

Inhibidores de proteasas de plantas: la historia de los inhibidores tipo Kunitz y su potencial uso para resolver muchos problemas contemporáneos

Alexis Omar Campuzano-González* **iD**, Enrique Rudiño-Piñera** **iD**

Laboratorio de Bioquímica Estructural, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

Email de autores para correspondencia: *alexis.campuzano@ibt.unam.mx;
**enrique.rudino@ibt.unam.mx

Recibido: 24 septiembre 2024. **Aceptado:** 08 enero 2025

RESUMEN

En 1935, Moses Kunitz descubrió de manera fortuita, que un péptido era el responsable de la inhibición de una proteasa, la tripsina. A pesar de que ya se tenía conocimiento de que existían inhibidores de proteasas, en ese momento ninguno de estos estaba compuesto por aminoácidos, ni se habían descrito proteínas capaces de realizar tal función. Desde entonces se han descubierto no solo nuevos miembros del tipo de péptidos que describió Kunitz, sino que también se han descrito proteínas con la misma capacidad. Estos inhibidores, nombrados inhibidores tipo Kunitz, son una familia de proteínas que guardan una menor identidad de secuencia entre ellas, pero cuyo plegamiento se conserva a pesar de la poca identidad de secuencia. A pesar de la gran variabilidad en su secuencia, el método que utilizan estos inhibidores para bloquear la actividad de distintas proteasas séricas parecía ser siempre el mismo, usando a un residuo básico de una de sus asas para secuestrar a la serina catalítica de la proteasa. Sin embargo, en los últimos años se descubrió que algunos de estos inhibidores eran capaces de bloquear la actividad proteolítica evitando el acceso a la cavidad catalítica; e inclusive, que podrían tener la capacidad para inhibir a más de una proteasa a la vez. Esta alta plasticidad de los inhibidores tipo Kunitz es sumamente interesante, debido no solo a su blanco de acción, sino también a las múltiples posibilidades que presentan para su uso, como por ejemplo el control biológico de moscas y nemátodos en cultivos de frutas, regular procesos inflamatorios en enfermedades humanas que afecten a la mucosa gástrica, o incluso, tener actividad citotóxica frente a distintos tipos de células cancerígenas.

Palabras clave: Proteasa; Inhibidor de proteasa; Kunitz; Kunitz-STI; Plasticidad.

ABSTRACT

In 1935, Moses Kunitz accidentally discovered that a specific peptide was responsible for inhibiting the protease trypsin. Although protease inhibitors were already known then, none had been identified as composed of amino acids, and no proteins capable of performing such a function had been described. Since Kunitz's discovery, new members of the peptide family he identified and proteins with similar inhibitory functions have been found. These inhibitors are known as Kunitz-type inhibitors and form a family of proteins that exhibit low sequence identity among their members. Yet, their folding structure is consistently preserved despite this variability. Despite the wide range of sequences, these inhibitors generally share a common mechanism for blocking the activity of various serine proteases. They typically utilize a basic residue from one of their loops to bind to the catalytic serine of the protease. Recent studies, however, have revealed that some Kunitz-type inhibitors can block proteolytic activity by preventing access to the catalytic site. Moreover, some inhibitors may have the ability to target multiple proteases simultaneously. This remarkable plasticity of Kunitz-type inhibitors is particularly intriguing due to their diverse targets of action and the numerous potential applications they offer. These applications include biological control of flies and nematodes in fruit crops, regulation of inflammatory processes in diseases affecting the gastric mucosa, and even exhibiting cytotoxic activity against various types of cancer cells.

Keywords: Protease; Protease inhibitor; Kunitz; Kunitz-STI; Plasticity.

INTRODUCCIÓN

La curiosidad innata del ser humano ha hecho que a lo largo del tiempo hayamos desentramado las interrogantes sobre el mundo que habitamos. Pero de la misma forma que nos hemos preguntado de qué manera funciona todo aquello que nos rodea, también hemos mostrado interés de la forma en que nosotros mismos funcionamos. Esta curiosidad nos permitió conocer de qué forma se encontraba construido nuestro cuerpo. Sin embargo, nuestros limitados sentidos nos ataban al mundo macroscópico. Limitación que, por lo

menos en el campo de la biología, fue superada en una primera instancia con la invención del microscopio en 1590 por Zacharias Janssen. Con esto fue posible saber que todos los seres vivos nos encontrábamos constituidos por pequeñas unidades las cuales se nombraron células y se pensó en un momento que aquella era la unidad mínima de todo ser vivo. Sin embargo, con el paso del tiempo y la disposición de nuevas herramientas, que nos permitían expandir de mejor manera nuestra capacidad de entender aquello que estudiamos, fuimos capaces de entender que aquellas células



se encontraban a la vez constituidas por moléculas. En este escrito desentramaremos la función de una de aquellas moléculas, una familia de proteínas conocida como inhibidores tipo Kunitz, los cuales podrían convertirse en proteínas con amplias utilidades en el mundo contemporáneo. Pero antes de hablar de ellos debemos de explicar quiénes son y de dónde vienen.

