

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

**Evaluación de la Actividad Enzimática de Citocromo C
Oxidasa y ATP sintasa de *Rhizopertha dominica* Bajo el
Efecto de Atmósferas Modificadas**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Lucía Gómez García

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 **Lucía Gómez García** hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado **Evaluación de la Actividad Enzimática de Citocromo c oxidasa y ATP sintasa de *Rhizopertha dominica* Bajo el Efecto de Atmósferas Modificadas** 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

Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui

Vocal

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por brindarme las herramientas para mi formación profesional.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) por las facilidades ofrecidas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero para la realización del presente proyecto con clave 220620 titulado "Bioenergética de Rhyzopertha 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 la Dra. Oliviert Martínez Cruz, por su apoyo, paciencia y comprensión durante la realización de éste proyecto.

A cada miembro del comité de tesis: Dr. Alonso Alexis López Zavala, Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui y Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores, por la contribución en ésta investigación.

A los laboratorios que me permitieron utilizar sus instalaciones para la realización de ésta tesis: Laboratorios del Departamento de Investigación y Posgrado en alimentos: Biotecnología, Entomología, Bioquímica, Productos Marinos e Investigación de Alimentos; al Laboratorio de Bioenergetica y Genética Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

A mis compañeros de laboratorio, Marlene Cota, Andrés Levy y Rafael Dávila, por su apoyo, comprensión y compañía durante esos meses.

A mi familia por su motivación y ser mi pilar durante mi formación académica y realización de tesis.

A mis amigos más cercanos, por darme ánimo en cada momento.

A mis compañeros de licenciatura por los buenos momentos, enseñanzas y experiencias durante estos años.

DEDICATORIA

*A mi familia y amigos más cercanos, por su apoyo,
cariño y motivación, gracias...*

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
ANTECEDENTES	13
<i>Rhizopertha dominica</i> : el Barrenador Menor de los Granos	13
Ciclo de Vida de <i>Rhizopertha dominica</i>	13
La Mitocondria: Estructura y Función	15
Metabolismo Energético	17
Cadena Transportadora de Electrones	17
Actividad de Citocromo C Oxidasa: Sitios Redox y Vías de Protones	20
Fosforilación Oxidativa	23
Metabolismo Anaerobio	25
Métodos Utilizados para Control de Plagas	27
Atmósferas Modificadas	28
METODOLOGÍA	31
Cultivo de <i>Rhizopertha dominica</i>	31
Exposición a Atmósferas Modificadas	31
Aislamiento de Mitocondrias de <i>Rhizopertha dominica</i>	31
Cuantificación de Lactato	32
Solubilización de Mitocondrias	32
Electroforesis Nativa en Geles de Poliacrilamida en Gradiente	33
Evaluación de la Actividad Enzimática de <i>Rhizopertha dominica</i>	34
Evaluación Cualitativa de la Actividad Enzimática de Citocromo C	

Oxidasa	34
Evaluación Cualitativa de la Actividad Enzimática de ATP Sintasa	34
Análisis Estadístico	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
 Monitoreo de Atmósferas Modificadas	35
 Cuantificación de Lactato	35
 Cuantificación de Proteínas Mitocondriales	37
 Evaluación de la Actividad Enzimática de Citocromo C Oxidasa	38
 Evaluación de la Actividad Enzimática de ATPasa	40
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Tiempo de desarrollo de los distintos estadios de <i>Rhyzopertha dominica</i> a diferentes temperaturas	15
Tabla 2. Uso de atmósferas modificadas para el control de plagas con diferentes concentraciones de gases	30
Tabla 3. Condiciones atmosféricas experimentales a las que fueron expuestos los insectos	31
Tabla 4. Preparación del gel de poliacrilamida en gradiente para la evaluación de la actividad enzimática	33
Tabla 5. Valores de variación en la concentración de gases durante el bioensayo	35
Tabla 6. Cuantificación de proteínas de mitocondrias aisladas de <i>Rhyzopertha dominica</i> expuesta a condiciones de hipoxia.	38

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Rhyzopertha dominica</i>	14
Figura 2. Estructura de una mitocondria animal	16
Figura 3. Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa	18
Figura 4. Enzima Citocromo c oxidasa (COX)	19
Figura 5. Estructura y mecanismo de actividad de Citocromo c oxidasa de corazón de bovino	21
Figura 6. Vías de translocación de protones en Citocromo c oxidasa de corazón de bovino	23
Figura 7. Enzima ATP sintasa de <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 8. Mecanismo de síntesis de ATP	25
Figura 9. Cuantificación de lactato de <i>Rhyzopertha dominica</i> sometidos a hipoxia	36
Figura 10. Actividad cualitativa de Citocromo c oxidasa	40
Figura 11. Actividad cualitativa ATPasa	42

RESUMEN

Rhyzopertha dominica es considerada una plaga primaria muy destructiva. Actualmente, se cuenta con una gran variedad de métodos, físicos y químicos, para controlar la aparición de distintas plagas en granos almacenados, de los cuales resalta la utilización de aceites esenciales como una alternativa sustentable para el medio ambiente y como una sucesión de los plaguicidas, a los cuales algunos insectos presentan resistencia. Por otra parte, métodos físicos como la variación en la temperatura de almacenamiento y la modificación de la concentración de gases, está siendo probada. Existen pocos estudios que evalúen la respuesta bioquímica, específicamente, la generación de energía en insectos bajo el estrés hipóxico, debido a esto el objetivo de esta investigación consistió en evaluar la actividad enzimática de Citocromo c oxidasa (COX) y ATPasa de *R. dominica* expuesta a diferentes atmósferas modificadas durante 12 y 24 h. Para cumplir con el objetivo se realizó un bioensayo en donde se expusieron a los insectos a condiciones de hipoxia (5% de O₂) y normoxia (19% de O₂). Posteriormente, se evaluó la concentración de lactato y se detectaron diferencias significativas entre los organismos en normoxia e hipoxia ($p < 0.05$), confirmándose con ello que los insectos cambiaron su metabolismo aerobio a anaerobio. También se encontró que la concentración proteica mitocondrial aumentó en hipoxia con respecto a los insectos en condiciones de normoxia. La actividad de la COX presentó un aumento en la actividad a las 12 h, respecto a los insectos en normoxia y se detectó una supresión en la actividad a las 24 h. Lo anterior podría indicar que *R. dominica* presenta una adaptación a las condiciones hipóxicas a largo plazo, mientras que en las primeras horas de exposición a la baja concentración de oxígeno intenta compensar la demanda energética. Adicional a estos resultados se observó una disminución en la actividad ATPasa en hipoxia respecto a los organismos en normoxia. Los resultados obtenidos en esta investigación podrían evidenciar que *R. dominica* activa el metabolismo anaerobio e incrementa la cantidad de lactato para satisfacer la demanda de energía y el ATP generado es hidrolizado para mantener el potencial de membrana. Así, a medida que se extiende el tiempo de la hipoxia se crea un desbalance en la producción y demanda de ATP, hasta llegar a un agotamiento de energía.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se busca garantizar el abasto de alimentos debido a que la población humana se incrementa exponencialmente, siendo la conservación adecuada de los granos almacenados motivo de preocupación e investigación a nivel mundial y nacional. De tal manera, que no basta con producir enormes volúmenes de granos, también se requiere de sistemas eficientes y ecológicos de conservación de los productos cosechados, además, se debe contar con las óptimas condiciones físico-químicas y de sanidad (Christensen y Kaufmann, 1969).

En México, las actividades primarias como agricultura, ganadería, pesca y caza, representan el 8.32% de la economía total del país, siendo el Estado de Sonora el primer lugar nacional en la producción de granos de trigo con el 52.2%, seguido de Baja California con el 17% (SAGARPA, 2010). Se han reportado grandes pérdidas económicas de este cereal, una vez almacenado, por distintas plagas como: *Sitophilus spp.*, *Prostephanus truncatus*, *Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Plodia interpunctella*, *Rhyzopertha dominica*, entre otros. En Sonora las localidades afectadas por *Rhyzopertha dominica* son Huatabampo, Navojoa, Ciudad Obregón, Vicam, Hermosillo, Caborca, Altar, Sonoyta y San Luis Río Colorado (Wong-Corral y col., 1996). En un intento por controlar las plagas, se aplican ampliamente y de manera intensiva en zonas agrícolas de todo el mundo aproximadamente 250 millones de toneladas de plaguicidas. Sin embargo, su uso continuo e indiscriminado ha tenido un impacto ambiental negativo, incluyendo pérdidas de calidad de agua, contaminación de hábitat natural y la resistencia de las especies que eran objeto de control, como es el caso del coleóptero *R. dominica* (Bouvier y col., 2001; Guedes y col., 1998; Schlipalius y col., 2008).

Todo esto plantea la necesidad de desarrollar nuevos métodos para el control de plagas que permitan conservar los rendimientos de producción, que no conlleven un elevado costo medioambiental y que sean compatibles con la agricultura sostenible (Isman, 2000; Regnault-Roger y col., 2004). Sin olvidar el efecto nocivo de los plaguicidas en la salud de quienes los aplican, así como las personas que viven en las áreas cercanas. La alternativa propuesta en este trabajo es utilizar atmósferas modificadas en el almacenamiento de trigo para el control de plagas. Con esta técnica se ha probado que pueden modificarse las tasas de respiración y por ende alargar la vida de almacenamiento de los granos de trigo, como también retardar el crecimiento de organismos aeróbicos (Barreiro y Sandoval, 2006). Por lo antes mencionado, en la presente investigación se evaluó el efecto de atmósferas modificadas en el insecto *R. dominica*, haciendo

énfasis en los cambios de actividad de las enzimas Citocromo c oxidasa y ATP sintasa, involucradas directamente en el metabolismo aeróbico.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad enzimática de Citocromo c oxidasa y ATP sintasa de *Rhizopertha dominica* bajo el efecto de atmósferas modificadas.

Objetivos Específicos

- I. Aislar las mitocondrias de *Rhizopertha dominica* bajo el efecto de atmósferas modificadas por centrifugaciones diferenciales.
- II. Realizar un bioensayo y cuantificar la concentración de lactato en *Rhizopertha dominica* bajo el efecto de atmósferas modificadas.
- III. Evaluar el efecto de atmósferas modificadas en la actividad enzimática de Citocromo c oxidasa y ATP sintasa de *Rhizopertha dominica*.

ANTECEDENTES

***Rhyzopertha dominica*: El Barrenador Menor de los Granos**

El insecto *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792) del orden Coleoptera, de la familia *Bostrichidae*, del género *Rhyzopertha*, de la especie *dominica*, también es llamado barrenador menor de grano, se ha reportado como originario de la India, sin embargo, actualmente tiene una distribución mundial (Ching'oma, 2006). Es considerada como una de las plagas primarias de grano almacenado más destructivas, debido a que su ciclo biológico se lleva a cabo en el interior del grano, por lo cual la larva y el adulto atacan al grano de trigo causándole daños importantes (García y col., 2009). Este insecto es responsable de la pérdida de toneladas de grano almacenado debido a que presenta resistencia a plaguicidas organoclorados, organofosforados y piretroides (Collins y col., 2006).

Ciclo de Vida de *Rhyzopertha dominica*

Es importante mencionar el ciclo de vida de este insecto, ya que siendo una plaga primaria, daña al grano desde sus primeros estadios de vida. El ciclo inicia al depositar los huevecillos dentro del grano por el insecto adulto (Fig. 1), aproximadamente 10.4 huevecillos por día, de los cuales el 80% son fértiles; el huevo tiene forma ovalada, con apariencia cerosa y de color opaco cuando es recién depositado, posteriormente, toma una tonalidad rosada (Avilés y col., 2008).

