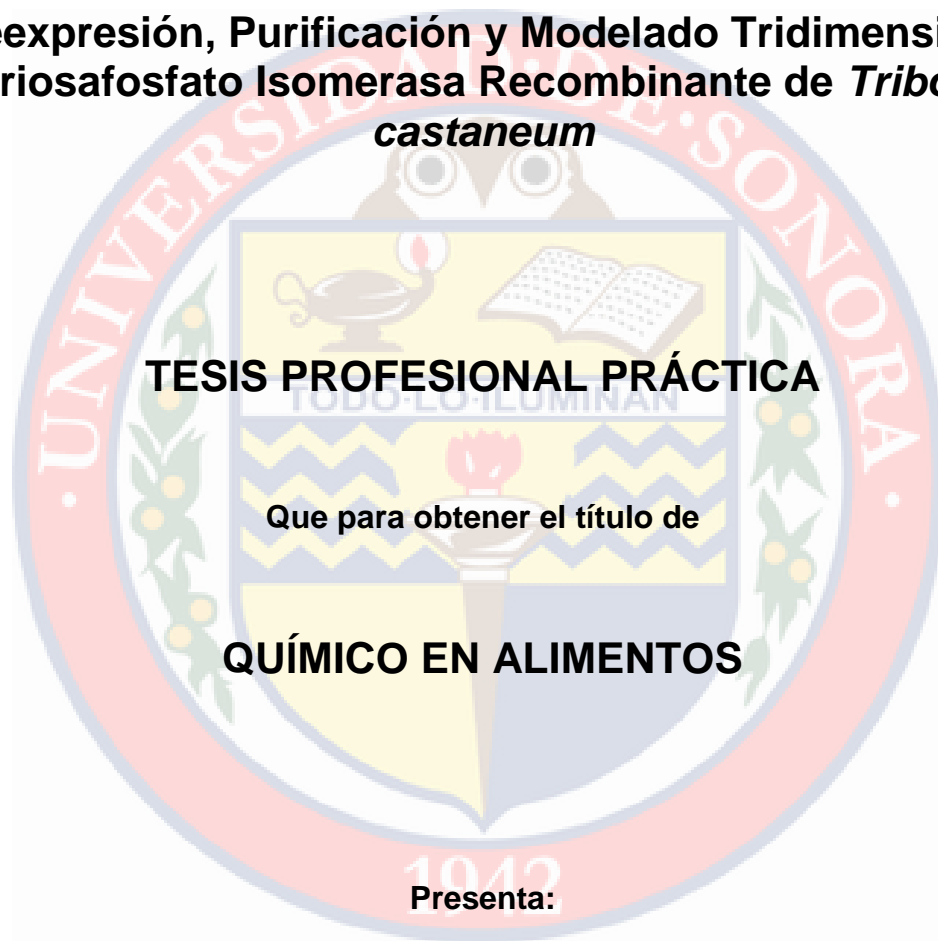


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Sobreexpresión, Purificación y Modelado Tridimensional de
la Triosafosfato Isomerasa Recombinante de *Tribolium
castaneum***



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

Rafael Enrique Dávila Flores

Hermsillo, Sonora

Septiembre de 2015

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Rafael Enrique Dávila Flores la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico en Alimentos.

Dr. Eduardo Guevara Hernández
Presidente

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Secretario

Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Vocal

Dra. Aned de León Flores
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad, por abrirme sus puertas y permitirme vivir esta experiencia.

A todos mis maestros, por su entrega en mi aprendizaje.

A mi comité de tesis. Han sido mis mejores y más amables críticos.

Al Dr. Cinco por brindarme la oportunidad de colaborar con él y motivar e impulsar mi gusto por la investigación.

A mi director de tesis, el profe Eduardo, que fue parte fundamental de éste proyecto. Gracias por todo el apoyo, por todas las cosas que me enseñó y por su paciencia aparentemente interminable.

A Brisa mi hermana de tesis, que soportó todo el bullying de mi parte y a cambio me apoyo en todo momento.

A Emma y al Carretas por siempre brindarme su ayuda y asesoría. Un agradecimiento especial a Machuy por soportarme con buen humor tantas horas en el laboratorio, alimentarme, aconsejarme y andarme correteando con todos los trámites para poder entrar a la maestría.

A todos mis amigos de QA, a los Emmy's, a los Agoberto's.

A Andrea, Yoko, Héctor y Julián, porque realmente somos más que un gran equipo.

DEDICATORIAS

A Dios, a quien se lo debo todo, evidentemente.

A mis padres, por su amor, esfuerzo y sacrificios en todos estos años. A mi hermana y abuela que siempre se preocupan por mí.

A mis amigos Carlos, Raúl, Mario, Germán, Pro y Jesús; así como a las chicas Valeria, Nayely y Cassandra, que sin ellos mi vida no sería la misma. Gracias por tantos años de verdadera amistad.

A Janette, que de alguna u otra manera, siempre ha estado conmigo apoyándome y motivándome para lograr todas mis metas. Eres una de esas oportunidades que la vida no me daría dos veces.

CONTENIDO

	Pág.
FORMA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIAS.....	IV
CONTENIDO	V
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
OBJETIVOS	XI
Objetivo General.....	XI
Objetivos Particulares.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Importancia de los Cereales	3
Trigo	3
Producción de Trigo.....	4
Pérdidas en la Producción de Cereales	8
Plaga Agrícola	9
Plagas de Insectos	10
Métodos de Control de Plagas Agrícolas de Insectos	10
<i>Tribolium castaneum</i>	11
Almidón	12
Glucólisis	14
Triosafofato Isomerasa	15
Producción de Proteínas Recombinantes	17

Cromatografía de Afinidad de Metales Quelantes Inmovilizados	18
Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	20
Modelado Tridimensional de Proteínas <i>In Silico</i>	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Sobreexpresión Recombinante.....	24
Purificación por Cromatografía de Afinidad de Metales Quelantes Inmovilizados	24
Actividad Enzimática Específica	25
Ensayo de Calorimetría de Titulación Isotérmica	26
Modelado Estructural.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
Sobreexpresión Recombinante de TIM de <i>Tribolium castaneum</i>	27
Purificación de TIM de <i>Tribolium castaneum</i>	29
Actividad Enzimática Específica de TIM de <i>Tribolium castaneum</i>	32
Ensayo de Calorimetría de Titulación Isotérmica	34
Modelado por Homología de la TIM de <i>Tribolium castaneum</i>	35
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Tendencias en producción real y pérdidas estimadas en la producción de cereales.....	9
2. Volúmenes de las soluciones patrón para preparar muestras experimentales y de control para el ensayo de actividad de la TIMtc.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Principales productores de trigo a nivel mundial.	5
2. Producción de trigo en México comparada con Estados Unidos	6
3. Principales estados productores de trigo.....	7
4. <i>Tribolium castaneum</i>	12
5. Almidón.....	13
6. Esquema general de la glucólisis	15
7. Imágenes de la estructura de la triosafosfato isomerasa de <i>Tenebrio molitor</i>	16
8. Unión de la cadena lateral de histidina a los iones metálicos de transición	19
9. Representación esquemática de un calorímetro de titulación isotérmica	21
10. Proceso de modelado por homología.....	23
11. Cinética de Sobreexpresión de TIM de <i>Tribolium castaneum</i>	28
12. Cromatografía IMAC de TIMtc	30
13. Determinación del grado de pureza de TIMtc.....	31
14. Mecanismo del ensayo de actividad acoplado.	32
15. Ensayo de actividad.....	33
16. Ensayo de calorimetría de titulación isotérmica.....	34
17. Aminoácidos pertenecientes a la triada catalítica.....	36
18. Triada catalítica de la TIMtc	37
19. Aminoácidos pertenecientes al sitio de unión del sustrato	38
20. Sitio de unión del sustrato	39
21. Aminoácidos pertenecientes a la interfase del dímero	40
22. Interfase del dímero	41

RESUMEN

A nivel mundial las pérdidas de producción de cereales como el trigo, son una problemática que representan un grave impacto económico. Las principales causas de éstas pérdidas se deben principalmente a deficientes prácticas de cosechado y almacenamiento, las cuales promueven la proliferación de plagas como lo es *Tribolium castaneum*.

El estudio estructural de enzimas que participan en la glucólisis, como la Triosafosfato isomerasa (TIM), puede ayudar a implementar nuevas estrategias para diseñar inhibidores de control de plagas. De tal manera que el objetivo general del presente trabajo consistió en la sobreexpresión y purificación de la triosafosfato isomerasa recombinante de *Tribolium castaneum*, lo que permitirá realizar una futura caracterización enzimática.

La metodología consistió en sobreexpresar la proteína recombinante mediante un sistema de expresión bacteriano, para lo cual previamente se realizó la introducción del plásmido pJ414 de DNA 2.0®, con la secuencia génica que codifica a la enzima, en la cepa bacteriana de *E. coli* BL21 Gold. Los factores que se tuvieron en cuenta fueron: el medio de crecimiento, el número de bacterias antes de inducir la sobreexpresión, la concentración del inductor y tiempo de inducción.

La enzima se logró purificar mediante una cromatografía de afinidad de metales quelantes inmovilizados según lo reveló el análisis por electroforésis SDS-PAGE y su actividad enzimática específica fue determinada mediante un mecanismo de acción acoplado utilizando como enzima acoplada la α -glicerofosfato deshidrogenasa.

Por otra parte se realizaron pruebas preliminares de calorimetría de titulación isotérmica para determinar los parámetros cinéticos de la enzima en donde se observó un alto calor de dilución por lo que es necesario rediseñar el experimento para su optimización.

Finalmente se realizó un modelado tridimensional *in silico* en base a la estructura experimental de la triosafosfato isomerasa de *Tenebrio molitor* obteniendo una estructura confiable debido al alto grado de identidad que presenta con respecto a *T. castaneum*.

Los resultados obtenidos pueden ser una herramienta útil para posteriormente llevar a cabo una caracterización enzimática completa que ayude a conocer los detalles del mecanismo catalítico de la triosafosfato isomerasa de *Tribolium castaneum*. Esto puede proporcionar información referente a la capacidad de adaptación que poseen las plagas con la que en un futuro se podrían desarrollar nuevos métodos específicos de control de plagas que no generen resistencia y promuevan el desarrollo sustentable en la producción de cereales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Sobreexpresar y purificar la triosafosfato isomerasa recombinante de *Tribolium castaneum*.

Objetivos Particulares

- Sobreexpresar heterológamente en *E. coli* la TIMtc.
- Purificar la TIMtc mediante cromatografía de afinidad de metales quelantes inmovilizados.
- Determinar la actividad enzimática específica de la TIMtc mediante un ensayo enzimático acoplado utilizando α -glicerosfato deshidrogenasa como enzima acoplada.
- Realizar un modelado tridimensional de la TIMtc e identificar las regiones y aminoácidos importantes para su actividad.

INTRODUCCIÓN

Los cereales son parte fundamental de la alimentación de miles de personas en el mundo, ya que éstos son ricos en nutrientes esenciales y son la base de muchos alimentos que consumimos a diario. Uno de los cereales más cultivados es el trigo, el cual es transformado en harina y a partir de ahí se elaboran una gran variedad de productos. Sin embargo, anualmente se pierden miles de toneladas de producción debido principalmente a deficientes prácticas de cosechado y almacenamiento. Las deficiencias de almacenamiento del trigo promueven la proliferación de plagas las cuales representan un grave impacto económico (Franco y col., 2002).

Una de las principales plagas del trigo almacenado en el mundo es *Tribolium castaneum*, la cual confiere un olor desagradable y un mal aspecto a las harinas y deprecia su valor debido a la presencia de excrementos, exuvios y restos de cadáveres. Para contrarrestar los efectos y disminuir las poblaciones de plagas se emplean métodos de control en donde el uso de pesticidas es de los más implementados (García y col., 2007).

Pese a que los tratamientos con insecticidas y fumigantes se han llevado a cabo de manera indiscriminada a lo largo de los años, se han generado graves problemas como contaminación ambiental, aparición de nuevas plagas y un aumento creciente en la resistencia de los insectos a plaguicidas dado a que éstos poseen una gran capacidad enzimática y se adaptan rápidamente a condiciones adversas.

Pese a la repercusión económica que representan las plagas de insectos en la agricultura y como sucede con otros insectos, existe muy poca información genética y proteómica relacionada con estos organismos, sin embargo, *T. castaneum* ha sido el primer coleóptero del cual se ha obtenido su genoma, debido a su gran importancia en la agricultura además de ser considerado como un modelo genético avanzado de insectos (Morris y col., 2009; Richards y col., 2008).

El estudio estructural de enzimas que están relacionadas con la glucólisis en los insectos, como la Triosafofato isomerasa (TIM) puede ayudar a implementar nuevas estrategias para diseñar inhibidores de control de plagas. Esta enzima realiza la interconversión de Dihidroxiacetona fosfato a Gliceraldehído-3-fosfato, que son el producto de la enzima aldolasa de la glucólisis.

La TIM juega un papel importante en la glucólisis y es esencial para la producción eficiente de energía. Se ha determinado que un mal funcionamiento de esta enzima incide directamente en el desarrollo de organismos tales como insectos, mamíferos, así como en hongos, plantas y bacterias (Knowles, 1991; Roland y col., 2013).

Los avances tecnológicos y científicos de los últimos años han permitido el desarrollo de técnicas biomoleculares de manipulación de ADN que hacen posible la sobreexpresión de proteínas recombinantes, lo cual ofrece la ventaja de producir de manera relativamente fácil y rápida grandes cantidades de una proteína de interés que es difícil obtener de su fuente natural. Todo esto funge como una herramienta disponible para numerosas aplicaciones, como la caracterización de enzimas.

La caracterización bioquímica de la TIM de *T. castaneum* (TIMtc) aportará conocimiento específico de una enzima importante para el catabolismo de carbohidratos de uno de los más importantes insectos que infestan a los cereales, así como el potencial de desarrollar inhibidores específicos para el control de plagas, y a su vez contribuir con el desarrollo sustentable ayudando a disminuir la contaminación ambiental generada por pesticidas.

ANTECEDENTES

Importancia de los Cereales

Los cereales se han constituido como la base de la alimentación en muchos pueblos y culturas del mundo, gracias a su facilidad de cultivo, preparación y sus principales propiedades nutricionales que aportan nutrientes esenciales para nuestra dieta diaria. El trigo, el arroz y el maíz son los cereales de mayor importancia económica, pero hay otros, como el centeno, la cebada y el mijo, que sirven de alimento a millones de personas, especialmente en Europa, Asia y África.

La importancia de los cereales radica en que contienen nutrientes en forma concentrada, son fáciles de almacenar y transportar, se conservan por mucho tiempo, y tienen numerosas aplicaciones como materia prima o como producto elaborado (CANIMOLT, 2007).

En la alimentación humana se emplean los cereales de diversas maneras para la elaboración una gran variedad de productos. Algunos son destinados en grandes cantidades a la alimentación del ganado, por lo cual, contribuyen indirectamente a la provisión de carne y grasas.

Trigo

El trigo es una planta gramínea con espigas de cuyos granos molidos se saca la harina. La forma del grano de trigo es ovalada con extremos redondeados, en uno de ellos sobresale el germen y en el otro hay un mechón de pelos finos. La altura de la planta varía entre treinta y 150 centímetros y cada planta tiene de cuatro a seis hojas. El trigo se cultiva de manera satisfactoria en climas sub-tropicales, moderadamente templados y moderadamente fríos (SAGARPA, 2014).