Proteínas y enzimas

Las proteínas son una de las cuatro macromoléculas biológicas, junto con los ácidos nucleicos, los lípidos y los carbohidratos, a partir de las cuales están constituidos todos los seres vivos. Las proteínas son polímeros, conformados a su vez por alrededor de 20 aminoácidos unidos por un enlace llamado peptídico; estos aminoácidos, dependiendo de cada proteína, se ordenarán siguiendo una secuencia y alcanzando una longitud específica, otorgando de esta forma distintas características fisicoquímicas a cada proteína. Las proteínas tienen una amplia gama de usos en todos los organismos vivos, están aquellas que dan estructura y rigidez a las células y tejidos, otras que transportan moléculas o señales a distintas partes de la célula o incluso a otros órganos, otras que catalizan reacciones fundamentales y que conforman todas las rutas metabólicas en todos los sistemas celulares, etc. Por lo tanto, hay una gran variedad de funciones que cumplen, y no siempre los nombres que se les otorgan siguen una regla única, ya que a veces, el origen de sus

nombres está salpicado de anécdotas y hasta de procesos culturales como de eventos debidos a las traducciones entre idiomas. Existen proteínas que se nombran por analogía con otras, o que cumplen aparentemente con la misma función biológica, o se encuentran en la misma localización celular, pero en un organismo diferente. Dentro de las proteínas existe un subgrupo llamado enzimas, las cuales catalizan reacciones y que para ser nombradas siguen las reglas de sistematicidad marcadas por la *Enzyme Commission* [1]; a pesar de lo anterior, algunas enzimas tienen nombres puestos de forma más o menos arbitraria, o recordando su origen, fuentes de obtención o características particulares.

En general, la forma en que se nombra a las enzimas es sencilla y lógica. Esta nomenclatura está compuesta de dos partes, primero el “compuesto” o “reacción” que la enzima cataliza seguido por el sufijo “-asa”, proveniente del griego “ασις” (ásis), que significa “acción” o “proceso”. Esto nos dice, por ejemplo, que la enzima lactasa cataliza la descomposición de la lactosa o, por otro lado, que una enzima oxidasa cataliza reacciones de oxidación en una multitud de moléculas blanco, y de ahí que estas no se especifiquen en el nombre.

Sin embargo, algunas enzimas se descubrieron antes de que una nomenclatura fuera propuesta y puesta en práctica. Un ejemplo de estas excepciones sería la proteasa tripsina [2], cuyo nombre proviene del alemán "trypsin", que a su vez viene del griego τρύειν (trýein), que significa "frotar, desgastar o tritular", y de la

terminación de otra proteasa descubierta previamente y que participa en los procesos de digestión de otras proteínas en los mamíferos, la pepsina [3] (término que significa “digestión”). A pesar de que la tripsina no sigue las reglas de la nomenclatura más sistemática mencionada en este texto, esta enzima pertenece a un grupo más grande conocido como proteasas, la cual por su nombre se sabe que son enzimas que degradan a otras proteínas [4].

Proteasas

Siguiendo la lógica de la nomenclatura de las enzimas, las proteasas realizan su actividad catalítica sobre otras proteínas, hidrolizando de manera específica o no, los enlaces peptídicos entre dos aminoácidos, consiguiendo de esa manera degradar a las proteínas en péptidos más pequeños, o incluso, en el caso de proteasas más inespecíficas, llevarlas al nivel de aminoácidos individuales. Esta hidrólisis de enlaces peptídicos es catalizada mediante la participación entre dos o tres aminoácidos, o incluso con la participación de un ion metálico, en el llamado sitio activo de la proteasa. Dependiendo de qué aminoácido o ion metálico lleve a cabo el primer paso de la reacción, llamado comúnmente “acilación”, la proteasa adquiere su nombre, pudiendo ser catalogadas como proteasas aspárticas, cisteínicas, serínicas o metaloproteasas [5]. Una primera impresión de este grupo de proteínas nos haría pensar que su actividad es algo negativo para los organismos, aunque en la mayoría de los casos

es todo lo contrario. La acción de las proteasas dentro de todos los seres vivos, e incluso en virus, regulan un gran número de eventos celulares, el primero y más directo ejemplo sería el de la digestión de los alimentos. Sin embargo, existen otros mecanismos que las proteasas regulan tales como la expresión de genes, el desarrollo celular, la defensa frente a infecciones, entre muchos otros, todo lo anterior por medio de la edición de las proteínas que se involucran en estos procesos, pasando de formas inactivas a activa, o bien, disminuyan su concentración o su actividad por medio de proteólisis. Todo organismo vivo requiere del uso de proteasas para mantener un correcto funcionamiento de todos sus sistemas celulares [6]. Sin embargo, es cierto que estos procesos deben de estar finamente regulados para que no haya una degradación inespecífica de proteínas o que esta ocurra en el momento equivocado (Tabla 1).

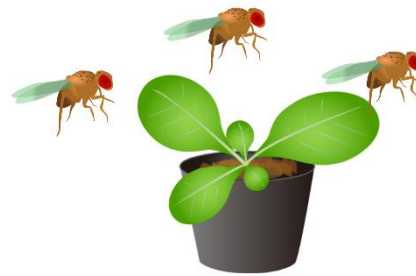
Por otro lado, algunos organismos utilizan a las proteasas con fines ofensivos, tanto para invadir a otro organismo, como en la búsqueda de alimento. Un ejemplo de lo anterior se presenta en insectos y nemátodos, los cuales infectan plantas utilizando una mezcla de varias enzimas, dentro de las cuales hay una gran cantidad de proteasas [7]. Para contender con esto, la mayoría de las plantas descritas a la fecha, han desarrollado técnicas de defensa molecular entre las que se incluyen la expresión de péptidos y proteínas principalmente en las raíces y durante la etapa de maduración de semillas; cuya función específica es la de bloquear la acción de las proteasas provenientes

del agente infeccioso (figura 1). Estas proteínas se llaman genéricamente inhibidores proteicos de proteasas (para diferenciarlas de los inhibidores no proteicos de proteasas), y la importancia de estos inhibidores llega a ser tal,

que aproximadamente el 10 % de todas las proteínas expresadas y presentes en algunas células especializadas de las plantas, mayoritariamente las raíces, pertenecen a este grupo [8-10].