En los días siguientes el insecto llega al estadio larvario, en donde se presentan cuatro pre-estadios o etapas larvales anteriores a prepupa; en el primer pre-estadio larval el insecto tiene forma curva y es de color blanquecino, presenta piezas bucales y una especie de columna vertebral, en esta etapa, se mueve rápidamente y se alimenta del interior del grano, donde permanece la mayor parte del tiempo hasta su maduración. El segundo pre-estadio larval es similar al primero en forma ya que sólo aumenta su tamaño. En el tercer y cuarto pre-estadio presenta forma curva y escarabeiforme, es poco móvil y la cabeza es retraída al tórax. A diferencia de los otros estadios, el cuarto pre-estadio presenta un cambio de color, donde la región ventral es blanquecina, la cabeza es de color marrón claro y las mandíbulas son de color marrón oscuro o casi negro, es aquí donde la larva alcanza su pleno desarrollo (Edde, 2012).

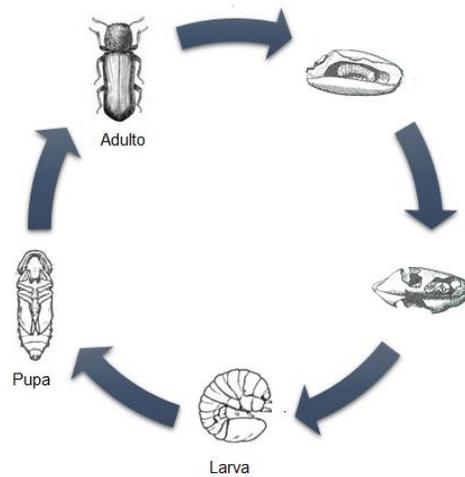


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhyzopertha dominica* (Imagen tomada y modificada de lucidcentral.org y erails.net).

El estadio prepupal es muy corto, se diferencia de las larvas por su forma alargada y cilíndrica, además su cabeza está extendida fuera del cuerpo, en esta etapa no se alimenta y es relativamente inmóvil. En el estadio pupal *R. dominica* es de color blanquecino y presenta un pigmento marrón en los ojos y piezas bucales, su cabeza se encuentra deprimida y el tórax se amplía, en este estadio el insecto todavía se encuentra dentro del grano y es posible distinguir entre ambos sexos. Los adultos emergen del grano de color marrón rojizo a marrón oscuro, en la parte anterior del tórax tiene forma de cúpula, antenas cortas, presenta élitros ligeramente convexos y segmentados (Edde, 2012). El tiempo necesario para alcanzar la maduración dependerá de las condiciones ambientales en las que se someta al insecto, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Tiempo de desarrollo de los distintos estadios de *Rhyzopertha dominica* a diferentes temperaturas.

Estadio	Longitud media (mm) ^a				Estadio (días) ^e			
	Longitud	Cabeza	Tórax	Abdomen	25°C	28°C	29°C	34°C
Huevo	0.55	-	-	-	11	7	9	5
1er estadio	0.78	0.13	0.2	0.17	13	9	5	-
2do estadio	1.08	0.17	0.29	0.24	10	6	4	-
3er estadio	2.04	0.26	0.64	0.51	9	5	3	-
4to estadio	3.07	0.41	0.86	0.78	13	9	4	-
Estadio extra	-	-	-	-	12	-	-	-
Larva madura	-	-	-	-	40	28	25	16
Prepupa	3.15	0.5	0.85	0.96	-	-	-	1
Pupa	3.91	0.63	0.91	1.11	9	6	7	3
Total de días					65	40	38	25

^a Las medidas reportadas de cabeza, tórax y abdomen, representan la anchura de cada región.

^b Valores obtenidos bajo condiciones constantes de 70% humedad relativa en las temperaturas de 25°C, 28°C y 34°C, y 75% de humedad relativa para la temperatura de 29°C. (Tabla tomada y modificada de Edde, 2012).

La Mitocondria: Estructura y Función

Existe la teoría de que las mitocondrias se formaron en una fase temprana de la evolución de los seres vivos, a partir de bacterias aerobias que constituyeron una simbiosis con organismos eucariotas primitivos de vida anaerobia. Esta teoría endosimbiótica es avalada por numerosos hallazgos, un ejemplo de esto es que las mitocondrias contienen su propio material genético, ADN de forma anular, además de tener sus propios ribosomas, los cuales participan en la síntesis de alrededor de 13 proteínas, que son generalmente subunidades de complejos de la cadena transportadora de electrones, el resto de proteínas son codificadas por el genoma nuclear y son trasladadas a su lugar dentro de la mitocondria (Koolman y Klaus, 2003).

La mitocondria es un organelo de aproximadamente 1 x 2 µm, está presente en gran cantidad en todas las células eucariotas, en función del gasto energético que presente la célula será la proporción en que se encontrará, pudiendo ser hasta el 25% del volumen celular. Las mitocondrias están rodeadas por dos membranas, una externa lisa y otra interna con

plegamientos, llamados crestas, que encierran la matriz mitocondrial. El espacio entre la membrana externa e interna se conoce como espacio intermembranal (Voet, 2004; Fig. 2).

Ambas membranas mitocondriales son ricas en proteínas. Las porinas, presentes en la membrana externa, posibilitan el intercambio de pequeñas moléculas, < 10 kDa, sin embargo, entre el citoplasma y el espacio intermembranal mitocondrial no existe intercambio de moléculas con excepción del O₂, CO₂ y H₂O. En la membrana interna existen transportadores que son responsables de la importación y exportación de metabolitos importantes, como lo son los complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones, la ATP sintasa, entre otras enzimas (Voet, 2004).

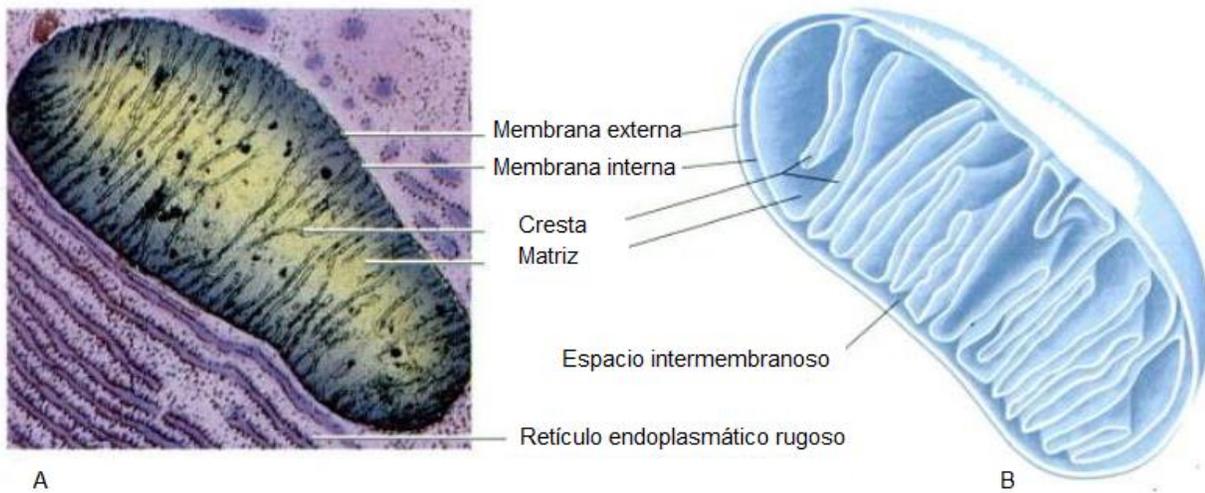


Figura 2. Estructura de una mitocondria animal. A. Micrografía electrónica. B. Diagrama de un corte de una mitocondria (Voet, 2004).

La mitocondria es considerada la fábrica de la célula, debido a que dentro de ella se llevan a cabo procesos tan importantes como la generación de energía, a través de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa, en su matriz se localizan el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), encargado de convertir el piruvato en Acetil-Coenzima A, el ciclo del ácido cítrico (de suma importancia por la generación de metabolitos implicados en otros procesos metabólicos), la β -oxidación de los ácidos grasos, encargada de metabolizar los ácidos grasos, entre otros procesos importantes para la supervivencia celular (Koolman y Klaus, 2003).

Metabolismo Energético

La energía libre en los sistemas biológicos es el adenosintrifosfato o ATP. Las células utilizan la energía liberada durante la hidrólisis de enlaces fosfoanhídrido terminal de “alta energía” del ATP para impulsar los procesos energéticos. Aunque en las células aparecen otras moléculas de alta energía, el ATP es la “moneda universal” de energía química; se encuentra en el organismo de todos los tipos y se cree que ha existido desde las primeras formas de vida (Lodish y col., 2004).

Una de las vías para obtener energía celular es por medio de la oxidación de glucosa hasta piruvato en el citoplasma celular, proceso conocido como Glucólisis, al llegar el piruvato a la matriz mitocondrial entra al complejo enzimático piruvato deshidrogenasa para ser oxidado a Acetil-Coenzima A y así iniciar el ciclo del ácido cítrico, también conocido como ciclo de Krebs, para pasar por una serie de reacciones y así formar una variedad de metabolitos que serán utilizados en los siguientes pasos de la respiración celular; los metabolitos más importantes para este trabajo es el poder reductor en forma de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y flavin-adenina dinucleótido (FAD^+). Este poder reductor será utilizado en la siguiente fase de la respiración celular (Armstrong y Bennett, 1982).

Cadena Transportadora de Electrones

En la Fig. 3 se muestran los complejos enzimáticos presentes en la cadena transportadora de mamíferos. Así, la cadena de transporte de electrones está integrada por: NADH deshidrogenasa (Complejo I), succinato coenzima Q reductasa (Complejo II), citocromo reductasa (Complejo III) y citocromo c oxidasa (Complejo IV; Ryan y Hoogenraad, 2007).

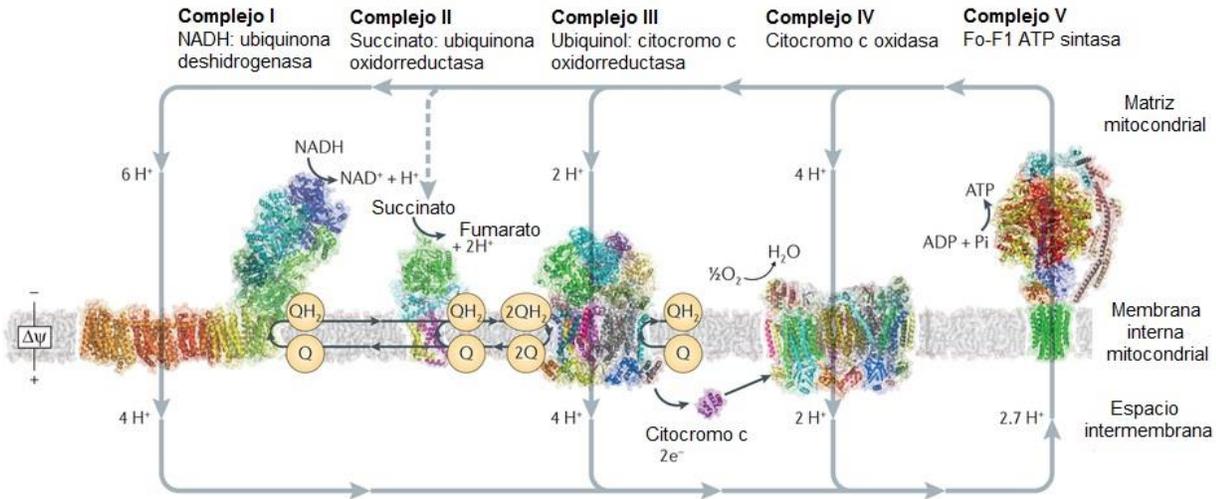


Figura 3. Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa (Sazanov, 2015).

- I. NADH deshidrogenasa. Este complejo cataliza la transferencia de dos electrones desde NADH hasta Coenzima Q. La estructura tiene forma de "L", con la sección funcional unida a la membrana, y otra sección que entra a la matriz mitocondrial, esta última parte contiene un brazo con actividad terminal de NADH deshidrogenasa y flavina mononucleótido (FMN), donde el NADH dona electrones al complejo I, los cuales pasan de dos en dos. Por último, ambas partes están unidas por un módulo conector con subunidades múltiples con ocho o nueve grupos de Fe-S (Devlin, 2008).

