

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Identificación de proteínas mitocondriales involucradas en la bioenergética de *Rhizopertha dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

Víctor Andrés Levy de la Torre

Universidad de Sonora

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

APROBACIÓN

**Identificación de proteínas mitocondriales involucradas en la bioenergética de
Rhizopertha dominica bajo el efecto de las atmósferas modificadas**

Víctor Andrés Levy de la Torre

Dra. Oliviert Martínez Cruz
Directora de tesis

Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Secretario

Dr. Alonso Alexis López Zavala
Vocal

Dr. Francisco Javier Wong Corral
Vocal

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias de los Alimentos** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

Autor

Víctor Andrés Levy de la Torre

Coordinador del Programa de Posgrado

Dr. Enrique Márquez Ríos

Hermosillo, Sonora, México

Agosto de 2017

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para la realización de mi tesis de maestría y por el 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 fosforilación oxidativa”.

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por las facilidades que me otorgó, así como a la planta docente por todos sus conocimientos y tiempo brindados.

A mi directora de tesis, Dra. Oliviert Martínez Cruz por haberme otorgado la oportunidad de trabajar con ella y por todos los conocimientos que adquirí bajo su dirección.

Al Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui, por haberme compartido de su tiempo y sus conocimientos transmitidos gracias a su amplia experiencia en el campo.

Al Dr. Alexis Alonzo López Zavala, por enseñarme todo lo que sé de cinética enzimática.

Al Dr. Francisco Javier Wong Corral, por haberme enseñado todo lo que aprendí del área de entomología, en especial de *Rhizopertha dominica*.

DEDICATORIAS

A mi Alma... eres la razón de levantarme a desayunar todos los días...

RESUMEN

El barrenador menor de los granos *Rhyzopertha dominica* es un insecto cosmopolita que se alimenta de una gran variedad de cereales y granos almacenados, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. Actualmente, los estudios relacionados con su bioenergética son necesarios para planear estrategias que sustituyan la utilización de insecticidas y plaguicidas. Tal alternativa consiste en la utilización de atmósferas modificadas en donde se somete al insecto a una baja concentración de O₂ y a una alta concentración de CO₂, comprometiendo así la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Así, el objetivo de esta investigación consistió en identificar las proteínas mitocondriales involucradas en la bioenergética de *R. dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas y evaluar la actividad enzimática de las enzimas citocromo c oxidasa (COX) y ATPasa de la enzima ATP sintasa. Para ello primeramente, insectos adultos de *R. dominica* se sometieron a un ambiente de hipoxia, utilizando una concentración de 5% O₂ y 10% CO₂ durante 24 h. Posteriormente, las mitocondrias fueron aisladas por centrifugaciones diferenciales y el paquete mitocondrial fue utilizado para la separación e identificación de las proteínas por electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, respectivamente. Las actividades enzimáticas COX y ATPasa fueron evaluadas. Los resultados de la electroforesis bidimensional arrojaron bandas correspondientes a proteínas sobreexpresadas y su identificación por espectrometría de masas reveló una proteína de choque térmico (HSP60), una actina y a las subunidades catalíticas α y β de la enzima ATP sintasa. Por otro lado, la actividad COX fue mayor en insectos bajo el efecto de la hipoxia que en normoxia, lo cual sugiere que *R. dominica* intenta compensar la falta de O₂ eficientando la actividad enzimática. Finalmente, la actividad ATPasa decreció en insectos sometidos a hipoxia, posiblemente inhibiéndose la actividad de la ATP sintasa mediante la proteína IF1, evitando la continua hidrólisis de ATP.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	3
Importancia de los Cereales	3
Pérdidas Económicas en Cereales por Insectos.....	3
<i>Rhizopertha dominica</i>	5
Control de Plagas	8
Atmósferas Modificadas.....	8
Mitocondria	11
Transporte de Electrones y Fosforilación Oxidativa	11
Citocromo C Oxidasa.....	14
ATP Sintasa.....	15
Efecto de las Bajas Concentraciones de Oxígeno Sobre las Proteínas COX y ATP Sintasa.....	17
HIPÓTESIS	20
OBJETIVOS	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Generación de Colonia de <i>Rhizopertha dominica</i>	22
Variedad de Trigo	22
Exposición a Atmósferas Modificadas	22
Aislamiento de Mitocondrias	23
Cuantificación de Lactato.....	23
Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford.....	23
Separación de las Proteínas Mitocondriales por Electroforesis Bidimensional 2-D PAGE.....	24
Identificación de Proteínas por LC MS/MS	25
Evaluación de la Actividad Citocromo C Oxidasa	25
Evaluación de la Integridad de la Membrana Externa Mitocondrial	26
Evaluación de la Actividad ATPasa	27
Análisis estadístico	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
Cuantificación de la Concentración de Lactato.....	29

Electroforesis Bidimensional 2-D PAGE	34
Identificación de las proteínas por espectrometría de masas MS/MS	40
Evaluación de la Actividad Citocromo c oxidasa.....	49
Evaluación de la Actividad ATPasa	53
CONCLUSION.....	57
RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ciclo de vida de <i>Rhyzopertha dominica</i>	7
2.	Cadena de transporte de electrones y fosofrilación oxidativa.....	13
3.	Cuantificación de lactato de <i>R. dominica</i> en condiciones de normoxia e hipoxia.....	31
4.	Proteínas mitocondriales de <i>Rhyzopertha dominica</i> correspondientes a los pI 3.87 a 6.19 y masa molecular.....	33
5.	Proteínas mitocondriales de <i>Rhyzopertha dominica</i> correspondientes a los pI 6.48 a 8.8 y masa molecular	36
6.	Bandas seleccionadas para obtener su secuencia por LC MS/MS.....	37
7.	Proteínas sobreexpresadas por efecto de la hipoxia y normoxia.....	38
8.	Alineamiento de la subunidad α de la enzima ATP sintasa de diferentes insectos y localización de los dominios y motivos conservados.....	46
9.	Alineamiento de la subunidad β de la enzima ATP sintasa de diferentes insectos y localización de los dominios y motivos conservados.....	47
10.	Actividad enzimática de la citocromo c oxidasa de <i>R. dominica</i> en condiciones de normoxia e hipoxia.....	52
11.	Actividad ATPasa mitocondrial de <i>R. dominica</i> en condiciones de normoxia e hipoxia.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Efecto de las atmósferas modificadas sobre el crecimiento, sobrevivencia y mortalidad en plagas primarias.....	10
2.	Características de masa molecular, punto isoeléctrico y número de pixeles de las bandas seleccionadas para su identificación.....	39
3	Información de los diferentes insectos con los que se realizó el alinamiento múltiple de las subunidades catalíticas α y β de la enzima ATP sintasa.....	44

INTRODUCCIÓN

La alimentación basada en cereales es la principal fuente de energía, proteína, vitaminas del complejo B y minerales para la población mundial (FAO, 2015). Estos son baratos de producir, fáciles de transportar, de almacenar y no son de fácil deterioro si se mantienen secos, lo que les proporciona una larga vida de anaquel. De acuerdo con la información proporcionada por la FAO, en América Latina se reportan pérdidas de hasta un 50% de la producción total de cereales cosechados, siendo una de las principales causas las plagas de insectos como lo es *Rhizopertha dominica* (Slavin, 2004). Este insecto es un coleóptero que barrena los granos de trigo para depositar los huevos en su interior, que posteriormente, eclosionan y dan lugar a las larvas que aprovechan este cereal para obtener energía y continuar con su ciclo de vida, proliferando de esta manera la invasión causada por *R. dominica* en bodegas de trigo almacenado (Bekett, 1998).

Los métodos de control de plagas más utilizados para combatir a este insecto consisten en plaguicidas que resultan ser efectivos, pero causan daño al medio ambiente y a la salud humana. Actualmente, las atmósferas modificadas sirven como método de control de plagas para productos almacenados y es una técnica que puede utilizarse como alternativa con respecto a la fumigación (Li, 2015). Esta técnica consiste en alterar los niveles de los gases que conforman la atmósfera (principalmente de oxígeno) en una delimitada área donde se encuentre *R. dominica*, para así reducir la cantidad de O₂ que consume el insecto. De esta manera, evitar la obtención de energía dentro de la membrana mitocondrial, es decir, bloquear la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa.

Hasta la fecha, pocas han sido las investigaciones en insectos que reportan la actividad de los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa bajo el efecto de los cambios en la concentración de oxígeno (Gómez et al., 2016; Zhang et al., 2013). En estos reportes se ha sugerido, por ejemplo, que la actividad de la Citocromo c oxidasa y la ATP sintasa se ven moduladas por efecto de la hipoxia, sin embargo, aun se desconoce el efecto de

este estresor en la sobreexpresión de las proteínas de estos complejos enzimáticos. Así, con esta investigación se pretende conocer las proteínas involucradas en el proceso de obtención de energía de *R. dominica* y que modifican su expresión debido a las atmósferas modificadas.

ANTECEDENTES

Importancia de los Cereales

Los cereales constituyen el alimento base de casi todos los pueblos y su principal fuente de calorías e hidratos de carbono en forma de almidón. Desde tiempos antiguos, los cereales han constituido el alimento base para el consumo humano, aunque gran parte se destina a la alimentación animal, así como a subproductos de la transformación industrial. Los cereales también han formado parte del desarrollo económico y cultural del hombre. Cada cultura, cada zona geográfica del planeta consume algún tipo de cereal, creando de esta manera una cultura gastronómica alrededor de ellos (FAO, 2015).

La comida basada en cereales es la principal fuente de energía, proteína, vitaminas del complejo B y minerales para la población mundial. En términos prácticos, los cereales son baratos de producir, fáciles de almacenar y de transportar y no son de fácil deterioro si se mantienen secos, haciendo que tengan una larga vida de anaquel. Los cereales son semillas comestibles que pertenecen a la familia *Gramineae* y están constituidos por el germen, el salvado y el endospermo (Slavin, 2004). Un número importante de cereales crece alrededor del mundo y se consideran los principales el centeno, el arroz, la avena, la cebada y el trigo (Hanz, 2009), siendo el trigo y el arroz la cosecha más importante, abarcando alrededor del 50% de la producción mundial de cereales (McKevith, 2004).

Pérdidas Económicas en Cereales por Insectos

La importancia del almacenamiento de granos en condiciones óptimas es una práctica trascendente para el consumo de éstos tanto en humanos como en animales. El almacenamiento es una práctica que consiste en guardar las cosechas totales o parte de estas con la finalidad de conservarlos físicamente y conservar su poder germinativo y nutricio hasta que sean requeridos conforme a las necesidades

de consumo, industriales y de mercado, después de un período de tiempo en almacén (Anderson y Alcock, 1954).

De acuerdo con la información proporcionada por la FAO, existen pérdidas que oscilan entre 10 y 15% de la producción de cereales en los países desarrollados con respecto a países como América Latina; donde se reportan pérdidas de hasta un 50% de la producción total cosechada. Una de las principales causas de dichas pérdidas son las plagas que utilizan el consumo de cereales para su proliferación (FAO, 2015). Las pérdidas de la producción de cereales por plagas de insectos están relacionadas con el producto que se está cultivando, la localidad y las prácticas de almacenamiento; si estos son almacenados en condiciones estandarizadas, pueden esperarse pérdidas de entre 10 y 30% de la producción total durante el almacenamiento. También se reportan pérdidas superiores al 10% durante la producción y de 10 a 20% en poscosecha (Domínguez, 2010).

El cereal de grano es atacado por una gran diversidad de especies de plagas, siendo las denominadas “plagas primarias” las que mayor daño ocasionan sobre los granos almacenados. Este tipo de plaga tiene afinidad por los granos íntegros, pues estos les propician las condiciones adecuadas de alimento, aire, humedad y calor para que los insectos se desarrollen satisfactoriamente. Algunos ejemplos de este tipo de plagas son el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.), del maíz (*Sitophilus zeamais* M.), del trigo (*Sitophilus granarius* L.), la palomilla dorada (*Sitotroga cerealella* O.), el barrenador mayor (*Prostephanus truncatus* H.) y el barrenador menor de los granos (*Rhyzopertha dominica*), siendo esta última una de las principales plagas que causa este tipo de pérdidas en granos y se encuentra ampliamente distribuida en silos y en bodegas de cereales (García *et al.*, 2007; Belda, 2012).

Rhyzopertha dominica es una plaga primaria del trigo almacenado; pero también puede infestar el tabaco, los frijoles, las nueces, frutas secas, cacahuates, especias y productos como carnes secas. Este insecto se alimenta de los granos y los invade

una vez que estos son almacenados (Wright *et al.*, 1990; Hagstrum y Throne, 1989). Las hembras de esta especie depositan sus huevos en la cáscara del trigo para que la larva neonata la penetre y se alimente del núcleo (Arthur, 2013).

El insecto adulto se dispersa desde fuentes de cereales infestadas hacia fuentes que aún no han sido colonizadas para ser invadidas (Campbell *et al.* 2002). Un estudio realizado por Ahmad (2013), reveló que *R. dominica* tiende a volar directamente a las fuentes de alimento una vez que las localiza, en lugar de caminar, como lo hacen otros insectos. El efecto que causa la invasión de este tipo de insectos en el trigo almacenados es directo: el insecto se alimenta oportunamente del trigo ocasionando principalmente pérdidas económicas; ya que este pierde peso y disminuye su capacidad germinativa (Larrin, 1994). *R. dominica* hidroliza mediante isoamilasas el almidón del grano de trigo y también mediante enzimas del tipo serina proteasas, lo que permite que se alimente eficazmente del trigo (Zhu y Baker, 1999).

Rhyzopertha dominica

R. dominica es un coleóptero con forma de cilindro alargado y angosto. Mide de 2.3 a 2.8 mm de longitud y es de color pardo. El huevo es alargado, tiene forma de óvalo y mide de 0.6 x 0.2 mm. La larva neonata es de color blanco y de cabeza amarilla, con pelos en la zona del dorso y se desarrolla dentro del grano. La pupa es color blanquecino. La longitud promedio del cuerpo y de la cabeza son de 3.9 y 0.6 mm, respectivamente. Una vez que madura y se convierte en un adulto, emerge del grano (Howe, 1950; Faroni, 1992). *R. dominica* es un insecto holometábolo, lo cual significa que sufre una metamorfosis completa, la cual incluye 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1; Szklarzewski *et al.*, 1992).

Las hembras adultas depositan sus huevos de manera individual o en grupos de hasta 30; una sola hembra puede depositar de 200 a 500 huevos blancos durante su vida. El desarrollo del huevo depende de la temperatura; en condiciones óptimas le puede tomar 30 días, pero el promedio es de 58. Este insecto se muestra tolerante

a temperaturas de calor; por lo que necesita de ambientes de altas temperaturas para incrementar su población (Beckett *et al*, 1998).