Tabla 1. Ejemplos de proteasas involucradas en distintos eventos celulares de *Arabidopsis thaliana*.

Proteasa	Organismo	Función
Núcleo defectuoso 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Involucrada en la embriogénesis [36-39]
Proteasa de la membrana cloroplástica	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Involucrada en el desarrollo de los cloroplastos [40, 41]
Proteasa de cloroplasto Clp	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Involucrada en el desarrollo de las hojas [41, 42]
Peptidasa de señal plastídica de tipo I	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Involucrada en el plegamiento de proteínas [43-45]



Planta sin inhibidores que contengan una infección



Planta con inhibidores que contengan una infección

Figura 1. Los inhibidores proteicos de proteasas otorgan una ventaja clara a las plantas, otorgándoles una resistencia a diversas infecciones.

Inhibidores de proteasas

Un grupo de estos inhibidores fue descubierto en 1935 por Moses Kunitz mientras se encontraba reproduciendo métodos para extraer, activar y cristalizar tripsina, una proteasa serínica [11]. El proceso iniciaba con la extracción del tripsinógeno, que es un precursor de la tripsina (llamados zimógenos), a partir del páncreas de una res. Este extracto se trabajaba a un pH de 7, terminado el proceso de extracción se modifica el pH para volver la solución más ácida, alcanzando un pH de 2, de esta manera se realizaba la transformación del tripsinógeno en tripsina. Esto se volvía una reacción de auto catálisis dado que la tripsina concluye la activación del resto del tripsinógeno. La activación del tripsinógeno en

tripsina consiste en la remoción de los primeros 15 aminoácidos de la proteína, los cuales forman el extremo *N*-terminal de la misma. Sin embargo, después de realizar la activación de la tripsina, Kunitz observaba que no alcanzaba la actividad esperada. Durante su trabajo, Kunitz llegó a la conclusión de que esta pérdida de actividad se debía a un elemento que se unía a la tripsina, el cual actuaba como inhibidor de la enzima madura (Figura 2). Kunitz fue capaz de determinar que este agente inhibidor estaba conformado por aminoácidos, pero por su contenido de carbono y nitrógeno, calculó su tamaño molecular en el rango de los 6000 Daltones, o bien, a péptidos de alrededor de 40 aminoácidos. A partir de ese momento a estos inhibidores de proteasas se les empezó a conocer como inhibidores Kunitz [11].

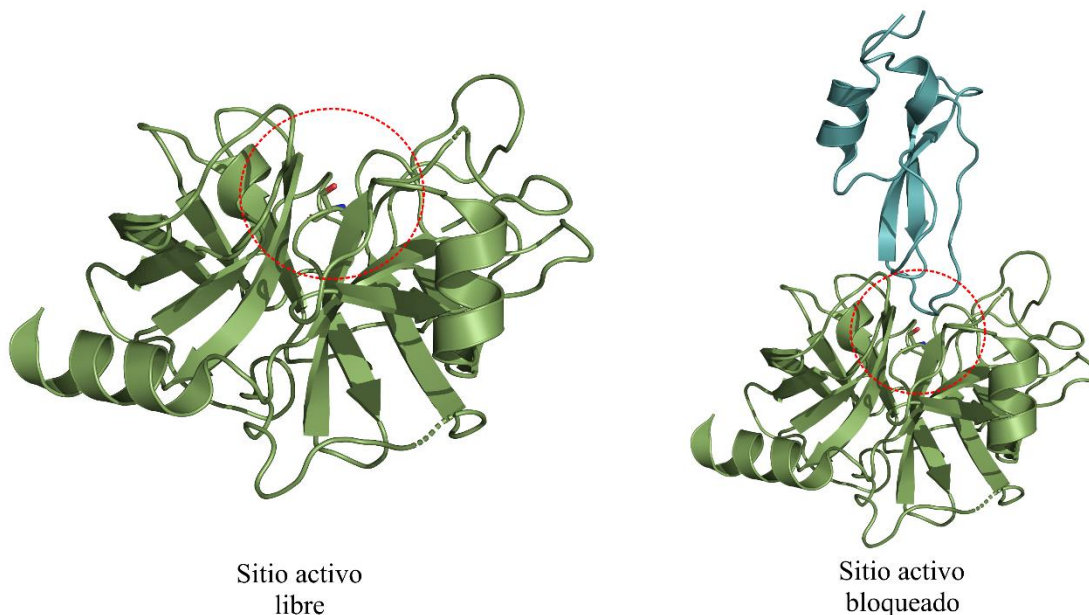


Figura 2. A la izquierda se observa a la tripsina bovina con el sitio activo libre. A la derecha se observa a la tripsina bovina en complejo con un inhibidor Kunitz obstruyendo el sitio activo de la proteasa e inhibiendo su función (PDBid: 1ZR0). La figura fue generada con PyMOL.

En 1945, Kunitz comparó un inhibidor de proteasa extraído de la soya con sus péptidos con capacidad inhibitoria descritos 1935. De esta manera descubrió un nuevo tipo de inhibidores de proteasas provenientes de plantas. Sin embargo, a diferencia de los péptidos que había estudiado previamente, estos nuevos inhibidores estaban formados por una mayor cantidad de aminoácidos, dando lugar a proteínas más grandes, y fueron nombrados entonces inhibidores tipo Kunitz [12].