El trigo se puede clasificar de acuerdo a las diferentes características que presenta. Algunas están relacionadas con su forma de fraccionarse en la molturación y otras relacionadas con las propiedades de la harina y su conveniencia para la elaboración de diferentes productos. De esta manera, se pueden mencionar distintas variedades de trigo como *aestivum* (harinero), *araraticum*, *boeoticum* (escaña silvestre), *compactum*, *dicoccoides* (escanda), *dicoccum* (farro), *durum*, *monococcum* (escaña cultivada), *polonicum* (polaco), *spelta* (espelta), entre otros (Kent, 1975).

Los trigos más importantes para el comercio son el *Triticum durum* (utilizado principalmente para pastas y sémola), el *Triticum aestivum* (utilizado para elaborar pan) y el *Triticum compactum* (se utiliza para hacer galletas).

Producción de Trigo

El Trigo es uno de los tres cereales más ampliamente producidos globalmente, junto al maíz y el arroz. Generalmente es transformado en harina, y ésta es destinada a la elaboración de pan, galletas, pasteles, tortillas y pastas principalmente.

Según las proyecciones de la FAO, la producción mundial de trigo aumentará a un ritmo más rápido durante los próximos años; más acelerado que el presentado en el período de la década de los 90, ésto sostenido por un decidido impulso registrado en los países en transición y por un crecimiento más rápido en los principales países productores de trigo de América Latina y el Caribe (FAO, 2004).

La producción mundial anual de trigo en el 2012 alcanzó más de las 670 millones de toneladas, siendo China, India y Estados Unidos los principales productores, produciendo en conjunto poco más de 273 millones de toneladas de trigo, lo que representa alrededor del 40 % de la producción total mundial (FAOSTAT, 2012).

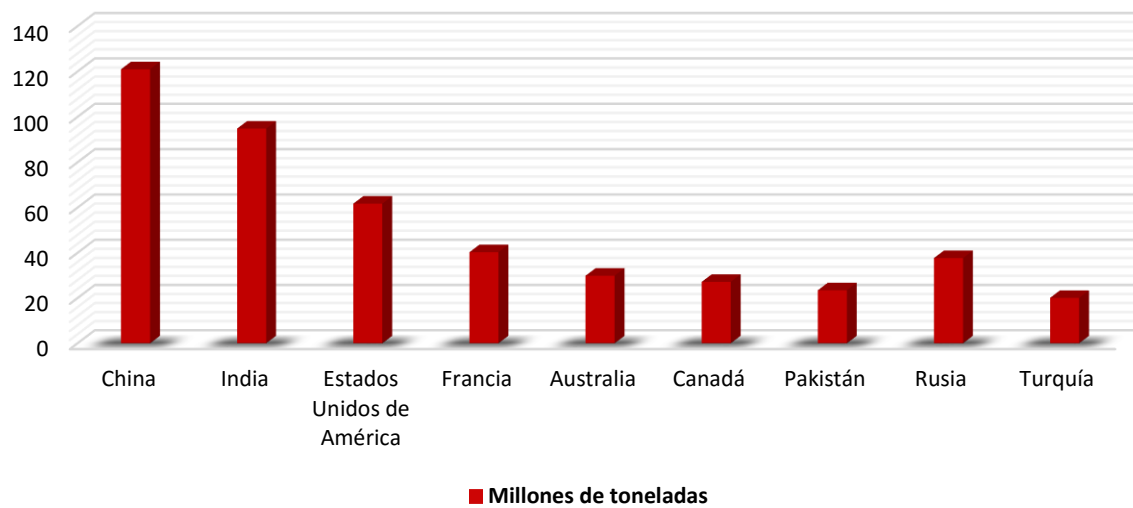


Figura 1. Principales productores de trigo a nivel mundial. Fuente: FAOSTAT 2012.

En México la producción nacional no es suficiente para cubrir las necesidades de todos los mexicanos por lo que se tiene que importar de otros países. Por su cercanía y por los costos de transportación, la gran mayoría del trigo que llega a México es proveniente de Estados Unidos quien es el mayor exportador a nivel mundial.

En el periodo de 2001 – 2012 la producción promedio de trigo en México fue de poco más de 3 millones de toneladas en promedio, mientras que en Estados Unidos se produjeron 63.8 millones de toneladas en promedio. La producción en el 2012 fue de 3.2 millones de toneladas, que con respecto al año inicial comparado se mantuvo estable (SAGARPA, 2012).

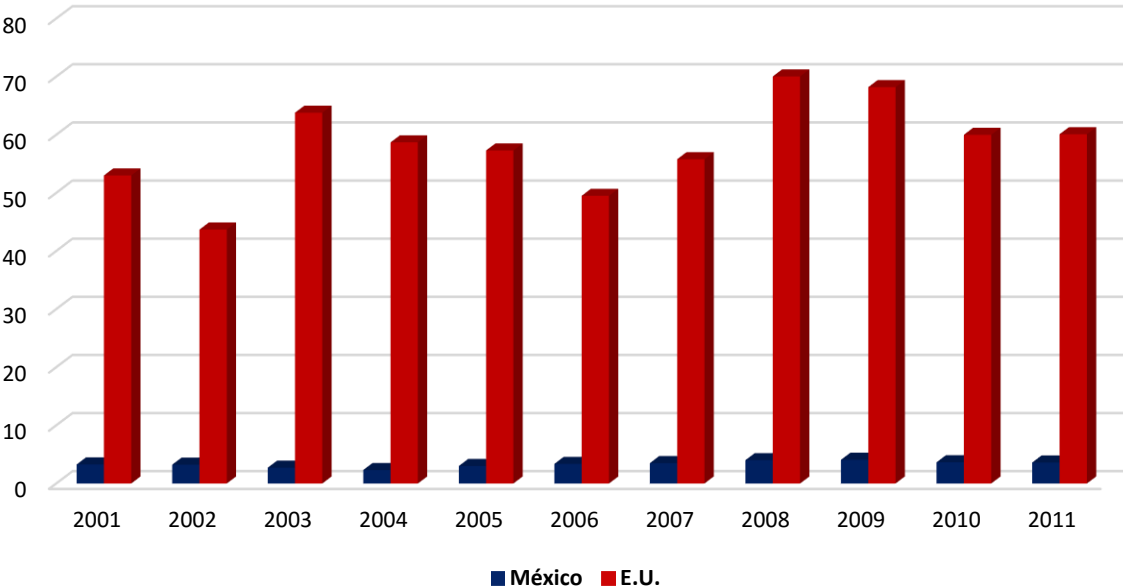


Figura 2. Producción de trigo en México comparada con Estados Unidos (en millones de toneladas). Fuente: SAGARPA 2012.

Las variedades de trigo que más se producen en México son el trigo suave y el trigo cristalino las cuales aportan aproximadamente el 95% de la producción total, mientras que el 5% restante pertenecen a las variedades de trigo fuerte y trigo medio fuerte. De las poco más de 3 millones de toneladas que se producen a nivel nacional, el estado de Sonora produce alrededor del 55%, siendo así el principal productor en México, seguido de Baja California y Guanajuato. (SAGARPA, 2012).

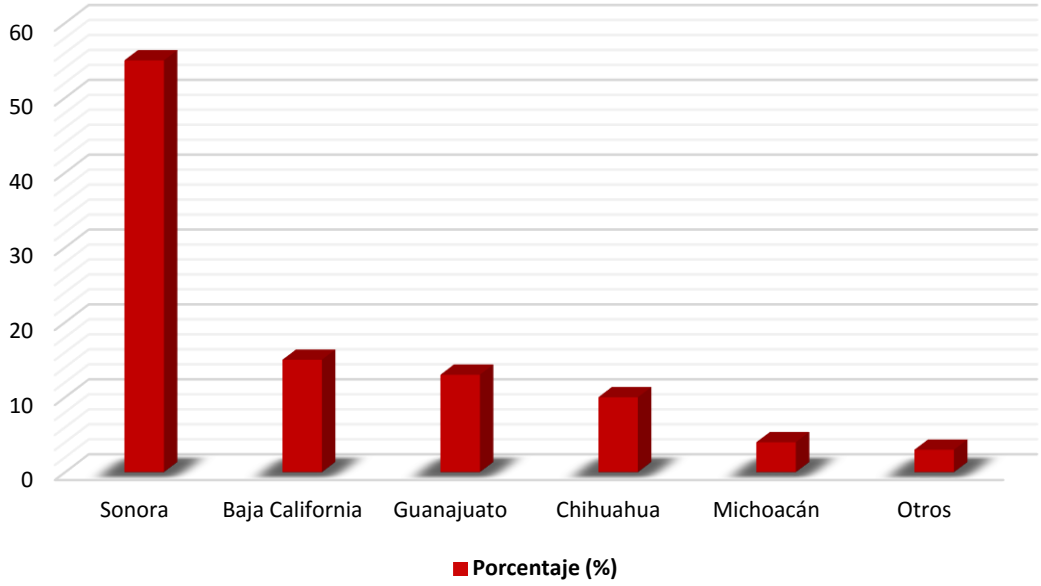


Figura 3. Principales estados productores de trigo. Fuente: SAGARPA 2012.

Pérdidas en la Producción de Cereales

Los cereales son el alimento básico de millones de personas en los países en desarrollo, por ello es importante mantener su calidad y su valor a lo largo de la cadena de suministro, para garantizar que los consumidores tengan acceso a alimentos inocuos y nutritivos.

Una cantidad considerable de los cultivos alimentarios producidos en los países en desarrollo se pierden debido a múltiples causas, de las cuales una de las principales son las prácticas deficientes de almacenamiento, que permiten la incursión de plagas como insectos y roedores, y la contaminación por micotoxinas. Los cultivos también pierden valor por daños producidos por el uso de herramientas inadecuadas, manipulación incorrecta y derrames durante la cosecha, la carga, el embalaje y el transporte (FAO, 2015).

Las pérdidas en el manejo y procesamiento de los alimentos contribuyen a elevar los costos de producción al retirar del mercado una parte del suministro. También repercuten en la degradación del medio ambiente y el cambio climático ya que se utilizan la tierra, el agua, la mano de obra y recursos no renovables, como los fertilizantes y la energía, para producir, elaborar, manipular y transportar alimentos que al final nadie consume (FAO, 2015).

Estimaciones de la FAO, que se han mantenido como tendencia a través de los años, indican que existen pérdidas de entre el 10-15 % de la producción de cereales en países desarrollados, mientras que en regiones como África y América Latina se puede alcanzar hasta el 50% con respecto a lo cosechado. Entre las principales causas de éstas pérdidas se encuentran los deficientes sistemas de cosechado y almacenamiento que son aprovechados por las plagas para su proliferación (FAO, 1999).

Tabla 1. Tendencias en producción real y pérdidas estimadas en la producción de cereales

Región	Producción Real	Pérdidas ocasionadas por (En miles de millones de US\$)			
		Agentes Patógenos	Insectos	Maleza	Total
Africa	13,3	4,1	4,4	4,3	12,8
América del Norte	50,5	7,1	7,5	8,4	22,9
América Latina	30,7	7,1	7,6	7,0	21,7
Asia	162,9	43,8	57,6	43,8	145,2
Europa	42,6	5,8	6,1	4,9	16,8
Antigua Unión Soviética	31,9	8,2	7,0	6,7	22,1
Oceanía	3,3	0,8	0,6	0,5	1,9

Fuente: Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schönbeck, F., & Weber, A. (1995). Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Elsevier.

Plaga Agrícola

Una plaga agrícola es una población organismos fitófagos que disminuye la producción del cultivo, reduce el valor de la cosecha o incrementa sus costos de producción. Se trata de un criterio esencialmente económico. El concepto de plaga agrícola implica reducción en el valor o en el beneficio económico que se obtiene de la cosecha; puede tratarse de reducciones en cantidad de la cosecha, en la calidad del producto, o en el incremento de los costos de producción. Se entiende por pérdida de calidad el deterioro en la presentación o aspecto del producto cosechado, o la disminución de su valor nutritivo u otra cualidad que influya en el uso del producto y baje su valor unitario (Cisneros, 1995).

Cuando la reducción de la cosecha se produce en grandes extensiones, la escasez del producto suele traer consigo el incremento de su precio en el mercado; en esas condiciones puede suceder que la disminución de la cosecha no necesariamente represente una pérdida económica para los productores.

Plagas de Insectos

Las estimaciones de las pérdidas de la producción de cereales por plagas de insectos varían mucho según el producto, la localidad y las prácticas de almacenamiento. Para los cereales almacenados en condiciones estándares puede esperarse una pérdida de entre el 10 y el 30% de la producción total durante una temporada de almacenamiento. (FAO, 1985). Estas plagas se clasifican en dos grupos: primarias y secundarias.

Las plagas primarias son los insectos que mayor daño causan al grano almacenado, ya que son capaces de iniciar el ataque al grano rompiendo la semilla. Estos insectos infestan al grano porque éste les proporciona el lugar apropiado para que vivan y se multipliquen ya que contiene el alimento, el aire, la humedad y el calor que necesitan para desarrollarse. Algunos insectos tales como los gorgojos de arroz (*Sitophilus oryzae* L.), maíz (*Sitophilus zeamais* M.) y trigo (*Sitophilus granarius* L.), la palomilla dorada (*Sitotroga cerealella* O.), el barrenador (*Prostephanus truncatus* H.) y el barrenillo de los granos (*Ryzophthera dominica* F.) son ejemplos de éste tipo de plagas (García y col., 2007).

Dentro de los insectos del grupo de las plagas secundarias se encuentran aquellos que se presentan en el grano almacenado una vez que los insectos primarios han atacado, o bien cuando el grano ha tenido prácticas deficientes de manejo o almacenamiento. Generalmente se alimentan de la harina y de los granos rotos y perforados. El gorgojo confuso de la harinas (*Tribolium confusum*), el gorgojo castaño de la harina (*Tribolium castaneum* H.), y el gorgojo plano de los granos (*Cryptolestes pusillus*) son ejemplos característicos de este tipo de plagas (González, 1995).

Métodos de Control de Plagas Agrícolas de Insectos

Los métodos de control de plagas pueden definirse como el conjunto de prácticas y/o técnicas que tienen como objetivo fundamental disminuir la densidad de población de una plaga debajo del nivel en el cual comienza a causar perjuicio económico. Actualmente, se tiende a utilizar el control integral de plagas, que consiste en la combinación de métodos mecánicos, físicos, biológicos y químicos principalmente, alcanzando una mayor eficacia con un menor impacto ambiental y coste económico (Cisneros, 1995).

El método de control químico es el más implementado en los cultivos agrícolas para el control de las plagas de insectos, el cual consiste en la represión de sus poblaciones o la prevención de su desarrollo mediante el uso de sustancias químicas. Los compuestos químicos que se utilizan en la protección de los cultivos reciben el nombre genérico de pesticidas o plaguicidas y en el caso para insectos, insecticidas (Cisneros, 1995).

Debido a su gran eficacia los tratamientos con insecticidas para el control de plagas se han utilizado de manera indiscriminada a lo largo de los años. Esto ha generado diversas problemáticas como contaminación ambiental, aparición de nuevas plagas que se consideraban secundarias y un aumento creciente en la resistencia de los insectos a los diversos insecticidas y fumigantes dado a que éstos cuentan con diversas enzimas digestivas, como proteasas y amilasas, que les permite adaptarse a diferentes fuentes alimenticias y proliferar fácilmente debido a la tolerancia que presentan a inhibidores que se encuentran de manera natural en los cereales (Cinco y col., 2006; Cinco y col., 2008; Zúñiga, 1985).

