta uniforme (Ep), microvellosidades (Mv) **(D)** T1, toma a 10x, con 2 en la escala de daño, es daño moderado, donde podemos observar un epitelio uniforme (Ep), **(E)** y **(F)** toma 40x y 100x, poca picnosis (n) (flecha negra) hacia el lumen (L) la matriz peritrófica rota (Mp) (flecha azul), la membrana basal rota y separada del epitelio (flecha roja) **(G)** T2, toma 10x, 3 en la escala de daño, la conformación del epitelio se ve alterado (Ep) y se ha ido hacia el Lumen (L) **(H)** **(I)** se ha perdido la forma, matriz peritrófica rota (Mp) (flecha azul), la membrana basal está rota (Mb) y hubo fuga del contenido del intestino medio como se señala (flecha azul claro), picnosis (n) (flecha negra), exceso de células caliciformes (Cc).

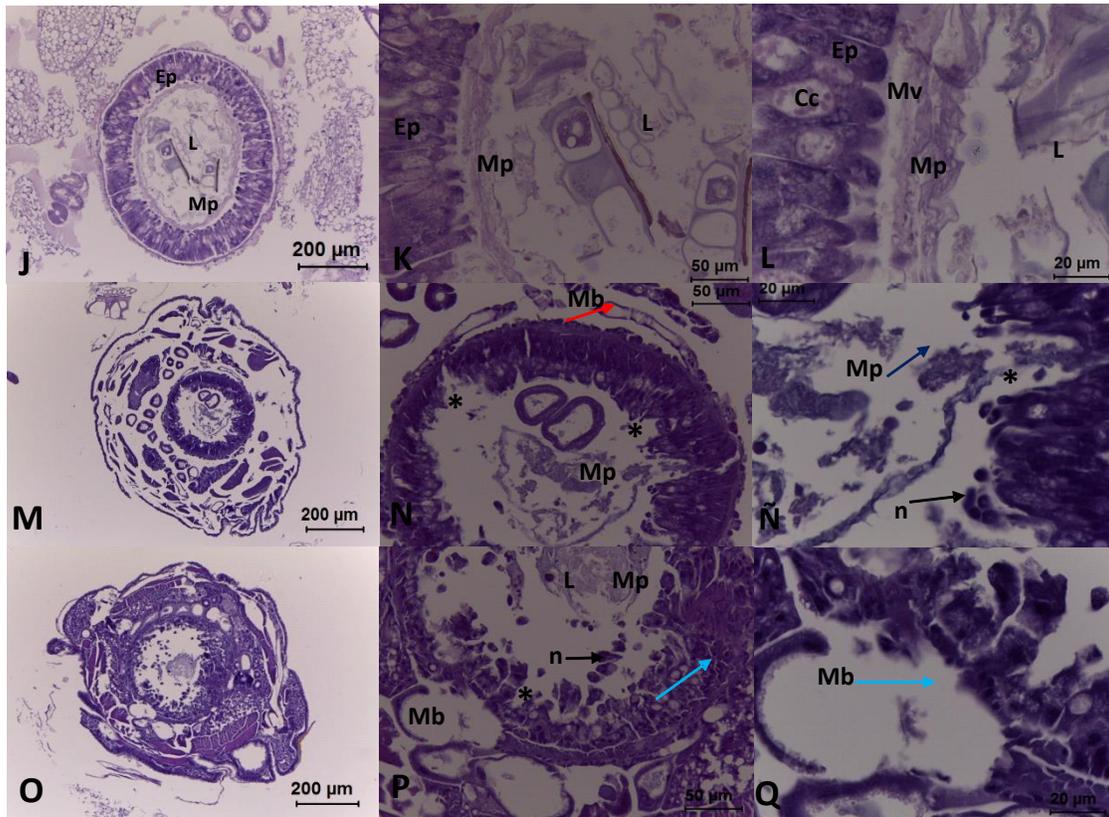


Figura 21. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de *Plodia interpunctella*. En cortes transversales teñidos con Hematoxilina-eosina que representan el día 2 de los tratamientos 3 y 4. **(J)** control con 0 en la escala que es casi nada o ningún daño: donde se observa a 10x el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica completa (Mp), Membrana basal completa (Mb) el Lumen o luz del intestino (L). **(K)** 40x del control, se observa el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica está completa (Mp). **(L)** toma 100x del control, se observa la matriz peritrófica completa (Mp) el Epitelio esta uniforme (Ep), Microvellosidades (Mv). **(M)** T3, toma a 10x, con 3 en la escala de daño, es daño es más alto, donde podemos observar un epitelio no uniforme (Ep) y de coloración más fuerte, **(N)** y **(Ñ)** toma 40x y 100x, el epitelio presenta huecos grandes (asterisco), poca picnosis (n) (flecha negra) hacia el lumen (L) la matriz peritrófica rota (Mp) (flecha azul), la membrana basal rota y separada del epitelio (flecha roja) **(O)** T4, toma 10x, 4 en la escala de daño, la conformación del epitelio se ve muy alterado (Ep) y se ha ido hacia el Lumen (L). **(P)** y **(Q)** se ha perdido la forma, matriz peritrófica rota (Mp) (flecha azul), la membrana basal está rota (Mb) y hubo fuga del contenido del intestino medio como se señala (flecha azul claro), picnosis (n) (flecha negra).

Para el día 5 del tratamiento, las micrografías muestran un mayor daño a comparación del día 2 (**Figura 22**).

