

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología

Informe Escrito Final

Análisis bioquímico de extractos enzimáticos de *Puya dasylirioides*
(Bromeliaceae), una especie endémica de Costa Rica, como potencial fuente de
nuevas enzimas proteolíticas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en
Biotecnología

Sergei Gerardo Redondo López

(1-1606-0373)

Campus Omar Dengo

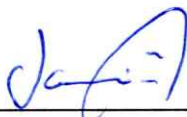
Heredia, 2024

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



Dr. Frank Solano Campos

Representante, Decano, quién preside



Dr. Javier Alvarado Mesén

Representante de la Dirección de la (ECB)



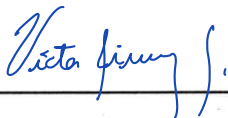
M.Sc. José Bernal Azofeifa Bolaños

Tutor



Dra. Martha Hernández de la Torre

Asesora



Dr. Víctor Jiménez García

Asesor



M.Sc. Carolina Sancho Blanco

Invitada especial

Agradecimiento

Un agradecimiento especial al M.Sc. José Bernal Azofeifa Bolaños del laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad Nacional por su gran labor como tutor y por su disposición para ayudarme con todo lo necesario para la finalización de este proyecto.

Al Ph.D. Frank Solano Campos del laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad Nacional por abrirme las puertas al laboratorio, por el préstamo de equipos y reactivos, y por la ayuda para la obtención de los permisos de la CONAGEBIO.

Al Ph.D. Javier Alvarado Mesén del Laboratorio de Bioquímica de Proteínas de la Universidad Nacional por su asesoría y acompañamiento en el proceso de la purificación de las proteínas mediante HPLC y por el préstamo de equipos que fueron indispensables para la realización de esta investigación.

A la Ph.D. Martha Hernández de la Torre de la Universidad de Concepción de Chile por ser la fuente de inspiración para esta investigación, por su asesoría, por compartir su conocimiento sobre enzimas proteolíticas, y por siempre estar disponible para evacuar dudas.

Al Ph.D. Victor Jiménez García por su disposición para formar parte del equipo asesor y por todos sus aportes, comentarios y correcciones durante el desarrollo del trabajo escrito.

Al Lic. Fabián Araya Yannarella de la Universidad Latina por su apoyo y disposición para brindar el traslado hacia las zonas de colecta del material vegetal.

Al M.Sc. Freylan Mena Torres y a la M.Sc. Katherine Jiménez del Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos por su disposición para el préstamo de equipos que fueron indispensables para la investigación.

A la M.Ed. Carolina Sancho Blanco del Laboratorio de Análisis Genómico de la Universidad Nacional por su disposición para el préstamo de equipos utilizados para la investigación.

Al programa FOCAES-Extensión por el apoyo económico que fue indispensable para cumplir con los objetivos de esta investigación.

Dedicatoria

A mis padres José Francisco Redondo Monney y Betty Lucía López Ulloa por el apoyo, el amor y por brindarme la gran oportunidad de estudiar. A mi novia Daniela Espinoza Noguera por siempre ser mi soporte y mi apoyo incondicional. A mi tutor y a cada persona que de una u otra manera me apoyó durante la generación de este proyecto. A la Universidad Nacional por toda la formación durante este gran periodo de mi vida.

Índice

Miembros del Tribunal.....	II
Agradecimiento.....	III
Dedicatoria.....	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros.....	VI
Índice de figuras.....	VII
Índice de anexos.....	X
Abreviaturas o acrónimos.....	XII
Resumen.....	XIII
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	3
1.3 Planteamiento del problema a investigar.....	6
1.4 Objetivos.....	6
1.4.1 Objetivo general.....	6
1.4.2 Objetivos específicos.....	7
2. Marco Teórico.....	7
3. Marco Metodológico.....	28
4. Resultados.....	43
5. Discusión.....	62
6. Conclusiones.....	72
7. Recomendaciones.....	72
8. Fuentes de Financiamiento.....	73
9. Conflictos de Interés.....	73
10. Referencias.....	73
11. Anexos.....	95

Índice de cuadros

Cuadro 1. Sistema de clasificación MEROPS.....	10
Cuadro 2. Familias en las que se han identificado moléculas con actividad proteolítica...	12
Cuadro 3. Enzimas proteolíticas aisladas de plantas pertenecientes a la familia Bromeliaceae.....	22
Cuadro 4. Explantes iniciales utilizados para el establecimiento in vitro de plantas pertenecientes a la familia Bromeliaceae.....	24
Cuadro 5. Tratamientos de desinfección para el establecimiento de semillas y segmentos de hoja de <i>Puya dasylirioides</i>	31
Cuadro 6. Tratamientos para el establecimiento de semillas y segmentos de hoja de <i>Puya dasylirioides</i>	33
Cuadro 7. Diseño del experimento Plackett-Burman con los diferentes reguladores de crecimientos y demás factores que fueron aplicados a explantes en crecimiento de <i>Puya dasylirioides</i> en condiciones in vitro. Placa compuesta de 8 factores y 12 corridas.....	35
Cuadro 8. Diseño del experimento para la multiplicación in vitro de explantes de <i>Puya dasylirioides</i> mediante la exposición a diversas concentraciones de reguladores de crecimiento.....	36
Cuadro 9. Concentración de proteína y actividad enzimática específica de extractos crudos de <i>Puya dasylirioides</i>	52
Cuadro 10. Comparación de los péptidos del pico 4 obtenidos mediante espectrometría de masas con las bases de datos de UniProt.	62

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de corte de las cuatro principales clases de proteasas.....	8
Figura 2. Tasa de crecimiento anual del mercado de las proteasas.....	14
Figura 3. Contribución de las industrias al valor del mercado mundial de las enzimas.....	15
Figura 4. Planta joven de <i>Puya dasyliroides</i>	29
Figura 5. Semilla con cubierta alada de <i>Puya dasyliroides</i>	30
Figura 6. Hoja de <i>Puya dasyliroides</i> dividida en zona basal y zona distal.....	32
Figura 7. Explante de <i>Puya dasyliroides</i> con corte vertical.....	37
Figura 8. Contaminación observada en explantes de <i>Puya dasyliroides</i> en respuesta a los tratamientos de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición.....	44
Figura 9. Curva de regresión logística para la determinación de la probabilidad de contaminación de semillas de <i>Puya dasyliroides</i> según el tiempo de exposición y la concentración de hipoclorito de sodio.....	45
Figura 10. Germinación de semillas de <i>Puya dasyliroides</i> en medio MS al 100 % a los 70 días de la siembra.....	46
Figura 11. Diagramas de Pareto para la determinación de la influencia de reguladores de crecimiento, concentración de sales, volumen de medio de cultivo y agitación sobre explantes de <i>Puya dasyliroides</i> . a) Efecto sobre la formación de brotes y b) Efecto sobre el cambio en la longitud de la planta. Línea punteada roja representa diferencias significativas.....	47
Figura 12. Formación de brotes a través del tiempo, de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas in vitro de <i>Puya dasyliroides</i>	48
Figura 13. Formación de brotes a partir de explantes de plantas de <i>Puya dasyliroides</i> establecidas in vitro. Brotes obtenidos mediante la exposición al regulador de crecimiento 2iP 0.5 mg/L.....	48

Figura 14. Formación de raíces a través del tiempo, de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas in vitro de <i>Puya dasylirioides</i>	49
Figura 15. Ganancia de peso fresco a través del tiempo, de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas in vitro de <i>Puya dasylirioides</i>	50
Figura 16. Crecimiento en longitud de las plantas sobre el tiempo de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas in vitro de <i>Puya dasylirioides</i>	51
Figura 17. Concentración de proteína y actividad enzimática específica de los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas de <i>Puya dasylirioides</i>	53
Figura 18. Zimograma en gel de gelatina al 10 % de extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas del tejido tallo y parte basal de la hoja.....	54
Figura 19. Densitometría normalizada de las manchas de actividad proteolítica producidas por enzimas proteolíticas presentes en extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas del tallo y hoja obtenidas mediante los ensayos de zimografía.....	55
Figura 20. Comportamiento de la actividad proteolítica residual en la fracción 1 del tallo de <i>P. dasylirioides</i> en función del pH del sustrato utilizado.....	56
Figura 21. Comportamiento de la actividad proteolítica residual en la fracción 1 del tallo de <i>P. dasylirioides</i> según la temperatura a la que se desarrolló la reacción.....	57
Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas del tallo y hoja de <i>P. dasylirioides</i>	58
Figura 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones parcialmente purificadas del tallo y hoja de <i>P. dasylirioides</i>	58
Figura 24. Cromatogramas de la fracción 1 del tallo de <i>P. dasylirioides</i> obtenidos mediante la técnica de HPLC al emplear una columna Ultra C18 y acetonitrilo con TCA al 0.1 % y agua con TCA al 0,1 % como solventes. A) Cromatograma obtenido al utilizar una absorbancia de 215 nm. B) Cromatograma obtenido al utilizar una absorbancia de 280 nm.....	59

Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los picos cromatográficos obtenidos 60
mediante la técnica de HPLC utilizando la fracción 1 del tallo.....

Figura 26. Alineamiento de los péptidos encontrados en el pico 4 de la fracción 1 del 61
tallo de *P. dasylirioides* con una serina proteasa putativa de la piña (*Ananas comosus*).....

Índice de anexos

Anexo 1. Inflorescencia de <i>Puya dasylirioides</i>	95
Anexo 2. Capsula de <i>Puya dasylirioides</i>	96
Anexo 3. Proceso de extracción de proteínas de tejido de <i>Puya dasylirioides</i>	96
Anexo 4. Curva de regresión logística para la determinación de la probabilidad de contaminación de explantes de la zona distal según el tiempo de exposición y la concentración de hipoclorito de sodio.....	97
Anexo 5. Curva de regresión logística para la determinación de la probabilidad de contaminación de explantes de la zona basal según el tiempo de exposición y la concentración de hipoclorito de sodio.....	97
Anexo 6. Presencia de contaminación fúngica en explantes de la zona distal de la hoja....	98
Anexo 7. Presencia de contaminación bacteriana en explantes de la zona basal de la hoja.....	98
Anexo 8. Semillas de <i>Puya dasylirioides</i> libres de contaminación pasadas dos semanas de cultivo.....	99
Anexo 9. Germinación de semillas de <i>Puya dasylirioides</i> en medio MS al 100 %.....	99
Anexo 10. Explantes de la zona distal y basal de la hoja de <i>Puya dasylirioides</i> en medio MS al 100 %.....	100
Anexo 11. Diagramas de Pareto para la determinación de la influencia de variables definidas sobre la formación de raíces.....	100
Anexo 12. Diagramas de Pareto para la determinación de la influencia de variables definidas sobre el cambio en el peso fresco de las plantas.....	101
Anexo 13. Brote a partir de un explante de plantas establecidas in vitro durante el ensayo de multiplicación utilizando diversos reguladores de crecimiento.....	101
Anexo 14. Regeneración de una planta completa a partir de un explante con un corte vertical.....	102
Anexo 15. Formación de múltiples brotes a partir de un explante establecido in vitro de <i>Puya dasylirioides</i>	102

Anexo 16. Formación de brotes a partir de un explante establecido in vitro de <i>Puya dasylirioides</i>	103
Anexo 17. Estructura de la raíz de <i>Puya dasylirioides</i>	103
Anexo 18. Planta establecida in vitro de <i>Puya dasylirioides</i> con amplio crecimiento radical.....	104
Anexo 19. Extractos crudos de la zona distal de la hoja, zona basal y tallo de <i>Puya dasylirioides</i>	104
Anexo 20. Cuantificación de proteína mediante técnicas colorimétricas para los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas de la zona distal de la hoja, zona basal y tallo de <i>Puya dasylirioides</i>	105
Anexo 21. Curva de calibración para la cuantificación de actividad enzimática mediante técnicas colorimétricas para los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas de la zona distal de la hoja, zona basal y tallo de <i>Puya dasylirioides</i>	105
Anexo 22. Información detallada de los péptidos del pico 4 de la fracción 1 del tallo encontrados mediante espectrometría de masas.....	106
Anexo 23. Plantas de <i>Puya dasylirioides</i> establecidas in vitro.....	106
Anexo 24. Planta de <i>Puya dasylirioides</i> en proceso de aclimatización.....	107

Abreviaturas o acrónimos

CAGR	Tasa de crecimiento anual compuesta
EC 3	Hidrolasas
EC 3.4	Peptidasas
MS	Murashige y Skoog
BAP	6-Bencilaminopurina
ANA	Ácido 1-naftalenacético
2iP	6-(γ,γ -Dimetilalilamino)-purina
TDZ	N-phenyl-N'-(1,2,3-thiazol-5-yl)urea
TCA	Ácido tricloroacético
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
PPFD	Densidad de flujo de fotones fotosintéticos
TFA	Ácido Trifluoroacético

Resumen

Costa Rica posee más de 190 especies de la familia Bromeliaceae, de las cuales 32 son endémicas. Estas especies poseen enzimas proteolíticas de gran importancia biotecnológica por sus diversas aplicaciones en la industria. A pesar de esto, ninguna de estas especies ha sido estudiada en Costa Rica. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de la especie *Puya dasylirioides* para producir enzimas proteolíticas y establecerse en condiciones *in vitro* a partir de plantas en estado silvestre mediante técnicas enzimológicas, espectrometría de masas y herramientas de biotecnología vegetal para su potencial uso en la industria. Para el establecimiento *in vitro* se utilizó semillas y segmentos de hoja. Estos se expusieron a una batería de ensayos con el fin de determinar el método de desinfección, tipo y concentración de reguladores de crecimiento y tipo de recipiente de cultivo que brindara mejores resultados para el crecimiento de las plantas en condiciones *in vitro*. Con respecto a las enzimas proteolíticas, se realizaron extractos crudos a partir del tallo y hoja, se purificaron mediante fraccionamiento con etanol frío y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y se realizaron ensayos enzimáticos para verificar la presencia de enzimas proteolíticas en los tejidos. Como parte de los resultados, se logró el establecimiento *in vitro* de la planta utilizando la semilla como explante, y se desarrolló un procedimiento de multiplicación de las plantas en condiciones *in vitro*. Además, se confirmó la presencia de enzimas proteolíticas en los tejidos del tallo y partes de la hoja, además de lograr la purificación de una enzima proteolítica extraída a partir del tallo de la planta con una masa aparente cercana a los 45 kDa. Esta investigación corresponde al primer informe sobre enzimas proteolíticas y establecimiento *in vitro* de una planta de la familia Bromeliaceae endémica de Costa Rica.

Palabras clave: Proteasas, Bromeliaceae, Enzimología, *In vitro*, *Puya dasylirioides*.

1. Introducción

Costa Rica posee más de 10000 especies de plantas (Gargiullo et al., 2008), de las cuales muchas corresponden a géneros con actividades farmacológicas y potenciales biotecnológicos que aún no han sido descubiertos. Debido a esto, es importante impulsar el desarrollo de investigaciones y tecnologías novedosas para la obtención de nuevos metabolitos que permitan el aprovechamiento de estas especies sin poner en peligro su supervivencia en sus hábitats naturales

1.1 Antecedentes

El estudio de las enzimas proteolíticas o proteasas se remonta a finales del siglo XVIII. Durante ese periodo se realizaron estudios del efecto de las secreciones gástricas sobre la carne, lo que permitió la identificación y descripción del proceso que hoy conocemos como catálisis biológica (Bruno, 2007). Gracias a los estudios sobre secreciones gástricas, en 1825 se descubrió y caracterizó la primera enzima proteolítica, molécula a la cual se le otorgó el nombre de pepsina (Bond, 2019).

Específicamente, el interés por las proteasas de origen vegetal inició con los estudios del químico venezolano Vicente Marcano en el año 1891, el cual descubrió una enzima con capacidad proteolítica en el fruto de la piña. Posteriormente, en el año 1892, Chittenden y colaboradores llamaron a esta enzima “bromelina”, término que se utilizó para describir cualquier proteasa aislada de una planta de la familia Bromeliaceae (Dighe et al., 2010).

A inicios de 1950, el Instituto de Investigación de la Piña en Hawái realizó estudios con variedades de plantas de la especie *Ananas comosus* var. *comosus* y un gran número de especies de la familia Bromeliaceae, logrando producir extractos con actividad proteolítica similar a la bromelina a una escala de planta piloto (Amini et al., 2016). Posteriormente, en el año 1954 se logró obtener formas purificadas de una nueva proteasa de origen vegetal llamada “papaína” a partir de extractos de la planta *Carica papaya* (Bond, 2019). Estos tipos de proteínas fueron las primeras en ser comercializadas a nivel mundial (Burckett et al., 2007) y desde entonces su demanda ha aumentado, debido a su aplicación en diversos tipos de industrias.

En la década de 1950 inició la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* para la producción de sustancias biológicamente activas (Natalucci et al., 2009). El primer reporte de actividad proteolítica *in vitro* se remonta al año 1979, con el trabajo realizado por Apte y colaboradores, en el que identificaron enzimas proteolíticas en cultivos de *Ananas Sativus*. Sin embargo, no fue hasta el año 2002 en el que se logró la caracterización de una nueva proteasa cisteínica a partir de callos de *Allium sativum* (Parisi et al., 2002).

En el 2003, Hernández y colaboradores diseñaron un procedimiento para la extracción de bromelina en el que utilizaron protectores del centro activo de la enzima a un pH cercano al fisiológico de la planta y alejado del óptimo de la enzima. Gracias a esta innovación tecnológica lograron alcanzar rendimientos de 20.8 g de extracto crudo/kg de tallos y 4.85 mg de proteínas/mL de extracto, con una actividad enzimática de 6.6 U/mL de extracto. Desde su publicación, este protocolo se ha utilizado para la extracción y el estudio de múltiples proteasas en otras especies vegetales.

Gracias a los avances en las técnicas de extracción y técnicas de cultivo *in vitro*, herramientas, como la generación de embriones somáticos de *C. papaya*, han sido eficientes para la producción de enzimas proteolíticas como la papaína (Panjaitan et al., 2007; Usman et al., 2002). De la misma manera, la ficina, extraída de la especie *Ficus carica*, se logró producir mediante suspensiones celulares (Fráguas et al., 2004; Pasqual y Ferreira, 2007).

En América Latina se han realizado investigaciones para la detección de nuevas enzimas proteolíticas. Entre ellas, se reportó la estructura de la Pendulifloraina I, aislada a partir de la planta *Hohenbergia penduliflora*, por un grupo de investigadores de Cuba, Argentina y España (Pérez et al., 2010). Posteriormente, se descubrió la Antiacantaína A, aislada de la planta *Bromelia antiacantha* (Vallés y Cantera, 2018), y la Balansaína I, por investigadores argentinos en la planta *Bromelia balansae* (Pardo et al., 2000).

En otras investigaciones latinoamericanas no se ha logrado elucidar completamente la estructura de nuevas proteasas, pero sí se ha determinado la capacidad proteolítica de extractos crudos de diferentes plantas, en especial las pertenecientes a la familia Bromeliaceae. Entre algunos de esos estudios figuran los desarrollados por Pérez y colaboradores (2006) y grupos mexicanos como Moreno-Hernández y colaboradores (2017) y Meza-Espinoza y colaboradores (2018).

En Costa Rica no se ha informado sobre proyectos dedicados a la determinación de la actividad proteolítica de extractos parcialmente purificados. Las técnicas de establecimiento *in vitro* se aplican principalmente para la micropropagación y no para producir metabolitos comerciales. Debido a esto, se requiere desarrollar proyectos que permitan la investigación y el aprovechamiento de la gran biodiversidad del país con el objetivo de descubrir nuevas proteasas con potencial de ser producidas a nivel industrial.

1.2 Justificación

Las enzimas proteolíticas son un grupo de enzimas cuya actividad catalítica consiste en hidrolizar los enlaces peptídicos (Mahajan y Badgujar, 2010). Estas se consideran componentes vitales en el desarrollo y crecimiento de los organismos por su participación indispensable en los procesos metabólicos y fisiológicos de los mismos. Esto debido a que están involucradas en todo el ciclo de vida de las proteínas, desde su biosíntesis, hasta su degradación (Moreno-Hernández et al., 2017; Pesquet, 2012).

Además de su importancia fisiológica, las enzimas son moléculas de gran relevancia comercial. En 2017, el valor de mercado a nivel mundial fue de 7 080 millones de dólares, y se prevé que para el año 2024 alcance los 10 500 millones de dólares, lo cual representa una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 5.7 %. Del mercado total de enzimas, las proteasas representan más del 26.8 % de enzimas comercializadas a nivel mundial (Allied Market Research, 2018), constituyendo un grupo que continúa ganando relevancia para la investigación dedicada a la bioprospección e industrialización.

Las propiedades únicas de las proteasas han permitido que se utilicen en aplicaciones industriales. Entre las más importantes se encuentran la industria alimenticia; donde son utilizadas para aumentar los perfiles nutricionales de los alimentos, retardar la descomposición, suavizar las carnes, y para la producción de quesos, panes y cerveza (Feijoo-Siota y Villa, 2011; González-Rábade et al., 2011). En la producción de detergentes y sustancias de limpieza las proteasas abarcan el 35 % del mercado total de enzimas (Feijoo-Siota y Villa, 2011), y en Estados Unidos el 50 % de los productos de limpieza contienen enzimas proteolíticas (Niyonzima y More, 2015). Además, estas enzimas son utilizadas en áreas de la medicina para el tratamiento de la artritis (Brien et al.,

2004), tratamiento del cáncer de mama y colon (Beuth, 2008), y para la regeneración de tejidos en las heridas (Kulkarni et al., 2019).

Actualmente el mercado mundial de enzimas proteolíticas es dominado por las de origen microbiano (Allied Market Research, 2018); no obstante, proteasas vegetales como la bromelina, papaína y ficina, continúan siendo irremplazables en muchas aplicaciones. Su capacidad para mantenerse activas en un rango superior de pH y temperatura, y la posibilidad de ejercer su actividad catalítica sobre una gama mayor de proteínas ha incrementado la relevancia en los últimos años de las proteasas extraídas de plantas (Troncoso et al., 2022). Esto ha generado un aumento en la bioprospección de proteasas de diferentes especies de plantas para su posterior caracterización y evaluación de su potencial biotecnológico (Meza-Espinoza et al., 2018).

Las especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae se caracterizan por producir grandes cantidades de proteasas por encima de sus niveles fisiológicos necesarios (Errasti et al., 2018). De ellas, la bromelina extraída del vástago de la especie *A. comosus* es la enzima más representativa (Benucci et al., 2011). En las últimas décadas, se han descubierto nuevas moléculas con posible potencial biotecnológico a partir de bromelias, tales como *Macrodontainia* I, *Hieronymainia* III, *Balansaina* I y *Antiacantahína* (Bruno et al., 2008; Maras et al., 2018; Pardo et al., 2000; Vallés y Cantera, 2018). Sin embargo, a pesar del gran potencial de esta familia, y el interés de los investigadores en las últimas décadas, aún son muchas las especies de bromelias a las cuales no se les ha investigado su potencial para producir enzimas proteolíticas.

En Costa Rica se encuentran 198 especies de la familia Bromeliaceae, de las cuales 32 son endémicas (Caceres-González et al., 2013). Entre ellas, resalta la especie *Puya dasylirioides*, que es una de las dos especies del género *Puya* que habita fuera de la cordillera de los Andes y ha sido reportada únicamente en Costa Rica (Caceres-Gonzalez et al., 2013; Smith y Downs, 1974). Actualmente no existen estudios sobre la capacidad metabólica de esta planta para producir enzimas proteolíticas con un posible uso industrial. Por eso, se considera una fuente promisoría para nuevas proteasas de plantas endémicas del país.

Uno de los principales problemas de producción de enzimas proteolíticas a partir de fuentes vegetales es que, a veces, se extraen de especies con riesgo de extinción y altos niveles de endemismo en hábitats que imposibilitan su domesticación o de difícil acceso. Las moléculas suelen producirse por órganos de la planta que dificultan su extracción o eliminan totalmente o

parte importante de la planta. Esto ha generado que se haya estudiado poco más del 1 % de las especies vegetales en el mundo (Pérez, 2012).

Las plantas de la familia Bromeliaceae se caracterizan por su amplia radiación adaptativa, lo que les ha permitido habitar diversos ecosistemas y nichos ecológicos (Pérez, 2012). A su vez, esto hace que sus poblaciones sean sumamente susceptibles a procesos de cambio climático y la antropización, lo que genera pérdida de los individuos que son parte de las poblaciones vegetales y, por consiguiente, pérdida de diversidad genética (Guerra y Dal Vesco, 2010).

Sumado a esto, especies como *P. dasylirioides* habitan en lo que se conoce como el ecosistema de turbera. Estos ecosistemas, y principalmente la flora local, responden de manera muy sensible a cambios climáticos y actividad antropogénica, procesos que causan afectaciones en la geoquímica del sitio, regímenes hidrológicos y condiciones redox, lo que implican posibles afectaciones en la población vegetal de la zona (Huaman et al., 2020; Schitteck et al., 2016).

Tales escenarios justifican el estudio y conservación de especies endémicas con distribución restringida y que habitan en zonas sensibles al cambio climático y actividad antropogénica. Además, permitirían identificar y aplicar medidas que con el fin de obtener las enzimas proteolíticas u otras moléculas de interés sin poner en peligro las poblaciones vegetales y su ecología.

A pesar de la importancia de las enzimas proteolíticas vegetales, su producción se considera un proceso costoso por la dificultad de establecer modelos industriales eficientes que reduzcan los costos de producción. Esto ocurre debido a que la concentración de proteasas se relaciona con las condiciones climáticas del organismo y factores, como cambios en el uso de suelo, enfermedades y períodos de cultivo, dificultan la obtención de metabolitos de forma constante durante el año (Singh, et al., 2016b).

Para superar tales dificultades, el uso de técnicas de cultivo *in vitro* y en especial, los sistemas de cultivo de órganos, tejidos o células vegetales en biorreactores son una oportunidad para producir productos naturales de una manera más homogénea, lo que genera que la comercialización de estos productos sea viable (González-Rábade et al., 2011, Hernández et al., 2009). Debido a que las proteasas son generalmente caras a altos niveles de pureza, técnicas utilizadas para generar gran cantidad de productos estructuralmente funcionales como la

micropropagación, biorreactores de inmersión temporal, callos y las suspensiones celulares (González-Rábade et al., 2011) pueden aumentar los rendimientos de producción a una escala industrial, logrando que compitan con las proteasas de origen microbiano ya establecidas en el mercado.

No se han realizado muchos intentos de producir proteasas de importancia comercial utilizando estrategias de cultivo *in vitro*, y el potencial industrial de la planta *P. dasyliroides* continúa siendo desconocido. Debido a esto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la capacidad de la especie *P. dasyliroides* para producir enzimas proteolíticas y establecerse en condiciones *in vitro* a partir de plantas en estado silvestre mediante técnicas enzimológicas, espectrometría de masas y herramientas de biotecnología vegetal para su potencial uso en la industria.

1.3 Planteamiento del problema a investigar

Las especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae se caracterizan por la producción de gran cantidad y variedad de enzimas proteolíticas, muchas de las cuales no han sido reportadas para la ciencia. Debido a esto, se plantea la siguiente pregunta: ¿Será posible establecer la planta *Puya dasyliroides* en condiciones *in vitro* y realizar la extracción de enzimas proteolíticas nuevas para la literatura utilizando extractos crudos y parcialmente purificados de tejidos de la planta silvestre?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

1. Evaluar la capacidad de la especie *Puya dasyliroides* para producir enzimas proteolíticas y establecerse en condiciones *in vitro* a partir de plantas en estado silvestre mediante técnicas enzimológicas, espectrometría de masas y herramientas de biotecnología vegetal para su potencial uso en la industria.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Establecer un procedimiento de multiplicación de plantas *in vitro* de la especie *Puya dasylirioides* mediante cambios en la concentración de reguladores de crecimiento, estado del medio de cultivo y mecanismos de desinfección.
2. Demostrar la capacidad de producción de enzimas proteolíticas en la especie *Puya dasylirioides* a partir de extractos parcialmente purificados obtenidos de plantas en estado silvestre, mediante zimogramas, espectrometría de masas y comparación con bases de datos bioinformáticas.
3. Analizar la variación de la actividad enzimática de las proteasas aisladas de extractos parcialmente purificados de la planta *Puya dasylirioides* ante condiciones no fisiológicas mediante ensayos enzimáticos empleando distintos rangos de temperatura y pH.

2. Marco Teórico

2.1 Enzimas proteolíticas

Las proteasas, también llamadas peptidasas o enzimas proteolíticas, son un grupo de enzimas que tienen la función catalítica de hidrolizar los enlaces peptídicos (Rani et al., 2012). Están presentes de manera ubicua en la naturaleza, donde participan y regulan muchos de los procesos metabólicos, fisiológicos y anatómicos que realizan todos los organismos vivos (Mahajan y Badgular, 2010).

Los cortes en los enlaces peptídicos son una de las más importantes y frecuentes modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas, las cuales ocurren mediados por muchas vías y con la participación de gran variedad de proteasas. Como estos cortes son limitados y dirigidos hacia la ruptura de uniones peptídicas de manera específica, dependen de la accesibilidad del enlace peptídico que se necesite cortar, de los aminoácidos involucrados en el enlace y del entorno generado por otros aminoácidos cercanos a la unión (Bruno, 2007).

Estas enzimas pertenecen a la clase de las hidrolasas (EC 3), y subclase de las peptidasas (EC 3.4). En dependencia del sitio de corte, las proteasas son subdivididas en endopeptidasas y

exopeptidasas (Mótyán et al., 2013; van der Hoorn, 2008). Las endopeptidasas rompen los enlaces peptídicos que se encuentran dentro de la estructura primaria de las proteínas, mientras que las exopeptidasas rompen los enlaces cercanos al N-terminal (aminopeptidasas) y al C-terminal (carboxipeptidasas) (Mótyán et al., 2013)

Independientemente de su sitio de acción, todas las proteasas realizan una polarización del grupo carbonilo del enlace peptídico diana al estabilizar el átomo de oxígeno en el llamado agujero de oxianión (Figura 1). Esto hace que el átomo de carbono sea más vulnerable a un ataque nucleofílico, mediado por la donación de un protón del grupo NH adyacente al sitio diana (Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008).

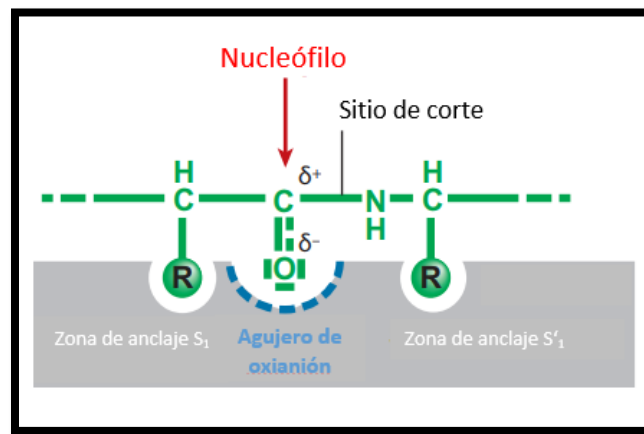


Figura 1. Mecanismo de corte de las cuatro principales clases de proteasas: La proteína sustrato (verde) se une a través de los residuos de aminoácidos al sitio de unión de la proteasa (gris) al interactuar con las zonas de anclaje de la enzima. El enlace peptídico por cortar es adyacente a un grupo carbonilo, el cual es polarizado por las proteasas mediante la estabilización del agujero de oxianión (azul), produciendo que el carbonilo sea vulnerable al ataque nucleofílico. Tomado y modificado de van der Hoorn (2008).

Las proteasas unen sus dominios proteolíticos a otra variedad de dominios especializados que les confieren características como: especificidad de sustrato, modificación de sus propiedades cinéticas, cambios en la sensibilidad frente a inhibidores endógenos y guía para su localización celular (López-Otín y Bond, 2008). Estos dominios incluyen señales que dirigen estas enzimas hacia su correcta localización, dominios autoinhibitorios que previenen la activación catalítica prematura y, por último, dominios que facilitan las interacciones homotípicas y heterotípicas con sustratos, otras proteínas, inhibidores y receptores (López-Otín y Bond, 2008).

Algunas de las funciones que estas enzimas poseen son: suplemento de aminoácidos, remoción de proteínas mal plegadas o anormales, control del metabolismo y homeostasis, maduración de hormonas peptídicas, modulación de las interacciones proteína-proteína, procesamiento de la información celular, amplificación de señales y corte de secuencias de señalización en proteínas para su integración en las organelas (Pardo et al., 2000). De igual manera, tienen efecto directo sobre la replicación y transcripción del ADN, proliferación y diferenciación celular, morfogénesis tisular, neurogénesis, angiogénesis, ovulación, fertilización, reparación de heridas, coagulación, necrosis y apoptosis (López-Otín y Bond, 2008).