Tribolium castaneum

Pertenece a la familia *Tenebrionidae*, *Tribolium castaneum* es una de las principales plagas de harinas de cereales y alimentos almacenados en el mundo. El insecto adulto es delgado y mide de 3 a 4 mm de largo; es de color que va de rojizo castaño a marrón negruzco. Se le identifica por los últimos tres segmentos antenales, que son proporcionalmente más anchos y mejor definidos que los anteriores. Las larvas son alargadas, de color blanco cremoso hasta tornarse amarillo marrón, y generalmente miden de 5 a 6 mm de longitud. (García, 2007)

Es difícil detectar los huevos de este insecto ya que son depositados de manera aislada en los granos. La hembra pone un promedio de 350 a 400 huevos durante más de un año. El desarrollo total tarda de siete semanas a tres meses. La larva se transforma en pupa dentro del producto infestado. El adulto puede volar y vivir más de tres años.

Suele considerarse una plaga secundaria y se asocia con la presencia de plagas primarias. Confiere un olor desagradable a las harinas y un aspecto grisáceo y deprecian el producto por la presencia de excrementos, exuvios y restos de cadáveres.



Figura 4. *Tribolium castaneum*. Fuente: Coleoptera pictures by heath blackmon. <http://coleoguy.blogspot.mx/p/coleoptera-pictures.html>

Pese a la repercusión económica que representan las plagas de insectos en la agricultura y como sucede con otros insectos, existe muy poca información genética y proteómica relacionada con estos organismos. Sin embargo, *T. castaneum* ha sido el primer coleóptero del cual se ha obtenido su genoma, debido a su gran importancia en la agricultura además de ser considerado como un modelo genético avanzado de insectos. Morris y col., 2009; Richards y col., 2008).

Almidón

Los carbohidratos son el principal componente de los cereales, en el están presentes almidón (en mayor proporción), celulosa, hemicelulosa, pentosanos y dextrinas. En el trigo, el almidón es el carbohidrato más importante constituyendo aproximadamente el 64% de la materia seca del grano completo y 70% de su endospermo. Este se compone de dos polisacáridos: la amilosa y la amilopectina. La amilosa que conforma el 25-27% del almidón, es un polímero lineal formado por cadenas largas sin ramificar de residuos de D-glucosa que están unidos por enlaces glucosídicos α 1-4.

La amilopectina es el componente mayoritario del almidón, este se encuentra en una proporción del 73-75% y es un polímero ramificado que contiene enlaces glucosídicos α 1-a y α 1-6. Los puntos de ramificación α 1-6 pueden producirse cada 20-25 residuos de glucosa e impiden la formación de una hélice. El número de unidades de glucosa en la amilopectina puede variar desde unos pocos miles a un millón de unidades (McKee y McKee, 2003).

Para metabolizar el almidón, los organismos poseen enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos (1-4) entre los residuos alfa-D-glucopiranososa. Las enzimas capaces de hidrolizar el almidón son llamadas en conjunto amilasas. El resultado final de la acción secuencial de las amilasas es la degradación completa del almidón a maltosa o glucosa, la cual posteriormente es metabolizada en la glucólisis (Mathews y col., 2002).

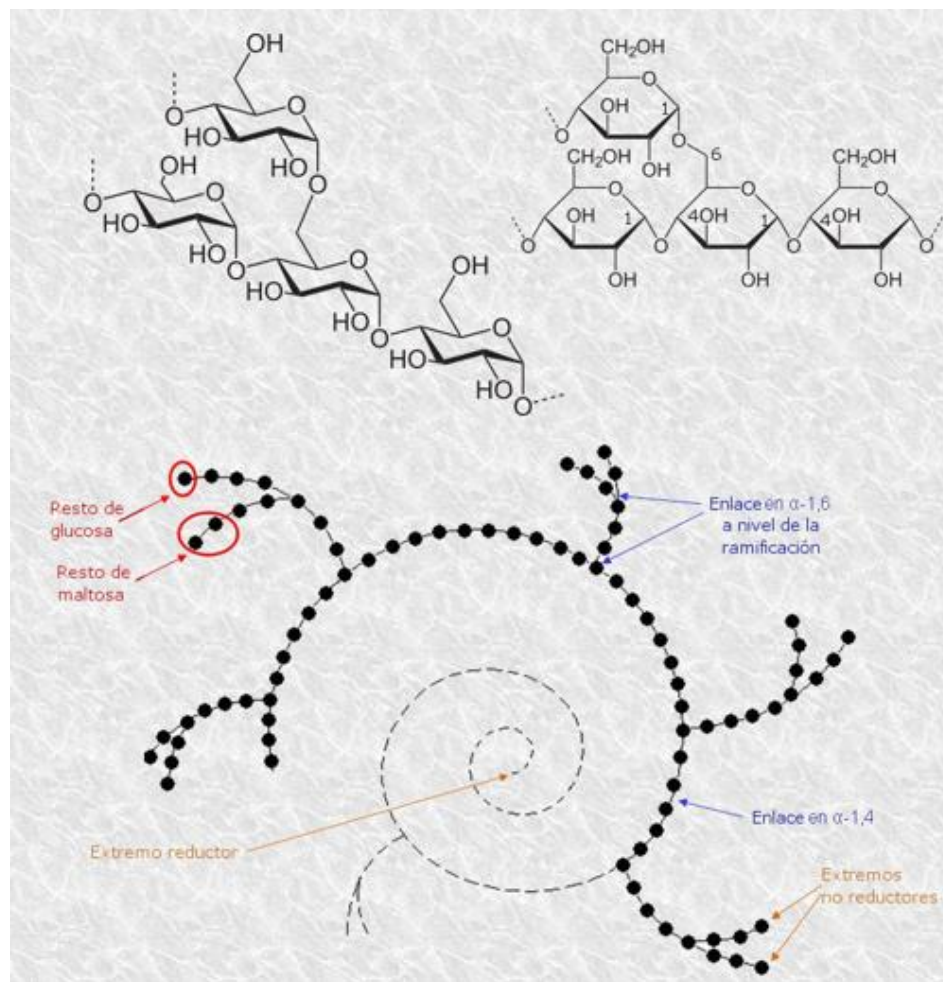


Figura 5. Almidón. Fuente: By Alejandro Porto [CC BY-SA 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>)], vía Wikimedia Commons

Glucólisis

La glucólisis, un conjunto de reacciones que tienen lugar en todas las células, se cree que es de las primeras rutas bioquímicas en formarse en los seres vivos. Tanto las enzimas como el número y mecanismos de los pasos de la ruta son muy conservados en procariotas y eucariotas (McKee y McKee, 2003).

En esta ruta metabólica cada molécula de glucosa se divide y se convierte en dos unidades de tres carbonos (piruvato). Durante este proceso se oxidan varios átomos de carbono. La pequeña cantidad de energía que se captura durante las reacciones glucolíticas (alrededor del 5 % de la total disponible) se almacena temporalmente en dos moléculas de ATP y dos de NADH. El destino del piruvato depende del organismo que se considere y de sus circunstancias metabólicas.

La glucólisis consta de 10 reacciones y tiene lugar en dos fases en donde se utiliza oxígeno como el aceptor terminal de electrones, en los organismos aerobios, como los animales y los vegetales; éstos oxidan totalmente el piruvato para formar CO_2 y H_2O en un mecanismo complejo por pasos, conocido como respiración aerobia.

La glucólisis es la vía metabólica por la cual las células obtienen energía más rápidamente. La actividad de las enzimas que participan en este conjunto de reacciones es esencial para la formación y aprovechamiento de energía, por lo que un mal funcionamiento de éstas incide directamente en el desarrollo de los organismos (Knowles 1991; Roland, 2013).

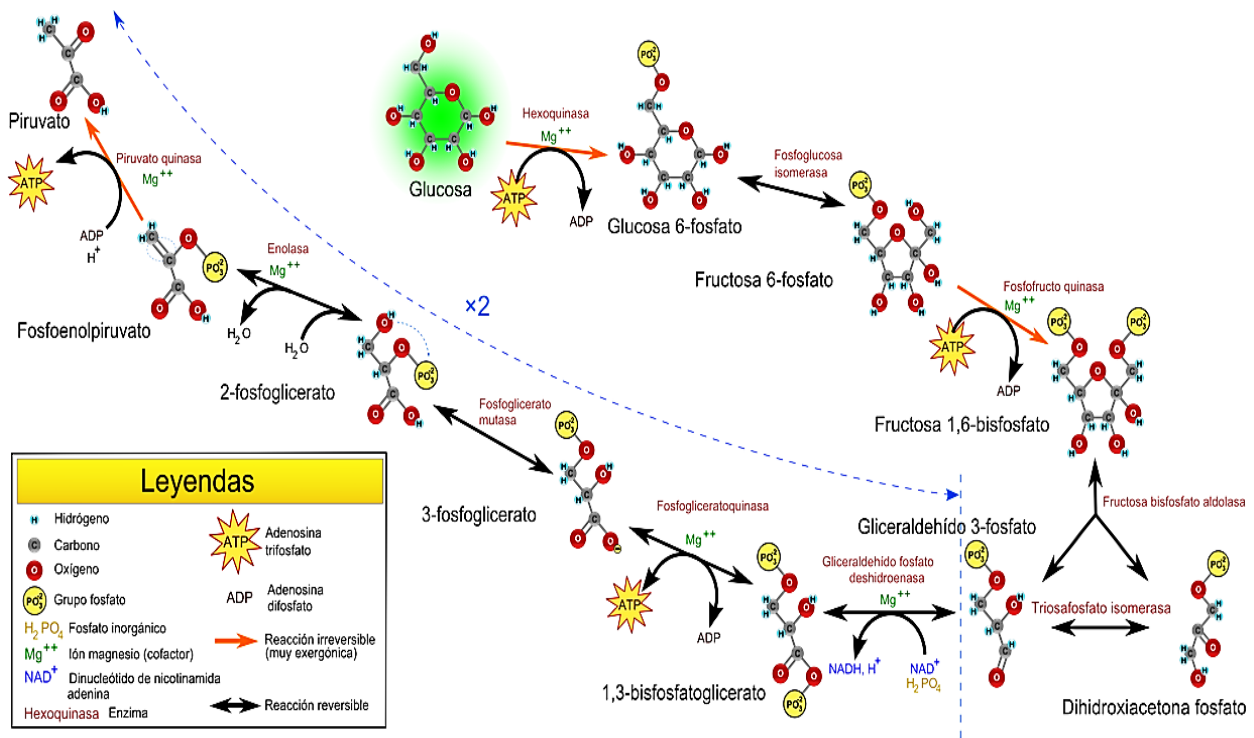


Figura 6. Esquema general de la glucólisis. Fuente: By YassineMrabet [CC BY 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>)], vía Wikimedia Commons

Triosafosfato Isomerasa

La TIM es una enzima implicada en la glucólisis que cataliza la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato (GADP) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP), reacción que tiene lugar a través de un intermediario enediol. Esta reacción es la quinta de la glucólisis y la última en la primera etapa de este proceso.

Estructuralmente la TIM es un homodímero donde cada subunidad en general tiene un peso molecular de 27 kDa con 247 residuos, asociadas por interacciones no covalentes. Cada monómero adopta un patrón de plegamiento de barril (β/α)₈, en la que ocho láminas β paralelas constituyen la parte interna de un barril rodeado por ocho hélices α , conectados entre sí por medio de lazos (Lolis y col., 1990; Moraes, 2011).

Aunque esta proteína tiene una longitud de 247 aminoácidos, sólo 3 de éstos, Glu165, His95 y Lys12 los cuales se encuentran estrictamente conservados, son importantes para la función catalítica. El sitio activo se forma cuando la proteína adquiere su forma completa tridimensional y los tres aminoácidos se ubican en posiciones próximas entre sí (Nickbarg y col., 1988; Komives y col., 1991). No se ha reportado evidencia de que exista cooperatividad catalítica entre las dos subunidades de la TIM, sin embargo, la enzima es solamente activa como dímero (Waley y col., 1973; Casal y col., 1987; Zhang y col., 1994).

Para el caso de la interfase que conforma el sitio activo de la enzima, se han observado diferencias entre especies: En algunos casos la dimerización está relacionada al plegamiento de la proteína, mientras que en otras se ha observado la formación de un intermediario monomérico expandido durante su desplegamiento (Nájera y col., 2003).

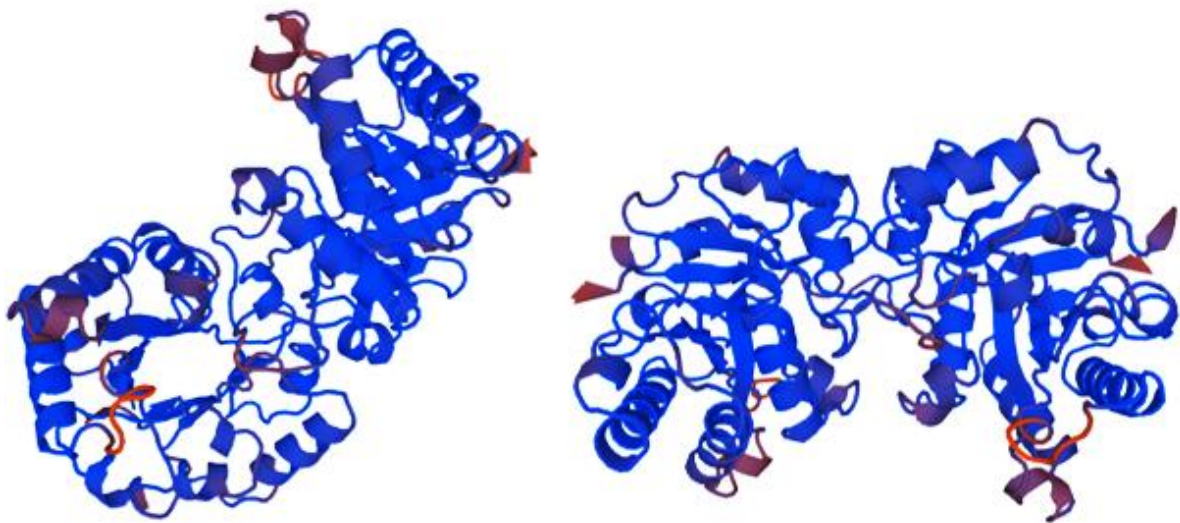


Figura 7. Imágenes de la estructura de la triosafosfato isomerasa de *Tenebrio molitor*. Fuente: Knobeloch y col., 2010.

Producción de Proteínas Recombinantes

Los avances tecnológicos y científicos de los últimos años han permitido el desarrollo de técnicas biomoleculares de manipulación de ADN que hacen posible la sobreexpresión de proteínas recombinantes, lo cual ofrece la ventaja de producir de manera relativamente fácil y rápida grandes cantidades de una proteína de interés que es difícil obtener de su fuente natural. Todo esto funge como una herramienta disponible para numerosas aplicaciones, como la caracterización de enzimas (Guevara-Hernández y col., 2013).

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de uno de los múltiples sistemas de expresión disponibles o de aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien pueden diseñarse y construirse sistemas de expresión según necesidades específicas. Un sistema de sobreexpresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de ADN que poseen los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción en dicho organismo hospedero, además de recibir las moléculas de ADN recombinante.

Para la selección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se tienen que tener en consideración el origen biológico y las propiedades fisicoquímicas de la proteína de interés, su aplicación posterior y el proceso que se empleará para su producción.

Actualmente se emplean una gran variedad de hospederos que van desde organismos unicelulares tales como bacterias, hongos, levaduras y líneas celulares de mamíferos, insectos o plantas, hasta organismos completos como animales y plantas transgénicas.