- II. Succinato coenzima Q reductasa. Esta enzima cataliza una de las reacciones del ciclo de Krebs; acepta electrones del succinato y cataliza la reducción de Coenzima Q a ubiquinol (QH₂). Está compuesta por tres enzimas multisubunidad idénticas, que se asocian en una forma trimérica, que se encuentra incrustada en la membrana. Una de las subunidades tiene el sitio de unión al sustrato y una flavina adenina dinucleótido. La otra subunidad tiene tres grupos Fe-S (Koolman y Klaus, 2003).

- III. Citocromo reductasa. Cataliza la oxidación de moléculas de QH₂ en la membrana, y la reducción de una molécula móvil e hidrosoluble de citocromo c en la superficie externa. El transporte de electrones mediante del complejo III se acopla a la transferencia de H⁺ a través de la membrana por un proceso llamado Ciclo Q. Su estructura está conformada por tres subunidades principales: Citocromo c₁, aceptor móvil de electrones, citocromo b y proteína hierro-azufre de Rieske (Lodish y col., 2004).

IV. Citocromo c oxidasa. De los cuatro complejos nos interesa el último llamado Citocromo c oxidasa (Fig. 4), la cual es una proteína transmembranal de ~200 kDa (en organismos eucariotas pequeños) y ~400 kDa (en organismos eucariotas de mayor tamaño). Está compuesta por 8 – 13 subunidades, cuyas cadenas más grandes e hidrófobas son la subunidad I, II y III, las cuales están codificadas por el ADN mitocondrial. Este complejo enzimático cataliza la oxidación de moléculas de Citocromo c reducido por el complejo III. La subunidad I se encuentra casi totalmente embebida en la membrana, consiste en 12 hélices α y tiene tres centros redox dentro, dos de ellos son tipo hemo α y el tercero es un átomo de cobre. La subunidad II tiene dos hélices que atraviesan la membrana y se anclan en ella, formando un dominio de barril- β que está en la superficie externa de la membrana. Este dominio contiene un centro redox de cobre, constituido por dos átomos de cobre, que al compartir electrones crean un estado mixto de valencia. La subunidad III consta de siete hélices transmembranales y está totalmente dentro de la membrana; ésta subunidad no cuenta con centros redox, ya que tiene la función de estabilizar ambas subunidades anteriores al proteger sus centros redox de reacciones de óxido-reducción inadecuadas (Devlin, 2008).

La función de reducir oxígeno molecular, acoplado al bombeo de protones, se considera uno de los elementos más importantes de la respiración celular. Esto lo logra a través de sus cuatro sitios metálicos activos, mencionados anteriormente, ya que es el único espacio para el acceso de oxígeno y es utilizado para el transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa (Fig. 4, Zhang y col., 2013).

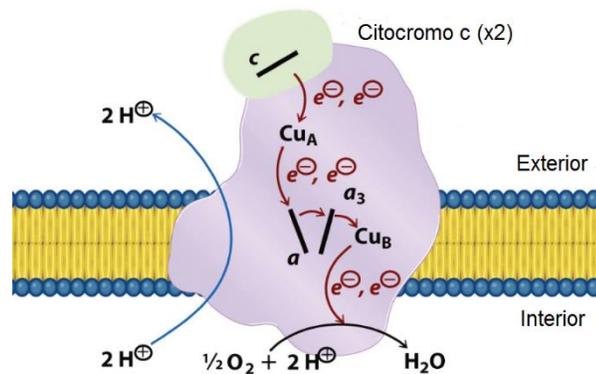


Figura 4. Enzima Citocromo c oxidasa (COX) (Devlin, 2008).

Actividad de Citocromo C Oxidasa: Sitios Redox y Vías de Protones

Citocromo c oxidasa tiene dos superficies hidrofílicas expuestas, una frente a la fase-P y otra frente fase-N (Fig. 5). El sitio de reducción de O_2 está conectado a la superficie hidrofílica de la Citocromo c oxidasa frente a la fase-N por dos redes de enlaces de hidrógeno, denominados vías K y D. Se cree que ambas vías son eficientes para transferir los protones necesarios para la formación de agua en el lugar de reducción de O_2 (Iwata y col., 1995). Una tercera vía de transferencia de protones posible en Citocromo c oxidasa es la vía H, que forma una conexión entre las dos superficies hidrofílicas, necesarias para el bombeo de protones asociados con la formación de un gradiente de protones transmembranal. La vía H, se encuentra cerca del grupo hemo *a*. Todas estas vías y sitios redox de la enzima se encuentran en las subunidades I y II, que son los más grandes y la tercera más grande de las subunidades constitutivas, respectivamente. Las estructuras y ubicaciones de estos sitios de metal y las vías para el transporte de los protones y los electrones son muy conservadas en las Citocromo c oxidasa de tipo aa_3 en bacterias y eucariotas (Yoshikawa y col., 2011). El tipo de enzima aa_3 se refiere a que la enzima contiene dos moléculas de grupo hemo *a* y cada uno contiene un átomo de hierro (Fe), que varía en sus valencias entre Fe^{3+} (férrico) y Fe^{2+} (ferroso) durante la oxidación y la reducción, además de dos átomos de cobre (Cu^{2+}) asociados a la actividad de Citocromo c oxidasa y la reacción de electrones con el oxígeno molecular. A continuación se explica a detalle el mecanismo de acción de cada vía descrito por Yoshikawa y col. (2011).

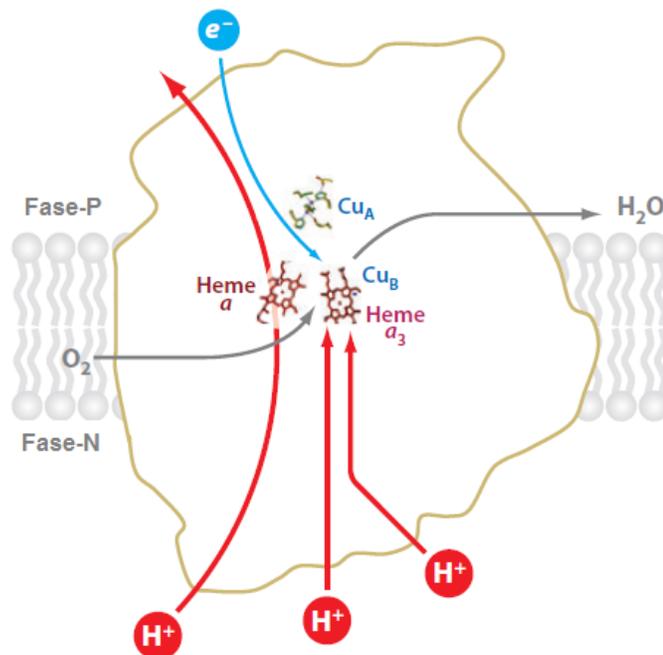


Figura 5. Estructura y mecanismo de actividad de Citocromo c oxidasa de corazón de bovino (Yoshikawa y col., 2011).

Vía D. El sitio de bombeo de protones se cree que está completamente separado del lugar de reducción de O_2 , porque de lo contrario los protones bombeados se utilizarían para la formación de agua, generando de este modo un cortocircuito. Por lo tanto, ésta vía debe tener al menos un punto de ramificación para la separación de los protones bombeados. Un candidato para el punto de cruce es el residuo de aminoácido E242 (Fig. 6). Cuando E242 está en estado protonado, la sal de propionato, que es un grupo ligado a R438, tiene un valor de pKa bajo y sólo se puede acceder a la fase-P. Tras una reducción de un electrón del lugar de reducción de O_2 , un protón se transfiere de E242 al lugar de reducción de O_2 para compensar la carga. La desprotonación de E242 induce un cambio conformacional en el R438 y el anillo-D de propionato (el receptor de protones bombeado: sitio A) para aumentar su valor pKa. En esta etapa, la accesibilidad de protones de sitio A cambia de la fase-P a la fase-N. A continuación, los protones bombeados se transfieren al sitio A, seguido rápidamente por la transferencia de protones para E242. La protonación del E242 induce un cambio conformacional en el sitio A para disminuir su valor pKa y para cambiar su accesibilidad a la fase-P. Por lo tanto, el protón que se bombea en el sitio A se libera a la fase-P. E242 debe transferir protones tanto al sitio receptor de protones A

y al lugar de reducción de O_2 si tiene la función de ramificación, que se propone en la vía D. Los protones deben ser transferidos al sitio A por medio del canal de transferencia de O_2 . La dirección de la transferencia depende de la distribución de carga de estos metales y de la ubicación de los protones para desplazarse hacia la reducción de O_2 o al sitio A (Yoshikawa y col., 2011).

Vía H. Se compone de una red de enlaces de hidrógeno conectado con el lado de la fase-P y una abertura de canal de agua en el lado fase-N. Las moléculas de agua en la fase-N son accesibles a R38 en el extremo inferior de la red a través del canal de agua. Como resultado, R38 se protona dándole equilibrio con la fase-N. Se propone un enlace peptídico entre Y440 y S441 situado junto a D51, para facilitar la transferencia de protones unidireccional por la relativa estabilidad de la forma ceto del enlace peptídico en comparación con la forma enol (Fig. 6). La red de enlaces de hidrógeno forma dos enlaces de hidrógeno con un grupo hemo de los grupos formilo y propionato de hemo *a* hacia una molécula de agua fija y R38 en la red de enlaces de hidrógeno, respectivamente. El canal de agua en la Citocromo c oxidasa totalmente reducida tiene cinco cavidades, cada una de las cuales es suficientemente grande para acomodar al menos una molécula de agua. La fase de agua de la fase-P, queda en el interior de proteínas tras la oxidación de Citocromo c oxidasa. Este cambio conformacional de D51 sugiere fuertemente que su estado de protonación es dependiente del estado redox de Citocromo c oxidasa. Además, tras la oxidación, la accesibilidad de D51 a la fase-P se elimina y D51 queda conectado a la fase-N a través de la Vía H. La carga positiva creada tras la oxidación del grupo hemo *a* después de donar un equivalente de electrones para el lugar de reducción O_2 está deslocalizada al propionato y los grupos formilo, cada uno de los cuales forma un enlace de hidrógeno a la red de enlaces de hidrogeno de la vía H. Por lo tanto, los protones en la red de enlaces de hidrógeno son transportados activamente a través de la red, impulsada por la repulsión electrostática (Yoshikawa y col., 2011).

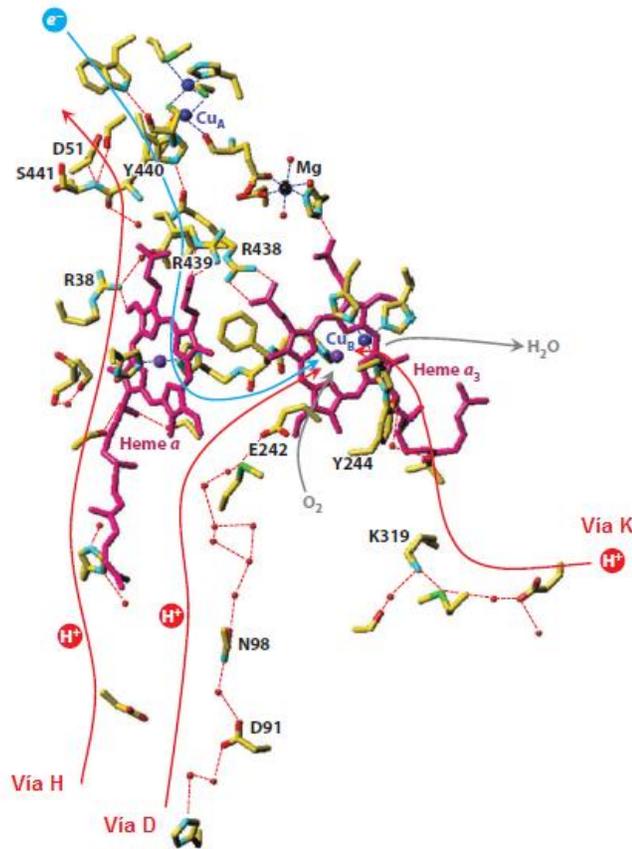


Figura 6. Vías de translocación de protones en Citocromo c oxidasa de corazón de bovino (Yoshikawa y col., 2011).

