

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

**Evaluación de la Expresión Génica y Actividad Enzimática de
la ATP sintasa de *Rhizopertha dominica* Bajo el Efecto de la
Hipoxia**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Haydeé Alejandra Brassea Estardante

Hermosillo, Sonora

Mayo de 2018

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 calificador del examen profesional de **Haydeé Alejandra Brassea Estardante** hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado **Evaluación de la Expresión Génica y Actividad Enzimática de la ATP sintasa de *Rhizopertha dominica* Bajo el Efecto de la Hipoxia** y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para la obtención del título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Oliviert Martínez Cruz

Directora de tesis

Dr. Alonso Alexis López Zavala

Secretario

M.C. Ana Gloria Andrade Arteaga

Vocal

Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y a los docentes que participaron en mi formación profesional.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por todas las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización del presente, a través del proyecto con clave 220620 titulado “Bioenergética de *Rhizopertha dominica*: efecto de las atmósferas controladas en la proteómica y expresión de genes de las enzimas involucradas en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa”.

A mi directora de tesis, la Dra. Oliviert Martínez Cruz, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y por todo el aprendizaje que me ha dejado. A usted le debo todo lo que sé y el amor que le tengo a la bioquímica.

A los miembros de mi comité de tesis, Dr. Alonso Alexis López Zavala, M.C. Ana Gloria Andrade Arteaga y Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui, por sus consejos, disposición y enseñanzas.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología, Andrés Levy, Rafael Dávila, Marlene Cota y Liliana Pérez por sus enseñanzas, consejos y, sobre todo, por su amistad. Gracias por darme uno de los mejores años de mi vida.

A mis padres y hermanos que siempre estuvieron apoyándome.

DEDICATORIA

A Santiago, Paula Sofía, Diego y Melissa, quienes son mi razón de ser.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	5
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Cultivo de <i>Rhizopertha dominica</i>	22
Diseño de Oligonucleótidos	22
Extracción de ARN Total de <i>R. dominica</i>	22
Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total	23
Digestión del ADN Genómico Presente en Muestras de ARN Total y Síntesis del ADN Complementario	23
Obtención de la secuencia parcial de la subunidad β de ATP sintasa	24
Exposición a Atmósferas Modificadas	24
Aislamiento de Mitocondrias	25
Cuantificación de Lactato	25
Determinación de proteínas por el método de Bradford	25
Evaluación de la expresión génica de <i>R. dominica</i> bajo el efecto de hipoxia por qRT-PCR	26
Cuantificación de la Actividad ATPasa	27
Análisis Estadístico	28
RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
Obtención de la secuencia nucleotídica parcial de la subunidad β de la ATP sintasa	29
Diseño de oligonucleótidos	29
Amplificación del gen <i>atpβ</i>	29
Exposición de <i>R. dominica</i> a hipoxia	32

Cuantificación de lactato	32
Evaluación de la expresión génica de <i>atpβ</i> de <i>R. dominica</i> bajo el efecto de la hipoxia	34
Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN total	34
Digestión del ADN genómico	35
Expresión relativa del gen <i>atpβ</i>	36
Evaluación de la actividad ATPasa	39
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. <i>Rhizopertha dominica</i>	7
2. Ciclo de vida de <i>Rhizopertha dominica</i>	8
3. Representación estructural de la mitocondria	14
4. Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa	15
5. Estructura de la ATP sintasa de <i>Escherichia coli</i>	17
6. Estructura tridimensional de la ATPasa F ₁ mitocondrial de corazón bovino	18
7. Mecanismo de cambio de unión para la síntesis de ATP	19
8. Integridad del ARN total de <i>R. dominica</i>	30
9. Digestión del ADN genómico de <i>R. dominica</i>	31
10. Amplificación de fragmentos de ADNc de <i>R. dominica</i>	31
11. Concentración de lactato	33
12. Integridad del ARN total de <i>R. dominica</i>	35
13. Digestión del ADN genómico de <i>R. dominica</i>	35
14. Curva estándar para calcular la eficiencia de <i>atpβ</i> y <i>β-actina</i> de <i>R. dominica</i>	37
15. Expresión relativa del ARNm de <i>atpβ</i> de <i>Rhizopertha dominica</i> en respuesta a la hipoxia	38
16. Evaluación de la actividad ATPasa de <i>R. dominica</i> en condiciones experimentales	40

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Métodos de control de plagas en granos almacenados	10
2. Uso de atmósferas modificadas como método de control de plagas	13
3. Estudios moleculares y de actividad enzimática de la ATP sintasa	20
4. Estudios realizados en la subunidad β de la ATP sintasa	21
5. Características de los oligonucleótidos diseñados para <i>atpβ</i> de <i>R. dominica</i> .	29
6. Cuantificación del ARN total extraído de <i>R. dominica</i> .	34

RESUMEN

Rhyzopertha dominica, conocido como el barrenador menor de los granos, es una plaga primaria que ataca cereales y granos almacenados a partir de la alimentación directa, ocasionando que estos no sean viables para su uso y/o consumo y consecuentemente pérdidas económicas a nivel mundial. A pesar de la existencia de métodos químicos para controlar la reproducción de insectos en granos de cereales, estos han demostrado resistencia, por lo que el uso de la tecnología de atmósferas modificadas se recomienda como un método alternativo en el control de plagas. Hoy en día, las enzimas involucradas en la bioenergética de *R. dominica* son apenas conocidas. Nuestro trabajo se basó en determinar la expresión génica de la subunidad β de la ATP sintasa, en respuesta a hipoxia. La metodología para esta investigación consistió en someter insectos adultos de *R. dominica* a un ambiente de normoxia (19% de O₂, 0.01% de CO₂ y 80% de N₂) y de hipoxia (5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂) por 24 horas. Se evaluó la respuesta metabólica del insecto midiendo la concentración de lactato por espectrofotometría, en donde se observó un aumento en el tratamiento de hipoxia, indicando el uso de una vía alterna anaeróbica. Se aisló ARN total para llevar a cabo la síntesis del ADN complementario (ADNc) y amplificar el gen *atp β* a partir del diseño de oligonucleótidos, obteniendo un fragmento de la secuencia de 199 pb. La expresión génica de *atp β* se evaluó por qRT-PCR en donde no se encontraron cambios significativos entre ambos tratamientos. Se aislaron mitocondrias por medio de centrifugaciones diferenciales para cuantificar la actividad enzimática de la ATPasa a través de reacciones acopladas, en donde se encontró una disminución en la actividad de esta enzima en los insectos al estar expuestos a la hipoxia. Este comportamiento podría estar relacionado con la presencia de la proteína inhibidora IF1, con el fin de evitar que moléculas de ATP sigan siendo hidrolizadas.

INTRODUCCIÓN

El trigo es la principal fuente de proteínas en la alimentación humana, al tener mayor contenido en proteínas que otros granos de cereales importantes (Ileke y Bulus 2012). El interés por la conservación de los granos constituye una necesidad tanto alimenticia como económica, en donde el abasto de alimentos se ha convertido en una preocupación a nivel mundial por el aumento de la población. Los granos almacenados son un material biológico vivo, que utiliza oxígeno y libera dióxido de carbono, por ello tienden a deteriorarse de manera natural. No obstante, el principal problema que se produce durante el período de almacenamiento se debe a la aparición de insectos (Benzi y col., 2009; Christensen y Kaufmann, 1969; Teixeira y col., 1993). Todos los insectos se reproducen de manera exponencial cuando existe una cantidad adecuada de nutrientes, condiciones ambientales óptimas y la ausencia de otros organismos para su subsistir; dichos factores se encuentran en los almacenes de granos, ocasionando daños directos para poder alimentarse, reduciendo así el peso, valor nutricional y germinación de los granos de cereal (Mason y Obermeyer, 2010).

Rhyzopertha dominica es considerada una de las plagas primarias más destructivas de granos almacenados a nivel mundial. El control estas plagas de insectos se basa principalmente en métodos químicos, siendo los más empleados debido a su rapidez y eficacia en la eliminación de plagas; sin embargo, se ha encontrado que el abuso de insecticidas y fumigantes está provocando una resistencia y adaptación a los compuestos químicos (Benzi y col., 2009; Guedes y Zhu, 1998; Schlipalius y col. 2008). El uso de atmósferas modificadas (AM) ha demostrado ser una alternativa segura, libre de residuos para el control de plagas en el almacenamiento de granos de cereal (Cheng y col., 2013).

Las AM son actualmente utilizadas para la preservación de la calidad de algunos alimentos y en los últimos años se ha observado que algunas modificaciones en la composición gases atmosféricos, pueden llegar a ser letales para las plagas de insectos. Las bajas concentraciones de O₂ y las altas concentraciones de CO₂ provocan una alteración del equilibrio metabólico que conduce a la muerte de los artrópodos durante períodos prolongados de exposición (Calderón y Barkai-Golan, 1990). A pesar de que en las últimas décadas se han realizado estudios sobre el uso de atmósferas modificadas, se desconoce la respuesta de los insectos de productos almacenados hacia bajas concentraciones de O₂ en la cadena respiratoria.

Por lo anterior, el desarrollo de investigaciones sobre los efectos de la hipoxia en las enzimas involucradas en la bioenergética de *R. dominica*, son fundamentales para la búsqueda de métodos alternativos para el control de plagas de insectos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión génica y actividad enzimática de la ATP sintasa de *Rhizopertha dominica* bajo el efecto de la hipoxia.

Objetivos Específicos

- I. Realizar un bioensayo exponiendo a *R. dominica* a la hipoxia y determinar la concentración de lactato.
- II. Obtener una secuencia nucleotídica parcial del ADN complementario que codifica para la subunidad β de la ATP sintasa.
- III. Evaluar la expresión génica de la subunidad β de la ATP sintasa de *R. dominica* bajo el efecto de hipoxia.
- IV. Evaluar la actividad ATPasa del complejo V de *R. dominica* durante la hipoxia.

ANTECEDENTES

Los cereales forman parte importante de la dieta humana y animal, por su alto contenido nutrimental, ya que contienen carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales que son fundamentales para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos (Gil, 2010; CANIMOLT, 2007). La cosecha de cualquier tipo de cereal es sencilla y de bajo costo, por lo que se encuentran en todas las civilizaciones. Entre los más distinguidos se encuentra el trigo, al ser uno de los más abundantes y productivos a nivel mundial ya que constituye el 40% de fuente alimentaria junto con el maíz (SAGARPA, 2016). Además de proveer gran cantidad de nutrientes, lo más relevante de los cereales, es que sus frutos maduros tienen una vida prolongada por lo que pueden ser almacenados para consumirse gradualmente o conservarse como semilla (Juárez y col., 2014).

Trigo

El trigo (*Triticum spp.*) es el cereal líder producido, consumido y comercializado en el mundo actual. Su cultivo permitió el establecimiento de asentamientos permanentes, fomentando el desarrollo de la civilización tal como la conocemos. Actualmente, el trigo proporciona más nutrientes para la población que cualquier otra fuente (Bushuk y Rasper, 1994). Las diferentes variedades cultivadas de trigo varían mucho en su hábito, forma y estructura, pero todas son hierbas anuales. Las partes principales son las raíces, tallos, hojas, y espigas (Briggle y Reitz, 1963). A su ventaja nutritiva se le añaden características de procesamiento propias del trigo, lo cual lo coloca como uno de los más empleados como materia prima para la elaboración de diferentes alimentos procesados y otros productos no alimentarios, aportando así un abasto en la economía y generación de empleos a nivel mundial (FAO, 2004).

Almacenamiento de granos de trigo

Debido al valor económico que aportan los granos de cereales, se debe garantizar la conservación de la calidad de estos, por lo que deben permanecer almacenados bajo ciertas condiciones hasta su uso (Kulp, 2000). Para ello existen diversos tipos de almacenaje como sacos

de fibras o plástico, almacenamiento en granel y hermético, sin embargo, no proporcionan la protección necesaria a los alimentos. Actualmente, por la gran producción de trigo en los últimos años, se comenzaron a emplear instalaciones mecánicas que permiten un manejo apropiado y eficiente para conservar grandes volúmenes de granos y semillas por varios años (SAGARPA, 2011). No obstante, no todos los países cuentan con este tipo de estructuras, por lo que manejan silos de acero o concreto, a los cuales si no se les da el mantenimiento correcto pueden permitir la infestación de granos por plagas.

Pérdidas por Insectos en la Producción de Trigo y Granos Almacenados

Las pérdidas alimentarias son consecuencia, naturalmente, de las pérdidas cuantitativas, pero también, y más insidiosamente, de pérdidas de orden cualitativo. Basta recordar que los productos básicos contienen no solamente elementos nutritivos esenciales, sino también vitaminas importantes. Es el caso, por ejemplo, del germen del grano, rico en proteínas y en vitaminas, al cual le atacan preferentemente los roedores y los insectos (Grolleaud, 2002). Las plagas de insectos infligen su daño a los productos almacenados, principalmente mediante la alimentación directa. Algunas especies se alimentan del endospermo, causando pérdida de peso y calidad, mientras que otras se alimentan del germen, resultando en una mala germinación de semillas y menos viabilidad (Malek y Parveen, 1989). Así, debido a los daños causados por los insectos, los granos pierden valor para la comercialización, el consumo o la plantación.

En México, se ha estimado que las pérdidas de granos básicos después de la postcosecha llegan a 25% en algunos lugares, y estas pérdidas pueden costar energía y recursos de los productores, y prevenir que tengan granos suficientes para alimentar sus familias y animales durante el año o tener excedentes para vender (Rivers, 2017).

Los principales factores bióticos que influyen a la pérdida de trigo durante su almacenamiento son los insectos, mohos, aves y ratas. Las principales especies de insectos que infectan el trigo incluyen al gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*), el barrenador menor de los granos (*Rhyzopertha dominica*) y el escarabajo castaño de la harina (*Tribolium castaneum*). Todos estos insectos se pueden encontrar extensamente en la mayoría de los países en desarrollo a diferentes extremos (Baloch, 1999).