La gran diversidad en las funciones de las proteasas es resultado del proceso evolutivo y la diversidad en tamaños y formas que estas enzimas poseen (López-Otín y Bond, 2008). Esto genera que la arquitectura de las enzimas proteolíticas varíe desde enzimas pequeñas de solo 20 kDa hasta complejos de degradación como el proteasoma, que poseen una masa de hasta 6 MDa (Bertenshaw, et al., 2003).

2.2 Clasificación de las enzimas proteolíticas (Sistema MEROPS)

Para el año 2024, se han reportado un total de 1142788 secuencias de proteasas en la base de datos MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>) (Rawlings et al., 2018), estas se dividen en seis grandes categorías en dependencia del grupo que utilizan como nucleófilo para realizar su catálisis. Estas categorías son: aspartil-proteasas, metaloproteasas, proteasas glutámicas, cisteíno-proteasas, serino-proteasas y treonina-proteasas (Li et al., 2013). Los primeros tres grupos utilizan una molécula de agua como nucleófilo, mientras que las tres últimas utilizan un residuo de cisteína, serina y treonina, respectivamente (van der Hoorn, 2008).

Rawlings y Barrett (1993) desarrollaron una forma de clasificación de las proteasas basada en sus características estructurales básicas y sus relaciones evolutivas, haciendo uso de las secuencias de aminoácidos disponibles en ese entonces. Esto dio origen a la base de datos “MEROPS”, la cual es un sistema de clasificación de peptidasas en familias y clanes (Rawlings et al., 2018).

Un clan se define como familias de proteasas que comparten un mismo origen evolutivo, pero que han divergido tanto que su relación no se puede establecer solo por comparar sus estructuras primarias (Bruno, 2007). Por ello, se comparan mediante sus estructuras terciarias, y

cuando no están disponibles se comparan por el orden de aminoácidos catalíticos en la cadena polipeptídica o las secuencias de aminoácidos alrededor de los aminoácidos catalíticos (Errasti, 2013).

Una familia está constituida por un grupo de proteasas en el que la secuencia de aminoácidos de cada miembro muestra una relación estadísticamente significativa con la de otro miembro de la familia en la zona de la molécula responsable de la actividad proteolítica (Rawlings y Barrett, 1993). Por último, cada proteasa que se diferencia por su estructura, función biológica, sustrato, mecanismo catalítico y origen genético recibe un nombre y un identificador (ID MEROPS) (Errasti, 2013).

Para la identificación de las familias, clanes y proteasas, son utilizadas letras que hacen referencia al tipo catalítico de las proteasas que las integran: S (serínicas), C (cisteínicas), T (treonínicas), A (aspárticas), G (glutámicas), M (metalopeptidasas), N (asparagínicas) e U (mecanismo desconocido) (cuadro 1). Todas las identificaciones se mantienen estables y se cambian sólo bajo circunstancias especiales y nunca son reutilizadas (Rawlings et al., 2018)

Cuadro 1. Sistema de clasificación MEROPS. Tomado y modificado de Bruno (2007).

Nivel	Descripción	Identificadores
Clan	Conjunto de familias en las que todas las proteasas han evolucionado a partir de un único ancestro	A, C, M, G, P, S
Familia	Una familia incluye proteasas que presentan homología en su secuencia aminoacídica	A, C, M, G, P, S, U
Peptidasa	Una proteasa se distingue de las demás por diferencias en la actividad, estructura u origen genético	A, C, M, G, P, S, U

2.3 Enzimas proteolíticas en organismos vegetales

El 43.85 % de todas las enzimas proteolíticas descubiertas pertenecen al reino Plantae (Mahajan y Badgujar, 2010). Organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* contienen más de 723 genes codificantes para proteasas (Schaller, 2004), mientras que en otras especies como *Populus trichocarpa* y *Oryza sativa* se han reportado hasta 955 y 678 genes, respectivamente (López-Otín y Bond, 2008; van der Hoorn, 2008). En organismos superiores, cerca del 2 % del

total de genes corresponden a secuencias codificantes para las proteasas, por lo que es uno de los grupos más grandes de enzimas (Barrett et al., 2001).

La degradación de proteínas en las plantas engloba gran cantidad de rutas proteolíticas que se realizan en diferentes compartimentos de la célula (Palma et al., 2002). Algunas de estas áreas en las que se ha detectado actividad proteolítica son: el núcleo, retículo endoplasmático, apoplastos, vacuolas, cloroplastos, mitocondrias, pared celular, aparato de Golgi y el citosol (Diaz-Mendoza et al., 2016; Palma et al., 2002).

Las proteasas están implicadas en todos los aspectos del ciclo de vida vegetal, desde la germinación de la semilla hasta la senescencia (Bruno, 2007). Estas enzimas son indispensables para la degradación de proteínas dañadas y mal plegadas, constituyendo una fuente de nuevos aminoácidos libres que son necesarios para la síntesis de nuevas proteínas. Todos los procesos de degradación actúan en mecanismos como la embriogénesis, el desarrollo de las flores y de los tricomas, la fotomorfogénesis, los ritmos circadianos, y la señalización hormonal en respuestas a jasmonatos, giberelinas, citoquininas, auxinas y ácido abscísico (Schaller, 2004).

Uno de los roles claves en los que participan estas moléculas es en la protección del vegetal a ataques de patógenos, parásitos y herbívoros (Domingues et al., 2013). Esto se evidencia mediante los resultados obtenidos por López-García y colaboradores (2012), donde informaron sobre la capacidad de la bromelina de inhibir hongos patógenos que causan enfermedades en cultivos como el maíz, arroz y melón.

La senescencia, proceso en el cual se reciclan estructuras celulares y se produce una degradación masiva de macromoléculas para la posterior translocación de los nutrientes a tejidos en crecimiento, es un proceso crítico para el desarrollo y supervivencia de la planta (Diaz-Mendoza et al., 2016). Su mecanismo es ampliamente regulado por la actividad proteolítica de serino-proteasas y cisteíno-proteasas. Estas moléculas han sido descritas como las enzimas más abundantes asociadas con la senescencia en las hojas, y cambian su concentración, actividad proteolítica y localización intracelular durante los procesos de senescencia (Breeze et al., 2011; Diaz-Mendoza et al., 2016; Kidrič et al., 2014)

De igual manera, estas enzimas participan en muchos procesos relacionados con el desarrollo de las características fisiológicas del organismo. Actúan en procesos tales como el

mecanismo de ubiquitinización/proteasoma, densidad de estomas, fotoinhibición en el cloroplasto, muerte celular programada, desarrollo de semillas, movilización de nitrógeno durante la germinación de las semillas, digestión de insectos en plantas carnívoras, la señalización por brasinoesteroides, el procesamiento de proteínas de reserva durante su acumulación en semillas, regulación de procesos de desarrollo y crecimiento, diferenciación xilemática, formación lateral de raíces, desarrollo embrionario y desarrollo del meristemo distal (Beers et al., 2000; Errasti, 2013; Estelle, 2001; van der Hoorn, 2008).

Actualmente, solo se han aislado proteasas de algunas familias de plantas espermatófitas (cuadro 2).

Cuadro 2. Familias en las que se han identificado moléculas con actividad proteolítica. Tomado y modificado de Pérez (2012).

Familia	Referencias
Actinidiaceae	Sharma et al. (2018)
Apocynaceae	Freitas et al. (2007), Shivaprasad et al. (2010), Tomar et al. (2008)
Asclepiadaceae	Liggieri et al. (2009), Trejo et al. (2001)
Asteraceae	Vairo-Cavalli et al. (2005)
Bromeliaceae	Bruno et al. (2008), Hernández et al. (2003), Maras et al. (2018), Meza-Espinoza et al. (2018), Moreno-Hernández et al. (2017), Pardo et al. (2000), Pérez et al. (2010), Vallés y Cantera, (2018)
Caricaceae	(Kyndt et al., 2007)
Euphorbiaceae	Domsalla y Melzig, (2008)
Fabaceae	Jinka et al. (2009), Zhang et al. (2006)
Moraceae	Corrons et al. (2012), Devaraj et al. (2008), Singh et al. (2008)
Poaceae	Martínez, (2007), Yang et al. (2004)
Solanaceae	Vallés et al. (2008)
Zingiberaceae	Karnchanatat et al. (2011), Nagarathnam et al. (2010)

2.4 Aplicaciones industriales de las enzimas proteolíticas

Las proteasas son reconocidas mundialmente por su gran potencial para ser aplicadas en la industria y como posibles moléculas terapéuticas (Singh et al., 2016a). Estas proteínas son parte del grupo de las hidrolasas, moléculas que representan hasta el 72.7 % de enzimas que se comercializan mundialmente. En 2017, su valor de mercado a nivel mundial alcanzó los 7080 millones de dólares, sin embargo, se prevé una tasa de crecimiento anual (CAGR) del 5.7 %, lo que elevaría sus valores a 10500 millones de dólares en el año 2024, siendo los principales factores del crecimiento los avances en ciencia y tecnología, desarrollo de biorreactores, demanda de farmacéuticos y fuentes de energía renovables, y el aumento de manufactura en países en desarrollo (Allied Market Research, 2018).

De todos los sectores que conforman el mercado de enzimas (alimentos y bebidas, bioenergía, farmacéutica, biotecnología y piensos), el sector farmacéutico y la biotecnología presentarán el mayor crecimiento durante el periodo 2018-2024, con una tasa de crecimiento anual del 7.1 % para un total de valor de mercado previsto en 1700 millones de dólares en el año 2024. La ingeniería genética y prevalencia de desórdenes crónicos en la salud de las personas como cáncer, diabetes, intolerancia a la lactosa, alergias e insuficiencia pancreática son los principales factores que resultan en este incremento (Allied Market Research, 2018).

Las proteasas son el segundo grupo más contribuyente al valor total del mercado de las enzimas. En el año 2017 su valor estimado fue de 1 890 millones de dólares y se prevé que alcance los 2840 millones de dólares con una tasa de crecimiento anual del 5.8 % en el año 2024 (Figura 2). Sus principales oportunidades de crecimiento están orientadas a la industria farmacéutica, con aplicaciones como anticoagulante, antiinflamatorios, antialérgicos y reparación del sistema cardiovascular (Allied Market Research, 2018).

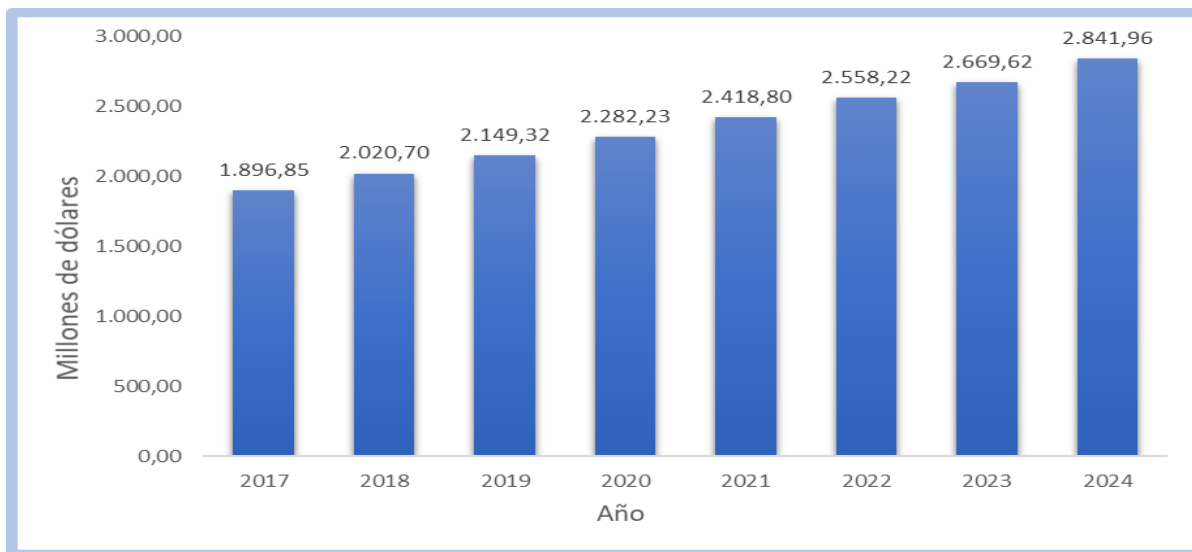


Figura 2. Tasa de crecimiento anual del mercado de las proteasas. Tomado y modificado de Allied Market Research (2018).

Actualmente, este mercado está dominado por las proteasas provenientes de fuentes microbianas (Singh et al., 2016a), esto debido a su rápido crecimiento y los bajos costos de extracción y purificación (Körfer et al., 2015). De igual manera, los microorganismos son cultivados de manera sencilla, presentan alta productividad y se pueden modificar mediante ingeniería genética para aumentar las propiedades catalíticas de sus proteasas (Li et al., 2013)

A pesar de esto, la aplicación de enzimas proteolíticas para uso comercial requiere que estas moléculas mantengan una actividad alta en condiciones no fisiológicas, como rangos amplios de pH y temperatura, altos niveles de detergentes y moléculas quelantes como el calcio. La falta de tales procesos de selección en microorganismos durante el desarrollo evolutivo de las enzimas proteolíticas es culpable de que la gran mayoría de estas moléculas producidas por estos organismos sean inestables o inactivas frente a tales condiciones (Li et al., 2013).

Ante esta problemática, se ha renovado la investigación por parte de la industria biotecnológica y farmacéutica para la búsqueda de otras fuentes de enzimas proteolíticas como las de origen vegetal y animal. De estas, las proteasas vegetales han probado ser más eficientes al mantenerse estables y activas en condiciones no fisiológicas (Troncoso et al., 2022) y a diferencia de las proteasas microbianas, tienden a estar libres de otras actividades secundarias que son indeseadas en la industria debido a su alta especificidad (Johnson y Jiang, 2005).

El número de proteasas de origen vegetal es limitado. Aun así, son el segundo grupo más contribuyente al mercado de las enzimas con un valor de venta previsto para el 2024 en 2 700 millones de dólares y una tasa de crecimiento del 6.4 % (Allied Market Research, 2018). De ellas, las de mayor importancia son la papaína, ficina y especialmente la bromelina, que son aisladas de las especies *C. papaya*, *F. carica* y *A. comosus*, respectivamente (Singh et al., 2016a). Con los avances en la biotecnología vegetal, se prevé la caracterización de nuevas proteasas con mejores propiedades para la industria biotecnológica y farmacéutica (Feijoo-Siota y Villa, 2011).

Las aplicaciones que se les puede atribuir a las enzimas vegetales son muy diversas. Estas incluyen la industria alimenticia, ciencia de alimentos y tecnología, producción de detergentes, industria farmacéutica, áreas de investigación, así como la producción de bebidas, nutrición animal, producción de textiles y tratamiento de cuero, pulpa y papel (Feijoo-Siota y Villa, 2011; Mahajan, et al., 2015). De éstas, la industria de detergentes y la industria alimenticia son las que más contribuyen al mercado de las enzimas (Figura 3).

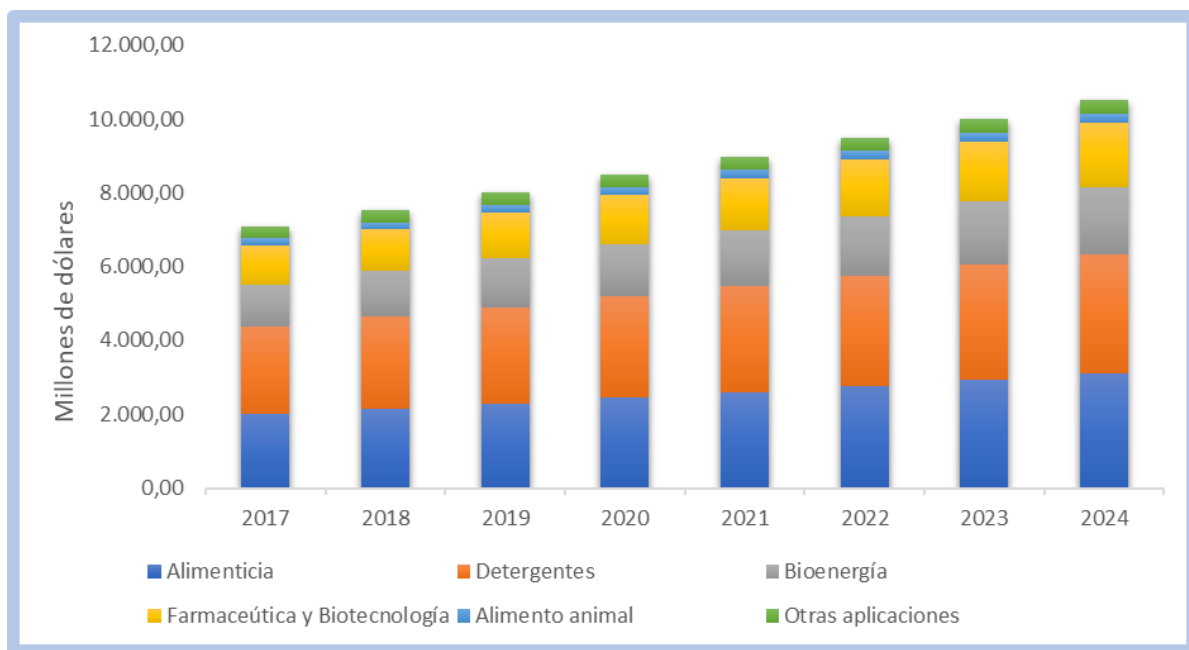


Figura 3. Contribución de las industrias al valor del mercado mundial de las enzimas. Tomado y modificado de Allied Market Research (2018).

2.5 Industria alimenticia

Las proteasas son una parte indispensable en las industrias modernas de alimentos para el consumo humano y animal (Mahajan et al., 2015). Entre algunas de sus funciones se pueden mencionar: mejoramiento de las características nutricionales, disminución de la descomposición, modificación de factores como la solubilidad y coagulación de sustancias, prevención de cambios en el olor y sabor, así como la remoción de moléculas tóxicas presentes en los alimentos (Natalucci et al., 2009).

Para la producción de quesos, estas enzimas son utilizadas como un coagulante natural, al hidrolizar los enlaces peptídicos de la caseína para la formación de macro péptidos que generan la estructura del cuajo (Singh et al., 2016a). De igual manera, las enzimas proteolíticas son importantes en el desarrollo del sabor y textura de las distintas variedades de quesos durante el periodo de maduración (Feijoo-Siota et al., 2014).

En relación con la industria panadera, las proteasas se agregan para hidrolizar el gluten, lo que hace que la masa sea más uniforme, fácil de manejar y a la vez mejora las características de la textura y sabor del pan (Feijoo-Siota y Villa, 2011). Además, la hidrólisis del gluten por parte de estas enzimas minimiza el efecto alergénico que la proteína genera sobre las personas celiacas (Heredia-Sandoval et al., 2016).

Por otra parte, la habilidad de las proteasas para hidrolizar las fibras musculares y tejidos conectivos es utilizada para suavizar carnes (proceso conocido como “tenderización”) (Bekhit et al., 2013), el cual es uno de los principales factores relacionados con la percepción del sabor y la satisfacción del consumidor (Miller et al., 2016). Para este proceso se utiliza la papaína, que degrada las miofibrillas y proteínas del tejido conectivo. También son utilizadas la ficina y la bromelina (Bruno, 2007).

Por último, la capacidad proteolítica es aprovechada para la generación de hidrolizados de proteínas que poseen gran valor nutricional para la producción de suplementos alimenticios, productos para niños en crecimiento, jugos de fruta y alimentos dietéticos (Gupta et al., 2003). Este es uno de los principales factores que llevarán a un crecimiento en los próximos años de esta industria, debido a la necesidad y preferencia de los consumidores por alimentos saludables y con mayor contenido nutricional (Allied Market Research, 2018).

2.6 Industria farmacológica

En la industria terapéutica y farmacológica, las proteasas de origen vegetal son seguras y no poseen efectos secundarios al ser administradas oralmente (Maurer, 2001). La quimopapaína ha sido utilizada para tratar enfermedades como la hernia discal mediante la disolución de sustancias gelatinosas de origen proteico dentro de los discos vertebrales (Simmons et al., 2001), y para el tratamiento de la artritis (Brien et al., 2004). También, estas enzimas son utilizadas para promover la recuperación de heridas, cicatrices y la regeneración del epitelio (Chao et al., 2007; Kulkarni et al., 2019).

La ficina, la papaína y la bromelina son utilizadas como medicamentos para el tratamiento de inflamaciones crónicas, ya que no presentan los efectos secundarios que generan otras moléculas como los glucocorticoides (Maurer, 2001; Vaisar et al., 2007). Esto lo hacen mediante la remoción de moléculas localizadas en la superficie de la célula que afectan la activación y migración de los linfocitos (Hale et al., 2002). Otras acciones farmacológicas atribuidas a las proteasas son el aumento de la absorción de otros medicamentos y la remoción de tejidos necrosados y digestivos (Mahajan et al., 2012; Rosenberg et al., 2014).

Algunas proteasas extraídas de la familia Bromeliaceae poseen actividad antitumoral mediante el efecto directo sobre el tumor a través de la elicitación de anticuerpos que promueven la lisis celular y la citotoxicidad (Serrano et al., 2007). Además, su demostrado efecto anticancerígeno, al inducir la autofagia en células de cáncer de mama, permiten su implementación con terapias modernas para reducir los efectos negativos de la quimioterapia y radioterapia (Bhui et al., 2010; Dhandayuthapani et al., 2012).

Las enzimas proteolíticas también funcionan en el tratamiento de parásitos gastrointestinales tanto en humanos como en animales (Feijoo-Siota y Villa, 2011). Estas tienen la capacidad de degradar la cutícula de los nematodos sin que sean capaces de desarrollar resistencia a lo largo del tiempo (Behnke et al., 2008). Otras proteasas tienen la capacidad de funcionar como agentes antimicrobianos y antifúngicos (Srilakshmi et al., 2014).

2.7 Detergentes e higiene personal

El uso de enzimas para la producción de detergentes y productos de higiene personal constituye el mayor volumen de moléculas vendidas con un fin industrial. Para el año 2017, representó un total del 33.31 % del mercado de enzimas con una proyección de un 30,56 % para el año 2024 (Allied Market Research, 2018). Estas enzimas son utilizadas como un constituyente clave para la formulación de detergentes, ya que mejoran la capacidad de limpieza de soluciones de uso doméstico y soluciones específicas para el lavado de dentaduras y lentes de contacto (Baweja et al., 2016; Grbavčić et al., 2011). Las proteasas tienen la capacidad de digerir manchas producidas por sangre, comida y otras secreciones corporales, son amigables con el ambiente y actúan en periodos más rápidos de agitación y de remojo (Saba et al., 2012).

Las proteasas utilizadas en esta industria deben poseer altas eficiencias en pH alcalinos y mantenerse activas desde temperaturas frías, para el tratamiento de fibras sintéticas, hasta temperaturas calientes, para el tratamiento del algodón. La calidad de una proteasa para ser utilizada en detergentes está dada por parámetros como la capacidad de degradar manchas, estabilidad en presencia de agentes oxidativos, y compatibilidad con otros componentes como surfactantes, perfumes y otras enzimas (Körfer et al., 2015). Además, al utilizar estas enzimas se reemplazan químicos derivados del petróleo que son contaminantes ambientales.

2.8 Industria del cuero

La utilización de enzimas proteolíticas ha mejorado la calidad del procesamiento del cuero debido a su capacidad para degradar constituyentes diferentes al colágeno que se encuentran en la piel y a la eliminación de proteínas no fibrilares (Singh et al., 2016a). Este tipo de aplicación presenta una alternativa frente a los tratamientos clásicos del cuero que normalmente involucran químicos peligrosos y contaminantes que generan problemas ambientales y afectan la vida de los organismos (Choudhary et al., 2004).

El principal tratamiento en el que actúan las proteasas es el proceso de suavizamiento, donde se abren las fibras de colágeno para que estas puedan actuar sobre moléculas como la elastina y otras proteínas indeseadas sin comprometer la estructura del colágeno. De igual manera, las enzimas son utilizadas para la remoción completa de pelos directamente del folículo, las cuales han

mostrado ser más eficientes que los métodos químicos clásicos como el sulfato de sodio, que deja segmentos de pelos degradados que son indeseados por la industria (Foroughi et al., 2006).

2.9 Familia Bromeliaceae

La familia Bromeliaceae abarca un total de 3747 especies y 82 géneros (Gouda et al., 2023; Luther, 2008), los cuales se agrupan en 8 subfamilias: Bromelioideae, Navioideae, Hechtioideae, Tillandsioideae, Brocchinioideae, Lindmanioideae, Pitcarnioideae y Puyoideae (Givnish et al., 2011). Esta familia es uno de los grupos de plantas con flores más variado según morfología, ecología y riqueza de especies (Luther, 2008). Son nativas de los trópicos y subtropicos de América, con solo una especie descrita en el oeste de África (Givnish et al., 2011).

Estas plantas habitan en ecosistemas muy diversos, desde montañas rocosas y frías, hasta bosques lluviosos y desiertos. El rango de altitud varía desde el nivel del mar, hasta los 4700 m. Su distribución comprende países sudamericanos como Brasil (con el mayor número de especies halladas), Chile y Argentina, así como Centroamérica y el Caribe, hasta alcanzar el límite norte en Virginia, en el sudeste de los Estados Unidos (Errasti, 2013).

La mayoría de las especies son epifitas y algunas cuentan con adaptaciones que les permiten vivir una vida terrestre (Luther, 2008). Están compuestas de un arreglo foliar en espiral denominado “roseta”, donde las bases foliares superpuestas funcionan como un reservorio de agua (Errasti, 2013). Las bromelias actúan como un elemento ecológico importante en muchas de las comunidades, al brindar una mayor complejidad al ambiente, lo cual se ve reflejado en un incremento en la riqueza y diversidad de la flora y fauna asociadas (Versieux y Wendt, 2007).

Como parte de la familia Bromeliaceae se encuentra el género *Puya*. Este género comprende alrededor de 228 especies (Gouda et al., 2023) distribuidas desde Costa Rica hasta Chile y Argentina, por lo que su presencia es exclusiva de la zona neotropical, siendo Perú el país con más diversidad con 73 especies (Romero y Grau, 2009; Zizka et al., 2013). Son plantas terrestres que se caracterizan por su gran variación morfológica, principalmente en el tamaño de sus inflorescencias, tamaño de las plantas y patrones de ramificación. Su especie más representativa es *Puya raimondii*, la cual alcanza tamaños aproximados de 12 m de altura (Hornung-Leoni y Sosa, 2008).

2.10 Familia Bromeliaceae en Costa Rica

Costa Rica es considerado uno de los sitios de mayor diversidad vegetal en el Neotrópico (Myers et al., 2010). Las bromeliáceas son una de las familias con mayor diversidad de especies presentes en el país y contribuye a la diversidad general en las zonas boscosas (Cáceres-González et al., 2013).

En el país se encuentran 198 especies y 18 géneros de esta familia, lo que constituye el 2.4 % de angiospermas del país (Cáceres-González et al., 2013). De las más de 3700 especies, el 5.6 % de ellas está presente en el país, lo que convierte a Costa Rica en la zona más diversa de América Central (Luther, 2008).

Costa Rica posee 32 especies endémicas y 36 especies que comparten una distribución geográfica única con Panamá. Estas especies se distribuyen en las siguientes subfamilias: 27 especies en la subfamilia Tillandsioideae, cuatro especies de la subfamilia Pitcairnioideae y una especie de la familia Puyoideae (Cáceres-González et al., 2013).

2.11 *Puya dasylirioides*

Dentro de la subfamilia Puyoideae, se encuentra la especie *Puya dasylirioides*, la cual pertenece a un género de bromelias terrestres que se encuentran en las regiones montañas de Costa Rica, Argentina y Chile (Augspurger, 1985). El género se encuentra comúnmente en los páramos de los Andes, pero *P. dasylirioides* sobresale al ser una de las dos especies del género *Puya* que habita fuera de la cordillera de los Andes y ha sido registrada únicamente en Costa Rica (Cáceres-González et al., 2013; Smith y Downs, 1974)

La planta tiene forma de roseta con una estructura final de 13 radios de hojas que alcanzan un diámetro de entre 30 a 40 cm. Sus hojas son rígidas, gruesas, armadas con espinas y están recubiertas de una cutícula cerosa. Después de completar su etapa de crecimiento y reproducción vegetativa, el meristemo distal se convierte en un meristemo reproductivo. Previo a la floración, este meristemo se eleva hasta un metro por encima de las hojas y produce una inflorescencia de entre 20 a 30 cm conformada por varias flores azules que conforman una bráctea (Augspurger, 1985).

En Costa Rica ha sido reportada en las zonas cercanas al Cerro de la Muerte (Gouda et al., 2023) a 52 km SE de Cartago y 25 km NO de Villa Mills (9° 38'N, 83° 67'W; 3 km S-SE de “Salsipuedes”) a elevaciones sub-alpinas de 2100 a 3000 msnm (Smith y Downs, 1974). En días soleados de la época seca enfrenta temperaturas máximas de 31 °C y por la noche las temperaturas descienden por debajo del punto de congelación del agua (Augspurger, 1985).

2.12 Enzimas proteolíticas en la familia Bromeliaceae

Las especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae se caracterizan por poseer enzimas proteolíticas en cantidades superiores a las fisiológicamente necesarias (Errasti, 2013), lo cual contrasta con la tendencia general de otras especies vegetales en las que la concentración de estas enzimas normalmente es baja y difícil de detectar. Estas moléculas son conocidas como proteasas secundarias o proteasas indispensables y se cree que su función está relacionada con defensa contra patógenos o la interacción con otras especies vegetales y animales (Bruno, 2007).

Las proteasas de las bromelias tienen un atractivo potencial debido a los múltiples usos biotecnológicos (Natalucci et al., 2009). Sin embargo, pese a la diversidad de especies de esta familia, pocas se han estudiado, principalmente por la inaccesibilidad de sus especies (Bruno, 2007).

Ananas comosus corresponde a la especie más estudiada, de la cual se obtiene la bromelina. En un principio, se encontró esta enzima proteolítica en el tallo y las hojas de la piña, pero luego se detectó su presencia en otras especies de bromelias (Maurer, 2001). La enzima purificada es una cisteíno-proteasa ácida, perteneciente a la misma familia que la papaína, extraída de la papaya, y corresponde a una glicoproteína que hidroliza enlaces peptídicos conformados por un residuo amino terminal de valina y un carboxilo terminal de glicina (del Pezo, 2018).

Posterior al descubrimiento de la bromelina, se estudiaron otras especies pertenecientes a la subfamilia Bromelioideae (cuadro 3), por lo que esta familia constituye una fuente promisoría de enzimas proteolíticas que aún no han sido descubiertas.

Cuadro 3. Enzimas proteolíticas aisladas de plantas pertenecientes a la familia Bromeliaceae.

Especie	Enzima	Referencia
Hemisfericina	<i>Bromelia hemispherica</i>	Ochoa et al. (1987)
Pinguinina	<i>Bromelia pinguin</i>	Payrol et al. (2005)
Karatasina	<i>Bromelia plumieri</i>	Montes et al. (1990)
Macrodontáinas I y II	<i>Pseudananas macrodotes</i>	López et al. (2000), Natalucci et al. (1996)
Balansaína I	<i>Bromelia balansae</i>	Pardo et al. (2000)
Hieronymaina I y II y III	<i>Bromelia hieronymi</i>	Bruno et al. (2008)
Fastuosáina	<i>Bromelia fastuosa</i>	Cabral et al. (2005).
Pendulifloraina I	<i>Hohenbergia penduliflora</i>	Pérez et al. (2010)
Antiacanthaina A	<i>Bromelia antiancantha</i>	Vallés y Cantera (2018)

2.13 Técnicas de cultivo *in vitro*

La gran mayoría de plantas utilizadas para la producción de proteasas *in vivo* provienen de áreas de cultivo remotas en zonas tropicales o subtropicales, expuestas a cambios en el uso del suelo, enfermedades e inestabilidad política (González-Rábade et al., 2011). El requerimiento de grandes áreas de cultivo y el crecimiento lento de las plantas en dependencia de las condiciones climáticas dificulta el proceso para la producción rápida y a gran escala de proteasas de origen vegetal (Rani et al., 2012).