Fosforilación Oxidativa

Es un proceso compuesto por un complejo enzimático llamado ATP sintasa (Fig. 7), comúnmente también es llamado Complejo V, siguiendo la numeración de la cadena transportadora de electrones. Este complejo cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP + Pi en una reacción impulsada por el gradiente de protones generado durante el transporte de electrones. Está compuesta por dos segmentos: una parte F₁ que participa en la síntesis de ATP y sobresale en forma de esfera hacia la matriz mitocondrial, y una parte F₀ que está integrada en la membrana interna. La parte F₁ de la ATP sintasa incluye cinco subunidades: α, β, γ, δ y ε. La parte F₀ consta de 11 subunidades diferentes, de las cuales a y c₁₂ forman el canal central de protones y b₂ actúa como enlace entre los segmentos F₀ y F₁. Los protones fluyen a un residuo de aspartato de las

subunidades c_{12} , de modo que causan un giro en el anillo c_{12} de F_0 en la membrana, esto junto con las subunidades α , δ y ϵ fijadas en el lado de la matriz de F_1 , forman un rotor. Siguiendo la conformación del complejo enzimático, las subunidades asimétricas a y b , funcionan como estabilizador, que se colocan a través del rotor e impiden el movimiento del hexámero α_3, β_3 (Müller-Esterl, 2008). Por otra parte, este complejo también funciona como ATPasa específica, es decir, lleva a cabo la hidrólisis de ATP (Devlin, 2008).

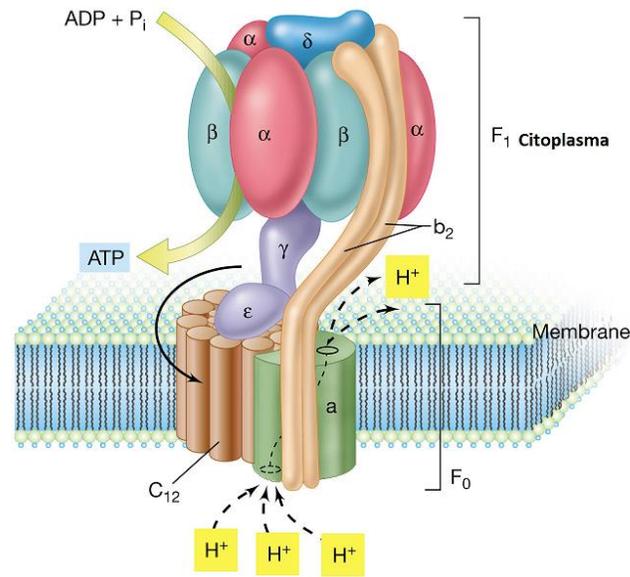


Figura 7. Enzima ATP sintasa de *Escherichia coli* (www.ugr.es).

El mecanismo de síntesis de ATP a partir de ADP + Pi se logra por medio de tres conformaciones:

1. Abierta: el ATP recién sintetizado puede ser liberado y se pueden enlazar ADP + Pi
2. Suelta: el ADP + Pi enlazados no pueden liberarse
3. Estrecha: el ATP está muy fuertemente enlazado, y se favorece la condensación de ADP + Pi.

Los tres momentos antes mencionados se explican en la Fig. 8:

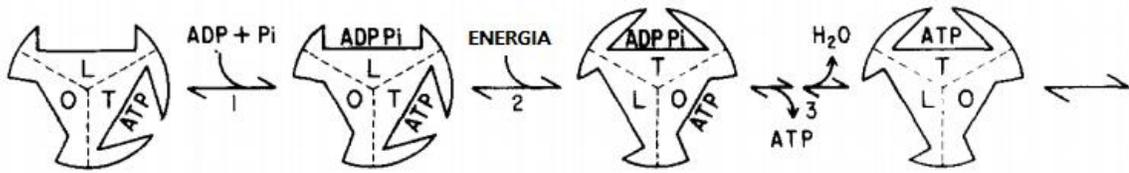


Figura 8. Mecanismo de síntesis de ATP. Por sus nombre en inglés O: abierto, (*open*) L: Suelta (*Loose*), T: Estrecha (*Tight*). (Boyer, 1993).

Metabolismo Anaerobio

La presencia de una atmósfera terrestre rica en O₂ ha permitido que los seres vivos hayan evolucionado desarrollando un metabolismo aeróbico, el cual se caracteriza por ser una forma muy eficiente de obtención de energía. En condiciones donde hay déficit de oxígeno el aumento de Adenosina difosfato (ADP), fosfato inorgánico (Pi) y NADH, favorecen la estimulación de la glucólisis, propiciando un aumento de la formación citosólica de NADH. Este incremento, en combinación con el NADH mitocondrial, provoca un desplazamiento del equilibrio de la lactato deshidrogenasa (LDH) hacia la formación de ácido láctico a partir de piruvato (López, 2008; Melo y Cuamatzi, 2007). Obtener lactato como producto en un metabolismo anaerobio es muy común y puede ser utilizado durante el ejercicio o la hipoxia ambiental (Schmitz y Harrison, 2004).

La mitocondria es un elemento crucial para la respuesta celular a la hipoxia, debido a su función central en la producción de energía, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), la homeostasis y muerte celular (Zhang y col., 2013). En las primeras etapas de hipoxia hay una elevación transitoria de ROS, y en la exposición crónica a la hipoxia severa hay evidencia de un estrés oxidativo; ésta respuesta fisiológica es considerada normal a un desequilibrio en el suministro de oxígeno, la existencia ROS durante la hipoxia es un tema muy controvertido, sin embargo, se han hecho observaciones en una distintos métodos en diferentes tejidos que apoyan la idea que en condiciones de hipoxia, los músculos pueden fallar por intentar mantener homeostasis redox normales, resultando una lesión celular (Clanton, 2007).

En el caso de los insectos bajo condiciones de hipoxia los espiráculos controlan el flujo de oxígeno a través de la pared del cuerpo y son la principal barrera para el transporte del mismo a

bajas tasas metabólicas. Los espiráculos se abren con mayor frecuencia, por una larga duración, o la apertura es más ancha al disminuir la concentración de oxígeno drásticamente. Caso contrario en un ambiente hiperóxico, las válvulas espiraculares están cerradas por períodos más largos. Por lo tanto, la hipoxia por lo general provoca un aumento temporal de la emisión de CO₂ y H₂O respiratoria, mientras que la hiperoxia provoca un comportamiento a la inversa. Estos efectos están mediados por los sensores y los centros integradores en el sistema nervioso central del insecto (Harrison y col., 2006).

Una explicación más detallada de lo que podría suceder en las células del insecto durante un estrés hipóxico es: (1) Aumenta la vía glucolítica anaerobia para mantener la producción de ATP y así compensar la falta de fosforilación oxidativa. Sin embargo, esta estrategia necesita altas tasas de glucólisis anaeróbica y como consecuencia da lugar a un rápido agotamiento de las reservas de carbohidratos y los productos finales, que son tóxicos, son acumulados. (2) Disminución en la demanda de ATP; es decir, reducir la tasa metabólica. (3) Emplear vías metabólicas alternativas para mejorar el rendimiento de ATP a partir de sustratos (Weyel y Wegener, 1996).

Se cree que los efectos perjudiciales de la hipoxia son mediados principalmente por la reducción de la tasa de síntesis de ATP. Esto da como resultado un fallo rápido de bombas de iones impulsadas por ATP, lo que permite el flujo sin dificultad de los iones en la célula causando una rápida despolarización de la membrana. Al no estar regulada la membrana con la cantidad de Ca²⁺ provoca una amplia gama de trastornos celulares incluyendo la estimulación espontánea de las fosfolipasas, proteasas y nucleasas (Van Voorhies, 2009).

Por otra parte, estudios previos muestran que la hipoxia extrema puede tener resultados perjudiciales sobre el crecimiento y la esperanza de vida de un organismo. En una investigación realizada en *Drosophila melanogaster*, además del aumento de la tasa de daño oxidativo y la reducción de la vida útil, las moscas expuestas presentaron supresión hipóxica dando como resultado la reducción de la síntesis de ATP. Es probable que la producción de ATP es limitada, con los efectos sobre procesos tales como la síntesis de proteínas, el intercambio y la reparación de las mismas. La elevación en el daño oxidativo observado en las moscas expuestas a la hipoxia extrema puede ser en parte debido al aumento de la producción de óxido nítrico. El óxido nítrico puede contribuir a la formación de superóxido mitocondrial, y se unen e inhiben a la enzima

Citocromo c oxidasa, lo que provoca la reducción de transportadores de electrones en sentido ascendente y favoreciendo la formación de superóxido adicional (Rascon y Harrison, 2010).

En insectos adultos la anoxia causa una rápida descomposición de las funciones fisiológicas y una pérdida casi total de ATP en el tejido, lo que resulta en un estado de inmovilidad completa. Muchos insectos, sin embargo, pueden sobrevivir a este estado durante varias horas y se recuperan rápidamente y de forma espontánea en caso de regresar a la normoxia. Un requisito previo esencial para la recuperación es la síntesis de ATP, es decir, la restauración del potencial de fosforilación porque ésta es la fuerza motriz para las funciones celulares. Durante el período de recuperación, la tasa de síntesis de ATP debe ser superior a la de la hidrólisis y esto sólo se puede lograr si se reactiva la fosforilación oxidativa (Weyel y Wegener, 1996).

Métodos Utilizados para Control de Plagas

Es importante conocer los métodos que han sido utilizados para mantener un control en las plagas que atacan a distintos granos. Como es conocido se han probado distintos insecticidas, compuestos por agentes químicos, para el control de insectos, un ejemplo de esto es el experimento realizado por Athanassiou y Kavallieratos (2014) en el cual pusieron a prueba dos insecticidas, spinotoram y spinosad, utilizados en granos de cebada, maíz, centeno y trigo, contra las plagas de *Prostephanus truncatus*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* y *Tribolium confusum*, concluyendo que a los 14 días de exposición todos los insectos habían muerto, excepto los que fueron tratados con spinosad.

Por otra parte, una idea prometedora ha sido utilizar aceites esenciales para evitar o retardar la infestación de los granos, Chand y Lal (2013) utilizando como objeto de estudio trigo y el insecto *R. dominica*, compararon la efectividad del aceite esencial de neem, ricino, karanj y eucalipto, donde el aceite de neem al 1% mantuvo al trigo libre del insecto por nueve meses y sin presentar ningún cambio en sus propiedades. Siguiendo la alternativa de utilizar métodos naturales para el control de plagas, en este caso también como objeto de estudio *R. dominica* Gandhi y Pillai (2011), probaron la efectividad de las hojas de granada (*Punica granatum*) y árbol del curry (*Murraya koenigii*), presentando ambas una efectividad aceptable, sin embargo, el tiempo que mantenían libre del insecto al trigo y arroz fue por un período menor al compararlo con los aceites esenciales antes mencionados.

Atmósferas Modificadas

El término atmósfera controlada se refiere al proceso cuando la concentración de gases es mantenida a niveles fijos durante el almacenamiento. Generalmente, los gases que se controlan con este fin son el nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y vapor de agua. El término de atmósfera modificada es indicativo de un proceso en el cual el ambiente alrededor del producto se modifica inicialmente, pero luego no es controlado a un nivel determinado de concentración de gases, pudiendo modificarse paulatinamente debido a la evolución de los gases metabólicos del producto o debido a la transferencia de masa a través del empaque o barreras del ambiente (Barreiro y Sandoval, 2006).