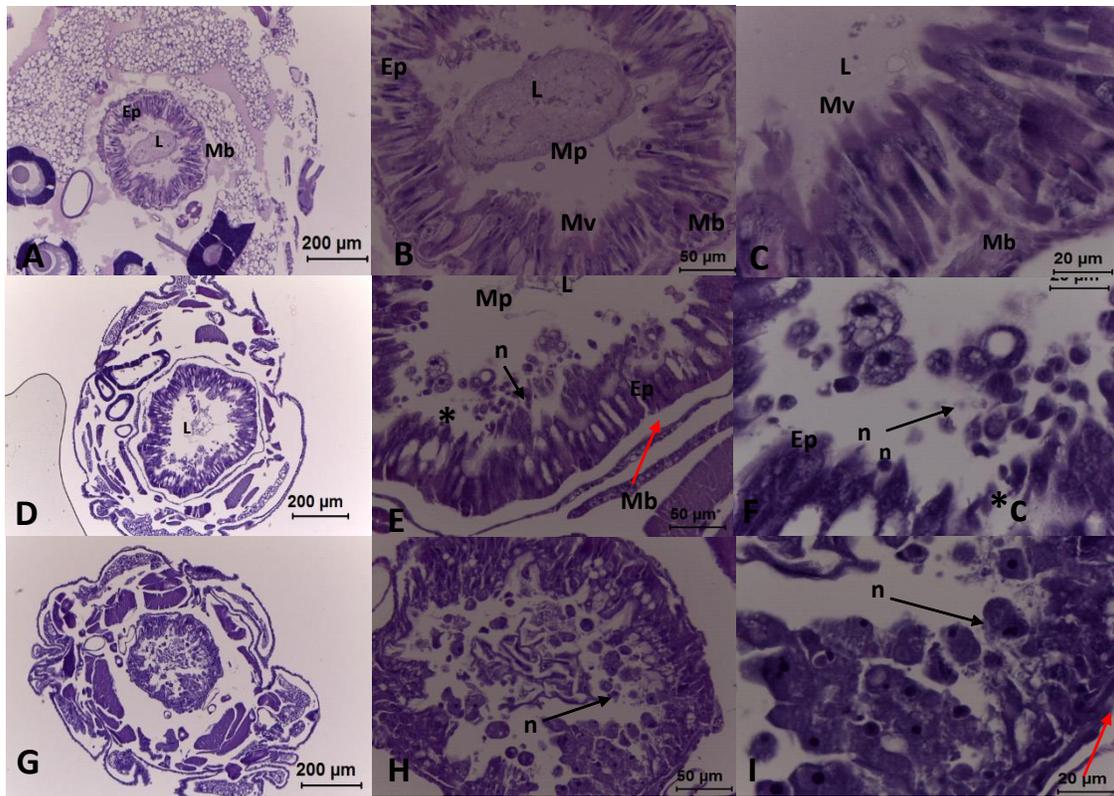


Figura 22. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de *Plodia interpunctella*. En cortes transversales teñidos con Hematoxilina-eosina que representan el día 5 de los tratamientos 1 y 2. **(A)** control con 0 en la escala que es casi nada o ningún daño: donde se observa a 10x el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica completa (Mp), Membrana basal completa (Mb) el Lumen o luz del intestino (L). **(B)** 40x del control, se observa el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica está completa (Mp). **(C)** toma 100x del control, se observa la matriz peritrófica completa (Mp) el Epitelio esta uniforme (Ep) se observan microvellosidades (Mv). **(D)** T1, toma a 10x, con 2 en la escala de daño, es daño moderado, donde podemos observar un epitelio uniforme (Ep), **(E)** y **(F)** toma 40x y 100x, picnosis (n) (flecha negra) hacia el lumen (L) la matriz peritrófica rota (Mp) (flecha azul), la membrana basal rota y separada del epitelio (flecha roja). **(G)** T2, toma 10x, 3 en la escala de daño, la conformación del epitelio se ve alterado (Ep) y se ha ido hacia el Lumen (L) y tiene huecos prolongados (asterisco). **(H)** e **(I)** se ha perdido la forma, matriz peritrófica rota (Mp) (flecha azul), picnosis (n) (flecha negra), membrana basal rota (Mb) (flecha roja).

En los tratamientos 3 y 4 del día 5, se observa un daño mucho más significativo e irreversible que en los tratamientos 1 y 2 del día 5 (**Figura 23**).

Similar a lo reportado por nosotros, George y col (2018) probaron una lectina recombinante (WsMBP1) contra larvas de dos diferentes especies y órdenes de insectos alimentados con la lectina recombinante, *Hyblaea puer* (Lepidoptera:

Hyblaeidae) y *Probergrothius sanguinolens* (Hemípteros: *Pyrrhocoridae*). En donde observaron un retraso en el crecimiento de los insectos y su desarrollo, en el proceso de la metamorfosis, además de un aumento en la mortalidad. De igual manera se realizaron cortes histológicos del intestino medio, en donde se encontraron alteraciones en su acomodo y distribución, las células secretoras que rodean la luz intestinal estaban difusas y desorganizadas, lo que indica una alteración en la asimilación de nutrientes y alteración en el proceso digestivo (George y col, 2018).

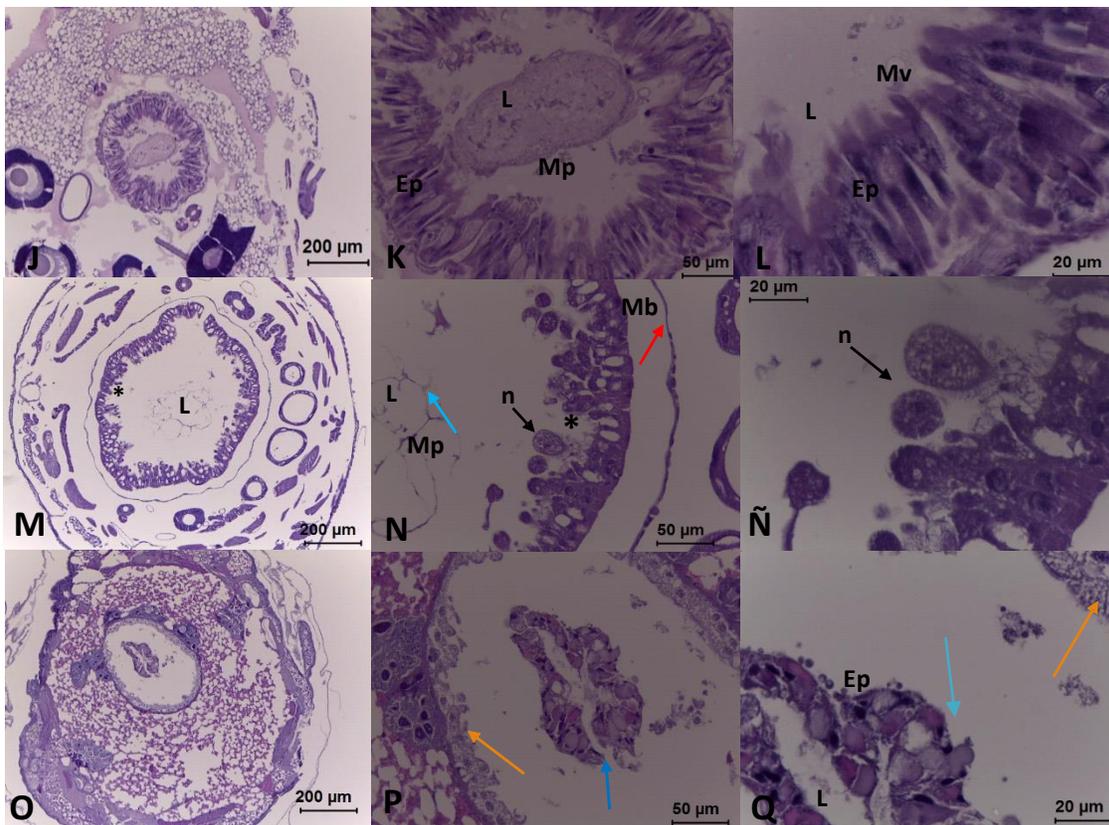


Figura 23. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de *Plodia interpunctella*. En cortes transversales teñidos con Hematoxilina-eosina que representan el día 5 de los tratamientos 3 y 4. **(J)** control con 0 en la escala que es daño leve o ningún daño: donde se observa a 10x el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica completa (Mp), Membrana basal completa (Mb) el Lumen o luz del intestino (L). **(K)** 40x del control, se observa el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica está completa (Mp). **(L)** toma 100x del control, se observa la matriz peritrófica

completa (Mp) el Epitelio esta uniforme (Ep), Microvellosidades (Mv). **(M)** T3, toma a 10x, con 3 en la escala de daño, el daño es más alto, donde podemos observar un epitelio no uniforme (Ep), **(N)** y **(Ñ)** toma 40x y 100x, el epitelio presenta huecos grandes (asterisco), poca picnosis (n) (flecha negra) hacia el lumen (L) la matriz peritrófica rota (Mp) (flecha azul), la membrana basal rota y separada del epitelio (flecha roja).