En 1974 se describió el primer complejo proteico entre la tripsina y un inhibidor tipo Kunitz, determinando de esta forma la estructura tridimensional de los inhibidores tipo Kunitz, y describiendo, a nivel molecular la

inhibición que realizaban [13]. Los inhibidores tipo Kunitz están conformados por dos láminas formadas por un total de 12 hebras beta antiparalelas conectadas entre ellas por asas de longitud variable, donde seis de ellas forman un barril beta y otras seis forman un tipo de “tapa” para el barril beta. Este plegamiento de la proteína se conoce como β -trefoil o *trébol beta* [13] (Figura 3). Así mismo, se secuenció a la proteína, obteniéndose lo que en bioquímica se llama “estructura primaria”. Con los años se fueron acumulando varias secuencias de estos inhibidores y se observó que, a diferencia de muchas otras familias de proteínas, la similitud en sus secuencias era sumamente variable, con identidades en el rango de 35 a 90 %. Pero a pesar de lo anterior, el plegamiento tipo β -trefoil se conserva entre todas ellas [14].

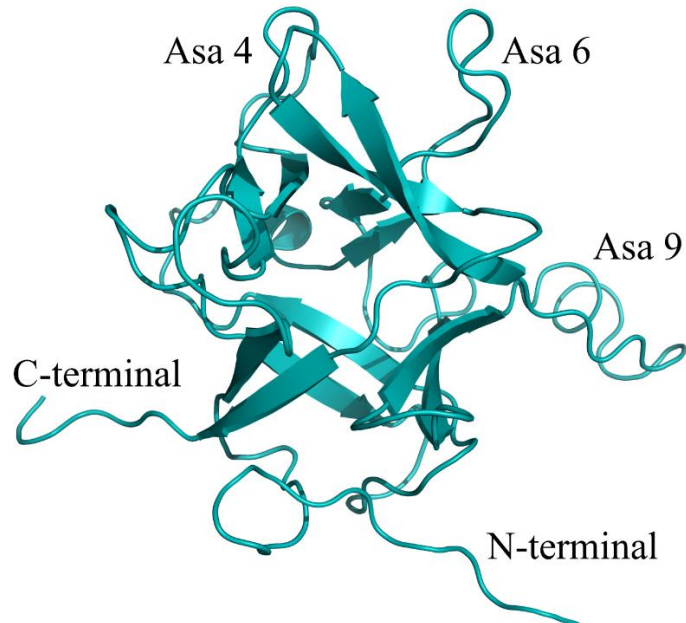


Figura 3. Representación de la estructura tridimensional de los inhibidores tipo Kunitz (en este caso M271, PDBid: 9CSZ). Se observan las 12 hebras beta que forman el núcleo de la proteína (representadas por flechas) y las 11 asas que les rodean. En la imagen, generada con PyMOL, se aprecia que cada asa tiene una longitud y una conformación estructural diferente.

Inhibidores tipo Kunitz

Actualmente se sabe que los inhibidores tipo Kunitz podrían ser capaces de inhibir proteasas serínicas, aspárticas y cisteínicas [15]. La inhibición de estas proteasas se lleva a cabo a través de la formación de un complejo entre el inhibidor y la proteasa a inhibir. En el caso de los complejos con tripsina, una proteasa serínica y los únicos complejos de los que se han reportado estructuras tridimensionales, los inhibidores tipo Kunitz llevan a cabo una inhibición de tipo competitivo, donde el inhibidor actúa simulando al sustrato de la proteasa [16]. El sitio activo de la tripsina identifica un residuo básico, que podría ser arginina o lisina, en la cadena de aminoácidos de la proteína, con este residuo básico se forma un complejo entre la proteasa y la proteína blanco para llevar a cabo la hidrólisis del enlace peptídico, una vez que el enlace peptídico se ha roto el sustrato se convierte en producto y se separa de la proteasa. Este sería un resumen de la acción de la tripsina sobre sus sustratos, sin embargo, cuando la hidrólisis del enlace peptídico ocurre con el inhibidor tipo Kunitz, la afinidad del inhibidor hacia la proteasa no se ve alterada, por lo que la proteasa es incapaz de separarse del inhibidor (Figura 4). De esta forma el inhibidor forma un complejo con la proteasa y no le permite interactuar con otras proteínas para degradarlas. Dentro de los inhibidores tipo Kunitz a este tipo de inhibición se le conoce como inhibición canónica [17] (Figura 5). Este nombre plantea la existencia de una inhibición no canónica, la cual tiene diferencias sutiles pero importantes. En la

inhibición no canónica, el inhibidor forma un complejo en el cual bloquea el acceso al sitio activo de la proteasa, esto se conoce como bloqueo estérico, pero no actúa como un sustituto del sustrato, por lo tanto, estos inhibidores no poseen un aminoácido básico que sea reconocido por el sitio activo de la proteasa [18].

A pesar de esta diferencia entre ambos métodos de inhibición, el estudio de varias estructuras tridimensionales de los complejos entre inhibidores tipo Kunitz y la tripsina muestra que entre ambas proteínas se forma una interfaz, con interacciones más o menos comunes entre ellas, y donde las interacciones hidrofóbicas son preponderantes [19-21]. De hecho, en todas las estructuras tridimensionales de estos complejos determinadas y reportadas en el *Protein Data Bank* [22] se puede ver que las interacciones hidrofóbicas, por su número, parecen ser las principales responsables de la gran afinidad del inhibidor tipo Kunitz hacia la proteasa blanco [20, 21, 23, 24]. Además de esta interfaz creada entre el inhibidor y la proteasa, otra parte importante en la formación del complejo es el asa del inhibidor, la cual interactúa más cercanamente con los residuos que conforman al sitio activo de la proteasa. Todos los inhibidores tipo Kunitz aislados a partir de plantas tienen 11 asas que unen a las 12 hebras betas que forman el núcleo de la proteína, estas 11 asas varían en su longitud y contenido de aminoácidos, de hecho, son los elementos estructurales más variables dentro de los inhibidores tipo Kunitz. Sin embargo, en todas las estructuras tridimensionales donde se