El uso de atmósferas controladas requiere el equipo especial para generar o suministrar los gases reguladores y controlarlos en los niveles requeridos. Esta técnica se ha utilizado para eliminar a una amplia gama de plagas de manera eficaz, como lo son los miembros de las familias *Tephritidae*, *Tortricidae*, *Curculionidae*, *Miridae* y *Liposcelididae* (Boyer y col., 2012). Generalmente, la combinación de O₂ a concentración baja y CO₂ a concentración elevada conduce a una mayor mortalidad (Wang y col., 2000). Sin embargo, si la atmósfera es muy baja en oxígeno, por ejemplo, menor del 2%, pueden llevarse a cabo reacciones metabólicas por vía anaerobia, lo cual resulta en cambios organolépticos indeseables en el producto, por la acumulación de metabolitos como alcoholes y aldehídos. El dióxido de carbono es un factor importante en la eficacia de los tratamientos con atmósferas modificadas para la mortalidad de la plaga. Respecto al trigo, los niveles elevados de CO₂ tienden a disminuir la tasa de respiración, igualmente se pueden producir desordenes fisiológicos, los cuales se manifiestan en reacciones de oscurecimiento y otros trastornos de origen bioquímico (Barreiro y Sandoval, 2006).

Desde hace más de 25 años distintos autores han probado la efectividad de las atmósferas controladas para el control de plagas, utilizando como objeto de estudio una diversa gama de insectos por ejemplo *Sitophilus granarius*, *R. dominica* y *Tribolium castaneum* en granos como trigo, arroz y nuez. Cada autor ha utilizado concentraciones de gases distintas, sin embargo, siempre se emplea la mezcla de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno; manteniendo bajas concentraciones de oxígeno, con un máximo del 4% del gas, como se muestra en la Tabla 2.

Al realizar un análisis de la Tabla 2, en la mayoría de los insectos con un día de exposición < al 1% de la concentración de oxígeno es suficiente para aniquilar al 95% de la población

estudiada, siendo proporcional este tiempo con la concentración de oxígeno manejada, ya que es necesario un máximo de 28 días para alcanzar el mismo porcentaje de mortalidad a una concentración del 4% de oxígeno. Cabe mencionar que estos autores no dan seguimiento a las respuestas de los insectos a nivel bioquímico, ya que el único interés es observar si existe un aumento en la mortalidad de la población inicial y conocer en que intervalo de tiempo.

Azab y col. (2013) reportaron que los efectos sobre el metabolismo de los insectos son variables, dependiendo del porcentaje de O₂ presente en la atmósfera modificada. En porcentajes de O₂ inferior al 3%, los diferentes estadios de *T. castaneum* disminuyen la producción de CO₂, lo que indica el cierre de vías oxidativas. El metabolismo anaeróbico, siendo mucho menos eficiente, exige un consumo elevado de reservas con el fin de obtener la misma cantidad de energía disponible (ATP) (Hochachka, 1986). Con el paso del tiempo, la producción de ATP se hace insuficiente para garantizar el funcionamiento de las bombas de membrana iónica, con una despolarización resultante y la consiguiente degeneración de los tejidos (Hochachka, 1991). Para combatir esta situación, insectos que se definen como "conformadores" disminuyen su metabolismo casi hasta detenerse por completo, lo que limita sus necesidades energéticas. Al mismo tiempo, el metabolismo anaeróbico, ya que no realiza la oxidación completa de metabolitos, conduce a la acumulación de productos tóxicos (Mitcham y col., 2006). Por lo tanto, la combinación hipometabolismo con la acumulación de productos finales tóxicos, es una causa de estrés para el insecto, mismo que eventualmente conduce a su muerte. En los niveles por debajo del 5% de O₂, los insectos aumentan su frecuencia respiratoria para mantener su metabolismo en niveles normales. Este aumento de la ventilación podría dar lugar a una posible pérdida de agua, ya que los insectos mantienen sus espiráculos abiertos durante un tiempo prolongado lo que los hace más susceptibles a la deshidratación (Azab y col., 2013).

Tabla 2. Uso de atmósferas modificadas para el control de plagas con diferentes concentraciones de gases.

Insecto	Sustrato	Atmósfera utilizada	Días de exposición	Mortalidad (%)
<i>Sitophilus oryzae</i>		0.1-0.25 (O ₂)	2	
<i>Sitophilus granarius</i>		9 (CO ₂)	3	
<i>R. dominica</i>	Trigo		2	95 ^a
<i>Tribolium castaneum</i>			1	
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>			<1	
<i>R. dominica</i>	Trigo	1 (O ₂) 9 (CO ₂)	2	100 ^b
<i>Cydia pomonella</i>	Nuez	0.5 (O ₂) 10 (CO ₂)	1-3	98 ^c
<i>O. surinamensis</i>	Arroz	3.0-4.0 (O ₂)		75.0 ^d
<i>Sitophilus granarius</i>	Trigo	8.5-9.5 (CO ₂)		56.0 ^d
<i>Sitophilus oryzae</i>	Arroz		28	99.6 ^d
<i>Tribolium castaneum</i>	Harina de trigo			99.5 ^d
Brúquidos	Caupí	2 (O ₂) 18 (CO ₂)	4	100 ^e
<i>Sitophilus zeamais</i>		0.5-2 (O ₂)		
<i>Sitophilus oryzae</i>	Arroz	90-95 (CO ₂)	6-10	100 ^f
<i>R. dominica</i>	Trigo	2 (O ₂) 10 (CO ₂)	6	100 ^g

^a Storey y col., 1975. ^b Storey y col., 1980. ^c Soderstrom y col., 1996. ^d Conyers y Bell., 2007. ^e Cheng y col., 2012 ^f Carvalho y col., 2012 ^g Calderon y Navarro, 2012.

METODOLOGÍA

Cultivo de *Rhyzopertha dominica*

En un frasco de vidrio, con tapa horadada cubierta con una malla, se agregaron dos kilogramos de trigo cristalino (*Triticum aestivum*) variedad cirno y se infestó con 300 insectos adultos de *R. dominica*, donados por el Laboratorio de Entomología de la Universidad de Sonora. El cultivo se incubó a 34°C con 70% de humedad relativa por un mes. Transcurrido este tiempo se extrajeron los adultos de *R. dominica*.

Exposición a Atmósferas Modificadas

En bolsas de polietileno MSD - DR006 Grainpro, Inc., con dimensiones de 22 x 28 cm, se agregaron 200 g de trigo cristalino con 150 adultos de *R. dominica* extraídos del cultivo madre. Se realizó la mezcla de gases, en Thermo Gas Mixers, (Instrument Corporation la Porte, Indiana, USA), por triplicado obteniendo una atmósfera con las características que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones atmosféricas experimentales a las que fueron expuestos los insectos.

	% N ₂	% CO ₂	% O ₂
Atmósfera modificada (Hipoxia)	85.0	10.0	5.0
Control (Normoxia)	80.0	0.1	19.0

Se mantuvieron las condiciones por 12 y 24 h, con una variación en la concentración de cada gas de $\pm 1.0\%$, a una temperatura de incubación de 29°C y 65% de humedad relativa. Los insectos fueron muestreados a los 12 y 24 h.

Aislamiento de Mitocondrias de *Rhyzopertha dominica*

Los insectos de ambos tratamientos en los distintos tiempos se lavaron para eliminar partículas de trigo. Los insectos fueron pasados por 20 mL agua jabonosa, con una proporción de 10:1, hipoclorito de sodio al 2% y agua destilada, posterior a esto se dejaron secar para ser recolectados en un tubo con tapa. Para el aislamiento de mitocondrias se siguió la metodología

de Heddi y col. (1992) con ciertas modificaciones que a continuación se describen. Ciento cincuenta insectos fueron macerados en 500 μ L de buffer A (Sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, Pipes 4 mM, EDTA 1 mM, pH 6.8) en frío. Posteriormente, se agregaron 4.5 mL de Buffer A y se centrifugó el macerado a 1,375 x g por 10 min, donde se recuperó el sobrenadante y se recolectaron 100 μ L del mismo para evaluar la concentración de lactato. El sobrenadante se centrifugó a 11,000 x g por 15 min, se recuperó el precipitado y se lavó dos veces con 100 μ L del buffer B (Sacarosa 290 mM, KCl 20 mM, MgCl 1 mM, Pipes 4 mM, pH 6.8). Se ajustó el volumen a 1 mL de Buffer B, y se centrifugó a 825 x g por 5 min para recuperar el sobrenadante, el cual se ajustó a 1 mL con el mismo buffer. Por último se centrifugó a 11,000 x g por 15 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 μ L de buffer B. El procedimiento se realizó a 4°C.

Cuantificación de Lactato

Se cuantificó lactato utilizando el kit L-Lactate (Randox, UK) ajustando las instrucciones del fabricante para la evaluación en microplaca. Para ello se utilizaron 20 μ L de muestra en 180 μ L del reactivo del kit. Posteriormente, obtuvo la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 550 nm utilizando un lector de microplaca xMARK (Bio-rad, U.S.A.)

Solubilización de Mitocondrias

Previo a la solubilización de las mitocondrias, se midió la concentración de proteína mitocondrial en un espectrofotómetro NanoDrop-8000 (Thermo Scientific, U.S.A.) a una longitud de onda 280 nm. Posteriormente, se agregaron 100 μ g de proteína mitocondrial, 8.0 μ L de digitonina al 5% y buffer muestra (Ácido aminocaproico 750 mM, Imidazol 25 mM, pH 7) para llegar a un volumen final de 60 μ L. Esta mezcla se agitó mecánicamente a velocidad media por 1 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó por 40 min a 11,000 x g y se tomó el sobrenadante. Una vez concluido este proceso se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente.

Electroforesis Nativa en Geles de Poliacrilamida en Gradiente

La evaluación cualitativa de la actividad de Citocromo c oxidasa y ATPasa fue realizada en geles en gradiente de poliacrilamida del 4 – 12% con 1.0 mm de espesor. Las condiciones para la preparación de los geles se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación del gel de poliacrilamida en gradiente para la evaluación de la actividad enzimática.

Componente	12% (mL)	4% (mL)	Concentrador 4% (mL)
30.0% Acrilamida/ 1.0% Brisacrilamida	1.40	0.469	0.405
Buffer 3x*	1.17	1.17	1.0
Glicerol 80%	0.910	0.25	–
Agua	-	1.59	1.595
Digitonina (0.025%)	0.0175	0.0175	0.015
TEMED	0.006	0.006	0.006
PSA 10%	0.018	0.018	0.018

*Buffer 3X (Ácido amino-caproico 1.5 mM, Bis-tris 150 mM, Imidazol 75 mM, pH 7.0).

Cada muestra, cargadas por triplicado en el gel, se corrió a 40 mA en una cámara de electroforesis a 4°C por un tiempo aproximado de 40 min, los buffers utilizados fueron: cátodo (Tricina 50 mM, Imidazol 7.5 mM, N-dodecil- β .maltosido 0.01% y desoxicolato de sodio 0.05%) y para ánodo (Imidazol 25 mM, pH 7.0).

Evaluación de la Actividad Enzimática de *Rhizopertha dominica*

Evaluación Cualitativa de la Actividad Enzimática de Citocromo C Oxidasa

Una vez realizada la electroforesis se evaluó la actividad de la Citocromo c oxidasa, siguiendo la metodología descrita por Jimenez-Gutierrez y col. (2014), la cual consiste en identificar la actividad de la enzima por medio de la tinción de bandas en el gel debido a la oxidación de la diaminobencidina. El gel de poliacrilamida se incubó por 60 min en agitación mecánica constante en el buffer de actividad (20 mg de diaminobencidina en 10 mL de fosfato de sodio a pH 7.0 y 10 mg de Citocromo c, en un volumen final de 50 mL) a temperatura ambiente.