Rhyzopertha dominica

Considerado como el “Barrenador menor de los granos”, *R. dominica* es un insecto cilíndrico pequeño de color marrón perteneciente a los coleópteros, que mide de 2.3 mm a 2.8 mm de largo (Lepesme, 1944; Figura 1). Esta es una de las plagas más destructivas de granos almacenados ya que puede penetrar en muchos tipos empaques, como por ejemplo los sacos de semillas (Highland, 1984). Tanto en su estadio larval como adulto, se alimentan de los granos, causando daños en la producción de cereales. (Jood y col., 1996; Rees, 2007).

Tienen la capacidad de sobrevivir y reproducirse en la harina que se acumula al masticar las semillas. El barrenador menor de los granos afecta principalmente cultivos y granos de trigo y maíz almacenados, pero puede infestar tabaco, nueces, frijoles, semillas de aves, galletas, yuca, cacao, frutos secos, cacahuates, especias, carne seca y pescado. (Koehler y Pereira, 1994).



Figura 1. *Rhyzopertha dominica* (Fuente: <http://www.agrologica.es/informacion-plaga/capuchino-granos-rhizopertha-dominica/>)

Ciclo de vida de *R. dominica*

R. dominica requiere alrededor de poco más de un mes en condiciones ambientales de verano de EE. UU. para completar su ciclo de vida (Birch y Snowball, 1945; Howe, 1950). El barrenador menor de los granos tiene una larga vida con poblaciones naturales de adultos de edades comprendidas entre los recién nacidos y los cuatro meses de edad (Hagstrum y Flinn, 1994). Las hembras adultas ponen de uno a siete huevos al día externamente en granos de trigo. La etapa

de huevo se desarrolla dentro de 12 a 18 días en larvas que experimentan cinco instares durante aproximadamente 30 días y se pupan, este estadio tarda aproximadamente 6 días en transformarse a adultos a 25 °C (Potter, 1935). Las larvas penetran en los granos, se desarrollan y pululan en el interior, donde los adultos permanecen durante varios días después de la eclosión (Hagstrum y Flinn, 1994). Tanto los adultos como las larvas se alimentan de granos de trigo y causan pérdida de peso y deterioro de la calidad (Dowdy y McGaughey 1994).

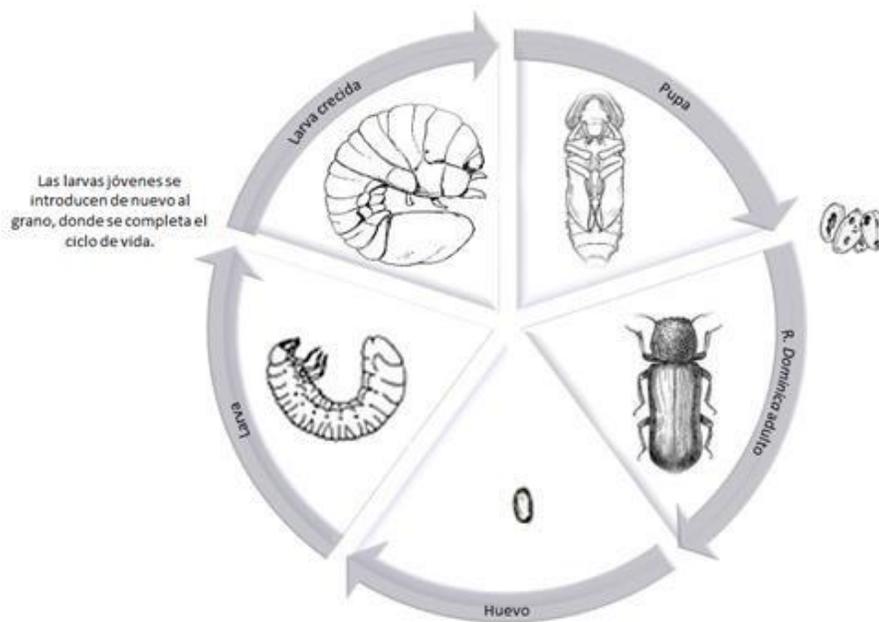


Figura 2. Ciclo de vida de *Rhyzopertha dominica* (Imagen modificada de: Paul Boles, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture).

Métodos de Control de Plagas

Muchos de los agroquímicos no son efectivos contra plagas de granos almacenados por cualidades inherentes de los insectos o los químicos, y algunos insectos ya han desarrollado resistencia a estos productos (Arthur, 1996; Haliscak y Beeman, 1983). Varios insectos son capaces de alimentarse, desarrollarse y multiplicarse en granos enteros, dañados o cereales procesados en los almacenes (Pedersen, 1992). Cuando se almacenan granos de 25 a 35 °C,

los insectos pueden reproducirse inmediatamente ocasionando daño a los granos (Sinha y Watters, 1985).

La prevención y control de insectos en productos almacenados son importantes para los agricultores y consumidores. Bajo muchas circunstancias, el método más sencillo, rápido y económico para el control de plagas son los insecticidas, en forma de fumigantes. Todos los insecticidas empleados en los cereales o cerca de ellos, deben cumplir ciertos requisitos para su uso. El insecticida ideal debe matar rápidamente a los insectos sin dañar a los humanos o al ambiente, tener una actividad residual con una cantidad de contaminación aceptable que no afecte los productos, de fácil preparación, económico, y proteja los alimentos almacenados sin producir olores (Bennett y col., 1988). Sin embargo, aún no se han encontrado productos químicos que cumplan con estos requisitos. En la Tabla 1 se encuentran los distintos métodos utilizados en la actualidad, en donde se pueden observar que los efectos adversos de los residuos de plaguicidas en los alimentos y el medio ambiente son de preocupación pública y esto ha llevado a la sustitución parcial de la fumigación por métodos alternativos de control (Phillips y Throne, 2010). Entre estos métodos, el único que mantiene la capacidad especial de fumigación para el tratamiento *in situ* de los productos almacenados, además de ofrecer una diversidad similar de tecnologías de aplicación, es el método de la atmósfera modificada (AM) (Navarro, 2006).

La manipulación atmosférica con bajo contenido de oxígeno (hipoxia) y dióxido de carbono elevado (hipercapnia) a niveles biológicamente alcanzables ha demostrado ser un método práctico y económico para proteger los productos almacenados de las plagas insecticidas y mantener la calidad del producto (Navarro, 2006; Villers y col., 2008).

Tabla 1. Métodos de control de plagas en granos almacenados

Método	Tipo	Descripción	Ventajas	Desventajas
Físicos	Temperatura	Los insectos no pueden desarrollarse o reproducirse a temperaturas menores a -13°C y mayores a 35°C	Más utilizado, económico	Las temperaturas varían según la época del año y región. Los insectos pueden adaptarse a altas temperaturas
	Atmósferas modificadas	Ambiente deficiente de O ₂ o alto en CO ₂ , alterando el sistema respiratorio del insecto	No contamina al ambiente, no deja residuos y las alteraciones organolépticas son mínimas	Requiere tiempo de exposición, difícil manejo y ocupa constante monitoreo
	Sonidos y percusión	Elimina fases de insectos, e incluso a huevos en el interior del grano	Efectivo para eliminar huevecillos	Requiere tiempo de exposición, infraestructura y de alto costo
Químicos	Insecticidas y fumigantes	Compuestos químicos (líquidos o gaseosos) que se utilizan en áreas infestadas	Efectivo para el control de plagas, rápido.	Residuos tóxicos, equipo especial para su uso, dañino para la población. Insectos han presentado resistencia
Biológicos	Depredadores	Depredadores naturales y en ocasiones suelen compartir el mismo hábitat	Natural, no deja residuos, no es tóxico, selectivo y económico	No son 100% efectivos, no eliminan a todas las presas, se requieren en gran cantidad
	Parasitoides	Parasitan plagas que se encuentran dentro o fuera del grano	Natural y selectivo	No es eficaz, requiere de gran cantidad de insectos
	Polvos vegetales	Plantas con propiedades insecticidas	Natural y económico	No es eficaz ni ovicida
Otros	Aceites esenciales	Extractos de plantas con compuestos volátiles y ovicidas	Natural, no tóxico, no deja residuos y es económico	Puede requerir tiempo de exposición o no

Fuente: Trivelli y Velázquez, 1984; Larrain, 1994; Curtis y col., 2002; Phillips y Throne, 2010.

Atmósferas modificadas: Hipoxia

Las atmósferas modificadas o controladas ofrecen una alternativa segura y ambientalmente benigna al uso de fumigantes químicos productores de residuos convencionales para controlar las plagas de insectos que atacan el grano almacenado, las semillas oleaginosas, los productos procesados y los alimentos envasados (Navarro, 2006). Los insectos que se encuentran en granos almacenados son organismos aerobios que requieren oxígeno para su supervivencia, por lo que, si son expuestos a cambios en la composición de gases atmosféricos, ya sea disminuyendo el O₂ o aumentando el CO₂ su metabolismo será alterado (Navarro, 2012).

Los efectos de anoxia, hipoxia e hipercapnia en los insectos del producto almacenado han sido ampliamente estudiados como medio de control de plagas durante más de 20 años (Tabla 2). Sin embargo, la respuesta de los artrópodos de productos almacenados a los cambios en la relación de O₂ a CO₂ no se entiende por completo. Se sabe que los cambios en las concentraciones de gases atmosféricos provocan una alteración del equilibrio metabólico que conduce a la muerte de los artrópodos durante largos periodos de exposición (Calderón y Barkai-Golan, 1990).

La disminución de oxígeno en el medio ambiente provoca estrés en los organismos, lo cual activa los sistemas metabólicos de respuesta. Los límites de tolerancia a diferentes tipos de estrés son impuestos por la genética del organismo, mientras que la capacidad de respuesta está en función de la plasticidad fenotípica del organismo y del tiempo que esté expuesto a las condiciones de estrés. Si los organismos se encuentran en condiciones de estrés que superan los límites de tolerancia, se compromete la supervivencia del organismo. Así el que un organismo pueda enfrentar circunstancias adversas es el resultado de la suma de la interacción de diversos factores, que pueden ir desde la modulación de los sistemas bioquímicos que operan en la célula a ajustes en el funcionamiento de distintos sistemas de órganos (McMahon, 2001; Hochachka y Monge, 2000).

Las células son capaces de sentir la insuficiencia en la disponibilidad de oxígeno y activar un cambio en la expresión génica ya sea por el aumento en el aporte de oxígeno o impulsando la supervivencia del organismo en un ambiente de escasez de oxígeno. En este proceso, existe un mecanismo altamente conservado desde el punto de vista evolutivo, que implica modificaciones post-traduccionales. (Balsa, 2012).

Tabla 2. Uso de atmósferas modificadas como método de control de plagas.

Insecto	Concentraciones de gases (%)	Tiempo de exposición	Autor(es)
<i>S. granarius</i> <i>S. oryzae</i> <i>T. castaneum</i> <i>R. dominica</i> <i>O. surinamensis</i>	0.1-0.25 O ₂ 9 CO ₂	3 d	Storey (1975)
<i>T. castaneum</i>	2-5 O ₂ 5-35 CO ₂	1-5 d	Calderón y Navarro (1979)
<i>T. castaneum</i> <i>R. dominica</i>	2-8 O ₂ 5-30 CO ₂	1-6 d	Calderón y Navarro (1980)
<i>S. granarius</i> <i>T. castaneum</i> <i>O. surinamensis</i> <i>C. ferrugineus</i> <i>R. dominica</i>	0.5–2.6 O ₂ 10–30 CO ₂	10 d	Krishnamurthy y col. (1986)
<i>C. ferrugineus</i> <i>O. surinamensis</i> <i>S. granarius</i> <i>S. oryzae</i> <i>T. castaneum</i>	3-6 O ₂ 10-20 CO ₂	28 d	Conyers y Bell (2007)
<i>S. zaemais</i> <i>S. oryzae</i>	0.5-2 O ₂ 90-95 CO ₂	3-6 d	Carvalho y col. (2012)
<i>C. maculatus</i>	2 O ₂ 0-18 CO ₂	20 d	Cheng y col. (2013)

Mitocondria

Los seres vivos estamos formados por células, las cuales pueden ser pluricelulares, como las plantas y animales o pueden estar formados de una sola célula, como lo son las bacterias. De ello se derivan dos clases de células: las procariotas y eucariotas. Las células eucariotas son más completas estructuralmente que las procariotas, ya que cuentan con ADN fragmentado en cromosomas, los cuales están rodeados por una membrana para formar un núcleo. Dentro del citoplasma, se encuentran las mitocondrias y cloroplastos las cuales aportan energía a la célula. (Prats, 2005).

Las mitocondrias son orgánulos que varían de tamaño y forma según su origen, midiendo 0.5 μm de diámetro y 1 μm de largo (son aproximadamente del tamaño de una bacteria) y en ellas se encuentra el sitio del metabolismo oxidativo (Voet, 2006). Existen en gran cantidad en casi todas las células, ocupando el 25% del volumen celular. Las mitocondrias se encuentran rodeadas por dos membranas, una externa lisa y una interna plegada por dentro que tiene una superficie extensa que envuelve la matriz mitocondrial. Las invaginaciones de la membrana interna se denominan crestas y las evaginaciones tubulares son los túbulos, mientras que el espacio que separa a la membrana externa de la interna se le conoce como espacio intermembranal (Koolman y Röhm, 2004).

En la membrana interna también presenta diversas proteínas de transporte que hacen que la membrana sea permeable de forma selectiva a las pequeñas moléculas metabolizadas o que son necesarias por gran cantidad de enzimas mitocondriales que se sitúan en la matriz. Entre estas enzimas se encuentran las que reutilizan el piruvato y los ácidos grasos hasta acetil CoA y las que oxidan el acetil CoA en el ciclo del ácido cítrico. Los principales productos finales de esta oxidación son el CO_2 , que es eliminado de la célula, mientras que el NADH y FADH_2 , que constituyen la principal fuente de electrones, serán transportados a través de la cadena respiratoria, es decir, la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Alberts y col., 2008; Lodish y col., 2005).