La concentración de enzimas proteolíticas en los tejidos de la planta está ligada a las condiciones climáticas del organismo, por lo que su producción tiende a ser errática (Singh et al., 2016a). Además, los periodos largos entre cosecha y la dificultad para seleccionar plantas élite en la producción de proteasas hace que por lo general estos productos tiendan a ser más caros que los de origen microbiano (González-Rábade et al., 2011).

El uso de técnicas de cultivo *in vitro* permite que las plantas estén aisladas del efecto que pueden ejercer las variables climatológicas o geográficas y su crecimiento es independiente de factores económicos y técnicos relacionados con el cultivo de los terrenos y enfermedades

(Fernández y Pomilio, 2003). Esto permite aumentar los rendimientos, homogenizar la producción, competir con las proteasas de origen microbiano que se encuentran en el mercado y mejorar la viabilidad de comercialización a escala industrial (González-Rábade et al., 2011).

Las técnicas *in vitro* son definidas como un cultivo de órganos, células o tejidos de manera aséptica bajo condiciones físicas y químicas controladas. Tales técnicas se aplican para el estudio del metabolismo, multiplicación de plantas, embriogénesis, citología, modificación genética de plantas, generación de organismos libres de patógenos, conservación del germoplasma y la producción de metabolitos con interés farmacológico e industrial (Thorpe, 2012).

Las especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae se destacan por poseer en la región basal de sus hojas, zonas con elementos vasculares con capacidad de re-diferenciación en presencia de ciertos reguladores de crecimiento. Sumado a esto, su alta capacidad regenerativa se asocia con la presencia de meristemas axilares presentes en la región basal de sus hojas (Guerra y Dal Vesco, 2010).

Durante la fase preparativa para el desarrollo de un protocolo de establecimiento *in vitro*, parte de los primeros pasos es la escogencia del explante. Para las bromelias se han utilizado diversos tejidos iniciales detallados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Explantes iniciales utilizados para el establecimiento *in vitro* de plantas pertenecientes a la familia Bromeliaceae.

Tejido	Referencia
Segmentos florales	Simão et al. (2016)
Meristemo caulinar	Simão et al. (2016)
Segmentos de hoja	Carneiro et al. (1998), Faria et al. (2018), Simão et al. (2016)
Semillas	Arrigoni-Blank et al. (2013), Castro et al. (2018), Da Silva et al. (2012), Da Silva et al. (2009), De Oliveira Paiva et al. (2009), Escalona et al. (2013), Pérez (2012), Pompelli y Guerra (2005), Resende et al. (2016), Rodrigues-Martins et al. (2014), Toledo-Aceves y Wolf (2008)
Yemas axilares	Arrabal et al. (2002), Barboza et al. (2004), Pereira et al. (2008), Saucedo et al. (2008)

Como se observa en el cuadro 4, las semillas han sido el explante más utilizado para el establecimiento *in vitro* de plantas de la familia Bromeliaceae. Estas corresponden a los explantes con mayor potencial de regeneración debido a su estado juvenil fisiológico y ontogenético (tejido embrionario). En términos generales, el uso de semillas mejora la respuesta *in vitro* en comparación con otros tipos de explante, son fáciles de desinfectar, poseen elevados niveles de germinación, representan una alternativa rápida para la propagación de estas especies y tienen la posibilidad de mantener la variabilidad genética de una población natural (Pérez, 2012).

Un protocolo clásico para la desinfección de semillas corresponde a lavados con etanol 70 % (v:v) durante 2-5 minutos, seguido por lavados con hipoclorito de sodio (NaClO, 1.5-5 %, v:v) durante 20-30 minutos. Esto ha permitido obtener porcentajes de germinación de entre el 92 y 100 % al ser sembradas en medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100 % de sales, ya sea en ausencia o presencia de reguladores de crecimiento (Guerra y Dal Vesco, 2010; Pérez, 2012).

Otro de los pasos fundamentales de la micropropagación es la multiplicación o propagación *in vitro* para aumentar la brotación en los explantes. Esta fase se caracteriza por la determinación del ambiente de crecimiento (tipo de recipiente de cultivo), el estado del medio de cultivo (semisólido o líquido) y el uso de reguladores de crecimiento específicos. En especial, los reguladores de crecimiento interactúan con las fitohormonas endógenas de la planta para controlar el crecimiento y la morfogénesis (George et al., 2008).

Diversos reguladores de crecimiento han sido utilizados para la inducción de organogénesis en bromelias, entre los que destacan las citoquininas 6-n-bencil aminopurina (BAP), 6-furfuril aminopurina (kinetina), N-phenyl-N'-(1,2,3-thidiazol-5-yl)urea (TDZ), la auxinas ácido naftalenacético (ANA) y Picloram (Guerra y Dal Vesco, 2010). De las posibles combinaciones de reguladores de crecimiento, los mejores resultados se obtuvieron con la combinación de BAP (concentraciones de 4,4-8,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y ANA (concentraciones de 1,61-10,74 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (Pérez, 2012).

El establecimiento y la generación de biomasa mediante la propagación vegetal *in vitro* son indispensables para una posterior implementación de sistemas de producción de enzimas proteolíticas vegetales. El desarrollo de patentes específicas para especies con capacidad de producción de moléculas con potencial industrial o biotecnológico es un reto y se debería considerar una prioridad institucional.

2.14 Extracción de enzimas proteolíticas

Para la extracción de proteasas a partir de órganos con alto contenido de estas moléculas, se requiere de un proceso inicial de molienda o estrujamiento para obtener el líquido que contiene las enzimas. El método o equipo utilizado depende de la forma y estructura del tejido, pero, según el material, han sido utilizados equipos tales como: despulpadoras, prensas de tornillo, extractores con rodillo giratorio y licuadoras (Briones et al., 2009). Las condiciones de extracción tienen que ser sumamente controladas para evitar posibles inactivaciones debido a: oxigenación excesiva, altos niveles de tensión superficial, interacción con metales, generación excesiva de fuerzas de corte, formación de espuma y presencia de inhibidores (Briones et al., 2009). Además, debido a la capacidad catalítica de las proteasas de romper los enlaces peptídicos, es indispensable evitar la auto proteólisis durante la extracción.

En el año 1997, Hernández y colaboradores diseñaron una metodología patentada en la que se emplean protectores del centro activo de las enzimas a un pH cercano al fisiológico de la planta, pero alejado del óptimo, esto con la finalidad de evitar la auto proteólisis. Gracias a esta metodología, en el año 2003, Hernández y colaboradores lograron escalar la producción de bromelina a partir de tallos de piña con rendimientos de hasta 4.85 mg de proteínas por mL de extracto crudo. Esta metodología, además de su gran importancia para la producción industrial, permite la realización de extractos crudos o parcialmente purificados (mediante técnicas cromatográficas) de otras especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae, con el fin de determinar la estructura de nuevas moléculas, su actividad enzimática y su potencial industrial o biotecnológico.

Posterior a la extracción de las enzimas proteolíticas, es necesario realizar pasos de purificación (parcial o completa) para continuar con el proceso de caracterización de las moléculas. Al no existir metodologías únicas, la purificación se realiza mediante distintas técnicas, entre las que destacan: cromatografías, ultrafiltración, precipitación y técnicas electroforéticas como zimogramas y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (Safarik y Safarikova, 2004).

Una vez que se tienen los extractos parcialmente purificados, se intenta realizar la identificación de la proteína de interés mediante su masa molecular y secuencia de aminoácidos (Pérez, 2012). El método más sensible y seguro para obtener la masa molecular de una proteína es la espectrometría de masas, debido al uso de la técnica de ionización conocida como desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) (Obregon et al., 2009). Al obtener la estructura primaria de la proteína de interés, se procede a establecer el grado de similitud de la proteína aislada mediante la comparación en las bases de datos de secuencias de aminoácidos y nucleótidos de enzimas similares (Pérez, 2012). El uso correcto de estas herramientas permite determinar si la proteína aislada corresponde a una nueva molécula no descrita para la literatura.

2.15 Efecto del pH y temperatura en la actividad y estabilidad de las enzimas proteolíticas.

Para identificar los factores que afectan la cinética enzimática es necesario realizar ensayos variando factores tales como: pH, concentración de enzima, concentración de ligandos, temperatura y fuerza iónica (Pérez, 2012). En especial, el pH y la temperatura son dos factores que

definen qué tan adecuada es una molécula proteolítica para su uso en la industria. En particular, las proteasas a utilizar deben poseer altas eficiencias en pH alcalinos y mantenerse activas a temperaturas frías y calientes para el tratamiento de fibras sintéticas y algodón, respectivamente (Körfer et al., 2015).

Por lo general, la actividad de una enzima varía en dependencia del pH en el que se encuentra, lo que tiene relación con el compartimiento en el que estén localizadas y cómo son afectadas por inhibidores o activadores endógenos (Van Der Hoorn y Jones, 2004). Debido a que las plantas de la familia Bromeliaceae producen enzimas proteolíticas en cantidad elevadas y generalmente están relacionadas a defensa contra patógenos, tales moléculas presentan una elevada estabilidad frente a variaciones en pH y temperatura, amplia especificidad de sustrato y la ausencia de una tendencia autolítica (Bruno, 2007), características que son deseadas para su uso en la industria.

El pH tiene efectos diversos sobre la velocidad de reacción y actividad enzimática de una proteasa. El realizar estudios sobre el efecto del pH permite elucidar información sobre el modo de acción de la enzima y los grupos que conforman su centro activo (Pérez, 2012). Los resultados de diversas investigaciones relacionadas con la estimación del pH óptimo de proteasas aisladas de bromelias, mostraron rangos que variaron desde 4.0 a 9.4 (Bruno et al., 2008; Grzonka et al., 2001; Maras et al., 2018; Meza-Espinoza et al., 2018; Moreno-Henández et al., 2017; Pardo et al., 2000; Pérez et al., 2010; Vairo-Cavalli et al., 2005; Vallés y Cantera, 2018).

En el caso de la temperatura, un incremento en sus valores suele relacionarse con un aumento en la velocidad de las reacciones enzimáticas; sin embargo, valores muy elevados pueden afectar la estabilidad estructural de la enzima. La pérdida de la actividad catalítica depende de su capacidad de mantener su estructura tridimensional dada por enlaces no covalentes débiles (Pérez, 2012). En el caso de enzimas aisladas de especies de la familia Bromeliaceae, se ha determinado que tienen la capacidad de mantener gran actividad en rangos de temperatura que abarcan desde los 25 a 70 °C (Meza-Espinoza et al., 2018; Moreno-Henández et al., 2017; Pardo et al., 2000; Pérez et al., 2010; Vallés y Cantera, 2018).

3. Marco Metodológico

3.1 Áreas de estudio:

El material vegetal fue recolectado en una zona localizada en la Cordillera de Talamanca, dentro del Parque Nacional Tapantí-Macizo de la Muerte (coordenadas geográficas aproximadas 9°39'36.19'' N y 83°50'57.64'' W). Corresponde a un ecosistema húmedo de tipo turbera ubicado en el margen izquierdo de la carretera Interamericana, km 69 del distrito de Copey de Dota, San José. En el área predominan especies de musgos del género *Sphagnum*. La topografía de la zona es plana con una altura promedio de 2718 m.s.n.m.

La parte experimental del proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad Nacional de Costa Rica (<https://www.biologia.una.ac.cr/index.php/laboratorios/lab-biotecnologia-plantas>). Este laboratorio ha estado involucrado en la implementación de cultivo de tejidos vegetales y la caracterización molecular de plantas mediante códigos de barras genéticos. El grupo ha generado contribuciones al análisis de la diversidad del género *Vanilla* en Costa Rica, mediante marcadores moleculares y secuenciación de ADN, estableciendo colaboraciones tanto a nivel nacional como internacional.

3.2 Organismo experimental:

Puya dasylirioides (Figura 4) es una especie monocotiledónea perteneciente a la familia Bromeliaceae, orden Bromeliales, clase Liliopsida y división Magnoliophyta. Constituye una especie que conforma poblaciones densas en turberas y sabanas de la Cordillera de Talamanca a una altitud entre los 2600 y 3005 msnm.



Figura 4. Planta joven de *Puya dasylirioides*.

3.3 Muestreos:

Se realizaron dos muestreos en la turbera localizada en las coordenadas 9°39'36.19'' N y 83°50'57.64'' W en los meses de julio (durante la floración) y noviembre (posterior a la floración) del año 2021. En cada uno de los muestreos se recolectó una planta elegida al azar de entre 40 y 45 cm de diámetro. Las plantas completas se extrajeron con una pala y se colocaron en bolsas de plástico debidamente rotuladas para su transporte. En el laboratorio, las muestras se mantuvieron en condiciones ambientales hasta los experimentos de establecimiento *in vitro* y extracción enzimática.

Durante el muestreo de julio se recolectaron aproximadamente 20 cápsulas de semilla de una inflorescencia madura escogida al azar. Estas semillas fueron trasladadas en bolsas de polietileno al área de trabajo para los posteriores experimentos de germinación.

Cabe resaltar que el acceso a la zona de muestreo y la colecta del material vegetal se realizó mediante el amparo de la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) mediante el permiso otorgado en el expediente CM-UNA-007-2021.

3.4 Determinación de un protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de plantas de *Puya dasylirioides*:

Con la finalidad de determinar el protocolo de desinfección más favorable para el establecimiento *in vitro* de *P. dasylirioides*, se realizó un experimento donde se evaluó el efecto de la exposición de explantes a distintas concentraciones de NaClO y distintos periodos de tiempo. Los explantes utilizados fueron semillas (Figura 5), segmentos distales y basales de la hoja, los cuales fueron obtenidos durante el muestreo en el mes de julio.



Figura 5. Semilla con cubierta alada de *Puya dasylirioides*.

En el laboratorio, el proceso de desinfección para los tres explantes fue el siguiente: enjuagues con agua de tubo durante 20 minutos seguido de lavados con agua y 20 ml de jabón líquido antibacterial (Protex ®) + Tween 20 durante 15 minutos en agitación. Luego, los explantes se colocaron en una solución de etanol 70 % (v:v) durante 30 segundos y se procedió con la aplicación del correspondiente proceso de desinfección con NaClO según el tratamiento asignado.

Finalmente, se realizó un lavado con una mezcla de fungicidas Microthiol® (Cerexagri, Mourenx, Francia) y Agrimicina® (Pfizer, Toluca, México) a una concentración de 1 mg/L durante 10 minutos. El excedente de NaClO y la solución fungicida se eliminó con cinco y tres lavados con agua destilada estéril por un minuto, respectivamente. Del proceso de desinfección, solo se varió la concentración de NaClO y el tiempo de exposición, lo cual dio origen a los tratamientos descritos en el cuadro 5.

Cuadro 5. Tratamientos de desinfección para el establecimiento de semillas y segmentos de hoja de *Puya dasyliroides*.

Tratamiento	Semillas		Segmentos de hoja distal		Segmento de hoja basal	
	NaClO (%)	Tiempo de exposición (s)	NaClO (%)	Tiempo de exposición (s)	NaClO (%)	Tiempo de exposición (s)
1	0	30	0	30	0	30
2	0	60	0	60	0	60
3	1	30	1	30	1	30
4	1	60	1	60	1	60
5	2.5	30	2.5	30	2.5	30
6	2.5	60	2.5	60	2.5	60
7	5	30	5	30	5	30
8	5	60	5	60	5	60
9	10	30	10	30	10	30
10	10	60	10	60	10	60
11	20	30	20	30	20	30
12	20	60	20	60	20	60

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento para las semillas y ambos segmentos de hoja. Para los segmentos de hoja de la parte distal y basal (Figura 6) se utilizó un tamaño aproximado de 1 cm².

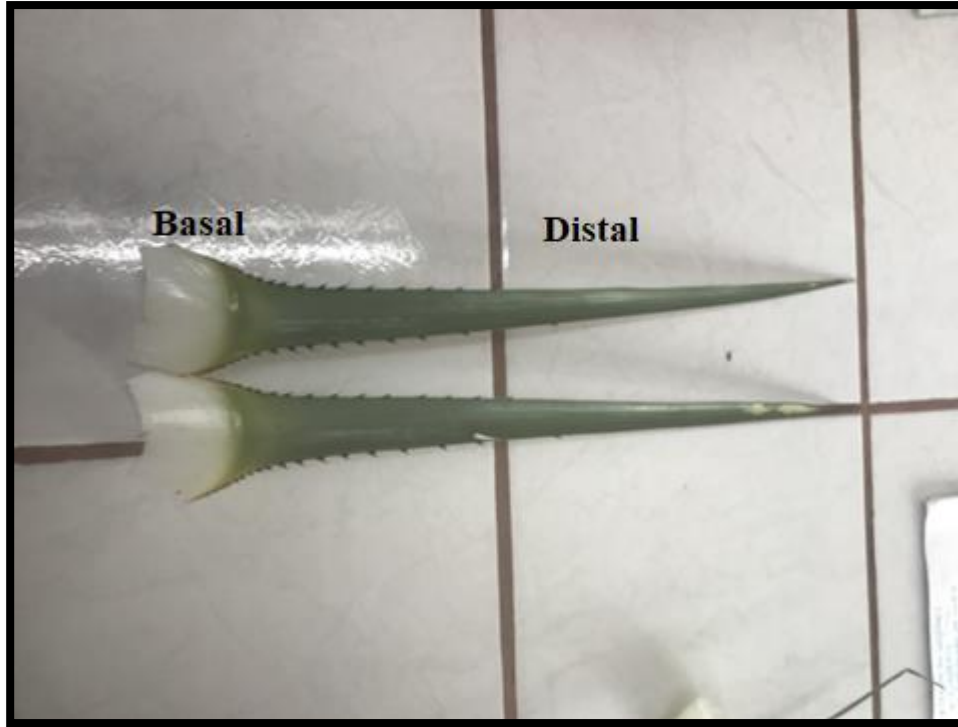


Figura 6. Hoja de *Puya dasylirioides* dividida en zona basal y zona distal.

Cada uno de los explantes se sembró en tubos de cultivo de 15 cm de altura, 2.5 cm de diámetro y 73.6 mL de volumen, los cuales contenían 10 mL de medio MS al 100 % de sales complementado con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar y un pH de 5.8. El medio fue esterilizado con una autoclave marca YTM modelo C3 a una presión de 1.03 kg/cm² y temperatura de 121°C durante 25 minutos. Para facilitar la identificación del tipo de explante se utilizó colorante comestible marca Vainol.

Los cultivos fueron colocados en una incubadora marca Jeiotech modelo GC-1000TLH con condiciones controladas de temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz a 6000 lux equivalentes a 146.34 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PPFD (densidad de flujo de fotones fotosintéticos). Posteriormente, a las dos semanas se evaluó la presencia/ausencia de contaminación total, contaminación fúngica y contaminación bacteriana. El análisis estadístico se realizó mediante una regresión logística debido a que las variables a evaluar fueron de tipo binomial. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Minitab 19 Statistical Software.

3.5 Tipo de recipiente y concentración de BAP para el establecimiento *in vitro* de explantes de *Puya dasylirioides*

Con el fin de determinar el mejor recipiente y la concentración de reguladores de crecimiento más adecuados para el desarrollo de material aséptico *in vitro*, se evaluó la exposición de explantes a distintas concentraciones de BAP (6-bencilaminopurina) y a dos ambientes de crecimiento (tipo de recipiente). Los explantes utilizados fueron segmentos de hojas de la parte distal, segmentos de hoja de la parte basal y semillas que se obtuvieron en el muestreo de julio. Los tratamientos a los que fueron expuestos los explantes se detallan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Tratamientos para el establecimiento de semillas y segmentos de hoja de *Puya dasylirioides*.

Tratamiento	Segmento de hoja basal		Segmento de hoja distal		Semillas	
	BAP (mg/L)	Recipiente de cultivo	BAP (mg/L)	Recipiente de cultivo	BAP (mg/L)	Recipiente de cultivo
1	0	Gerber	0	Gerber	0	Gerber
2	0	Tubo	0	Tubo	0	Tubo
3	0.25	Gerber	0.25	Gerber	0.25	Gerber
4	0.25	Tubo	0.25	Tubo	0.25	Tubo
5	0.5	Gerber	0.5	Gerber	0.5	Gerber
6	0.5	Tubo	0.5	Tubo	0.5	Tubo
7	1	Gerber	1	Gerber	1	Gerber
8	1	Tubo	1	Tubo	1	Tubo
9	2	Gerber	2	Gerber	2	Gerber
10	2	Tubo	2	Tubo	2	Tubo
11	4	Gerber	4	Gerber	4	Gerber
12	4	Tubo	4	Tubo	4	Tubo

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento para los explantes semilla y ambos segmentos de las hojas. Independientemente del tratamiento, los cultivos se sembraron en 10 ml de medio dentro de frascos tipo Gerber de 7 cm de diámetro y volumen de 60 mL o tubos de cultivo de 15 cm de altura, 2.5 cm de diámetro y 73.63 ml de volumen. Se les aplicó el proceso de desinfección que brindó mejores resultados en el experimento previamente detallado en la sección 3.4. El medio utilizado fue el MS al 100 % de

sales complementado con 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar. El pH de las soluciones de los medios se ajustó a 5.8 antes de su esterilización en una autoclave marca YTM modelo C3 a una presión de 1.03 kg/cm² y una temperatura de 121°C durante 25 minutos. Para facilitar la identificación del tipo de explante se utilizó colorante comestible marca Vainol. Los cultivos fueron colocados en una incubadora marca Jeiotech modelo GC-1000TLH con condiciones controladas de temperatura de 25 °C y un fotoperiodo de 16 horas luz a 6000 lux equivalentes a 146.34 μmol/m²/s PPFD.

A los dos meses se evaluó el porcentaje de germinación. Para los explantes de las hojas, se evaluaron las variables número de brotes y raíces, y el estado general del brote (vivo o muerto).

El análisis estadístico para las variables número de brotes y raíces, longitud de brotes y raíces se realizó mediante la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y pruebas post-hoc para identificar diferencias entre grupos utilizando el programa R Studio versión 1.3.1093. Se tomó en consideración los valores de normalidad, homocedasticidad y balance de los datos para decidir el análisis a aplicar.

3.6 Ensayo de Plackett-Burman para la detección de factores influyentes en el crecimiento, multiplicación y estado de explantes de *Puya dasyliroides*.

Los diseños de Plackett-Burman son una metodología utilizada en primeras fases de experimentación para identificar los factores que tienen mayor influencia sobre variables previamente definidas. En este experimento se buscó determinar si algunas variables como la agitación, volumen de medio, porcentaje de sales en el medio MS (%) y diversos reguladores de crecimiento generaban un impacto positivo en el crecimiento y multiplicación de explantes *in vitro*. Los factores utilizados y sus respectivos niveles se detallan en el cuadro 7.

Cuadro 7. Diseño del experimento Plackett-Burman con los diferentes reguladores de crecimientos y demás factores que fueron aplicados a explantes en crecimiento de *Puya dasyliroides* en condiciones *in vitro*. Placa compuesta de 8 factores y 12 corridas.

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	Kinetina (mg/L)	2iP (mg/L)	Metatopolina (mg/L)	Volumen de medio (mL)	% Medio MS	Agitación (rpm)
1	0	1	0	0	5	50	60
1	1	0	1	0	5	100	60
0	1	1	0	1	5	100	0
1	0	1	1	0	10	100	0
1	1	0	1	1	5	50	0
1	1	1	0	1	10	100	60
0	1	1	1	0	10	50	0
0	0	1	1	1	5	50	60
0	0	0	1	1	10	100	60
1	0	0	0	1	10	50	0
0	1	0	0	0	10	50	60
0	0	0	0	0	5	100	0

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Como explante se utilizaron plantúlas *in vitro* de un 1 cm de longitud, los cuales se pesaron antes de ser sembradas en el medio. Los cultivos se inocularon en medio MS líquido contenido en frascos tipo Gerber de 7 cm de diámetro y volumen de 60 mL según el tratamiento. El medio utilizado fue el MS al porcentaje de sales correspondiente según el tratamiento, suplementado con 30 g/L de sacarosa. Previo a la esterilización, el pH se ajustó a 5.8. Las condiciones de esterilización y crecimiento fueron las mismas que las indicadas en la sección 3.5. Para la agitación de los cultivos se utilizó un agitador marca Scientific Industries modelo Genie-Temp-Shaker300.

A los dos meses, se evaluó el número de raíces, número de brotes, peso fresco, longitud total, contaminación total y estado general de la planta. El análisis estadístico se realizó con el programa Minitab 19 Statistical Software (2019) mediante un análisis factorial.

3.7 Ensayo de multiplicación de plantas establecidas *in vitro* de *Puya dasylirioides* utilizando diversos reguladores de crecimiento en medio semisólido.

Con el objetivo de establecer un procedimiento de multiplicación de las plantas establecidas *in vitro*, se realizó un experimento para identificar el efecto de diversos reguladores de crecimiento en la tasa de multiplicación, crecimiento y supervivencia de plantas con cortes longitudinales. Los tratamientos utilizados se detallan en el cuadro 8.

Cuadro 8. Diseño del experimento para la multiplicación *in vitro* de explantes de *Puya dasylirioides* mediante la exposición a diversas concentraciones de reguladores de crecimiento.

Tratamiento	BAP (mg/L)	Kinetina (mg/L)	2iP (mg/L)	Metatopolina (mg/L)
1	0	0	0	0
2	0.5	0	0	0
3	1	0	0	0
4	2	0	0	0
5	0	0.5	0	0
6	0	1	0	0
7	0	2	0	0
8	0	0	0.5	0
9	0	0	1	0
10	0	0	2	0
11	0	0	0	0.5
12	0	0	0	1
13	0	0	0	2

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con ocho repeticiones por tratamiento. Los explantes utilizados fueron segmentos de tallo de plantas previamente establecidas *in vitro* a las cuales se les hizo cortes longitudinales desde la zona distal hasta la zona basal (Figura 7). Los explantes de aproximadamente 1.5 cm se pesaron en una balanza electrónica marca AND modelo EJ-610. Los cultivos se sembraron en 30 mL de medio MS al 100 % de sales contenido en frascos tipo Gerber de 7 cm de diámetro y volumen de 60 mL y complementado con 30 g/L de

sacarosa, 1.9 g/L de phytigel y los respectivos reguladores de crecimiento (Cuadro 8). El pH de la solución se ajustó a 5.8 antes de su esterilización. Las condiciones de esterilización y crecimiento de las vitroplantas fueron las mismas que las indicadas en la sección 3.5.



Figura 7. Explante de *Puya dasylirioides* con corte vertical.

Cada mes durante un periodo de cuatro meses, se evaluó el porcentaje de supervivencia, el número de raíces y brotes, la longitud total, el peso fresco y estado general de la planta. El análisis estadístico se realizó mediante el uso de una ANOVA de una vía y pruebas post-hoc para identificar diferencias entre grupos utilizando el programa R Studio versión 1.3.1093. Se tomó en consideración los valores de normalidad, homocedasticidad y balance de los datos para decidir el análisis a aplicar.

3.8 Extracción y cuantificación de proteasas y proteínas totales de tejidos de plantas silvestres de *Puya dasyliroides*

La extracción de las proteasas se realizó siguiendo la metodología patentada por Hernández y colaboradores (2003). Para esto, se utilizó un buffer que protege los grupos tiol (átomo de azufre y átomo de hidrógeno) del centro activo de las enzimas y un pH ácido para minimizar la proteólisis, (anexo 3).

Con el fin de determinar la parte de la planta con la mayor concentración y actividad proteolítica, la extracción de proteasas de plantas silvestres se realizó con tejidos de hoja (parte basal y distal de la hoja) y tallo. El material vegetal fue recolectado en julio y noviembre del 2021. Los materiales recolectados se mezclaron para evitar diferencias en los resultados en base a la estación del año.

La extracción de proteasas se realizó por triplicado en cada uno de los tejidos, y el líquido obtenido fue almacenado en tubos Falcon de 50 mL en un congelador a -80 °C marca Thermo Scientific modelo EM 4980 hasta su posterior uso. Estos extractos fueron llamados extractos crudos. La cuantificación de la proteína se realizó mediante el método de Lowry y colaboradores (1951) en microplacas de 96 pozos. Pasados 30 minutos de la reacción, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro marca Thermo Varioskan Lux VLBL00D0 a una longitud de onda de 595 nm. Para la cuantificación se utilizó una curva patrón de albumina de suero bovino 1 mg/mL en un rango de concentraciones de 0 a 0.5 mg/mL (rango lineal en microplaca). Todas las muestras incluida la curva patrón se leyeron por duplicado.

3.9 Purificación parcial y concentración de proteínas de los extractos crudos de *Puya dasyliroides* con etanol.

Para la purificación parcial de las proteínas se realizó un fraccionamiento de los extractos crudos utilizando etanol frío. Este proceso se les realizó a los tres tipos de muestras vegetales (parte basal y distal de la hoja y tallo). Inicialmente, las tres repeticiones generadas en la sección 3.8 se mezclaron en un mismo tubo Falcon de 50 ml. En un nuevo tubo Falcon de 50 ml, se depositaron 10 ml del extracto crudo, a los cuales se les añadió lentamente un volumen de etanol 95 % (v:v)

frío (-20°C) en una relación 1:1. La solución se dejó reposar por 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 6962 g durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga marca Thermo Scientific ST8R.

El sobrenadante se recuperó y el proceso se repitió tres veces más hasta obtener cuatro fracciones. El precipitado (preparado proteolítico parcialmente purificado) obtenido en cada fracción fue resuspendido en 2 mL de agua destilada para su concentración. Este proceso se realizó por triplicado para cada tejido. Después, las tres repeticiones por tejido se mezclaron para usarse después como muestra compuesta. La concentración de proteínas se cuantificó en cada una de las mezclas utilizando la misma metodología de la sección 3.8.

3.10 Determinación de la actividad enzimática de los extractos crudos y parcialmente purificados de *Puya dasylirioides*.

Para determinar si existen diferencias entre la actividad enzimática de los tejidos de la planta silvestre se realizó una determinación mediante el método utilizado por Natalucci et al. (1996) y después por Pardo et al. (2000) con modificaciones. Inicialmente, en tubos de microcentrífuga de 2 mL se incubó 0.5 mL de caseína (Thermo Scientific Applied Biosystems) al 1 % (m/v) en una solución tamponada de fosfatos (pH 7.0) durante 10 minutos en un bloque seco marca Torrey Pines Scientific Inc a 37 °C. Para llevar a cabo la reacción, se adicionó 0.1 mL del extracto crudo o fracción parcialmente purificada y toda la mezcla se dejó reposando 30 minutos en el bloque seco a la misma temperatura. Para detener completamente la reacción se adicionaron 1.4 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % y se dejó reposar en frío durante 20 minutos. Los tubos con las muestras se centrifugaron 15 minutos en una microcentrífuga marca Thermo Scientific ST8R a 7000 g. Del sobrenadante se tomó 1 mL y se colocó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. El control negativo o blanco se preparó fuera del bloque seco en el siguiente orden: 0.5 mL de caseína al 1 % (m/v) en tampón de buffer de fosfatos pH 7.0, 1.4 mL TCA y 0.1 mL de enzima. De los tubos se tomaron 0.3 mL, se cargaron en una microplaca de 96 pozos por triplicado y se realizó una lectura a 280 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Varioskan Lux VLBL00D0 en placas de cuarzo. Se definió una unidad arbitraria llamada unidad de actividad caseinolítica específica (Ucas/mg) la cual corresponde a la cantidad de proteína que produce un incremento de una unidad de absorbancia respecto al blanco en las condiciones del ensayo (Natalucci et al., 1996; Moreno-Hernández et al., 2017). Cabe destacar que para verificar que los

ensayos enzimáticos se realizaron de una manera adecuada se utilizó como control positivo un extracto de piña debido a su ya conocida actividad proteolítica.

3.11 Determinación de la actividad enzimática óptima bajo distintos rangos de temperatura y pH

Para analizar la capacidad de las enzimas proteolíticas presentes en los extractos crudos de *P. dasyliroides* de mantenerse activas en diferentes condiciones no fisiológicas, se realizaron ensayos enzimáticos variando la temperatura y pH en el proceso de incubación. Basado en resultados de secciones anteriores y por disponibilidad de material se utilizó la fracción 1 del tallo para todos los ensayos realizados en esta sección.

El efecto del pH en la actividad enzimática fue evaluado en un rango de 6 a 10. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se evaluó mediante la incubación de la reacción a un pH de 7 en un rango de temperaturas de 27 a 67 °C. Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por triplicado utilizando la misma metodología detallada en la sección 3.10. Para determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad proteolítica, se consideró como el 100 % de actividad el valor más alto obtenido en los ensayos. A partir de este valor, se calculó el porcentaje de actividad catalítica residual.