Evaluación Cualitativa de la Actividad Enzimática de ATP Sintasa

Una vez terminada la electroforesis se evaluó la actividad ATPasa siguiendo la metodología de Wittig y col. (2007). Para ello el gel se incubó con agitación, a temperatura ambiente y durante 1 h en un buffer de incubación (Glicina 270 mM, Tris 35 mM, pH 8.4). Transcurrido este tiempo se retiró el buffer, se agregaron 39 mL de buffer de actividad frío (Glicina 540 mM, Tris 70 mM, pH 8.4; MgSO₄ 500 mM, ATP 2 mM) y directamente se agregó por goteo 800 µL de nitrato de plomo al 10%, sin depositarlo directamente sobre el gel, dejándose en agitación baja por 24 h. La presencia de bandas blancas, de fosfato de plomo, muestran las fracciones del complejo enzimático ATP sintasa donde realizaron la hidrólisis del ATP.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico para los datos obtenidos de la concentración de lactato en las muestras, utilizando pruebas paramétricas de una vía y prueba de comparación múltiple de Tukey en el programa NCSS 2007, considerando un intervalo de confianza de 95% ($p=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Monitoreo de Atmósferas Modificadas

Para este ensayo se utilizaron bolsas GrainPro™ compuestas por tres capas, dos de polietileno y una barrera antigases intermedia, las cuales evitan el intercambio de gases. Varios autores han utilizado bolsas GrainPro™ para almacenamiento de diferentes tipos de granos puros o infestados, por ejemplo con: *Prostephanus truncatus*, *Rhyzopertha dominica* y *Callosobruchus maculatus*, concluyendo que se mantiene un aislamiento respecto al medio ambiente durante prolongados períodos de tiempo, ya sea semanas o meses (Baoua y col., 2013; Meira y col., 2013; García-Lara y col., 2013).

La concentración de los gases fue monitoreada al inicio y al final de cada experimento, esto con el fin de identificar una posible variación. La variación en la concentración de gases durante el experimento fue medida utilizando un analizador (CO₂ Analyzer G110-00N. Viosensor, USA), y se muestra en la Tabla 5, donde la variación se considera mínima. Estos cambios pueden ser causados por el intercambio de gases entre los insectos y el grano.

Tabla 5. Valores de variación en la concentración de gases durante el bioensayo.

Gas	Normoxia	Hipoxia 12 h	Hipoxia 24 h
% O ₂	16.8 ± 0.3	4.5 ± 0.1	3.9 ± 0.5
% CO ₂	2.6 ± 0.4	11.4 ± 0.3	12.2 ± 0.3
% N ₂	80.6 ± 0.1	84.3 ± 0.2	83.9 ± 0.7

Cuantificación de Lactato

La sobrevivencia de los organismos en hipoxia e incluso en anoxia se garantiza gracias al cambio del metabolismo aeróbico a anaeróbico con la consecuente inhibición de la producción de ATP (Galli y Richards, 2014). Diversos estudios en insectos, bajo estas condiciones, demuestran que los organismos recurren al metabolismo anaerobio utilizando distintos metabolitos como es el

caso de la larva del mosquito *Chaoborus crystallinus* que es capaz de convertir malato a succinato (Englisch y col., 1982), el díptero *Callitroga macellaria* que convierte el glucógeno y aminoácidos en lactato, alanina y polioles y la larva del escarabajo tigre que produce lactato y alanina (Hoback y col., 2000). En el caso de insectos adultos como abejas, moscas y escarabajos se ha reportado la acumulación de lactato, alanina, glicerol, glicerol 3-fosfato y succinato (Callier y col., 2015).

Así, la acumulación de lactato hace referencia a subproductos de metabolismo anaeróbico en los insectos terrestres (Feala y col., 2007). La producción de lactato se deriva de los hidratos de carbono que se convierten en ácido láctico en proporción a la duración de anaerobiosis (Hoback y Stanley, 2001), por lo que este metabolito confirma que los organismos estuvieron bajo estrés hipóxico. En el caso de los organismos bajo hipoxia, la concentración de lactato presentó un incremento significativo de hasta el 75% a las 24 h con respecto a los organismos en normoxia (Fig. 9).

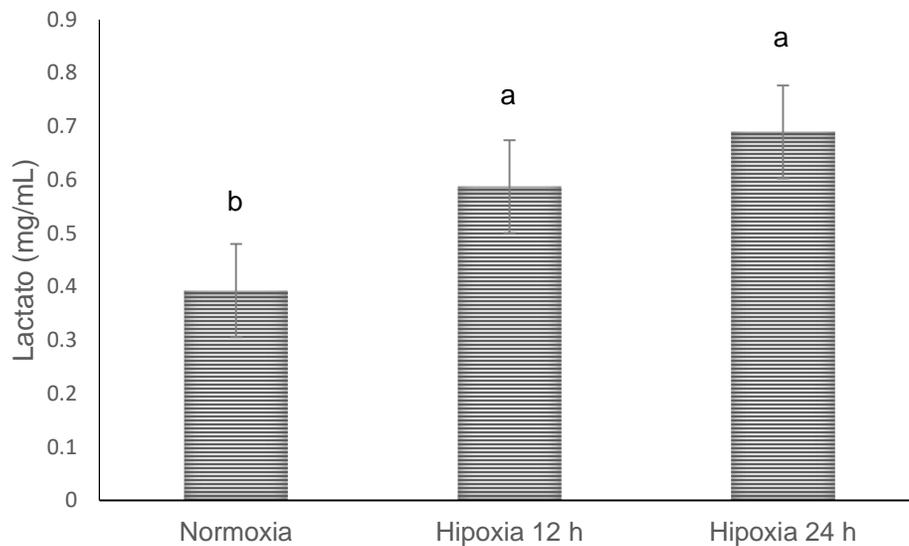


Figura 9. Cuantificación de lactato de *Rhyzopertha dominica* sometidos a hipoxia.

Se ha reportado que algunos los insectos, pueden recuperarse de horas o días de anoxia completa con poco daño. Sin embargo, los mecanismos responsables de esta tolerancia son poco conocidos (Harrison y col., 2006). Adler y col. (1994) reportaron que en el gorgojo del trigo *Sitophilus granarius* en condiciones anóxicas se incrementó la concentración de lactato. Un

estudio realizado por Kölsch y col. (2002), en el cual sometieron a un estado de anoxia al insecto *Agelastica alni*, muestra que a las 10 h de exposición el nivel de lactato fue significativamente superior. Así mismo, un estudio realizado por Vigne y col. (2009) en el cual evaluaron la producción de lactato en *Drosophila spp.* resistente y sensible a un ambiente de anoxia, demostraron que hubo una elevación en la concentración de lactato en moscas tolerantes a la anoxia con respecto a las moscas sensibles, sugiriendo así que las moscas sensibles son menos eficientes para obtener energía de la glucólisis anaerobia. Aunado a esto, en larvas de *Drosophila* expuestas a hipoxia severa se detectó actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, lo que sugiere que se produjo lactato para alimentar así la producción de ATP anaeróbico (Klok y col., 2010).

Algunos autores proponen que la disponibilidad de oxígeno es de gran importancia en la regulación de la producción de lactato, aunque no es el único determinante. En insectos se ha observado que la producción de este metabolito está determinado también por la cinética de glucólisis, la actividad de la lactato deshidrogenasa y la respiración mitocondrial (López, 2008).

Cuantificación de Proteínas Mitocondriales

Durante la hipoxia se ha reportado en varios invertebrados la capacidad de reducir y cambiar su metabolismo a un nuevo estado hipometabólico y con ello disminuir las demandas de ATP, sobretodo durante el proceso de transcripción del ADN y la traducción del ARNm (Storey y Storey, 1990). Así, se ha reportado que en *Artemia franciscana* la síntesis de proteínas mitocondriales y citoplasmáticas disminuye hasta un 90% en respuesta a la anoxia (Kwast y Hand, 1996a, b). Se atribuye que la supresión coordinada de la síntesis de las proteínas es controlada por la combinación de factores como la concentración de oxígeno y la disminución del pH intracelular (Kwast y Hand, 1993, 1996a). Bailey y Driedzic, (1996) también reportaron una reducción de la síntesis de proteínas en la fracción mitocondrial de corazón de tortugas anóxicas, sin embargo, no se detectó ningún cambio en la capacidad respiratoria mitocondrial. Estos estudios previos revelan varias respuestas con respecto al impacto de la baja concentración de oxígeno en el metabolismo.

En esta investigación, una vez aisladas las mitocondrias de los insectos bajo los distintos tratamientos, se cuantificó la concentración proteica y los resultados se muestran en la Tabla 6. En esta tabla se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de proteína en los

organismos bajo el efecto de las atmósferas modificadas (a las 12 y 14 h) comparada con la concentración de proteína en los insectos expuestos a normoxia. Estos resultados difieren con lo antes reportado para organismos sometidos a una baja concentración de oxígeno y ésta respuesta podría estar relacionada con la aclimatación del insecto a este estresor. También se recomienda realizar otra evaluación de la concentración de proteína por métodos colorimétricos como Bradford o BCA con la finalidad de confirmar los resultados.

Tabla 6. Cuantificación de proteína de mitocondrias aisladas de *Rhyzopertha dominica* expuesta a condiciones de hipoxia.

	Normoxia	Hipoxia 12 h	Hipoxia 24 h
Proteína (mg/mL)	3.9 ± 0.2 ^b	5.0 ± 0.3 ^a	5.4 ± 0.3 ^a

Evaluación de la Actividad Enzimática de Citocromo C Oxidasa

Las mitocondrias son cruciales en los organismos aeróbicos para la respuesta frente a la hipoxia. Sin embargo, los mecanismos mitocondriales para la adaptación a la hipoxia siguen siendo, en gran parte, desconocidos. Se ha reportado que las subunidades de la Citocromo c oxidasa codificadas por el genoma mitocondrial (COX I y COX II) y de las subunidades codificadas por el genoma nuclear (COX IV y COX Vb) pueden coordinar su expresión para reprimir la actividad de la enzima en respuesta a la hipoxia a corto plazo. Dada la importancia funcional, cambios adaptativos en la actividad de la Citocromo c oxidasa pueden mejorar la fosforilación oxidativa para el suministro de ATP durante la hipoxia, tales como, variaciones en la secuencia de subunidades de Citocromo c oxidasa (Zhang y col., 2013). También se han reportado cambios conformacionales en la Citocromo c oxidasa, específicamente en las crestas mitocondriales, debido al daño oxidativo induciendo, además, apoptosis (Harrison y col., 2006).

La actividad enzimática de la Citocromo c oxidasa a los distintos tiempos y condiciones se muestra en la Fig. 10, donde se observa una banda abundante correspondiente a las 12 h de hipoxia (Fig. 10C) y una banda tenue después de las 24 h de exposición (Fig. 10D), comparado con la evaluación en normoxia (Fig. 10B). Estos resultados indican que las primeras 12 h

Citocromo c oxidasa de *R. dominica* muestra un aumento en la actividad enzimática durante la hipoxia, por otro lado, a las 24 h la actividad de la enzima se ve disminuida. Estudios en crustáceos sugieren que el aumento en la actividad de la enzima indica un intento por compensar y restaurar las funciones mitocondriales (Jimenez-Gutierrez y col., 2014). Se ha reportado, en insectos como la langosta migratoria (*Locusta migratoria*) bajo el efecto de la hipoxia, que el incremento de la actividad de Citocromo c oxidasa no es causada por el contenido de proteína, sino por elevada eficiencia catalítica que resulta de la mayor afinidad de ferrocitocromo C de la enzima y por consiguiente el aumento de la tasa de transporte de electrones a través de los centros redox catalíticos, revelando así un nuevo mecanismo que confiere robustez mitocondrial contra la hipoxia, mediante la modulación de la actividad de Citocromo c oxidasa, lo que representa una adaptación a la baja concentración de oxígeno (Zhang y col., 2013). Ampliando esta información McMullen y Storey (2007) reportaron que durante la hipoxia prolongada se reduce la expresión de la enzima en insectos, confirmando la sensibilidad a los cambios en los niveles de oxígeno y por consiguiente una disminución en la síntesis proteica.