Las cepas de *Escherichia coli* son de los sistemas de sobreexpresión más utilizados para la producción de proteínas recombinantes. Algunas ventajas que ofrece son su rápida reproducción, utiliza medios de cultivo relativamente baratos, buen manejo en fermentaciones de alta densidad y fácil escalamiento. Además, ha sido uno de los organismos más utilizados como modelo de estudio, debido a esto se ha sido caracterizado ampliamente y se han desarrollado numerosas herramientas que han facilitado su clonación y expresión genética (Baneix y Mujacic, 2004).

Para insertar el material genético en la bacteria se utiliza un el vector de sobreexpresión con la secuencia que codifica a la proteína de interés dentro de la célula hospedera la cual se convierte en una fábrica celular de dicha proteína, éste proceso se conoce como “transformación” el cual consiste en modificar la permeabilidad de las membranas celulares del organismo hospedero por diversos métodos físicos o eléctricos para permitir la entrada del constructo génico al interior de la célula (Palomares y col., 2004).

Cromatografía de Afinidad de Metales Quelantes Inmovilizados

Un método eficaz para la purificación de proteínas es la cromatografía de afinidad, la cual aprovecha la capacidad de unión reversible y específica que tienen las proteínas para unirse a determinadas moléculas.

En la producción de proteínas recombinantes, las proteínas son proporcionadas con residuos de grupos funcionales por medio de técnicas de biología molecular que facilitan su posterior purificación, permitiendo la purificación de proteínas en un único paso por medio de la cromatografía de afinidad de metales quelantes inmovilizados (IMAC, siglas en inglés).

Los complejos de metales quelantes constan de un ion metálico central al cual se unen de manera no covalente determinados ligandos (como el aminoácido histidina), Con la técnica IMAC los ligandos quelantes se inmovilizan en la matriz y se cargan con iones metálicos de transición, como Cu^{+2} o Ni^{+2} . Sin embargo, los iones metálicos mantienen centros de unión libres a los que se pueden enlazar otros ligandos, como los restos de histidina de un polipéptido.

El complejo originado es relativamente inestable si se une un único o unos pocos restos de histidinas que están “dispersos” por una cadena polipeptídica. No obstante, si una proteína contiene varios restos de histidina próximos (etiquetas de histidina o His-tag, por su nombre técnico en inglés) en su extremo amino o carbonilo, la unión del metal es de mayor magnitud. La proteína unida puede ser eluida de la columna con imidazol, que es una molécula que contiene el grupo funcional de la histidina. Al hacerlo, el imidazol compite por los puntos de unión metálicos de la matriz y desplaza a la proteína unida (Müller-Esterl, 2008).

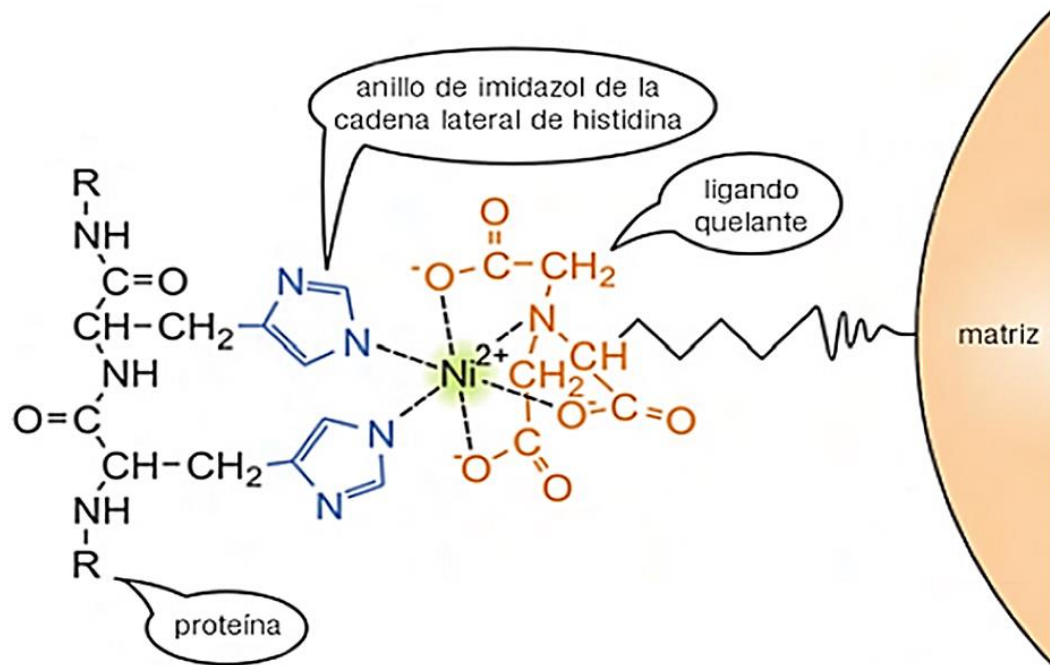


Figura 8. Unión de la cadena lateral de histidina a los iones metálicos de transición. Fuente: Müller-Esterl, 2008.

Para asegurarse que la proteína de interés ha sido purificada con éxito se pueden utilizar métodos analíticos como la electroforesis, las cuales consisten en hacer pasar las proteínas por un campo eléctrico en una matriz formada por una mezcla de polímeros de acrilamida, que dependiendo de su concentración, formará poros de tamaños determinados donde éstas se desplazarán en base a su cociente carga/masa y mediante fricción que depende de su tamaño. Una de las más implementadas es la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Calorimetría de Titulación Isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica termodinámica que permite estudiar el calor de interacción entre dos moléculas durante una reacción química. Cuando dos moléculas se unen o se disocian, el calor puede ser generado o absorbido. La medición de este calor permite una muy precisa determinación de las constantes de unión, la estequiometría de reacción y un perfil termodinámico de la reacción en el cual se incluyen la variación en la entalpía (ΔH) y en la entropía (ΔS).

Esta técnica también ha demostrado ser capaz de medir directamente la cinética y los parámetros termodinámicos (k_{cat} , K_m , ΔH) de reacciones enzimáticas, no obstante esta aplicación es todavía poco explotada (Mazzei y col., 2014).

Un instrumento de ITC consiste en dos celdas idénticas compuestas de un material conductor térmico de alta eficiencia rodeadas por una camisa adiabática. Los termopares que rodean a las celdas detectan diferencias de temperatura entre las dos celdas y entre las celdas y la camisa. Los calentadores localizados en ambas celdas y en la camisa son activados cuando es necesario mantener temperaturas idénticas entre todos los componentes.

La medición directa observable en un experimento de ITC es la entrada de potencia dependiente del tiempo que se requiere para mantener temperaturas iguales en las celdas de referencia y de muestra. La celda de referencia contiene agua o amortiguador careciendo de la macromolécula a estudiar. Durante la inyección de titulante hacia la celda de muestra, el calor es disminuido o incrementado dependiendo de que la reacción de asociación macromolecular sea endotérmica o exotérmica (Pulido y col., 2008).

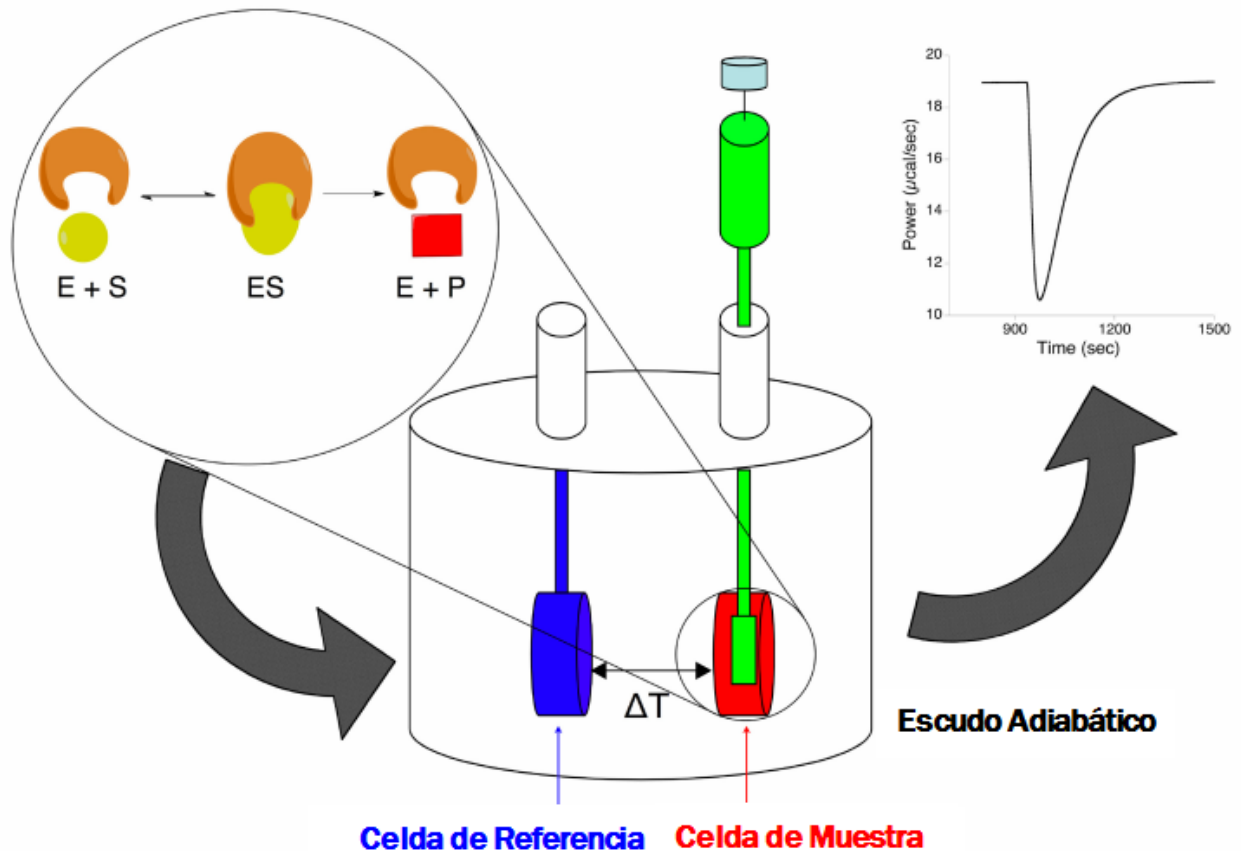


Figura 9. Representación esquemática de un calorímetro de titulación isotérmica para estudiar reacciones enzimáticas. Una reacción enzimática se produce al hacer la titulación del sustrato (en la jeringa de inyección) en la solución de enzima (en la celda de muestra), resulta en un cambio de la potencia térmica liberada por el calorímetro, necesario para mantener constante la diferencia de temperatura entre la celda de muestra y la celda de referencia. (Mazzei y col., 2014)

Se debe tener extremo cuidado en la preparación de muestras, la conducción de experimentos, el análisis de información y la discusión de resultados, ya que cualquier proceso de generación de calor adicional (calor de dilución, calor de protonación - desprotonación, entre otros) contribuirá a los datos experimentales de salida.

Modelado Tridimensional de Proteínas *In Silico*

Las estructuras tridimensionales de proteínas proporcionan información valiosa sobre las bases moleculares de la función de proteínas, lo que permite un diseño eficaz de experimentos, tales como mutagénesis de sitio dirigido, estudios de mutaciones relacionadas con enfermedades o el diseño inhibidores específicos basados en la estructura.

Actualmente, cerca de 110,000 estructuras experimentales de proteínas se depositan en el Protein Data Bank (PDB). Sin embargo, el número de proteínas estructuralmente caracterizadas es bajo comparado con el número de secuencias de proteínas conocidas, lo que significa una falta de información estructural disponible para la gran mayoría de secuencias de proteínas.

Debido a que es complejo obtener estructuras experimentales de métodos tales como la cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN), para cada proteína de interés se han desarrollado métodos computacionales para la predicción de estructuras de proteínas que han ganado mucho interés en los últimos años.

El modelado por homología o comparativo puede proporcionar modelos estructurales útiles para generar hipótesis acerca de la función de una proteína y dirigir el trabajo experimental. Consiste en la construcción de un modelo atómico-resolución de una proteína de interés a partir de su secuencia de aminoácidos y una estructura tridimensional experimental de una proteína homóloga relacionada (molde). Este tipo de modelado se basa en la identificación de las estructuras conocidas probables que pudieran asemejarse a la estructura proteica de la secuencia en cuestión, y en la producción de una alineación que asigne los residuos de la secuencia objetivo a los residuos en la secuencia molde.

Proteínas relacionadas evolutivamente tienen secuencias similares y naturalmente ocurre que proteínas homólogas tienen estructura proteica similar. Se ha demostrado que la estructura de la proteína tridimensional es evolutivamente más conservada de lo que cabría esperar sobre la base de la secuencia (Kaczanowski y Zielenkiewicz, 2010).

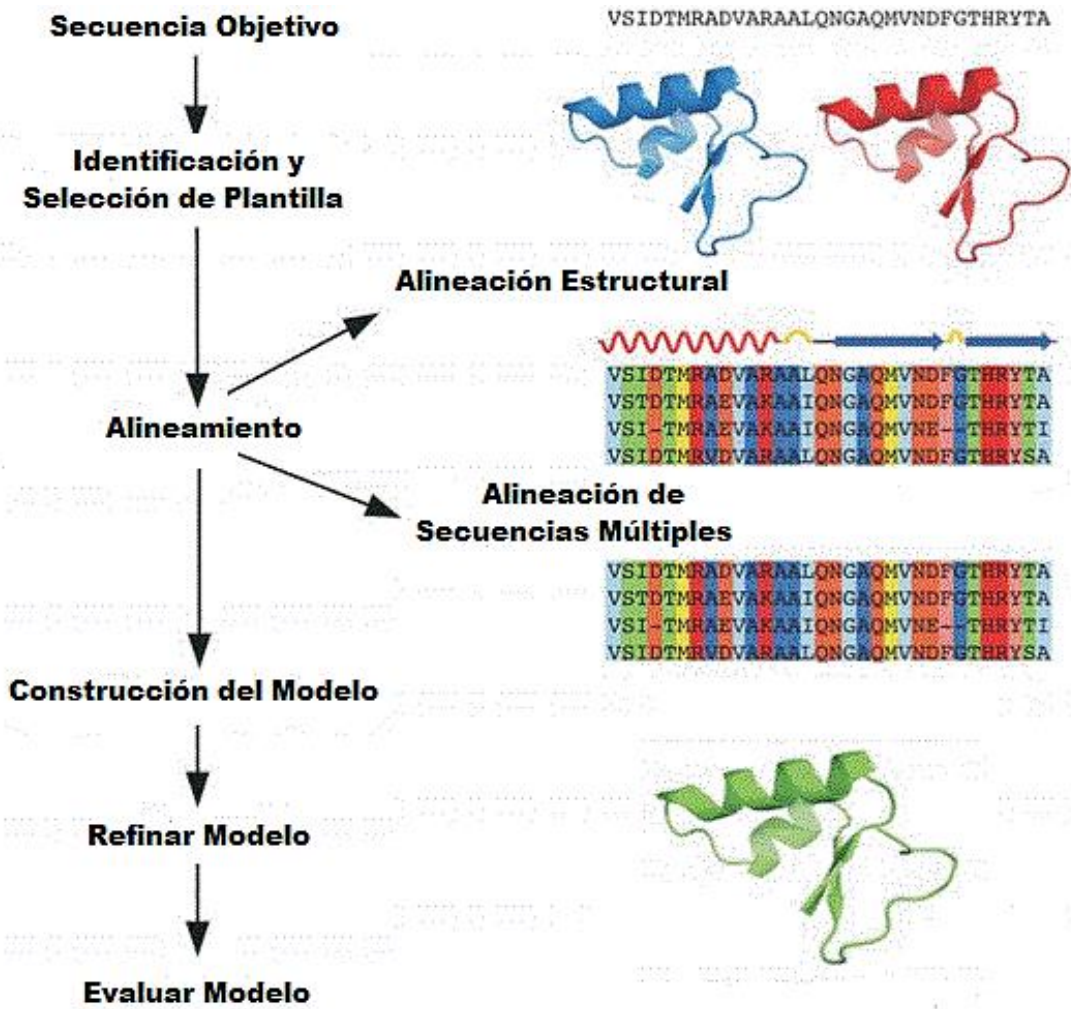


Figura 10. Proceso de modelado por homología. Fuente: Bishop y col., 2008.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sobreexpresión Recombinante

A partir del ADNc de *Tribolium castaneum* se identificó la secuencia génica que codifica a la enzima triosafosfato isomerasa con la cual se diseñó un vector de sobreexpresión comercial (pJ414 de DNA 2.0 ®), el cual contenía un marcador de resistencia a ampicilina, una etiqueta de ocho histidinas en el amino terminal, la región de reconocimiento (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro) de la proteasa sitio-específica PreScision (PPS) y la región codificante del dominio de TIMtc optimizado para su expresión en *E. coli*. El constructo génico fue introducido por medio de un choque térmico en células competentes de *E. coli* BL21 Gold.