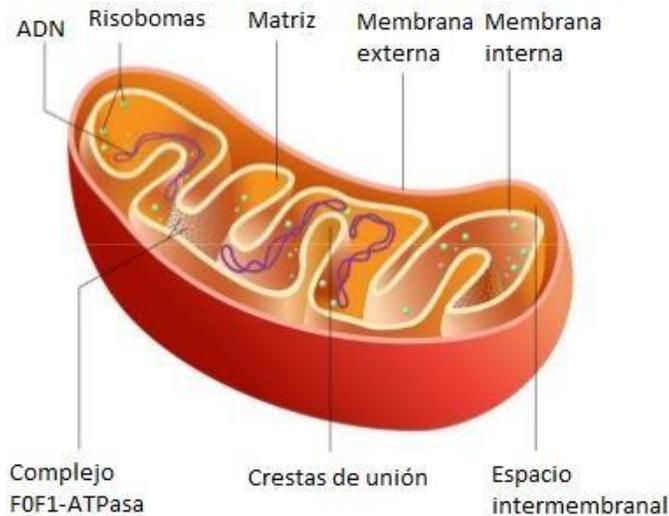


Figura 3. Representación estructural de la mitocondria (Fuente: <http://alfaser.org/2016/05/05/queres-mas-energia-optimiza-tus-mitocondrias/>)

Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa

También conocida como cadena respiratoria, es la última fase de la respiración aerobia para la producción de energía. Este sistema consiste en una secuencia de complejos capaces de provocar reacciones de oxidación y reducción (Tortora y col., 2007). En las mitocondrias, el NADH o el FADH_2 producido por el ciclo de Krebs, transfieren un electrón de alta energía por medio de la cadena transportadora de electrones, en donde parte de la energía liberada impulsa la acción de tres complejos enzimáticos respiratorios que bombean H^+ hacia el exterior de la matriz. Estos protones generan un gradiente electroquímico de iones H^+ a través de la membrana mitocondrial interna causando que los protones vuelvan hacia la matriz por medio del complejo V para sintetizar moléculas de ATP (Alberts y col., 2008).

La cadena transportadora de electrones está compuesta por tres complejos (I, III y IV) que se encuentran dentro de la membrana mitocondrial y dos moléculas transportadoras móviles, la ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo c. (Koolman y Röhm, 2004).

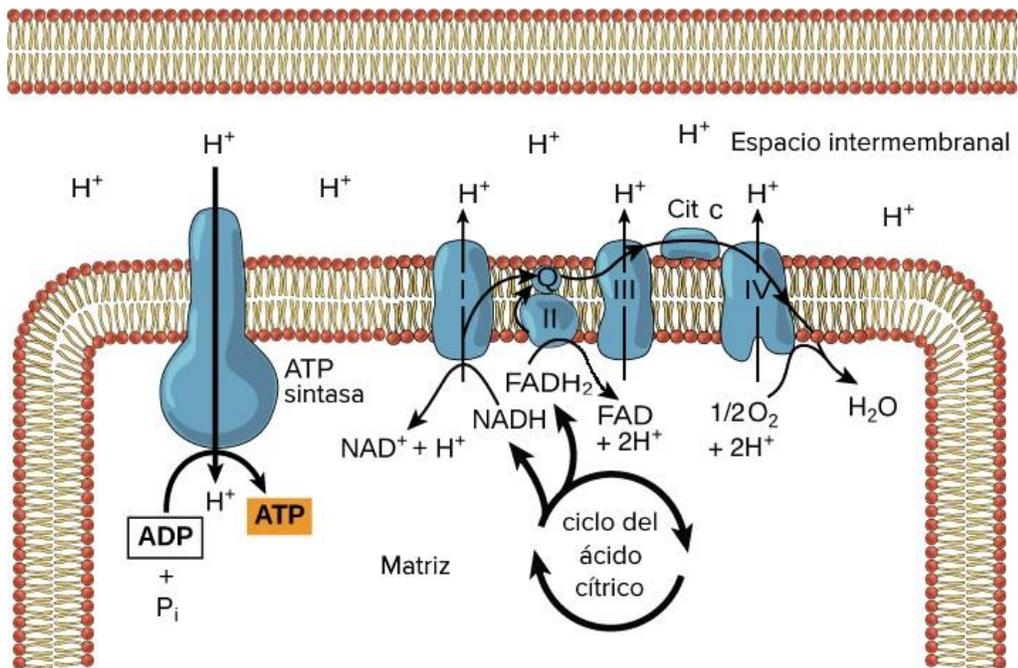


Figura 4. Complejos de la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa (Imagen modificada por Klaus Hoffmeier, OpenStax College, Anatomy & Physiology).

Complejo I o NADH deshidrogenasa: es la primera proteína mitocondrial en el transporte de electrones. Es el complejo más grande, conformado por más de 40 cadenas polipeptídicas. Su función es aceptar los electrones del NADH producido en el ciclo de Krebs y los traslada a la ubiquinona (coenzima Q) a través de una flavina con el fin de transferir los electrones al complejo III (Alberts y col., 2008).

Complejo II o Succinato deshidrogenasa: flavoproteína que se encuentra unida a la membrana interna en las mitocondrias y participa en el ciclo del ácido cítrico y en la cadena respiratoria. Está compuesta por cuatro subunidades, una donde se encuentra el sitio de fijación de sustrato (FAD unido a un residuo de histidina), otra que contiene tres centros ferrosulfurados y dos proteínas hidrofóbicas. En ella, se transfieren electrones y protones a partir del succinato unido covalentemente a FAD, en donde los centros ferrosulfurados se oxidan y reducen. El flujo de electrones llega a la coenzima Q en donde continuarán su trayectoria por los demás complejos (Devlin, 2004).

Complejo III o Citocromo c reductasa: Está compuesto por 11 cadenas polipeptídicas diferentes formando un dímero. Cada monómero tiene tres grupos hemo, los cuales están unidos a citocromos (proteínas transportadoras de electrones) y una proteína ferrosulfurada. Las subunidades catalíticas, citocromo b y c_1 , aceptan los electrones obtenidos por la ubiquinona al citocromo c, dicho proceso está relacionado con la translocación de protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana (Müller-Esterl, 2008).

Complejo IV o Citocromo c oxidasa: Es la última proteína involucrada en el transporte de electrones para la síntesis de ATP. Esta enzima, al igual que el complejo III, actúa como dímero al estar formado por 13 cadenas polipeptídicas, dos subunidades de citocromos y dos átomos de cobre. El complejo acepta un electrón del citocromo c a la vez y transfiere cuatro al oxígeno para producir agua. (Alberts y col., 2008).

Complejo V o ATP sintasa: Es una enzima compleja que lleva a cabo la fosforilación oxidativa. Está conformada por dos dominios funcionales, una fase unida a la membrana interna mitocondrial (F_0) y una fase catalítica (F_1) situada en la matriz mitocondrial (Watt y col., 2010). Su principal función es sintetizar ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (P_i) en la matriz mitocondrial utilizando la energía suministrada por el gradiente electroquímico de protones generado por los sustratos producidos en el ciclo de Krebs (Capaldi y col., 1994). La presencia universal de la ATP sintasa en mitocondrias, cloroplastos y procariontes, es de vital importancia en los mecanismos energéticos de las células (Alberts y col., 2008).

ATP sintasa: Estructura y Función

La F_0F_1 -ATP sintasa (EC 3.6.3.14) es una enzima multimérica, que se encuentra en la membrana mitocondrial de mamíferos, levaduras, hongos y en la membrana citoplasmática de bacterias (Devlin, 2004) y tiene como función proveer energía a la célula para que pueda realizar todos sus procesos vitales. También se le conoce como ATPasa por su capacidad de hidrolizar moléculas de ATP (Alberts y col., 2008).

Como se mencionó anteriormente, la ATP sintasa está conformada por dos partes proteicas definidas: F_1 , una porción soluble situada en la matriz mitocondrial y F_0 , que se encuentra unido a la membrana mitocondrial interna. Mientras que F_1 se compone de tres copias de las subunidades α y β , y una de las subunidades γ , δ y ϵ . Estas últimas tres subunidades constituyen el tallo central del complejo V (Figura 5; Watt y col., 2010) mientras que las subunidades α y β conforman la parte catalítica de la enzima, siendo estas las más conservadas (Pedersen y Amzel, 1993). La estructura del complejo es muy similar en las membranas de mitocondrias, cloroplastos y bacterias y muy diferente en el resto de las bombas de iones que hidrolizan ATP (como la Na^+/K^+ -ATPasa de la membrana plasmática en eucariontes, o Ca^{+2} -ATPasa que acumula Ca^{+2} en el retículo endoplasmático) (Nicholls, 1987).

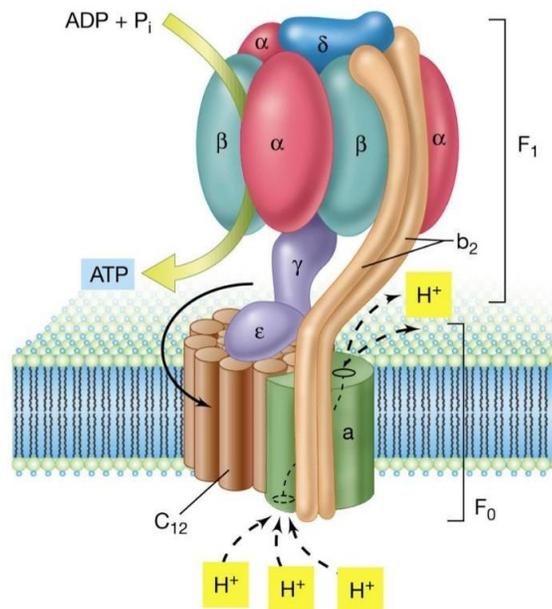


Figura 5. Estructura de ATP sintasa de *Escherichia coli*. (Fuente: Kanehisa Laboratories)

La función de la ATP sintasa es sintetizar ATP a partir de ADP y Pi en el dominio F₁. Esto es posible debido a la energía derivada de un gradiente de protones que atraviesan la membrana mitocondrial interna desde el espacio intermembrana hacia la matriz a través de la porción F₀ de la enzima. El gradiente de protones establece una fuerza motriz protónica, el cual está compuesto por dos factores: un diferencial de pH y un potencial eléctrico de membrana (Campanella y col., 2009).

La energía liberada provoca la rotación de dos motores rotatorios: el anillo de subunidades c en F₀, junto con las subunidades γ, δ y ε en F₁, a la que está unida. Los protones pasan por F₀ a través de la subunidad al anillo c (Boyer y Kohlbrenner, 1981). La rotación de la subunidad γ dentro del hexámero α₃β₃ proporciona energía para la síntesis de ATP. Esto se llama "catálisis rotatoria" (Devenish y col., 2008). Boyer (1975) describió el mecanismo de "cambio de unión", en donde explica la síntesis e hidrólisis de ATP por los sitios catalíticos de la subunidad β (Figura 6).

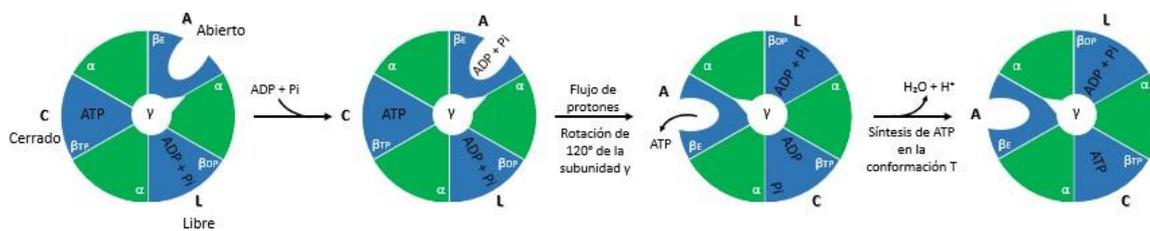


Figura 6. Mecanismo de cambio de unión para la síntesis de ATP (Imagen modificada de <http://www.guweb2.gonzaga.edu>).

Subunidad β. La mayor parte del sitio catalítico de la ATP sintasa reside en la subunidad β y existen trabajos que han tratado de medir catálisis en la subunidad β aislada y purificada, para estudiar el ciclo catalítico libre del resto de las subunidades del complejo (Mitchell, 1961). La extensión de la subunidad β está compuesta por aproximadamente 60 aminoácidos y se localiza en el extremo C-terminal (Franzén y Falk, 1992). No es clara la función de estas extensiones, aunque se ha propuesto que estos aminoácidos extra en la subunidad β podrían hacer el papel de la proteína reguladora dentro del complejo (Villavicencio y col., 2009), ya que la proteína inhibidora de la ATP sintasa de los eucariontes, la IF1, no se encuentra en este complejo (Alberts y col., 2008).

La subunidad β del complejo mitocondrial muestra una diversa organización y presenta varias regiones homologas de secuencia con otras enzimas que utilizan ATP (Futai y Kanazawa, 1983; Walker y col., 1982). Como se muestra en la figura 6, las tres subunidades catalíticas β adquieren conformaciones diferentes durante la síntesis de ATP: abierta, semiabierta y cerrada. Cuando la subunidad pasa del estado cerrado al abierto se libera una molécula de ATP, y a su vez se captan las moléculas de ADP y fosfato. Con estos sustratos, la subunidad β cambia a una conformación semiabierta, donde se lleva a cabo la reacción de formación del ATP, y posteriormente uno de los sitios catalíticos se abre para liberar el producto. Este ciclo se repite en forma alterna en las tres subunidades β de la ATP sintasa (Cano y González, 2011). Por lo tanto, esta subunidad juega un papel central en la síntesis de ATP ya que contiene aminoácidos involucrados en el enlace de sustratos al sitio catalítico (Amzel y Pedersen, 1983; Senior y Wise, 1983).

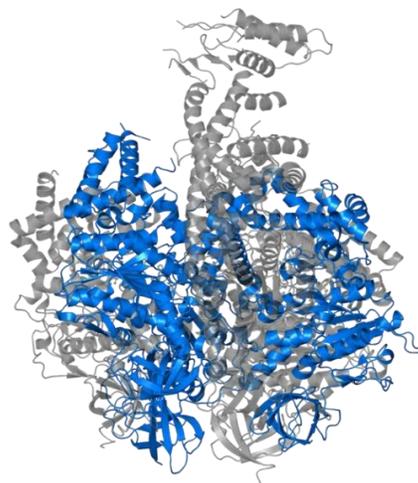


Figura 7. Estructura tridimensional de la ATPasa F_1 mitocondrial de corazón bovino. Se señalan de color azul las tres subunidades catalíticas β (Bowler y col., 2007).