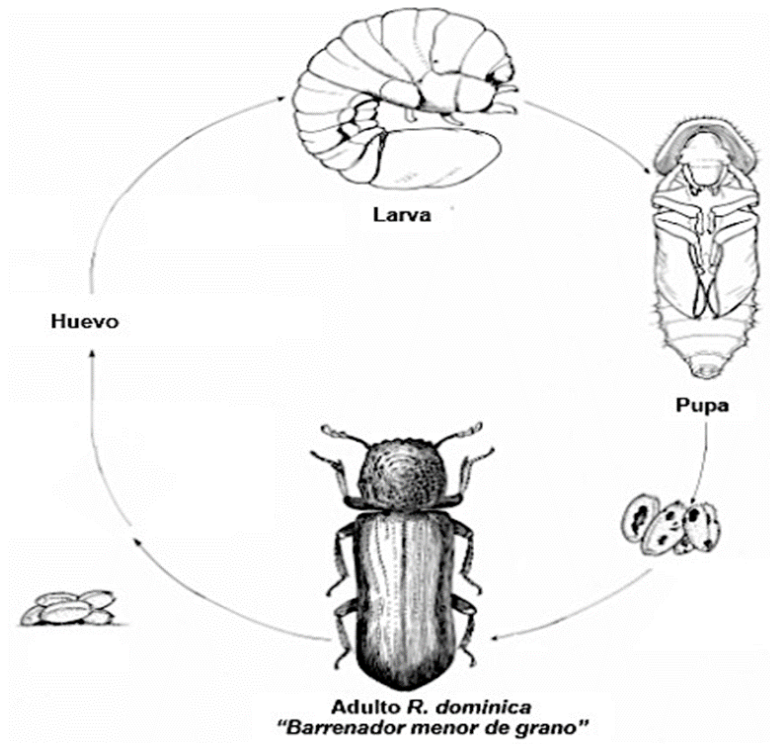


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhyzopertha dominica* (Szklarzewski et al., 1992).

Control de Plagas

Las plagas de insectos son un importante problema tanto para la producción mundial de alimentos como para la conservación de la biodiversidad y ocasionan riesgos sobre la salud animal y humana (Oerke, 2006). Los métodos de control de plagas son un conjunto de prácticas que tienen la finalidad de disminuir la densidad de población de una plaga por debajo del nivel en el cual dan inicio los daños por pérdidas económicas, siendo el método de control químico el más utilizado en cultivos agrícolas. Pesticidas y plaguicidas son nombres genéricos que reciben los compuestos químicos para proteger los cultivos, e insecticidas son el nombre de productos químicos para matar insectos (Cisneros, 1995).

Los insecticidas sintéticos son ampliamente utilizados para el control de plagas, sin embargo, ocasionan daños al medio ambiente y proporcionan a los insectos la capacidad de desarrollar resistencia a estos (Harvey, 2015), por lo que se han desarrollado alternativas más amigables para el control de plagas como lo son las atmósferas modificadas.

Atmósferas Modificadas

El término atmósferas modificadas (AM) se refiere a la metodología a partir de la cual, la composición de gases tales como oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono son controlados de tal forma que el ambiente en el que se encuentra el producto o algún organismo se ve modificado de acuerdo a los objetivos del productor o del investigador (Barreiro y Sandoval, 2006). Las atmósferas modificadas pueden utilizarse como una alternativa con respecto a la fumigación química para prolongar frescas las cosechas y productos almacenados (Li, 2015). Las atmósferas modificadas basadas en un alto contenido de CO₂ sirven como método de control para plagas en productos almacenados (Tabla 1) y pueden ser aplicadas sobre productos alimenticios durante el empaquetado para evitar incidentes de contaminación por plagas que conlleva el proceso de manufactura, así como para

prevenir el desarrollo de estas en productos que llegan a los consumidores (Riudavets, 2009).

En un estudio realizado por Eissa (2014), en el cual sometió a *R. dominica* a diferentes concentraciones de CO₂ en un experimento de atmósferas modificadas, se concluyó que dicho insecto en etapa adulta tiene una mortalidad del 100% después de 7 días con un tratamiento de 80% de CO₂ y después de 8 días con 60% de CO₂, mientras que en atmósferas modificadas con 40 y 20% de CO₂, se reportó una mortalidad del 96% a los 8 y 9 días, respectivamente.

Tabla 1. Efecto de las atmósferas modificadas sobre el crecimiento, sobrevivencia y mortalidad en plagas primarias.

Insecto	Nombre común	AM	Composición de gases (%)	Temperatura (°C)	Tiempo de exposición	Observaciones	Referencia
- <i>Rhyzopertha dominica</i>	Barrenador menor de los granos	O ₂ CO ₂	5 10	34	12/24 h	Cero Mortalidad Metabolismo Alterado	Gómez <i>et al.</i> (2016)
- <i>Callosobruchus maculatus</i>	Gorgojo del garbanzo	O ₂ CO ₂	10/6/3 50/70/90	27	48/72/120	100 % de mortalidad en 48 h	Iturralde <i>et al.</i> (2016)
- <i>Callosobruchus chinensis</i>	Falso gorgojo chino	CO ₂	30/40/50	-	6 m	Inhibición de la progenie	Divya <i>et al.</i> (2015)
- <i>Rhyzopertha dominica</i>	Barrenador menor de los granos	CO ₂	80 60 40/20	-	7 d 8 d	100% de mortalidad 100% de mortalidad 96% de mortalidad	Eissa (2014)
- <i>Rhyzopertha dominica</i>	Barrenador menor de los granos	O ₂ CO ₂	2 10	-	8/9 d 6d	100% de mortalidad	Calderón y Navarro (2012)
- <i>Sitophilus zeamais</i>	Gorgojo del maiz	O ₂	0.5-2	-	6-10 d	100% de mortalidad	Carvalho <i>et al.</i> (2012)
- <i>Sitophilus oryzae</i>	Gorgojo del arroz	CO ₂	90-95				
- <i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Carcoma dentada de los granos	O ₂ CO ₂	3-6 10-20	20/25	28 d	A 20°C hubo menor crecimiento de insectos que a 25°C	Conyers <i>et al.</i> (2007)
- <i>Sitophilus granarius</i>	Gorgojo del trigo						
- <i>Sitophilus oryzae</i>	Gorgojo del arroz						
- <i>Tribolium castenum</i>	Gorgojo de la harina						
- <i>Sitophilus granarius</i>	Gorgojo del trigo	O ₂	0.1-.25	-	3 d	95% de mortalidad	Storey <i>et al.</i> (1975)
- <i>Sitophilus oryzae</i>	Gorgojo del arroz	CO ₂	9				
- <i>Tribolium castenum</i>	Gorgojo de la harina						
- <i>Rhyzopertha dominica</i>	Barrenador menor de los granos						
- <i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Carcoma dentada de los granos						

Mitocondria

La mitocondria juega un importante papel en la producción de energía dentro de la célula, siendo el orgánulo celular en el cual sucede el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Luna, 2014). La mitocondria está formada por 2 membranas: la membrana externa que es lisa y porosa y la membrana interna, con pliegues en forma de crestas, que es el sitio en el que se encuentra integrado el *ensamblaje respiratorio*, responsable de la síntesis de ATP. Juntas, dichas membranas forman dos compartimentos separados: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (McKee, 2003). Dentro de la mitocondria se llevan a cabo una serie de reacciones que tienen la finalidad de producir metabolitos que son necesarios para la producción de energía en forma de moléculas de ATP. La glucólisis es el proceso mediante el cual, una molécula de glucosa produce 2 moléculas de piruvato y sucede en el citosol de la célula. El piruvato, posteriormente, se transforma en Acetil coenzima A mediante un complejo enzimático denominado piruvato deshidrogenasa. Este metabolito conlleva a otra serie de reacciones químicas que se llevan a cabo dentro de la matriz mitocondrial denominadas Ciclo de Krebs. Esta ruta metabólica tiene la finalidad de generar poder reductor en forma de moléculas de NADH y FADH, coenzimas reducidas que son transportadas hacia la cadena de transporte de electrones dentro de la membrana interna mitocondrial a través de un proceso denominado cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa (Alberts, 2006)

Transporte de Electrones y Fosforilación Oxidativa

Las coenzimas reducidas NADH y FADH que se generan en las reacciones metabólicas descritas anteriormente, contienen electrones de alta energía que son utilizados a través de una serie de complejos multiproteicos mediante un proceso metabólico conocido como cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa (Harper, 2013). Dichos complejos multiproteicos se conocen como I (NADH deshidrogenasa), II (citocromo bc1), III (citocromo c), IV (citocromo c oxidasa) y V (ATP sintasa). El complejo I y el complejo II reciben los electrones que

resultan de la oxidación del NADH y del succinato y los pasan a la coenzima Q, que los traslada a través de la membrana. El complejo III oxida la forma reducida de la coenzima Q y reduce a su vez el citocromo c, un transportador electrónico proteico que también puede desplazarse por el interior de la membrana interna. Finalmente, el complejo IV acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del oxígeno a agua (Figura 2; Mathews, 2002).

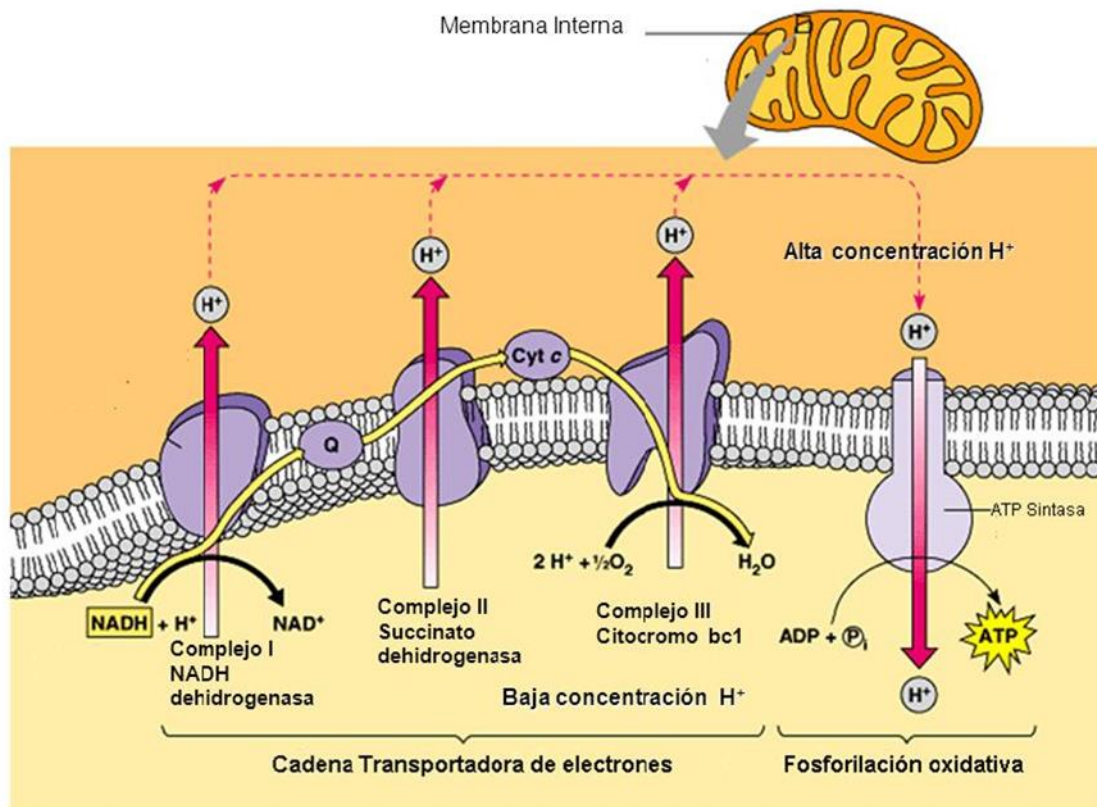


Figura 2. Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa (Tomado de Mathews, 2002).

Complejo I

Es el complejo respiratorio de mayor tamaño con un peso molecular superior a 900 kDa. En bovinos, esta enzima contiene al menos 45 diferentes subunidades (Caroll *et al.*, 2002). Esta enzima cataliza la transferencia del NADH a la quinona a través de una serie de centros redox que incluyen una flavina mononucleótido (FMN), de siete a nueve centros hierro-sulfuro y hasta tres especies de ubisemiquinona (Ohnishi *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2000; Yano *et al.*, 2000).

Complejo II

Esta enzima es la única proteína de membrana componente del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones. Consta de 4 subunidades: una de ellas contiene a la coenzima FAD y esta se encuentra unida de manera covalente a un residuo de histidina. Otra subunidad contiene tres centros ferrosulfurados y dos proteínas hidrofóbicas. Este complejo proteico cataliza la oxidación de las coenzimas reducidas FADH provenientes del ciclo de Krebs y que pasan directamente a esta proteína sin atravesar el complejo I (Cecchini, 2003).

Complejo III

El complejo III en mitocondrias de mamíferos contiene 11 subunidades, entre ellas un grupo dihemo citocromo *b* unido a la membrana y un citocromo *c*₁ anclado a la membrana y dos proteínas hierrosulfuradas. Los electrones del ubiquinol son transferidos al citocromo *c*. Esta enzima transporta estos electrones hacia el complejo cuatro: citocromo *c* oxidasa. Esta formado por dos monómeros y cada monómero a su vez por tres grupos hemo y por proteínas ferrosulfuradas (Alberts, 2006).

Citocromo C Oxidasa

La citocromo *c* oxidasa es una enzima de la membrana interna mitocondrial que cataliza la reducción de oxígeno molecular a agua, produciéndose un gradiente electroquímico a través de la membrana. Dicho gradiente se forma tanto por la actividad química electrogénica, en donde se toman electrones y protones desde

lados opuestos de la membrana y por el bombeo a través de la membrana (Blomberg, 2014). Ya que consume un 95% del oxígeno que respiramos, la enzima citocromo c oxidasa tiene un papel importante en el balance de la energía celular. La regulación de la reducción de su oxígeno y la actividad de bombeo de protones resulta, por lo tanto, crítica para la función fisiológica (Ferguson, 2012).

La enzima citocromo c oxidasa en mamíferos y aves esta compuesta por 13 subunidades. Las subunidades IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII están esencialmente involucradas en la regulación del consumo de oxígeno y en la traslocación de protones (Kadenbach, 2015).