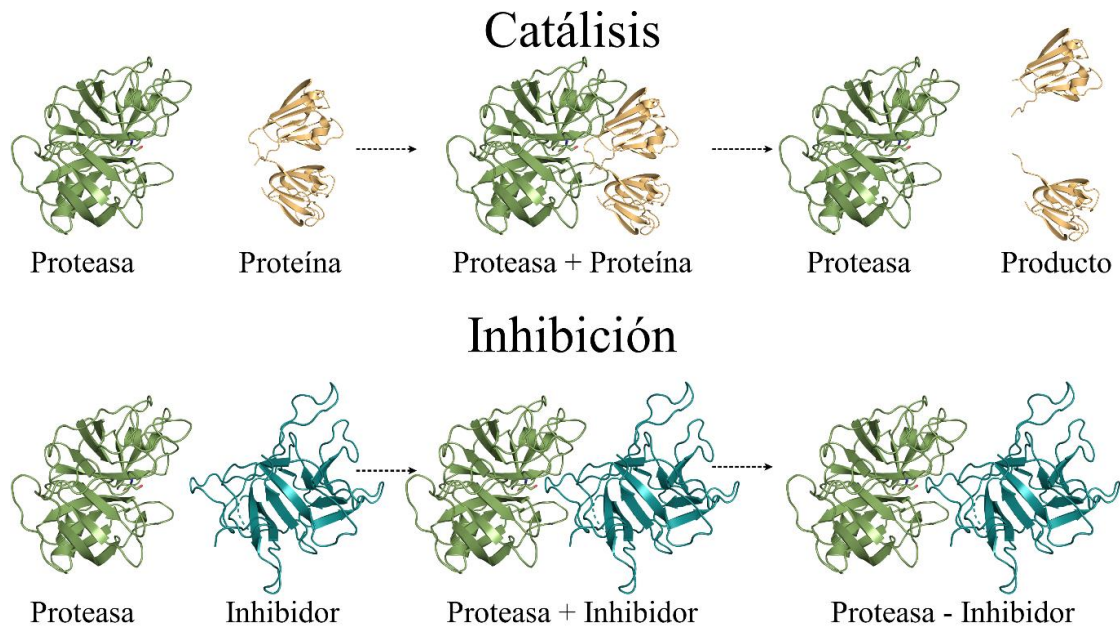


Figura 4. Arriba; Catálisis de la proteasa sobre una proteína blanco. La proteasa se encuentra con la proteína, se efectúa la formación de un complejo proteasa + proteína, el cual finaliza con la escisión del enlace peptídico y la liberación del producto. Abajo; Inhibición de una proteasa. La proteasa se encuentra con el inhibidor, se efectúa la formación de un complejo proteasa + inhibidor, la proteasa es incapaz de separarse del inhibidor y de esta manera es inhibida.

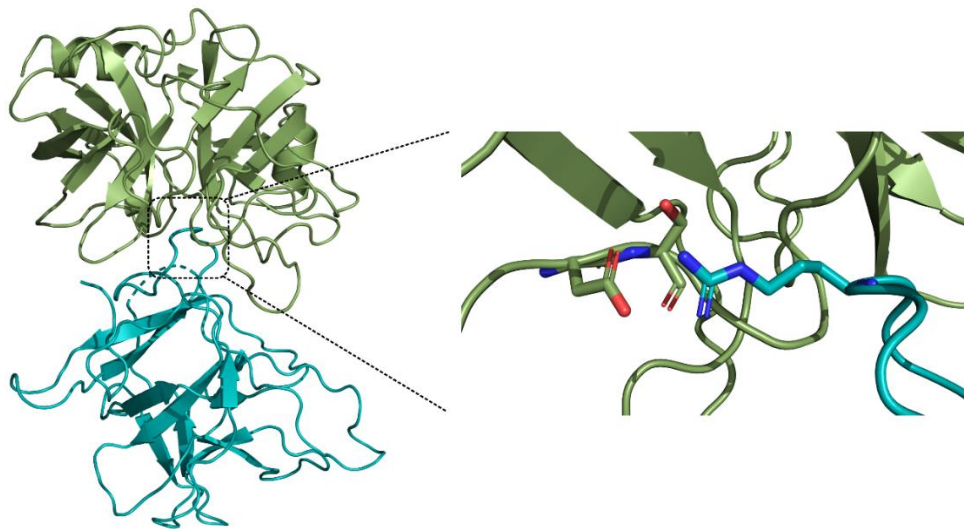


Figura 5. Complejo entre un inhibidor tipo Kunitz, en este caso el Soybean Trypsin Inhibitor, y la tripsina porcina (PDBid: 1AVX). El asa 4 ingresa en el sitio activo de la proteasa, realizando una inhibición canónica, de esta forma bloquea el sitio activo de la tripsina y le impide realizar su función catalítica. Las figuras se generaron en PyMOL.

observa la inhibición canónica, es el asa 4 del inhibidor tipo Kunitz quien se encuentra interactuando con el sitio activo de la proteasa blanco. Adicionalmente, en esta asa siempre se encuentra en la misma posición espacial, aunque no secuencial, una arginina que es el aminoácido reconocido por el sitio activo de la proteasa y responsable del secuestro de la serina catalítica. Esto nos haría pensar que la arginina es un aminoácido esencial en el proceso inhibitorio de las distintas proteasas y que, aunque no es el responsable directo de la estabilidad del complejo, sí podría tratarse de un elemento que guíe al mismo. Aun así, estudios realizados durante la última década han demostrado que el mutar a la arginina del asa 4 de un inhibidor tipo Kunitz por otros aminoácidos cambia, pero no abate, la afinidad del inhibidor hacia la proteasa, permitiendo que el complejo proteasa – inhibidor tipo Kunitz se siga formando, siguiendo un tipo de inhibición

llamado no canónico [19].