Son escasos los estudios que se han realizado sobre las enzimas que participan en la bioenergética de artrópodos, especialmente del complejo V. Como se muestra en la tabla 3, las investigaciones se concentran en el análisis de las secuencias nucleotídicas de subunidades nucleares y mitocondriales y en la actividad enzimática de la ATP sintasa/asa bajo diferentes condiciones en varios organismos. Sin embargo, son carentes los estudios realizados en la subunidad β de este complejo en insectos (Tabla 4).

Tabla 3. Estudios moleculares y de actividad enzimática de ATP sintasa.

Organismo	Aportación	Autor (es)
<i>Mus musculus</i>	Regulación de la expresión de la subunidad ϵ de la ATP sintasa de células C2C12 en hipoxia por 24 h	Levy y Kelly (1997)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Aumento de la actividad ATPasa en hipoxia de 10 h	Martínez-Cruz y col. (2012)
<i>Belgica antarctica</i>	Disminución en la expresión génica de subunidades de la ATP sintasa en condiciones de deshidratación	Teets y col. (2012)
Ratas Sprague–Dawley	Inhibición de la actividad y disminución de la concentración ATP sintasa en hipoxia hipobárica por 4 h/4 semanas	Wang y col. (2012)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Respuesta transcripcional de las subunidades γ , δ y ϵ de la ATP sintasa bajo el efecto de hipoxia	Martínez-Cruz y col. (2015)
<i>Rhyzopertha dominica</i>	Disminución de la actividad ATPasa en hipoxia de 24 h	Levy-de la Torre (2017)

Tabla 4. Estudios realizados en la subunidad β de la ATP sintasa

Organismo	Aportación	Autor (es)
Bovinos	Obtención de la secuencia nucleotídica de la subunidad β de la ATP sintasa mitocondrial de corazón bovino	Walker y Runswick (1983)
<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Detección de dos genes nucleares para la subunidad β de la ATP sintasa mitocondrial	Boutry y Chua (1985)
<i>Homo sapiens</i>	Análisis de secuencia, asignación de cromosomas y expresión diferencial de <i>atpβ</i>	Neckelmann y col. (1989)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Estructura, características reguladoras de la transcripción y patrón de expresión de <i>atpβ</i>	Peña y col. (1995)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Identificación de la subunidad β de la ATP sintasa como un nuevo regulador de la muerte celular de las plantas	Chivasa y col. (2010)
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Secuencia del ADNc y cuantificación del ARNm de <i>atpβ</i> durante la hipoxia	Martínez-Cruz y col. (2011)
<i>Panstrongylus megistus</i>	Identificación de la subunidad β de la ATPasa como una proteína de unión a lipoforina en preparaciones de membrana de intestino medio enriquecido libre de mitocondrias.	Fruttero y col. (2014)
<i>Spodoptera litura</i>	Identificación de la subunidad β de la ATPasa en la población celular apoptótica inducida por <i>Microplitis bicoloratus</i>	Kou y col. (2017)

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Rhyzopertha dominica*

Se realizaron cultivos para generar nuevas colonias de insectos y aumentar su reproducción, para ello se utilizaron frascos de vidrio con tapa horadada cubierta con una malla, a los cuales se añadieron insectos adultos de *R. dominica* en cada frasco y 200 g de trigo (*Triticum aestivum*) para fomentar su desarrollo. El cultivo fue incubado a 30 °C y a una humedad aproximada del 70% por un mes aproximadamente.

Diseño de Oligonucleótidos

Para la obtención de la secuencia parcial de la subunidad β de ATP sintasa (*atp β*), se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias reportadas de artrópodos en la base de datos GenBank. Los oligonucleótidos contienen entre 40 y 60% de GC y una longitud entre 17 y 20 pares de bases con el fin de obtener un amplicón de entre 130 y 200 pares de bases, tamaño idóneo para la realización de la evaluación de la expresión génica.

Extracción de ARN Total de *R. dominica*

Pasado el tiempo de reproducción de *R. dominica*, se recolectaron 40 mg de insectos adultos (alrededor de 50 insectos) para la obtención de la secuencia de ADN complementario (ADNc). Los insectos fueron macerados en 1 mL de reactivo TRIzol® (Invitrogen, CA), que tiene su fundamento en la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi (1987); siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez homogenizados los insectos, se adicionaron 200 μ L de cloroformo, se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12 000 x g por 15 minutos a 4 °C. Se recolectó la fase acuosa y se repitió la extracción adicionando 500 μ L de TRIzol®. Llevado esto a cabo, se recuperó la fase acuosa a la cual se le adicionó 1 mL de isopropanol frío, se incubó por 10 minutos y se centrifugó a 12 000 x g por 15 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% en agua tratada con

dietil pirocarbonato al 0.1% (DEPC) frío. Para finalizar la extracción, se centrifugó a 7 500 x *g* por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, el exceso de etanol restante y se agregó 30 µL de agua DEPC al 0.1%.

Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total

El ARN total obtenido se cuantificó por triplicado a una longitud de onda de 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 v 3.5.2, (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, se valoró la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1% con UView™ 6x Loading Dye (1 µL/5 µL de muestra; Bio-Rad Laboratories, Inc.) como marcador fluorescente, utilizando 5 µg de ARN total. La electroforesis se realizó a 60 volts y una vez obtenidas las bandas, éstas fueron detectadas en el fotodocumentador Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-rad, USA), utilizando el programa Image Lab™ Software (Bio-rad, USA).

Digestión del ADN Genómico Presente en Muestras de ARN Total y Síntesis del ADN Complementario

Para la obtención completa del ADNc es necesario eliminar la contaminación por ADN genómico (ADNg) que se encuentra en la muestra de ARN total extraída. Para ello se digirieron 8 µg de muestra con DNasa I (1 U/µg de ARN; Sigma, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubó la muestra a 37 °C por 20 minutos, se añadió 1 µL de EDTA 50 mM para inactivar la enzima y se incrementó la temperatura a 70 °C por 10 minutos. Una vez terminado el tratamiento se comprobó la eliminación del ADNg por medio de PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 5 µg de ARN total de *R. dominica* libre de ADNg empleando el kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, U.S.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se preparó una mezcla con 5 µg de ARN total, 1 µL de oligo (dT)₁₅, y se incubó a 70 °C por 5 minutos. Se enfrió en hielo por 5 minutos y se le agregó una segunda mezcla con 4 µL de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 4 µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de PCR Nucleotide Mix 0.5 mM, 1 µL de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 1 µL de GoScript™ Reverse Transcriptase y se llevó hasta un volumen de 15 µL con

H₂O libre de nucleasas. Una vez enfriado y mezclado ambas soluciones, se incubó a 25 °C por 5 minutos y después a 42 °C por una hora. Posteriormente, se incubó a 70 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima transcriptasa reversa. Finalmente, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Obtención de la secuencia parcial de la subunidad β de ATP sintasa

A partir del ADNc sintetizado se realizó un PCR convencional utilizando los oligonucleótidos diseñados anteriormente para la amplificación de la subunidad β de la ATP sintasa de *R. dominica*. La reacción de PCR se realizó usando 24 μ L de la mezcla preparada a partir de 12.5 μ L H₂O agua ultra pura, 2.5 μ L coral 10x, 2.5 μ L buffer 10x, 0.5 μ L dNTPs 10 mM, 5 μ L solución Q 5x, 0.125 μ L Taq (5 U/ μ L) y 0.5 μ L de cada oligonucleótido 1.6 mM y 1 μ L de ADNc (equivalentes a 200 ng de ARN total). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 3 minutos (un ciclo); 95 °C por 45 segundos, 60 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos (35 ciclos) y una extensión de 72 °C por 10 minutos en un termociclador C-1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Posteriormente, los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1 % y purificados por columnas GFX (General Electric, CA), siguiendo las condiciones del fabricante.

Exposición a Atmósferas Modificadas

Se utilizó el equipo de atmósferas modificadas Thermo Gas Mixers (Instrument Corporation la Porte, Indiana, USA) capaz de generar una mezcla de gases de CO₂ y O₂, en el rango de 0-100%. Se usaron bolsas de polietileno MSD – DR006 (Grainpro, Inc.), a los cuales se añadieron 200 insectos adultos de *R. dominica*. El tratamiento consistió en someter a *R. dominica* a una mezcla de gases 10% CO₂, 5% de O₂ y 85% de N₂, por 24 horas. Una vez colocados los insectos con la concentración de gases adecuada, las bolsas fueron selladas herméticamente y puestas a incubar a 30 °C y a 70% de humedad relativa. Cada tratamiento se evaluó por triplicado. También se incluyeron insectos sin ser expuestos a hipoxia como controles (0.01 CO₂, 19% O₂ y 80% N₂).

Aislamiento de Mitocondrias

Para el aislamiento de mitocondrias de *R. dominica* se siguió la metodología propuesta por Heddi y col. (1993), con ciertas modificaciones. Los insectos adultos fueron lavados dos veces con agua jabonosa en proporción 10:1, hipoclorito de sodio al 2% y enjuagados con agua destilada. Posteriormente, se homogenizaron en un medio de extracción (MEX): PIPES 4 mM, sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM a pH 6.8. La mezcla se centrifugó a 8500 x *g* a 4 °C por 10 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, el precipitado se suspendió en MEX y fue homogeneizado en un recipiente frío. Después, la mezcla se centrifugó a 700 x *g* por 5 minutos a 4 °C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 8500 x *g* por 10 minutos a 4 °C obteniendo un precipitado en donde se encuentran las mitocondrias. Éstas fueron lavadas dos veces en buffer MLM: PIPES 4 mM, sacarosa 290 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM a pH 6.8 y posteriormente se centrifugaron a 8500 x *g* por 10 minutos a 4 °C. Por último, el precipitado fue resuspendido y se aforó a 50 µL con buffer MLM.

Cuantificación de Lactato

Se determinó la concentración de lactato utilizando el kit L-Lactate (Randox, UK) adecuando las instrucciones del fabricante para la evaluación en microplaca. Para ello se utilizaron 20 µL de muestra en 180 µL del reactivo del kit. Posteriormente, se midió la absorbancia de la muestra contra un blanco a una longitud de onda de 550 nm utilizando un lector de microplaca Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Japón).

Determinación de proteínas por el método de Bradford

Para cuantificar las proteínas presentes en el precipitado obtenido en el aislamiento de mitocondrias, se utilizó el reactivo de Bradford (RB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Este ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microplaca Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Japón) a una longitud de onda de 595 nm midiendo por triplicado cada muestra. Para medir la concentración de proteínas presentes, se realizó una reacción con 250 µL del RB, 45 µL de agua ultra pura y 5 µL de la muestra. En el caso del blanco, se mezclaron 250 µL del RB, 45

μL de agua ultra pura y 5 μL del buffer en donde las mitocondrias fueron resuspendidas (MEX). Ambas reacciones se llevaron a un volumen final de 300 μL y se incubaron a 25 °C por 20 minutos.

Se construyó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (ASB) a una concentración de 2 mg/mL. A partir de esta concentración se realizaron diluciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL. Se midió la absorbancia utilizando 250 μL del RB, 45 μL de agua ultra pura y 5 μL de cada dilución. El blanco consistió en 250 μL del RB y 50 μL de agua ultra pura, fue incubado por 20 minutos y cada medición se realizó por triplicado.

Evaluación de la expresión génica de *R. dominica* bajo el efecto de hipoxia por qRT-PCR.

Se evaluó la expresión génica de 150 insectos adultos de *R. dominica* en normoxia y en condiciones de hipoxia; se realizaron los métodos anteriormente descritos para el aislamiento, cuantificación, evaluación de la integridad del ARN total, la eliminación del ADNg y la síntesis del ADNc.

El ARN mensajero (ARNm) de *atpβ* se determinó utilizando el termociclador StepOne Real-Time PCR-System (Applied Biosystems, CA), el cual consiste en la detección y cuantificación del fluoróforo SYBR-Green que se une a las dobles cadenas de los productos de PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados (Tabla 5) para la amplificación del gen *atpβ*, así como para el gen constitutivo (*β*-actina) para normalizar la expresión génica. Se preparó la reacción a partir de 12.5 μL Master mix for real-time qPCR with green-fluorescent DNA stain (Jena Bioscience, Germany), 1 μL de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) diseñado previamente y 208 ng de ADNc sintetizado. Las condiciones de PCR para *atpβ* fueron las siguientes: 95 °C por 10 minutos, 95 °C por 15 segundos, 42 °C por 25 segundos y 72 °C por 20 segundos (40 ciclos), con una curva de disociación de 42 °C a 95 °C. La cuantificación se llevó a cabo por triplicado para ambos genes. Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ propuesto por Livak y Schmittgen (2001) para calcular los cambios en la expresión génica de subunidad la subunidad *β* de la ATP sintasa. El cálculo se basa en el valor del Ct (ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor de umbral) de cada muestra durante la amplificación. La fórmula consiste en:

$$2^{-((CT_{atp\beta} - CT_{\beta actina}) - (CT_{prom atp\beta} - CT_{prom \beta actina}))}$$

en donde:

CT *atpβ* es el Ct del gen evaluado

CT *βactina* es el Ct del gen constitutivo

x es el tratamiento experimental

CT_{prom} *atpβ* es el promedio de los Ct de *atpβ* en normoxia

CT_{prom} *βactina* es el promedio de los Ct de *β-actina* en normoxia

Los resultados se expresaron como el cambio en la expresión génica de la subunidad β normalizada con respecto a la expresión del gen constitutivo (β-actina) y relativa a la condición de normoxia. En cada ensayo de qRT-PCR se incluyeron controles negativos sin templado. Se construyó una curva estándar para *atpβ* y *β-actina*, utilizando producto de PCR purificado como templado, en donde se realizaron 7 diluciones seriadas de 0.918 ng a 9.18×10^{-7} ng para *atpβ* y de 1.078 ng a 10.78×10^{-6} ng para el gen constitutivo y se calculó la eficiencia del PCR (%) para cada gen.