(O) T4, toma 10x, 5 en la escala de daño, la conformación del epitelio se ve muy alterado (Ep) y se ha ido desplazando hacia el Lumen (L). **(P)** y **(Q)** se ha perdido la forma, matriz peritrófica inexistente (Mp), la membrana basal está rota (Mb) y hubo fuga del contenido del intestino medio como se señala (flecha azul claro), se observa Epitelio regenerándose (flecha naranja), pero su aspecto no es favorable para poderse regenerar.

Para los cortes del día 10 del experimento, los cortes del intestino medio mostraron un daño más grave, aunque en algunas imágenes pareciera que el epitelio está intentando regenerarse, el daño causado ya es muy significativo y avanzado dando como resultado un efecto irreversible.

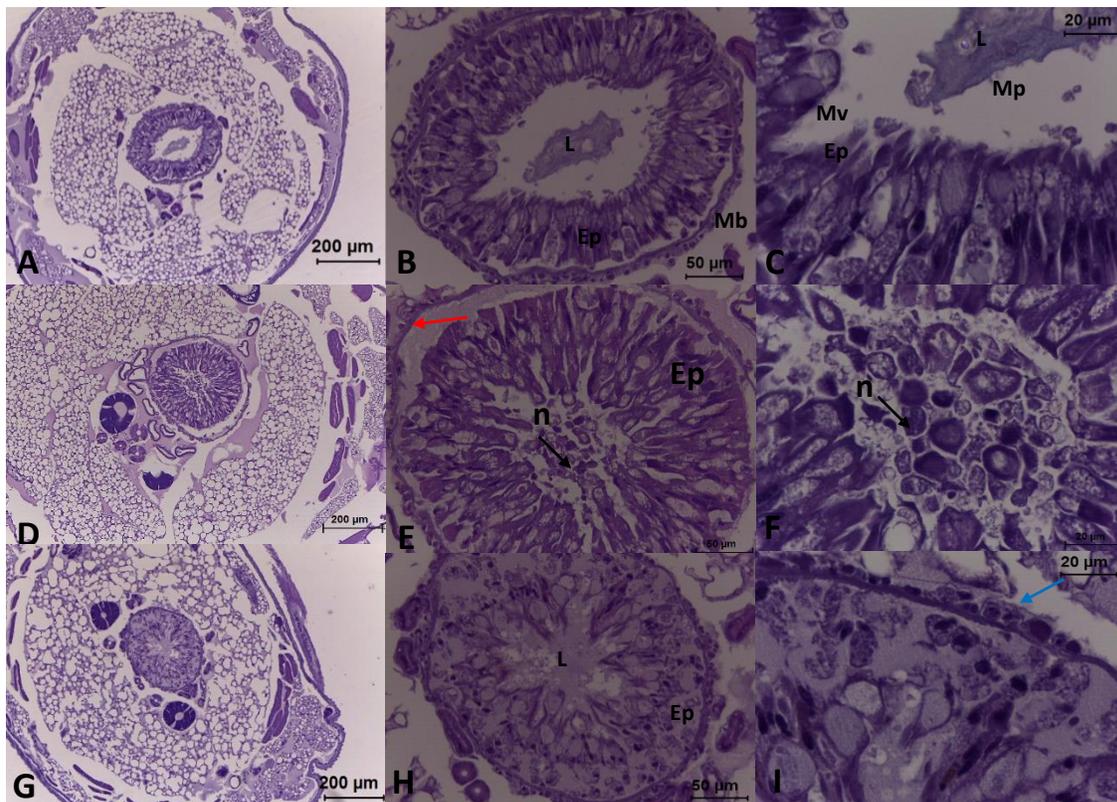


Figura 24. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de *Plodia interpunctella*. En cortes transversales teñidos con Hematoxilina-eosina que representan el día 10 de los tratamientos 1 y 2. **(A)** control con 0 en la escala que es daño leve o ningún daño: donde se observa a 10x el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica completa (Mp), Membrana basal completa (Mb) el Lumen o luz del intestino (L). **(B)** 40x del control, se observa el epitelio uniforme (Ep), la matriz

peritrófica está completa (Mp). **(C)** toma 100x del control, se observa la matriz peritrófica completa (Mp) el Epitelio esta uniforme (Ep) se observan microvellosidades (Mv) **(D)** T1, toma a 10x, con 4 en la escala de daño, es daño alto, donde podemos observar un epitelio no uniforme (Ep) y cayendo hacia el lumen (L), **(E)** y **(F)** toma 40x y 100x, picnosis (n) (flecha negra) hacia el lumen (L) la matriz peritrófica inexistente (Mp) (flecha azul), la membrana basal rota y separada del epitelio (flecha roja) **(G)** T2, toma 10x, 4 en la escala de daño, la conformación del epitelio se ve alterado (Ep) y se ha ido hacia el Lumen (L). **(H)** e **(I)** se ha perdido la forma, coloración, matriz peritrófica inexistente (Mp) (flecha azul), núcleos picnóticos (flecha negra) membrana basal rota (Mb) (flecha roja).