3.12 Zimografía y densitometría.

Con el objetivo de identificar la presencia de enzimas proteolíticas en extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas se utilizó la técnica de zimografía. Esta técnica permite visualizar en un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina, las manchas producidas por la actividad proteolítica de las enzimas presentes, sin la necesidad de purificarlas.

Para esto, se utilizó el kit Invitrogen Novex Zymogram gels (Thermo Fisher Scientific) el cual contiene geles de tris-glicina-gel, 10 % de acrilamida y copolimerizado con 0.1 % de gelatina. La electroforesis se realizó mediante una corrida a 125 V durante 85 minutos en una solución tampón de corrida 1X Tris-Glycina SDS y una fuente de poder Probiotek. Como marcador de peso molecular se utilizó el Precision Plus Protein (500 µl) (Bio-rad). Posterior a la corrida electroforética el gel se lavó por 30 minutos en buffer de renaturalización (Novex™ Zymogram

Renaturing Buffer (10X)) a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, se incubó dos veces por 30 minutos a temperatura ambiente en buffer de desarrollo (Novex™ Zymogram Developing Buffer (10X)). Seguidamente, se realizó una incubación “overnight” a 37 °C en una incubadora marca Labnet International modelo 211 DS. El exceso de buffer se eliminó con dos lavados de 5 minutos con agua destilada. Para confirmar la presencia de actividad enzimática el gel se tiñó con Imperial Protein Stain (Thermo Fisher Scientific) por 3 horas a temperatura ambiente, para finalizar con una decoloración “overnight”. La visualización de la actividad proteolítica (manchas blancas en el gel) se llevó a cabo en un transiluminador marca Enduro GDS (Labnet, Edison, NJ).

Para determinar la actividad enzimática según la intensidad de las bandas se utilizó la técnica de densitometría. Las fotos tomadas en el transiluminador fueron analizadas mediante el programa Image J (Schneider etl., 2012). Se realizó una normalización según la cantidad de proteína cargada en cada pozo del gel al dividir el área del pico obtenido mediante Image J entre la cantidad de proteína.

3.13 Caracterización molecular de los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas mediante SDS-PAGE.

La masa molecular aparente de las proteínas de los extractos crudos y las fracciones parcialmente purificadas se determinó con la técnica de SDS-PAGE. La mezcla de reacción se realizó a partir de 56 µL de muestra, 20 µL de buffer de carga Laemmli 4X (Laemmli, 1970) y 8 µL de DTT (Dithiothreitol). Las muestras se incubaron por 3 minutos a 85 °C. Se utilizaron los geles de marca Kit Novex 4-20 Tris-Glycine Wedgewell 10 Well en los cuales se cargaron 50 µL de mezcla de reacción y 7 µL de marcador molecular marca Precision Plus Protein (Bio-rad). El gel se corrió a 225 V por 40 minutos. Pasado este tiempo, el gel se lavó tres veces con agua destilada y se tiñó durante 3 horas con Imperial Protein Stain (Thermo Fisher Scientific), para finalizar con una decoloración “overnight”. Se tomaron fotos del gel utilizando un transiluminador marca Enduro (Labnet, Edison, NJ).

3.14 Uso de HPLC para la purificación de proteínas a partir de los extractos parcialmente purificados.

Con el objetivo de realizar una separación de las proteínas presentes en los extractos parcialmente purificados se utilizó el equipo Jasco MD-4010 (detector de arreglo de fotodiodos) en conjunto con una columna Ultra C18 con dimensiones de 150 x 4.6 mm. Como solventes se utilizaron acetonitrilo con TFA al 0.1 % y agua con TFA al 0.1 %. Inicialmente se realizó una clarificación de la muestra mediante una centrifugación a 16600 g utilizando el equipo Thermo Scientific ST8R. Se realizó una prueba inicial con 150 μ L de muestra. Pasada la primera corrida, 250 μ L de muestra se cargaron en la columna y se asignó un tiempo de corrida de 30 minutos, en el cual el proceso de elución de las proteínas fue monitoreado a 215 y 280 nm. Este proceso se realizó por duplicado y cada uno de los picos seleccionados fue colectado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. El secado de las muestras se realizó en un concentrador de vacío de la marca Thermo Scientific modelo Savant DNA 120.

3.15 Caracterización molecular de los picos cromatográficos mediante SDS-PAGE y escisión de las bandas de interés.

La masa molecular aparente de las proteínas purificadas mediante HPLC fue determinada mediante la técnica de SDS-PAGE. La mezcla de reacción consistió en 26 μ L de muestra, 10 μ L de buffer de carga Laemmli 2X (Laemmli, 1970) y 4 μ L de DTT (Dithiothreitol). Las muestras se incubaron a 85 °C por un minuto. Para visualizar las bandas de interés, se utilizaron geles de marca Kit Novex 4-20 Tris-Glycine Wedgewell 10 Well en los cuales se cargaron 35 μ L de mezcla de reacción y 7 μ L de marcador molecular marca Precision Plus Protein (Bio-rad). Para el tiempo de corrida y el proceso de tinción se siguió el mismo procedimiento detallado en la sección 3.13.

Seguidamente, con una punta de micropipeta de 1000 μ L se separaron las bandas de interés del gel. Se tomaron cuatro bandas, las cuales fueron elegidas según la intensidad de la banda y la masa molecular aparente. Las bandas se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con 10 μ L de agua destilada para evitar su desecación. Las muestras se almacenaron en refrigeración hasta su posterior uso.

3.16 Espectrometría de masas y comparación con bases de datos UniProt.

Con el fin de confirmar la presencia de enzimas proteolíticas en los extractos purificados se utilizó la técnica de espectrometría de masas. Para esto, las muestras se enviaron al Laboratorio de Proteómica del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica.

El análisis de las muestras consistió en una digestión con tripsina y una posterior corrida en un sistema de espectrometría de masas por cromatografía de nanolíquidos (nLC-MS/MS). Mediante este proceso se lograron obtener secuencias de péptidos que fueron comparadas con las bases de datos públicas de UniProt mediante el programa PEAKS X (Bioinformatics Solutions Inc, Canadá).

Se utilizó una “tasa de descubrimiento falso” (FDR) no mayor a 1 %, y un valor estadístico de $-10 \lg P > 30$. Esto para aumentar la confiabilidad en la identificación o concordancia entre los péptidos y las bases de datos.

4. Resultados

4.1 Determinación del protocolo de desinfección para el establecimiento *in vitro* de plantas de *Puya dasylirioides*.

El porcentaje de contaminación durante el ensayo varió en dependencia del tejido utilizado para realizar el establecimiento (Figura 8). La parte distal de la hoja fue la que presentó mayor porcentaje de contaminación con un 95 % de los explantes contaminados, siendo los hongos la fuente predominante de contaminación. La parte basal de la hoja presentó un 82.5 % de explantes contaminados, de los cuales 65.65 % fueron afectados por hongos, 21.21 % por bacterias y los restantes por una mezcla de ambos. Las semillas fueron el explante con menor porcentaje de contaminación con un 47.5 %, donde las bacterias fueron los principales organismos contaminantes.

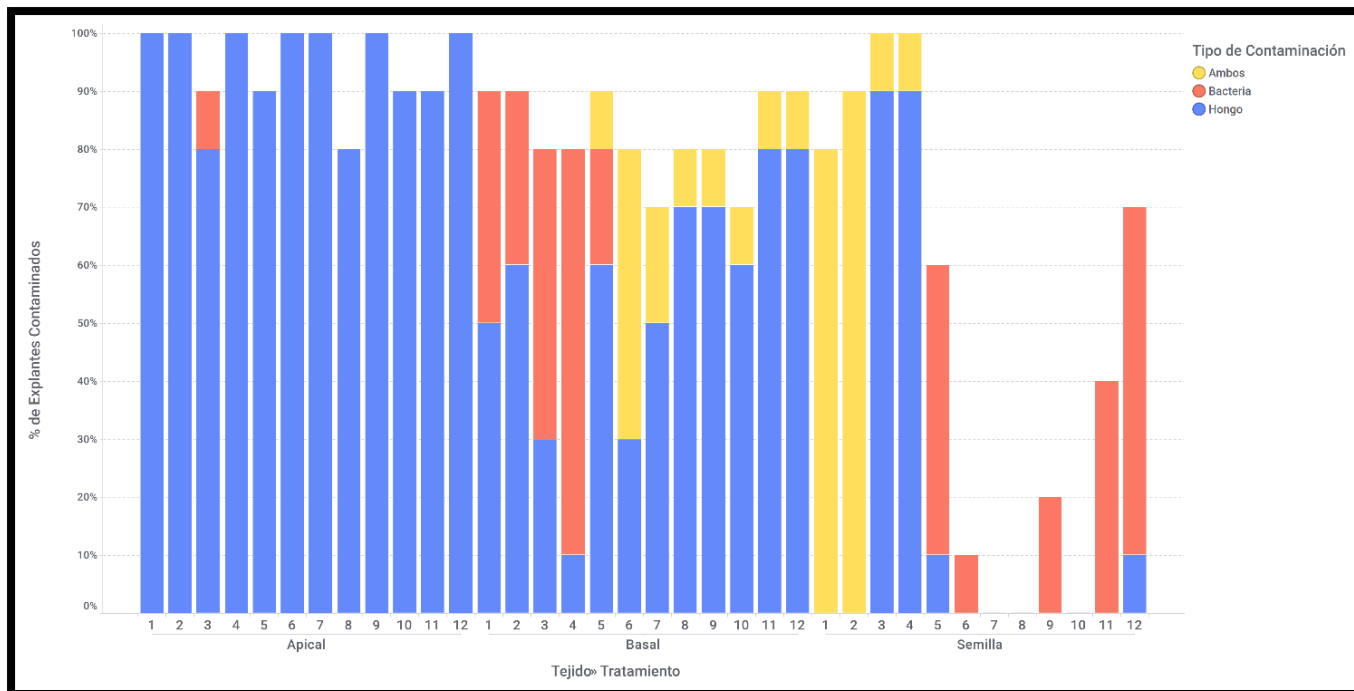


Figura 8. Contaminación observada en explantes de *Puya dasylirioides* en respuesta a los tratamientos de hipoclorito de sodio y tiempo de exposición. La descripción de los tratamientos se presenta en el Cuadro 5.

Al realizar el análisis mediante regresión logística, se logró apreciar que a medida que aumenta el porcentaje de NaClO utilizado, disminuye la probabilidad de contaminación de las semillas, pasando de una probabilidad cercana del 80 % a una probabilidad cercana al 20 % (Figura 9), alcanzándose hasta un 100 % de descontaminación en los tejidos de los tratamientos 7, 8 y 10. Independientemente del tratamiento utilizado, la probabilidad de contaminación en las zonas distal y basal de la hoja fue de 95 (anexo 4) y 83 % (anexo 5), respectivamente. Para los siguientes experimentos se decidió utilizar el tratamiento 8, correspondiente a una exposición de 60 segundos a una solución con 5 % de NaClO.

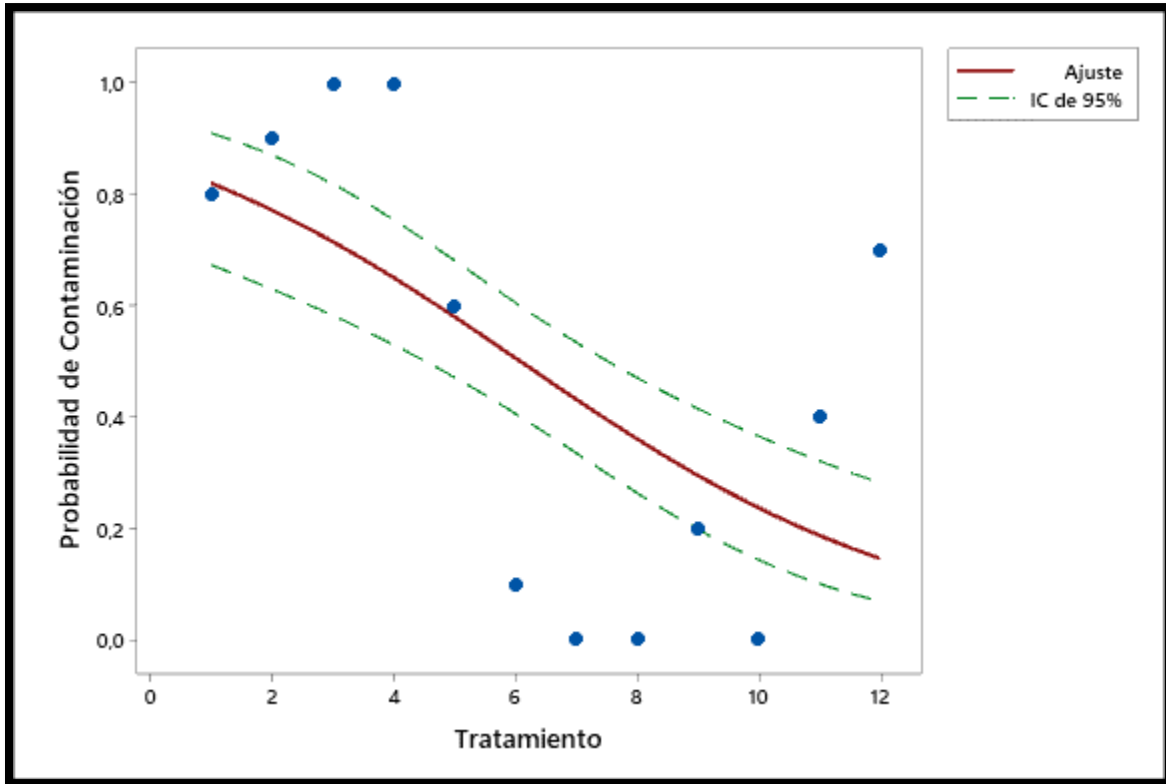


Figura 9. Curva de regresión logística para la determinación de la probabilidad de contaminación de semillas de *Puya dasylirioides* según el tiempo de exposición y la concentración de hipoclorito de sodio.

4.2 Tipo de recipiente y concentración de BAP para el establecimiento *in vitro* de explantes de *Puya dasylirioides*.

Los altos índices de contaminación encontrados en la zona distal y basal de la hoja ocasionaron la muerte del 77.5 % y 65.5 % de los explantes, respectivamente. Los restantes explantes, a pesar de mantenerse en buen estado, no mostraron ningún tipo de respuesta frente al tipo de recipiente o la concentración de BAP, al no formar raíces o brotes. En el caso de las semillas, se presentó un 16.66 % de contaminación y un porcentaje de germinación del 53.75 % 45 días posterior a la siembra de los explantes en el medio de cultivo (Fig, 10). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre los diferentes tratamientos evaluados en este ensayo ($p\text{-value} = 0.4219$, $df = 11$) con respecto al control, lo cual es indicativo de que la concentración de BAP o el tipo de recipiente utilizados en este ensayo no influyeron sobre la tasa de germinación de semillas de esta especie.



Figura 10. Germinación de semillas de *Puya dasylirioides* en medio MS al 100 % a los 70 días de la siembra.

4.3 Ensayo de Plackett-Burman para la detección de factores influyentes en el crecimiento, multiplicación y estado de explantes de *Puya dasylirioides*.

Este ensayo se realizó para identificar los factores más influyentes en la fase de multiplicación. Las variables evaluadas en este diseño fueron formación de brotes, raíces, estado general y cambios en el peso y la longitud de las plantas. Los resultados mostraron una aparente influencia de la hormona del regulador 6-(γ,γ -dimetilalilamino)-purina (2iP) y el porcentaje de sales en el medio MS en la brotación y la longitud de las plantas (Fig 11a y 11b), que, a pesar de no ser resultados estadísticamente significativos, el efecto del regulador 2iP se logró confirmar en los resultados del ensayo 4.4. A su vez, permitió descartar la influencia de factores como la agitación y el volumen del medio. En relación con el cambio en el peso fresco de la planta y la generación de raíces, no se logró determinar una respuesta clara y significativa frente a los factores utilizados en este ensayo (anexo 11 y anexo 12)

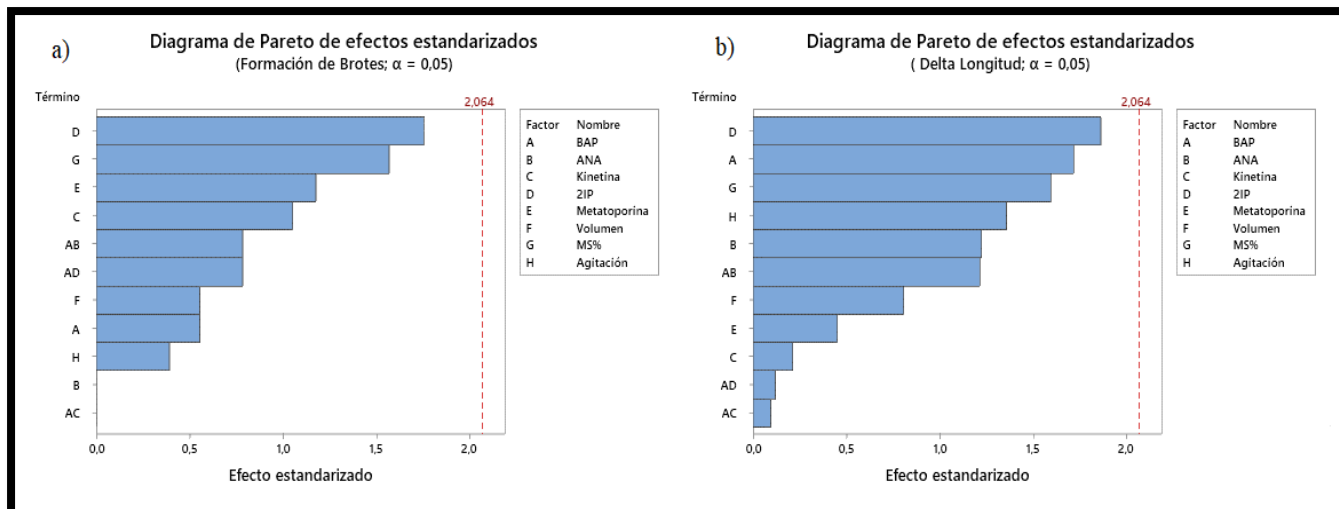


Figura 11. Diagramas de Pareto para la determinación de la influencia de reguladores de crecimiento, concentración de sales, volumen de medio de cultivo y agitación sobre explantes de *Puya dasylirioides*. a) Efecto sobre la formación de brotes y b) Efecto sobre el cambio en la longitud de la planta. Línea punteada roja representa diferencias significativas.

4.4 Ensayo de multiplicación de plantas establecidas *in vitro* de *Puya dasylirioides* utilizando diversos reguladores de crecimiento en medio semisólido.

Los primeros brotes a partir de explantes con cortes longitudinales del tallo aparecieron un mes después de la siembra; sin embargo, no fue hasta el mes tres que los tratamientos con kinetina (2 mg/L) y 2iP (1 mg/L) presentaron una tendencia de formación de brotes superior al resto de los tratamientos con un total de 9 y 7 brotes, lo que equivale a un 1.12 y 0.875 brote/explante, respectivamente. Al mes cuatro, se presentó un efecto significativo ($p\text{-value} = 2,525e-07$, $df = 12$) del tratamiento 2iP (0.5 mg/L) respecto al control al generar un total de 22 explantes, equivalente a 2.75 brotes/explante, siendo éste el valor más alto obtenido en este experimento (Figura 12), seguido de un 2.5 brotes/explante ($p\text{-value} = 0.104$, $df = 12$) para el tratamiento 2iP (1 mg/L). Cabe destacar que en el control no hubo ninguna formación de brotes. La morfología de los brotes obtenidos fue normal, sin ninguna anomalía aparente y se pudieron separar fácilmente de la planta madre (Figura 13).

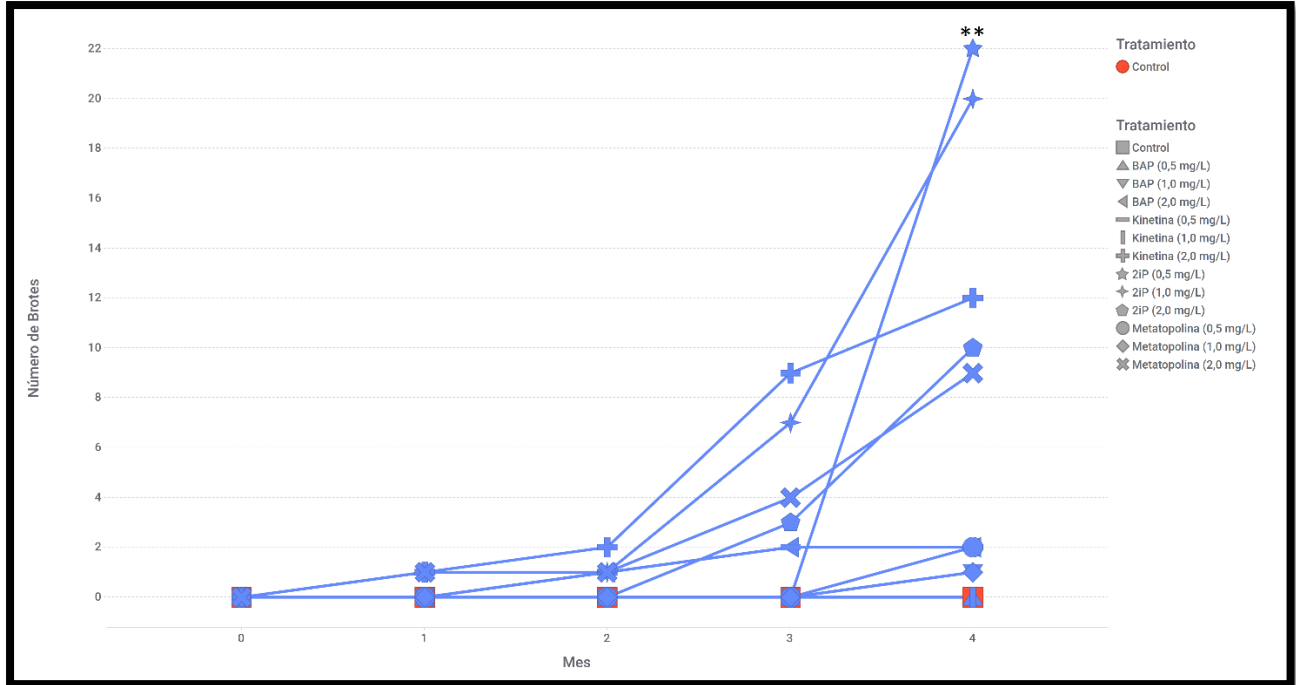


Figura 12. Formación de brotes a través del tiempo, de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas *in vitro* de *Puya dasylirioides*. ** Representa diferencias significativas (p -value < 0.05) con respecto al control.



Figura 13. Formación de brotes a partir de explantes de plantas de *Puya dasylirioides* establecidas *in vitro*. Brotes obtenidos mediante la exposición al regulador de crecimiento 2iP 0.5 mg/L.

Con respecto a la formación de raíces, el tratamiento de kinetina 0.5 mg/L produjo una respuesta significativa (p -value = 0.029, $df=12$) en comparación con los restantes reguladores empleados, ya que se observó la formación de 20 raíces equivalente a 2.5 raíces por brote. Los demás reguladores ocasionaron un efecto adverso sobre el número de raíces producidas por explante, ya que las plantas control fueron el segundo grupo que produjo una mayor cantidad de raíces al final del experimento, con un total de 15 equivalente a 1.8 raíces por brote (Figura 14), sin ser una diferencia significativa (p -value = 1, $df=12$). Los tratamientos de metatopolina y 2IP causaron la inhibición completa de raíces en los explantes.

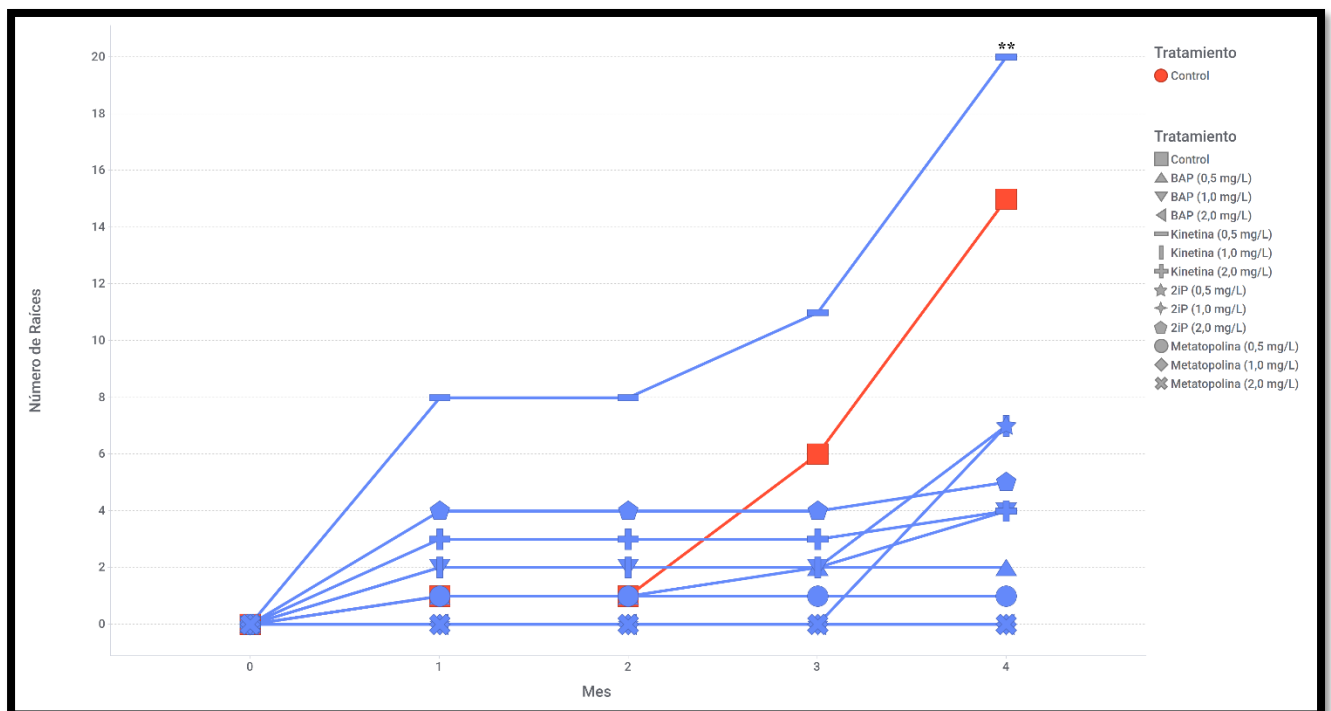


Figura 14. Formación de raíces a través del tiempo, de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas *in vitro* de *Puya dasyliroides*. ** Representa diferencias significativas (p -value < 0.05) con respecto a los restantes reguladores de crecimiento, no con respecto al control.

En relación con el incremento del peso fresco de los explantes, en la figura 15 se observa una tendencia de que la exposición a las hormonas incrementó la ganancia de peso fresco durante el periodo de evaluación con respecto al control, y que este aumento se mantuvo constante conforme avanzaban los meses. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los

tratamientos en comparación al control (p-value = 0.139, df = 12). El valor de peso seco más alto (2 g) se obtuvo a los cuatro meses con el tratamiento 2iP 2 mg/L

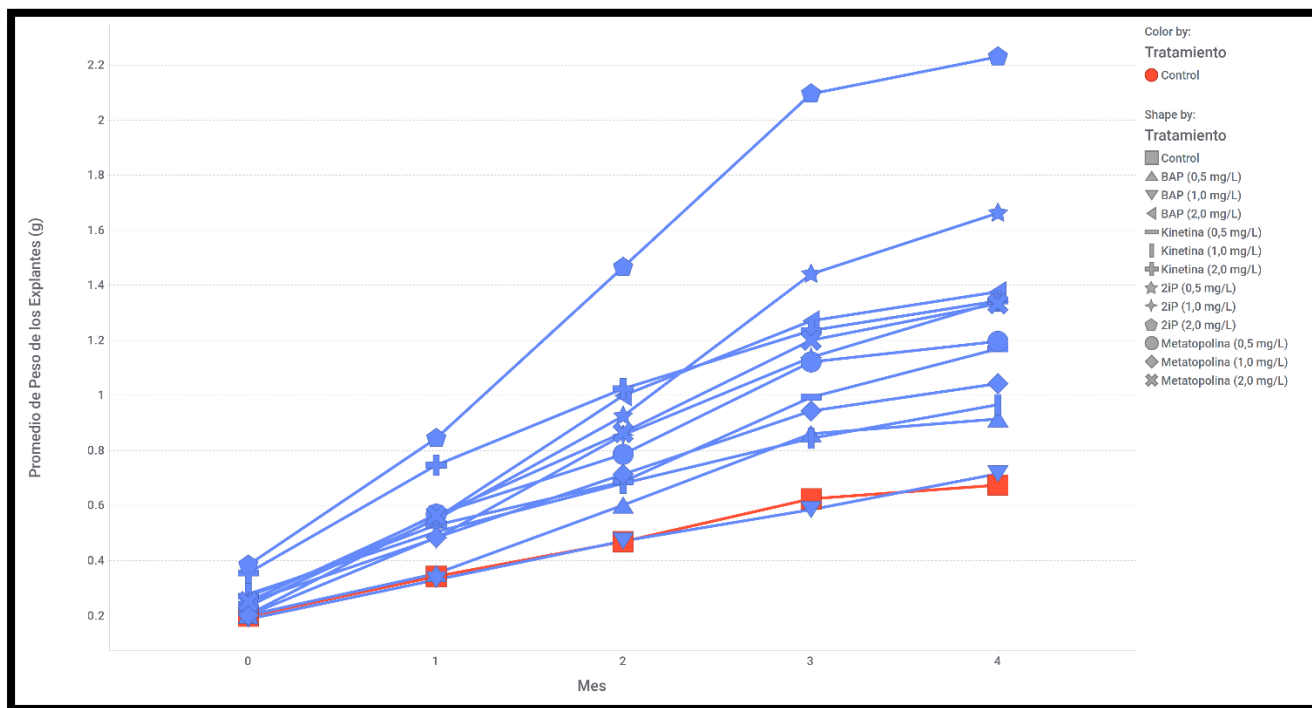


Figura 15. Ganancia de peso fresco a través del tiempo, de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas *in vitro* de *Puya dasyliroides*.

No hubo diferencias significativas para la variable longitud de las plantas (p-value = 0.1906, df = 12). Las hormonas parecen generar una mayor elongación de los explantes a lo largo del tiempo respecto al control (Fig 16). Los tratamientos que generaron una mayor elongación corresponden al regulador 2iP 2 mg/L, alcanzando valores en promedio cercanos a los 6 cm, seguido del tratamiento 2iP 0.5 mg/L y el tratamiento kinetina 0.5 mg/ con valores de 5.6 y 5.5 cm, respectivamente, lo que se relaciona con el incremento de peso explicado previamente.