Este complejo cuenta con dos átomos de cobre que forman un complejo con dos cisteínas en la subunidad II. En la subunidad I contiene un citocromo α y un citocromo α_3 . Este último esta próximo a otro átomo de cobre, que es donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno (McKee, 2003).

ATP Sintasa

La ATP sintasa es un proteína de membrana que consiste en un motor rotatorio y resulta crítica para el metabolismo celular energético de todos los organismos vivos (Cingolani, 2011). En bacterias, se encuentra en la membrana plasmática, en la membrana tilocoidal de los cloroplastos y en las células eucariotas se localiza en la membrana interna mitocondrial. En eucariontes, la función de la ATP sintasa es aprovechar el potencial electroquímico que se genera en la cadena de transporte de electrones para generar ATP (Mitchell, 1961).

Las subunidades de este complejo enzimático se distribuyen en dos estructuras llamadas F1 y F0; el dominio F1 se encuentra atravesando la membrana mitocondrial y se caracteriza por conformar las subunidades catalíticas de la enzima y el dominio F0 se encuentra embebido en la membrana mitocondrial. La estructura de la ATP sintasa varía de una especie a otra; se encuentran subunidades

diferentes dependiendo de la especie a la que pertenezca, siendo esta enzima más compleja en organismos más evolucionados (Cano, 2011).

La síntesis de ATP da inicio cuando se genera un gradiente electroquímico de protones que se genera a través del complejo enzimático de la cadena de transporte de electrones durante la oxidación de sustratos; una vez que los protones se traslapan a la membrana externa mitocondrial por un conducto que se encuentra en el dominio F₀, ocasionan un giro de la subunidad c, la cual provoca un giro de las subunidades centrales γ y ϵ de 120° para originar cambios en la conformación de las subunidades catalíticas α y β , con lo que se induce la unión de sustratos (ADP y Pi) para que finalmente se sintetice y se libere ATP (Itoh, 2004).

Efecto de las Bajas Concentraciones de Oxígeno Sobre las Proteínas COX y ATP Sintasa

El término hipoxia se refiere a una disminución en la concentración de oxígeno (Diaz y Breitburg, 2009). Es un estado en el cual la presión parcial de oxígeno ocasiona que la tasa metabólica y las funciones fisiológicas ya no puedan ser mantenidas (Richards, 2011). Cuando un organismo es sometido a hipoxia, aparece un incremento en las especies reactivas de oxígeno (Clanton, 2007). La ruta anabólica de la glucólisis se incrementa para que la producción de ATP pueda ser mantenida en un intento por compensar la falta de fosforilación oxidativa.

Cuando las reservas de oxígeno se terminan, la enzima Citocromo c oxidasa se detiene y como consecuencia es inhibida la cadena de transporte de electrones, lo cual provoca una acumulación de protones dentro de la matriz mitocondrial, ocasionando la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. La enzima ATP sintasa comienza a girar en sentido contrario y degrada el ATP en ADP + Pi. Eventualmente, todas las reservas de ATP se agotarán y todo proceso dependiente de esta molécula cesará, provocando la muerte celular (Galli *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que en levaduras la expresión de COX IV y VI son aeróbicamente reguladas, en donde la cantidad de COX totalmente ensamblada decrece con el descenso en la concentración de oxígeno (Poyton *et al.*, 1992; Burke *et al.*, 1997; Bunn *et al.*, 1996). En mamíferos, estas subunidades COX se llaman Vb y Va, respectivamente. Durante el ensamblaje de COX en células mamíferas, se incorpora COX Va seguida de COX Vb, lo cual sugiere que COX Va determina la integración de COX Vb, y que a la subsecuente integración de COX Vb se le atribuya un rol vital en la actividad enzimática de COX (Nijtmans *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2004).

Las isoformas de esta subunidad (Va y Vb), están inversamente reguladas por la concentración de oxígeno (Burke, 1998). La isoforma aeróbica Va se expresa en

células aeróbicas y en células que crecen en concentraciones de oxígeno por debajo de $1 \mu\text{mol}^{-1}$ de oxígeno. Por otro lado, la isoforma hipóxica Vb, se expresa en células anaeróbicas y en células que crecen en concentraciones de oxígeno por arriba de $1 \mu\text{mol}^{-1}$ de oxígeno. El oxígeno regula la expresión de ambas isoformas a niveles de transcripción de sus genes. En ambos casos se involucra un factor de transcripción hemo dependiente. En normoxia, el gen *COX5a* se activa por el factor de transcripción Hap2/3/4/5p, mientras que el gen *COX5b* es reprimido por el factor de transcripción Rox1. La expresión de Rox1 es mediado directamente por hemo y Hap1p.

Debido a que la biosíntesis de hemo requiere oxígeno, se ha propuesto que los niveles de hemo celular sirven como un indicador de oxígeno disponible. Por lo tanto, en presencia de oxígeno, los niveles de hemo son lo suficientemente altos para activar la transcripción dependiente de Hap2/3/4/5p de *COX5a* y la transcripción dependiente de Hap1p de Rox1, que reprime la expresión de *COX5b* esto conlleva a la expresión preferencial de la isoforma Va. En ausencia de oxígeno, el hemo no se sintetiza; por lo tanto, el gen *COX5a* ya no puede ser activado y el gen de *COX5b* ya no puede ser reprimido. Consecuentemente, en ausencia de oxígeno, *COX5a* se inhibe y *COX5b* se activa, lo que radica en la expresión preferencial de la isoforma Vb (Burke, 1998).

Gómez *et al.*, (2016), después evaluar cualitativamente a la actividad enzimática de COX y ATP sintasa de *R. dominica* en un bioensayo de AM que consistió en 5% de oxígeno y 10% de dióxido de carbono durante 12 y 24 horas, observó cambios en la actividad enzimática de ambos complejos con respecto al tratamiento control (normoxia). Los resultados sugirieron que durante las primeras 12 horas de exposición a hipoxia, este insecto muestra un incremento en la actividad COX, con respecto al tratamiento de 24 horas de hipoxia, donde la actividad enzimática decreció, lo cual sugiere una adaptación por parte del *R. dominica* hacia tan estresante ambiente después de largos períodos de tiempo de exposición. De modo contrario, la actividad enzimática de la proteína ATP sintasa no mostró cambios

significativos entre las 12 y 24 horas de hipoxia. Sin embargo, el grupo control mostró una mayor actividad ATPasa, lo cual podría sugerir que al someter a *R. dominica* a ambientes hipóxicos, este insecto tiende a suprimir la actividad del complejo V mitocondrial en un intento por disminuir su metabolismo y evitar la hidrólisis de ATP.

Además de la exposición a la tecnología de las AM, algunos insectos viven naturalmente en ambientes hipóxicos. Zhang *et al.* (2013), compararon 2 especies de saltamontes que pertenecen al mismo género pero que habitan ambientes donde la concentración de oxígeno es distinta. *Locusta migratoria* vive en condiciones naturales de hipoxia y por lo tanto se muestra mas tolerante tanto en ambientes de normal como de baja concentración de oxígeno, evidenciando mayor actividad COX en contraste con *Locusta spp*, la cual vive en condiciones de normoxia.

Diapausa es una respuesta fisiológica que los insectos expresan para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas (Tauber *et al.*, 1986; Danks, 1987). Yang *et al.* (2010), evaluaron la actividad COX en *Helicoverpa amigera* bajo diapausa pupal, que es un estado en el que se observa un decremento en la actividad metabólica del insecto y observaron un decremento en la actividad COX. En 2008, McMullen *et al.* evaluaron la actividad Cox de 2 larvas de insectos en diapausa invernal, que es un período donde la actividad mitocondrial se ve reducida para resistir largos períodos de bajas temperaturas. *Epiblema scudderiana* y *Eurosta solidaginis* fueron sometidas a condiciones de hipoxia y a temperaturas de 4, -4 y -20° C. La actividad COX en *E. scudderiana* mostró mayor decremento comparada con *E. solidaginis*, la cual, al vivir naturalmente en climas fríos, se mostró mas tolerante.

HIPÓTESIS

Las proteínas mitocondriales que se encuentran involucradas en la bioenergética de *Rhizopertha dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas se sobreexpresarán y como consecuencia se modificará la actividad enzimática de los complejos protéicos involucrados.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar las proteínas mitocondriales sobreexpresadas que se encuentran involucradas en la bioenergética de *Rhizopertha dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas y evaluar su actividad enzimática.

Objetivos Específicos

- 1) Realizar un bioensayo exponiendo a *R. dominica* a una concentración de gases con 10% de CO₂ y 5% de O₂ por 24 horas y aislar sus mitocondrias por centrifugaciones diferenciales.
- 2) Identificar las subunidades sobreexpresadas de las proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa de *R. dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas, por electroforesis bidimensional (2-D PAGE) y secuenciación.
- 3) Evaluar a actividad enzimática de la citocromo C oxidasa y ATP-sintasa de *R. dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de Colonia de *Rhyzopertha dominica*

La colonia se generó a partir de insectos de *R. dominica* donados por el Laboratorio de Entomología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, los cuales fueron utilizados en etapa adulta. Se utilizaron insectos de ambos sexos, los cuales fueron colocados en frascos de vidrio con tapas horadadas y con una malla con 100 gramos de trigo cada uno y se incubaron a 27° C y 70% de humedad relativa. Todos los insectos tenían 21 días de haber emergido del grano al momento de realizar el experimento.

Variedad de Trigo

El trigo *Triticum aestivum*, variedad *durum* se utilizó para la propagación del insecto, cosechado durante el verano del año 2015.

Exposición a Atmósferas Modificadas

Se utilizó un 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 utilizaron bolsas de polietileno MSD – DR006 Grainpro, Inc., con dimensiones de 22 x 28 cm, en donde se agregaron 150 insectos adultos de *R. dominica*. Los tratamientos consistieron en una mezcla de gases 75% N₂, 5% O₂ y 10% CO₂ por 24 horas. Una vez colocados los insectos con la concentración de gases adecuada, las bolsas fueron selladas herméticamente y se incubaron a 27° C y 70% de humedad relativa. Cada tratamiento se evaluó por triplicado. Además, se incluyeron organismos sin ser expuestos a ningún tratamiento como controles del experimento (80% N₂, 20% O₂ y 0-03% CO₂).

Aislamiento de Mitocondrias

Los insectos adultos fueron lavados dos veces con agua jabonosa en proporción 10:1, 2% de hipoclorito de sodio y enjuagados con agua destilada. Las mitocondrias fueron aisladas según el protocolo de Heddi (1993) con algunas modificaciones. Brevemente, los insectos fueron homogenizados en medio de extracción (MEX): PIPES 4 mM, sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 6.8. El homogenado se centrifugó a 8500 x g y a 4 °C por 10 minutos. Después de eliminar los sobranes, los precipitados fueron suspendidos en MEX y homogeneizados en un recipiente frío. A continuación, el homogenado fue centrifugado a 700 x g por 5 minutos a 4 °C. El precipitado, fue descartado y el sobrenadante se centrifugó a 8500 x g por 10 minutos a 4°C. Los precipitados mitocondriales fueron lavados dos veces en buffer MLM (PIPES 4 mM, sacarosa 290 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 6.8) y posteriormente centrifugados a 8500 x g por 10 minutos a 4 °C. Por último el precipitado fue resuspendido y llevado a un volumen de 50 µL buffer MLM.

Cuantificación de Lactato

La cuantificación de lactato se llevó a cabo utilizando el kit L-Lactate (Randox, UK) en un lector de microplaca (Thermo Fisher Scientific, modelo Multiskan GO, Japón), siguiendo las instrucciones del fabricante a una longitud de onda de 550 nm. Se utilizaron 20 µL de muestra y 180 µL de reactivo.

Cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Una vez obtenido el precipitado mitocondrial, se determinó la concentración de proteína con el Reactivo de Bradford (RB) (SIGMA-ALDRICH, SaintLouis, Missouri, USA) en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Fisher Scientific, modelo Multiskan GO, Japón) a una longitud de onda de 595 nm mediante una lectura simple. El ensayo se realizó por triplicado. Para medir la concentración de la muestra, se utilizaron 250 µL del RB, 45 de agua ultra pura y 5 del precipitado mitocondrial. El blanco consistió en 250 µL del RB, 45 de agua ultra pura y 5 del

buffer donde se resuspendieron las mitocondrias (MEX). El tiempo de incubación fue de 20 minutos. Ambas reacciones se llevaron a un volumen final de 300 μ L.

Se construyó una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) a una concentración stock de 2 mg/mL. A partir de esta solución se realizaron diluciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL. Para medir la absorbancia se utilizaron 250 μ L del RB, 45 de agua ultra pura y 5 de cada dilución. El blanco consistió en 250 μ L del RB y 50 de agua ultra pura. El tiempo de incubación fue de 20 minutos y cada medición se hizo por triplicado

Separación de las Proteínas Mitocondriales por Electroforesis Bidimensional 2-D PAGE

Para llevar a cabo la separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (primera dimensión), se utilizaron tiras ReadyStrip IPG (BioRad, Hercules California, USA) de 24 cm y con un gradiente de pH de 3-10. Las tiras fueron colocadas en un equipo 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las tiras IPG fueron hidratadas en un buffer que contiene urea 8.4 M; tiourea 2.3 M; DTT 0.07 M y 600 μ L de anfolitos (pH 3-10). Se utilizaron 200 μ g de proteína mitocondrial en un volumen final de 3.4 mL con solución hidratadora. Posteriormente, se inyectaron 150 μ L en cada pozo del equipo a lo largo de la tira. Se colocaron almohadillas hidratadas con esta misma solución en cada extremo de las tiras y se agregaron 200 μ L de aceite mineral en el ánodo y 400 μ L en el cátodo. Después de 1 minuto se agregaron nuevamente 200 μ L de aceite mineral en ambos extremos. Finalmente, el equipo se programó a 20kV/h con corrientes máximas de 50 μ A y voltajes máximos de 4500 V durante 36 h. Se colectaron aproximadamente 150 μ L de solución por pozo y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Para la separación de las proteínas por masa molecular, se realizaron electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras utilizando geles de poliacrilamida al 12%. Se inyectaron 40 μ L de la solución recolectada en cada pozo del gel de poliacrilamida. La electroforesis se realizó a 60 V por gel durante 2 horas y a 4°C.

Tinción con Azul de Coomassie

Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con azul de Coomassie y para ello se preparó una solución que consistió en azul de Coomassie 0.1%, metanol 40%, ácido acético 10% y agua ultrapura 50%. Los geles fueron teñidos durante una hora y a continuación fueron transferidos a una solución destiñidora que consistió en metanol 40%, ácido acético 10% y agua ultrapura 50%.