El crecimiento de las bacterias se realizó en medio de cultivo Luria Bertani (LB) utilizando ampicilina a una concentración de 100 µg/ml como antibiótico de selección en el que se incubó el medio a 37 °C y a una agitación de 200 rpm, hasta que alcanzó un valor de 0.6 de densidad óptica determinada a 600 nm. Para inducir el medio de cultivo se utilizó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.2 mM. Después de haber inducido el medio de cultivo, se dejó sobreexpresando la proteína durante 16 h a 20 °C con una agitación de 200 rpm. Las células fueron colectadas por centrifugación a 5,000 rpm durante 15 min a 4 °C (obtención de pellet) y fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Purificación por Cromatografía de Afinidad de Metales Quelantes Inmovilizados

Para la purificación de la TIMtc, se resuspendió el pellet colectado de la sobreexpresión en buffer de lisis (Tris- HCl 25 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, imidazol 5 mM, benzamidina 5 mM, DTT 1 mM y lisozima 0.1 mg/ml) y se lisaron las células con 4-5 pulsos ultrasónicos de 10 segundos cada uno a una amplitud de 30%. Posteriormente se centrifugó a 17,000 rpm durante 30 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante (extracto crudo).

El extracto crudo fue cargado en una columna de afinidad a níquel (IMAC, por sus siglas en inglés) (HisTrap, 1 ml, de General Electric) y la proteína fue purificada mediante un gradiente lineal de 5 a 500 mM de imidazol utilizando Tris- HCl 25 mM pH 7.4, NaCl 150 mM e imidazol 5mM como buffer de equilibrio y Tris-HCl 25 mM pH 7.6, NaCl 150 mM e imidazol 500 mM como buffer de elución. La cromatografía se llevó a cabo en un cromatógrafo ÄKTA prime con un flujo de 1 ml/min.

Actividad Enzimática Específica

Para la determinación de la actividad enzimática específica de la TIMtc, se llevó a cabo un ensayo de actividad acoplado. Se utilizó buffer de actividad (TEA 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM y DTT 1 mM. pH final 7.4), D-gliceraldehído-3-fosfato 1 mM como sustrato, 0.9 U de α -glicerofosfato deshidrogenasa como enzima acoplada que utiliza el producto de la reacción que cataliza la TIM (dihidroacetona-3-fosfato) para la formación de α -glicerofosfato con la subsecuente oxidación de NADH. La reacción se detectó a 340 nm en un espectrofotómetro.

Tabla 2. Volúmenes de las soluciones patrón para preparar muestras experimentales y de control para el ensayo de actividad de la TIMtc.

Soluciones Patrón	Volúmenes adicionados (μ l)		
	Experimental	Sin Sustrato (Control)	Sin Enzima (Control)
Buffer (TEA 100 mM, EDTA 10 mM, NADH 0.2 mM, DTT 1 mM)	900	900	900
D-gliceraldehído- 3-fosfato (1 mM)	33.3	0	33.3
α -glicerofosfato deshidrogenasa (0.9 U)	33.3	33.3	33.3
Agua	0	33.3	33.3
TIMtc	33.3	33.3	0
Volumen Total	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Ensayo de Calorimetría de Titulación Isotérmica

Se llevaron a cabo 2 ensayos de calorimetría de titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés). Las titulaciones se realizaron en un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal Inc.) a 25° C y una agitación de 199 rpm. Previamente, la TIMtc fue dializada en buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.6 y NaCl 150 mM y se ajustó la concentración a 0.05 mM. Para cada experimento se utilizaron 2 mL de la muestra.

La solución del sustrato se preparó durante el último recambio del buffer de diálisis y la proporción molar de proteína-ligando fue de 1 a 20. Se realizó una sola inyección del sustrato en la solución de la enzima hasta observar la saturación de la proteína con el sustrato.

Modelado Estructural

El modelado de la TIMtc se llevó a cabo en el programa MOE versión 2012 (Chemical Computing Group) en base a la identidad de secuencias deducidas de aminoácidos con la TIM de *Tenebrio molitor* (Knobleloch y col., 2010; RSCB PDB: 2I9E).

Previo a la construcción del modelo molecular se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de TIM de distintos organismos, lo cual ayudó a mejorar la predicción debido a la alta conservación de los residuos en esta proteína (aproximadamente 80% de identidad).

Se construyeron varios modelos independientes en el programa SWISS-MODEL, de los cuales se eligió el mejor en base la evaluación estructural por defecto de MOE para un refinamiento posterior de minimizaciones de energía.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Sobreexpresión Recombinante de TIM de *Tribolium castaneum*

Para comprobar la sobreexpresión de la TIMtc se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de muestras tomadas del medio a diferentes tiempos después de la inducción con IPTG. Se incluyó una muestra sin inducir y un marcador de peso molecular.

En la tinción del gel SDS-PAGE con azul de Coomassie (Figura 11), en el carril correspondiente a la muestra sin inducir no se observaron bandas intensas, mientras que en los carriles pertenecientes a las muestras tomadas a los diferentes tiempos (2, 4, 6, 8 y 16 horas.) después de la inducción en la fracción soluble, se pudieron observar diferentes bandas de gran tamaño que destacaban cerca de los 31 kDa, las cuales eran de mayor intensidad conforme al tiempo transcurrido después de la inducción.

Dado a que la electroforesis se realizó en condiciones disociantes se esperaba observar en la tinción del gel el peso molecular del monómero de la proteína. El valor reportado en general del peso molecular de cada subunidad de la enzima triosafosfato isomerasa ronda los 27 kDa (Lolis y col., 1990). Sin embargo se debe hacer una consideración de 2 kDa correspondientes a los residuos de histidinas y el sitio de corte de PPS añadidos, por lo que el valor esperado es de aproximadamente de 29 kDa. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que se obtuvo una alta producción de la enzima soluble bajo éstas condiciones de sobreexpresión.

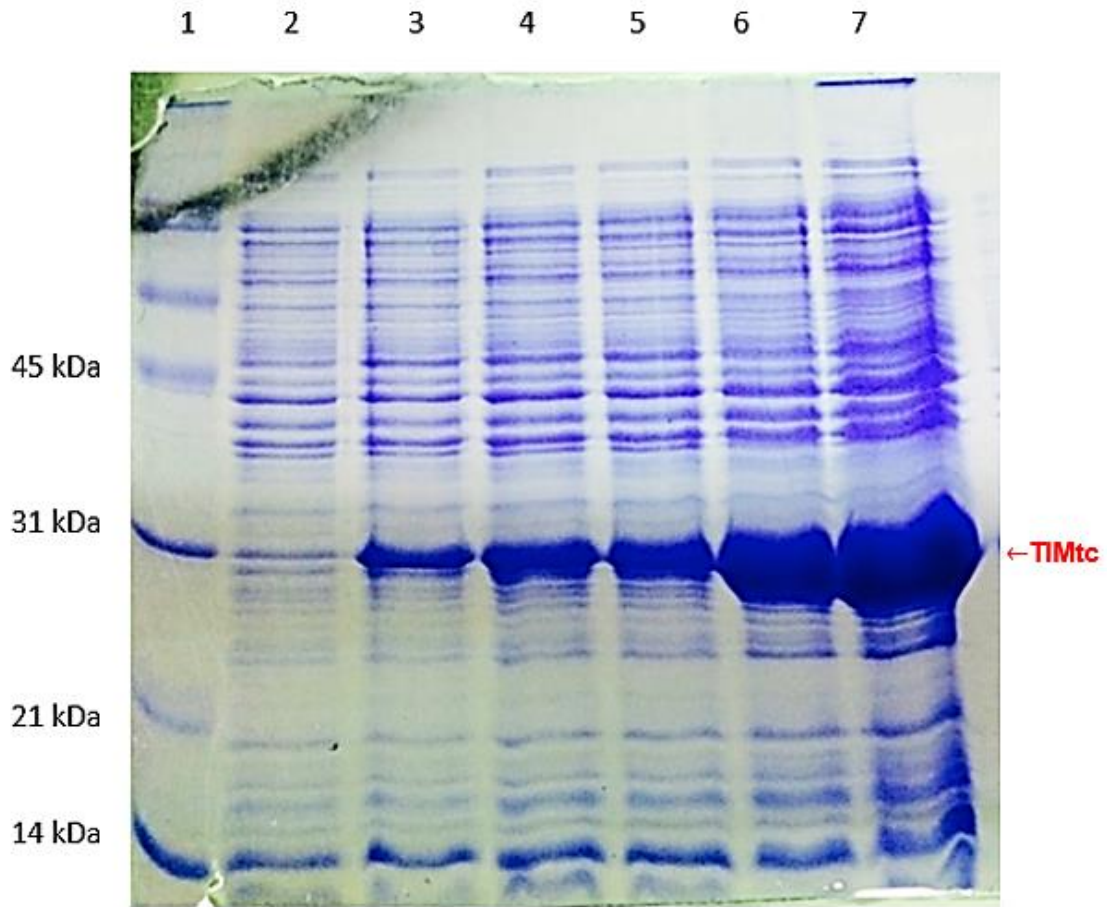


Figura 11. Cinética de Sobreexpresión de TIM de *Tribolium castaneum*. La figura muestra la tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE de la cinética de sobreexpresión de TIMtC. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al cultivo sin inducir, los carriles 3-7 corresponden a muestras colectadas de biomasa a las 2, 4, 6, 8, y 16 horas después de la inducción, respectivamente.

Purificación de TIM de *Tribolium castaneum*

El extracto crudo obtenido de la sobreexpresión fue cargado en una columna de afinidad a níquel (HisTrap, 1 mL) y la proteína fue purificada mediante un gradiente lineal de imidazol de 5 a 500 mM. El ajuste del pH a 7.4 de los buffers de equilibrio y de elución garantiza que la matriz y la cola de histidina de la TIMtc estén correctamente cargadas y se produzca la interacción entre los grupos imidazol de las histidinas y los iones de níquel en la matriz. El contenido de imidazol 5 mM (baja concentración) y cloruro de sodio 150 mM en el búfer de equilibrio, tiene como finalidad reducir las interacciones inespecíficas y prevenir las interacciones iónicas, respectivamente, lo que disminuye la unión de proteínas contaminantes a la columna (Falero y col., 2008).

Cuando las sustancias están muy estrechamente ligadas al medio de afinidad, puede ser útil detener el flujo durante algún tiempo después de la aplicación de eluyente. Esto da más tiempo para la disociación de uniones inespecíficas relativamente débiles y por lo tanto ayuda a optimizar la purificación (Biotech, 2001). Por lo anterior durante la cromatografía se fijó la concentración de imidazol en tres ocasiones a 14, 23, y 31% por alrededor de 7-9 minutos cada uno para permitir una adecuada purificación de la TIMtc. Los primeros tres picos de cuatro obtenidos en la cromatografía (Figura 12), se presentaron a concentraciones bajas de imidazol los cuales se tratan de uniones inespecíficas de proteínas que presentan también afinidad por la columna.

La mayor cantidad de la TIMtc queda retenida en la matriz debido a una mayor afinidad que le proporciona la cola de histidinas, con respecto a las uniones inespecíficas, uniéndose fuertemente a los puntos de unión de los iones de níquel. La proteína solo puede ser desplazada por una alta concentración (por lo general, arriba de los 200 mM) de imidazol contenido en el búfer de elución, el cual compite por los sitios de unión del Ni^{+2} de la matriz. Esto se pudo observar en el último pico obtenido en la cromatografía en donde se eluyó la TIMtc aproximadamente a una concentración de 270 mM de imidazol y se colectaron las fracciones correspondientes.

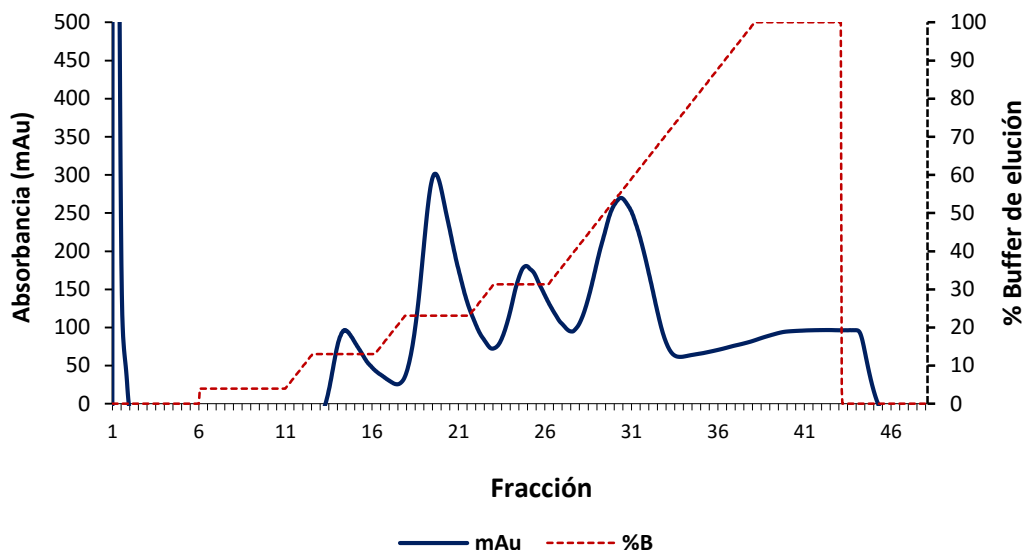


Figura 12. Cromatografía IMAC de TIMtc. La elución se realizó mediante un gradiente de Imidazol de 5 a 500 mM. La línea continua pertenece a la absorbancia en mAu y la línea punteada al porcentaje del buffer de elución.

Para determinar el grado de pureza de la proteína en las fracciones colectadas correspondientes al último pico de la cromatografía se llevó a cabo una electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12% en condiciones desnaturalizantes, empleando una intensidad de corriente constante de 20 mA. Se incluyó un marcador de peso molecular, el extracto crudo y el extracto crudo eluido a través de la columna. La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie.