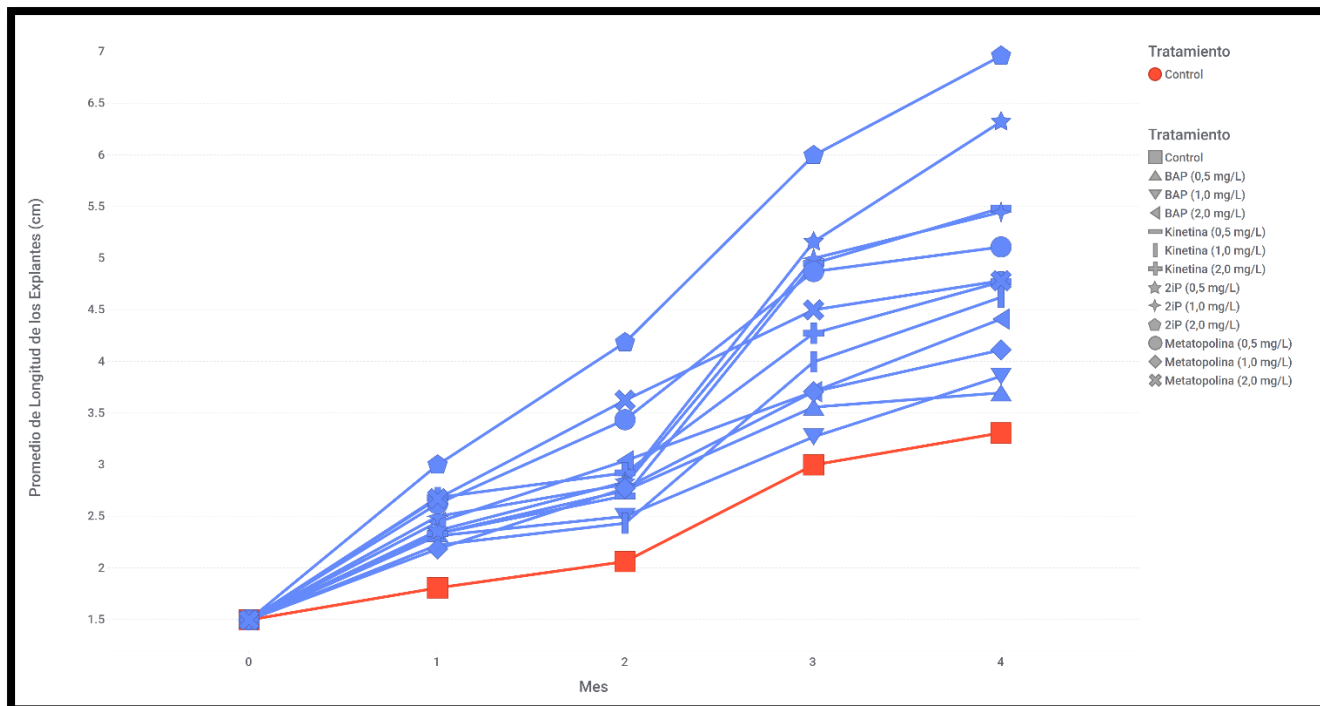


Figura 16. Crecimiento en longitud de las plantas sobre el tiempo de acuerdo con los tratamientos específicos para el ensayo de multiplicación de plantas establecidas *in vitro* de *Puya dasylirioides*.

4.5 Determinación de la concentración de proteína y actividad enzimática de los extractos crudos y parcialmente purificados de *Puya dasylirioides*.

Los resultados de la obtención de proteína se detallan en el cuadro 9. La mayor cantidad de proteína se obtuvo en los extractos crudos de la zona distal con un promedio de 4287.44 ± 652.91 mg/kg de masa fresca, seguido de los extractos crudos del tallo y de la zona basal con 4250.71 ± 196.78 mg/kg y 1547.8 ± 40.39 mg/kg de masa fresca, respectivamente. Debido a que la actividad enzimática de estos extractos crudos fue baja en todos los tejidos, se realizaron procesos para la purificación parcial usando etanol frío.

Cuadro 9. Concentración de proteína y actividad enzimática específica de extractos crudos de *Puya dasylirioides*.

<i>Tejido</i>	<i>Repetición</i>	<i>Peso del tejido (g)</i>	<i>Volumen (mL)</i>	<i>Proteína (mg/mL)</i>	<i>Proteína (mg/Kg de tejido)</i>	<i>Actividad enzimática específica (Ucas/mg de proteína)</i>
<i>Basal</i>	1	30.27	50	0.9360	1540.622	0.0016
<i>Basal</i>	2	30.51	50	0.9753	1590.837	0.0041
<i>Basal</i>	3	30.30	50	0.9156	1510.100	-0.0924
<i>Distal</i>	1	30.41	50	2.1648	3550.946	0.3407
<i>Distal</i>	2	30.33	50	2.7466	4520.789	0.1884
<i>Distal</i>	3	30.77	50	2.9515	4790.611	0.2702
<i>Tallo</i>	1	30.54	50	2.6383	4310.953	0.0097
<i>Tallo</i>	2	30.28	50	2.4456	4030.844	0.0084
<i>Tallo</i>	3	30.04	50	2.6515	4410.335	0.0119

Al considerar las fracciones parcialmente purificadas, se obtuvo una mejora en la actividad enzimática específica. Los valores más elevados se obtuvieron en la fracción 4 y 1 del tallo (6.07 y 1.26 Ucas/mg) respectivamente (Figura 17). Destacan las fracciones 1, 2 y 3 de la zona basal, que a pesar de su baja concentraciones de proteína presentaron actividades enzimáticas de posible interés. A pesar del elevado resultado obtenido para la fracción 4 del tallo, esta no fue considerada para los siguientes experimentos debido a la baja concentración de proteína en el extracto y debido a que este resultado no se pudo confirmar mediante la técnica de zimografía.

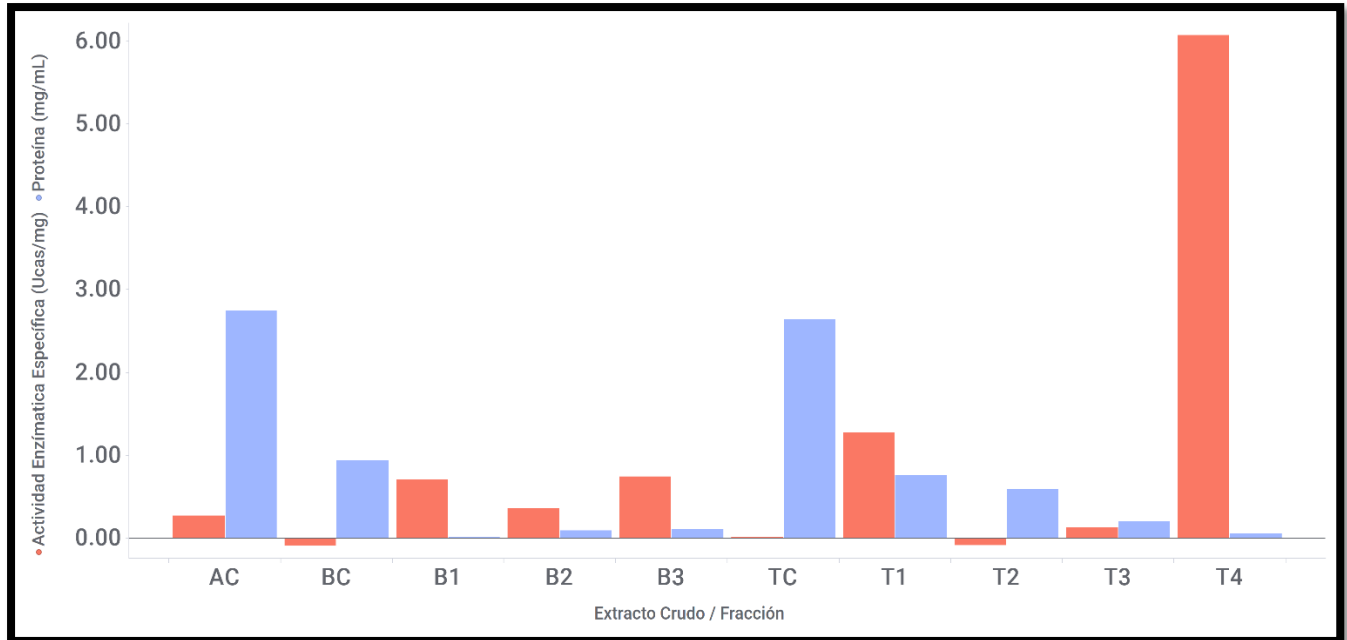


Figura 17. Concentración de proteína y actividad enzimática específica de los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas de *Puya dasylirioides*. AC = Extracto crudo zona distal, BC = Extracto crudo zona basal, B1 = Fracción 1 zona basal, B2 = Fracción 2 zona basal, B3 = Fracción 3 zona basal, TC = Extracto crudo del tallo, T1 = Fracción 1 del tallo, T2 = Fracción 2 del tallo, T3 = Fracción 3 del tallo, T4 = Fracción 4 del tallo.

4.6 Zimografía y densitometría para la detección de actividad enzimática presente en los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas empleando geles de gelatina.

Al aplicar la técnica de zimografía, se logró observar la presencia de enzimas proteolíticas en los extractos crudos y las fracciones 1, 2 y 3 del tallo y la zona basal de la hoja. Las grandes bandas de actividad corresponden a proteínas con una masa aparente de entre 75 kDa y 150 kDa. Entre los extractos utilizados en el experimento, destaca la fracción 1 del tallo, en el cual se observa una banda de gran intensidad con una masa aparente cercana a 45 kDa, seguido por una banda de baja intensidad con una masa aparente de 37 kDa (Figura 18). Mediante zimografía se descartó la presencia de actividad enzimática en los extractos y fracciones del tejido de la zona distal de la hoja.

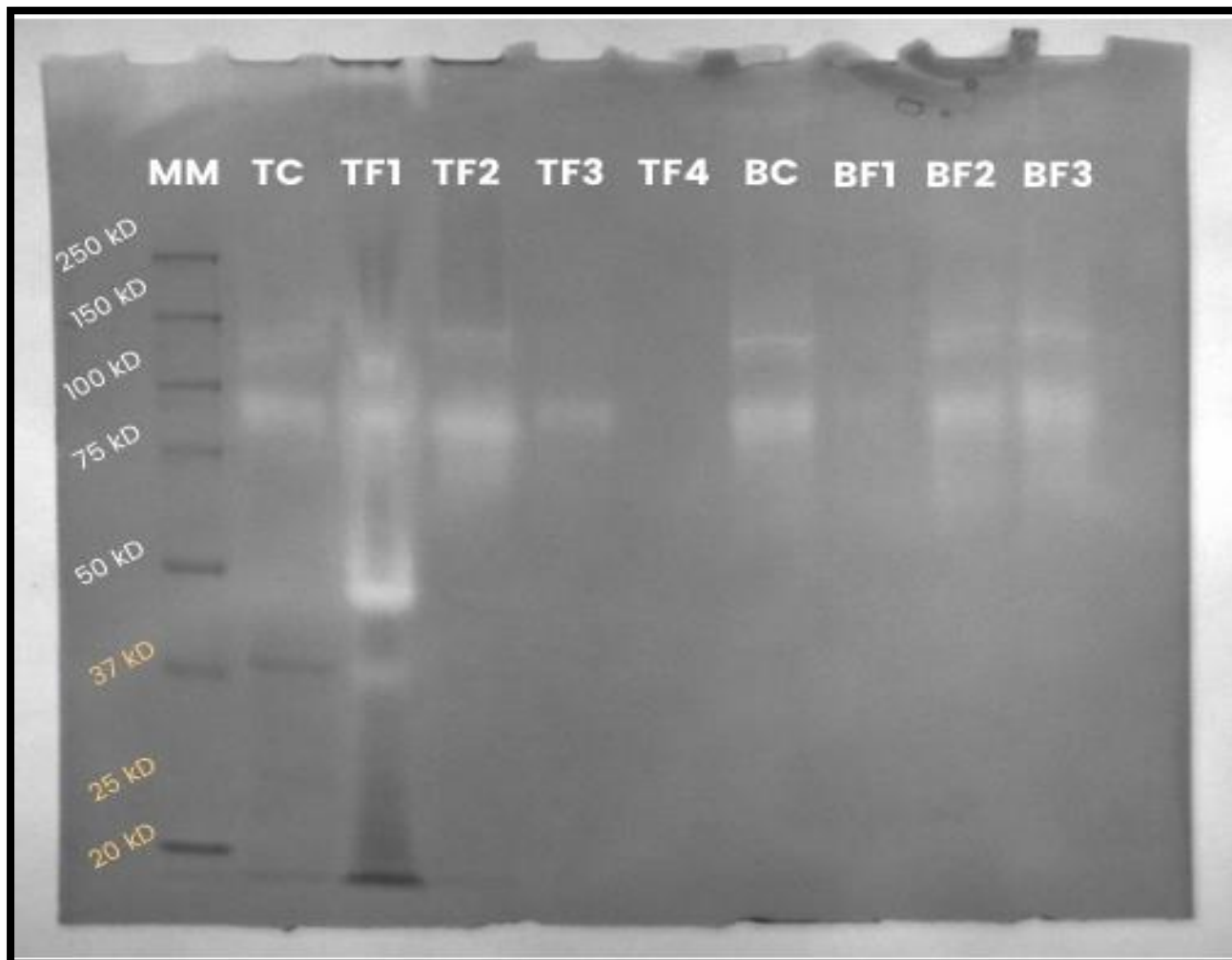


Figura 18. Zimograma en gel de gelatina al 10 % de extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas del tejido tallo y parte basal de la hoja. De izquierda a derecha: MM = Marcador de peso molecular, TC= Extracto crudo del tallo, TF1 = Fracción 1 del tallo, TF2 = Fracción 2 del tallo, TF3 = Fracción 3 del tallo, TF4 = Fracción 4 del tallo, BC= Extracto crudo de parte basal de la hoja, BF1 = Fracción 1 del extracto basal, BF2 = Fracción 2 del extracto basal, BF3 = Fracción 3 del extracto basal, BF4 = Fracción 4 del extracto basal.

Al realizar el análisis mediante densitometría y normalizar los valores según la concentración de proteína utilizada para la zimografía, se determinó que las enzimas proteolíticas con mayor actividad corresponden a las fracciones 3 y 2 de la zona distal de la hoja, seguido de la fracción 1 del tallo (Figura 19), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en la sección 4.6. La fracción 1 del tallo se escogió para las siguientes etapas de la investigación debido a los buenos

resultados obtenidos en el gel de zimografía y la buena relación entre la actividad enzimática y la concentración de proteína.

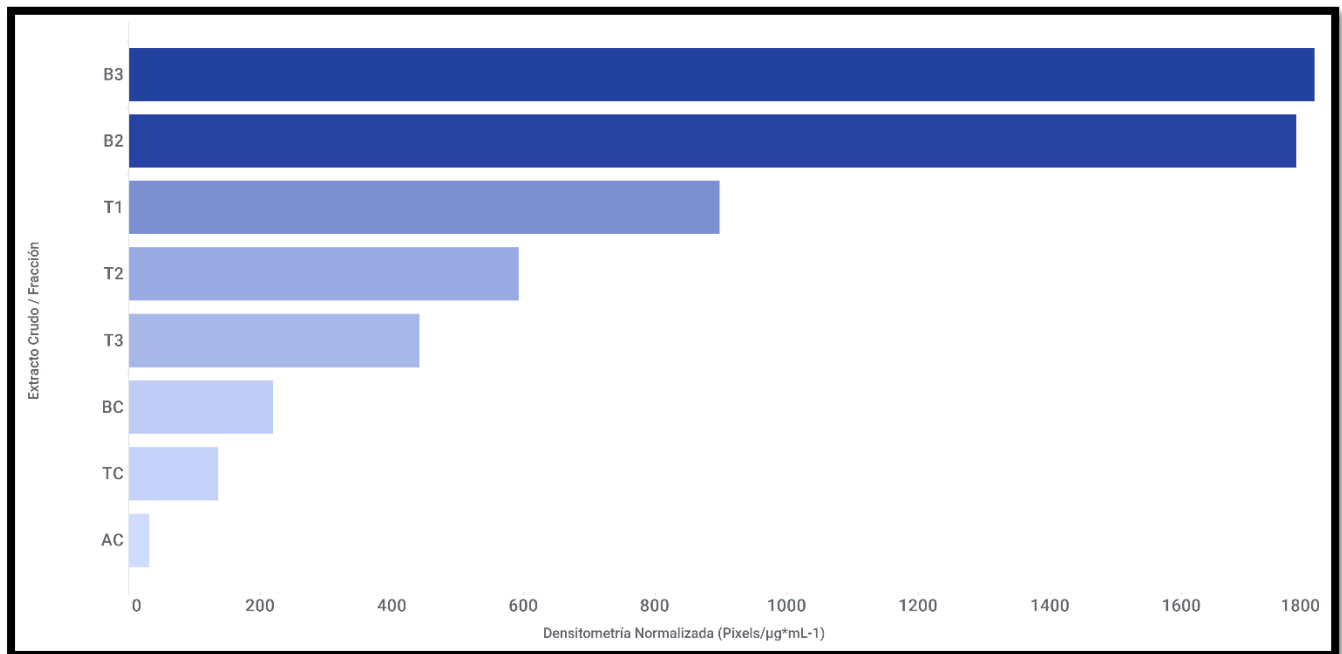


Figura 19. Densitometría normalizada de las manchas de actividad proteolítica producidas por enzimas proteolíticas presentes en extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas del tallo y hoja obtenidas mediante los ensayos de zimografía. La normalización fue realizada al dividir el valor de pixeles entre la concentración de proteína utilizada para cada extracto.

4.7 Determinación de la actividad enzimática óptima bajo distintos rangos de temperatura y pH.

En relación con la actividad proteolítica residual al variar el pH del sustrato, las enzimas proteolíticas de la fracción 1 del tallo presentaron actividades mayores al 85 % al utilizar sustratos con un rango de pH de 6-8. No se evaluaron valores de pH menores a 6 debido a la naturaleza y a la solubilidad del sustrato empleado (caseína). Al utilizar un pH por encima de 8 se observó una pérdida gradual de la actividad proteolítica, descendiendo a valores de 72.76 % y 68.80 % para los pH de 9 y 10, respectivamente (Figura 20).

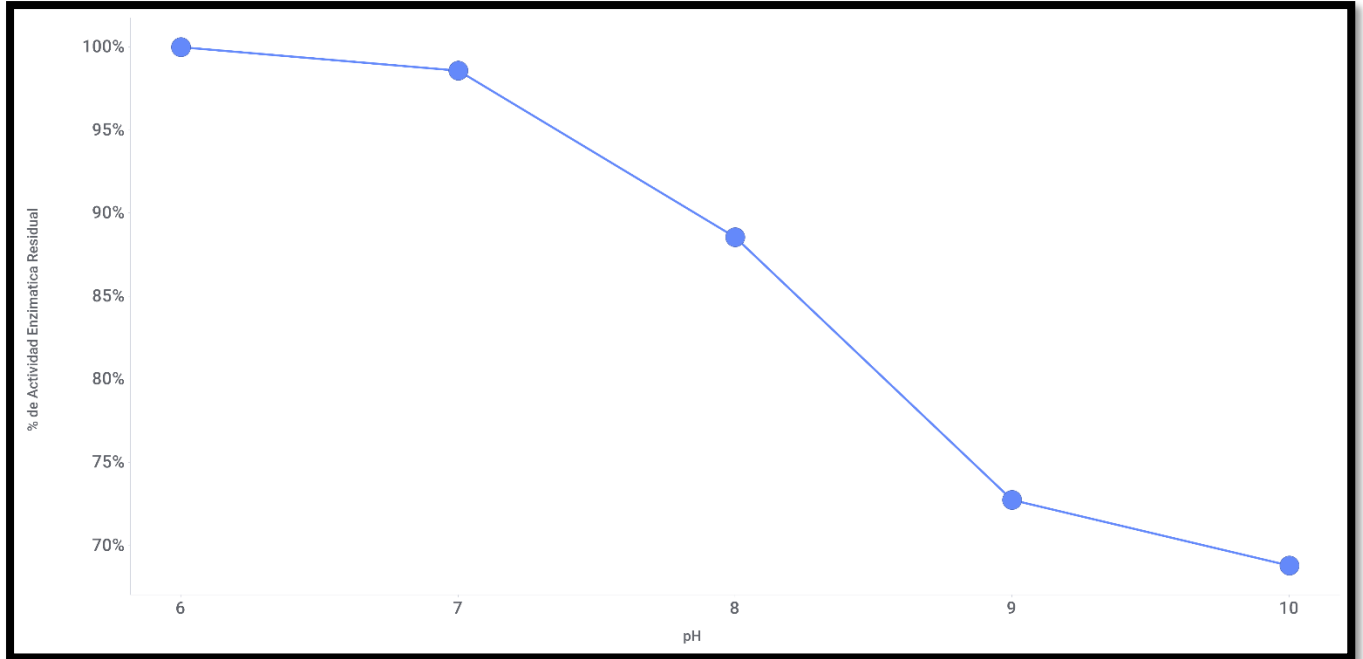


Figura 20. Comportamiento de la actividad proteolítica residual en la fracción 1 del tallo de *P. dasylirioides* en función del pH del sustrato utilizado.

Con respecto a la temperatura óptima, el mejor resultado se obtuvo cuando la reacción enzimática se desarrolló a 57 °C, valores 40 % más altos que los obtenidos al realizar los ensayos a temperatura ambiente (27 °C) y a 37 °C. Sin embargo, como se observa en la figura 21, al utilizar temperaturas superiores a 57 °C, las enzimas pierden cerca de un 30 % de su actividad y, aunque no fue posible demostrar una tendencia, es de esperar una pérdida mayor al incrementar aún más la temperatura. Aun así, la retención aproximada del 70 % de la actividad al enfrentarse a temperaturas elevadas como 67 °C, muestra potencial para el uso en la industria.

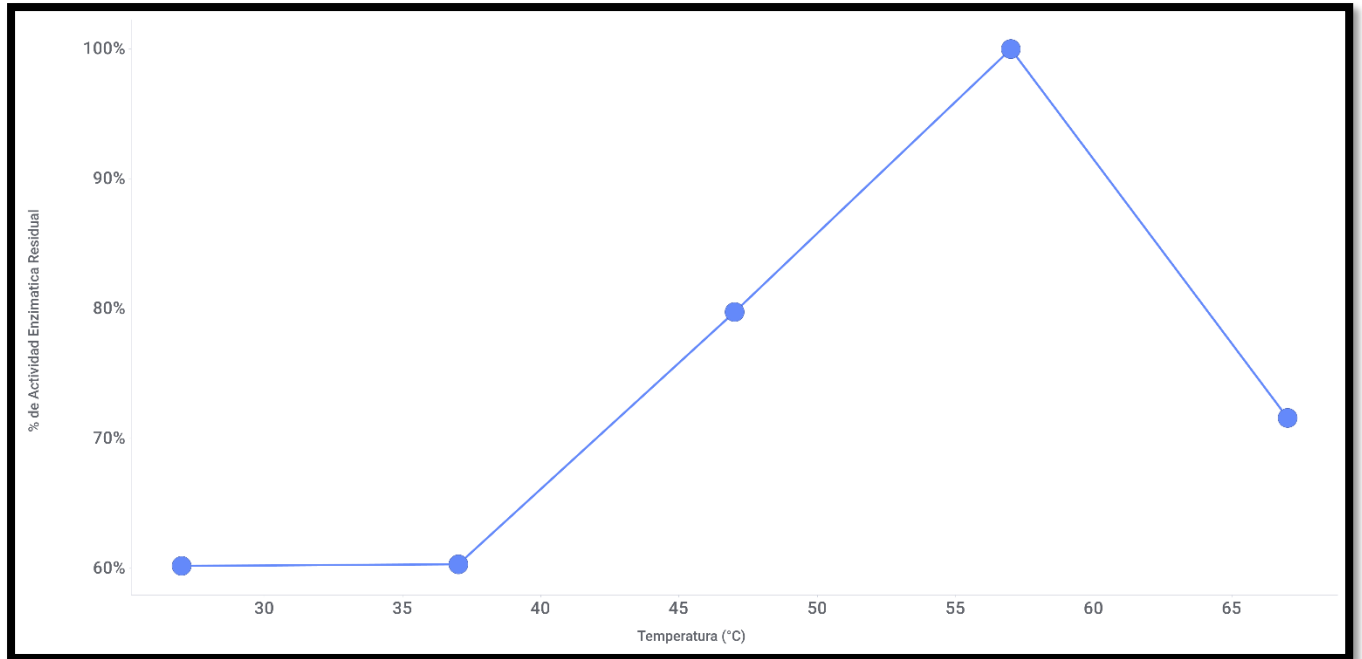


Figura 21. Comportamiento de la actividad proteolítica residual en la fracción 1 del tallo de *P. dasylirioides* según la temperatura a la que se desarrolló la reacción.

4.8 Caracterización molecular de los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas mediante SDS-PAGE.

Al aplicar la técnica de SDS-PAGE se logró obtener un perfil proteico de los extractos crudos y las fracciones parcialmente purificadas (Figura 22 y Figura 23). Para el tejido de la zona distal de la hoja se observa una distribución de las bandas entre los 12 y 50 kDa, mientras que para las distintas fracciones del tallo la distribución fue mayor, con bandas entre el rango de 10 a 75 kDa. Con el tejido de la zona basal no se logró observar la formación de bandas, resultados atribuibles a la baja concentración de proteína en el extracto crudo y en las fracciones parcialmente purificadas.

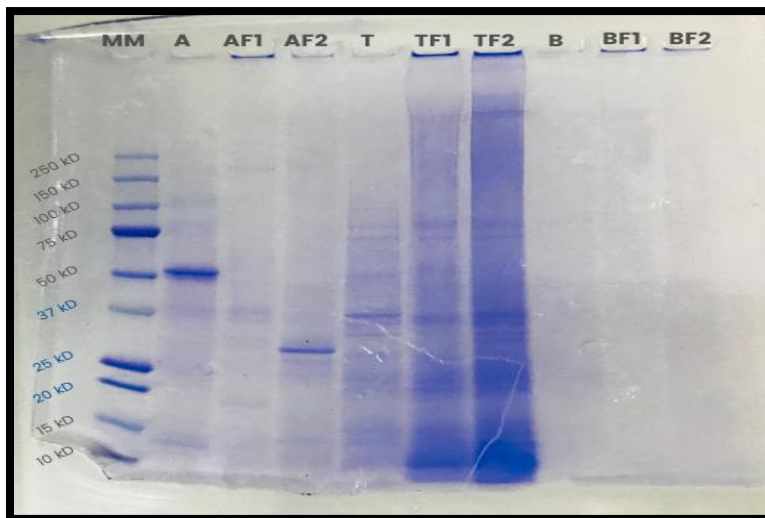


Figura 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas del tallo y hoja de *P. dasyliroides*. De izquierda a derecha: MM = Marcador de peso molecular, A= Extracto crudo de parte distal de la hoja, AF1 = Fracción 1 del extracto distal, AF2 = Fracción 2 del extracto distal, T= Extracto crudo del tallo, TF1 = Fracción 1 del tallo, TF2 = Fracción 2 del tallo, B= Extracto crudo de parte basal de la hoja, BF1 = Fracción 1 del extracto basal, BF2 = Fracción 2 del extracto basal.

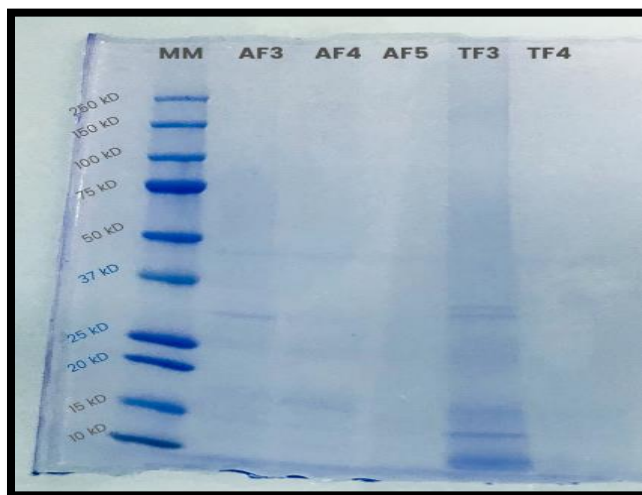


Figura 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las fracciones parcialmente purificadas del tallo y hoja de *P. dasyliroides*. De izquierda a derecha: MM = Marcador de peso molecular, AF3 = Fracción 3 del extracto distal, AF4 = Fracción 4 del extracto distal, AF5 = Fracción 5 del extracto distal, TF3 = Fracción 3 del tallo, TF4 = Fracción 4 del tallo.

4.9 Uso de HPLC para la purificación de proteínas a partir de los extractos parcialmente purificados.

El cromatograma obtenido mediante la técnica de HPLC evidenció la presencia de seis picos proteicos mayoritarios en la fracción 1 del tallo (Fig 24). El pico cuatro mostró la mayor intensidad, con un valor cercano a los 12000 μ V, seguido del pico 5 con una intensidad cercana a los 10000 μ V. Basado en estos resultados, se decidió trabajar con los seis picos colectados para la posterior confirmación de la presencia de enzimas proteolíticas en la fracción 1 del tallo.

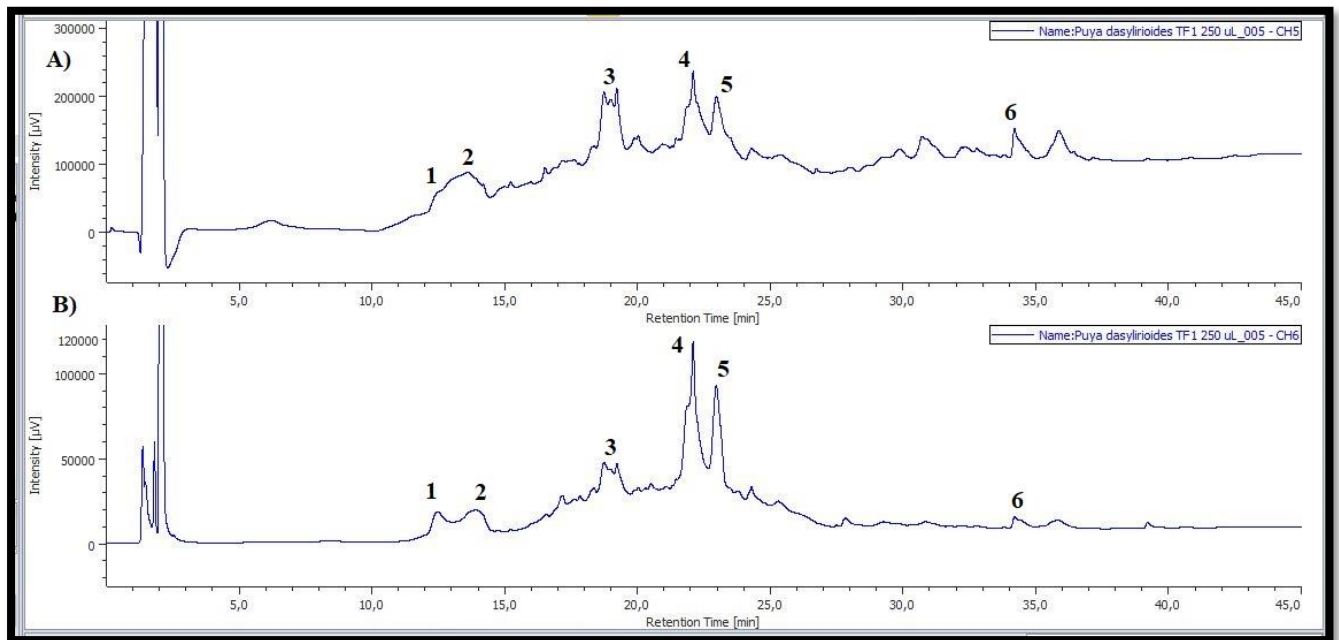


Figura 24. Cromatogramas de la fracción 1 del tallo de *P. dasylirioides* obtenidos mediante la técnica de HPLC al emplear una columna Ultra C18 y acetonitrilo con TCA al 0.1 % y agua con TCA al 0.1 % como solventes. A) Cromatograma obtenido al utilizar una absorbancia de 215 nm. B) Cromatograma obtenido al utilizar una absorbancia de 280 nm.

4.10 Caracterización molecular de los picos cromatográficos mediante SDS-PAGE y escisión de las bandas de interés.

Para observar las bandas y obtener una masa molecular aparente de los picos colectados durante el ensayo de HPLC se utilizó la técnica de SDS-PAGE. La formación de bandas de alta

intensidad en el gel fue difícil debido a la baja intensidad de los picos y a la baja concentración de proteína. Aun así, se observaron algunas bandas, marcadas con un círculo amarillo en la figura 25.

Entre ellas destaca el pico 6, en la cual se observó la formación de dos bandas, una correspondiente a una proteína con una masa molecular aparente cercana a los 55 kDa y otra con una masa molecular cercana a los 20 kDa. En la fracción 4 se observó la formación de una banda en la zona cercana a los 45 kDa, (imperceptible en la imagen). Por último, en la fracción 5 destaca la formación de una banda en una zona cercana a los 10 kDa.



Figura 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los picos cromatográficos obtenidos mediante la técnica de HPLC utilizando la fracción 1 del tallo. De izquierda a derecha: MPM = Marcador de peso molecular, 1 = Pico cromatográfico 1, 2 = Pico cromatográfico 2, 3 = Pico cromatográfico 3, 4 = Pico cromatográfico 4, 5 = Pico cromatográfico 5, 6 = Pico cromatográfico 6.

4.11 Espectrometría de masas y comparación con bases de datos UniProt.

Los resultados más destacados al realizar el análisis de masas y la comparación de los péptidos con bases de datos UniProt se consiguieron con el pico cromatográfico número 4. En este se logró la identificación de seis péptidos que, en conjunto tuvieron un porcentaje de cobertura de 13 % con una serino-proteasa putativa de la piña (*Ananas comosus*) (Figura 26).