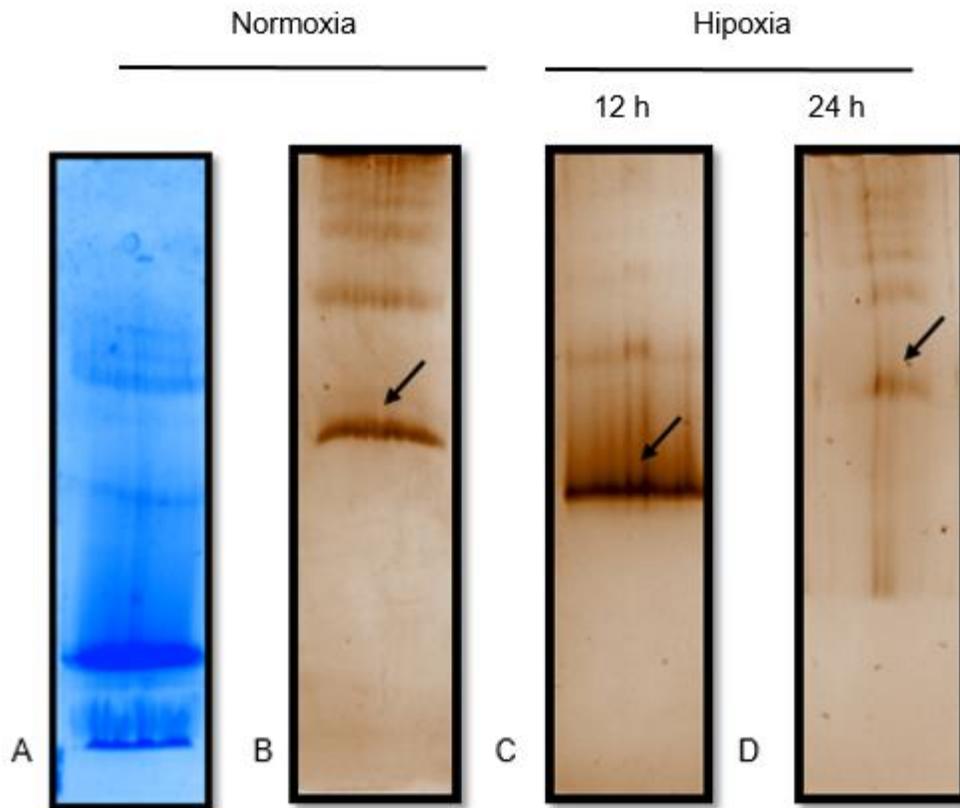


Figura 10. Actividad cualitativa de Citocromo c oxidasa. A, proteínas mitocondriales teñidas con Azul de Commassie. B, Actividad enzimática de Citocromo c oxidasa de *R. dominica* en normoxia. C, Actividad enzimática de Citocromo de oxidasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 12 h. D, Actividad enzimática de Citocromo c oxidasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 24 h.

Evaluación de la Actividad Enzimática de ATPasa

Las mitocondrias son cruciales en las respuestas celulares durante la hipoxia, debido a que están implicadas directamente en la producción de energía, en la generación de ROS, homeostasis y muerte celular. Durante la exposición a la hipoxia la fosforilación oxidativa, para la generación de ATP, es suprimida, las actividades de los complejos respiratorios se ven reducidos y por consiguiente las ROS incrementan y causan daño oxidativo celular (Zhang y col., 2013).

El oxígeno es críticamente importante para la generación de ATP catabólico, ya que este funge como aceptor final de electrones, que ayudará en el ciclo para la síntesis de energía, pero

también es una fuente peligrosa de ROS. Los insectos expuestos a ambientes hipóxicos responden a corto plazo con cambios compensatorios en la apertura espiracular y ventilación, que reduce la variación de oxígeno dentro de su organismo (Harrison, 2006). Durante la anoxia, la ATP sintasa gira de manera inversa e hidroliza el ATP, en lugar de sintetizarlo, a medida que bombea activamente protones de la matriz hacia el espacio intermembranal, en un intento de mantener el potencial de membrana mitocondrial. Así, durante este tiempo la célula anóxica limita el uso de ATP y evita que se sintetice (Boutilier, 2001).

En este trabajo, se observó la actividad ATPasa en insectos expuestos a 12 y 24 h de hipoxia, con bandas tenues blancas, las cuales no presentan diferencias aparentes entre ambos tiempos (Fig. 11C y D). Por otra parte, la actividad identificada en insectos expuestos a condiciones de normoxia se observa una banda más intensa (Fig. 11B). En un rango entre 3 y 5% de O₂ (que se define como el "punto de concentración crítica"), no existe suficiente O₂ para producir el ATP necesario para mantener un nivel metabólico normal, por lo que los insectos tienden a reducir su nivel metabólico para disminuir la demanda de energía (Mitcham y col., 2006). Por lo tanto, a concentraciones de O₂ entre el punto de compensación anaeróbica y el punto de concentración crítica, la respiración oxidativa, aunque reducida, es suficiente para satisfacer la demanda de energía, que también se reduce (Chiappini y col., 2009).

Di Lisa y col. (1995) reportaron que en organismos expuestos a hipoxia, la producción de energía es suprimida dentro de la mitocondria debido a la reducción en la fosforilación oxidativa y con ello se reprime la síntesis de ATP. Además, bajo este mismo estímulo el ATP proveniente de la glucólisis es utilizado por la ATP sintasa, la cual lo hidroliza con la finalidad de mantener el potencial intermembranal. Es decir, que la ATP sintasa puede hidrolizar el ATP presente en la matriz mitocondrial, cuando el intercambio de ATP entre los compartimentos intracelulares se agota.

Cheng y col. (2013) reportaron que el escarabajo *Callosobruchus maculatus* puede activar la vía glucolítica más rápido una vez que detecta la falta de O₂ en presencia de CO₂. Además, el CO₂ puede contrarrestar la inhibición metabólica causada por la hipoxia. Debido a su baja eficacia en la producción de ATP, el metabolismo anaeróbico no puede mantener la actividad metabólica. A medida que la condición hipóxica continúa, el desequilibrio entre la producción y la demanda de ATP se hace más grave, ya que se llega a un agotamiento de energía (Cheng y col., 2013). Lo anterior podría explicar porque se observan bandas más tenues en insectos expuestos a

hipoxia, debido a que el tiempo de exposición fue suficiente para disminuir las reservas energéticas.

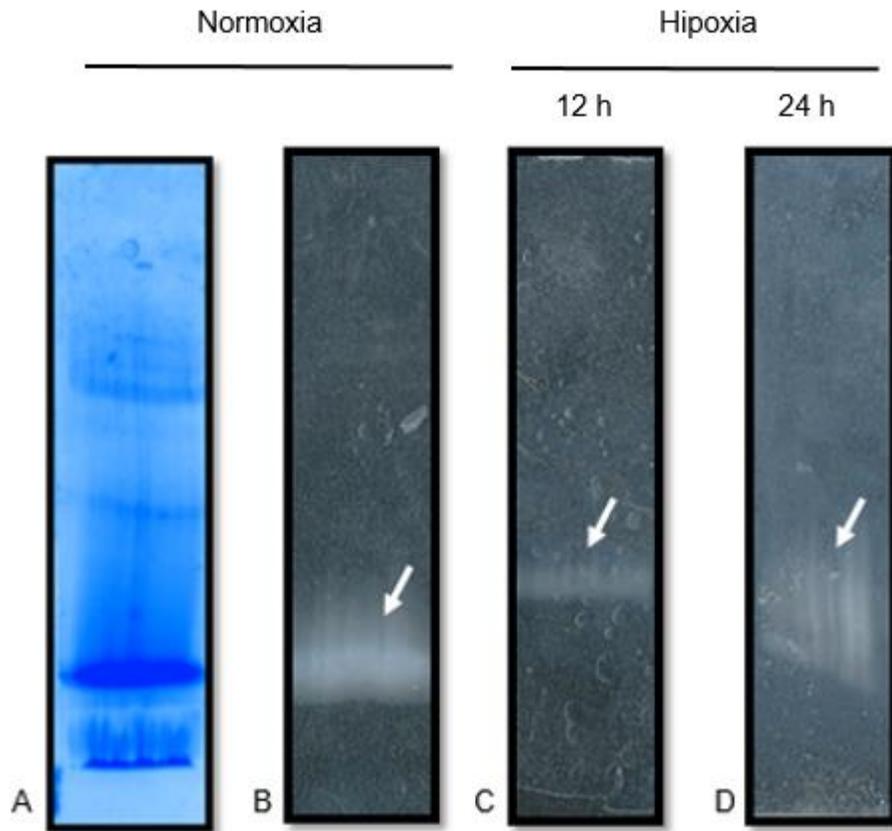


Figura 11. Actividad cualitativa ATPasa. A, proteínas mitocondriales teñidas con Azul de Comassie. B, Actividad enzimática ATPasa de *R. dominica* en normoxia. C, Actividad enzimática ATPasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 12 h. D, Actividad enzimática ATPasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 24 h.

CONCLUSIONES

Se realizó un bioensayo con *R. dominica* expuestos a atmósferas modificadas, posteriormente, se evaluó la concentración de lactato en los distintos tratamientos, donde se detectó un aumento significativo de concentración en insectos expuestos a hipoxia con respecto a los organismos en normoxia. Lo anterior indica un adecuamiento de los insectos a las condiciones hipóxicas, al cambiar su metabolismo de aerobio a anaerobio.

La actividad enzimática de Citocromo c oxidasa en *R. dominica* se incrementó en las primeras 12 h de hipoxia, a manera de compensar la demanda de energía, mientras que a las 24 h se observó una disminución de la actividad, sugiriendo una aclimatación a las condiciones. Finalmente, se evaluó la actividad ATPasa en *R. dominica* expuestas a 12 y 24 h de hipoxia, sin detectar diferencias concluyentes entre ambos tratamientos, sin embargo, se observa un decremento en la actividad durante la hipoxia con respecto a los insectos expuestos a normoxia, lo que podría revelar que el tiempo de exposición fue suficiente para agotar las reservas energéticas.

Los resultados obtenidos en esta investigación podrían evidenciar que *R. dominica* activa el metabolismo anaerobio e incrementa la cantidad de lactato para satisfacer la demanda de energía y el ATP generado es hidrolizado para mantener el potencial de membrana. Así, a medida que se extiende el tiempo de la hipoxia se crea un desbalance en la producción y demanda de ATP, hasta llegar a un agotamiento de energía.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere utilizar un marcador de peso molecular o mitocondrias de corazón de bovino cuando se realicen las electroforesis nativas para dar una idea del patrón de bandeo.
- Asimismo, se recomienda realizar la evaluación de la concentración de proteína por métodos colorimétricos como Bradford o BCA con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos.
- Debido a los resultados obtenidos se recomienda evaluar la actividad enzimática de la Citocromo c oxidasa y ATP sintasa de *R. dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas empleando técnicas cuantitativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adler CS, Highley E, Wright EJ, Banks HJ, Champ BR. 1994. Carbon dioxide-more rapidly impairing the glycolytic energy production than nitrogen? Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored Products Protection, Canberra, Australia, 1: 7-10.

Armstrong FN, Bennett TP. 1982. Bioquímica. Ed. Reverté. España. 227p.

Athanassiou CG, Kavallieratos NG. 2014. Evaluation of spinetoram and spinosad for control of *Prostephanus truncates*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* and *Tribolium confusum* on stored grains under laboratory tests. J. Pest. 87: 469-683.

Avilés PR, Sotomayor SE, Guibert SG, Martínez SY. 2008. Ciclo biológico de *Rhyzopertha dominica* (f.) en semillas de arroz sometidas a cuatro temperaturas. FITOSANIDAD, 4: 221-225.

Azab M, Daewish A, Mohamed R, Sanad, M. 2013. Comparative efficacy of controlled atmospheres against two stored product insects. J Crop Ptro 2: 343-353.