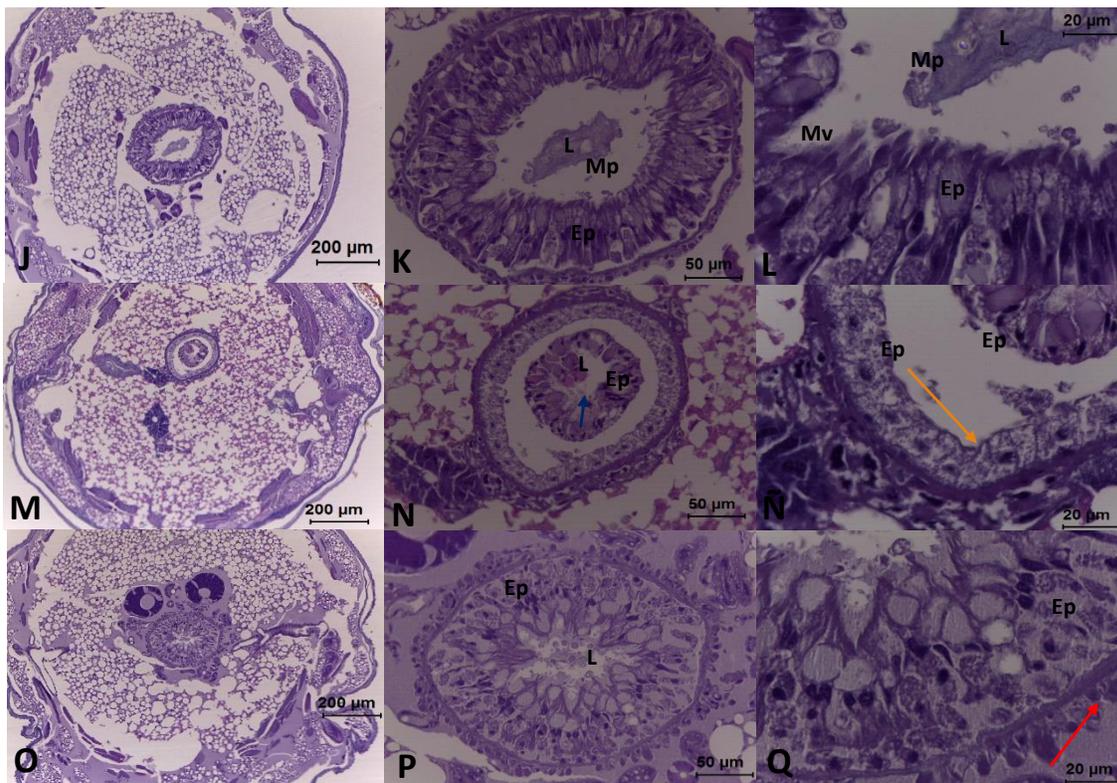


Figura 25. Micrografías de cortes histológicos del intestino medio de larvas de *Plodia interpunctella*. En cortes transversales teñidos con Hematoxilina-eosina que representan el día 10 de los tratamientos 3 y 4. Como podemos observar algunas imágenes muestran un epitelio totalmente amorfo y donde ya no se pueden diferenciar las células; **(J)** control con 0 en la escala que es daño leve o ningún daño: donde se observa a 10x el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica completa (Mp), Membrana basal completa (Mb) el Lumen o luz del intestino (L). **(K)** 40x del control, se observa el epitelio uniforme (Ep), la matriz peritrófica está completa (Mp). **(L)** toma 100x del control, se observa la matriz peritrófica completa (Mp) el Epitelio esta uniforme (Ep), Microvellosidades (Mv). **(M)** T3, toma a 10x, con 5 en la escala de daño, el daño es muy alto, donde podemos observar un epitelio no uniforme (Ep) y totalmente en el lumen (L). **(N)** y **(Ñ)** toma 40x y

100x, el epitelio presenta huecos grandes (asterisco), matriz peritrófica inexistente (Mp) (flecha azul), la membrana basal rota (flecha roja) con fuga al exterior, se observa epitelio regenerándose (flecha naranja) (O) T4, toma 10x, 4 en la escala de daño, la conformación del epitelio se ve muy alterado (Ep) y se ha ido hacia el Lumen (L). (P) y (Q) se ha perdido la forma, matriz peritrófica inexistente (Mp) (flecha azul), la membrana basal está rota (Mb) y hubo fuga del contenido del intestino medio como se señala (flecha azul claro).

El mecanismo de acción por el cual las lectinas actúan de forma negativa y nociva para los insectos todavía se encuentra en investigación pues aún no se conoce en su totalidad, pero por lo que se sabe hasta el día de hoy a través de las diferentes investigaciones que se han realizado, se cree que las glicoproteínas forman parte importante en la constitución de las membranas del tracto digestivo de los insectos, son objetivo de las lectinas vegetales por ser moléculas específicas de unión a ligandos y de esta manera ejercen una interacción que perjudica la actividad normal en la digestión; lo anterior va a depender de su resistencia a la proteólisis intestinal, además de la afinidad y especificidad que tengan a los receptores de carbohidratos, para así poder unirse al intestino delgado y tener efectos negativos en la función y morfología del mismo (Pusztai y col. 1990; Macedo y col. 2007). Por lo tanto, es importante continuar investigando y conociendo acerca de todas estas interacciones y mecanismos, así como las limitantes para su evaluación en campo y su utilización en el ambiente de forma segura. En la actualidad ya se han hecho estudios en campo con plantas transgénicas que expresan una lectina con potencial insecticida, está el caso de la aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) que se ha probado en varios cultivos teniendo resultados positivos, cultivos de arroz, papas, tabaco, azúcar, entre otras que brindó una mayor resistencia al enfrentarse a insectos plaga, provocando mortalidad así como disminución en el desarrollo y fecundidad en diferentes cultivos e insectos, sin embargo, es importante tomar en cuenta los efectos secundarios hacia otros seres vivos adyacentes, pues aunque se considera son menos o nada dañinos para otros organismos a diferencia de los insecticidas comerciales, puede que no todas las lectinas tengan el mismo resultado deseado; por ejemplo, mientras lectinas de ajo y lectinas de *Glanthus nivalis* (GNA), que son lectinas de unión a manosa no presentaron efectos secundarios tóxicos para otros animales, WSMoL presentó efectos negativos contra larvas de *A. aegypti* pero

también resultó tóxico para *Danio rerio* (pez cebrá), generando efectos negativos similares, en su crecimiento y en los huevos de los peces, lo que nos lleva a tomar en cuenta estas contraindicaciones para probarlas de manera experimental en campo en plantas transgénicas (Napoleão y col. 2019). El presente estudio indica que rTBL-1 puede actuar como un recurso genético potencial para posteriores programas que incrementen la tolerancia a plagas de insectos en genotipos de plantas que sean susceptibles, así como de forma independiente suministrándose de alguna forma a los insectos plaga objetivo; de igual manera, puede ser un estudio precursor para conocer más acerca de dichos mecanismos, el alcance de la lectina rTBL-1, así como pionero para su estudio en diferentes especies de insectos plaga.

VIII. CONCLUSIÓN

Diferentes órdenes de insectos han sido catalogados como plagas de importancia económica y se conoce que las lectinas causan un efecto tóxico en ellos, sin embargo, se han realizado pocos estudios que expliquen en su totalidad el mecanismo de toxicidad que poseen las lectinas para estos insectos. Aunado a esto, se ha observado a través de estos diferentes trabajos que en su mayoría no reportan mortalidad de los insectos de forma inmediata o a los pocos días, pero se ha visto que las lectinas tienen la capacidad para influir de forma negativa en el desarrollo normal de los insectos, lo que podría significar que los insectos no pueden completar su ciclo de vida de manera normal ni tampoco producir una descendencia exitosa, normal y sana, garantizando los productos de los cuales se quiere erradicar dicha plaga.