En el gel SDS-PAGE (Figura 13), no se destacaron bandas intensas de proteínas en los carriles correspondientes al extracto crudo, tanto al eluido y el no eluido, con lo cual se comprobó que la TIMtc se unió satisfactoriamente a la columna. En los carriles centrales 4-7 se pudieron observar una gran cantidad de bandas, las cuales se pueden interpretar como uniones inespecíficas de proteínas a la columna coeluyendo junto con la TIMtc de aproximadamente 29 kDa (Lolis y col., 1990), con la consideración pertinente de los residuos extra de histidinas agregadas a la secuencia nativa. Esto evidencia una baja pureza en las fracciones correspondientes. Sin embargo en los últimos dos carriles se obtuvo una única banda de gran intensidad de igual manera cercana a los 31 kDa, lo cual, en base a lo mencionado anteriormente, indica una alta pureza en las fracciones respectivas necesaria para realizar experimentos como actividad enzimática, calorimetría de titulación isotérmica e incluso pruebas de cristalización de proteínas.

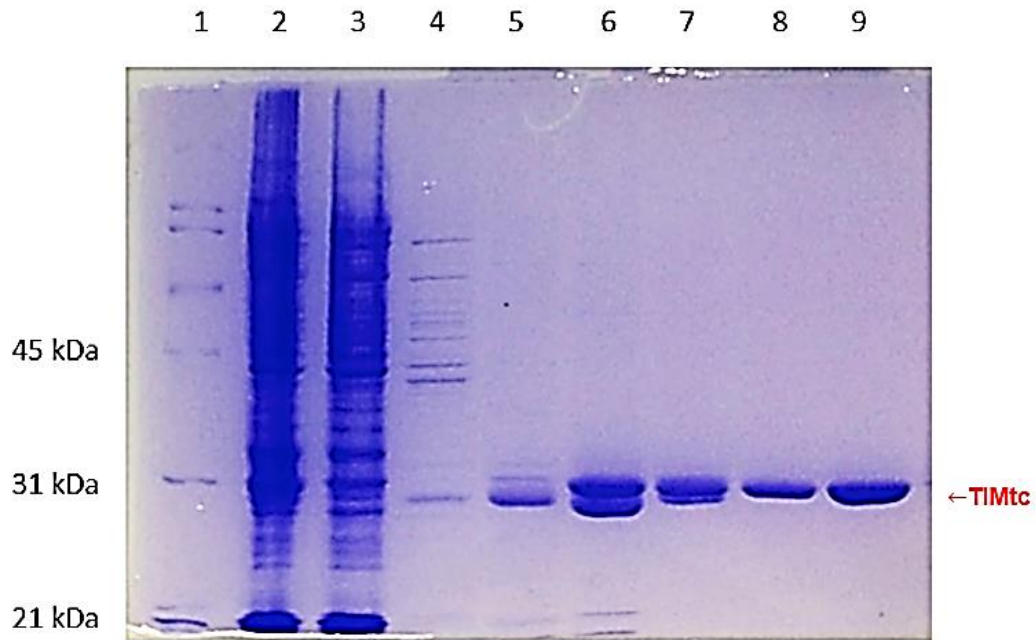


Figura 13. Determinación del grado de pureza de TIMtc. Electroforésis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de fracciones colectadas en IMAC. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al extracto crudo, en el carril 3 se encuentra el extracto crudo que fue eluido a través de la columna, en el carril 4-7 se muestran uniones inespecíficas, en los carriles 8-9 se encuentra la TIMtc purificada.

Actividad Enzimática Específica de TIM de *Tribolium castaneum*

Los ensayos enzimáticos realizados para diversos fines se han llevado a cabo mediante ensayos acoplados de gran complejidad en los que la formación de productos o degradación de sustratos no puede ser medida con facilidad, por ejemplo ensayos radioactivos, cuantificación por HPLC etc. Para poder determinar la actividad de este tipo de enzimas, se utilizan ensayos de actividad con enzimas acopladas cuya actividad puede detectarse espectrofotométricamente (Figura 14), lo cual implica menores costos y tiempo de realización.

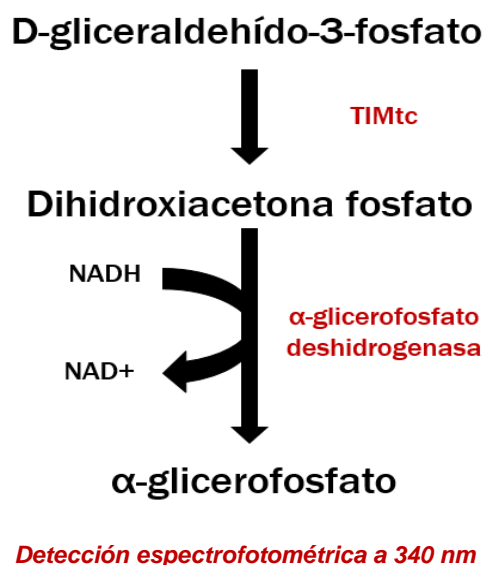


Figura 14. Mecanismo del ensayo de actividad acoplado.

En los resultados obtenidos del ensayo de actividad (Figura 15), se pudo observar una disminución en la absorbancia a través del tiempo lo cual indica la subsecuente oxidación del NADH dependiente de la actividad enzimática de la TIMtc dentro del mecanismo de acoplamiento planteado. Esto se puede sustentar con el ensayo de control realizado previamente donde se corrieron blancos de muestras control (sin TIMtc) para garantizar la estabilidad del gliceraldehído-3-fosfato, la α -glicerofosfato deshidrogenasa y el NADH contenido en el buffer de actividad. Los resultados obtenidos demuestran la estabilidad de los componentes de la mezcla de la reacción sin la TIMtc ya que no hubo variación en la absorbancia a través del tiempo.

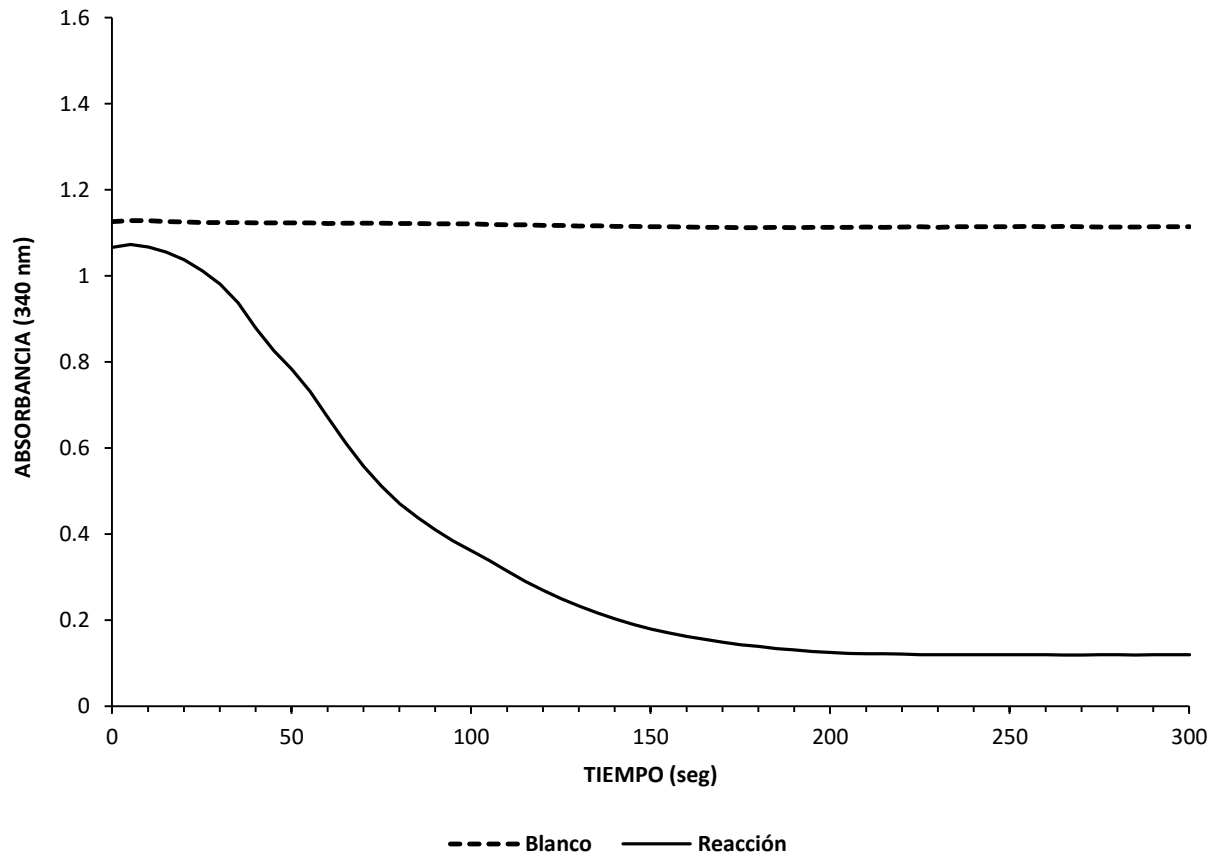


Figura 15. Ensayo de actividad. Absorbancia a través del tiempo siguiendo la oxidación de NADH. La línea punteada pertenece a una muestra control, la cual contiene todos los componentes de la mezcla de la reacción a excepción de la TIMtc. La línea continua pertenece a la reacción.

Ensayo de Calorimetría de Titulación Isotérmica

Se realizaron pruebas para la determinación de parámetros cinéticos de la actividad de la TIMtc por medio de ITC (Figura 14), utilizando una sola inyección del sustrato dentro de la celda de reacción que contiene la TIMtc. Se observó un alto calor de dilución que pudo haberse generado por diferencias en las composiciones de los buffers y no puede atribuirse a la reacción de la TIMtc con la dihidroxiacetona fosfato.

Para detectar una señal correspondiente a la reacción enzimática se pueden realizar ajustes en la formulación de los buffers, la concentración de la enzima y del sustrato. Hasta la fecha no se han reportado experimentos cinéticos determinados por ITC de enzimas isomerasas. Una limitante de este tipo de reacciones es que el producto de la misma puede ser utilizado como sustrato por la misma enzima lo que podría afectar a la detección de los diferenciales de temperatura por el equipo. Sin embargo estos resultados pueden ser utilizados como base para un diseño experimental más adecuado, que permita realizar mediciones más precisas.

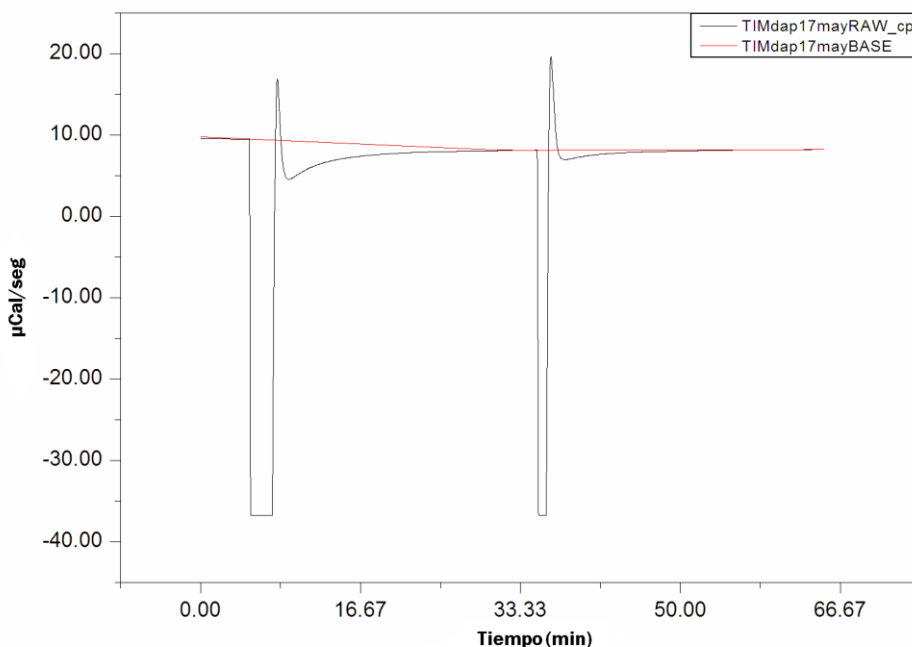


Figura 16. Ensayo de calorimetría de titulación isotérmica.

Modelado por Homología de la TIM de *Tribolium castaneum*

El modelo estructural realizado con base a las secuencias de aminoácidos de la TIMtc y la TIM de *Tenebrio molitor* realizado en el programa SWISS-MODEL y la estructura generada en MOE donde se realizó un refinamiento de minimizaciones de energía, tuvieron un alto grado de identidad y en ambas estructuras se mantuvo el plegamiento $(\beta/\alpha)_8$ característico. La precisión de las estructuras generadas por modelado por homología es altamente dependiente de la identidad de secuencia entre el objetivo y el molde. La secuencia de la TIMtc tiene un 80% de identidad con respecto a la secuencia de la TIM de *Tenebrio molitor*, además la triosafosfato isomerasa es una de las enzimas más conservadas evolutivamente, por lo que el modelado realizado puede considerarse altamente confiable, con posibles errores en el compactamiento de las cadenas laterales y pequeños cambios o distorsiones en la parte central de la cadena principal (Baker y Sali, 2001).

En la estructura generada se identificaron las regiones y aminoácidos característicos de esta enzima como la triada catalítica (Figura 18), el sitio de unión del sustrato (Figura 20) y la interfase del dímero (Figura 22), importantes para la actividad de la triosafosfato isomerasa de *Tribolium castaneum*. En la triada catalítica participan los aminoácidos Lys12, His94 y Glu164 que son esenciales para la catálisis. A pH fisiológico, el glutamato está desprotonado y por tanto cargado negativamente, con lo cual contribuye a atraer el protón del carbono 2 del D-gliceraldehído-3-fosfato; la histidina actúa como un grupo donador de protones para transferirlos entre el grupo carbonilo del sustrato y el hidroxilo del carbono 2. El sitio de unión al sustrato se conforma por los aminoácidos Asn10, Lys12, His94, Glu164, Gly170, Ser210, Leu229 y Gly232, los cuales dan lugar a una interacción con el sustrato de tal forma que permiten el plegamiento eficiente de la TIM.

Para el caso de la interfase que conforma el sitio activo de la enzima, se han observado diferencias entre especies. En algunos casos, la dimerización está relacionada al plegamiento de la proteína, mientras que en otras se ha observado la formación de un intermediario monomérico expandido durante su desplegamiento. En el caso de la TIMtc se observa que en esta región los aminoácidos que predominan son de carácter no polar lo que permite una fuerte interacción hidrofóbica entre los monómeros permitiendo la estabilización del dímero.