Identificación de Proteínas por LC MS/MS

Se compararon las proteínas mitocondriales separadas por electroforesis bidimensional de los organismos en normoxia con respecto a los que estuvieron bajo el efecto de las atmósferas controladas utilizando el equipo Fotodocumentador de geles Gel Doc [™], empleando el programa informático Image Lab [™] Software (Bio-Rad, USA). Las proteínas mitocondriales que se expresaron fueron cortadas del gel, desteñidas y digeridas con tripsina para su análisis por LC-MS/MS, esto como un servicio del Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Irapuato). Posteriormente, los fragmentos obtenidos fueron analizados comparándolos con secuencias depositadas en diferentes bases de datos.

Evaluación de la Actividad Citocromo C Oxidasa

La evaluación de la actividad Citocromo c oxidasa se determinó utilizando el kit CYTOCOX 1 (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, USA), en un ensayo colorimétrico basado en una disminución en la absorbancia a 550 nm del ferrocitocromo C ocasionada por su oxidación a ferricitocromo C por la enzima Citocromo c oxidasa. El ensayo consistió en utilizar una celda de 1mL a la cual se le agregó Buffer de Ensayo (Tris-HCl 10 mM, KCl 120 mM, pH 7.0) y Buffer de Dilución de Enzima (Tris-HCl 10 mM, sacarosa 250 mM, DTT 0.1 M, Ferrocitocromo C 0.22 mM, pH 7.0) y 90 µg de proteína mitocondrial. Se utilizó un espectrofotómetro Cary 60 (Agilent Technologies, Mulgrave, Australia) a una longitud de onda de 550 nm a temperatura

constante (25° C) y se tomaron lecturas cada 5 segundos durante 1 minuto. Las mediciones se realizaron por triplicado. Se evaluó la actividad enzimática en U/mg de Proteína de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$U /mg Proteína = \frac{\Delta A_{(550 \text{ nm/ min Muestra})} - \Delta A_{(550 \text{ nm/ min Blanco})} * 1}{(21.84)(0.09)}$$

Donde:

ΔA550nm/min Muestra es la absorbancia de la muestra por minuto.

ΔA550nm/min Blanco es la absorbancia del blanco por minuto.

1 es el volumen de la reacción (1mL).

21.84 es el coeficiente de extinción milimolar entre el ferrocitocromo c y el ferricitocromo c a 550 nm.

0.09 fue la cantidad de proteína utilizada en mili gramos

U/mg Prot donde una Unidad es aquella que oxida 1 μMol de ferrocitocromo c por minuto a 25° C y a pH 7.

Evaluación de la Integridad de la Membrana Externa Mitocondrial

La evaluación de la integridad de membrana se llevó a cabo midiendo la actividad Citocromo C Oxidasa en presencia y ausencia de detergente *n*-dodecyl β-D-maltoside, utilizando Buffer de Dilución de Enzima con *n*-dodecyl β-D-maltoside (Tri-HCl 10 mM, sacarosa 250 mM y *n*-dodecyl β-D-maltoside 1 mM, pH 7). Se determinó la absorbancia por minuto para cada muestra en un espectrofotómetro Cary 60 (Agilent Technologies, Mulgrave, Australia) a una longitud de onda de 550 nm a temperatura constante (25° C) de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \Delta A_{(intacta)} &= \Delta A_{(muestra intacta)} - \Delta A_{(blanco)} \\ \Delta A_{(total)} &= \Delta A_{(muestra total)} - \Delta A_{(blanco)} \end{aligned}$$

Donde:

$\Delta A_{(intacta)}$ es la actividad enzimática sin detergente *n*-dodecyl β -D-maltoside
 $\Delta A_{(total)}$ es la actividad enzimática con detergente *n*-dodecyl β -D-maltoside

Por último, se calculó la integridad de la membrana externa mitocondrial de la siguiente manera:

% de integridad de membrana:

$$\% = \frac{\Delta A_{(total)} - \Delta A_{(intacta)} \times 100}{\Delta A_{(total)}}$$

Evaluación de la Actividad ATPasa

La actividad ATPasa se evaluó en dirección de la hidrólisis del ATP, en un ensayo acoplado en 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 que se le agregó Tris 178 mM, MgSO₄ 13 mM, KCl 133 mM, sacarosa 300 mM, ATP 6.7 mM, PEP 20 mM NADH 0.13 mM, PK 2 U, LDH 3 U, pH 8.0. Se utilizaron 90 μ g de proteína mitocondrial de cada uno de los tratamientos. El ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro Cary 60 (Agilent Technologies, Mulgrave, Australia) a una longitud de onda de 340 nm a temperatura constante (28° C). Las mediciones se realizaron por triplicado. Se midió absorbancia durante 5 minutos haciendo mediciones cada 5 segundos. Se determinó la actividad enzimática en U/mg de proteína de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

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.

V es el volumen de la reacción (1 mL).

ϵ es el coeficiente de extinción milimolar del NADH.

W fue la cantidad de proteína utilizada en mili gramos.

$U/\text{mg Prot}$ donde una Unidad se define como aquella que hidroliza 1 μMol de ATP en ADP + Pi por minuto a 28° C y a pH 8.

Análisis estadístico

Además de la utilización de estadística descriptiva, los datos correspondientes a la sobreexpresión de proteínas y a las actividades enzimáticas fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba t de student considerando un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0.05$) utilizando el software NCSS versión 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de la Concentración de Lactato

Para la mayoría de los animales terrestres, hipoxia se define como el porcentaje de oxígeno por debajo de 20.94%. Los insectos son capaces de intensificar su metabolismo energético aerobio mediante un sistema traqueal, que se encarga de repartir eficientemente el oxígeno hacia los tejidos (Hoback y Stanley, 2000). Los insectos respiran a través de ciertas estructuras que tienen en el abdomen, llamadas espiráculos. Los espiráculos controlan la entrega de oxígeno a través de la pared del cuerpo y son la principal barrera para el transporte de esta molécula cuando la tasa metabólica disminuye (Harrison *et al.*, 2006). Estas válvulas espiraculares tienden a abrirse con más frecuencia cuando los insectos se enfrentan a ambientes hipóxicos (Burkett y Schneiderman, 1974). Cuando los insectos disminuyen su metabolismo, son capaces de sobrevivir varios días en ambientes que van desde nulas a bajas concentraciones de oxígeno mediante la utilización de la ruta metabólica anaeróbica, produciendo metabolitos como alanina, NADH y lactato (Storey y Storey, 1988; Hoback *et al.*, 1998).

El lactato es un producto de la glucólisis que se produce cuando un tejido ya no puede ser provisto con oxígeno o cuando hay una disminución de esta molécula, cambiando la respiración de aeróbica a anaeróbica. Concentraciones elevadas de lactato en tejido es un parámetro que se utiliza para confirmar metabolismo anaeróbico (Goodman *et al.*, 1999).

En nuestro experimento, al someter a *R. dominica* a un tratamiento de hipoxia, fue necesario corroborar que cambió su metabolismo a anaeróbico mediante la cuantificación de lactato para confirmar el efecto de este estresor. En la Figura 3 se observa un incremento de lactato del 29% en insectos sometidos a hipoxia con respecto a insectos que no fueron sometidos a dicho estrés. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Cota *et al.* en el 2016, donde se sometió a *R.*

dominica a un tratamiento de 24 h de hipoxia y se reportó un incremento de lactato del 50% con respecto a los mismos insectos en condiciones de normoxia. Resultados similares fueron encontrados por Feala *et al.* (2007), donde se reporta una acumulación de lactato en tejido en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) después de haber sido expuesta a bajas concentraciones de oxígeno.

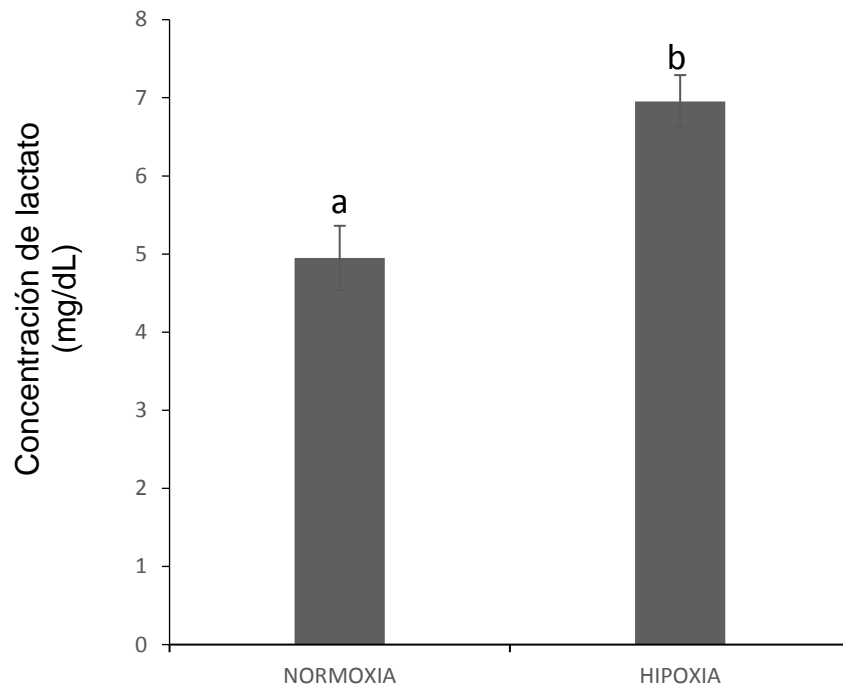


Figura 3. Cuantificación de lactato de *R. dominica* en condiciones de normoxia e hipoxia. Los datos corresponden a las medias \pm DE de tres observaciones. Diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

A pesar de que los insectos terrestres no están del todo adaptados para sobrevivir en ambientes hipóxicos y anóxicos, se sabe que algunos miembros de los órdenes de mayor importancia, incluyendo el orden de los coleópteros, pueden sobrevivir durante períodos que van desde horas, días, e incluso meses sin oxígeno (Hoback y Stanley, 2000). El género *Drosophila* (un género de mosca), muestra una notable resiliencia a la ausencia de oxígeno, ya que la etapa adulta es capaz de soportar hasta por 4 horas condiciones de anoxia (Krishnan *et al.*, 1997). Esto lo logran mediante la oxiregulación en el consumo de oxígeno siempre y cuando los niveles ambientales de pO₂ (presión parcial de oxígeno) no sean una limitante para que puedan mantener el metabolismo oxidativo (Gorr *et al.*, 2006).

La falta de oxígeno es también común en ambientes acuáticos durante el invierno, cuando el agua que cubre la superficie de los lagos se congela y el oxígeno es consumido por las especies atrapadas bajo el hielo (Galli y Richards, 2014). Se ha reportado que ciertos organismos marinos logran sobrevivir hasta por 5 meses en anoxia (Jackson, 2000). Estos organismos acuáticos han evolucionado para adaptarse a este tipo de ambientes hipóxicos o anóxicos cambiando su metabolismo a anaerobio, acumulando una mayor concentración de lactato en tejido. Tales son los casos de *Fundulus garndis* (Virani y Rees, 2000), una especie de pez que habita en el Golfo de México y del camarón *Litopenaeus vannamei* (Martínez *et al.*, 2012). Ambas especies marinas fueron expuestas a un tratamiento hipóxico y evidenciaron un incremento en la concentración de lactato comparadas con las mismas especies en normoxia.

En hepatocitos de modelos murinos, se ha estudiado que un decremento en la tasa de respiración ocasionado por la exposición a hipoxia está relacionado con un incremento en la concentración de lactato (Schumacker *et al.*, 1993). En insectos también se ha reportado la acumulación de lactato en tejido cuando son expuestos a hipoxia y anoxia. En el cerebro de insectos del género *Locusta* se reportó una acumulación de lactato de 10 μMoles por g después de 4 horas de anoxia (Lowry *et al.*, 1964). La larva del escarabajo tigre (*Cicindela togata*) logró sobrevivir por más

de 6 días en anoxia disminuyendo su metabolismo y cambiando su metabolismo energético por rutas metabólicas anaerobias (Hoback *et al.*, 2000).

Cuando los niveles de pO_2 decrecen de tal forma que se acercan o van más allá del punto crítico (1.6-3% O_2 , aprox. en *Drosophila*), el insecto comienza a manifestar un repertorio multifacético de defensas en respuesta al estrés, entre estos, una disminución en la tasa de consumo de oxígeno de aproximadamente 20-30% (Krishnan *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 1999) y estupor, que va desde pérdida de coordinación hasta completa inmovilidad (Csik, 1939; Chadwick y Gilmour, 1940). Pasadas las 24 h de tratamiento y de acuerdo a la concentración de gases a la que se sometió *R. dominica*, se observó que todos los insectos se encontraban en posición "Knock down" (decúbito dorsal), lo cual demuestra que los insectos presentaron estupor con la finalidad de disminuir su metabolismo.

La adaptación a la hipoxia implica la habilidad que muestran los insectos de cambiar sus rutas metabólicas de aerobias a anaerobias, así como la habilidad que tienen para atenuar drásticamente su tasa metabólica y de ajustar el volumen de sus traqueas para permitir un mayor consumo de oxígeno (Hoback y Stanley, 2000). Con base en el comportamiento que mostraron los insectos ante el ambiente hipóxico al que se sometieron y de acuerdo a la concentración de lactato que presentó el grupo hipoxia comparado con el grupo control, nuestros resultados confirman que *R. dominica* efectivamente cambió su metabolismo de tal forma que su demanda de ATP fue compensada mediante la producción de esta molécula a través de la ruta de la glucólisis (Boutilier, 2001), en un intento de adaptación a este estresante ambiente.

Electroforesis Bidimensional 2-D PAGE

La electroforesis bidimensional 2-D PAGE es una técnica que es utilizada para determinar cambios a nivel de proteínas individuales en mezclas de complejos proteicos (Mahon y Dupree, 2001). Las tiras IPG tienen la finalidad de llevar a cabo la primera dimensión de la electroforesis que consiste en separar a las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) para posteriormente separarlas acorde a su peso molecular en un gel de poliacrilamida a través de un mapeado con puntos o bandas (Westermeier *et al.*, 1983).