En el presente trabajo pudimos observar y comprobar la toxicidad de una lectina recombinante (rTBL-1) que, aunque las dosis probadas no nos fueron suficientes para provocar el 50% de la mortalidad, no podemos decir que no se obtuvieron resultados que muestren la letalidad de la rTBL-1 ya que pudimos observar los efectos nocivos en el desarrollo de los insectos, haciendo que sean insectos sin éxito reproductivo y a nivel histológico pudimos comprobar el daño que causa en el intestino medio, daños irreversibles que repercuten a lo largo de su vida y en su

descendencia muy posiblemente, sería interesante y se recomienda continuar el estudio para poder comprobar estas hipótesis que involucran errores y fallas en la descendencia de los individuos.

Las moléculas como las lectinas poseen características importantes, como la toxicidad, que las posicionan como moléculas prometedoras para muchas cosas, entre ellas el control de plagas de manera sostenible, esto gracias a que son moléculas termolábiles que no tienen el mismo grado de daño colateral hacia otros seres vivos que los insecticidas comúnmente usados.

Por otra parte, gracias a los avances biotecnológicos de los últimos tiempos, se ha podido agilizar la producción de manera sintética de dichas moléculas, así como de otras de gran interés, lo cual las hace todavía más fascinantes y prometedoras para su estudio y uso en diferentes aspectos, sin dañar o afectar lo menos posible a los demás seres vivos y su consumo. Otro ejemplo son las plantas transgénicas que podrían tolerar daños por las plagas de insectos, por todo lo anterior, es importante seguir conociendo más acerca de estas moléculas, sus vías de acción, así como su nivel de alcance para hacer frente ante diferentes problemas ambientales de la manera más adecuada.

Nuestro estudio constituye una línea base para futuros estudios moleculares y a nivel intestino medio, sobre la adaptación y resistencia de dosis más altas o prolongadas de una lectina recombinante, así como futuros estudios que amplíen el conocimiento del alcance de sus efectos a través del éxito reproductivo, así como en los daños y efectos en las generaciones siguientes.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol*, 18(2), 265-267.
- Adebiyi, A. O., & Tedela, P. O. (2012). Pesticidal effects of extracts of *Barbula indica* on *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Nature Science*, 10(9), 113-115.

- Ahmmed, MK, Bhowmik, S., Giteru, SG, Zilani, MNH, Adadi, P., Islam, SS, ... y Wong, JH (2022). Una actualización de lectinas de organismos marinos: caracterización, metodología de extracción y posibles aplicaciones biofuncionales. *Drogas Marinas*, 20 (7), 430. <https://doi.org/10.3390/md20070430>
- Alatorre, R., Bravo, H., Leyva, J., & Huerta, A. (2000). Manejo integrado de plagas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Subsecretaría de Desarrollo Rural, Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural, 12.
- Andow, DA, Paula, DP, Timbó, RV, Sujii, ER, Pires, CS y Fontes, EM (2014). Captación y transferencia de una toxina Bt por un lepidóptero a sus huevos y efectos en su descendencia. *Más uno*, 9 (4), e95422.
- Araujo, L. C. C., Aguiar, J. S., Napoleão, T. H., Mota, F. V. B., Barros, A. L. S., Moura, M. C. & Paiva, P. M. G. (2013). Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PLoS one*, 8(12), e81973.
- Barrera-Illanes, A.N., Popich, S.B., Ajmat, M.T., 2017. *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) life cycle on stored walnuts under controlled environmental conditions. *Folia Entomol. Mex.* 3 (2), 15e22 (n. s.)
- Belete, T. (2018). Mecanismos de defensa de las plantas frente a los insectos plaga: del enfoque morfológico al bioquímico. *Tecnología de tendencias. ciencia Res* , 2 , 30-38.
- Benítez Blanco, M. E., & Lesmes Montañez, J. L. 2014. Determinación de la concentración letal 50 (cl50) de tres insecticidas de uso doméstico con el mismo principio activo.
- Benítez, R. (2012) «Plaguicidas y efectos sobre la salud humana: Un estado del arte,» SERPAJ PY, p. 17.

- Blanco-Labra, A., & Mancilla, C. A. (2002). Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. *Acta universitaria*, 12(3), 3-28.
- Bojar, D., Meche, L., Meng, G., Eng, W., Smith, D. F., Cummings, R. D., & Mahal, L. K. (2022). A useful guide to lectin binding: machine-learning directed annotation of 57 unique lectin specificities. *ACS chemical biology*, 17(11), 2993-3012. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00689> .
- Bradford, MM (1976). Un método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína que utiliza el principio de unión de proteína-colorante. *Bioquímica analítica* , 72 (1-2), 248-254.
- Caccia, S., Van Damme, EJ, De Vos, WH y Smagghe, G. (2012). Mecanismo de entomotoxicidad de la lectina vegetal del híbrido *Hippeastrum* (*Amaryllis*) en larvas de *Spodoptera littoralis*. *Revista de fisiología de insectos* , 58 (9), 1177-1183. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.05.014
- Camaroti, J. R. S. L., de Almeida, W. A., do Rego Belmonte, B., de Oliveira, A. P. S., de Albuquerque Lima, T., Ferreira, M. R. A., ... & Napoleão, T. H. (2018). *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). *Industrial crops and products*, 116, 81-89.
- Campos, K. R., Coleman, P. J., Alvarez, J. C., Dreher, S. D., Garbaccio, R. M., Terrett, N. K., Tillyer, R. D., Truppo, M. D., & Parmee, E. R. (2019). The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. *Science* (New York, N.Y.), 363(6424), eaat0805. <https://doi.org/10.1126/science.aat0805>
- Casas-Corredor, Z. Y., Reyes Montaña, E. A., & Vega Castro, N. A. (2016). Lectinas con dominio de Leguminosa: Características estructurales y utilidad como agentes insectistáticos e insecticidas. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 32(2), 157-169.