Cuantificación de la Actividad ATPasa

La actividad ATPasa se evaluó con base en la hidrólisis de ATP, a partir de un ensayo donde se determinó la oxidación de NADH a NAD e indirectamente la hidrólisis de ATP en ADP. Para llevar a cabo la reacción se utilizó una celda de 1 mL, a la cual se le agregó Tris 178 mM, MgSO₄ 13 mM, KCl 133 mM, sacarosa 300 mM, ATP 6.7 mM, fosfoenolpiruvato 20 mM, NADH 0.13 mM, piruvato cinasa 2 U, lactato deshidrogenasa 3 U, pH 8.0. Se utilizaron aproximadamente 90 μg de proteína mitocondrial de cada uno de los tratamientos. Para medir actividad, se empleó un espectrofotómetro (Agilent Cary 60 Spectrophotometer, Mulgrave, Victoria, Australia) a una longitud de onda de 340 nm a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia cada 5 segundos durante 5 minutos. Cada muestra se determinó por triplicado. Se cuantificó la actividad enzimática en U/mg de proteína de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{U}}{\text{mg}} \text{ Proteína} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}} / \text{min muestra} - \Delta A_{340\text{nm}} / \text{min Blanco} (1)}{(6.22)(0.09)}$$

Donde:

$\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min Muestra}$ es la absorbancia de la muestra por minuto.

$\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min Blanco}$ es la absorbancia del blanco por minuto.

1 es el volumen de la reacción (mL).

6.22 es el coeficiente de extinción mM del NADH.

0.09 es la cantidad de proteína utilizada en mg.

U/mg Proteína cantidad necesaria para hidrolizar $1\mu\text{mol}$ de ATP en ADP + Pi por minuto a 28°C a pH 8.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico para la concentración de lactato, actividad enzimática y expresión génica, utilizando la prueba t de student, considerando un intervalo de confianza del 95%, empleando el software NCSS versión 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Obtención de la secuencia nucleotídica parcial de la subunidad β de la ATP sintasa

Diseño de oligonucleótidos

A partir de secuencias reportadas en bases de datos para el escarabajo castaño de la harina, *Tribolium castaneum* (GenBank: NM_001170890.1), el mosquito de la fiebre amarilla, *Aedes aegypti* (GenBank: DQ440233.1) y variantes de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (GenBank: NM_001297790.1, NM_001272152.1, NM_166808.3, X71013.1), se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento de ADNc de 199 pares de bases codificantes para *atp β* . Las características de cada oligonucleótido se describen en la Tabla 5, en donde se puede observar que cada uno cuenta con las propiedades necesarias para ser utilizados en la evaluación de la expresión génica.

Tabla 5. Características de los oligonucleótidos diseñados para *atp β* de *R. dominica*.

Gen	Oligos	Secuencia	pb	%GC	Tm °C
<i>atpβ</i>	ATPBFw1	GTTGCCGTAATCGGTGC	17	58.8	54.3
	ATPBRv3	GGGTTTCAGCACCGACT	17	58.8	55.1
<i>β-actina</i>	BACTINAFw1	CGTCTTCCCATCCATCG	17	58.8	52.6
	BACTINARv5	CCATATCATCCCAGTTGGTG	20	50	52.9

Amplificación del gen *atp β*

Para obtener la secuencia parcial del gen *atp β* se aisló y se cuantificó el ARN total extraído por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280 nm, obteniendo una concentración de 2,723 ng/ μ L y una relación 260/280 de 1.9. La concentración de ARN se deriva de la absorbancia a 260 nm, la longitud de la trayectoria de la luz y el coeficiente de extinción molar. Mientras que la pureza se determina a partir de la relación de la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. El

ARN debe tener una relación 260/280 de alrededor de 1.8 – 2 para ser considerado como un producto puro (Douglas y col., 2005). La evaluación de la integridad del ARN se realizó mediante la visualización de las bandas 28S y 18S del ARN ribosomal (ARNr) y por la ausencia de barridos en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 8; Mueller y col., 2004).

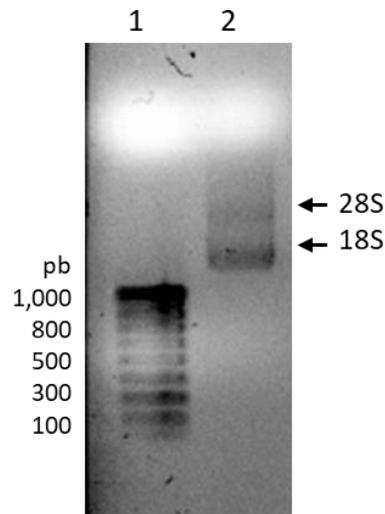


Figura 8. Integridad del ARN total de *R. dominica*. 1) EZ Load 100 bp como marcador molecular y 2) ARN total de *R. dominica*.

Para la amplificación de nuestro gen es necesario realizar la digestión del ADN genómico, ya que en el ARNm maduro se encuentran secuencias codificantes (exones), y la presencia de ADNg podría causar posibles interferencias al momento de evaluar la expresión génica. En la Figura 9 se confirma la eliminación del ADNg tratado con la enzima DNAsa I por la ausencia de una banda de amplificación del gen de tripsina (carril 2), el control positivo de tripsina de 213 pb (carril 3) indica un buen funcionamiento de los ciclos de amplificación del PCR y el control negativo (carril 4) indica que los componentes del PCR se encuentran libres de contaminantes.

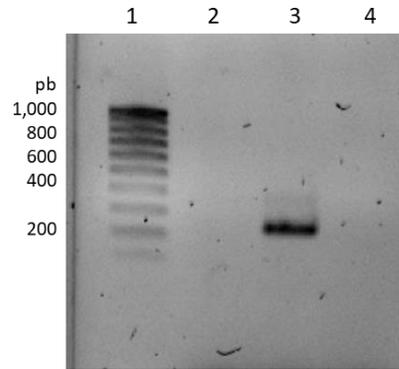


Figura 9. Digestión del ADN genómico de *R. dominica*. 1) EZ Load 100 bp como marcador molecular, 2) ARN tratado con DNasa I, 3) producto de PCR conocido amplificado con tripsina y 4) control negativo de la amplificación con tripsina.

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis del ADNc y la amplificación de *atpβ* de *R. dominica* por PCR convencional utilizando oligonucleótidos previamente diseñados. En la Figura 10 se muestra una banda de amplificación de 199 pb (carril 2) correspondiente a *atpβ* y en el carril 4 el control positivo amplificado por tripsina. El carril 3 y 5 representan a los controles negativos de *atpβ* y tripsina, respectivamente. Por lo anterior, se confirma la obtención del fragmento de interés de 199 pb correspondiente a la subunidad β de la ATP sintasa de *R. dominica*.

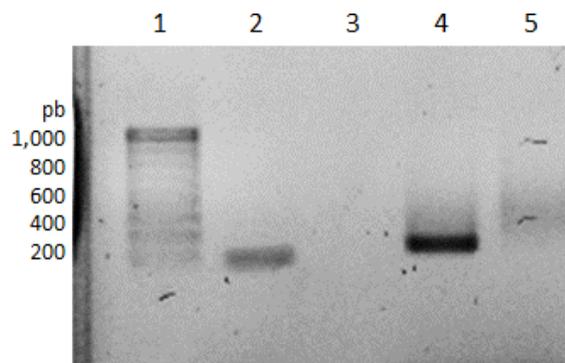


Figura 10. Amplificación de fragmentos de ADNc de *R. dominica*. 1) EZ Load 100 bp como marcador molecular, 2) ADNc amplificado con *atpβ*, 3) control negativo de la amplificación con *atpβ*, 4) control positivo amplificado con tripsina y 5) control negativo de la amplificación con tripsina.

Se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de *atpβ* obtenida a partir de fragmentos amplificados en el laboratorio, utilizando el programa de Clustal Omega, comparándola con secuencias reportadas de la subunidad β de la ATP sintasa en distintos organismos, en donde no se encontró similitud entre ellas. Esto podría deberse a complicaciones al momento de amplificar el fragmento de *atpβ*, obteniendo bajas concentraciones en el producto purificado. Sin embargo, en la amplificación por PCR, se obtuvo una banda de aproximadamente 199 pb, la cual corresponde al tamaño esperado.

Exposición de *R. dominica* a hipoxia

Cuantificación de lactato

La producción de ATP comienza cuando los carbohidratos, proteínas y lípidos son metabolizados. Una de las vías más rápidas para la obtención de energía es a partir de la glucólisis, produciendo moléculas de ATP, NADH y piruvato (Pagana, 2009). Sin embargo, al existir una escasez de oxígeno en los tejidos, ocurre un cambio en el metabolismo, causando que este pase de un estado aerobio a anaerobio. Al no haber suficiente producción de ATP para satisfacer la demanda, los insectos cambian al menos parcialmente a vías anaeróbicas para la obtención de energía (Pagana, 2009; Harrison y col., 2017). Existen varios estudios en donde se ha descubierto que los insectos recurren a esta ruta utilizando distintos metabolitos, como es el caso de las larvas del gusano de sangre, *Chironomus thummi* y del mosquito común, *Culex pipiens*, que acumulan grandes cantidades de alanina y lactato a los 60 minutos de estar expuestos a anoxia, las larvas del mosquito fantasma, *Chaoborus crystallinus*, forman succinato como producto final del metabolismo del malato y las larvas de *C. thummi* excretan etanol para sobrevivir a la falta de oxígeno (Redecker y Zebe, 1998; Englische y col., 1982; Zebe, 1977).

Se ha encontrado que los insectos adultos acumulan lactato, alanina, succinato, glicerol, glicerol 3-fostato, acetato y etanol como resultado de la anaerobiosis y la cuantificación de estos son una forma sencilla para identificar a organismos cuando están bajo estrés hipóxico. La producción de lactato es consistente en este tipo de exposición, dado que este compuesto no aumenta en condiciones normales, ya que es un producto del metabolismo anaeróbico en varios organismos (Adler, 1994; Hoback y Stanley, 2001). En el presente trabajo se sometió a *R. dominica* a condiciones de hipoxia, en donde fue necesario medir la concentración de lactato

presente en los organismos con el fin de confirmar que los insectos estuvieron expuestos a este tipo de estrés. Se observó un incremento de lactato del 29% en insectos en hipoxia con respecto a los insectos control (Figura 11). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Cota (2016) donde sometieron a *R. dominica* a un tratamiento de 12 y 24 h de hipoxia, reportando un aumento en la concentración de lactato del 50% y 75% respectivamente, en comparación con los mismos insectos en condiciones de normoxia.

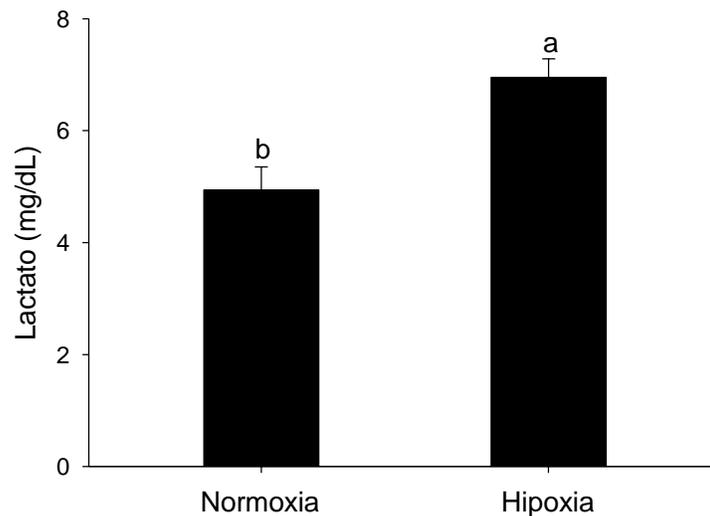


Figura 11. Concentración de lactato. Las variables literarias representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Resultados similares fueron reportados por Navarro y Friedlander (1975) quienes expusieron a pupas de la polilla de la harina, *Ephestia cautella*, a un ambiente hipóxico por 24 horas, obteniendo un aumento en la concentración de lactato en la hemolinfa. Adler (1994) reportó un aumento en la producción de lactato en el gorgojo del trigo, *Sitophilus granarius*, en dos tipos de ambientes bajos en oxígeno: con altas concentraciones de CO_2 y N_2 . Existen insectos que son resistentes a la falta de oxígeno, como lo es la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, en donde se evaluó la producción de este producto del metabolismo anaerobio en organismos resistentes y sensibles a anoxia, obteniendo como resultado un incremento en la producción de lactato en moscas resistentes a la ausencia de oxígeno con respecto a los organismos sensibles,

lo cual sugiere que las moscas sensibles son menos eficientes en la obtención de energía por la vía anaerobia (Vigne y col., 2009).

También se ha observado este comportamiento en organismos marinos, quienes están habituados a residir en una amplia variedad de concentraciones de O₂ por las fluctuaciones de corrientes de agua, haciendo que la disponibilidad de oxígeno sea pequeña (Abele y col., 2007). Un ejemplo de ello son los crustáceos *Corystes cussivelaunus* y *Galathea strigosa*, donde se ha encontrado que, al estar en un medio hipóxico, la producción de lactato aumenta dependiendo de la duración y gravedad de la exposición. Consecuentemente, los niveles de lactato disminuyeron al regresar a un estado de normoxia (Bridges y Brand, 1980).

Evaluación de la expresión génica de *atpβ* de *R. dominica* bajo el efecto de la hipoxia

Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN total

Se realizó la extracción de ARN total de las muestras de *R. dominica* expuestas a hipoxia, así como también organismos en condiciones normales. Se determinó la concentración de cada muestra por espectrofotometría a 260 y 280 nm. En la Tabla 6 se muestran las concentraciones del ARN total y la relación 260/280 con valores cercanos a 1.8, indicando la pureza del ARN extraído (Douglas y col., 2005). Se evaluó la integridad del ARN total de cada muestra mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 12), en donde se observan las bandas correspondientes a las subunidades 28 y 18S del ARNr y la ausencia de barridos, confirmando la integridad del ARN total (Mueller y col., 2004).

Tabla 6. Cuantificación del ARN total extraído de *R. dominica*.