<i>Homo sapiens</i>	MAPSRKFFVGGNWK M NGRKQSLGELIGTLNAAKVPAD-TEVVCPPTAYIDFARQKLD-P	58
<i>Gallus gallus</i>	MAP-RKFFVGGNWK M NGDKKSLGELIHTLNGAKLSAD-TEVVCGAPSIYLDFAKQKLD-A	57
<i>T. castaneum</i>	MG--RKFFVGGNWK M NGDKKQISEIINTLKTGPLSPN-TEVIVGVPPIYLEHVRTNLP-Q	56
<i>T. molitor</i>	MA--RKFFVGGNWK M NGDKKQINEIIGFLKSGPLNQD-TEVVVGVPAIYLELVRTCVP-A	56
<i>L. vannamei</i>	MASPRKFFVGGNWK M NGDKAAIDGIIISFMKTGPLSPN-TEVVVGCPCQCYLYMTRHMP-A	58
<i>E. coli</i>	---MRHPLVMGNWK L NGSRHMVHELVSNLRKELAGVAGCAVAIAPPEMYIDMAKREAEGS	57
	: . ****:* : : :: :. * . * *: .:	
<i>Homo sapiens</i>	KIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATWVVL G HERRHVFGESEDELIGQKVAHAL	118
<i>Gallus gallus</i>	KIGVAAQNCYKVPKGAFTGEISPAMIKDIGAAWVIL G HERRHVFGESEDELIGQKVAHAL	117
<i>T. castaneum</i>	SIEVAAQNCYKVPKGAFTGEISPAMIKDIGVNWVIL G HERRQIFGETDELIAEKVAHAL	116
<i>T. molitor</i>	SIGVAAQNCYKVPKGAFTGEISPAMIKDVGDWVIL G HERRQIFGESEDELIAEKVCHAL	116
<i>L. vannamei</i>	NIGIAAQNCYKVAKGAFTGEISPAMVKDCGCEWVIL G HERRNVFGEPEQLISEKVGHAL	118
<i>E. coli</i>	HIMLGAQNVDLNLGSAFTGETSAAMLKDIGAQYII I GHERRTYHKESDELIAKKFAVLK	117
	* :.*** .***** *..*:** * ::::***** .*.*:*.:.*	
<i>Homo sapiens</i>	AEGLGVIACIGEKLDEREAGITEKVVFEQTKVIADN--VKDWSKVVLAY E PVWAIGTGKT	176
<i>Gallus gallus</i>	AEGLGVIACIGEKLDEREAGITEKVVFEQTKAIADN--VKDWSKVVLAY E PVWAIGTGKT	175
<i>T. castaneum</i>	EAGLKVIACIGETLEEREAGKTEEVVFRQTKAIAGK--IKDWSNVVIA E PVWAIGTGKT	174
<i>T. molitor</i>	ESGLKVIACIGETLEEREAGKTEEVVFRQTKAIAAK--VNDWSNVVIA E PVWAIGTGKT	174
<i>L. vannamei</i>	EAGLKVIPICIGEKLEDREGNRTQEVVFAQMKALLPN--ISDWSRVVLAY E PVWAIGTGKT	176
<i>E. coli</i>	EQGLTPVLCIGETEAEAGKTEEVVQIDAVLKTQGAFAFEGAVIA E PVWAIGTGKS	177
	** : ****. :.*..*::* * ..: . :. .*:*****:	

Figura 17 Secuencias de diferentes TIM donde se resaltan los aminoácidos Lys12, His94 y Glu164 pertenecientes a la triada catalítica. El símbolo (*) hace referencia a aminoácidos que se conservan en todas las secuencias. El símbolo (:.) hace referencia a sustituciones conservativas de aminoácidos. EL símbolo (.) señalan sustituciones no conservativas de aminoácidos en la secuencias. Los aminoácidos no simbolizados no tienen relación alguna.

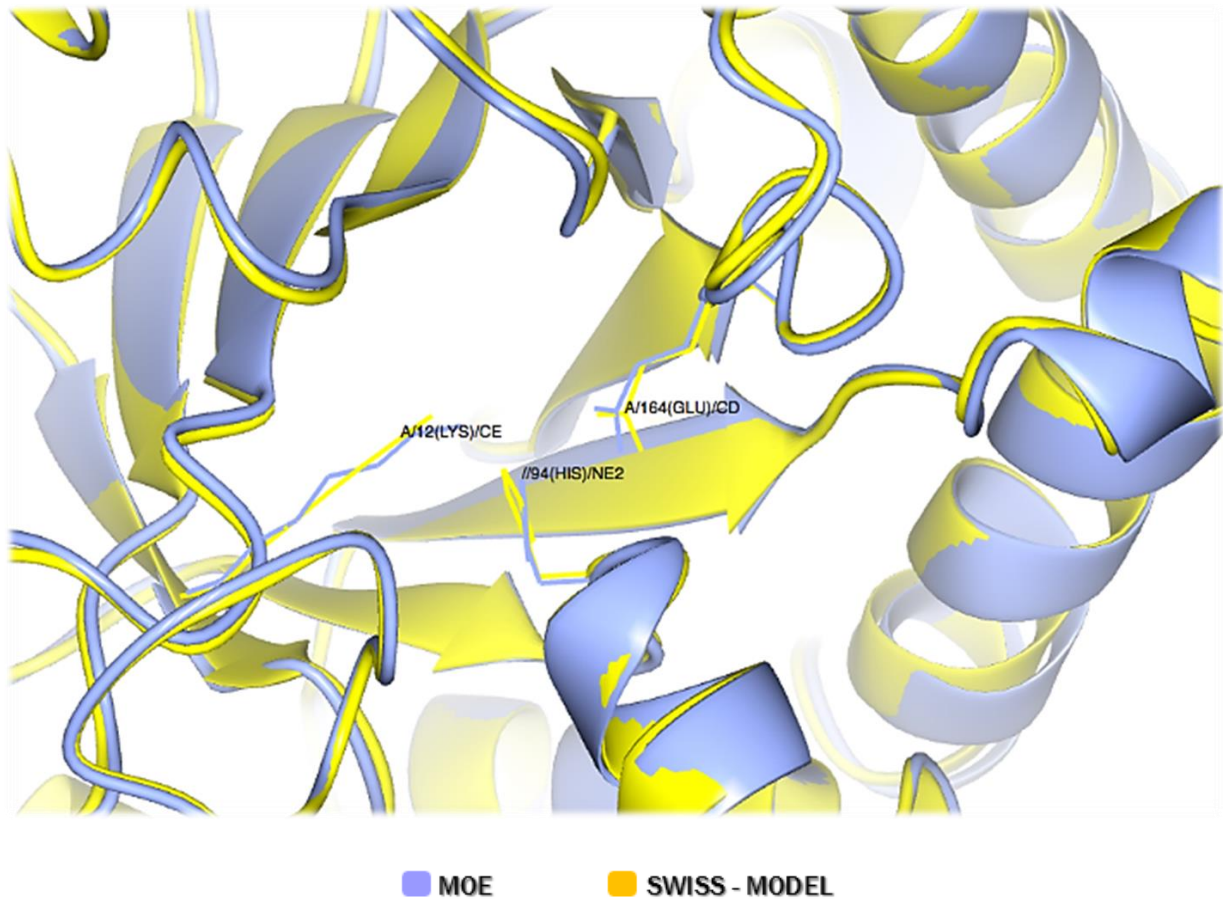


Figura 18. Triada catalítica de TIMtc. Modelo por homología de TIMtc donde se observa la región perteneciente a la triada catalítica. La estructura generada en MOE se muestra en azul y la estructura generada en SWISS-MODEL se muestra en amarillo.

Homo sapiens MAPSRKFFVGGNWKMMNGRKQSLGELIGTLNAAKVPAD-TEVVCPAPTAYIDFARQKLD-P 58
Gallus gallus MAP-RKFFVGGNWKMMNGDKKSLGELIHTLNGAKLSAD-TEVVCGAPSIYLD FARQKLD-A 57
T. castaneum MG--RKFFVGGNWKMMNGDKKQISEIINTLKTGPLSPN-TEVIVGVPAIYLEHVRTNLP-Q 56
T. molitor MA--RKFFVGGNWKMMNGDKKQINEIIGFLKSGPLNQD-TEVVVGVPAIYLELVRTCVP-A 56
L. vannahamei MASPRKFFVGGNWKMMNGDKAAIDGIISFMKTGPLSPN-TEVVVGCPCYCYLMTREHMP-A 58
E. coli ---MRHPLVMGNWKLNGSRHMVHELVSNLKELAGVAGCAVAIAPPEMYIDMAKREAEGS 57
*: . * **** : * : : : : . * . * * : . :

Homo sapiens KIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATWVVLGHSERRHVFGESEDELIGQKVAHAL 118
Gallus gallus KIGVAAQNCYKVPKGAFTGEIS PAMIKDIGAAWVILGHSERRHVFGESEDELIGQKVAHAL 117
T. castaneum SIEVAAQNCYKVPKGAFTGEIS PAMIKDIGVNWVILGHSERRQIFGETDELIAEKVAHAL 116
T. molitor SIGVAAQNCYKVPKGAFTGEIS PAMIKDVGADWVILGHSERRQIFGESEDELIAEKVCHAL 116
L. vannahamei NIGIAAQNCYKVAKGAFTGEIS PAMVKDCGCEWVILGHSERRNVFGEPEQLISEKVGHAL 118
E. coli HIMLGAQNVDLNLGSAFTGETSAAMLKDIGAQYIIIGHSERRTYHKESDELIAKKFAVLK 117
* : . *** . ***** * . * : * * : : : ***** . * . * : * : * .

Homo sapiens AEGLVVIACIGEKLDEREAGITEKVVFEQTKVIADN--VKDWSKVVLAYEPVWAIETGKT 176
Gallus gallus AEGLVVIACIGEKLDEREAGITEKVVFEQTKAIADN--VKDWSKVVLAYEPVWAIETGKT 175
T. castaneum EAGLKVIACIGETLEEREAGKTEEVVFRQTKAIAGK--IKDWSNVVIAIYEPVWAIETGKT 174
T. molitor ESGLKVIACIGETLEEREAGKTEEVVFRQTKAIAAK--VNDWSNVVIAIYEPVWAIETGKT 174
L. vannahamei EAGLKVIACIGEKLEDRGNRTQEVVFAQMKALLPN--ISDWSRVVLAYEPVWAIETGKT 176
E. coli EQGLTPVLCIGETEAEENEAGKTEEVVFCARQIDAVLKTQGAAPFEGAVIAYEPVWAIETGKS 177
** : **** . : * . * : : * * : : . : . * : ***** :

Homo sapiens ATPQQAQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVVTGATCKELASQPDVDGFLVGGAS 236
Gallus gallus ATPQQAQEVHEKLRGWLKSHVSDAVAQSTRIIYGGSVVTGGNCKELASQHDVDGFLVGGAS 235
T. castaneum ATPQQAQEVHKALRQWFCTHVNADVGNISIRIQYGGSVVTGANCKELAAQPDIDGFLVGGAS 234
T. molitor ATPQQAQDVHKALRQWICENIDAKVGNISIRIQYGGSVVTAANCKELASQPDIDGFLVGGAS 234
L. vannahamei ASPEQAQEVHADLRQWLRDNVNAEVAESTRIIYGGSVSAGNCQELAKKGDIDGFLVGGAA 236
E. coli ATPAQAQAVHKFIRDHIAK-VDANIAEQVIIQYGGSVNASNAELFAQPDIDGFLVGGAS 236
* : * *** ** : * : : . : : . * ***** ** : * : * * ***** :

Figura 19. Secuencias de diferentes TIM donde se resaltan los aminoácidos Asn10, Lys12, His94, Glu164, Gly170, Ser210, Leu229 y Gly 232 pertenecientes al sitio de unión del sustrato. El símbolo (*) hace referencia a aminoácidos que se conservan en todas las secuencias. El símbolo (:) hace referencia a sustituciones conservativas de aminoácidos. EL símbolo (.) señalan sustituciones no conservativas de aminoácidos en la secuencias. Los aminoácidos no simbolizados no tienen relación alguna.

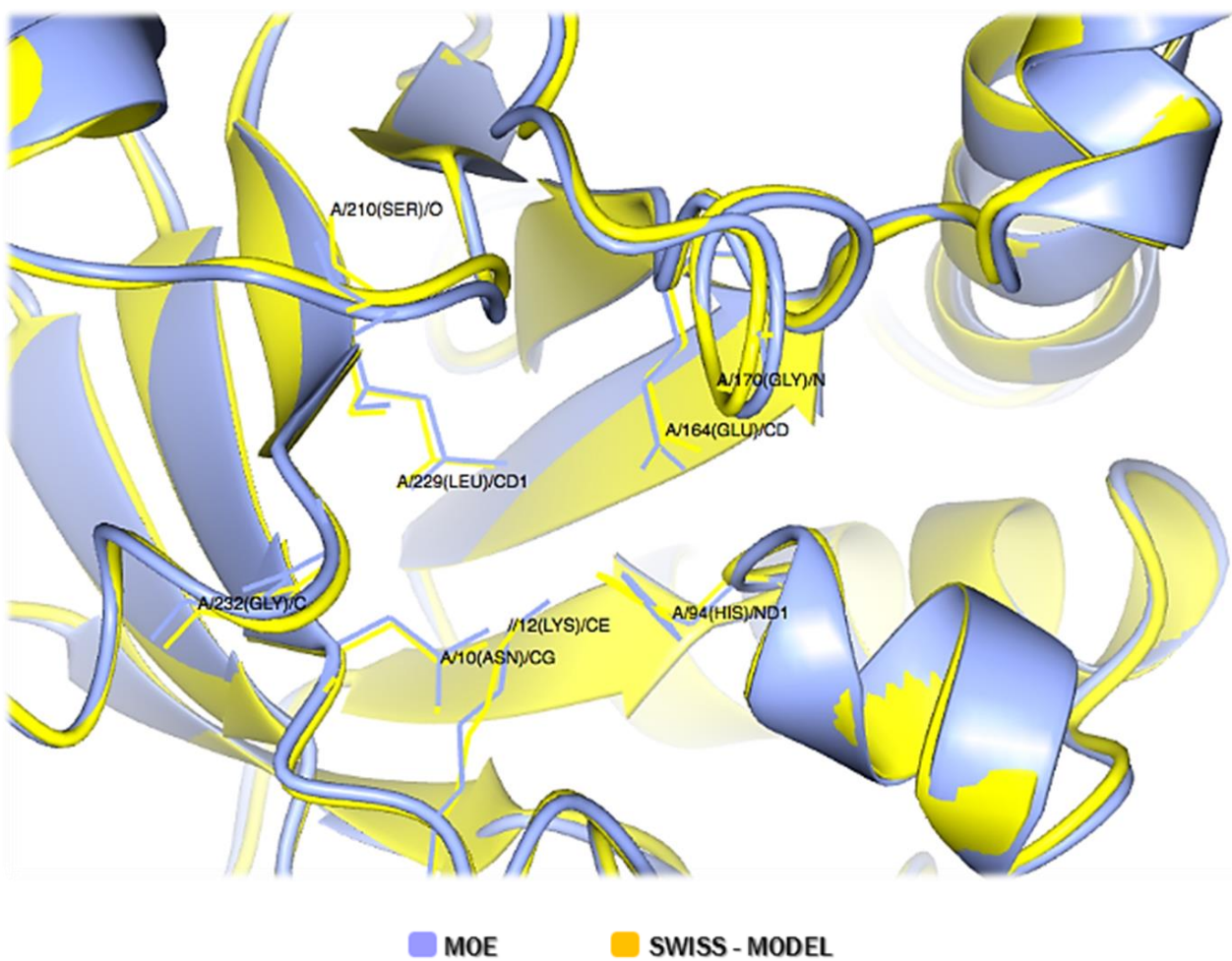


Figura 20. Sitio de unión del sustrato. Modelo por homología de TIMtc donde se observa la región perteneciente al sitio de unión del sustrato. La estructura generada en MOE se muestra en azul y la estructura generada en SWISS-MODEL se muestra en amarillo.