- Castilla, Y., Mercado, I. D., & González, G. (2012). Determinación y cuantificación de los niveles de compuestos organoclorados en leche pasteurizada. *Producción+ Limpia*, 7(1).
- Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97-106.
- Chilcutt, C. F. (2006). Cannibalism of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) from *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic corn versus non-Bt corn. *Journal of economic entomology*, 99(3), 728-732.
- Conga Pachín, K. (2017). Efecto toxicológico agudo del cloruro de mercurio en larvas de *Rhinella spinulosa* Wiegmann, 1834 (Anura: Bufonidae).
- Contreras Espinoza, C. F. (2019). Evaluación de la percepción de los agricultores maiceros sobre los daños observados en el cultivo de maíz, ocasionados por insectos plaga en la zona de Mocache (Bachelor's thesis, Quevedo-UTEQ).
- Corzo, FL, Traverso, L., Sterkel, M., Benavente, A., Ajmat, MT y Ons, S. (2020). *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae): Intoxicación con aceites esenciales aislados de *Lippia turbinata* (Griseb.) y análisis de neuropéptidos y receptores de neuropéptidos, objetivos putativos para el control de plagas. *Archivos de bioquímica y fisiología de insectos* , 104 (3), e21684.
- De Oliveira, CFR, de Moura, MC, Napoleão, TH, Paiva, PMG, Coelho, LCB y Macedo, MLR (2017). Una lectina fijadora de quitina procedente de las semillas de *Moringa oleifera* (WSMoL) altera la fisiología digestiva de las larvas de la harina mediterránea, *Anagasta kuehniella*. *Bioquímica y fisiología de plaguicidas*, 142 , 67-76. doi:10.1016/j.pestbp.2017.01.006
- Dulmage, HT y Martínez, E. (1973). Los efectos de la exposición continua a bajas concentraciones de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* sobre el desarrollo

del gusano del tabaco, *Heliothis virescens*. *Revista de Patología de Invertebrados* , 22 (1), 14-22.

Eisemann, CH, Donaldson, RA, Pearson, RD, Cadogan, LC, Vuocolo, T., & Tellam, RL (1994). Actividad larvívica de las lectinas en *Lucilia cuprina*: mecanismo de acción. *Entomologia experimentalis et applicata* , 72 (1), 1-10.

Eliopoulos, P. A., Hassiotis, C. N., Andreadis, S. S., & Porichi, A. E. (2015). Toxicidad fumigante de los aceites esenciales de albahaca y menta verde contra dos plagas pirálidas principales de productos almacenados. *Revista de entomología económica*, 108(2), 805–810. <https://doi.org/10.1093/jee/tov029>

Fernández-Andrés, M. D., Rangel-Lucio, J. A., Juárez-Goiz, J. M., Bujanoz-Muñíz, R., Montes-Hernández, S., & Mendoza-Elos, M. (2009). Oleorresina de jícama para controlar *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleóptera: Bruchidae) en semilla de frijol. *agronomía mesoamericana*, 59-69.

Ferraris, M. N., Cattivelli, M., & Martínez, J. L. (2021). *Plagas en granos almacenados*. AER Villa María, INTA.

Ferrer, A.. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(Supl. 1), 155-171.

Ferriz-Martínez R, García-García K, Torres-Arteaga I, Rodríguez-Mendez AJ, Guerrero-Carrillo MJ, Moreno-Celis U, et al. 2015. Evaluación de la tolerabilidad de una fracción de lectina de semillas de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius*) administrada por vía oral a ratas. *Toxicol Reports*; 2: 63-69.

Food and Agriculture Organization (FAO), «Actualización del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas,» Roma, Italia, 2012.

- França, K. C. (2022). Avaliação do efeito do estrato, fração proteica e lectina da casca de *Genipa americana* L. sobre a broca dos frutos das anonáceas *Cerconota anonella* (Lepidoptera: Depressariidae).
- Gadir Nouri-Ganbalani, Ehsan Borzoui, Arman Abdolmaleki, Zahra Abedi, Shizuo George Kamita, Efectos individuales y combinados de *Bacillus Thuringiensis* y *Azadirachtin* en *Plodia Interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae), *Journal of Insect Science*, Volumen 16, Número 1, 2016, 95, <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew086>
- García Lara, S., Espinosa Carrillo, C., & Bergvinson, D. J. (2007). Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control/por Silverio García Lara, César Espinosa Carrillo y David J. Bergvinson (No. FOLLETO 3531.). Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.
- García-Gasca, T., García-Cruz, M., Hernandez-Rivera, E., López-Matínez, J., Castaneda-Cuevas, A. L., Yllescas-Gasca, L., & Blanco-Labra, A. (2012). Effects of Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutrition and cancer*, 64(8), 1269-1278.
- George, B. S., Silambarasan, S., Senthil, K., Jacob, J. P., & Ghosh Dasgupta, M. (2018). Characterization of an insecticidal protein from *Withania somnifera* against lepidopteran and hemipteran pest. *Molecular biotechnology*, 60, 290-301. doi:10.1007/s12033-018-0070-y
- Giles, K. L., Hellmich, R. L., Iverson, C. T., & Lewis, L. C. (2000). Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of economic entomology*, 93(3), 1011-1016.
- González de Mejía, E. y Prisecaru, VI (2005) Lectinas como proteínas vegetales bioactivas: un potencial en el tratamiento del cáncer. *Reseñas críticas en ciencia*

de los alimentos y nutrición, 45, 425-445.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408390591034445>

González Pombo, A. (2018.). *Aislamiento, caracterización y selección de cepas nativas de Bacillus thuringiensis para el control de lepidópteros plaga*. Tesis de maestría. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias.

González-Castillo, M., Aguilar, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2012). Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8), 42-55.

Gryspeirt, A., & Grégoire, J.C. (2012). Efectividad de la estrategia de dosis altas/refugio para el manejo de la resistencia de plagas a plantas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que expresan una o dos toxinas. *Toxinas*, 4(10), 810-835.

Hahn, J., L. Jesse y P. Pellitteri. 2013. *Insect pests of stored foods*. University of Minnesota Disponible en: www.extension.iastate.edu/publications/ic407.pdf Visitado el 8 de julio del 2013.

Hendrickson, O. D., & Zherdev, A. V. (2018). Analytical Application of Lectins. *Critical reviews in analytical chemistry*, 48(4), 279–292.
<https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1422965>

Hernández-Trejo, A., Estrada Drouaillet, B., Rodríguez-Herrera, R., García Giron, J. M., Patiño-Arellano, S. A., & Osorio-Hernández, E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 803-813.

Heryanto, C., Hanly, J. J., Mazo-Vargas, A., Tendolkar, A., & Martin, A. (2022). Mapping and CRISPR homology-directed repair of a recessive white eye mutation in *Plodia* moths. *Iscience*, 25(3), 103885.