Actualmente, solo existe un ejemplo de una estructura tridimensional de un inhibidor tipo Kunitz que utiliza al asa 9 en vez del asa 4 para formar el complejo inhibitorio con la proteasa (PDBid: 3E8L) [25]. Esta asa, a diferencia del asa 4 de los otros inhibidores, cuenta con una lisina, residuo que el sitio activo de su proteasa blanco identifica siguiendo la inhibición canónica descrita arriba. A diferencia de los otros inhibidores canónicos reportados, este complejo entre el inhibidor tipo Kunitz API-A de *Sagittaria sagittifolia* y la tripsina tiene la característica de que su estructura no se encuentra unida a una única proteasa, sino que, hay dos proteasas unidas a este inhibidor en dos lugares distintos. Una por medio de una inhibición canónica usando el asa 9 y otra por medio de una inhibición no canónica usando el asa 5 [25] (Figura 6).

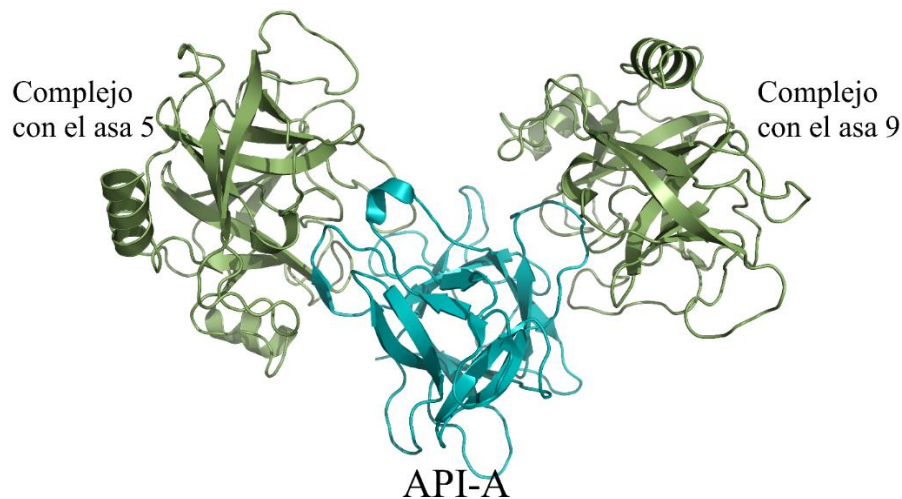


Figura 6. Complejo formado entre API-A, un inhibidor tipo Kunitz, y dos tripsinas bovinas. Este inhibidor cuenta con dos asas, la 5 y la 9, con la capacidad de inhibir a la tripsina. Una de las asas, la 9, realiza una inhibición de tipo canónica, mientras que el asa 5 lo hace siguiendo la inhibición no canónica (PDBid:3E8L).

De la Ciencia Básica a la resolución de problemas

Con toda la evidencia actual, se puede decir que los inhibidores tipo Kunitz presentan una alta plasticidad en su capacidad inhibitoria frente a proteasas, donde no se recurre a un único método de inhibición, ni a una única sección dentro de la estructura molecular del inhibidor. Distintas asas pueden proveer el aminoácido básico que la proteasa blanco reconoce para así poder llevar a cabo la inhibición canónica. Pero igualmente, es posible formar el complejo inhibitorio con la proteasa sin la necesidad de ese aminoácido guía. Esto abre la puerta a que otras asas de los inhibidores tipo Kunitz, además de las ya reportadas (asas 4, 5 y 9) puedan llevar a cabo la inhibición de otras proteasas aún por determinar. Además, con el estudio de la interfaz entre el inhibidor y la proteasa, en un futuro se podrían diseñar zonas de inhibición que sean capaces de interactuar con el sitio activo de la proteasa y poder estabilizar de una manera eficaz los complejos de la misma forma que sus variantes naturales.

Por lo tanto, conociendo mejor estos métodos inhibitorios y la manera de recrearlos en un laboratorio, estos podrían ser usados en distintas áreas. Como de hecho ya se han realizado algunos estudios donde se evalúa el potencial de los inhibidores tipo Kunitz en áreas como la agrícola; con la creación de plantas transgénicas capaces de protegerse de pestes, de distintos organismos, tales como moscas o nemátodos, donde algunos de estos organismos segregan una mezcla de distintas proteínas

directo en la planta para degradarla y posteriormente consumirla. En estas cuestiones los inhibidores de proteasas detienen el proceso de degradación y de esta forma el insecto o nemátodo es incapaz de ingerirlas [8, 10, 26-28]; en el área médica, se ha probado que los inhibidores tipo Kunitz son capaces de regular procesos antiinflamatorios en diversas enfermedades inducidas por estrés que afectan a la mucosa gástrica. En este caso, la señal de inflamación se regula por medio de proteasas, por lo tanto, este proceso puede ser reversible al añadir inhibidores [29, 30]; e incluso, algunos estudios han observado que algunas células cancerígenas presentan reacciones adversas con el uso de los inhibidores, dado que interrumpen varios procesos del proteosoma de la célula cancerígena dando de esta forma la cualidad de ser citotóxicas, y por ende, ser empleadas en tratamientos cancerígenos [31-35].