<i>Homo sapiens</i>	MAPSRKFFVGGNWKMNGRKQSLGELIGTLNAAKVPAD-TEVVCAPPTAYIDFARQKLD-P	58
<i>Gallus gallus</i>	MAP-RKFFVGGNWKMNQDKKSLGELIHTLNGAKLSAD-TEVVCGAPSIYLDFAHQKLD-A	57
<i>T. castaneum</i>	MG--RKFFVGGNWKMNQDKKQISEIINTLKTGPLSPN-TEVIVGVPAIYLEHVRITNLP-Q	56
<i>T. molitor</i>	MA--RKFFVGGNWKMNQDKKQINEIIGFLKSGPLNQD-TEVVGVPAIYLELVRITCVP-A	56
<i>L. vannamei</i>	MASPRKFFVGGNWKMNQDKAAIDGIISFMKTGPLSPN-TEVVVGCPCYLYMTRHMP-A	58
<i>E. coli</i>	---MRHPLVMGNWKLNGSRHMVHELVSNLKELAGVAGCAVAIAPPEMYIDMAKREAEGS	57
	: . ****:*: : : :: :. * . * *: .:	
<i>Homo sapiens</i>	KIAVAAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATWVVLGHSERHRVFGESDELIGQKVAHAL	118
<i>Gallus gallus</i>	KIGVAAQNCYKVPKGAFTGEISPAIKDIGAAWVILGHSERHRVFGESDELIGQKVAHAL	117
<i>T. castaneum</i>	SIEVAAQNCYKVPKGAFTGEISPAIKDIGVNWVILGHSERQRIFGETDELIAEKVAHAL	116
<i>T. molitor</i>	SIGVAAQNCYKVPKGAFTGEISPAIKDVGADWVILGHSERQRIFGESDELIAEKVCHAL	116
<i>L. vannamei</i>	NIGIAAQNCYKVAKGAFTGEISPAVKDCGCEWVILGHSERNVFGEPDQLISEKVGHAL	118
<i>E. coli</i>	HIMLGAQNVDLNLSGAFTGETSAAMLKDIGAQYIIIGHSESRTYHKESEDELIAKKFAVLK	117
	* :.*** .***** *..*:** * ::::***** .*.:**.:*.	

Figura 21. Secuencias de diferentes TIM donde se resaltan los aminoácidos Asn10, Met13, Ile45, Tyr46, Glu48, Arg51, Gln63, Asp84, Ile85, Glu96, y Arg97, pertenecientes a la interfase del dímero. El símbolo (*) hace referencia a aminoácidos que se conservan en todas las secuencias. El símbolo (:) hace referencia a sustituciones conservativas de aminoácidos. EL símbolo (.) señalan sustituciones no conservativas de aminoácidos en la secuencias. Los aminoácidos no simbolizados no tienen relación alguna.

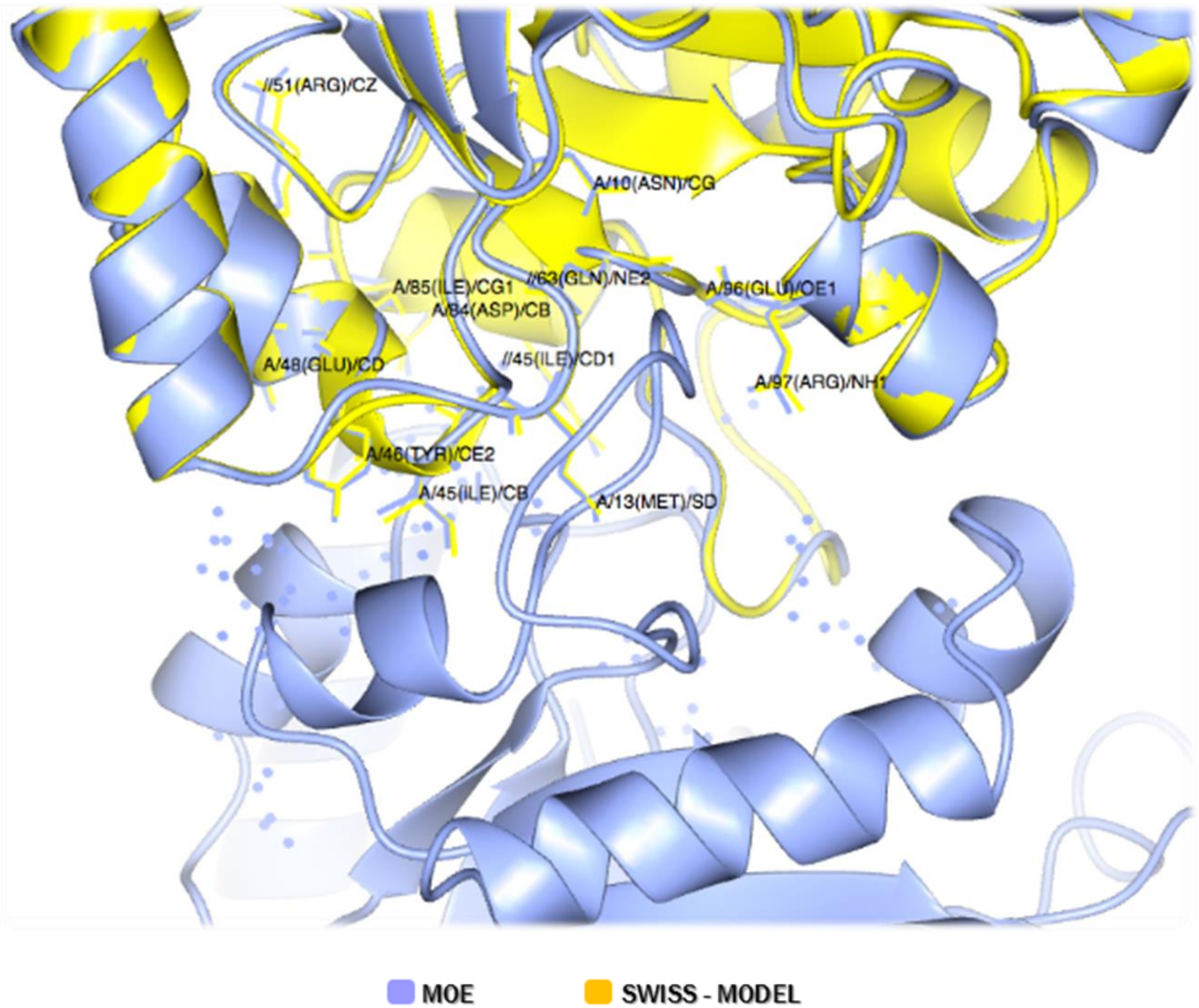


Figura 22. Interfase del dímero. Modelo por homología de TIMtc donde se observa la interfase del dímero. La estructura generada en MOE se muestra en amarillo y la estructura generada en SWISS-MODEL se muestra en azul.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de las muestras colectadas de biomasa de las cepas de *E. coli* después de su inducción, se puede concluir que se logró la sobreexpresión heteróloga de la TIMtc, obteniendo una alta producción de la enzima soluble bajo las condiciones implementadas.

El análisis SDS-PAGE de las fracciones colectadas de la cromatografía de afinidad a metales quelantes inmovilizados reveló la purificación de una proteína de alrededor de 31 kDa, lo cual sugiere que por efecto de las condiciones disociantes del gel se trata de los monómeros de la TIMtc, que con base a lo reportado se esperaba un peso molecular de 29 kDa aproximadamente.

El ensayo enzimático acoplado planteado, utilizando α -glicerosfato deshidrogenasa como enzima acoplada, logró determinar la actividad enzimática específica de la TIMtc mediante la subsecuente oxidación del NADH contenido en el buffer de actividad determinado a 340 nm.

Los ensayos preliminares de ITC revelaron un alto calor de dilución que pudo haberse generado por diferencias en las composiciones de los buffers y no puede atribuirse a la reacción de la TIMtc con la dihidroxiacetona fosfato. Esto sugiere la necesidad de una optimización del experimento lo cual se podría lograr con un ajuste en la formulación de los buffers y la concentración de la enzima y el sustrato.

La estructura tridimensional teórica de la TIMtc realizada con base a la estructura experimental de la TIM de *Tenebrio molitor*, puede considerarse altamente confiable dado al alto grado de identidad de secuencia que presentan. La TIMtc mantiene el plegamiento $(\beta/\alpha)_8$ característico así como las regiones y aminoácidos importantes para su actividad catalítica.

REFERENCIAS

- Baker, D., & Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294(5540), 93-96.
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22(11), 1399-1408.
- Biotech, A. P. (2001). *Affinity chromatography: principles and methods*. Amersham Pharmacia Biotech.
- Bishop, A., De Beer, T. A., & Joubert, F. (2008). Protein homology modelling and its use in South Africa. *South African Journal of Science*, 104(1-2), 2-6.
- CANIMOLT. Cámara de la Nacional Industria Molinera de Trigo. México (2007). Disponible en: <http://www.canimolt.org/> (Fecha de acceso: 2 de febrero de 2015).
- Casal, J. I., Ahern, T. J., Davenport, R. C., Petsko, G. A., & Klibanov, A. M. (1987). Subunit interface of triosephosphate isomerase: site-directed mutagenesis and characterization of the altered enzyme. *Biochemistry*, 26(5), 1258-1264.
- Cinco-Moroyoqui, F. J., Díaz-Malvárez, F. I., Barrón-Hoyos, J. M., Cárdenas-López, J. L., Cortez-Rocha, M. O., & Wong-Corral, F. J. (2008). Isolation and partial characterization of three isoamylases of *Rhyzopertha dominica* F. (*Coleoptera: Bostrichidae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(2), 153-160.
- Cinco-Moroyoqui, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Borboa-Flores, J., & Cortez-Rocha, M. O. (2006). α -Amylase activity of *Rhyzopertha dominica* (*Coleoptera: Bostrichidae*) reared on several wheat varieties and its inhibition with kernel extracts. *Journal of economic entomology*, 99(6), 2146-2150.
- Cisneros, F. (1995). *Control de plagas agrícolas*. Lima. Perú.
- Falero, A., Suzarte, E., Águila, B., Campos, J., & Fando, R. (2008). Expresión heteróloga de la proteína OmpU de *Vibrio cholerae* y su purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(2).

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma (2004). Departamento Económico y Social. Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas, proyecciones al año 2010. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5143s/y5143s00.pdf> (Fecha de acceso: 19 de Junio de 2015).

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2015). Gestión Poscosecha de Cereales. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/ags/gestion-poscosecha/cereales/es/> (Fecha de acceso: 18 de Junio de 2015).

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Italia (1985). Departamento de Agricultura. Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha manual de capacitación.

FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas Para La Alimentación y la Agricultura (2012). Dirección de Estadística. Producción mundial de trigo. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Fecha de acceso: 8 de Marzo del 2015).

Franco L., Rigden D., Melo F., Grossi-de-sá M. (2002). Plant alfa-amylase inhibitors and their interaction with insect alfa-amylases structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 269, 397-412.

García-Lara, S., Espinosa Carrillo, C., & Bergvinson, D. J. (2007). Manual de plagas en grano almacenado y tecnologías alternas para su manejo y control. CIMMYT.

González, A. U. (1995). El maíz y su conservación. Editorial Trillas. México, DF.

Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L., & Sotelo-Mundo, R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biocencia*, XV (3): 8-17.

Hopkins, T. L. (1965). The Physiology of Insects. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 11(2), 101-102.

Kaczanowski, S., & Zielenkiewicz, P. (2010). Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures? *Theoretical Chemistry Accounts*, 125(3-6), 643-650.

Kent, N. L. (1975). Technology of cereals: with special reference to wheat. Pergamon international library.

Knobeloch, D., Schmidt, A., Scheerer, P., Krauss, N., Wessner, H., Scholz, C., ... & Höhne, W. (2010). A coleopteran triosephosphate isomerase: X-ray structure and phylogenetic impact of insect sequences. *Insect molecular biology*, 19(1), 35-48.

Knowles, J.R. (1991). "To build an enzyme". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 332(1263): 115-121.

Komives, E. A., Chang, L. C., Lolis, E., Tilton, R. F., Petsko, G. A., & Knowles, J. R. (1991). Electrophilic catalysis in triosephosphate isomerase: the role of histidine-95. *Biochemistry*, 30(12), 3011-3019.

Lolis, E., Alber, T., Davenport, R. C., Rose, D., Hartman, F. C., & Petsko, G. A. (1990). Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9-Å resolution. *Biochemistry*, 29(28), 6609-6618.

Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. Pearson Education.

Mazzei, L., Ciurli, S., & Zambelli, B. (2014). Hot biological catalysis: isothermal titration calorimetry to characterize enzymatic reactions. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (86), e51487-e51487.

McKee, T., & McKee, J. R. (2003). *Bioquímica: la base molecular de la vida*. McGraw-Hill Interamericana de España.

Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., ... & Logullo, C. (2011). Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(6), 400-409.

Morris, K., Lorenzen, M. D., Hiromasa, Y., Tomich, J. M., Oppert, C., Elpidina, E. N., ... & Oppert, B. (2009). *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: a resource for the study of the coleopteran gut. *Journal of proteome research*, 8(8), 3889-3898.

Müller-Esterl, W. (2008). *Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Reverté.

Nájera, H., Costas, M., & FERNANDEZ-VELASCO, D. (2003). Thermodynamic characterization of yeast triosephosphate isomerase refolding: insights into the interplay between function and stability as reasons for the oligomeric nature of the enzyme. *Biochem. J*, 370, 785-792.

- Nickbarg, E. B., Davenport, R. C., Petsko, G. A., & Knowles, J. R. (1988). Triosephosphate isomerase: removal of a putatively electrophilic histidine residue results in a subtle change in catalytic mechanism. *Biochemistry*, 27(16), 5948-5960.
- Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schönbeck, F., & Weber, A. (1995). Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Elsevier.
- Orosz, F., Olah, J., & Ovadi, J. (2006). Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB life*, 58(12), 703-715.
- Orosz, F., Oláh, J., & Ovádi, J. (2009). Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1792(12), 1168-1174.
- Palomares, L. A., Estrada-Moncada, S., & Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins. In *Recombinant Gene Expression* (pp. 15-51). Humana Press.
- Pulido, N. O., Chavelas, E. A., Turner, F., & García-Hernández, E. (2008). Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes. *Advances in Protein Physical Chemistry*, Transworld Research Network, India, 115-138.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Brown, S. J., Denell, R., Beeman, R. W., ... & Nguyen, N. (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190), 949-955.
- Roland, B. P., Stuchul, K. A., Larsen, S. B., Amrich, C. G., VanDemark, A. P., Celotto, A. M., & Palladino, M. J. (2013). Evidence of a triosephosphate isomerase non-catalytic function crucial to behavior and longevity. *Journal of cell science*, 126(14), 3151-3158.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2012). Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/> (Fecha de acceso: 8 de Marzo de 2015).
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México (2014). Servicio de Información Agroalimentaria Y Pesquera. Trigo Grano. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/trigo-grano/> (Fecha de acceso: 20 de Junio de 2015).
- Waley, S. G. (1973). Refolding of triosephosphate isomerase. *Biochem. J*, 135, 165-172.

Zhang, Z., Sugio, S., Komives, E. A., Liu, K. D., Knowles, J. R., Petsko, G. A., & Ringe, D. (1994). Crystal Structure of Recombinant Chicken Triosephosphate Isomerase-Phosphoglycolohydroxamate Complex at 1.8-Å Resolution. *Biochemistry*, 33(10), 2830-2837.

Zúñiga, T. (1985). Conceptos básicos de entomología y manejo de plagas. López Genes, Marceliano; Fernández O., Fernando O.; Schoonhoven, Aart van (eds.). Frijol: Investigación y producción.