- J. Ramirez y M. Lacasaña, (2001). «Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición,» Cuernavaca, México.
- Jia X, Zhang X, Liu H, Wang R, Zhang T (2018) Identificación de genes quimiosensoriales del transcriptoma antenal de la polilla de la harina india *Plodia interpunctella*. PLoS ONE 13(1): e0189889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189889>
- Karbalaei, M., Rezaee, SA y Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: Un sistema de expresión de gran éxito para la síntesis óptima de proteínas heterólogas. *Revista de fisiología celular* , 235 (9), 5867-5881.
- Khan, H. H., Naz, H., Ghongade, D. S., & Sahu, P. S. (2018). Chapter-7 Losses Due to Pests in Agriculture. *LATEST TRENDS IN ZOOLOGY AND ENTOMOLOGY SCIENCES*, 145. Vol 3
- Laemmli, Reino Unido, Beguin, F. y Gujer-Kellenberger, G. (1970). Un factor que impide la agregación aleatoria de la principal proteína de la cabeza del bacteriófago T4. *Revista de biología molecular* , 47 (1), 69-85.
- Lagarda-Díaz, I., Guzman-Partida, A. M., & Vazquez-Moreno, L. (2017). Legume lectins: proteins with diverse applications. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1242.
- Liu, X., Cooper, A. M., Yu, Z., Silver, K., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2019). Progress and prospects of arthropod chitin pathways and structures as targets for pest management. *Pesticide biochemistry and physiology*, 161, 33-46.
- López Ibarra, c. (2018). Evaluación de las características nutricionales y funcionales del concentrado proteico de *Phaseolus acutifolius* Gray (doctoral dissertation, universidad autónoma de nuevo león).

- López-Moreno, M., Garcés-Rimón, M., & Miguel, M. (2022). Antinutrientes: Lectinas, bociógenos, fitatos y oxalatos, ¿amigos o enemigos? *Revista de alimentos funcionales*, 89 , 104938. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.104938>
- Macedo, M. L. R., Freire, M. D. G. M., da Silva, M. B. R., & Coelho, L. C. B. B. (2007). Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae), Zabrotes subfasciatus and Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 486-498.b
- Macedo, TB, Bastos, CS, Higley, LG, Ostlie, KR y Madhavan, S. (2003). Respuestas fotosintéticas de la soja a la lesión del pulgón de la soja (Homoptera: Aphididae). *Revista de entomología económica* , 96 (1), 188-193.
- Mahmoud, E. A., Al-Hagar, O. E., & El-Aziz, M. F. A. (2021). Gamma radiation effect on the midgut bacteria of *Plodia interpunctella* and its role in organic wastes biodegradation. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41(1), 261-272. doi:10.1007/s42690-020-00203-x
- Maria, d. C. V. V. (2004). Purificación, caracterización y propiedades bioactivas de las lectinas de frijol tepari,(*phaseolus acutifolius*, var. *Latifolius*).
- Márquez Delgado, D. L., Hernández Santoyo, A., Márquez Delgado, L. H., & Casas Vilardell, M. (2021). La educación ambiental: evolución conceptual y metodológica hacia los objetivos del desarrollo sostenible. *Revista Universidad y sociedad*, 13(2), 301-310.
- Martínez Alarcón, D. (2017). Producción de una lectina recombinante de frijol Tépari (*phaseolus acutifolius*) con efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Departamento de Biotecnología y Bioquímica.).

- Martínez-Alarcón, D., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2018). Expression of Lectins in Heterologous Systems. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 616. <https://doi.org/10.3390/ijms19020616>
- Mazalovska, M., & Kouokam, J. C. (2020). Plant-derived lectins as potential cancer therapeutics and diagnostic tools. *BioMed Research International*, 2020(1), 1631394. <https://doi.org/10.1155/2020/1631394>
- Mendoza Elos, M., Rodríguez Perez, G., Guevara Acevedo, L. P., Andrio Enríquez, E., Rangel Lucio, J. A., Rivera Reyes, J. G., & Cervantes Ortiz, F. (2016). Bioinsecticidas para el control de plagas de almacén y su relación con la calidad fisiológica de la semilla. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(7), 1599-1611.
- Milutinović, M., Čurović, D., Nikodijević, D., Vukajlović, F., Predojević, D., Marković, S., & Pešić, S. (2019). The silk of *Plodia interpunctella* as a potential biomaterial and its cytotoxic effect on cancer cells. *Animal Biotechnology*, 1–8. doi:10.1080/10495398.2019.1575848
- Mohandass, S., Arthur, F. H., Zhu, K. Y., & Throne, J. E. (2007). Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. *Journal of Stored Products Research*, 43(3), 302-311.
- Muñoz-Escobar, E. M., & Palacio-Baena, J. A. (2010). Efectos del cloruro de mercurio (HgCl₂) sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. *Actualidades biológicas*, 32(93), 189-197.
- Napoleão, T. H., Albuquerque, L. P., Santos, N. D., Nova, I. C., Lima, T. A., Paiva, P. M., & Pontual, E. V. (2019). Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. *Pest Management Science*, 75(5), 1212-1222.
- Organización Mundial de la Salud. (2006). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. World Health Organization.

- Palmerín-Carreño, D.; Martínez-Alarcón, D.; Dena-Beltrán, JL; Vega-Rojas, LJ; Blanco-Labra, A.; Escobedo Reyes, A.; García-Gasca, T. (2021). Optimización de la producción de lectinas recombinantes en *Pichia pastoris* utilizando glicerol crudo en un sistema Fed-Batch. *Procesos* , 9 , 876. <https://doi.org/10.3390/pr9050876>
- Park, W. B., Lyu, S. Y., Kim, J. H., Choi, S. H., Chung, H. K., Ahn, S. H., ... & Choi, M. J. (2001). Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 16(5), 439-447.
- Pérez, J. C., Ramírez, S., & Suris, M. (2012). Biología de *Plodia interpunctella* Hubner sobre garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones de laboratorio. *Revista de Protección Vegetal*, 27(2), 90-94.
- Pérez, J. C., Ramírez, S., & Suris, M. (2015). Tabla de vida de *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) sobre garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones de laboratorio. *Revista de Protección Vegetal*, 30(1), 14-18.
- Pusztai, A., Ewen, S. W., Grant, G., Peumans, W. J., van Damme, E. J., 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 Suppl 2, 308–316. <https://doi.org/10.1159/000200402>
- Rahimi, V., Hajizadeh, J., Zibae, A., & Sendi, J. J. (2018). Toxicity and physiological effects of an extracted lectin from *Polygonum persicaria* L. on *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). *Physiological and molecular plant pathology*, 101, 38-44.
- Razazzian, S., Hassani, M. R., Imani, S., & Shojai, M. (2015). Life table parameters of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) on four commercial pistachio cultivars. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(1), 55–59. [doi:10.1016/j.aspen.2014.12.002](https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.12.002)