CONCLUSIONES

En 1947 inició el estudio de los inhibidores tipo Kunitz y desde entonces han sido objeto de diversos estudios, durante este tiempo se han podido describir los dos métodos que utilizan para llevar a cabo su función a nivel molecular, la inhibición canónica y no canónica. En estos trabajos se ha demostrado que no existe una única y clara vía de acción sino varias, mostrando que los inhibidores tipo Kunitz presentan una alta plasticidad y que pueden utilizar diferentes zonas de su estructura para inhibir proteasas. Adicionalmente, muchos estudios han logrado obtener resultados prometedores en áreas tan distintas como la

agrícola y la médica, generando en el primer caso plantas transgénicas capaces de soportar plagas y en el segundo caso se han descubierto usos antiinflamatorios e inclusive citotóxicos ante células cancerígenas, haciendo de estos inhibidores candidatos muy atractivos para futuras aplicaciones. Todos estos motivos vuelven al estudio de los inhibidores tipo Kunitz un área del conocimiento científico con un alto potencial para aumentar nuestro entendimiento de la función de las proteínas pero, sobre todo, para generar en el futuro próximas herramientas con aplicaciones desde salud hasta procesos alimentarios.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran la ausencia de conflicto de interés en el presente manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la DGAPA y al donativo PAPIIT IN226523 por su financiamiento a nuestra labor científica. Alexis Campuzano agradece al CONAHCYT (2020-000013-01NACF-13534) y al IBT por el programa de Becas de Manutención para Doctorado por el apoyo económico para realizar sus estudios doctorales.

REFERENCIAS

[1]. Thompson RHS. Classification and Nomenclature of Enzymes: The Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry recommends measures of

standardization. *Science* (1979) 196;137:405–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.137.3528.405>

[2]. Kühne W. Ueber das Trypsin (Enzym des Pankreas). *FEBS Lett* 1976;62:E8–12. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80848-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80848-4)

[3]. Schwann T. Ueber das Wesen des Verdauungsprocesses. *Annalen der Pharmacie* 1836;20:28–34. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/andp.18361140612>

[4]. Levene PA. The Cleavage Products Of Proteoses. *Journal of Biological Chemistry* 1905;1:45–58. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46095-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46095-9)

[5]. Rawlings ND, Barrett AJ. Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes* 2013;1:3–19. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00001-6>

[6]. López-Otín C, Bond JS. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry* 2008;283:30433–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>

[7]. Koiwa H, Bressan RA, Hasegawa PM. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci* 1997;2:379–84. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)90052-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)90052-2)

[8]. Habib H, Fazili KM. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants.

Biotechnology and Molecular Biology Review 2007;2:68–85. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/235962652_Plant_protease_inhibitors_A_defense_strategy_in_plants

[9]. Mosolov V V., Valueva TA. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. Appl Biochem Microbiol 2005;41:227–46. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0040-6>

[10]. Ryan CA. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. Annu Rev Phytopathol 1990;28:425–49. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.28.090190.002233>

[11]. Kunitz M, Northrop JH. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. Journal of General Physiology 1936:991–1007. Disponible en: <https://doi.org/10.1085/jgp.19.6.991>

[12]. Kunitz M. Crystallization of a Trypsin inhibitor from Soybean. Science (1979) 1945;101:668–9. Disponible en: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.101.2635.668>

[13]. Sweet RM, Wright HT, Janin J, Chothia CH, Blow DM. Crystal Structure of the Complex of Porcine Trypsin with Soybean Trypsin Inhibitor (Kunitz) at 2.6-Å Resolution. Biochemistry 1974;13:4212–28. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/bi00717a024>

[14]. Oliva MLV, Ferreira RDS, Ferreira JG, de Paula CAA, Salas CE, Sampaio MU. Structural

and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review.

Curr Protein Pept Sci 2011;12:348–57.

Disponible en:

<http://dx.doi.org/10.2174/138920311796391061>

[15]. Guerra Y, Valiente PA, Pons T, Berry C, Rudiño-Piñera E. Structures of a bi-functional Kunitz-type STI family inhibitor of serine and aspartic proteases : Could the aspartic protease inhibition have evolved from a canonical serine protease-binding loop? J Struct Biol 2016;195:259–71. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.014>

[16]. Laskowski M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases 1980:593–626. Disponible en:

<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.49.070180.003113>

[17]. Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. Cellular and Molecular Life Sciences 2003;60:2427–44. Disponible en:

<https://doi.org/10.1007/s00018-003-3120-x>

[18]. Guerra Y, Armijos-Jaramillo V, Pons T, Tejera E, Berry C. Canonical or noncanonical?

Structural plasticity of serine protease-binding loops in Kunitz-STI protease inhibitors. Protein Science 2023;32. Disponible en:

<https://doi.org/10.1002/pro.4570>

[19]. Li M, Srp J, Mares M, Wlodawer A, Gustchina A. Structural studies of complexes of kallikrein 4 with wild-type and mutated forms of the Kunitz-type inhibitor BbKI. Acta Crystallogr D Struct Biol 2021;77:1084–98.

Disponible en:



<https://doi.org/10.1107/S2059798321006483>

[20]. Song HK, Suh SW. Kunitz-type Soybean Trypsin Inhibitor Revisited: Refined Structure of its Complex with Porcine Trypsin Reveals an Insight into the Interaction Between a Homologous Inhibitor from *Erythrina caffra* and Tissue-type Plasminogen Activator. *J Mol Biol* 1998;275:347–63. Disponible en: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1469>

[21]. Patil DN, Chaudhary A, Sharma AK, Tomar S, Kumar P. Structural basis for dual inhibitory role of tamarind Kunitz inhibitor (TKI) against factor Xa and trypsin. *FEBS Journal* 2012;279:4547–64. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/febs.12042>

[22]. Rudiño-Piñera E, Quintero-Hernández V, Rivelino Juárez-González V. El Protein Data Bank (PDB) y su impacto en la investigación científica. *Alianzas y Tendencias BUAP* 2022;7:21–35. Disponible en: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5885737>