De la primera dimensión se recolectaron 24 muestras por tratamiento, cada una con un pI característico y fueron cargadas en geles de poliacrilamida al 12%. En los geles se inyectó el volumen recuperado de los pozos 4 al 21. Las Figuras 4 y 5 muestran las proteínas que se expresaron en normoxia contra hipoxia de acuerdo a su pI y a su masa molecular. Se llevó a cabo un análisis de intensidad de bandas para determinar si existen diferencias cuantitativas entre el grupo normoxia contra el grupo hipoxia con la finalidad de evaluar su sobreexpresión. La Figura 6 muestra las bandas que se seleccionaron para secuenciar y la Tabla 2 sus características. Finalmente, la Figura 7 muestra las dos bandas que se expresaron en hipoxia con respecto a normoxia (D y E). Con base en el análisis de la Tabla 2, estas bandas fueron seleccionadas, cortadas del gel y obtenida la secuencia espectrometría de masas MS/MS.

El análisis de las bandas A, B y C no muestran diferencias significativas entre tratamientos, caso contrario a la banda F, que mostró sobreexpresión en hipoxia. Las bandas D y E corresponden a proteínas que solamente se sobreexpresaron debido al efecto de la hipoxia, por lo que no se observaron en el grupo de normoxia.

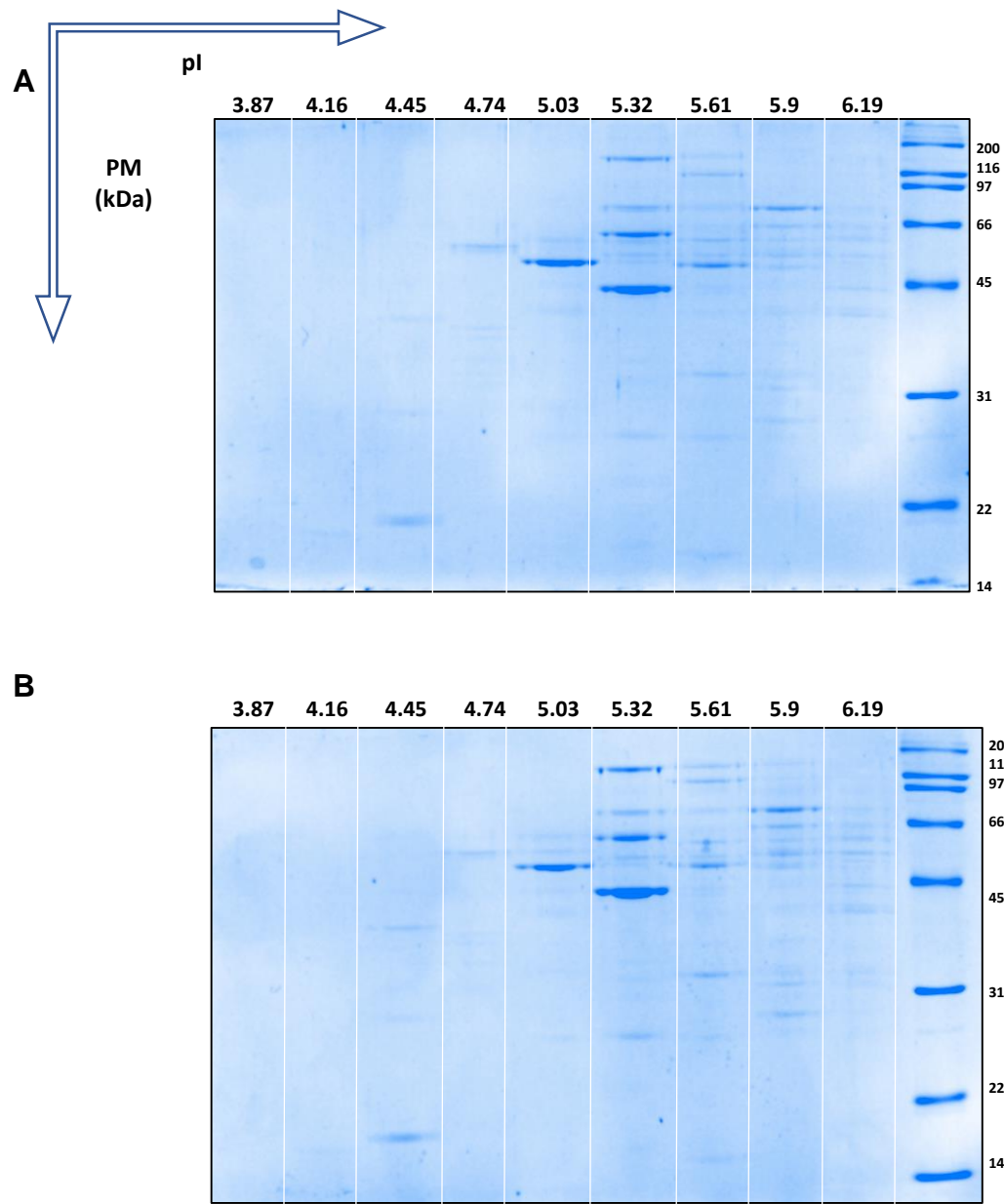


Figura 4. Proteínas mitocondriales de *Rhizopertha dominica* correspondientes a los pI 3.87 a 6.19 separadas por pI y masa molecular. A) Imagen correspondiente al gel de poliacrilamida de la muestra en normoxia y B) Imagen correspondiente al gel de poliacrilamida de la muestra en hipoxia.

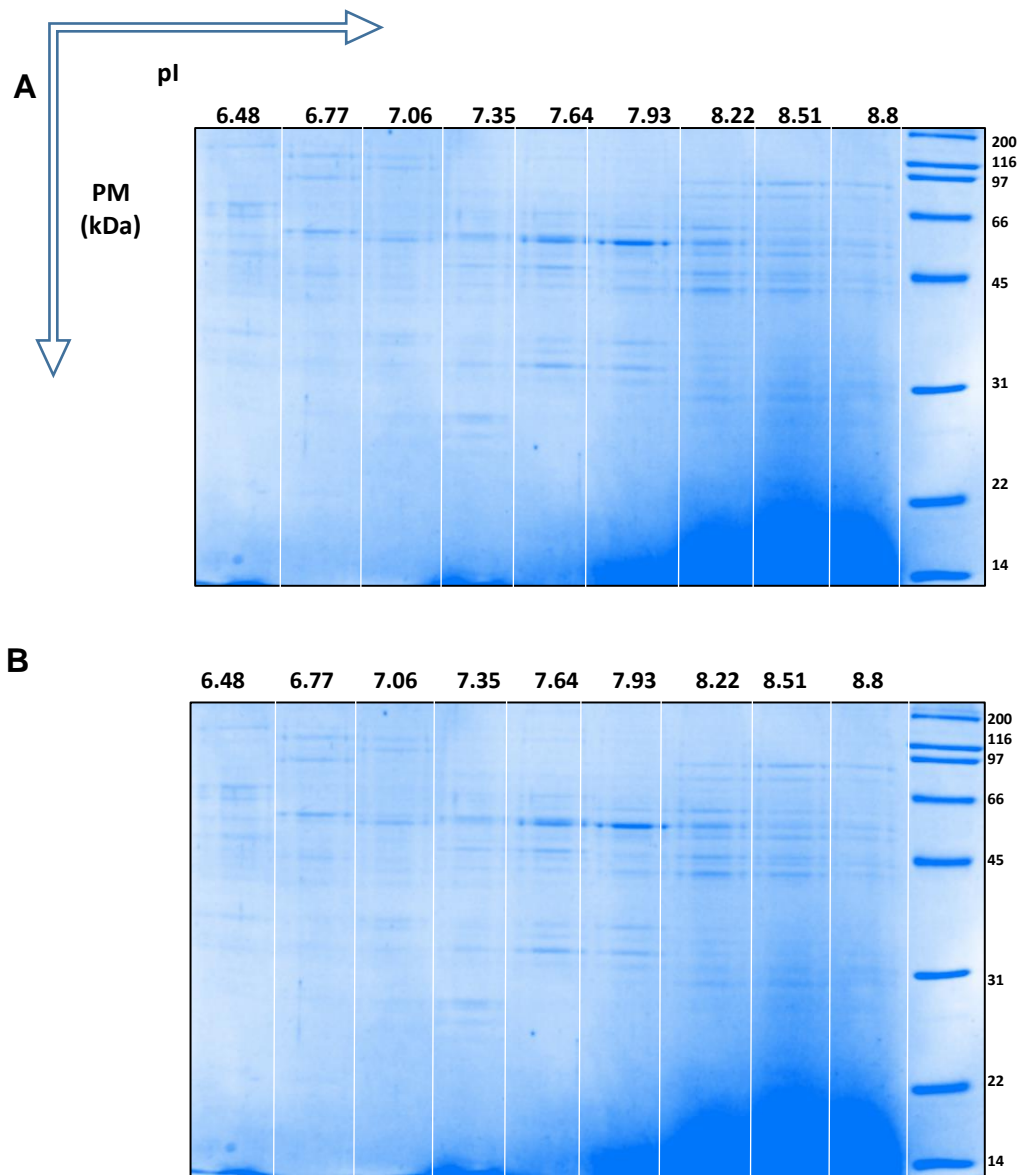


Figura 5. Proteínas mitocondriales de *Rhyzopertha dominica* correspondientes a los pI 6.48 a 8.8 separadas por pI y masa molecular. A) Imagen correspondiente al gel de poliacrilamida de la muestra en normoxia y B) Imagen correspondiente al gel de poliacrilamida de la muestra en hipoxia.

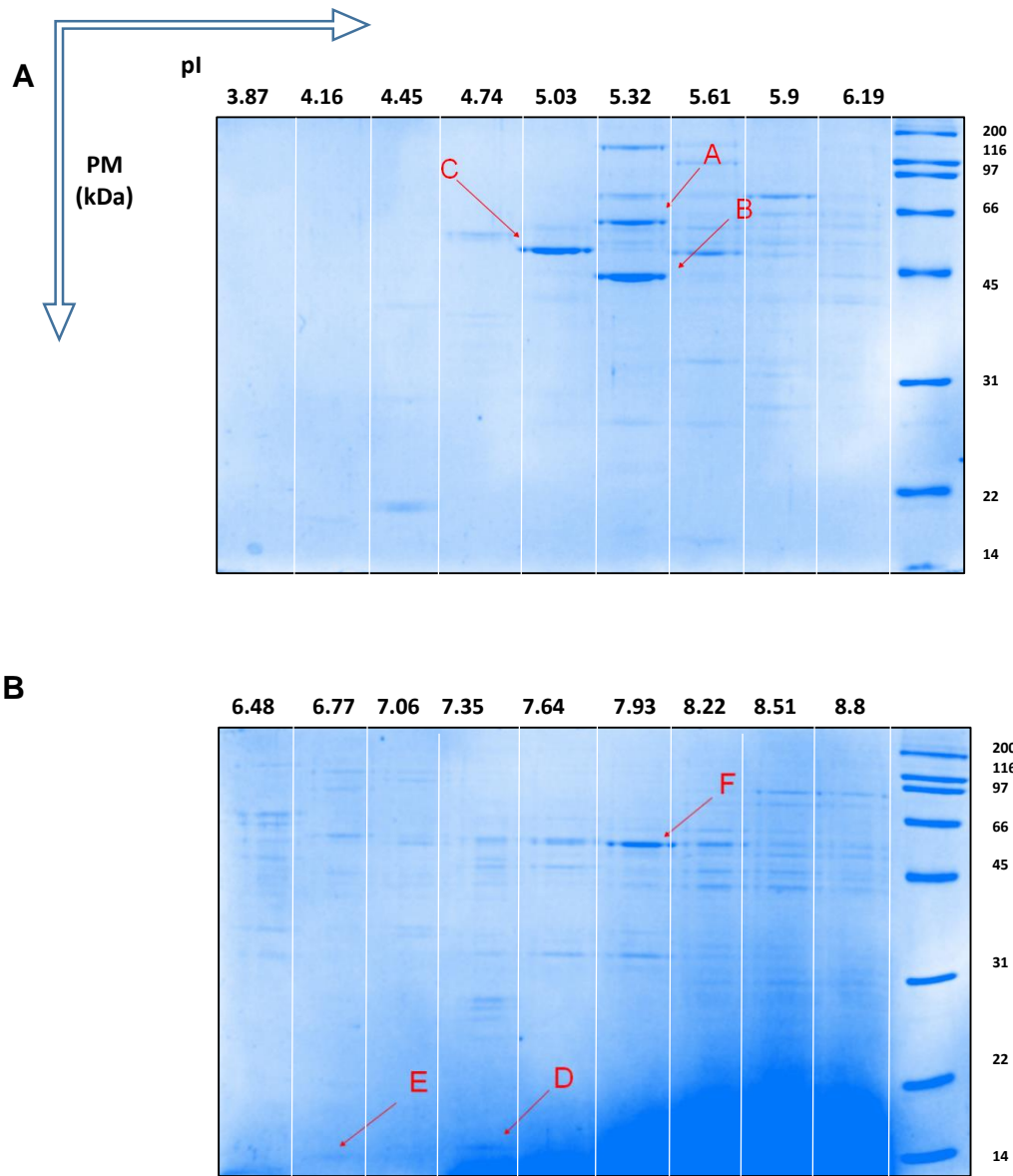


Figura 6. Bandas seleccionadas para obtener su secuencia por LC MS/MS. Las bandas A, B y C del gel A pertenecen al experimento normoxia. Las bandas D, E y F pertenecen al experimento en hipoxia.