- Repetto, J. M. & Repetto, K. G. (2009). Toxicología fundamental. *Ediciones Díaz de Santos*, 565.
- Rharrabe, K., Bakrim, A., Ghailani, N. y Sayah, F. (2007). Efecto bioinsecticida de la harmalina sobre el desarrollo de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioquímica y fisiología de pesticidas*, 89 (2), 137-145. doi:10.1016/j.pestbp.2007.05.002
- Rodríguez, D. A., 1987. Evaluación de polvos vegetales y minerales para el combate del barrenador mayor de los granos *Prostephanus truncatus* (HORN) (Coleoptera: Bostrichidae) en maíz almacenado. Tesis Profesional en Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Córdoba, Veracruz. México. 69 pp.
- Rubio Cota, E. R. (2012). Efecto de la susceptibilidad de *plodia interpunctella* (hübner)(lepidóptera: pyralidae) a *bacillus thuringiensis*, su relación con la flora microbiana y la expresión de la proteína de inmunidad hemolina (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Russell, R. M., & Robertson, J. L. (1979). Programming probit analysis. *Bulletin of the ESA*, 25(3), 191-193.
- Sabbour, M. M., & Abd El-Aziz, S. E. S. (2019). Impact of certain nano oils against *Ephestia kuehniella* and *Ephestia cutella* (Lepidoptera-Pyralidae) under laboratory and store conditions. *Bulletin of the national research Centre*, 43, 1-7.
- Sadeghi, A., E.J. Van Damme, W.J. Peumans, and G. Smagghe. 2006. Deterrent activity of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) Oviposition. *Phytochemistry* 67(18):2078-84.
- Salama, H.S. Foda, M.S. Aziza El-Sharaby, M. Matter, M. Khalafallah, (1981) Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxins of *Bacillus thuringiensis* for different periods, *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 38, Issue 2, Pages 220-229, ISSN 0022-2011, [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90126-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90126-9).

- Salama, Hussein S. "Producción y aplicación de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas en Egipto". *Industria artesanal de agentes de biocontrol y sus aplicaciones: aspectos prácticos para abordar biológicamente las plagas y el estrés que enfrentan los cultivos estratégicos* (2020): 203-229.
- Salas, J. A. S., Espinosa, L. M. T., Pineda, A. C., & Burciaga, O. U. M. (2003). Daños y diversidad de insectos descortezadores de coníferas del noreste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 28(93), 41-56.
- Salgado, M. I. C., Montalvo, J. C. G., & Nápoles, C. A. R. (2006). Productos naturales para el control de la principal plaga de maíz, frijol y garbanzo almacenados. *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 30(1), 83-92.
- Schnider, B., Escudero, FL, Imberty, A. y Lisacek, F. (2023). BiotechLec: una guía interactiva de lectinas comerciales para aplicaciones de glicobiología e investigación biomédica. *Glicobiología*, 33 (9), 684-686. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad034>
- Sedlacek, J. D., Komaravalli, S. R., Hanley, A.M., Price, B. D., & Davis, P.M. (2001). Atributos de la historia de vida de la polilla de la harina india (Lepidoptera: Pyralidae) y la polilla del grano de Angoumois (Lepidoptera: Gelechiidae) criadas en granos de maíz transgénicos. *Revista de entomología económica*, 94(2), 586-592.
- Segura-Trujillo, C. A., & Iñiguez-Dávalos, L. I. (2023). Murciélagos socios para el control de plagas. *Therya ixmana*, 2(1), 40-41.
- Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., & Fando-Calzada, R. (2016). *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 47(2), 67-77.
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J. C., & Rodríguez, D. (2002). Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas.

- Simpson, B. K., He, S., Sun, H., Ngadi, M. O., Ma, Y., & Huang, T. (2018). Phaseolus vulgaris lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(1), 70-83.
- Singh, P., Pandey, VK, Sultan, Z., Singh, R. y Dar, AH (2023). Clasificación, beneficios y aplicaciones de diversos factores antinutricionales presentes en cultivos comestibles. *Revista de Investigación Agrícola y Alimentaria* , 14 , 100902.
- Stejskal, V., Stara, J., Pekar, S., Nesvorna, M., & Hubert, J. (2021). Sensibilidad de las polillas de almacenamiento polífagas (*Plodia interpunctella*) y estenófagos (*Ephestia kuehniella*) a insecticidas residuales: efecto de la formulación y edad larvaria. *Ciencia de los insectos*. doi:10.1111/1744-7917.12889
- Subramaniyan, SB y Veerappan, A. (2024). Las lectinas tienen el potencial destacado para liberar nanopartículas metálicas bioactivas mediante el reconocimiento de los glicanos de la superficie celular. *Heliyon*, 10 (8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29394>
- Sudheendra, CHVK, Hazra, T., Solanki, A. y Ramani, VM (2022). Propiedades antinutritivas y terapéuticas de las lectinas. En *Peligros biológicos y químicos en alimentos y productos alimenticios* (págs. 281-298). Prensa académica de Apple.
- Tang, T., Zhao, C., Xu, L., & Qiu, L. (2016). Factors affecting larval cannibalism in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). *Oriental insects*, 50(1), 23-33. doi:10.1080/00305316.2016.1139515
- Tripathi, NK y Shrivastava, A. (2019). Avances recientes en el bioprocesamiento de proteínas recombinantes: huéspedes de expresión y desarrollo de procesos. *Fronteras en Bioingeniería y Biotecnología* , 7 , 420.
- Tsaneva, M., & Van Damme, E. J. (2020). 130 years of plant lectin research. *Glycoconjugate journal*, 37(5), 533-551.

- Urretabizcaya, N., Vasicek, A., & Saini, E. D. (2010). Insectos perjudiciales de importancia agronómica: I. Lepidópteros (No. 632.78). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina).
- Valadez-Vega, M., Dubón, G. A. M., Carrancá, A. G., & Abdullaev, F. (2004). Cytotoxicity of tepary bean lectins (*Phaseolus acutifolius* lectins) on human malignant cells. In *2004 IFT Annual Meeting, July 12-16-Las Vegas, NV*.
- Vikram, N., Katiyar, S. K., Singh, C. B., Husain, R., & Gangwar, L. K. (2020). A review on anti-nutritional factors. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(5), 1128-1137.
- Villamizar, L., Espinel, C., & COTES, A. (2009). Efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 116-121.
- Vukajlović, F. N., Predojević, D. Z., Miljković, K. O., Tanasković, S. T., Gvozdenc, S. M., Perišić, V. M., ... Pešić, S. B. (2019). Life history of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) on dried fruits and nuts: Effects of macronutrients and secondary metabolites on immature stages. *Journal of Stored Products Research*, 83, 243–253. doi:10.1016/j.jspr.2019.07.007
- Wang, H., Li, F., Qu, J., Mao, T., Chen, J., Li, M., ... y Li, B. (2019). El mecanismo de daño causado por trazas de acetamiprid en el intestino medio del gusano de seda *Bombyx mori*. *Toxicología ambiental*, 34 (9), 1043-1051. doi: 10.1002/tox.22775
- Yadav, T., & Mishra, G. (2021). Microbial Source of Insect-Toxic Proteins. *Bioprospecting of Microorganism-Based Industrial Molecules*, 377-403. <https://doi.org/10.1002/9781119717317.ch19>
- Zelaya-Molina, L. X., Chávez-Díaz, I. F., de los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Ruíz-Ramírez, S., & Rojas-Anaya, E. (2022). Control biológico de

plagas en la agricultura mexicana. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 13(SPE27), 69-79.