Tratamiento	Concentración (ng/μL)	260/280
Normoxia	2566 ± 111	1.86 ± 0.13
Hipoxia	2752 ± 12.3	1.81 ± 0.09

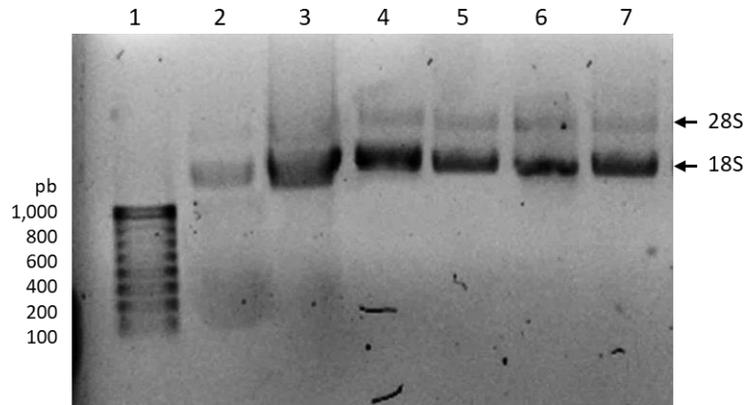


Figura 12. Integridad del ARN total de *R. dominica*. 1) EZ Load 100 bp como marcador molecular, 2-4) ARN total de *R. dominica* en normoxia y 5-7) ARN total de *R. dominica* en hipoxia.

Digestión del ADN genómico

Se trató cada una de las muestras con la enzima DNasa I y se confirmó la ausencia del ADNg con una reacción de PCR, incluyendo como control positivo la amplificación de la enzima tripsina de *R. dominica*. En la Figura 13, se observa una banda correspondiente a la amplificación con tripsina (carril 2) y en los carriles 2-7 se observa la ausencia de la amplificación del gen correspondiente, confirmando la digestión del ADNg.

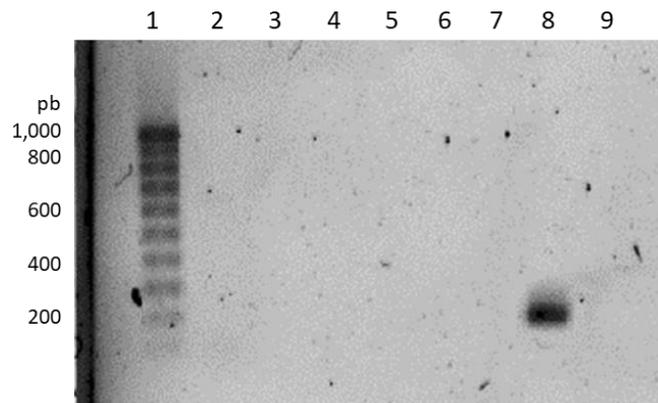


Figura 13. Digestión del ADN genómico de *R. dominica*. 1) EZ Load 100 bp como marcador molecular, 2-7) ARN tratado con DNasa I, 8) control positivo amplificado con tripsina y 9) control negativo de la amplificación con tripsina.

Expresión relativa del gen *atpβ*

El método de PCR en tiempo real (qRT-PCR) se ha convertido en la forma predilecta para validar resultados que permiten evaluar los cambios en la expresión de genes, ya que es altamente sensible, tiene buena reproducibilidad y un amplio rango de cuantificación (Marchionni, 2009; Pfaffl y col., 2002). Para propósitos de este trabajo se determinó la expresión relativa de *atpβ*, que consistió en cuantificar los cambios relativos de los niveles de ARNm en estado estable en múltiples muestras biológicas. Actualmente, el uso de genes constitutivos que se expresan sin ser regulados para normalizar los niveles de transcripción es el sistema preferido para valorar la expresión génica (Pfaffl, 2012; Vandesompele y col., 2002). Los controles pueden ser uno o más genes de referencia, que pueden ser cualquier transcripción, siempre y cuando estos se expresen en todas las muestras (Bustin y col., 2009).

Los resultados se muestran como el cambio en la expresión génica de la subunidad β normalizada con respecto a la expresión del gen constitutivo (β-actina) y relativa a la condición de normoxia. Se siguió el modelo matemático propuesto por Livak y Schmittgen (2001), el cual se basa en la comparación de los ciclos de umbral entre ambos genes, asumiendo una eficiencia de amplificación del 100% o similares entre estos durante todos los ciclos de PCR. Para ello se determinó la eficiencia de las reacciones para cada gen generando una curva estándar a partir de concentraciones conocidas. El porcentaje de eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar (Figura 14), obtenida después de realizar las diluciones seriadas con las reacciones de PCR en tiempo real de acuerdo con la siguiente fórmula (Higuchi y col., 1993):

$$E = (10^{(-1/m)} - 1) \times 100$$

Siendo E la eficiencia de la reacción y m la pendiente de la curva estándar obtenida por un análisis de regresión. Se consiguió aproximadamente un 90% de eficiencia para ambos genes, lo cual es considerado como una eficiencia ideal para evaluar la expresión ya que se encuentra dentro el intervalo de 90-100 % reportado (Bustin y col., 2009).

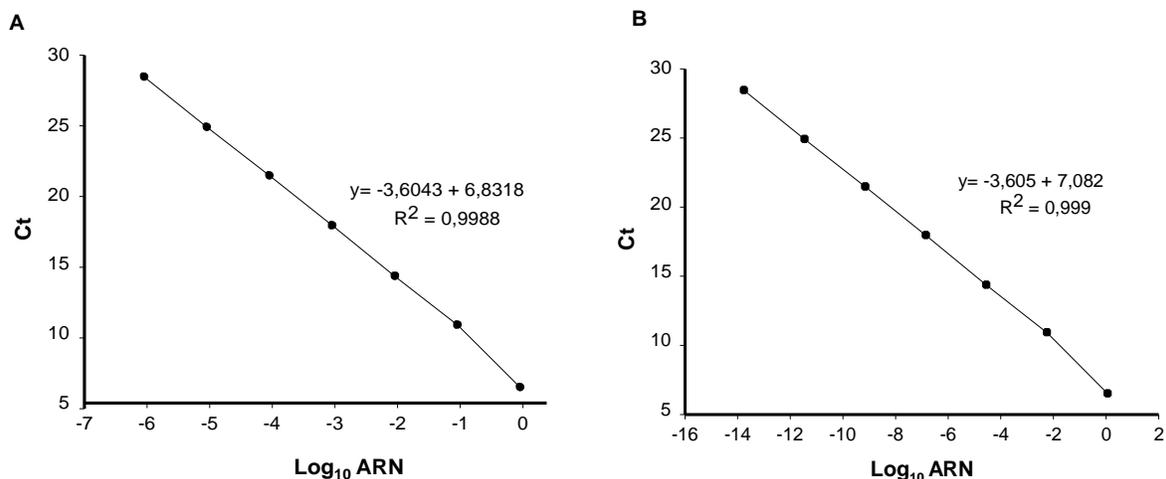


Figura 14. Curva estándar para calcular la eficiencia de A) *atpβ* y B) *β-actina* de *R. dominica*. Los valores se representan en función del logaritmo base 10 de la concentración y el Ct de amplificación.

Una vez comparados los porcentajes de eficiencia, se realizó una RT-PCR para determinar la expresión relativa de *atpβ* en hipoxia, en donde no se encontraron cambios significativos en la expresión génica de esta subunidad en comparación con los insectos en normoxia (Figura 15). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Levy-de la Torre (2017) quienes detectaron la presencia de la subunidad β en una electroforesis 2-D PAGE sin encontrar diferencias en la actividad de esta proteína al exponer a los mismos insectos a 5% de O₂ por 24 horas. Este comportamiento también fue observado en el camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuesto a diferentes condiciones de hipoxia, sin manifestar cambios en la expresión génica de las subunidades catalíticas de la ATP sintasa (Martínez-Cruz, 2011). Sin embargo, en investigaciones previas se detectó un aumento en la expresión de *atpβ* en pleópodos del camarón blanco y una disminución en la expresión de esta subunidad en branquias a 1.5 mg/L de oxígeno disuelto (OD), sugiriendo que los cambios en la expresión de las subunidades de la ATP sintasa son parte de los mecanismos biológicos de estos organismos para adaptarse a ambientes deficientes de oxígeno (Martínez-Cruz y col., 2011).

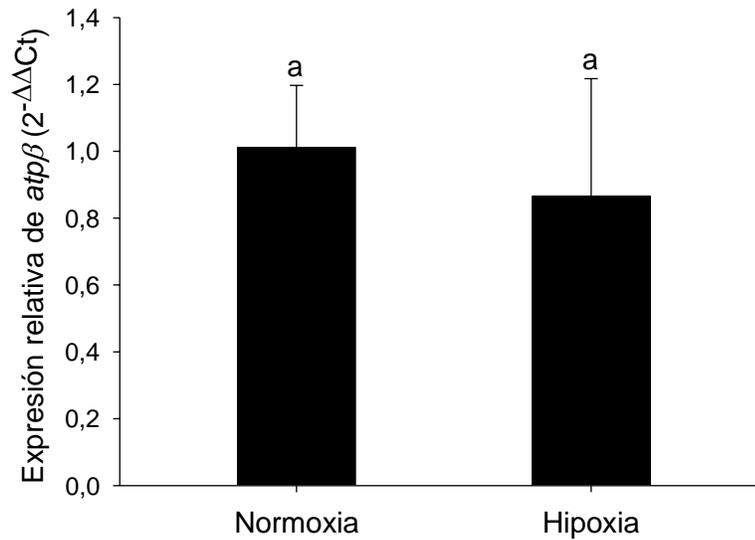


Figura 15. Expresión relativa del ARNm de *atpβ* de *Rhizopertha dominica* en respuesta a la hipoxia. Los valores de expresión están en base a la normalización con β -actina. Los datos se representan como la media \pm el análisis de la desviación estándar. Las variables literarias indican que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0.05$).

Cuando un organismo se ve afectado por la falta de oxígeno, activa una variedad de vías complejas con el fin de restaurar el equilibrio homeostático. Aunque se ha investigado la respuesta fisiológica a la hipoxia en varios organismos durante varios años, aún no están definidos los procesos moleculares que son activados en la célula para sobrellevar este tipo de estrés (Kenneth y Rocha, 2008). Para adaptarse a este ambiente, la célula puede reaccionar de dos formas distintas, ya sea cambiando su metabolismo aeróbico a anaeróbico para compensar el suministro y demanda de energía sintetizando ATP por otras vías, o por la alteración en la expresión de genes particulares. La adaptación a la hipoxia es en gran parte mediada por la expresión de una familia de genes dependientes de los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF), los cuales regulan la homeostasis de O_2 celular y sistémica para la supervivencia y adaptación de los organismos a la hipoxia (Aragónés y col., 2009; Arsham y col., 2003), estimulando la glucólisis y manteniendo los niveles de ATP cuando el último complejo de la fosforilación oxidativa se encuentra comprometido (Van den Beucken y col., 2006).

La ATP sintasa es una de las proteínas más abundantes en todos los organismos y es responsable de sintetizar moléculas de ATP. Durante la privación de oxígeno la enzima cambia

su función de forma inversa, hidrolizando ATP y translocando protones de la matriz mitocondrial al espacio Intermembranal para mantener el potencial de membrana estable frente a la alteración de la respiración, siempre que la glucólisis anaeróbica suministre a la célula de energía (Braig y col., 2000). Hasta el momento, no se ha investigado la participación de las subunidades catalíticas de la ATP sintasa en la adaptación de los insectos a la hipoxia. Existen estudios en los que se ha observado que la expresión de la subunidad α de la ATP sintasa en el músculo esquelético de ratas se ve afectada al estar expuesta a hipoxia por largos periodos de tiempo (Chen y col., 2012). Hernández y col. (2013) reportaron que al someter ratas Wistar a condiciones extremas de hipoxia por una hora, existía una menor expresión en las subunidades α y β de la F1-ATPasa cuando estos eran reoxigenados. Este comportamiento puede deberse a la falta de equilibrio en la membrana mitocondrial, afectando a la cadena transportadora de electrones y a la pérdida de proteínas unidas a la desestabilización de la mitocondria por efecto de la falta de oxígeno, alterando la estructura y función enzimática de la fracción F1 de la ATP sintasa (Chen y col., 2012; Nouette-Gaulain y col., 2011).

Evaluación de la actividad ATPasa

Como se mencionó anteriormente, el oxígeno es esencial para la vida de los organismos aeróbicos puesto que ocupa un lugar importante en la cadena respiratoria como el aceptor final de los electrones, permitiendo continuar con la fosforilación oxidativa y así proporcionarle a la célula energía produciendo ATP (Gilany y Vafakhah, 2010). Al igual que otros animales, los insectos necesitan equilibrar los riesgos de toxicidad por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la privación de oxígeno al hacer coincidir su capacidad de absorción con sus requerimientos de O_2 , para ello cuentan con varios mecanismos fisiológicos para hacerlo. Ante la baja disponibilidad de oxígeno o un aumento en respuesta a una disminución en la disponibilidad de O_2 ambiental o un aumento en la demanda de O_2 debido al aumento del crecimiento, la actividad o la temperatura corporal, los insectos pueden aumentar rápidamente el suministro de O_2 a sus tejidos, por ejemplo, al abrir los espiráculos y aumentar el bombeo abdominal (Harrison y col., 2006; Harrison y col., 2017). En condiciones normales, las células mantienen continuamente una proporción alta y constante de síntesis e hidrólisis de ATP para sobrevivir y para conservar esta relación de ATP/ADP, depende del suministro de oxígeno (Gilany y Vafakhah, 2010). Por lo tanto, una reducción del suministro normal de oxígeno implicaría que la cadena de transporte de electrones se detenga, afectando la viabilidad celular (Griffiths, 2012).

En este trabajo se cuantificó la actividad ATPasa de *R. dominica* expuesto a hipoxia por 24 horas, en donde se observó una disminución del 61% en la actividad enzimática durante la hipoxia en contraste con los insectos en condiciones normales (Figura 16). Resultados similares fueron encontrados por Gómez (2016) y por Levy-de la Torre (2017), quienes evaluaron la actividad ATPasa de los mismos organismos a bajas concentraciones de oxígeno, de forma cualitativa y cuantitativa respectivamente, en donde los insectos en normoxia mostraron una mayor actividad enzimática con respecto a los organismos sometidos a hipoxia. Este comportamiento se debe a que los insectos pueden activar mecanismos a corto plazo y largo plazo, suprimiendo la actividad del complejo V para reducir la necesidad de ATP (Mitcham y col., 2006).