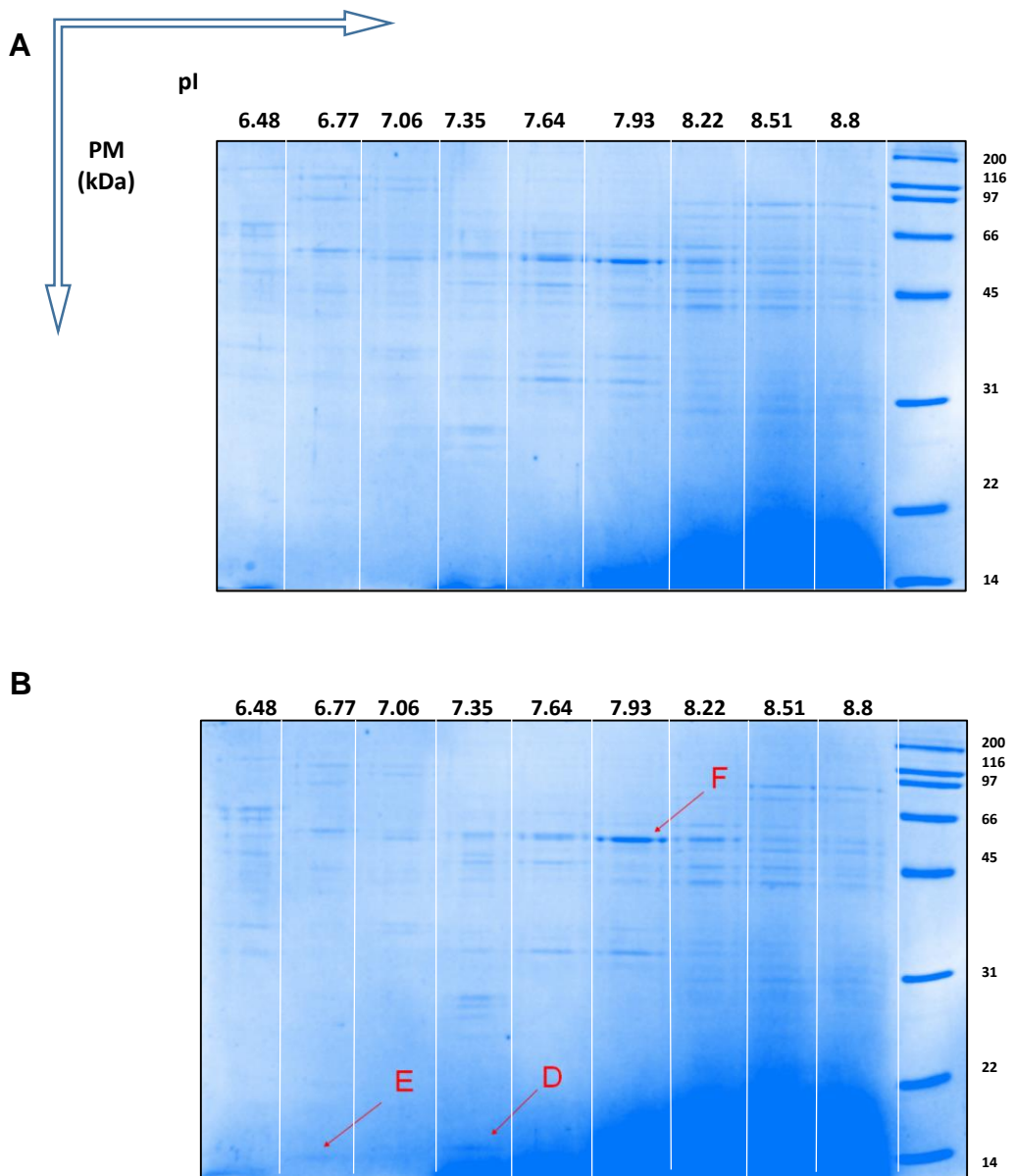


Figura 7. Proteínas sobreexpresadas por el efecto de la hipoxia y normoxia. El gel A corresponde al experimento en normoxia. El gel B corresponde al experimento en hipoxia. Las bandas D y E son proteínas que solamente se expresaron en el tratamiento hipoxia.

Tabla 2. Características de peso molecular (PM), punto isoeléctrico (pI) y número de pixeles (No.Pix) de las bandas seleccionadas para su identificación.

Banda	PM (kDa)	pI	No.Pix Normoxia	No.Pix Hipoxia
A	62.0	5.3	370 ± 14 ^a	419 ± 9.2 ^a
B	44.3	5.3	702 ± 25.5 ^a	781 ± 15.6 ^a
C	51.9	5.0	483 ± 39 ^a	450 ± 17 ^a
D	15.1	7.3	-	225 ± 0
E	14.4	6.7	-	140 ± 0
F	57.3	7.9	435 ± 12.8 ^a	367±10.6 ^b

Diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05)

Identificación de las proteínas por espectrometría de masas MS/MS

Información que data hasta el año 2008, indica que se desconoce el número exacto de proteínas mitocondriales, pero mediante un estimado que combina técnicas de proteómica y bio-informática, se han cuantificado hasta 1098 (Pagliarini *et al.*, 2008).

En la espectrometría de masas MS/MS, para cada combinación de proteínas se calcula una puntuación total. Este número refleja las puntuaciones que se observaron de todos los espectros de masas que pueden coincidir con la secuencia de aminoácidos dentro de una proteína. Entre más alta es la puntuación (>20), mayor es la confiabilidad en la secuencia (Matrix Science. Accedido el 1 de julio de 2017). Los resultados de la secuenciación de las bandas mostraron que todas las proteínas tuvieron una puntuación mayor que 20, además de que coincidieron con diferentes géneros de coleópteros. Se obtuvieron 10 péptidos por muestra y sus espectros correspondieron en el caso de la banda A: una proteína de choque térmico que se asoció a *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la papa), con una puntuación de 124.05; banda B: un fragmento de actina que se asoció con el escarabajo *Merizodus soledadinus*, con una puntuación de 279.89; banda C: una subunidad β de la enzima ATP sintasa asociada al escarabajo *Oryctes borbonicus*, con una puntuación de 407.76; banda D: un fragmento de la subunidad β de la ATP sintasa asociada al escarabajo anterior, con una puntuación de 76.72; banda E: un fragmento de la subunidad β de la ATP sintasa del mismo insecto con una puntuación de 31.17 y banda F: una subunidad α de la ATP sintasa asociada a *Triboliumm castaeum* (gorgojo de la harina), con una puntuación de 49.76.

Las proteínas de choque térmico (*hsps*, por sus siglas en inglés) se encargan de proteger a las células eucariotas del daño celular. La síntesis de la mayor parte de las proteínas en insectos decrece cuando estos son expuestos a estresores como la temperatura y la baja concentración de oxígeno, mientras que la síntesis de proteínas de choque térmico aumenta (Sahebzadeh y Lau, 2017), lo cual coincide con un mayor número de píxeles en las bandas de nuestro experimento en normoxia con respecto a hipoxia (Tabla 2). Las *hsps* se clasifican de acuerdo a su peso

molecular en kDa en *hsp40*, *hsp60*, *hsp 70*, *hsp90*, *hsp100* y en pequeñas *hsp* (*shsp*) (Carmel *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por Sun *et al.* (2014), en el cual se analizaron los diferentes tejidos y estadios de desarrollo de la palomilla *Sesamia inferes*, encontraron que la expresión de tres *shsp* se ve modulada en respuesta al estrés térmico por el frío. La proteína A que se expresó en el tratamiento de hipoxia fue una proteína clasificada como *hsp60*, pues su PM es de 62 kDa. De acuerdo con lo reportado con Szabo *et al.* (1996) y King y MacRae (2015), las proteínas *hsp60*, *hsp70* y *hsp90* se encargan de plegar y degradar proteínas dependientes de ATP y cuando las concentraciones de esta molécula son bajas, en lugar de plegarlas y degradarlas, podrían secuestrarlas y almacenarlas (King y MacRae, 2015). Es posible que las bajas concentraciones de oxígeno a las que fue sometido el insecto *R. dominica* hayan ocasionado una disminución de ATP y la expresión de la *hsp60*, en un intento por mantener la homeostasis celular, protegiendo a las proteínas de desnaturalizaciones irreversibles e interfiriendo con su plegamiento.

El resultado de la secuenciación de la banda B reveló ser un fragmento de actina. La actina es una de las proteínas intracelulares más abundantes y evolutivamente conservadas. Puede existir en forma globular y de filamentos y esta involucrada en una gran variedad de procesos biológicos como contracción muscular, movilidad celular, división celular, como organelo de movimiento y como señalización celular (Sandiford *et al.*, 2015). De acuerdo con Zieseniss (2014), la regulación dinámica del citoesqueleto de actina durante la hipoxia es compleja. Varía en diferentes células y tejidos y también depende del nivel de hipoxia. En un estudio realizado por Glass *et al.* (2015), en el cual se sometieron a hipoxia (1 % O₂, 5 % CO₂) células con neuroblastoma, se reportó un incremento significativo en la anchura y longitud de los filamentos de actina, concluyendo que la hipoxia claramente induce cambios en la organización de la actina en este tipo de células cancerígenas con respecto a los mismos cultivos en normoxa. Nuestros resultados, de acuerdo al número de píxeles, muestran una tendencia a la sobreexpresión de la actina, sin embargo,

estadísticamente no hubo diferencia entre tratamientos (Tabla 2). Es posible que un mayor tiempo de exposición a hipoxia hubiera ocasionado una sobreexpresión de esta proteína ocasionada por las bajas concentraciones de oxígeno, con la finalidad de preparar a las mitocondrias ante posibles situaciones de movilización, reproducción y señalización celular como respuesta al estrés por la falta de oxígeno.

La mayoría de los animales, en alguna etapa de su vida experimentan algún tipo de daño ocasionado por la hipoxia, ya sea por exposición al ambiente o a través de insuficiencias metabólicas, respiratorias y/o circulatorias. La clave para la supervivencia a tales condiciones yace en disminuir su tasa metabólica celular hacia un nuevo estado hipometabólico, de tal forma que puedan compensar la demanda de ATP con las rutas metabólicas que lo suministran (Boutilier, 2001). En condiciones de normoxia, la enzima ATP sintasa es responsable de catalizar la fosforilación del ADP para sintetizar ATP aprovechando el gradiente electroquímico que se genera por la cadena de transporte de electrones como el último paso de la fosforilación oxidativa. Bajo el efecto de la hipoxia, esta proteína funciona en forma reversible, hidrolizando el ATP, reestableciendo el equilibrio quimiosmótico entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Solaini y Harris, 2005). Sin embargo, la degradación del ATP debe ser estrictamente regulada para evitar la depleción de esta molécula. Esto se logra mediante una enzima llamada IF1, que se une a la porción catalítica F1, formada por las subunidades α y β , lo cual conlleva a una rápida y reversible inhibición de la enzima (Bosetti *et al.*, 2000).

Los resultados de la secuenciación de las bandas D y E resultaron ser fragmentos de la subunidad β de la enzima ATP sintasa, sin embargo, la banda C evidenció la expresión de una subunidad β de la misma enzima y la banda F una subunidad α . Se sabe que la porción catalítica de la enzima ATP sintasa esta en el dominio F1, específicamente en las subunidades β y en la interfase con una subunidad α adyacente, por lo que se atribuye que la porción catalítica de esta enzima se encuentra en las subunidades α/β (Noji *et al.*, 1997). Resultados similares también fueron reportados por Chen *et al.* (2012), quienes encontraron la sobreexpresión de

una subunidad α de la enzima ATP sintasa en células de mamíferos sometidos a hipoxia con respecto a las mismas en normoxia.

A pesar de que no hubo diferencias entre tratamientos, la banda C mostró un menor número menor de pixeles en hipoxia con respecto a normoxia (Tabla 2), lo cual podría indicar una tendencia hacia una menor actividad en la subunidad catalítica β , pues se ha estudiado que cuando los insectos son sometidos a hipoxia muestran una disminución en la producción de ATP (Hochachka, 1986), evidenciando que las bajas concentraciones de oxígeno tienen un claro efecto sobre las proteínas involucradas en la producción de esta molécula, lo cual ya ha sido reportado por Chen *et al.* (2012).

Las ATPasas tienen secuencias peptídicas altamente conservadas llamadas motivos. Estos motivos se conocen como Walker A y Walker B y son regiones en donde se lleva a cabo la unión del ATP. En la enzima ATP sintasa, el motivo Walker A se presenta en forma de *loop* y se encarga de conectar la subunidad β_1 con la subunidad α_1 . Lo componen un aminoácido glicina, cuatro aminoácidos indistintos y finalmente una glicina, una lisina y una treonina (GXXXXGKT, donde X representa cualquier aminoácido). El motivo Walker B se compone de 4 aminoácidos hidrofóbicos y un ácido aspártico (ZZZZD, donde Z representa a cualquier aminoácido hidrofóbico) y se localiza en la subunidad β . Además de los motivos, las ATPasas están conformadas por tres dominios: el dominio ATP-synt_ab_N, que indica la dirección amino terminal, el dominio central (dominio de unión a nucleótidos) ATP-synt_ab, en el que también se localizan los motivos y el dominio ATP-synt_ab_C, que marca la dirección carboxilo terminal (Muneyuqui *et al.*, 1999).

Debido a que se lograron identificar las subunidades catalíticas α y β de la enzima ATP sintasa de *R. dominica*, se llevó a cabo un alineamiento múltiple con diferentes insectos para relacionar los péptidos obtenidos por LC MS/MS dentro de las secuencias reportadas de la subunidad α de *Triboliumm castaneum* y de la subunidad β de *Oryctes borbonicus* (Figuras 8 y 9, respectivamente). Los distintos

insectos con los que se realizó el alineamiento, así como el porcentaje de identidad y los números de acceso se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Información de los diferentes insectos con los que se realizó el alineamiento múltiple de las subunidades catalíticas α y β de la enzima ATP sintasa

Insecto	Nombre común	Subunidad	Identidad (%)	No. Acceso
<i>Tribolium castaneum</i>	Gorgojo de la harina	α	100	XP_966334.1
<i>Apis mellifera</i>	Abeja europea	α	85	XP_392639.1
<i>Drosophila navojoa</i>	-	α	89	XP_017961732.1
<i>Locusta migratoria</i>	Langosta migratoria	α	89	AGO59887.1
<i>Helicoverpa armigera</i>	Gusano cogollero	α	89	XP_021193200.1
<i>Aedes albopictus</i>	Mosquito tigre	α	89	XP_019554378.1
<i>Oryctes borbonicus</i>	-	β	100	KRT85479.1
<i>Apis mellifera</i>	Abeja europea	β	90	XP_006564892.1
<i>Drosophila navojoa</i>	-	β	97	XP_017962727.1
<i>Helicoverpa armigera</i>	Gusano cogoyero	β	90	XP_021187000.1
<i>Tribolium castaneum</i>	Gorgojo de la harina	β	94	NP_001164361.1

<i>T. castaneum</i>	LKKIVSDFISTFSG----	551
<i>A. mellifera</i>	LKQVVTDFLASFSG----	547
<i>D. navoja</i>	LKDIVQKFMSTFQG----	550
<i>L. migratoria</i>	LKKIVTDFVANFQG----	551
<i>H. armigera</i>	LKKIVSDFLATFTQAASR	558
<i>A. albopictus</i>	LKNVVTSEFMSTFSG----	551
	**.:* .*:.*	

Figura 8. Alineamiento de la subunidad α de la enzima ATP sintasa de diferentes insectos y localización de los dominios y motivos conservados. Los residuos sombreados con gris representan las cadenas peptídicas resultantes del análisis LC MS/MS. Los residuos subrayados indican los tres dominios conservados. Los residuos enmarcados indican los motivos Walker A y Walker B.