[23]. Zhou D, Lobo YA, Batista IFC, Marques-Porto R, Gustchina A, Oliva MLV, *et al.* Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of Its Complex with Bovine Trypsin. *PLoS One* 2013;8. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062252>

[24]. Li M, Srp J, Gustchina A, Dauter Z, Mares M, Wlodawer A. Crystal structures of the complex of a kallikrein inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* with trypsin and modeling of kallikrein complexes. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 2019;75:56–69. Disponible en: <https://doi.org/10.1107/S2059798318016492>

[25]. Bao R, Zhou CZ, Jiang C, Lin SX, Chi CW, Chen Y. The ternary structure of the double-headed arrowhead protease inhibitor API-A complexed with two trypsins reveals a novel reactive site conformation. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:26676–84. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022095>

[26]. de Lacerda JTJG, e Lacerda RR, Assunção NA, Tashima AK, Juliano MA, dos Santos GA, *et al.* New insights into lectin from *Abelmoschus esculentus* seeds as a Kunitz-type inhibitor and its toxic effects on *Ceratitis capitata* and root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. *Process Biochemistry* 2017;63:96–104. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2017.09.003>

[27]. Vajravijayan S, Pletnev S, Pletnev VZ, Nandhagopal N, Gunasekaran K. Crystal structure of a novel Kunitz type inhibitor, alocasin with anti-*Aedes aegypti* activity targeting midgut proteases. *Pest Manag Sci* 2018;74:2761–72. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/PS.5063>

[28]. Valueva TA, Mosolov VV. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 2004;69:1305–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0015-5>

[29]. Valois MV, De Oliveira C, Lapa AJ, Souccar C, Oliva MLV. *Bauhinia* Protease Inhibitors Attenuate Gastric Ulcer by Blocking Neutrophil Enzymes. *Planta Med* 2021;87:169–



76. Disponible en: <http://doi.org/10.1055/a-1202-4799>

[30]. Bonturi CR, Teixeira ABS, Rocha VM, Valente PF, Oliveira JR, Filho CMB, *et al.* Plant Kunitz Inhibitors and Their Interaction with Proteases: Current and Potential Pharmacological Targets. *Int J Mol Sci* 2022;23. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms23094742>

[31]. Nakahata AM, Mayer B, Neth P, Hansen D, Sampaio MU, Oliva MV. Blocking the Proliferation of Human Tumor Cell Lines by Peptidase Inhibitors from *Bauhinia* Seeds. *Planta Med* 2013;79:227–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1055/S-0032-1328156>

[32]. Bonturi CR, Motaln H, Silva MCC, Salu BR, de Brito MV, Costa L de AL, *et al.* Could a plant derived protein potentiate the anticancer effects of a stem cell in brain cancer? *Oncotarget* 2018;9:21296. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.25090>

[33]. De Paula CAA, Coulson-Thomas VJ, Ferreira JG, Maza PK, Suzuki E, Nakahata AM, *et al.* *Enterolobium contortisiliquum* Trypsin Inhibitor (EcTI), a plant proteinase inhibitor, decreases *in vitro* cell adhesion and invasion by inhibition of Src protein-Focal Adhesion Kinase (FAK) signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:170–82. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263996>

[34]. Lobba ARM, Alvarez-Flores MP, Fessel MR, Buri MV, Oliveira DS, Gomes RN, *et al.* A Kunitz-type inhibitor from tick salivary

glands: A promising novel antitumor drug candidate. *Front Mol Biosci* 2022;9. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.936107>

[35]. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clinica Chimica Acta* 2000. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00224-7](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00224-7)

[36]. Ge X, Dietrich C, Matsuno M, Li G, Berg H, Xia Y. An *Arabidopsis* aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *EMBO Rep* 2005;6:282–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400357>

[37]. Doelling JH, Yan N, Kurepa J, Walker J, Vierstra RD. The ubiquitin-specific protease UBP14 is essential for early embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 2001;27:393–405. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01106.x>

[38]. Kim J, Rudella A, Rodriguez VR, Zybailov B, Olinares PDB, Van Wijk KJ. Subunits of the plastid ClpPR protease complex have differential contributions to embryogenesis, plastid biogenesis, and plant development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009;21:1669–92. Disponible en: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063784>

[39]. Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C, *et al.* A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *The Company of Biologist* 2001;128. Disponible en:

<https://doi.org/10.1242/dev.128.23.4681>

[40]. Schaller A. A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta* 2004;220:183–97. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1407-2>

[41]. Olinares PDB, Kim J, Van Wijk KJ. The Clp protease system; A central component of the chloroplast protease network. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2011;1807:999–1011. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.12.003>

[42]. Nishimura K, Kato Y, Sakamoto W. Essentials of Proteolytic Machineries in Chloroplasts. *Mol Plant* 2017;10:4–19. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.08.005>

[43] Shipman RL, Inoue K. Suborganellar localization of plastidic type I signal peptidase

1 depends on chloroplast development. *FEBS Lett* 2009;583:938–42. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.02.016>

[44]. Inoue K, Baldwin AJ, Shipman RL, Matsui K, Theg SM, Ohme-Takagi M. Complete maturation of the plastid protein translocation channel requires a type I signal peptidase. *Journal of Cell Biology* 2005;171:425–30. Disponible en: <https://doi.org/10.1083/jcb.200506171>

[45]. Shipman-Roston RL, Ruppel NJ, Damoc C, Phinney BS, Inoue K. The significance of protein maturation by plastidic type I signal peptidase 1 for thylakoid development in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Physiol* 2010;152:1297–308. Disponible en: <https://doi.org/10.1104/pp.109.151977>