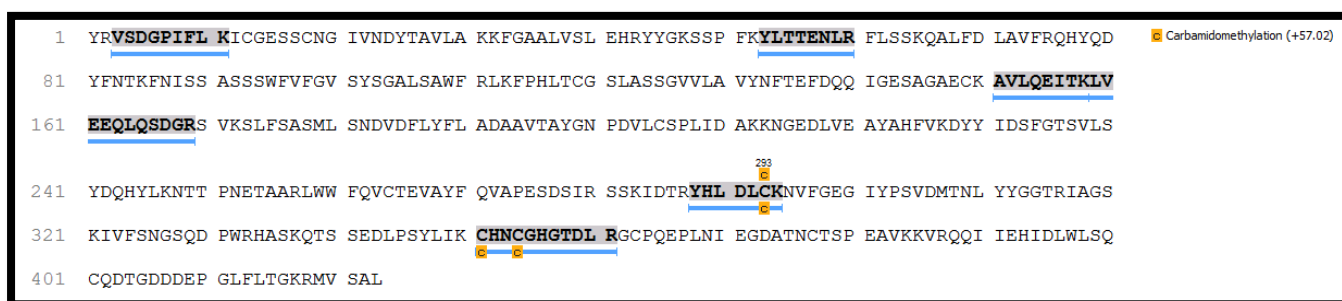


Figura 26. Alineamiento de los péptidos encontrados en el pico 4 de la fracción 1 del tallo de *P. dasyliroides* con una serina proteasa putativa de la piña (*Ananas comosus*).

Esta proteína posee una masa molecular de 47.1 kDa según las bases de datos de Uniprot y concuerda con los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE en la sección 4.10, ya que a partir del pico 4 se observó la formación de una banda cercana a los 45 kDa. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos en la sección 4.6, en los cuales mediante zimografía se detectó la presencia de una banda con actividad proteolítica con una masa aparente de 45 kDa.

A su vez se encontraron péptidos con cierto porcentaje de cobertura con peptidasas A1 pertenecientes a la especie *A. comosus* var. *bracteatus* con masas moleculares cercanas a los 44 kDa y una proteasa aspártica PCS1 de la especie *A. comosus* con una masa molecular cercana a los 47 kDa (Cuadro 10). Para más información sobre los péptidos encontrados consultar el anexo 22.

Cuadro 10. Comparación de los péptidos del pico 4 obtenidos mediante espectrometría de masas con las bases de datos de UniProt.

<i>Accesión</i>	<i>-10lgP</i>	<i>Cobertura (%)</i>	<i>Masa Molecular</i>	<i>Descripción</i>
<u><i>A0A199V3B6</i></u>	103.63	13	47104	Putative serine protease EDA2 (Fragment) OS=Ananas comosus OX=4615 GN=ACMD2_2 3569 PE=3 SV=1
<u><i>A0A6V7QXL5</i></u>	30.24	2	43895	Peptidase A1 domain-containing protein OS=Ananas comosus var. bracteatus OX=296719 GN=CB5_LOCUS31124 PE=3 SV=1
<u><i>A0A6V7QUL2</i></u>	30.24	2	43816	Peptidase A1 domain-containing protein OS=Ananas comosus var. bracteatus OX=296719 GN=CB5_LOCUS29656 PE=3 SV=1
<u><i>A0A6P5HBV0</i></u>	30.24	2	46944	aspartic proteinase PCS1 OS=Ananas comosus OX=4615 GN=LOC109727895 PE=3 SV=1

Con base en la evidencia encontrada por los ensayos aplicados en el desarrollo de esta investigación, se confirmó la presencia de enzimas proteolíticas en la fracción 1 del tallo y el pico 4 del mismo. Teniendo en cuenta que en la literatura no se encontraron antecedentes de un proceso de aislamiento y purificación de proteasas de *P. dasyliroides*, el pico 4 de la fracción 1 del tallo se podría considerar una proteasa nunca descrita para la literatura.

5. Discusión

5.1 Protocolo de desinfección, germinación y multiplicación *in vitro* de plantas de *Puya dasyliroides*.

La definición de un protocolo de desinfección que esterilice efectivamente la superficie de una planta es indispensable para evitar la presencia de organismos contaminantes durante un proceso de establecimiento *in vitro* (Wegayehu et al., 2015). Ya que el medio de cultivo en el que crecen las plantas es una gran fuente de nutrientes para el crecimiento microbiano, la contaminación por microorganismos es uno de los principales causantes de pérdidas durante un proceso de cultivo *in vitro*, pues al competir con las plantas por nutrientes, generan mortalidad del

explante, necrosis, inhibición de la proliferación y problemas de crecimiento (Omamor et al., 2007; Wegayehu et al., 2015). Según Webster y Mitchell (2003), en laboratorios comerciales y de investigación, se pierden entre el 3 y el 15 % de los explantes debido a problemas de contaminación. Entre los principales contaminantes se incluyen los hongos, virus, bacterias y levaduras (Omamor et al., 2007).

La contaminación es aún más grave cuando la fuente de material vegetal proviene directamente de plantas silvestres (Daud et al., 2012; Odutayo et al., 2007; Webster y Mitchell, 2003). En esta investigación, los métodos de desinfección empleados mostraron ser ineficientes para disminuir los niveles de contaminación en los tejidos de la zona distal y basal de la hoja, siendo los hongos los principales organismos perjudiciales.

Especialmente en los trópicos, las poblaciones de hongos son abundantes en el aire y en la rizosfera de las plantas y constituyen dos tercios de todos los organismos que son transportados por el aire (Odutayo et al., 2007; Omamor et al., 2007). Esto hace que la producción de material estéril a partir de plantas silvestres sea un proceso altamente desafiante y laborioso, especialmente con plantas con las hojas cercanas al suelo (Webster y Mitchell, 2003). La alta contaminación en esta investigación con los tejidos mencionados puede atribuirse a la cantidad de microorganismos contaminantes en la superficie de la planta. Además, aún si la superficie de la planta fue correctamente esterilizada, la contaminación pudo haberse generado a partir de microorganismos presentes en los tejidos internos de la planta (endófitos), por una inapropiada técnica aséptica o por falta de esterilización de los instrumentos de laboratorio (Daud et al., 2012).

El NaClO resultó ser una sustancia altamente eficiente para la desinfección de semillas. Esta sustancia ha sido uno de los desinfectantes químicos que más se ha utilizado en el establecimiento *in vitro* de plantas de la familia Bromeliaceae (Guerra y Dal Vesco, 2010; Pérez, 2012) y ha sido el químico más investigado en tratamientos en que varía la concentración y el tiempo de esterilización (Nelson et al., 2015), ya que su efectividad puede variar de especie a especie (Barampuram et al., 2014).

El efecto bactericida y fungicida del cloro se debe a la acción del ácido hipocloroso (HOCl), el ion hipoclorito (OCl^-), y el componente activo NaClO (Webster y Mitchell, 2003), los cuales actúan de forma combinada para la desnaturalización de proteínas en los microorganismos y por lo tanto causan la muerte de bacterias, hongos y virus de una manera rápida y eficiente.

En esta investigación, se generó un 100 % de cultivos asépticos a partir de semillas cuando se usó una concentración de 5 % de NaClO, en conjunto con alcohol al 70 % y una mezcla de Microthiol® y Agrimicina®. Otro resultado que concuerda con esta investigación fue el publicado por Pompelli y Guerra (2005), quienes desinfectaron de forma óptima semillas de *Dyckia distachya* (Bromeliaceae) al emplear NaClO al 5 % por 30 minutos, logrando el 100 % de germinación de las semillas. Sin embargo, la efectividad del NaClO para la obtención de buenos índices de desinfección de semillas varía entre especies de la familia Bromeliaceae. Al respecto, se han empleado concentraciones que varían desde 0.6 % (Resende et al., 2016), 1 % (Da Silva et al., 2009; Pickens et al., 2003), 2 % (Andrade y Tamaki, 2016; Escalona et al., 2013; Nelson et al., 2015; Pérez, 2012; Pulido-Rueda et al., 2018) hasta 2.5 % (Arrigoni-Blank et al., 2013).

En esta investigación, la modificación del tiempo de exposición y el uso de una concentración mayor de NaClO en comparación con otros protocolos de desinfección en bromelias se debió al uso de material silvestre y al estudio de la anatomía de la semilla (datos no mostrados). Como es una especie endémica, rara y con una distribución tan reducida, la estrategia se orientó en limitar la pérdida de material vegetal en condiciones de laboratorio.

Los resultados presentados en esta investigación al determinar la germinación de las semillas (53.75 %) están por debajo de los valores obtenidos para otras especies de la familia Bromeliaceae, donde se han alcanzado porcentajes de germinación del 100 % (Pompelli y Guerra, 2005; Silveira et al., 2009) y valores comprendidos entre el 60 y 95 % pasados 15 días de la siembra (Arrigoni-Blank et al., 2013; Da Silva et al., 2009; Pickens et al., 2003; Pulido-Rueda et al., 2018; Resende et al., 2016). Aun así, los resultados fueron promisorios y permitieron el establecimiento aséptico de germoplasma único que funcionó para la obtención de biomasa en condición de laboratorio sin la necesidad de extraer material vegetal de las poblaciones naturales.

Ante la falta de información acerca del manejo agronómico de *P. dasylirioides*, se podrían argumentar algunas causas para explicar la germinación obtenida. Entre estas se destacan, el medio de cultivo MS, cuyas concentraciones de sales afectan el potencial osmótico del medio, y por lo tanto, disminuyen la disponibilidad del agua para las semillas (Arrigoni-Blank et al., 2013; Da Silva et al., 2009). Entre otras razones se encuentran la condición de las semillas, la maduración de la cápsula, la época del año, las condiciones fisiológicas de la germinación e inclusive un posible efecto tóxico debido a la alta concentración de NaClO para la desinfección (Pérez, 2012; Pulido-

Rueda et al., 2018; Zeng et al., 2013). Es necesario el diseño de experimentos más robustos para identificar los factores *ex vitro* e *in vitro* que permitan la optimización del proceso de germinación. También se puede evaluar la viabilidad de la semilla mediante la prueba de tetrazolio.

A pesar de que la tasa de germinación apenas sobrepasó el 50 %, los ensayos *in vitro* generaron rendimientos muy superiores a la regeneración natural de la especie. Según el estudio realizado por Augspurger (1985) en el mismo sitio de estudio donde se realizó esta investigación, una población de esta especie es capaz de producir un estimado de 13.630.275 semillas al año: sin embargo más del 90 % de las plántulas muere antes de cumplir un año debido a la época seca, lo cual representa el mayor cuello de botella para la supervivencia de la especie. Esto, sumado a que un organismo de esta especie requiere aproximadamente 36 años para alcanzar su edad reproductiva (Augspurger, 1985), es evidencia de las grandes dificultades de *P. dasyliroides* para realizar eficientemente la reproducción sexual y sobrevivir frente a la creciente presión antropológica y del calentamiento global en la zona.

Con respecto a la multiplicación *in vitro* de esta planta, sólo el tratamiento con 2iP en una concentración de 0.5 mg/l presentó significativamente mayor número de brotes que el control, con un valor de 2.75 brotes/explante. La cantidad de brotes por explante obtenida es comparable con la de otras investigaciones realizadas en especies de la familia Bromeliaceae. Por ejemplo, Da Silva y colaboradores (2012) reportaron un total de dos explantes/brote para la especie *Nidularium innocentii* y 4 explantes/brote para la especie *N. procerum* al utilizar una concentración de 2.7 µM de ANA; sin embargo, los valores están por debajo de los obtenidos en otras investigaciones utilizando metodologías similares, ya que Pérez (2012) reportó hasta 5.81 brotes/explante al realizar el corte vertical más la aplicación de una mezcla de BAP y ANA, mientras que Capote y colaboradores (2009) y Saare-Surminski y colaboradores (2008) reportaron hasta 9.5 y 16 brotes/explante, respectivamente.

Históricamente, para la multiplicación *in vitro* de algunas especies de la familia Bromeliaceae ha sido común la utilización de BAP en combinación con ANA, debido a un efecto sinérgico que promueve altos índices de formación de brotes (Arrabal et al., 2002; Carneiro et al., 1998; Da Silva et al., 2012; Escalona et al., 2013; Faria et al., 2018; Pérez, 2012; Rodrigues-Martins et al., 2014). En esta investigación, el uso de BAP no tuvo un efecto significativo en la formación de brotes para la especie *P. dasyliroides* con respecto al control. Aunque esta discrepancia con la

literatura no es común para especies de bromelias, Da Silva y colaboradores (2008) reportaron la ineficiencia del BAP para la generación de brotes en la especie *D. maritima*.

Aunque la respuesta de una planta ante la aplicación exógena de reguladores de crecimiento es altamente variable, existe una diversidad de factores que pueden afectar el crecimiento y desarrollo, entre los cuales destacan el tipo de cultivo, la concentración endógena de hormonas vegetales, la edad de la planta, la composición genética, las interacciones entre citoquininas y receptores, entre otros (Dos Santos et al., 2020; Silveira et al., 2009). A este conjunto de factores se le es atribuida la baja formación de brotes de *P. dasyliroides* en comparación con otras especies de la familia Bromeliaceae.

Con respecto a la eficiencia de la 2iP para la formación de brotes en esta especie, es importante destacar que el crecimiento y la morfogénesis en las plantas está regulado por la interacción entre fitohormonas endógenas y la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, lo cual se ha observado también en la familia Bromeliaceae (Escalona et al., 2013; Guerra and Dal Vesco, 2010). Se podría argumentar que este regulador proporciona un efecto sinérgico y potencia la producción de proteínas necesarias para una adecuada regulación de la actividad metabólica y la división celular necesaria para una posterior formación de brotes (Corredor-Prado et al., 2015; Faria et al., 2018).

La 2iP es una citoquinina que en algunas especies suele generar un efecto más potente para la formación de brotes en comparación con BAP, especialmente en bajas concentraciones (Huang et al., 2011). Es un regulador muy poco utilizado en el cultivo *in vitro* de bromelias. En *Vriesea reitzii*, el uso de este regulador fomentó la regeneración de las plantas (Dal Vesco et al., 2014), mientras que Huang y colaboradores (2011) formaron brotes a partir de callo en la especie *Aechmea fasciata*, sin obtener buenos resultados. Sin embargo, el 2iP ha demostrado su gran eficiencia para la formación de brotes en otras familias de plantas (Jana et al., 2013; Parzymies y Dabski, 2012). Una mayor presencia de 2iP en el medio se ha relacionado con la modulación de las respuestas organogénicas y la síntesis de ADN (Faria et al., 2018), en las que mediante la aplicación de un regulador exógeno las células se hacen competentes y capaces de responder a señales hormonales que inducen la formación de nuevos órganos y por lo tanto la formación de brotes adventicios (Rodrigues-Martins et al., 2014).

Mediante la realización del corte vertical en los explantes de tallo en conjunto con la presencia de 2iP fue posible reducir la dominancia apical y estimular la formación de brotes. En esta investigación, los brotes se originaron en la zona basal del explante donde se encuentran yemas axilares y elementos vasculares con gran cantidad de células competentes y capaces de responder a los reguladores de crecimiento, además de regiones derivadas del parénquima donde se produce una intensa división celular (Faria et al., 2018; Resende et al., 2016; Simão et al., 2016). Sumado a esto, es posible que los nuevos brotes se formaran a partir de meristemos axilares residuales en la base de la planta después de realizar el corte vertical (Corredor-Prado et al., 2015).

Con respecto a los demás resultados obtenidos durante el ensayo de multiplicación, la poca formación de raíces de las plantas expuestas a las diferentes citoquininas era esperado ya que estas hormonas se caracterizan por favorecer la formación de brotes e inhibir la generación de nuevas raíces (Pérez, 2012). Mientras tanto, la mayor ganancia de peso fresco y la mayor longitud de las plantas expuestas a citoquininas puede obedecer a que estas hormonas suelen incrementar la eficiencia de la planta para convertir el azúcar del medio en biomasa mediante la regulación de rutas metabólicas que coordinan del desarrollo y determinan la disponibilidad de nutrientes (Rodrigues-Martins et al., 2014).

Basados en los resultados obtenidos, esta investigación evidencia que es posible el establecimiento de la especie *P. dasylirioides* en condiciones *in vitro* y además presenta una metodología eficiente para la germinación de semillas y la multiplicación *in vitro*, lo cual se puede considerar el punto de partida para el desarrollo de un protocolo de micropropagación que permita eventualmente realizar el proceso de aclimatación de las plantas. Esto con el objetivo de proteger la especie y ser capaces de almacenar y reproducir el material vegetativamente en condiciones estériles libres de las afectaciones del medio ambiente y del ser humano.

Hasta la fecha, esta investigación corresponde al primer reporte de germinación y multiplicación *in vitro* para una especie costarricense endémica de la familia Bromeliaceae. Aun así, se recomienda continuar la investigación para lograr identificar los factores que permitan obtener una mayor tasa de germinación e investigar posibles combinaciones entre reguladores de crecimiento que brinden una mayor tasa de reproducción.

5.2 Extracción, actividad enzimática y caracterización molecular de las proteasas aisladas de extractos de *Puya dasylirioides* y comparación con proteasas previamente reportadas.

El conocimiento de la concentración, la actividad y la estabilidad de enzimas proteolíticas vegetales frente a condiciones no fisiológicas brinda información importante para una posible aplicación biotecnológica (Bruno et al., 2008). En esta investigación se obtuvieron rendimientos de concentración de proteína de hasta 4287.44 ± 651.94 y 4250.71 ± 196.78 mg/kg de masa fresca en los tejidos de la zona distal de la hoja y el tallo de la planta, respectivamente. Estos resultados son comparables con los obtenidos en otras investigaciones, por ejemplo, Hernández y colaboradores (2003) reportaron rendimientos de 3900.00 mg de proteínas por kg de tallo, Bruno (2007) obtuvo valores máximos de 3300.00 mg/kg de masa fresca en frutos de *Bromelia hieronymi*, y, por último, Pérez (2012) obtuvo valores de 597.27 mg/kg de masa fresca al extraer las enzimas a partir de tallos de la especie *Hohenbergia penduliflora*, por lo que los valores para la especie *Puya dasylirioides* se encuentran dentro del rango reportado en la literatura. No se pudieron comparar con otros valores reportados para especies de bromelias por la falta de información sobre el volumen del buffer de extracción utilizado, la cantidad de masa fresca empleada o las condiciones inespecíficas de trabajo.

Con respecto a la actividad enzimática, para lograr obtener valores sobre la actividad proteolítica de las enzimas en tejidos como el tallo y la zona basal de la hoja, fue necesario aplicar un proceso de fraccionamiento con etanol frío. Esto es algo recurrente a la hora de trabajar con extractos vegetales, debido a la presencia de moléculas como pigmentos, azúcares, flavonoides y fenoles que se unen a las proteínas por medio de puentes de hidrógeno, causando pérdidas en la actividad enzimática (Bruno, 2007; Pardo et al., 2000; Vallés y Cantera, 2018).

Gracias a la purificación fue posible determinar la actividad enzimática de fracciones de la zona basal de la hoja y del tallo, en el que destacaron principalmente los valores de 6.07 Ucas/mg y 1.26 Ucas/mg para la fracción 4 y 1 del tallo respectivamente. Estos resultados son comparables con investigaciones realizadas en otras especies de la familia Bromeliaceae. Moreno-Hernández y colaboradores (2017) obtuvieron actividades de 3.2 Ucas/mg en enzimas de la especie *B. pinguin*, Meza-Espinoza y colaboradores (2018) reportaron actividades de 1.89 y 3.48 Ucas/mg al realizar la extracción en buffer de agua utilizando frutos de *B. karatas* y *B. pinguin*, respectivamente, mientras que Pérez (2012) reportó un valor de 1.10 Ucas/mg para la especie *H. penduliflora*. Por

otra parte, los resultados de la presente investigación fueron muy inferiores a los obtenidos por Bruno (2007) y Pardo y colaboradores (2000) con valores de hasta 15 Ucas/mg en *B. hieronymi* y 35.4 Ucas/mg en extractos crudos de *Bromelia balansae*.

Uno de los factores que afectan las actividades enzimáticas es el uso ineficiente de tampones de extracción. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo indicado por Meza-Espinoza y colaboradores (2018), de que el uso de agua como tampón de extracción es ineficaz para mantener la actividad enzimática de las proteasas. Es una hipótesis que debe evaluarse en otro estudio, debido a que la actividad de las proteasas en *P. dasyliroides* no ha sido estudiada. Es necesario investigar el uso de diferentes buffers e incluso el uso de distintos pH para encontrar las condiciones óptimas de extracción que mejoren los rendimientos reportados en esta investigación. Al hacer la comparación con otras especies, es indispensable considerar también que las diferencias en las actividades catalíticas de las enzimas se ven influenciada por la composición genética única de las especies que influyen la estructura y la actividad de sus enzimas (Meza-Espinoza et al., 2018).

En relación con la capacidad para mantenerse activas frente a condiciones no fisiológicas como altas temperaturas o pH ácidos o alcalinos, se demostró que la mayor actividad enzimática sucedió a un pH ligeramente ácido, lo cual es un resultado esperado para proteasas vegetales que suelen ser activas a un pH de entre 5.6 y 6.8. Lo anterior se relaciona con la presencia de estas enzimas en vacuolas y en la pared celular, donde un pH ácido provoca alteraciones en la conformación de la enzima que permiten su adecuado procesamiento y plegamiento (Grudkowska y Zagdańska, 2004). Sin embargo, a un pH de 8 las enzimas lograron mantener cerca del 90 % de su actividad lo que sugiere la presencia de enzimas ácidas, neutras y alcalinas en la fracción utilizada (Meza-Espinoza et al., 2018).

Generalmente, las plantas de la familia Bromeliaceae se caracterizan por la producción de cisteíno-proteasas que expresan su mayor actividad a pH ligeramente alcalinos (Bruno, 2007; Bruno et al., 2008; Moreno-Henández et al., 2017; Pardo et al., 2000; Pérez, 2012), lo que difiere con lo mostrado en la especie *Puya dasyliroides*; sin embargo es importante destacar que el rango de actividad de las enzimas frente a distintos pH es altamente variable en dependencia del sustrato utilizado, la planta en estudio e inclusive las condiciones de la reacción (Pérez, 2012). Aun así, los datos reportados en esta investigación son comparables con investigaciones similares con piña,

donde se ha reportado que la mayor actividad enzimática se presentó al utilizar un pH de 6 (Silvestre et al., 2012).

Con respecto a la temperatura, se determinó que la actividad enzimática incrementa con la temperatura hasta los 57 °C. Pasado este valor, se logró observar una caída de cerca del 30 % en actividad al incubar la reacción a 67 °C. La caída se relaciona con el hecho de que a altas temperaturas inician los procesos de desnaturalización enzimática, se pierde la estructura tridimensional, se produce la oxidación del centro activo de las enzimas y por lo tanto la actividad catalítica (Pérez, 2012; Silvestre et al., 2012).

Al comparar el rendimiento de *P. dasyliroides* con plantas de la misma familia, las enzimas se comportan mejor en comparación con las encontradas en la especie *H. penduliflora* (A. Rich.) Mez, donde a 57 °C se reportó la pérdida de actividad en más del 35 %, siendo su temperatura óptima a 45 °C (Pérez, 2012). Sin embargo, los resultados se quedan por debajo de especies como *Bromelia antiacantha* y *Ananas comosus*, donde se han reportado picos de actividad hasta los 70 °C (Silvestre et al., 2012; Vallés y Cantera, 2018). Estos resultados sugieren que las enzimas de *P. dasyliroides* parecen ser sensibles a altas temperaturas, lo que puede afectar su rendimiento en procesos industriales.

Posterior a la purificación por HPLC de las enzimas presentes en la fracción dos del tallo, se logró la identificación de una posible enzima proteolítica con una masa aparente de 45 kDa. En especies de la familia Bromeliaceae, la mayoría de los reportes de enzimas proteolíticas corresponden a cisteíno-proteasas con masas moleculares en el rango de los 21 a 30 kDa (Bruno et al., 2008; Maras et al., 2018; Meza-Espinoza et al., 2018; Moreno-Hernández et al., 2017; Pérez, 2012); sin embargo, proteasas con altos pesos moleculares también han sido reportadas, tal es el caso de la especie *B. karatas*, en la cual se encontraron proteasas con pesos moleculares entre 60 y 97 kDa (Ávalos-Flores et al., 2022; Meza-Espinoza et al., 2018). También, Brullo y colaboradores (1994), reportaron una proteasa de 54 kDa en *Pseudananas macrodontes* y recientemente en *A. comosus* fueron reportadas proteasas de 45, 55 y 60 kDa (Bhagavathy et al., 2019; Raimbault et al., 2013).

Con los avances en la secuenciación de genomas y la obtención del genoma completo de la piña (Redwan et al., 2016), se lograron identificar más de 14 genes codificantes para cisteíno-proteasas, en las cuales se determinó su tamaño teórico en el rango de los 19 a los 200 kDa (Razali

et al., 2020; Redwan et al., 2016). Estos hallazgos respaldan la posibilidad de que una planta perteneciente a la familia Bromeliaceae pueda producir enzimas proteolíticas de alto peso molecular como la encontrada en esta investigación.

Además de las características genéticas de la especie en estudio, hay que considerar la posibilidad de que el alto peso molecular de la enzima encontrada sea producto de la presencia de complejos homoméricos o heteroméricos que no se lograron disociar durante la preparación de la mezcla bajo condiciones desnaturalizantes (Ávalos-Flores et al., 2022), lo que resulta en una proteína con ensamblaje de múltiples subunidades. Por último, a pesar de que las serino-proteasas han sido poco estudiadas en la familia Bromeliaceae, existe la posibilidad de que la enzima encontrada sea una serino-proteasa y no una cisteíno proteasa. Esta hipótesis se basa en que las serino-proteasas suelen tener pesos moleculares mayores, alcanzando masas moleculares de hasta 97 kDa (Meza-Espinoza et al., 2018), además de que los péptidos identificados mediante espectrometría de masas tuvieron un porcentaje de similitud alto con una serino-proteasa de piña (Figura 24).

Basados en la concordancia de los resultados obtenidos mediante zimografía, SDS-PAGE y la comparación de los péptidos con las bases de datos de Uniprot, así como, con el soporte de la bibliografía encontrada a la fecha de desarrollo de este proyecto, se puede asegurar con un alto grado de confianza que se logró verificar la presencia de enzimas proteolíticas en extractos de la planta *Puya dasylirioides*, además de lograr la purificación de una de ellas con una masa aparente de 45 kDa, posiblemente nunca antes descrita en la literatura.

Esta investigación corresponde al primer informe acerca de enzimas proteolíticas a partir de una especie del género *Puya*, además del primer estudio sobre una planta de la familia Bromeliaceae endémica de Costa Rica. Se espera que esta investigación sienta las bases y abra las puertas para la bioprospección sistemática y el estudio del potencial biotecnológico de especies endémicas.

6. Conclusiones

La planta *Puya dasylirioides* fue satisfactoriamente establecida *in vitro* mediante el uso de semillas como explante vegetal. También, se desarrolló un procedimiento de multiplicación de las plantas en condiciones controladas de laboratorio. Gracias a esto, fue posible generar material vegetal que puede ser utilizado en futuras investigaciones sin la necesidad de recolectar material silvestre.

Mediante la generación de extractos parcialmente purificados fue posible verificar 1) la presencia de enzimas proteolíticas en los tejidos del tallo y en la parte distal y basal de la hoja, así como, 2) su nivel de actividad enzimática y 3) su capacidad de mantenerse activas frente a condiciones no fisiológicas. Además, mediante HPLC se logró la purificación de una enzima proteolítica extraída a partir del tallo de la planta, la cual cuenta con una masa aparente cercana a los 45 kDa.

Ya que en Costa Rica aún quedan más de 30 especies endémicas de Bromelias sin estudiar, esta investigación se podría considerar el punto de partida para estudios de aislamiento, caracterización y purificación de proteasas mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, no solo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad Nacional, sino también en otros centros de investigación del país. Es necesario impulsar investigaciones de bioprospección de especies promisorias para el aprovechamiento del gran potencial biológico presente en Costa Rica.

7. Recomendaciones

- Realizar estudios fenológicos de la especie en estudio para determinar en qué momento del año es recomendable la colecta de material vegetal, y que tipo de explante utilizar. Esto con el objetivo de aumentar las probabilidades de establecer la planta *in vitro* satisfactoriamente.
- Efectuar una fase preparativa (Fase 0) con la planta silvestre antes de ser utilizada como explante para el establecimiento *in vitro*. Esto con el propósito de disminuir la cantidad de

hongos y bacterias en la superficie de la planta y facilitar el proceso de desinfección del material vegetal.

- Utilizar sistemas de inmersión temporal para aumentar la multiplicación de la planta *in vitro* y, por lo tanto, la disponibilidad de material vegetal para posteriores ensayos.
- Optimizar la extracción de enzimas en *P. dasyliroides* mediante el uso de distintos buffers de extracción y distintos valores de pH.
- Realizar ensayos de inhibición de la actividad proteolítica para verificar los tipos de proteasas presentes en los extractos (serino, cisteíno o aspártica).
- Complementar los ensayos bioquímicos realizados en esta investigación con análisis moleculares que permitan elucidar la estructura primaria de las proteínas purificadas, y así reportarlas como nuevas moléculas para la literatura.

8. Fuentes de Financiamiento

Este proyecto final de graduación fue financiado por recursos propios del Laboratorio de Biotecnología de Plantas (LBP) de la Universidad Nacional de Costa Rica y gracias al apoyo económico del Fondo de fortalecimiento de las capacidades estudiantiles (FOCAES-Extensión).

9. Conflictos de Interés

El autor declara que no existen conflictos de interés.