En la secuencia peptídica de la subunidad α se localizaron los dominios conservados: a) el dominio ATP-synt_ab_N de la posición 68 a la 133; b) el dominio central ATP-synt_ab de la posición 134 a la 416; c) el dominio ATP-synt_ab_C de la posición 425 a la 509, así como los motivos Walker A de la posición 210 a la 217 (GDRQTGKT) y Walker B, de la posición 306 a la 310 (LIYD). Una de las secuencias peptídicas obtenidas por LC MS/MS coincidió en parte con el motivo Walker A (QTGKT), mientras que la secuencia peptídica que indica el motivo Walker B (LIYD) coincidió completamente dentro del alineamiento. Ambos motivos resultaron ser conservados entre los diferentes insectos con los que se llevó a cabo el alineamiento (Figura 8).

En la secuencia peptídica de la subunidad β se localizaron los dominios conservados: a) el dominio ATP-synt_ab_N de la posición 55 a la 121; b) el dominio central ATP-synt_ab de la posición 123 a la 402; c) el dominio ATP-synt_ab_C de la posición 410 a la 482, así como los motivos Walker A de la posición 199 a la 205 (GAGVGKT) y Walker B, de la posición 294 a la 298 (LLFID). El motivo Walker A coincide en el último aminoácido (T) con una de las secuencias peptídicas identificadas por LC MS/MS, sin embargo, ambos motivos resultaron ser conservados entre los diferentes insectos con los que se realizó el alineamiento (Figura 9).

Evaluación de la Actividad Citocromo c oxidasa

El complejo IV mitocondrial resulta crucial para completar el mecanismo del transporte de electrones y fosforilación oxidativa, debido a que es la enzima donde se fija el oxígeno encargado de captar a los electrones transportados a lo largo de este proceso bioquímico. Sin oxígeno, el complejo mitocondrial citocromo c oxidasa no puede funcionar correctamente y eventualmente el mecanismo de la cadena de transporte de electrones se detendrá. Esto provocará una acumulación de protones dentro de la matriz mitocondrial y a su vez, un desequilibrio en el potencial de membrana mitocondrial, provocando a la muerte celular (Griffiths *et al.*, 2012, Galli *et al.*, 2014).

La alteración de las funciones mitocondriales, sobre todo de la función de la actividad COX, son factores importantes en la modulación de la generación y gasto de energía durante la adaptación a la hipoxia (Luo *et al.*, 2008). Durante hipoxias agudas (menos de 30 minutos), la respiración celular es independiente de la concentración de oxígeno siempre y cuando la pO_2 se mantenga por encima del punto crítico (5-10 Torr) (Chandel *et al.*, 1995). Por debajo de 3-6 Torr, la difusión de oxígeno en la mitocondria comienza a limitar la fosforilación oxidativa (Jones *et al.*, 1978).

Diversos estudios han reportado que la actividad de la enzima Citocromo c oxidasa en organismos expuestos a hipoxia se ve modificada. Se ha estudiado que en células de la corteza cerebral de ratones machos expuestos a hipoxia, la actividad COX decrece un 17%. Estos resultados sugieren que bajo estas condiciones, la reducción de las actividades mitocondriales es causada, en parte, por alteraciones enzimáticas en la cadena de transporte de electrones, en los complejos I y IV (Chavez *et al.*, 1995). Resultados similares fueron reportados por LaManna *et al.* (1996) en ratas sometidas a hipoxia, las cuales mostraron un descenso en la actividad COX del 16 al 27%. De manera similar, en monocitos macrófagos de modelos murinos sometidos a hipoxia (0.1% O_2 y 5% CO_2 , 6-12 h), se ha encontrado que el contenido de subunidades de COX se altera: un decremento en el hemo aa_3

mitocondrial, así como en las subunidades I, IV y Vb, sin embargo, la eficiencia catalítica de la enzima se mantiene casi igual con respecto a normoxia (21% O₂ y 5% CO₂) (Vijayarathy *et al.*, 2003).

Haciendo énfasis en insectos, McMullen *et al.* (2007), reportaron que en el saltamontes *Epiblema scudderiana* expuesto a hipoxia, la actividad COX decrece significativamente, sugiriendo que uno de los mecanismos involucrados en la inhibición de la actividad de esta enzima en respuesta a la hipoxia, puede deberse a una reducción en la síntesis de las subunidades de la citocromo c oxidasa. Por el contrario, Gómez *et al.*, (2016), después de evaluar cualitativamente a *R. dominica* en un bioensayo de AM que consistió en 5% de oxígeno y 10% de dióxido de carbono durante 12 y 24 horas, observaron cambios en la actividad enzimática de la COX con respecto al tratamiento control (normoxia). Los resultados sugirieron que durante las primeras 12 horas de exposición a hipoxia, este insecto muestra un incremento en la actividad COX, lo cual sugiere una adecuación del insecto después de largos períodos de tiempo de exposición. Resultados similares fueron reportados por Zhang *et al.* (2013), quienes encontraron un incremento en la actividad COX en un saltamontes que vive en condiciones naturales de hipoxia.

Nuestros resultados mostraron un incremento en la actividad COX del 50.1% en el grupo hipoxia comparado con el grupo normoxia (Figura 10), lo cual coincide con lo reportado por Gómez *et al.* (2016) y Zhang *et al.* (2013). De acuerdo a lo reportado por Adis y Messner (1997), algunos miembros del orden de los coleópteros son capaces de sobrevivir a ambientes que van desde nulas a bajas concentraciones de oxígeno. Tal es el caso del escarabajo tigre sudamericano (*Oxycheila polita*), que es capaz de sobrevivir hasta por 6 minutos sumergido en el agua, o el escarabajo tigre (*Megacephala sobrina*), quien logra sobrevivir por debajo del agua (encerrado en una burbuja) de 24 a 30 horas. Los insectos han colonizado también ambientes con altitudes superiores a los 6,000 metros sobre el nivel del mar; conforme la elevación aumenta, la presión atmosférica y el porcentaje de oxígeno disminuyen (9.5% O₂). La diferencia entre insectos que viven en condiciones de normoxia e

insectos que viven en condiciones naturales de hipoxia yace en la adaptación por parte de estos últimos (Mani, 2013). En 2009, Feala *et al.* llevaron a cabo un estudio en moscas del género *Drosophila*, en el cual midieron la producción de ATP de moscas adaptadas y no adaptadas a la hipoxia, observando una mayor producción de dicha molécula y un consumo de oxígeno más bajo en el grupo de moscas adaptadas a las bajas concentraciones de oxígeno.

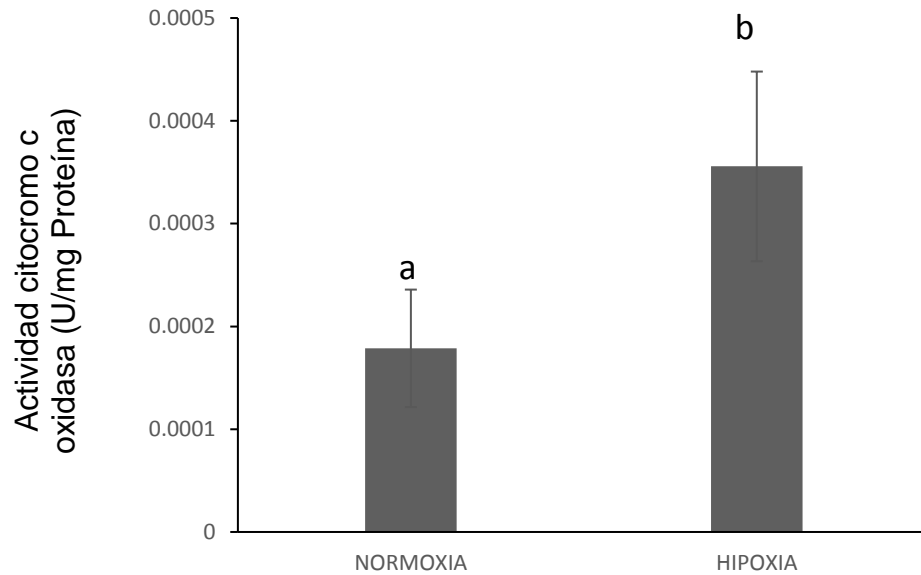


Figura 10. Actividad enzimática de la enzima citocromo c oxidasa de *R. dominica* en condiciones de normoxia e hipoxia. Los datos corresponden a las medias \pm DE de tres observaciones. Diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

El mejoramiento en la función catalítica de la actividad COX que mostró *R. dominica* sugiere una adecuación del insecto para enfrentar el ambiente hipóxico al que se expuso. Lo anterior concuerda por lo reportado por Zhang *et al.* (2013), en donde se mostró que el aumento en la actividad COX del saltamontes *Locusta migratoria* es ocasionado por la elevada eficiencia catalítica de la enzima, resultado del incremento en la afinidad del ferrocitocromo c y del incremento en el transporte de electrones, confiriendo una mayor “robustez” a la enzima COX para soportar ambientes de bajas concentraciones de oxígeno.

Evaluación de la Actividad ATPasa

La respiración celular se determina por la actividad metabólica y por la correspondiente tasa de utilización de ATP (Chandel, 1997). Una de las principales respuestas o mecanismos de defensa contra la privación de oxígeno es regular la eficiencia en la producción de esta molécula (Hochachka, 1986). Hipoxias prolongadas ocasionan daño a la mitocondria e inhiben la actividad de la cadena de transporte de electrones y el bombeo de protones hacia el espacio intermembrana, ocasionando la depleción de las reservas de ATP y la acidificación de la matriz mitocondrial (Griffiths, 2012; Huag *et al.*, 2013).

Las ATPasas son proteínas que necesitan la energía liberada de la hidrólisis del ATP para poder llevar a cabo su correcto funcionamiento. Pueden funcionar como bombas impulsadoras de protones o pueden sintetizar ATP, utilizando el gradiente iónico transmembranal (Lapierre *et al.*, 2006). Esta importante familia de proteínas transportadoras de iones se ha dividido en 3 familias: 1) A-ATPasas: que se encuentran principalmente en arqueas; 2) F-ATPasa: se encuentran en mitocondrias, plásmidos y bacterias y C) V-ATPasas en eucariotas, principalmente en vacuolas (Harvey, 1992).

La actividad ATPasa en *R. dominica* sometida a hipoxia ha sido evaluada de manera cualitativa por Gómez *et al.* (2016), en un experimento en el que se sometió a este insecto a un tratamiento durante 12 y 24 h con las concentraciones de gases de 5%

de O₂ y 10% CO₂. No se encontraron diferencias entre 12 y 24 h de tratamiento, sin embargo, el grupo normoxia mostró mayor actividad ATPasa de este insecto comparado con el grupo expuesto a hipoxia, lo cual podría sugerir que *R. dominica* sometida a bajas concentraciones de oxígeno tiende a suprimir la actividad del complejo V en un intento por disminuir su metabolismo y su demanda de energía (Mitcham *et al.*, 2006). Contrariamente, Martínez *et al.* (2012), después de exponer durante 10 horas de hipoxia (1.5-2.0 mg oxígeno/L) al camarón *Litopenaeus vannamei*, detectaron un incremento en la actividad ATPasa del 70% con respecto a los mismos camarones en normoxia. Por otro lado, Scholz y Balaban (1994), reportaron que la actividad ATPasa de miocardio canino expuesto a 10 minutos de hipoxia no mostró cambios significativos con respecto a normoxia.

En células eucariotas, existe una proteína que se une a la enzima ATP sintasa con el objetivo de inmovilizarla para inhibir su actividad, llamada IF1 (Burwick *et al.*, 2004). La proteína activa es un dímero en forma de hélice α . En bovinos consta de 84 residuos de aminoácidos. A un pH de 6.5, la secuencia del residuo N-terminal se une a la porción F1 de la ATP sintasa, interfiriendo con la rotación del tallo central (subunidad γ) y evitando cambios conformacionales de las subunidades catalíticas α/β (Jackson *et al.*, 1988; Mimura *et al.*, 1993) para detener su movimiento hidrolítico de ATP y reestablecer el equilibrio quimiosmótico (Cabezón *et al.*, 2003; Cabezón *et al.*, 2000). En ratas, esta proteína contiene 82 aminoácidos y reacciona cuando la ATP sintasa hidroliza el ATP, inhibiendo hasta un 90% de la actividad ATPasa (Huang *et al.*, 2007). Se ha estudiado que la remoción de esta proteína en hígado de ratas y en corazón de bovinos, incrementa la actividad ATPasa de esta enzima (García *et al.*, 2006).

En la Figura 11 se muestra la actividad enzimática ATPasa de *R. dominica* sometida a hipoxia con respecto a normoxia. Como se puede observar, la actividad ATPasa de insectos sometidos a hipoxia muestra un descenso del 59% con respecto al experimento en normoxia, lo cual coincide con lo reportado por Gómez *et al.* en el 2016. Durante períodos prolongados de ambientes con baja concentración de oxígeno, la enzima ATP sintasa, que produce ATP, gira en sentido contrario para hidrolizarlo en ADP + Pi, bombeando protones al espacio intermembrana en un intento por reestablecer el equilibrio quimiosmótico. Sin embargo, si se sigue hidrolizando el ATP, eventualmente las reservas de esta molécula se agotarán y todo proceso dependiente de energía cesará. Como se mencionó anteriormente, los organismos eucariontes tienen una proteína llamada proteína inhibidora IF1, que es un dímero encargado de bloquear el funcionamiento rotatorio de la enzima ATP sintasa, evitando así tanto la hidrólisis como la síntesis de ATP (Galli *et al.*, 2014).

La concentración de lactato fue más elevada en los insectos expuestos a hipoxia, por lo que podemos asumir que *R. dominica*, al cambiar su metabolismo a anaerobio, sufrió una acidosis láctica, lo cual ocasionó valores de pH en tejido por debajo de 6.5. De manera similar, el desequilibrio quimiosmótico entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana se perdió, y al no continuar el bombeo de protones, se acidificó la matriz mitocondrial con valores de pH también por debajo de 6.5, generándose las condiciones adecuadas para la activación de la proteína IF1. Es posible que debido a lo anteriormente mencionado, la disminución en la actividad ATPasa se haya debido a que se inhibió la enzima ATP sintasa mediante la proteína IF1, para evitar la degradación del ATP, para que esta molécula pueda seguir funcionando para llevar a cabo procesos dependientes de energía.