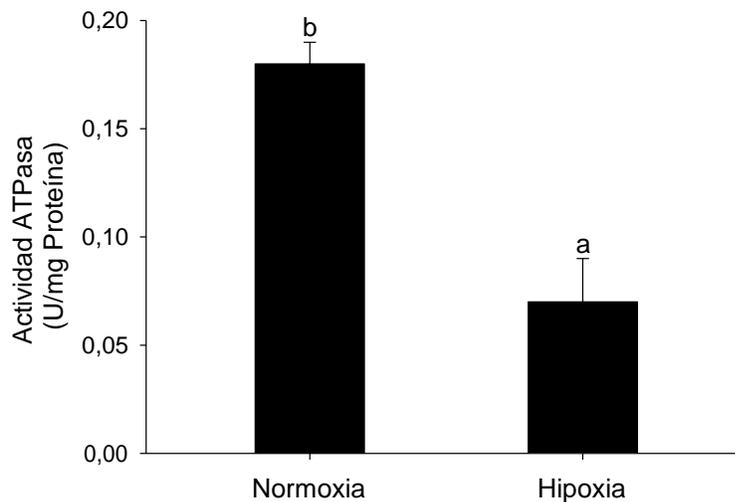


Figura 16. Evaluación de la actividad ATPasa de *R. dominica* en condiciones experimentales. Las diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

Se ha reportado que, en condiciones de hipoxia, los mecanismos de defensa para aumentar el suministro de oxígeno se vuelven insuficientes, interrumpiendo la fosforilación oxidativa y por consiguiente, comienza a acumularse protones en la matriz mitocondrial provocando la desestabilización del potencial de membrana mitocondrial. La ATP sintasa cambia su función a ATPasa y comienza a hidrolizar moléculas de ATP con el objetivo de restablecer el potencial de membrana. Alrededor del 50-80% del ATP que es gastado durante la anaerobiosis,

dependiendo del organismo (Rouslin y col., 1990), proviene de esta reversión, convirtiendo a la mitocondria en consumidor de ATP en lugar de sintetizar esta molécula energética (Galli y Richards, 2014).

No obstante, si la hidrólisis de ATP continua, eventualmente las reservas de esta molécula se terminarán, afectando los procesos dependientes de energía (Campanella y col., 2008). En células eucariontes existe una proteína que regula la función enzimática de la ATP sintasa, llamada IF1 (Burwick y col., 2004). IF1 se une a la fracción F1 de la enzima e inhibe completamente la actividad ATPasa, pero no la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa con el fin de mantener los niveles de ATP normales. La acción inhibitoria de IF1 requiere un pH bajo (<7.0) para ser activada (Pullman y Monroy, 1965).

Asimismo, los insectos tienen métodos a largo plazo para aumentar la producción de ATP, por ejemplo, mediante la proliferación traqueal para mejorar el suministro de oxígeno y activando vías metabólicas anaeróbicas para la producción de energía y con ello evitar la pérdida de moléculas de ATP (Harrison y col., 2017; Mitcham y col., 2006). Debido a esto, al detenerse la cadena transportadora de electrones, la ATP sintasa deja de bombear protones hacia la matriz mitocondrial, ocasionando que haya un desequilibrio quimiosmótico con el espacio intermembranal, disminuyendo así los valores de pH en la célula. De igual forma, al exponer a *R. dominica* a hipoxia, hubo un aumento en la producción de lactato, indicando el cambio de su metabolismo de aerobio a anaerobio, provocando una acidosis láctica en los insectos y consigo una alteración en el pH, lo cual generaría condiciones óptimas para la activación de la proteína IF1. Con los resultados obtenidos en la actividad enzimática de la ATPasa, se podría atribuir su disminución por la presencia de IF1, ya que este se uniría al complejo V con el objetivo de inhibir la hidrólisis de ATP y así continuar proporcionando energía a la célula.

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el estudio de la subunidad β de la ATP sintasa de *Rhyzopertha dominica*, en donde no se consiguió confirmar la secuencia nucleotídica de ADNc. Sin embargo, en la amplificación por PCR, se obtuvo una banda de aproximadamente 199 pb, la cual corresponde con la secuencia diseñada para *atp β* .

En la exposición de *R. dominica* a un ambiente hipóxico (5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂) por 24 horas, se observó un incremento del 29% en la concentración de lactato en los insectos sometidos a la hipoxia, confirmando el uso de una vía alterna anaeróbica para la obtención de energía.

En contra de la hipótesis inicial, no se encontraron cambios significativos en la expresión génica de *atp β* durante la hipoxia, sugiriendo que la respuesta de los organismos se pudiera encontrar regulada de manera post-transcripcional. No obstante, con los resultados obtenidos, se cree que la expresión de este gen podría tender a disminuir.

Se cuantificó la actividad ATPasa, detectando una disminución del 61% en la actividad enzimática en los organismos expuestos a la hipoxia con respecto a los insectos en normoxia. Este comportamiento pudiera estar relacionado con la presencia de la proteína inhibidora IF1, con el fin de evitar que moléculas de ATP sigan siendo hidrolizadas.

RECOMENDACIONES

Debido a que no se encontraron cambios significativos en la expresión del gen de la subunidad β de la ATP sintasa de *R. dominica* por efecto de la hipoxia, es importante evaluar la expresión génica de la subunidad α y de HIF en condiciones de hipoxia, así como de la proteína IF1, con el fin de conocer la participación de estos en la adaptación de los organismos a la hipoxia.

Además de realizar un bioensayo a 24 horas, se recomienda utilizar tratamientos de 12 y 48 horas. También es importante la obtención de la secuencia nucleotídica para confirmar la presencia de *atp β* .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele D, Philipp E, Gonzalez P, Puntarulo S. (2007). Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Frontiers in Bioscience*, 12, 933-946.
- Adler C. (1994). Carbon dioxide-more rapidly impairing the glycolytic energy production than nitrogen. In *International Working Conference On Stored-Product Protection*. 7-15p.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2008). *Molecular biology of the cell*, Garland Science. Taylor & Francis Group, New York. 813-840p.
- Amzel LM, Pedersen PL. (1983). Proton ATPases: structure and mechanism. *Annual Review Biochemistry*, 1983; 52:801–824.
- Aragónés J, Fraisl P, Baes M, Carmeliet P. (2009). Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metabolism*, 9(1), 11-22.
- Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *Journal of Biological Chemistry*, 278(32), 29655-29660.
- Arthur, FH. (1996) Grain protectants: Current status and prospects for the future. *Journal of Stored Products Research*, 32, 293–302.
- Baloch UK. (1999). WHEAT: Post-harvest Operations. Post-harvest Compendium. Pakistan Agricultural Research Council (PARC). Islamabad, Pakistan.
- Balsa-Martínez E. (2012). Regulación de la cadena de transporte de electrones bajo condiciones de hipoxia. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
- Bennett FD, Crestana L, Habeck DH, Berti-Filho E. (1988). Brazilian peppertree-prospects for biological control. In *Proceedings of the VII International Symposium on Biological Control of Weeds*. 293-297p.
- Benzi V, Sanchez-Chopa C, Ferrero AA. (2009). Comparación del efecto insecticida de dos especies de *Aloysia* (Verbenaceae) sobre *Rhyzopertha dominica* (Insecta, Coleoptera, Bostrichidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(2).

- Birch, L, Snowball J. (1945). The development of the eggs of *Rhyzopertha dominica* Fab. (Coleoptera) at constant temperatures. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 23, 37–40.
- Boutry M, Chua NH. (1985). A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO Journal*, 4(9), 2159.
- Boyer PD. (1975). A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. *Federation of European Biochemical Societies*, 58:1–6.
- Boyer PD, Kohlbrenner WE. (1981) The present status of the binding change mechanism and its relation to ATP formation by chloroplasts. In: Selman BR, Selman-Peimer S (eds) Energy coupling in photosynthesis. *Elsevier*. Amsterdam. 231–240p.
- Braig K, Menz RI, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. (2000). Structure of bovine mitochondrial F1-ATPase inhibited by Mg²⁺ ADP and aluminium fluoride. *Structure*, 8(6), 567-573.
- Bridges CR, Brand AR. (1980). The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of some marine Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 65(4), 399-409.
- Briggle LW, Reitz LP. (1963). Classification of *Triticum* species and of wheat varieties grown in the United States (No. 1278). *United States Department of Agriculture*. Washington, D. C. 9p.
- Burwick NR, Wahl ML, Fang J, Zhong Z, Moser TL, Li B, Capaldi RA, Kenan DJ, Pizzo SV. (2005). An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1740-1745.
- Bushuk W, Rasper VF. (1994). Wheat: production, properties and quality. *Springer Science & Business Media*. 1p.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Plaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.

- Calderón M, Barkai-Golan R. (1990). Food preservation by modified atmospheres. *CRC Press*. Florida. 4-7p.
- Calderón M, Navarro S. (1979). Increased toxicity of low oxygen atmospheres supplemented with carbon dioxide on *Tribolium castaneum* adults. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 25(1), 39-44.
- Calderón M, Navarro S. (1980). Synergistic effect of CO₂ and O₂ mixtures on two stored grain insect pests. *Elsevier*. Amsterdam. 79-84p.
- Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, Tinker A, Duchen MR. (2008). Regulation of mitochondrial structure and function by the F₁F_o-ATPase inhibitor protein, IF₁. *Cell Metabolism*, 8(1), 13-25.
- Campanella M, Parker N, Tan CH, Hall AM, Duchen MR. (2009). IF₁: setting the pace of the F₁F_o-ATP synthase. *Trends in Biochemical Science*, 34:343–350.
- CANIMOLT. Cámara de la Nacional Industria Molinera de Trigo. México (2007). Disponible en: <http://www.canimolt.org/> (Fecha de acceso: 15 de agosto de 2017).
- Cano-Estrada A, González-Halphen D. (2011). Estructurales. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(3), 98-108.
- Capaldi RA, Aggeler R, Turina P, Wilkens S. (1994). Coupling between catalytic sites and the proton channel in F₁F_o-type ATPases. *Trends in Biochemical Science*, 19:284–289.
- Carvalho MO, Pires I, Barbosa A, Barros G, Riudavets J, Garcia AC, Brites C, Navarro S. (2012). The use of modified atmospheres to control *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae* on stored rice in Portugal. *Stored Products Research*, 50: 49-56.
- Chen J, Gao Y, Liao W, Huang J, Gao W. (2012). Hypoxia affects mitochondrial protein expression in rat skeletal muscle. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16(3), 98–104.
- Cheng W, Lei J, Ahn JE, Wang Y, Lei C, Zhu-Salzman K. (2013). CO₂ enhances effects of hypoxia on mortality, development, and gene expression in cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology*, 59(11), 1160-1168.
- Chivasa S, Tomé DF, Hamilton JM, Slabas AR. (2010). Proteomic analysis of extracellular ATP-regulated proteins identifies ATP synthase β -subunit as a novel plant cell death regulator. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(3), 1-13.

- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159p.
- Christensen CM, Kaufmann HH. (1969). Grain storage: the role of the fungi in quality loss. University of Minnesota Press. 164p.
- Conyers ST, Bell CH. (2007). A novel use of modified atmospheres: storage insect population control. *Journal of Stored Products Research*. 43(4), 367-374.
- Cota-Valdez MA. (2016). Evaluación de la expresión génica de la subunidad COX Va de *Rhyzopertha dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Curtis BC, Rajaram S, Gómez-Macpherson H. (2002). Bread Wheat; Improvement and Production. Harvest and storage management of wheat. FAO Plant Production and Protection Series. No.30. Rome. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/006/Y4011E/y4011e00.htm#Contents> (Fecha de acceso: 20 de agosto de 2017).
- Devenish RJ, Prescott M, Rodgers AJ. (2008). The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 267:1–58.
- Devlin TM. (2004). Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. 4ta ed. Editorial Reverté. Nueva Jersey. 575-579p.
- Douglas SA., Ao Z, Johns DG, Maniscalco K, Willette RN, Sarov-Blat L, Cogswell JP, Seepersaud S, Murdock P, Steplewski KM, Patel L. (2005). Quantitative Analysis of Orphan G Protein-Coupled Receptor mRNAs by TaqMan® Real-Time PCR. In Receptor Binding Techniques. *Humana Press*. 27-49p.
- Dowdy AK, McGaughey WH. (1994). Seasonal activity of stored product insects in and around farm stored wheat. *Journal of Economic Entomology*, 87: 1351-1358.
- Englische H, Opalka B, Zebe E. (1982). The anaerobic metabolism of larvae of the midge *Chaoborus crystallinus*. *Insect Biochemistry*, 12, 149–155.
- 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 agosto de 2017).

- Franzén LG, Falk G. (1992). Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Molecular Biology*, 19: 771-780.
- Fruttero LL, Demartini DR, Rubiolo ER, Carlini CR, Canavoso LE. (2014). β -chain of ATP synthase as a lipophorin binding protein and its role in lipid transfer in the midgut of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 52, 1-12.
- Futai M, Kanazawa H. (1983). Structure and function of proton-translocating adenosine triphosphatase (F₀F₁): biochemical and molecular biological approaches. *Microbiological Reviews*, 47(3):285–312.
- Galli GL, Richards JG. (2014). Mitochondria from anoxia-tolerant animals reveal common strategies to survive without oxygen. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(3), 285-302.
- Gil-Martínez A. (2010). Preelaboración y conservación de alimentos. Editorial AKAL. Madrid, España. 66p.
- Gilani K, Vafakhah M. (2010). Hypoxia: a review. *Journal of paramedical sciences (JPS)*, 1, 43-60.
- Guedes RNC, Zhu KY. (1998). Characterization of malathion resistance in a Mexican population of *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide Science*, 53: 15–20.
- Gómez-García L. (2016). Evaluación de la actividad enzimática de la Citocromo c Oxidasa y ATP sintasa de *Rhyzopertha dominica* bajo el efecto de atmósferas modificadas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Griffiths EJ. (2012). Mitochondria and heart disease. In *Advances in Mitochondrial Medicine*. Springer, Dordrecht. 249-267p.
- Grolleaud M. (2002). Estudio sintético y didáctico sobre el fenómeno de las pérdidas que se producen a lo largo del sistema post-cosecha. Compendio sobre pérdidas post cosecha. FAO, Agro Industries and Post-Harvest Management Service (AGSI).