10. Referencias

Allied Market Research. (2018). Enzymes Market Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, and Other Types), Source (Microorganisms, Plants, and Animals), Reaction Type (Hydrolase, Oxidoreductase, Transferase, Lyase, and Other Reaction Types), and Application (Food and Beverages, Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and Biotechnology, Feed, and Other Applications) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2017-2024: Accesado el 29 de junio del 2020 en <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>

- Amini, A., Masoumi-Moghaddam, S., y Morris, D. L. (2016). *Utility of bromelain and N-acetylcysteine in treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal mucin-producing malignancies*. Springer International Publishing <https://doi.org/10.1007/978-3-319-28570-2>
- Andrade, S.V., y Tamaki, V. (2016). In Vitro Growth of *Nidularium Minutum* Mez (Bromeliaceae) in Different Concentrations of Nitrogen , Phosphorus , Potassium , and Calcium. *Journal or Plant Nutrition.*, 39, 1634-1643. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1161775>
- Apte, P.V., Kaklij, G.S., y Heble, M.R. (1979). Proteolytic enzymes (Bromelains) in tissue Cultures of *Ananas sativus* (pineapple). *Plant Science. Letters.* 14, 57–62. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(79\)90154-8](https://doi.org/10.1016/0304-4211(79)90154-8)
- Arrabal, R., Amancio, F., Carneiro, L.A., Neves, L.J., y Mansur, E. (2002). Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation.* 11(6), 1081–1089. <https://doi.org/10.1023/A:1015860804695>
- Arrigoni-Blank, M. de F., dos Santos, F., de Oliveira, A.C.L., Santos, M. de S., Menezes, T.S.A., y Blank, A.F. (2013). *In vitro* germination of seeds and acclimatization of Macambira (*Bromelia laciniosa* Martius ex Schultes f.) seedlings. *Revista de Ciências Agrárias - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences.* 56, 68–71. <https://doi.org/10.4322/rca.2013.083>
- Augspurger, C. K. (1985). Demography and life history variation of *Puya dasylirioides*, a long-lived rosette in tropical subalpine bogs. *Oikos*, 45(3), 341–352. <https://doi.org/10.2307/3565569>
- Ávalos-Flores, E., López-Castillo, L.M., Wielsch, N., Hupfer, Y., Winkler, R., y Magaña-Ortiz, D. (2022). Protein extract of *Bromelia karatas* L. rich in cysteine proteases (ananain- and bromelain-like) has antibacterial activity against foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. *Folia Microbiologica*, 67(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00906-9>
- Barampuram, S., Allen, G., y Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0472-x>

- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., y O'Brien, E. A. (2001). The *MEROPS* database as a protease information system. *Journal of Structural Biology*, 134(2–3), 95–102. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4332>
- Baweja, M., Tiwari, R., Singh, P. K., Nain, L., y Shukla, P. (2016). An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: Functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01195>
- Beers, E. P., Woffenden, B. J, y Zhao, C. (2000). Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, 44(3), 399–415. <https://doi.org/10.1023/A:1026556928624>
- Behnke, J. M., Buttle, D. J., Stepek, G., Lowe, A., y Duce, I. R. (2008). Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasites and Vectors*, 1(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-29>
- Bekhit, A. A., Hopkins, D. L., Geesink, G., Bekhit, A. A., y Franks, P. (2013). Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(8), 1012–1031. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.623247>
- Benucci, I., Liburdi, K., Garzillo, A. M. V., y Esti, M. (2011). Bromelain from pineapple stem in alcoholic-acidic buffers for wine application. *Food Chemistry*, 124(4), 1349–1353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.087>
- Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T., y Bond, J. S. (2003). Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), 2522–2532. <https://doi.org/10.1074/jbc.m208808200>
- Beuth, J. (2008). Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: Fact or fiction? *Integrative Cancer Therapies*, 7(4), 311–316. <https://doi.org/10.1177/1534735408327251>
- Bhagavathy, S., Pushya, K., Gayathridevi, R., y Jeniffer, J. (2019). Purification, characterization and application of bromelain from *Ananas comosus*. *Journal of Applied and Advanced Reseach*, 4(5), 133–140. <https://doi.org/10.21839/jaar.2019.v4i5.304>

- Barboza, S.B.S.C., Caldas, L.S., y Souza, L.A.C. (2004). Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 39, 725–733. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2004000800001>
- Bhui, K., Tyagi, S., Prakash, B., y Shukla, Y. (2010). Pineapple bromelain induces autophagy, facilitating apoptotic response in mammary carcinoma cells. *BioFactors* 36, 474–482. <https://doi.org/10.1002/biof.121>
- Bond, J. S. (2019). Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 294(5), 1643–1651. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004156>
- Brien, S., Lewith, G., Walker, A., Hicks, S. M., y Middleton, D. (2004). Bromelain as a treatment for osteoarthritis: a review of clinical studies. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(3), 251–257. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh035>
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y.S., Penfold, C.A., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S., Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J.D., Wild, D.L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A., y Buchanan-Wollaston, V. (2011). High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *The Plant Cell* 23, 873–894. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083345>
- Briones, R., Hernández, M., y Cortés, I.M. (2009). *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores (1a ed.)*. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Capítulo 19. Sistemas de producción de fitoproteasas. Buenos Aires, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo – CYTED
- Brullo, A., Hilal, R.M., Natalucci, C.L., y Caffini, N.O. (1994). Estudio preliminar de “Macrodontina”, una nueva cisteinilproteínasa aislada de frutos de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 13(1), 41–47. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7170>
- Bruno, M. A. (2007). *Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas de Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae)* (Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de la Plata, Argentina). Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2348>
- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., y López, L. M. I. (2008). Purification and

- characterization of hieronymain III. Comparison with other proteases previously isolated from *Bromelia hieronymi* Mez. *Protein Journal*, 27(7–8), 426–433. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9152-1>
- Burckett, J., de Buzzaccarini, F., De Clerck, K., Demeyere, H., Labeque, R., Lodewick, R., y van Langenhove, L. (2007). Laundry Cleaning of Textiles. Handb. *Cleaning/Decontamination Surfaces* 57–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51664-0.50003-6>
- Cabral, H., Leopoldino, A.M., Tajara, E.H., Greene, L.J., Faca, V.M., Mateus, R.P., Ceron, C.P., de Souza Judice, W.A., Juliano, L., y Bonilla-Rodriguez, G.O. (2005). Preliminary Functional Characterization, Cloning and Primary Sequence of Fastuosain, a Cysteine Peptidase Isolated from Fruits of *Bromelia fastuosa*. *Protein & Peptide Letters*, 13(1), 83–89. <https://doi.org/10.2174/092986606774502072>
- Cáceres-Gonzales, D.A., Schulte, K., Schmidt, M., y Zizka, G. (2013). Diversity and levels of endemism of the Bromeliaceae of Costa Rica – an updated checklist. *PhytoKeys*, 29, 17–62. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.29.4937>
- Capote, I., Escalona, M., Daquinta, M., Pina, D., González, J., y Aragon, C. (2009). Propagación *in vitro* de *Vriesea* en sistemas de inmersión temporal. *Bioteconología Vegetal*, 9(3), 161–167. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/318>
- Carneiro, L.A., Araújo, R.F.G., Brito, G.J.M., Fonseca, M.H.P.B., Costa, A., Crocomo, O.J., y Mansur, E. (1998). *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55(2), 79–83. <https://doi.org/10.1023/A:1006186627580>
- Castro, J.A., Araque, E.J., Pacheco, J.E. y Pacheco, J.C. (2018). Micropropagación y determinación del número cromosómico de *Puya trianae* con fines de conservación y uso ornamental. *Revista Peruana de Biología*. 25, 267. <https://doi.org/10.15381/rpb.v25i3.15210>
- Chao, Y. P, Xie, F. H, Yang, J., Lu, J. H., y Qian, S. J. (2007). Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. *Journal of Environmental Sciences*, 19(9), 1125–1128. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60183-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60183-1)
- Choudhary, R. B., Jana, A. K., y Jha, M. K. (2004). Enzyme technology applications in leather

- processing. *Indian Journal of Chemical Technology*, 11(5), 659–671.
<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/9527>
- Corredor-Prado, J.P., Schmidt, E.C., Guerra, M.P., Bouzon, Z.L., Dal Vesco, L.L., y Pescador, R. (2015). Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (L.B. Smith) L.B. Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). *Journal of Microscopy Ultrastructure*, 3(4), 200-209.
<https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.04.001>
- Corrons, M.A., Bertucci, J.I., Liggieri, C.S., López, L.M.I., y Bruno, M.A. (2012). Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *LWT - Food Science and Technology*. 47, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.028>
- Da Silva, A.L.L., Da Luz Costa, J., De Alcantara, G.B., De Carvalho, D.C., Ruzza Schuck, M., Biasi, L.A., Scheidt, G.N., y Soccol, C.R. (2012). Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 44(3), 1095–1101. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(3\)/38.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/44(3)/38.pdf)
- Da Silva, A.L.L., Franco, E.T.H., Dornelles, E.B., Bortoli, C.L.R., y Quoirin, M. (2009). *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). *Iheringia – Serie Botanica*, 64(2), 151–156. <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/128>
- Da Silva, A.L.L., Franco, E.T.H., Dornelles, E.B., y Gesing, J.P.A. (2008). Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. *Iheringia – Serie Botanica*, 63(1), 135–138. <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/162>
- Dal Vesco, L.L., Vieira, P.M., Corredor, J.P., Pescador, R., Elter, L.J., y Guerra, M.P. (2014). Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89, 542–548. <https://doi.org/10.1080/14620316.2014.11513118>
- Daud, N.H., Jayaraman, S., y Mohamed, R. (2012). Methods paper: An improved surface sterilization technique for introducing leaf, nodal and seed explants of *Aquilaria malaccensis* from field sources into tissue culture. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 20(2), 55–58.

- De Oliveira Paiva, P.D., Naves, V.C., Dutra, L.F., Paiva, R., y Pasqual, M. (2009). In vitro propagation of *Nidularium Fulgens* lem. *Interciencia* 34, 593–596.
- del Pezo, K. A. (2018). *Determinación de la actividad proteolítica de la enzima bromelina obtenida de la corteza de Ananas comosus sobre extracto acuoso de carne* (Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil, Ecuador). Recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/36132>
- Devaraj, K.B., Gowda, L.R., y Prakash, V. (2008). An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry* 69, 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.003>
- Dhandayuthapani, S., Perez, H.D., Paroulek, A., Chinnakkannu, P., Kandalam, U., Jaffe, M., y Rathinavelu, A. (2012). Bromelain-induced apoptosis in GI-101A breast cancer cells. *Journal of Medicinal Food* 15, 344–349. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0145>
- Diaz-Mendoza, M., Velasco-Arroyo, B., Santamaria, M.E., González-Melendi, P., Martinez, M., y Diaz, I. (2016). Plant senescence and proteolysis: Two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology*. 39, 329–338. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0015>
- Dighe, N. S., Pattan, S. R., Merekar, A. N., Laware, R. B., Sanjay, B., Nirmal, S. N., Vinayak, M. G., Hole, M., B., y Musmade, D. S. (2010). Bromelain a wonder supplement: A review. *Pharmacologyonline Newsletter.*, 18, 11–18.
- Domingues, L.F., Giglioti, R., Feitosa, K.A., Fantatto, R.R., Rabelo, M.D., Oliveira, M.C. de S., Oliveira, G.P. de, Bechara, G.H., y Chagas, A.C. de S. (2013). In vitro activity of pineapple extracts (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 134, 400–404. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.021>
- Domsalla, A., y Melzig, M.F. (2008). Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta Medica*. 74, 699–711. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074530>
- Dos Santos, S.S., de Souza, E.H., Nepomuceno, C.F., Souza, F.V.D., y Costa, M.A.P. (2020). Micropropagation and *in vitro* conservation of *Alcantarea nahoumii* (Bromeliaceae), an endemic and endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. *Acta Scientiarum* -

Biological Sciences, 42(1), 1–10. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsoci.v42i1.52940>

Errasti, M. E. (2013). *Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con bromelina*. (Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de la Plata, Argentina). Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/31727>

Errasti, M. E., Natalucci, C. L., Caffini, N. O., Rotelli, A. E., Brullo, A., Maras, B., Trejo, S., A., y López, L. M. I. (2018). Structural properties of macrodontanin I, a cysteine protease from *Pseudananas macrodantes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(1), 186–198. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2725-3>

Escalona, M., Pérez, A., Mora, M., Lorenzo, J.C., Carvajal, C., Aragón, C., González, J., Hernández, M., Daquinta, M., Laudat, T., y Trujillo, R. (2013). Micropropagation of *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. for sustainable production of plant proteases. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35(8), 2525–2537. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1288-8>

Estelle, M. (2001). Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 254–260. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00169-2)

Faria, D.V., Simão, M.J., Cipriano, R., Werner, E.T., Soares, T.C.B., Aoyama, E.M., y Lima-Gontijo, A.B.P. (2018). *In vitro* morphogenesis and micropropagation of *Aechmea ramosa* var. *ramosa* Mart. ex Schult. f. (Bromeliaceae) from leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 54(5), 530–536. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9907-0>

Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Rodríguez-Rama, J. L., Barros-Velázquez, J., Miguel, T. de, Sánchez-Pérez, A., y Villa, T. G. (2014). Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. *Recent Advances in DNA & Gene Sequences*, 8(1), 44–55. <https://doi.org/10.2174/2352092208666141013231720>

Feijoo-Siota, L., y Villa, T. G. (2011). Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066–1088. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0431-4>

Fernández, G. y Pomilio, A. B. (2003). Optimized growth conditions and determination of the catalytic type of the peptidase complex from a novel callus culture of pineapple (*Ananas comosus*). *Molecular Medicinal Chemistry*, 1(1), 39–49.

<http://www.idecefyn.com.ar/mmcv01/vol01.htm>

- Foroughi, F., Keshavarz, T., y Evans, C. S. (2006). Specificities of proteases for use in leather manufacture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81(3), 257–261. <https://doi.org/10.1002/jctb.1367>
- Fráguas, C. B., Pasqual, M., Dutra, L. F., y Cazetta, J. O. (2004). Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) ‘Roxo de Valinhos’ plants. *In Vitro Cellular y Developmental Biology – Plant*, 40(5), 471–474. <https://doi.org/10.1079/ivp2004562>
- Freitas, C.D.T., Oliveira, J.S., Miranda, M.R.A., Macedo, N.M.R., Sales, M.P., Villas-Boas, L.A., Ramos, M.V. (2007). Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45, 781–789. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.020>
- Gargiullo, M. B., Magnuson, B. L., y Kimball, L. D. (2008). *A field guide to plants of Costa Rica*. Oxford University Press. Nueva York, EEUU.
- George, E.F., Hall, M.A., y De Klerk, G.J. (2008). *Plant propagation by tissue culture* (3rd ed.). Springer.
- Givnish, T. J., Barfuss, M. H. J., van Ee, B., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P., A., Jabaily, R., S., Crayn, D., M., Smith, A., C., y Sytsma, K. J. (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, 98(5), 872–895. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000059>
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., y Oliver-Salvador, M. del C. (2011). Production of plant proteases *in vivo* and *in vitro* – A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983–996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>
- Gouda, E.J., Butcher, D. & Dijkgraaf, L. (2023). Encyclopaedia of Bromeliads, Version 5. Utrecht University Botanic Gardens, online <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>(accessed: [04-06-2023]).
- Grbavčić, S., Bezbradica, D., Izrael-Živković, L., Avramović, N., Milosavić, N., Karadžić, I., y Knečević-Jugovi, Z. (2011). Production of lipase and protease from an indigenous

- Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Bioresource Technology*, 102(24), 11226–11233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.076>
- Grudkowska, M., y Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 609–624. https://doi.org/10.18388/abp.2004_3547
- Guerra, M.P., y Dal Vesco, L.L. (2010). *Strategies for the Micropropagation of Bromeliads*. En: Jain, S., Ochatt, S. (eds) *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*. *Methods in Molecular Biology*, vol 589. Humana Press. https://doi-org.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/10.1007/978-1-60327-114-1_6
- Gupta, R., Beg, Q., y Lorenz, P. (2003). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15–32. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0975-y>
- Hale, L. P., Greer, P. K., y Sempowski, G. D. (2002). Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell surface molecules involved in cellular adhesion and activation. *Clinical Immunology*, 104(2), 183–190. <https://doi.org/10.1006/clim.2002.5254>
- Heredia-Sandoval, N., Valencia-Tapia, M., Calderón de la Barca, A., y Islas-Rubio, A. (2016). Microbial proteases in baked goods: modification of gluten and effects on immunogenicity and product quality. *Foods*, 5(4), 59. <https://doi.org/10.3390/foods5030059>
- Hernández, M., Pérez, A., M^a, Martín, I., y Natalucci, C., L. (2009). *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores (1a ed.)*. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Capítulo 11. Cultivos in vitro: una alternativa en la producción de proteasas. Buenos Aires, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo – CYTED
- Hernández, M., Chávez, M. D., Báez, R., Carvajal, C., Márquez, M., Morris, H., Santos, R., González, J. L., Quesada, V., y Rodríguez, C. (2003). Nueva tecnología para la obtención de un preparado de bromelina de tallo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Biotecnología Aplicada*, 20(3), 180–182. <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/ContenidoIssue.asp?ID=10>
- Hernández, M., Chávez, M., Márquez, M., Rodríguez, G., Santos, R., González, J., y Carvajal, C. (1997). Proceso de obtención de bromelina a partir de tallos de piña. Patente Cubana C12

N9/50.

- Hornung-Leoni, C.T., y Sosa, V. (2008). Morphological phylogenetics of *Puya* subgenus *Puya* (Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 156, 93–110. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00740.x>
- Huaman, Y., Moreira-turcq, P., Espinoza, R., Llanos, R. (2020). Influence of climate changes on carbon accumulation in high andean peatlands during the last 2 500 years. *Ecología Aplicada*. 19, 35-41. <https://doi.org/10.21704/rea.v19i1.1444>
- Huang, P. L., Liao, L. J., Tsai, C. C., y Liu, Z. H. (2011). Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(1), 73–78. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9843-0>
- Jana, S., Sivanesan, I., y Jeong, B. R. (2013). Effect of cytokinins on *in vitro* multiplication of *Sophora tonkinensis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(7), 549–553. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60111-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60111-2)
- Jinka, R., Ramakrishna, V., Rao, S.K., y Rao, R.P. (2009). Purification and characterization of cysteine protease from germinating cotyledons of horse gram. *BMC Biochemistry*. 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-10-28>
- Johnson, G. D., y Jiang, W. (2005). Characterization of cathepsin L secreted by Sf21 insect cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.09.011>
- Karnchanatat, A., Tiengburanatam, N., Boonmee, A., Puthong, S., Sangvanich, P. (2011) Zingipain, a cysteine protease from *Zingiber ottensii* valetton rhizomes with antiproliferative activities against fungi and human malignant cell lines. *Preparative Biochemistry Biotechnology*. 41, 138–153. <https://doi.org/10.1080/10826068.2011.547347>
- Kidrič, M., Kos, J., y Sabotič, J. (2014). Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. *Botanica Serbica* 38, 139–158.
- Körfer, G., Martinez, R., Jakob, F., Vojcic, L., Pitzler, C., Schwaneberg, U., Maurer, K.-H. (2015). Advances in protease engineering for laundry detergents. *New Biotechnology*. 32, 629–634. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.12.010>

- Kulkarni, V.B., Achar, R.R., Mahadevappa, M., Manjegowda, D.S., Shubha, P.B., Puttappa, S., y Swamy, S.N. (2019). Hemostatically potent small molecular weight serine protease from *Maclura spinosa* (Roxb. ex Willd.) accelerates healing of subcutaneous dermal wounds in Swiss albino mice. *Biologia (Bratisl)*. 14, 1–11. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00322-y>
- Kyndt, T., Van Damme, E.J.M., Van Beeumen, J., y Gheysen, G. (2007). Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp. *The FEBS Journal*. 274, 451–462. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05592.x>
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., y Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>
- Liggieri, C., Obregón, W., Trejo, S., Priolo, N. (2009). Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*. 41, 154–162. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmn018>
- López-García, B., Hernández, M., y Segundo, B.S. (2012). Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 55, 62–67. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03258.x>
- López-Otín, C., y Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.r800035200>
- López, L., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D., y Caffini, N. O. (2000). Purification and characterization of macrodontanin I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodantes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Protein Expression and Purification*, 18(2), 133–140. <https://doi.org/10.1006/prev.1999.1165>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1), 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Luther, H. E. (2008). *An alphabetical list of bromeliad binomials*. Bromeliad Society International.

- Mahajan, R., Chaudhari, G., y Chopadaa, M. (2015). Report on biotechnological applications of proteolytic enzymes from lattices of euphorbian plants. *Journal of Applied Biotechnology Reports Original*, 2(4), 333–337. http://www.biotechrep.ir/article_69203.html
- Mahajan, R. T., y Badgujar, S. B. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9), 2048–2068. http://jprsolutions.info/article_detail.php?article_id=991
- Mahajan, S., Chandra, V., Dave, S., Nanduri, R., Gupta, P. (2012). Stem bromelain-induced macrophage apoptosis and activation curtail mycobacterium tuberculosis persistence. *The Journal of Infectious Diseases*. 206, 366–376. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis354>
- Maras, B., Brullo, A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., Rotelli, A. E., López, L. M. I., Errasti, M. E., y Natalucci, C. L. (2018). Structural properties of macrodontan I, a cysteine protease from *Pseudananas macrodantes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(1), 186–198. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2725-3>
- Martínez, D.E., Bartoli, C.G., Grbic, V., y Guiamet, J.J. (2007). Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany*. 58, 1099–1107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl270>
- Maurer, H. R. (2001). Bromelain; biochemistry pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(9), 1234–1245. <https://doi.org/10.1007/PL00000936>
- Meza-Espinoza, L., Vivar-Vera, M., García-Magaña, M., Sáyago-Ayerdi, S. G., Chacón-López, A., Becerrea-Verdín, E. M., y Montalvo-González, E. (2018). Enzyme activity and partial characterization of proteases obtained from *Bromelia karatas* fruit and compared with *Bromelia pinguin* proteases. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 509–517. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0244-6>
- Miller, M. F., Carr, M. A., Ramsey, C. B., Crockett, K. L., y Hoover, L. C. (2016). Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *Journal of Animal Science*, 79(12), 3062–3068. <https://doi.org/10.2527/2001.79123062x>
- Minitab 19 Statistical Software (2019). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)

- Montes, C., Amador, M., Cuevas, D., y Cordoba, F. (1990). Subunit structure of karatasin, the proteinase isolated from: *Bromelia plumieri* (karatas). *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 17–24. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10869883>
- Moreno-Hernández, J. M., Hernández-Mancillas, X. D., Navarrete, E. L. C., Mazorra-Manzano, M. Á., Osuna-Ruiz, I., Rodríguez-Tirado, V. A., y Salazar-Leyva, J. A. (2017). Partial characterization of the proteolytic properties of an enzymatic extract from “Aguama” *Bromelia pinguin* L. fruit grown in Mexico. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 181–196. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2319-x>
- Mótyán, J., Tóth, F., y Tözsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3, 923–942. <https://doi.org/10.3390/biom3040923>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., y Kent, F. (2010). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nagarathnam, R., Rengasamy, A., Balasubramanian, R. (2010). Purification and properties of cysteine protease from rhizomes of *Curcuma longa* (Linn.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90, 97–105. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3789>
- Natalucci, C. L., Brullo, A., López, L. M. I., Hilal, R. M., y Caffini, N. O. (1996). Macrodontin, a new protease isolated from fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). *Journal of Food Biochemistry*, 19(6), 443–454. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1995.tb00547.x>
- Natalucci, C. L., Payrol, J. A., Bruno, M. A., Martin, I., Pardo, M. F., Pérez, A. T., Hernández, M., y Caffini, N. O. (2009). Fuentes naturales de fitoproteasas. Proteasas de Bromeliaceae. En M. Hernández. (Ed), *Enzimas Proteolíticas de Vegetales Superiores. Aplicaciones Industriales* (pp. 41-55). Buenos Aires, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo – CYTED
- Nelson, B. J., Asare, P.A., y Junior, R. A. (2015). *In vitro* growth and multiplication of pineapple under different duration of sterilization and different concentrations of benzylaminopurine and sucrose. *Biotechnology*, 14(1), 35–40. <https://doi.org/10.3923/biotech.2015.35.40>
- Niyonzima, F. N., y More, S. (2015). Detergent-compatible proteases: Microbial production,

- properties, and stain removal analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(3), 233–258. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907183>
- Obregon, W., Liggieri, C., Morcelle, S., Trejo, S., Aviles, F., y Priolo, N. (2009). Biochemical and PMF MALDI-TOF Analyses of Two Novel Papain-Like Plant Proteinases. *Protein and Peptide Letters*. 16, 1323–1333. <https://doi.org/10.2174/092986609789353736>
- Ochoa, N., Agundis, C., y Córdoba, F. (1987). Isolation and partial characterization of *Bromelia hemisphaerica* protease by affinity chromatography. *Preparative Biochemistry*, 17(4), 337–347. <https://doi.org/10.1080/00327488708062500>
- Odutayo, O. I., Amusa, N. A., Okutade, O. O., y Ogunsanwo, Y. R. (2007). Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. *African Journal of Agricultural Research*, 2(3), 67–72. <https://doi.org/10.5897/AJAR.9000650>
- Omamor, I. B., Asemota, A. O., Eke, C. R., y Eziashi, E. I. (2007). Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian Institute for Oil Palm Research (NIFOR). *African Journal of Agricultural*, 2(10), 534–537. <https://doi.org/10.5897/AJAR.9000361>
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., y del Río, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 521–530. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01404-3)
- Panjaitan, S. B., Aziz, M. A., Rashid, A. A., y Saleh, N. M. (2007). *In-vitro* plantlet regeneration from shoot tip of field-grown hermaphrodite papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(6), 827–832. http://www.fspublishers.org/published_papers/4988_..pdf
- Pardo, M. F., López, L. M. I., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., y Caffini, N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3795–3800. <https://doi.org/10.1021/jf0002488>
- Parisi, M., Moreno, S., Fernández, C. (2002). Characterization of a novel cysteine peptidase from tissue culture of garlic (*Allium sativum* L.). *In Vitro Cellular and Development Biology –*

Plant, 38, 608–612. <https://doi.org/10.1079/IVP2002344>

- Parzymies, M., y Dabski, M. (2012). The Effect of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of *Clematis viticella* (L.) and *Clematis integrifolia* 'Petit Faucon'. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 11(1), 81–91. <https://czasopisma.up.lublin.pl/index.php/asphc/article/view/3005>
- Pasqual, M., y Ferreira, E. A. (2007). Micropropagation of Fig. tree (*Ficus carica* L.). In S. M. Jain, y H. Häggman (Eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (pp. 409–416). Dordrecht, The Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_37
- Payrol, J. A., Obregón, W. D., Natalucci, C. L., y Caffini, N. O. (2005). Reinvestigation of the proteolytically active components of *Bromelia pinguin* fruit. *Fitoterapia*, 76(6), 540–548. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.04.021>
- Pereira, F.D., Pinto, J.E.B.P., Rosado, L.D.S., Rodrigues, H.C.A., Bertolucci, S.K.V., y Lameira, O.A. (2008). Micropropagation of the fiber-rich Amazonian species *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae). *HortScience* 43, 2134–2137. <https://doi.org/10.21273/hortsci.43.7.2134>
- Pérez, A.M. (2012). Alternativas para la obtención de proteasas a partir de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. (Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas, Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas, Cuba).
- Pérez, A. T., Carvajal, C., Torres, M. J., Martín, M. I., Pina, D., Trujillo, R., Lorenzo, J. C., Natalucci, C. L., y Hernández, M. (2006). Actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia *Bromeliaceae*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000200003&lng=es&nrm=iso
- Pérez, A., Carvajal, C., Trejo, S., Torres, M. J., Martín, M. I., Lorenzo, J. C., Natalucci, C. L., y Hernández, M. (2010). Penduliflorain I: A cysteine protease isolated from *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez (Bromeliaceae). *Protein Journal*, 29(4), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9243-7>
- Pesquet, E. (2012). Plant proteases - from detection to function. *Physiologia Plantarum*. 145, 1–4.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01614.x>

- Pickens, K., Affolter, J. M., Wetzstein, H. Y., y Wolf, J. H. D. (2003). Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. *HortScience*, 38(1), 101–104. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.1.101>
- Pompelli, M. F., y Guerra, M. P. (2005). Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5, 117–124. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v05n01a16>
- Pulido-Rueda, E. E., Milaneze-Gutierrez, M. A. y Negrelle, R. (2018). *In vitro* germination and growth of *Vriesea incurvata* Gaudich. (Bromeliaceae). *Acta Agronómica*, 67(1), 140–145. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.58551>
- Raimbault, A. K., Zuily-Fodil, Y., Soler, A., Cruz de Carvalho, M. H. (2013). A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus*): Cloning, characterization and relation to postharvest chilling stress resistance. *Journal of Plant Physiology*, 170(17), 1536–1540. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.06.007>
- Rani, K., Rana, R., y Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*, 2(1), 12–18.
- Rawlings, N. D., y Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290(1), 205–218. <https://doi.org/10.1042/bj2900205>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., y Finn, R. D. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
- Razali, R., Kumar, V., y Budiman, C. (2020). Structural insights into the enzymatic activity of cysteine protease bromelain of MD2 pineapple. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 23(6), 829–838. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.829.838>
- Redwan, R. M., Saidin, A., y Kumar, S. V. (2016). The draft genome of MD-2 pineapple using hybrid error correction of long reads. *DNA Research*, 23(5), 427–439. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw026>

- Resende, C.F. De Ribeiro, C., Mendes, G.C., Quinhones, C., Soares, G., Braga, V.F., Paula, B., Forzza, R.C., Henrique, P., y Peixoto, P. (2016). In vitro culture of *Vriesea cacuminis* L.B. Sm. (Bromeliaceae): an endemic species of Ibitipoca State Park, MG, Brazil. *Iheringia - Serie Botânica* 71, 55–61.
- Rodrigues-Martins, J. P., Schmidt, E. R., Alexandre, R. S., De Castro, E. M., Nani, T. F., Pires, M. F., y Pasqual, M. (2014). Direct organogenesis and leaf-anatomy modifications *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (Vellozo) L.B. Smith (Bromeliaceae). *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2179–2187. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46\(6\)/35.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/46(6)/35.pdf)
- Romero, S.E.G., y Grau, A. (2009). Las especies de Puya(Bromeliaceae) en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 44, 175–208.
- Rosenberg, L., Krieger, Y., Bogdanov-Berezovski, A., Silberstein, E., Shoham, Y., y Singer, A.J. (2014). A novel rapid and selective enzymatic debridement agent for burn wound management: A multi-center RCT. *Burns* 40, 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.08.013>
- Saare-Surminski, K., Pisowotzki, C., y Lieberei, R. (2008). Shoot propagation of ornamental gentian in a temporary immersion system - Effect of culture parameters on plant quality. *Propagation of Ornamental Plants*, 8, 210–214.
- Saba, I., Qazi, P. H., Rather, S. A., Dar, R. A., Qadri, Q. A., Ahmad, N., Johri, S., Taneja, S. C., y Shawl, S. (2012). Purification and characterization of a cold active alkaline protease from *Stenotrophomonas* sp., isolated from Kashmir, India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1071–1079. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0905-1>
- Safarik, I. y Safarikova, M. (2004). Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic Research and Technology*. 2, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>
- Saucedo, S.G., Giler, E.V., Carmigniani, C.F. y Ramos, G.L. (2008). PROPAGACIÓN CLONAL *in vitro* DE PIÑA (*Ananas comosus* L. Merr) VARIEDADES CHAMPAKA Y HAWAIANA. *Ciencia y Tecnología*. 1, 49–54. <https://doi.org/10.18779/cyt.v1i1.22>
- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220(2),

183–197. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1407-2>

Schittek, K., Kock, S.T., Lücke, A., Hense, J., Ohlendorf, C., Kulemeyer, J.J., Lupo, L.C., y Schäbitz, F. (2016). A high-altitude peatland record of environmental changes in the NW Argentine Andes (24 ° S) over the last 2100 years. *Climate of the Past* 12, 1165–1180. <https://doi.org/10.5194/cp-12-1165-2016>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., y Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Serrano, F. A., Travassos, L. R., Ribeiro-dos-Santos, R., Cabral, H., Mortara, R. A., y Rodrigues, E. G. (2007). Antitumor effects *in vitro* and *in vivo* and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia*, 9(9), 723–733. <https://doi.org/10.1593/neo.07427>

Sharma, S., Vaidya, D., Rana, N. (2018). Extraction, partial purification and characterization of kiwifruit enzyme. *The Pharma Innovation* 7(1), 312–315.