Barreiro JA, Sandoval AJ. 2006. Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Equinoccio. Venezuela. 100-102.

Bailey J, Driedzic W. 1996. Decreased total ventricular and mitochondrial protein synthesis during extended anoxia in turtle heart. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 271: R1660-R1667.

Baoua IB, Amadou L, Lowenberg-DeBoer JD, Murdock LL. 2013. Side by side comparison of GrainPro and PICS bags for postharvest preservation of cowpea grain in Niger. J Stored Prod Res 54: 13-16.

Boutilier RG. 2001. Mechanism of cell survival in hypoxia and hypothermia. J Exp Biol 204: 3171-3181.

Bouvier JC, Bues R, Boivin T, Boudinhon L, Beslay D, Sauphanor B. 2001. Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of gen involved. *Heredity* 87: 456-462.

Boyer S, Zhang H, Lempérière G. 2012. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bull Entomol Res* 102: 213-229.

Boyer PD. 1993. Review: the binding change mechanism for ATP synthase – Some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1140: 215-250.

Callier V, Hand SC, Campbell JB, Biddulph T, Harrison JF. 2015. Developmental changes in hypoxic exposure and responses to anoxia in *Drosophila melanogaster* *J Exp Biol* 218: 2927-2934.

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. *J Stored Prod Res* 50: 49-56.

Chand KK, Lal NB. 2013. Effect of plant oils on the infestation of *Rhyzopertha dominica* (Fab.) in wheat, *Triticum aestivum* linn. *J Plant Prot Res* 53: 301-304.

Cheng W, Lei J, Ahn Ji-Eun, Wang Y, Lei C, Zhu-Salzman K. 2013. CO₂ enhances effects of hypoxia on mortality, development, and gene expressions in cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus*. *J Insect Physiol* 59: 1160-1168.

Cheng W, Lei J, Ahn JE, Liu TX, Zhu-Salzman K. 2012. Effects of decreased O₂ and elevated CO₂ on survival, development, and gene expression in cowpea bruchids. *J Insect Physiol* 58: 792-800.

Chiappini E, Molinari P, Cravedi P. 2009. Mortality of *Tribolium confusum* J. du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) in controlled atmosphere at different oxygen percentages. *J Stored Prod Res* 45: 10-13.

Ching'oma GP. 2006. Spatial distribution and movement of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. Manhattan (KS): Kansas State University Press. 1p.

Christensen CM, Kaufmann HH. 1969. Grain storage: the role of the fungi in quality loss. Minneapolis (MN): University of Minnesota Press. 164p.

Clanton, TL. 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 2379-2388.

Collins PJ, Lorini I, Bacaltchuk B, Beckel H, Deckers D, Sundfeld E, dos Santos JP, Biagi JD, Celaro JC, Faroni LRD'A, Bortolini L de OF, Sartori MR, Elias MC, Guedes RNC, da Fonseca RG, Scussel VM. 2006. Resistance to chemical treatments in insect pests of stored grain and its management. Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection. 277-282.

Conyers ST, Bell CH. 2007. A novel use for modified atmospheres: Storage insect population control. *J Stored Prod Res* 43: 367-374.

Devlin TM. 2008. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. 4ta ed. Ed. Reverté. New Jersey, 575-579p.

Di Lisa F, Blank P, Colonna R, Gambassi G, Silverman H, Stern M, Hansford R. 1995. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol* 486: 1-13.

Edde PA, 2012. A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. *J Stored Prod Res* 48: 1-18.

Englich H, Opalka B, Zebe E. 1982. The anaerobic metabolism of the larvae of the midge *Chaoborus crystallinus*. *Insect Biochem* 12: 149-155.

Feala JD, Coquin L, McCulloch AD, Paternostro G. 2007. Flexibility in energy metabolism supports hypoxia tolerance in *Drosophila* flight muscle: metabolomics and computational systems analysis. *Mol Syst Biol* 3: 99-102

- Galli GLJ, Richards JG. 2014. Mitochondria from anoxia-tolerant animals reveal common strategies to survive without oxygen. *J Comp Physiol* 184: 285-302.
- Gandhi N, Pillai S. 2011. Control of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) by pulverized leaves of *Punica granatum* (Lythraceae) and *Murray koenigii* (Rutaceae). *Int J Agric Biol* 13: 535-540.
- García GC, Bautista MN, González MMB. 2009. Tecnologías de granos y semillas; principales plagas en granos almacenados. AUIM, CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, COLPOS. México. 85p.
- García-Lara S, Ortiz-Islas S, Villers P. 2013. Portable hermetic storage bag resistant to *Prostephanus truncatus*, *Rhyzopertha dominica*, and *Callosobruchus maculatus*. *J Stored Prod Res* 54: 23-25.
- Guedes RNC, Zhu KY. 1998. Characterization of malathion resistance in a Mexican population of *Rhyzopertha dominica*. *J Pestic Sci* 53: 15–20.
- Harrison J, Frazier MR, Henry JR, Kaiser A, Klok CJ, Rascón B. 2006. Responses of terrestrial insects to hypoxia or hyperoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 154: 4-17.
- Heddi A, Lefebvre F, Nardon P. 1992. Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 23: 403-411.
- Hoback WW, Podrabsky JE, Higley LG, Stanley DW, Hand SC. 2000. Anoxia tolerance of con-familial tiger beetle larvae is associated with differences in energy flow and anaerobiosis. *J Comp Physiol. B Biochem Syst Environ Physiol* 170: 307-314
- Hoback WW, Stanley DW. 2001. Insects in hypoxia. *J Insect Physiol* 47: 533-542.
- Hochachka PW, Jackson MB, Davies DD, Lambers H. 1991. Metabolic strategies of defense against hypoxia in animals. *Plant life under oxygen deprivation*. The Hague, (AHO) . SPB Academic publishing. 121-128.

- Hochachka PW. 1986. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. 231: 234-241.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot* 19: 603-608.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*. 376: 660-69
- Jimenez-Gutierrez LR, Uribe-Carvajal S, Sanchez-Paz A, Chimeo C, Muhlia-Almazan A. 2014. The cytochrome c oxidase and its mitochondrial function in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia. *J Bioenerg Biomembr* 46: 189-196.
- Klok CJ, Kaise A, Lighton JRB, Harrison JF. 2010. Critical oxygen partial pressures and maximal tracheal conductances for *Drosophila melanogaster* reared for multiple generations in hypoxia or hyperoxia. *J Insect Physiol* 56: 461-469.
- Kölsch G, Jakobi K, Wegener G, Braune HJ. 2002. Energy metabolism and metabolic rate of the alder leaf beetle *Agelastica alni* (L.) (Coleoptera, Chrysomelidae) under aerobic and anaerobic conditions: a microcalorimetric study. *J Insect Physiol* 48: 143-151.
- Koolman J, Klaus HR. 2003. *Bioquímica: texto y atlas*. 3ra Ed. Panamericana. Alemania. 210p.
- Kwast KE, Hand SC. 1996a. Acute depression of mitochondrial protein synthesis during anoxia. *J Biol Chem* 271: 7313-7319.
- Kwast KE, Hand SC. 1996b. Oxygen and pH regulation of protein synthesis in mitochondria from *Artemia franciscana* embryos. *Biochem J* 313: 207-213.
- Kwast KE, Hand SC. 1993. Regulatory features of protein synthesis in isolated mitochondria from *Artemia* embryos. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265: R1238-R1246.
- Lodish H, Berk D, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. 2004. *Biología celular y molecular*. 5ta ed W.H. Freeman and Company. New York (NY).

López CJ. 2008. Fisiología clínica del ejercicio. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana. 27-28p.

McMullen DC, Storey KB. 2007. Mitochondria of cold Hardy insects: Responses to cold and hypoxia assessed at enzymatic, mRNA and DNA levels. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 367-373.

Meira BF, Carmanini RF, Pereira FL, Silva GG, Aparecida FV, Pedroza IE. 2013. Evaluation of the sensory and color quality of coffee beans stored in hermetic packing. *J Stored Prod Res* 52: 1-6.

Melo V, Cuamatzi O. 2007. Bioquímica de los procesos metabólicos. 2da edición. Barcelona. Reverté. 159-160p.

Mitcham E, Martin TA, Zhou S. 2006. The mode of action of insecticidal controlled atmospheres. *Bull Entomol Res* 96: 213-222.

Rascon B, Harrison FJ. 2010. Lifespan and oxidative stress show a non-linear response to atmospheric oxygen in *Drosophila*. *J Exp Biol* 213: 3441-3448.

Regnault-Roger C, Philogène BJ, Vincent C. 2004. Biopesticidas de origen vegetal. Madrid (ES): Mundi Prensa Madrid. 337p.

Ryan MT, Hoogenraad NJ. 2007. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* 76: 701-722.

Sazanov LA. 2015. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 375-388.

Schlupalius 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.

Schmitz A, Harrison JF. 2004. Hypoxic tolerance in air-breathing invertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 141: 229-242.

Soderstrom EL, Brandl DG, Mackey BE. 1996. High temperature alone combined with controlled atmospheres for control of diapausing codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in walnuts. J Econ Entomol 89: 144-147.

Storey KB, Storey JM. 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. Q Rev Biol 65: 145-174.

Storey CL. 1980. Mortality of various stored product insects in low oxygen atmospheres produced by an exothermic inert atmosphere generator, in controlled atmosphere storage of grains. Amsterdam (NL): Elsevier Ed. 85p.

Storey CL. 1975. Mortality of adult stored-product insects in an atmosphere produced by an exothermic inert atmosphere generator. J Econ Entomol 68: 316-318.

Van Voorhies WA. 2009. Metabolic function in *Drosophila melanogaster* in response to hypoxia and pure oxygen. J Exp Biol 212: 3132-3141.

Vigne P, Tauc M, Frelin C. 2009. Strong dietary restrictions protect *Drosophila* against anoxia/reoxygenation injuries. PLoS One 4: 1-12.

Voet D, Voet J. 2004. Bioquímica. 3ra Ed. Panamericana. 830-832 p.

Wang J, Zhao Z, Tsai JH. 2000. Resistance and some enzyme activities in *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae) in relation to carbon dioxide enriched atmospheres. J Stored Prod Res 36: 297-308.

Weyel W, Wegener G. 1996. Adenine nucleotide metabolism during anoxia and postanoxic recovery in insects. Experientia 52: 474-480.

Wittig I, Karas M, Schägger H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. Mol Cell Proteomics 6: 1215-1225.

Wong-Corral FJ, Cortez-Rocha MO, Borboa-Flores J. 1996. Abundance and distribution of insect in stored wheat grain in Sonora, Mexico. *Southwest. Entomol* 21: 75-81.

Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K. 2011. Proton-pumping mechanism of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biophys* 40: 205-23.

Zhang ZY, Chen B, Zhao DJ, Kang L. 2013. Functional modulation of mitochondrial cytochrome c oxidase underlies adaptation to high-altitude hypoxia in Tibetan migratory locust. *Proc R Soc B* 280: 20122758.

Páginas consultadas en internet

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2010). Labranza de conservación. México, 2010. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Publicaciones/Lists/Agrocolas/Attachments/3/A-05-1.pdf>. (Fecha de acceso: 18 de abril de 2015).

UGR, Universidad de Granada (2006). Captación de energía. España, 2006. Imagen de ATP sintasa. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/10energia.htm> (Fecha de acceso: 06 de julio de 2016).

Secretaría de BioNET-EAFRINET (2011). *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) – Barrenador menor de grano. Kenia 2011. Tanzania 2011. Imagen de Ciclo de vida de *Rhyzopertha dominica*. Disponible en: [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) (Fecha de acceso: 06 de julio de 2016).

APHLIS. African Postharvest Losses Information System (2012). Insect pests of cereal grains. Africa 2012. Imagen de Ciclo de vida de *Rhyzopertha dominica*. Disponible en: http://www.erails.net/FARA/aphlis/aphlis/quality-losses-review/annex-1---insect-pests-of-cereal-grains/LANG_PATH?lang=pt.