- Hagstrum DW, y Flinn PW. (1994). Survival of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat under fall and winter temperature conditions. *Environmental Entomology*, 23: 390-395.
- Haliscak JP, Beeman RW. (1983). Status of malathion resistance in five genera of beetles infesting farm-stored corn, wheat, and oats in the United States. *Journal of Economic Entomology*, 76: 717-722.
- Harrison JF, Frazier MR, Henry JR, Kaiser A, Klok CJ, Rascón B. (2006). Responses of terrestrial insects to hypoxia or hyperoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154(1-2), 4-17.
- Harrison JF, Greenlee K, Verberk WC. (2017). Functional Hypoxia in Insects: Definition, Assessment, and Consequences for Physiology, Ecology, and Evolution. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 303-325.
- Heddi A, Lefebvre F, Nardon P. (1993). Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23(3), 403-411.
- Hernández R, Blanco S, Peragón J, Pedrosa JA, Peinado MA. (2013). Hypobaric hypoxia and reoxygenation induce proteomic profile changes in the rat brain cortex. *Neuromolecular Medicine*, 15(1), 82-94.
- Highland HA. (1984). Insect infestation of packages. In Baur F. J., editor. (ed.), *Insect Management for Food Storage and Processing. American Association of Cereal Chemists International*. Minnesota, USA. 309-320p.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026-1030.
- Hoback WW, Stanley DW. (2001). Insects in hypoxia. *Journal of Insect Physiology*, 47(6), 533-542.
- Hochachka PW, Monge C. (2000). Evolution of human hypoxia tolerance physiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 472:25-43.
- Howe RW. (1950): The development of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Col., Bostrichidae) under constant conditions. *The Entomologist's Monthly Magazine*, 86: 1-5.

- Ileke KD, Bulus DS. (2012). Evaluation of contact toxicity and fumigant effect of some medicinal plant and pirimiphos methyl powders against cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (Fab) [Coleoptera: Chrysomelidae] in stored cowpea seeds. *Journal of Agricultural Science*, 4(4): 279-284.
- Jood S, Kapoor AC, Singh R. (1996). Effect of infestation and storage on lipids of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(6): 1502-1506.
- Juárez ZN, Bárcenas-Pozos ME, Hernández LR. (2014). El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 79-93.
- Kenneth NS, Rocha S. (2008). Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochemical Journal*, 414(1), 19-29.
- Koehler PG, Pereira RM. (1994). Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera, Bostrichidae). Entomology and Nematology Department, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida, Gainesville. 1-2p.
- Koolman J, Röhm KH. (2004). Bioquímica: texto y atlas. Madrid: Médica Panamericana.
- Kou TC, Liu YT, Li M, Yang Y, Zhang W, Cui JH, Zhang XW, Dong SM, Xu S, You S, Pang ZY, Yu DS. (2017). Identification of β -chain of FoF1-ATPase in apoptotic cell population induced by *Microplitis bicoloratus* bracovirus and its role in the development of *Spodoptera litura*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 95(2).
- Krishnamurthy TS, Spratt EC, Bell CH. (1986). The toxicity of carbon dioxide to adult beetles in low oxygen atmospheres. *Journal of Stored Products Research*, 22(3), 145-151.
- Kulp K. (2000). Handbook of Cereal Science and Technology, Revised and Expanded. CRC Press. 9p.
- Larrain P. (1994). Manejo integrado de plagas en granos almacenados. *Investigación y Progreso Agropecuario, La Platina*, 81:10-16
- Levy-de la Torre VA. (2017). Identificación de proteínas mitocondriales involucradas en la bioenergética de *Rhyzopertha dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.

- Levy FH, Kelly DP. (1997). Regulation of ATP synthase subunit e gene expression by hypoxia: cell differentiation stage-specific control. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 272(2), C457-C465.
- Lepesme P. (1944). Les Coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés. *Enciclopedia Entomologica*. Paris-VI, Paul Lechevalier. 19 335p.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. (2005). *Biología celular y molecular*. 5ta ed. Editorial Médica Panamericana. Nueva York. 309p.
- Malek M, Parveen B. (1989). Effect of insects infestation on the weight loss and viability of stored BE paddy. *Bangladesh Journal of Zoology*. 17: 1, 83-85.
- Marchionni L. (2009). Impact of Gene Expression Profiling Tests on Breast Cancer Outcomes. *DIANE Publishing*. 119-122p.
- Martínez-Cruz O, Arvizu-Flores A, Sotelo-Mundo RR, Muhlia-Almazán A. (2015). The nuclear encoded subunits gamma, delta and epsilon from the shrimp mitochondrial F1-ATP synthase, and their transcriptional response during hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 47(3), 223-234.
- Martínez-Cruz O. (2011). La porción catalítica F1 de la ATP-Sintasa del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*): transcritos, proteínas y respuesta frente a la hipoxia. Tesis Doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Martínez-Cruz O, García-Carreño F, Robles-Romo A, Varela-Romero A, Muhlia-Almazán A. (2011). Catalytic subunits atp α and atp β from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* FOF1 ATP-synthase complex: cDNA sequences, phylogenies, and mRNA quantification during hypoxia. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 43(2), 119-133.
- Martínez-Cruz O, de la Barca AC, Uribe-Carvajal S, Muhlia-Almazán A. (2012). The function of mitochondrial FOF1 ATP-synthase from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle during hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 162(4), 107-112.

- Mason LJ, Obermeyer J. (2010). Stored grain insect pest management. Purdue University Extension, West Lafayette, IN. 1-5 p.
- McMahon B. (2001). Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans. *Respiration Physiology*. 128, 349-364.
- Mitcham E, Martin T, Zhou S. (2006). The mode of action of insecticidal controlled atmospheres. *Bulletin of Entomological Research*, 96(3), 213-222.
- Mitchell P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature*. 191, 144-148.
- Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. (2004). RNA integrity number (RIN)—standardization of RNA quality control. *Agilent Application Note*, 1-8p.
- Müller-Esterl W. (2008). Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida. Barcelona: Editorial Reverté. 512p.
- Navarro S. (2006). Insect Management for Food Storage and Processing. Modified Atmospheres for the Control of Stored-Product Insects and Mites. Department of Food Science. Agricultural Research Organization. Israel. 105-146p.
- Navarro S. (2012). The use of modified and controlled atmospheres for the disinfestation of stored products. *Journal Pest Science*. 1-22p.
- Navarro S, Friedlander A. (1975). The effect of carbon dioxide anesthesia on the lactate and pyruvate levels in the hemolymph of *Ephestia cautella* (Wlk.) pupae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 50(1), 187-190.
- Neckelmann N, Warner CK, Chung A, Kudoh J, Minoshima S, Fukuyama R, Shimizu Y, Shimizu N, Liu JD, Wallace, DC. (1989). The human ATP synthase β subunit gene: sequence analysis, chromosome assignment, and differential expression. *Genomics*. 5(4), 829-843.
- Nicholls, DG. (1987). Bioenergética: Introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté. Barcelona, España. 161p.
- Nouette-Gaulain K, Biais M, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, Letellier T, Sztark F. (2011). Chronic hypoxia-induced alterations in mitochondrial energy metabolism are not reversible in rat heart ventricles. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 89(1), 58–66.
- Pagana KD. (2009). Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. Elsevier Health Sciences. 9p.

- Pedersen JR. (1992). Insects: Identification, damage, and detection. *Storage of Cereal Grains and their Products*. 435-489.
- Pedersen PL, Amzel LM. (1993). ATP synthases, Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 9937-9937.
- Peña P, Ugalde C, Calleja M, Garesse R. (1995). Analysis of the mitochondrial ATP synthase β -subunit gene in Drosophilidae: structure, transcriptional regulatory features and developmental pattern of expression in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal*, 312(3), 887-897.
- Perkins G, Hsiao YH, Yin S, Tjong J, Tran MT, Lau J, Xue J, Liu S, Ellisman MH, Zhou D. (2012). Ultrastructural modifications in the mitochondria of hypoxia-adapted *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, 7(9), e45344.
- Phillips TW, Throne JE. (2010). Biorational Approaches to Managing Stored - Product Insects. *Annual Review Entomology*, 55: 375 - 397.
- Pfaffl MW. (2012). Quantification strategies in real-time polymerase chain reaction. Applied Microbiology. *Caister Academic Press*; Norfolk, UK, 53-61.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36-e36.
- Potter C. (1935). The biology and distribution of *Rhyzopertha dominica* (Fab.). *Transactions of the Royal Entomological Society*, 83: 449-482.
- Prats G. (2005). Microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1p.
- Pullman ME, Monroy GC. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 238, 3762–3769.
- Rees D. (2007). Insects of stored grain: a pocket reference. *CSIRO Publishing*. Australia. 15p.
- Redecker B, Zebe E. (1988). Anaerobic metabolism in aquatic insect larvae: studies on *Chironomus thummi* and *Culex pipiens*. *Journal of Comparative Physiology B*, 158(3), 307-315.

- Rivers A. (2017). Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Agricultura de Conservación. Disponible en: <http://conservacion.cimmyt.org/> (Fecha de acceso: 28 de agosto 2017).
- Rouslin W, Broge CW, Grupp IL. (1990). ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 259(6), H1759-H1766.
- Runswick MJ, Walker JE. (1983). The amino acid sequence of the beta-subunit of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 258(5), 3081-3089.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2011). Almacenamiento y Conservación de Granos y Semillas. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Almacenamiento%20de%20semillas.pdf> (Fecha de acceso: 28 de agosto 2017).
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2016). Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa> (Fecha de acceso: 6 de Agosto 2017).
- Schlipalius D, Chen W, Collins P, Nguyen T, Reilly P, Ebert P. (2008). Gene interactions constrain the course of evolution of phosphine resistance in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Heredity*, 100: 506-516.
- Senior AE y Wise JG. (1983). The proton-ATPase of bacteria and mitochondria. *Journal Membrane Biology*, 1983;73(2):105–124.
- Sinha RN, Watters FL. (1985). Insect pests of flour mills, grain elevators, and feed mills and their control. *Agriculture Canada*. Ottawa. 57p.
- Storey CL. (1975). Mortality of Adult Stored-Product Insects in an Atmosphere Produced by an Exothermic Inert Atmosphere Generator. *Journal of Economic Entomology*, 68: 316-318.
- Storey CL. (1980). Mortality of various stored product insects in low oxygen atmospheres produced by an exothermic inert atmosphere generator. Controlled atmosphere storage of grains. *Elsevier*. Amsterdam. 85p.
- Teets NM, Peyton JT, Colinet H, Renault D, Kelley JL, Kawarasaki Y, Lee RE, Denlinger DL. (2012). Gene expression changes governing extreme dehydration tolerance in an Antarctic insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20744-20749.

- Teixeira MM, Marqués-Pereira JA, Ribeiro A. (1993). Manual de manejo: poscosecha de granos a nivel rural. FAO América Latina y Caribe. Pérdidas Alimentarias Posteriores a la Cosecha. Disponible en: <http://www.fao.org> (Fecha de acceso: 15 de septiembre de 2017).
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. (2007). Introducción a la Microbiología. 9na ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 129-134p.
- Trivelli HDO, Velázquez CJA. (1984). Insectos que dañan a granos y productos almacenados. FAO América Latina y Caribe. Serie: Tecnología Postcosecha 4. Santiago-Chile. Disponible en: <http://www.fao.org/> (Fecha de acceso: 15 de septiembre de 2017).
- Van den Beucken T, Koritzinsky M, Wouters BG. (2006). Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer Biology and Therapy*, 5(7), 749-755.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034-1.
- Vigne P, Tauc M, Frelin C. (2009). Strong dietary restrictions protect *Drosophila* against anoxia/reoxygenation injuries. *PLOS ONE*, 4(5), e5422.
- Villavicencio-Queijeiro A, Vázquez-Acevedo M, Cano-Estrada A, Zarco-Zavala M, Tuena de Gómez M, Mignaco JA, Freire MM, Scofano Helena M, Foguel D, Cardol P. Remacle C, González-Halphen D. (2009). The fully-active and structurally-stable form of the mitochondrial ATP synthase of *Polytomella* sp. is dimeric. *Journal Bioenergetic Biomembrane*, 41:1–13.
- Villers P, Navarro S, De Bruin T. (2008). Development of hermetic storage technology in sealed flexible storage structures. *Controlled Atmosphere and Fumigation (CAF) Conf.*, Chengdu.
- Voet D, Voet, JG. (2006). Bioquímica. 3a ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 830p.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay N. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal*. 1(8):945–951.
- Wang ZH, Cai XL, Wu L, Yu Z, Liu JL, Zhou ZN, Liu J, Yang HT. (2012). Mitochondrial energy metabolism plays a critical role in the cardioprotection afforded by intermittent hypobaric hypoxia. *Experimental Physiology*. 97(10), 1105-1118.

Watt IN, Montgomery MG, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:16823–16827.

Zebe E. (1977). Anaerobier stoffwechsel bei wirbellosen tieren. In *Cytoplasmatische Actomyosine und ihre Bedeutung für Zellbewegungen*. Sozialwissenschaften, Wiesbaden. 51-73p.

Páginas de internet

Imagen de *Rhyzopertha dominica* disponible en:

<http://www.agrologica.es/informacion-plaga/capuchino-granos-rhizopertha-dominica/>

Imagen del Ciclo de vida de *Rhyzopertha dominica*:

Paul Boles, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture:
[http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Rhyzopertha_dominica_\(Fabricius\)_-_Lesser_Grain_Borer.htm](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Rhyzopertha_dominica_(Fabricius)_-_Lesser_Grain_Borer.htm)

Imagen de la Representación estructural de la mitocondria disponible en:

<http://alfaser.org/2016/05/05/quieres-mas-energia-optimiza-tus-mitocondrias/>

Imagen de los Complejos de la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa:

Modificada por Klaus Hoffmeier, OpenStax College, Anatomy & Physiology, Connexions:
<http://cnx.org/content/col11496/1.6/>

Imagen de la Estructura de ATP sintasa de *Escherichia coli*:

Kanehisa Laboratories: www.genome.jp/kegg

Imagen de la Estructura de la ATP sintasa mitocondrial de corazón bovino:

Matthew W. Bowler, Martin G. Montgomery, Andrew G. W. Leslie, John E. Walker. EMBL-EBI, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK:
http://www.ebi.ac.uk/pdbe/static/entry/2jdi_entity_1_front_image-800x800.png