Shivaprasad, H. V., Rajaiah, R., Frey, B.M., Frey, F.J., Vishwanath, B.S. (2010). “Pergularain e I” - a plant cysteine protease with thrombin-like activity from *Pergularia extensa* latex. *Thrombosis Research*. 125, e100–e105. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.10.002>

Silveira, D.G., Souza, F.V.D., Pelacani, C.R., Souza, A. da S., Ledo, C.A. da S., y de Santana, J.R.F. (2009). Micropropagation and *in vitro* conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), 923–932. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000400016>

Silvestre, M. P. C., Carreira, R. L., Silva, M. R., Corgosinho, F. C., Monteiro, M. R. P., y Morais, H. A. (2012). Effect of pH and temperature on the activity of enzymatic extracts from pineapple peel. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1824–1831. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0616-5>

Simão, M. J., Faria, D. V., Werner, E. T., Soares, T. C. B., y Lima Gontijo, A. B. P. (2016). Induction of *in vitro* shoots of *Billbergia euphemiae* E. Morren (Bromeliaceae) from leaf explants. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 38(2), 207–213. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v38i2.31694>

- Simmons, J. W., Nordby, E. J., y Hadjipavlou, A. G. (2001). Chemonucleolysis: The state of the art. *European Spine Journal*, 10(3), 192–202. <https://doi.org/10.1007/s005860000234>
- Singh, V.K., Patel, A.K., Moir, A.J. y Jagannadham, M. V. (2008). Indicain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2. *Phytochemistry* 69, 2110–2119. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.05.005>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., y Mehta, P. K. (2016a). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., y Mehta, P. K. (2016b). Microbial proteases in commercial applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(3), 365–374. https://www.jpccbs.info/2016_4_3_06_Rajendra.pdf
- Smith, L. B. y Downs, R. J. (1974). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. New York Botanical Garden Press Organization for Flora Neotropica. <https://doi.org/10.2307/4393694>
- Srilakshmi, J., Madhavi, J., Lavanya, S., y Ammani, K. (2014). Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(4), 218–234. https://www.jpccbs.info/Vol_2_Issue_4_Feb_2015.html
- Thorpe, T. (2012). History of plant tissue culture. *Methods in Molecular Biology*, 877, 9–27. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_2
- Toledo-Aceves, T. y Wolf, J.H.D. (2008). Germination and establishment of the epiphyte *Tillandsia eizii* L.B. Smith in the canopy of a pine-oak forest in the Highlands of Chiapas, Mexico. *Biotropica* 40, 246–250.
- Tomar, R., Kumar, R., y Jagannadham, M. V. (2008). A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: Purification and biochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 1479–1487. <https://doi.org/10.1021/jf0726536>
- Trejo, S.A., López, L.M.I., Cimino, C. V., Caffini, N.O., y Natalucci, C.L. (2001). Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). *Journal of Protein Chemistry*. 20, 469–477. <https://doi.org/10.1023/A:1012502412612>

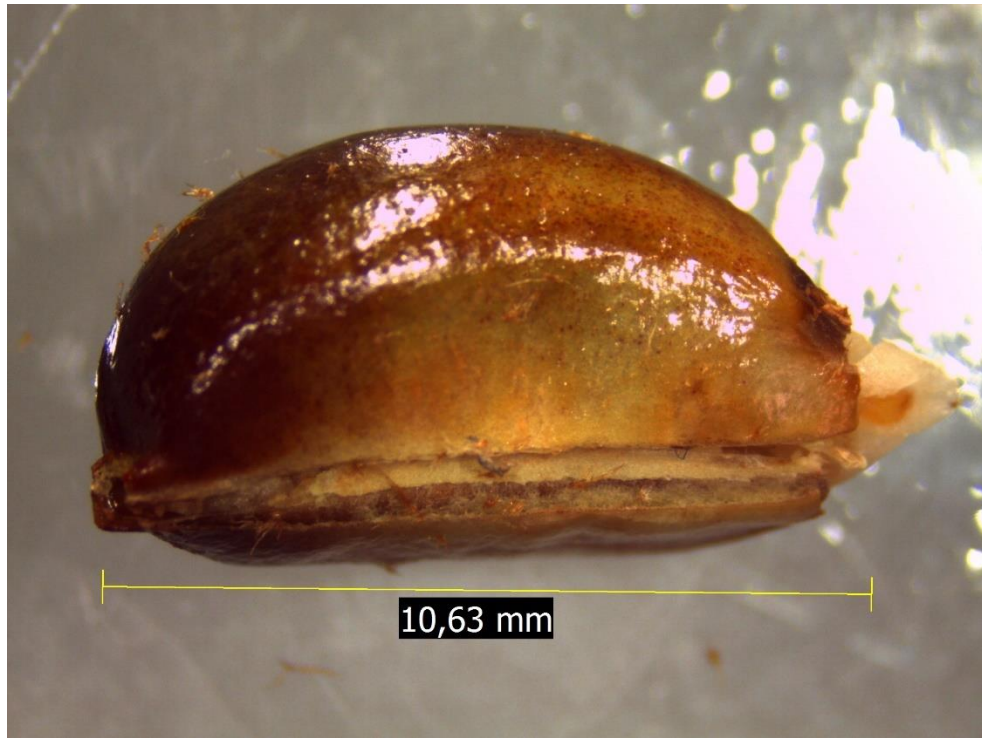
- Troncoso, F., Sánchez, D., y Ferreira, M. (2022). Production of Plant Proteases and New Biotechnological Applications: An Updated Review. *ChemistryOpen*, *11*, 1-38. <https://doi.org/10.1002/open.202200017>
- Usman, M., Fatima, B., Khan, M. M., Jaskani, M. J., y Khan, I. A. (2002). Somatic embryogenesis in papaya. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, *39*(3), 217-223.
- Vairo-Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., y Natalucci, C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research*, *72*(3), 271–275. <https://doi.org/10.1017/s0022029905000749>
- Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P. S., Gharib, S. A, Hoofnagle, A. N., Cheung, M. C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., Chea, H., Knopp, R. H., Brunzell, J., Geary, R., Chait, A., Zhao, X. Q., Elkon, K., Marcovina, S., Ridker, P., ... Heinecke, J. W. (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(3), 746–756. <https://doi.org/10.1172/JCI26206DS1>
- Vallés, D., Bruno, M., López, L.M.I., Caffini, N.O., y Cantera, A.M.B. (2008). Granulosain I, a cysteine protease isolated from ripe fruits of *Solanum granuloso -leprosum* (Solanaceae). *Protein Journal*. *27*, 267–275. <https://doi.org/10.1007/s10930-008-9133-4>
- Vallés, D. y Cantera, A. M. B. (2018). Antiacanthain A: New proteases isolated from *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). *International Journal of Biological Macromolecules*, *113*, 916–923. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.025>
- van der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 191–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>
- van der Hoorn, R. A. L. y Jones, J. D. G. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(4), 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.003>
- Versieux, L. M. y Wendt, T. (2007). Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais

- state, Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 16(11), 2989–3009. <https://doi.org/10.1007/s10531-007-9157-7>
- Webster, S., y Mitchell, S. (2003). A novel surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown medicinal explants intended for *in vitro* culture. *Biotechnology Centre, UWI, Mona, Kingston*, 7.
- Wegayehu, F., Firew, M., y Belayneh, A. (2015). Optimization of explants surface sterilization condition for field grown peach (*Prunus persica* L. Batsch. cv. Garnem) intended for *in vitro* culture. *African Journal of Biotechnology*, 14(8), 657–660. <https://doi.org/10.5897/ajb2014.14266>
- Yang, L., Mickelson, S., See, D., Blake, T.K. y Fischer, A.M. (2004). Genetic analysis of the function of major leaf proteases in barley (*Hordeum vulgare* L.) nitrogen remobilization. *Journal of Experimental Botany*. 55, 2607–2616. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh267>
- Zhang, M., Wei, Z., Chang, S., Teng, M. y Gong, W. (2006). Crystal structure of a papain-fold protein without the catalytic residue: A novel member in the cysteine proteinase family. *Journal of Molecular Biology*. 358, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.065>
- Zeng, S., Zhang, Y., Wu, K., Zhang, J., y Duan, J. (2013). Seed biology and *in vitro* seed germination of *Cypripedium*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 34(4) 1–14. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.841117>
- Zizka, G., Schneider, J. V., Schulte, K. y Novoa, P. (2013). Taxonomic revision of the Chilean Puya species (Puyoideae, Bromeliaceae), with special notes on the *Puya alpestris-Puya berteroniana* species complex. *Brittonia* 65, 387–407. <https://doi.org/10.1007/s12228-012-9290-9>

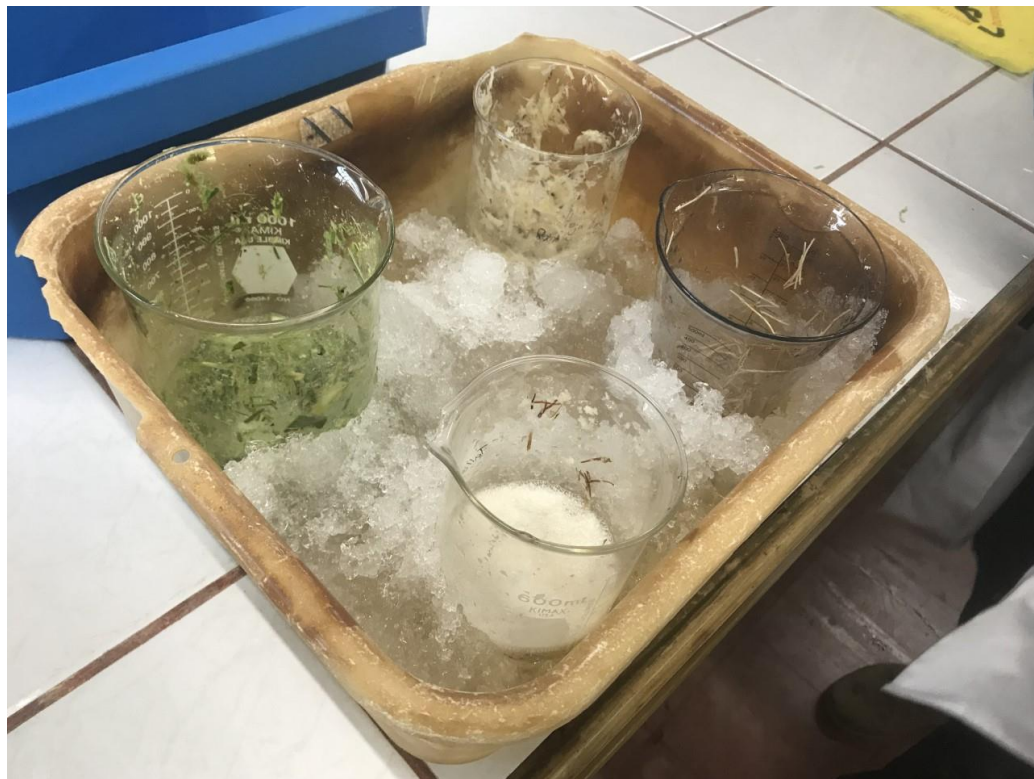
11. Anexos



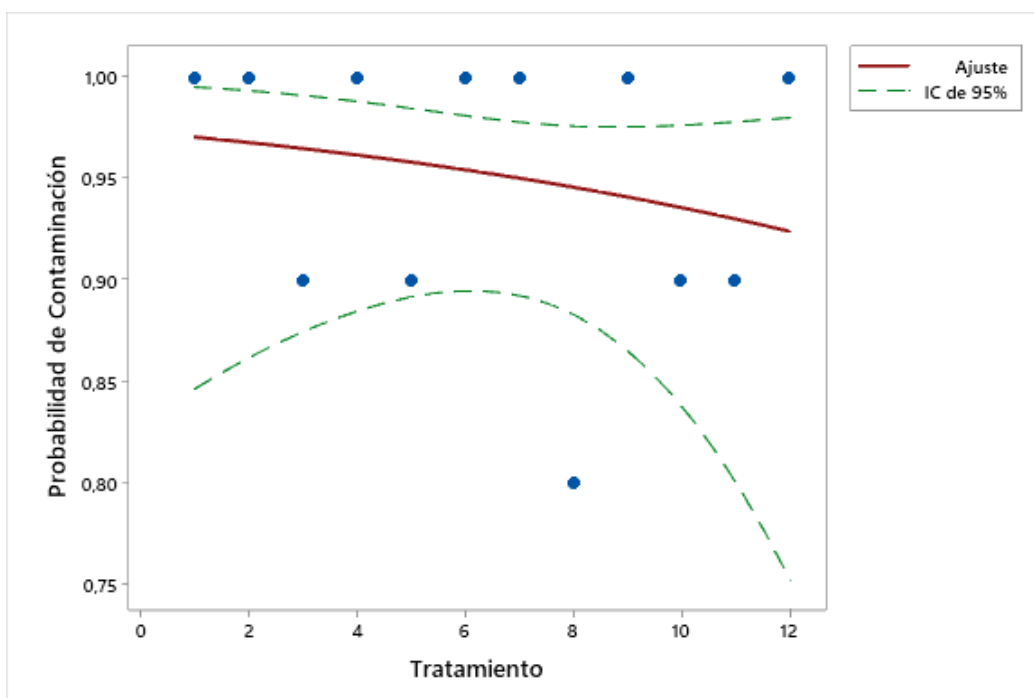
Anexo 1. Inflorescencia de *Puya dasylirioides*.



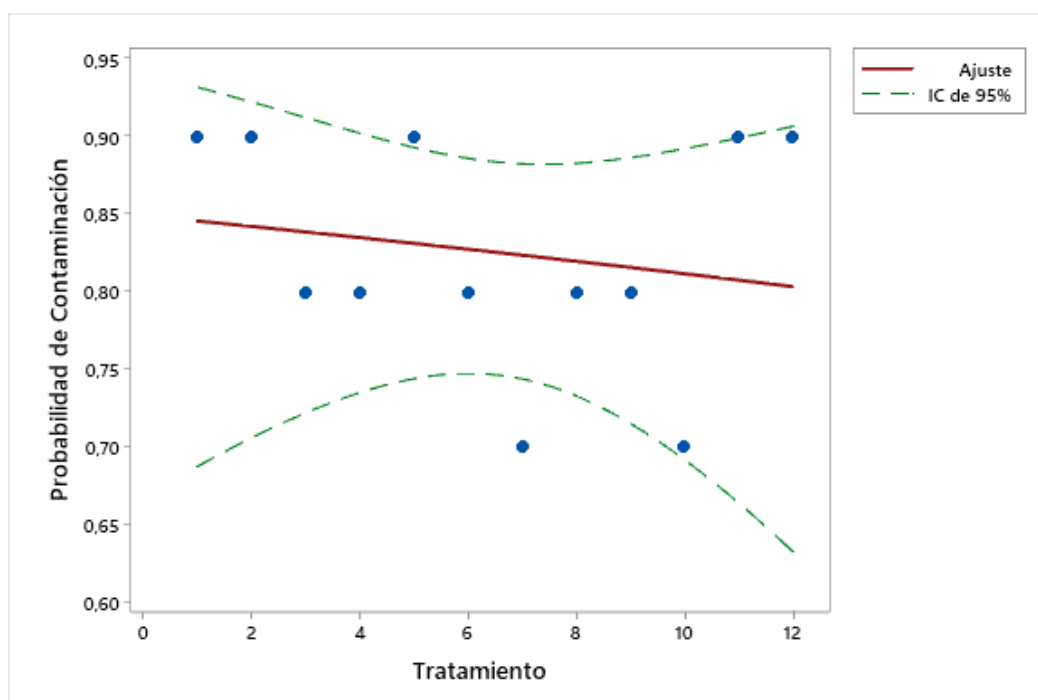
Anexo 2. Cápsula de *Puya dasylirioides*.



Anexo 3. Proceso de extracción de proteínas de tejido de *Puya dasylirioides*.



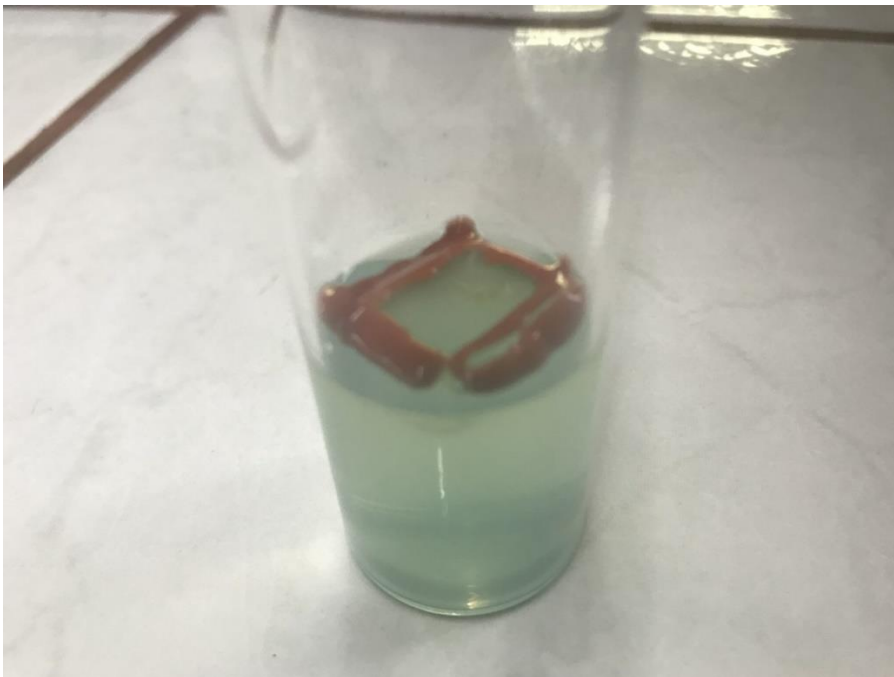
Anexo 4. Curva de regressão logística para a determinação de la probabilidad de contaminación de explantes de la zona distal según el tiempo de exposición y la concentración de hipoclorito de sodio.



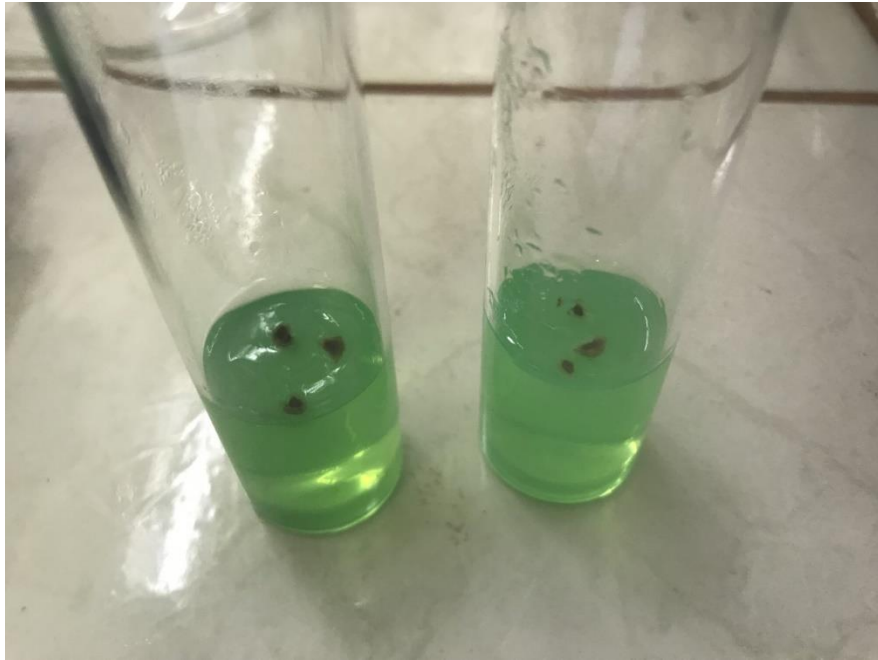
Anexo 5. Curva de regresión logística para la determinación de la probabilidad de contaminación de explantes de la zona basal según el tiempo de exposición y la concentración de hipoclorito de sodio.



Anexo 6. Presencia de contaminación fúngica en explantes de la zona distal de la hoja.



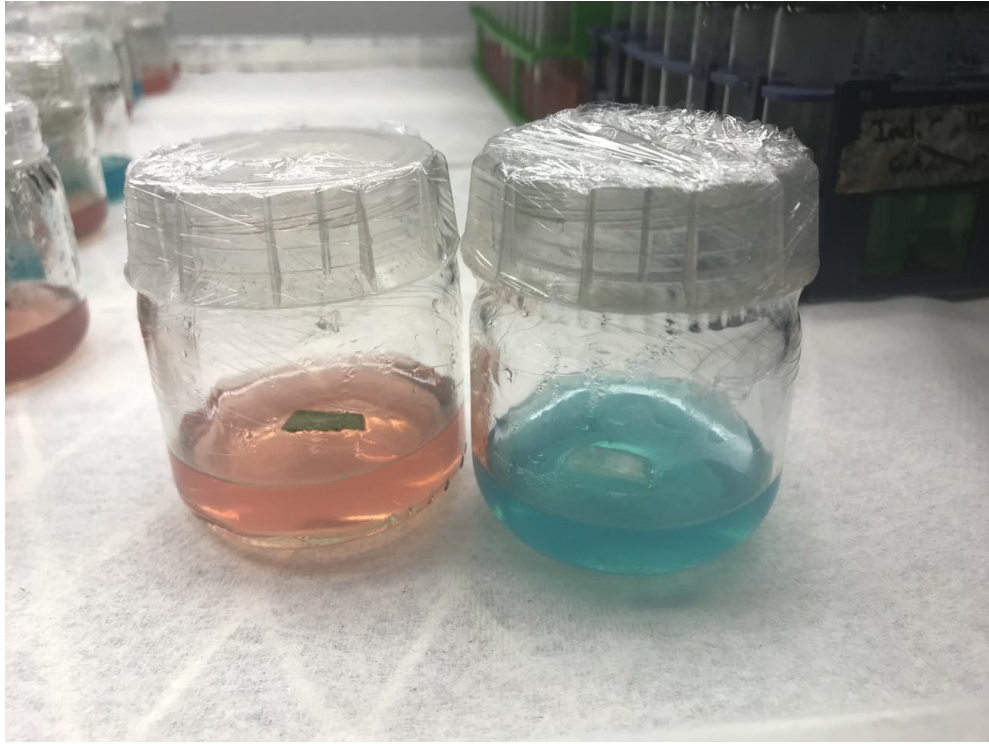
Anexo 7. Presencia de contaminación bacteriana en explantes de la zona basal de la hoja.



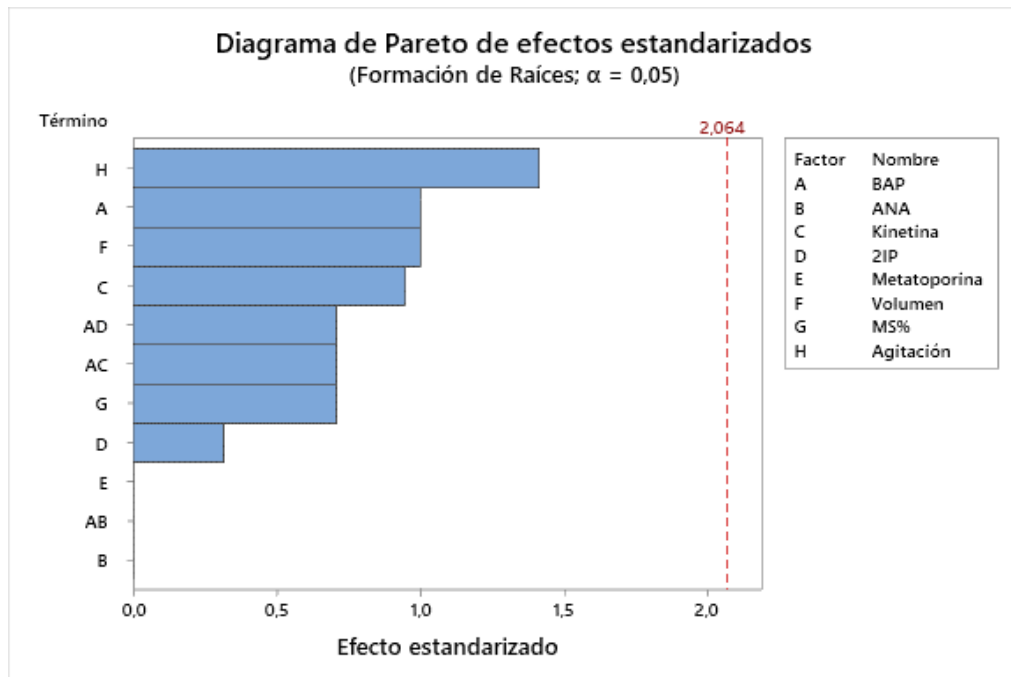
Anexo 8. Semillas de *Puya dasylirioides* libres de contaminación pasadas dos semanas de cultivo.



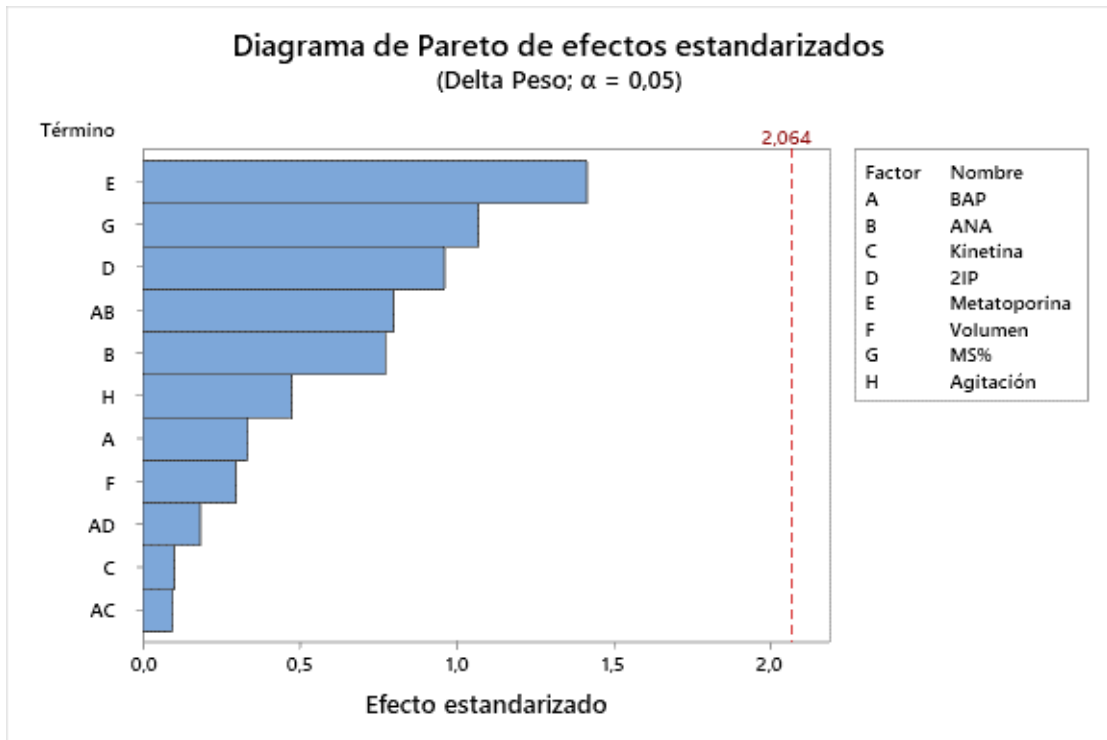
Anexo 9. Germinación de semillas de *Puya dasylirioides* en medio MS al 100 %.



Anexo 10. Explantes de la zona distal y basal de la hoja de *Puya dasyliroides* en medio MS al 100 %.



Anexo 11. Diagramas de Pareto para la determinación de la influencia de variables definidas sobre la formación de raíces.



Anexo 12. Diagramas de Pareto para la determinación de la influencia de variables definidas sobre el cambio en el peso fresco de las plantas.



Anexo 13. Brote a partir de un explante de plantas establecidas *in vitro* durante el ensayo de multiplicación utilizando diversos reguladores de crecimiento.



Anexo 14. Regeneración de una planta completa a partir de un explante con un corte vertical.



Anexo 15. Formación de múltiples brotes a partir de un explante establecido *in vitro* de *Puya dasylirioides*.



Anexo 16. Formación de brotes a partir de un explante establecido *in vitro* de *Puya dasyliroides*.



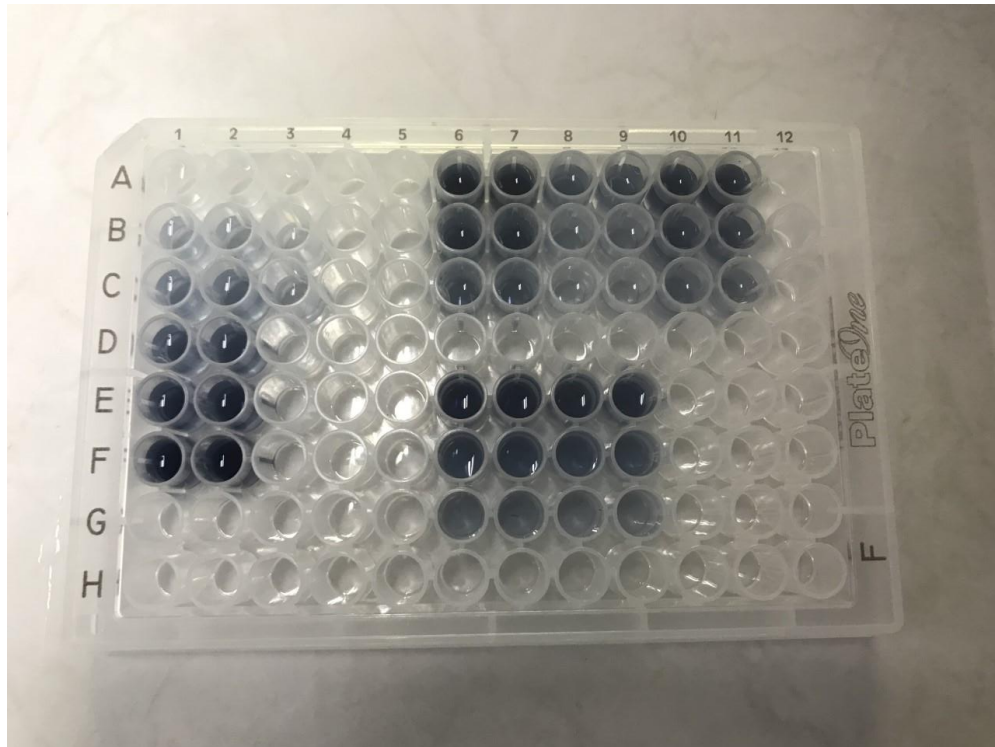
Anexo 17. Estructura de la raíz de *Puya dasyliroides*.



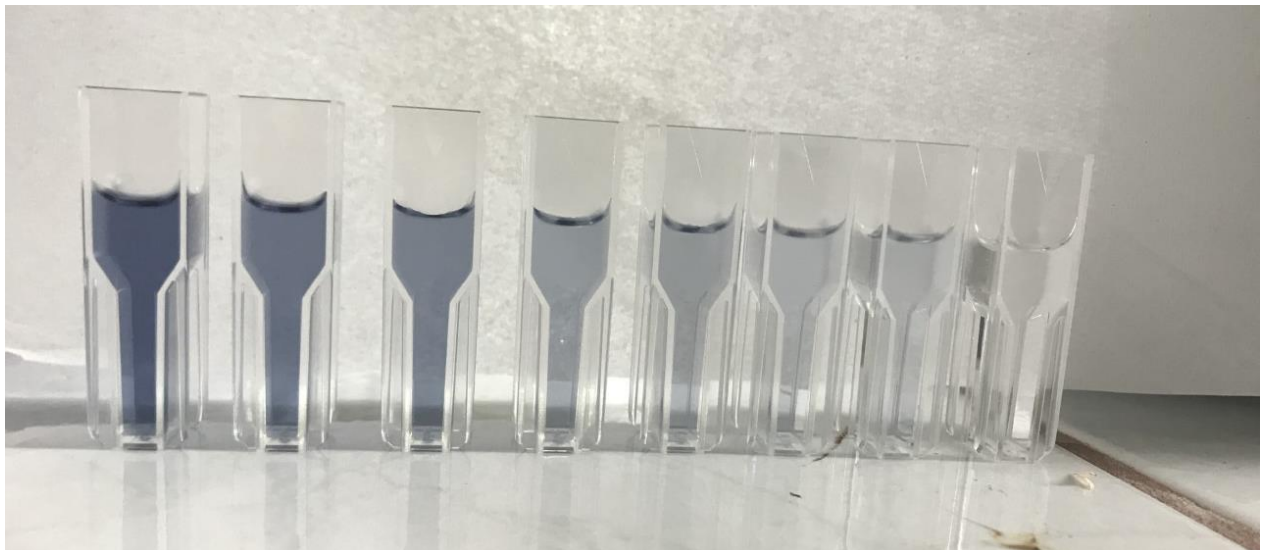
Anexo 18. Planta establecida *in vitro* de *Puya dasylirioides* con amplio crecimiento radical.



Anexo 19. Extractos crudos de la zona distal de la hoja, zona basal y tallo de *Puya dasylirioides*.



Anexo 20. Cuantificación de proteína mediante técnicas colorimétricas para los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas de la zona distal de la hoja, zona basal y tallo de *Puya dasylirioides*.



Anexo 21. Curva de calibración para la cuantificación de actividad enzimática mediante técnicas colorimétricas para los extractos crudos y fracciones parcialmente purificadas de la zona distal de la hoja, zona basal y tallo de *Puya dasylirioides*.

Peptide	Uniq	-10lgP	Mass	Length	ppm	m/z	z	RT	Fraction	Scan	Source File	Area Sample 1	#Feature	#Feature Sample 1	Start	End	PTM
K.LVVEQLQSDGR.S	Y	52.44	1272.6310	11	0.6	637.3231	2	32.10	1	6605	20220908_ID_6935.raw	2.61E5	1	1	159	169	
K.C(+57.02)HNC(+57.02)GHGTDLR.G	Y	38.64	1325.5354	11	-1.6	442.8517	3	20.79	1	3632	20220908_ID_6935.raw	1.09E5	1	1	351	361	Carbamidomethylation
R.YHLDLC(+57.02)K.N	Y	37.26	947.4535	7	0.3	474.7342	2	32.49	1	6672	20220908_ID_6935.raw	9.85E4	1	1	288	294	Carbamidomethylation
R.VSDGPFLK.I	Y	33.43	974.5436	9	0.5	488.2794	2	40.84	1	8887	20220908_ID_6935.raw	1.77E5	1	1	3	11	
K.AVLQETIK.L	Y	30.45	900.5280	8	-2.0	451.2704	2	33.73	1	7065	20220908_ID_6935.raw	2.53E5	1	1	151	158	
K.YLTENLR.F	Y	29.93	1008.5240	8	-0.4	505.2691	2	33.51	1	6994	20220908_ID_6935.raw	0	0	0	53	60	

Anexo 22. Información detallada de los péptidos del pico 4 de la fracción 1 del tallo encontrados mediante espectrometría de masas.



Anexo 23. Plantas de *Puya dasylirioides* establecidas *in vitro*.



Anexo 24. Planta de *Puya dasylirioides* en proceso de aclimatización.