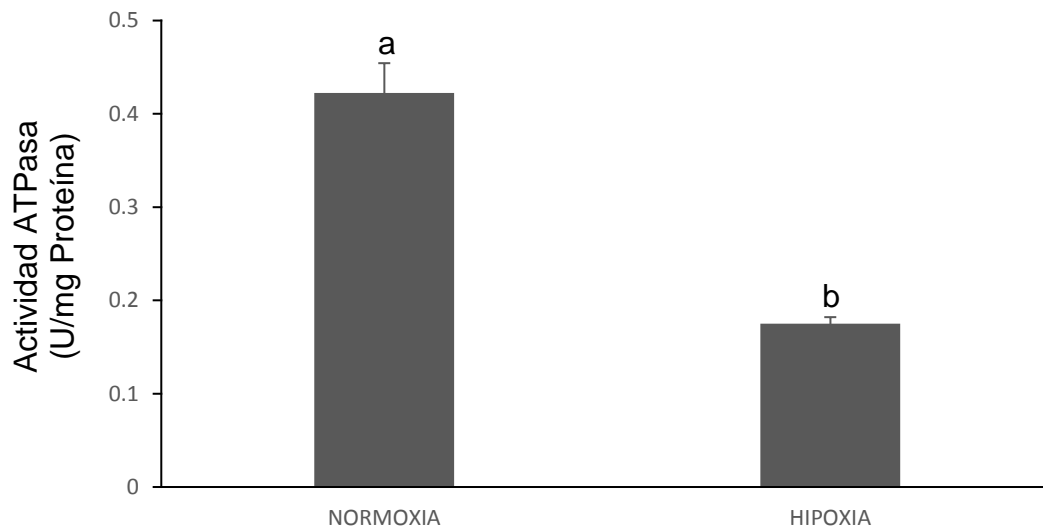


Figura 11. Evaluación de la actividad ATPasa de *R. dominica* en condiciones de normoxia e hipoxia. Diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$).

CONCLUSIÓN

El incremento en la concentración de lactato confirma que la baja concentración de oxígeno provocó que el insecto cambiara su metabolismo de aerobio a anaerobio. Lo cual podría estar relacionado con el incremento en la actividad enzimática de COX y la disminución en la actividad ATPasa. Así, con base en los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas y de las proteínas que se expresaron por el efecto de la hipoxia contra normoxia, se da certeza a la hipótesis planteada, pues se modificaron las actividades enzimáticas COX y ATPasa, además de que se reportó sobreexpresión de la subunidad α de la enzima ATP sintasa. Finalmente, se lograron identificar las subunidades catalíticas ATP α y ATP β del complejo V de *Rhyzoperta dominica*.

RECOMENDACIONES

Además de hacer la separación de las proteínas mitocondriales de *R. dominica* en tiras IPG con un rango de pH de 3 a 10, utilizar tiras IPG con un pH de 7 a 10 para lograr una mayor resolución en el gel de poliacrilamida con la finalidad de evidenciar las proteínas que se encuentran en ese rango. Además de 24 horas, se recomienda utilizar tratamientos de 12 y 48 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adis, J., Messner, B., (1997). Adaptations to life underwater: tiger beetles and millipedes. *Ecological Studies* 126, 319–330.
- Ahmad, F., Ridley, A. W., Daglish, G. J., Burrill, P. R., & Walter, G. H. (2013). Response of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* to various resources, near and far from grain storage. *Journal of Applied Entomology*, 137(10), 773-781.
- Alberts, B., & Bray, D. (2006). Introducción a la biología celular. Ed. Médica Panamericana.
- Anderson, J. A., & ALCOCK, A. W. (1954). Storage of cereal grains and their products. *Storage of cereal grains and their products*. American Association of Cereal Chemists.
- Arthur, F., Starkus, L., Smith, C., & Phillips, T. (2013). Methodology for determining susceptibility of rough rice to *Rhyzopertha dominica* and *Sitotroga cerealella*. *Journal of Pest Science*, 86(3), 499-505.
- Avilés Pacheco, R., Sotomayor Sánchez, E., Sánchez, G. G., & Martínez Suárez, Y. (2008). Ciclo biológico de *Rhyzopertha dominica* (F.) en semillas de arroz sometidas a cuatro temperaturas. *Fitosanidad*, 12(4).
- Barreiro, J. A., & Sandoval, A. J. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Equinoccio.
- Beckett, S. J., Morton, R., & Darby, J. A. (1998). The mortality of *Rhyzopertha dominica* (F.)(Coleoptera: Bostrychidae) and *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae) at moderate temperatures. *Journal of Stored Products Research*, 34(4), 363-376.
- Belda, C., & Riudavets, J. (2012). Reproduction of the parasitoids *Anisopteromalus calandrae* (Howard) and *Lariophagus distinguendus* (Förster) on arenas containing a mixed population of the coleopteran pests *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica*. *Journal of Pest Science*, 85(3), 381-385.
- Blomberg, M. R. A., & Siegbahn, P. E. M. (2014). Proton pumping in cytochrome c

- oxidase: Energetic requirements and the role of two proton channels. *BBA - Bioenergetics*, 1837(7), 1165-1177.
- Bunn, H. F., & Poyton, R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological reviews*, 76(3), 839-885.
- Burke, P. V., & Poyton, R. O. (1998). Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase. *Journal of Experimental Biology*, 201(8), 1163-1175.
- Burke, P. V., Raitt, D. C., Allen, L. A., Kellogg, E. A., & Poyton, R. O. (1997). Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14705-14712.
- Burkett, B. N., & Schneiderman, H. A. (1974). Roles of oxygen and carbon dioxide in the control of spiracular function in *Cecropia pupae*. *The Biological Bulletin*, 147(2), 274-293.
- Bosetti, F., Yu, G., Zucchi, R., Ronca-Testoni, S., & Solaini, G. (2000). Myocardial ischemic preconditioning and mitochondrial F1F0-ATPase activity. *Molecular and cellular biochemistry*, 215(1), 31-38.
- Boutillier, R. G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *Journal of Experimental Biology*, 204(18), 3171-3181.
- Burwick, N. R., Wahl, M. L., Fang, J., Zhong, Z., Moser, T. L., Li, B., ... & Pizzo, S. V. (2005). An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiotensin on the endothelial cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1740-1745.
- Cabezón, E., Butler, P. J. G., Runswick, M. J., & Walker, J. E. (2000). Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25460-25464.
- Cabezón, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(9), 744-750.
- Campbell, J. F., & Hagstrum, D. W. (2002). Patch exploitation by *Tribolium castaneum*: movement patterns, distribution, and oviposition. *Journal of Stored Products Research*, 38(1), 55-68.

- Cano-Estrada, G.-H. D. (2011). F1-F0-ATP Sintasa y sus diferencias estructurales. *REB*, (3), 98-108.
- Carmel, J., Rashkovetsky, E., Nevo, E., & Korol, A. (2011). Differential expression of small heat shock protein genes Hsp23 and Hsp40, and heat shock gene Hsr-omega in fruit flies (*Drosophila melanogaster*) along a microclimatic gradient. *Journal of Heredity*, 102(5), 593-603.
- Carroll, J., Shannon, R. J., Fearnley, I. M., Walker, J. E., & Hirst, J. (2002). Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I Identification of two new subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50311-50317.
- Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual review of biochemistry*, 72(1), 77-109.
- Cespón, M. F., Martínez Curbelo, G., Varela, D. C., & Barrera García, A. (2015). Control de la temperatura para la prevención de plagas poscosecha en la conservación de granos. *Temperature control for preventing postharvest plagues in grain conservation*, 33(2), 216-237.
- Cingolani, G., & Duncan, T. M. (2011). Structure of the ATP synthase catalytic complex (F1) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(6), 701-707. doi:10.1038/nsmb.2058.
- Cisneros, F., Alcázar, J., & Palacios, M. O. Ortiz. 1995. Una estrategia para el desarrollo e implementación del Manejo integrado de plagas. CIP-Circular. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú, 21(3), 2-7.
- Chadwick, L. E., & Gilmour, D. (1940). Respiration during flight in *Drosophila repleta* Wollaston: the oxygen consumption considered in relation to the wing-rate. *Physiological Zoology*, 13(4), 398-410.
- Chandel, N. A, Budinger, G. R., Kemp, R. A., & Schumacker, P. T. (1995). Inhibition of cytochrome-c oxidase activity during prolonged hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 268(6), L918-L925.
- Chandel, N. S., Budinger, G. S., Choe, S. H., & Schumacker, P. T. (1997). Cellular respiration during hypoxia role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18808-18816.

- Chávez, J. C., Pichiule, P., Boero, J., & Arregui, A. (1995). Reduced mitochondrial respiration in mouse cerebral cortex during chronic hypoxia. *Neuroscience letters*, 193(3), 169-172.
- 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.
- Clanton, T. L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102(6), 2379-2388.
- Conyers, S. T., & Bell, C. H. (2007). A novel use of modified atmospheres: Storage insect population control. *Journal of Stored Products Research*, 43(4), 367-374.
- Csik, L. (1940). The susceptibility to oxygen want of different *Drosophila* species. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 27(2), 304-310.
- Danks, H. V. (1987). Insect dormancy: an ecological perspective (Vol. 1, pp. 439-439). *Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods)*.
- Diaz, R. J., & Breitburg, D. L. (2009). The hypoxic environment. *Fish physiology*, 27, 1-23.
- Domínguez Umpiérrez, J. E., & Marrero Artabe, L. (2010). Catálogo de la entomofauna asociada a almacenes de alimentos en la provincia de Matanzas. *Fitosanidad*, 14(2), 75-82.
- Eissa, F. I., Zidan, N. E.-H. A., Hashem, M. Y., & Ahmed, S. S. (2014). Insecticidal efficacy of certain bio-insecticides, diatomaceous earth and modified atmospheres against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) on stored wheat. *Journal of Stored Products Research*, 57, 30-35.
- FAO. (2015). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [Documento WWW]. Recuperado: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- Faroni, L. R. A., & García-Mari, F. (1992). Influencia de la temperatura sobre los parámetros biológicos de *Rhyzopertha dominica* (F.). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 18(2), 455-467.

- Feala, J. D., Coquin, L., McCulloch, A. D., & Paternostro, G. (2007). Flexibility in energy metabolism supports hypoxia tolerance in *Drosophila* flight muscle: metabolomic and computational systems analysis. *Molecular systems biology*, 3(1), 99.
- Feala, J. D., Coquin, L., Zhou, D., Haddad, G. G., Paternostro, G., & McCulloch, A. D. (2009). Metabolism as means for hypoxia adaptation: metabolic profiling and flux balance analysis. *BMC systems biology*, 3(1), 91.
- Ferguson-Miller, S., Hiser, C., & Liu, J. (2012). Gating and regulation of the cytochrome c oxidase proton pump. *BBA - Bioenergetics*, 1817(4), 489-494.
- Friedrich, T., & Scheide, D. (2000). The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *Febs Letters*, 479(1-2), 1-5.
- Galli, G. L., & Richards, J. G. (2014). Mitochondria from anoxia-tolerant animals reveal common strategies to survive without oxygen. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(3), 285-302.
- García, J. J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernández, P., & Rodríguez-Zavala, J. S. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry*, 45(42), 12695-12703.
- García-Lara, S., Espinosa Carrillo, C., & Bergvinson, D. J. (2007). Manual de plagas en granos almacenado y tecnologías alternas para su manejo y control. CIMMYT.
- Glass, J. J., Phillips, P. A., Gunning, P. W., & Stehn, J. R. (2015). Hypoxia alters the recruitment of tropomyosins into the actin stress fibres of neuroblastoma cells. *BMC cancer*, 15(1), 712.
- Gorr, T. A., Gassmann, M., & Wappner, P. (2006). Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *Journal of insect physiology*, 52(4), 349-364.
- Goodman, J. C., Valadka, A. B., Gopinath, S. P., Uzura, M., & Robertson, C. S. (1999). Extracellular lactate and glucose alterations in the brain after head injury measured by microdialysis. *Critical care medicine*, 27(9), 1965-1973.

- Harrison, J., Frazier, M. R., Henry, J. R., Kaiser, A., Klok, C. J., & Rascón, B. (2006). Responses of terrestrial insects to hypoxia or hyperoxia. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154(1), 4-17.
- Hagstrum, D. W., & Throne, J. E. (1989). Predictability of stored-wheat insect population trends from life history traits. *Environmental Entomology*, 18(4), 660-664.
- 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.
- Heerlein, K., Schulze, A., Hotz, L., Bartsch, P., & Mairbaurl, H. (2005). Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 32(1), 44-51.
- Harper, H. A., Murray, R. K. B., David, A. B., Kathleen, M. R. K., David, A. B., Kathleen, M. B., ... & Michael, A. P. (2013). Harper: Bioquímica ilustrada/Bioquímica ilustrada (No. 577.1). Konrad-Adenauer-Stiftung.
- Harvey-Samuel, T., Morrison, N. I., Walker, A. S., Marubbi, T., Yao, J., Collins, H. L., & Shelton, A. M. (2015). Pest control and resistance management through release of insects carrying a male-selecting transgene. *BMC biology*, 13(1), 49.
- Harvey, W. R. (1992). Physiology of V-ATPases. *Journal of Experimental Biology*, 172(1), 1-17.
- Hoback, W.W. & Stanley D.W. (2000). Insects in hypoxia. *Journal of Insect Physiology*. (47)533-542.
- Hoback, W. W., Podrabsky, J. E., Higley, L. G., Stanley, D. W., & Hand, S. C. (2000). Anoxia tolerance of con-familial tiger beetle larvae is associated with differences in energy flow and anaerobiosis. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 170(4), 307-314.
- Hochachka, P. W. (1986). Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 231, 234-242.

- Huang, L. J., Hsu, C., Tsai, T. N., Wang, S. J., & Yang, R. C. (2007). Suppression of mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in the liver of late septic rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(7), 888-896.
- Huang, W. Y., Jou, M. J., & Tsung, I. P. (2013). mtDNA T8993G mutation-induced F1F0-ATP synthase defect augments mitochondrial dysfunction associated with hypoxia/reoxygenation: *The protective role of melatonin*. *PLoS one*, 8(11), e81546.
- King, A. M., & MacRae, T. H. (2015). Insect heat shock proteins during stress and diapause. *Annual review of entomology*, 60, 59-75.
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinoshita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*, 427(6973), 465-468.
- Jackson, D. C. (2000). Living without oxygen: lessons from the freshwater turtle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 125(3), 299-315.
- Jackson, P. J., & Harris, D. A. (1988). The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F1 β -subunit. *FEBS letters*, 229(1), 224-228.
- Janssens, D., Michiels, C., Delaive, E., Eliaers, F., Drieu, K., & Remacle, J. (1995). Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilobalide. *Biochemical pharmacology*, 50(7), 991-999.
- Jones, D. P., & Mason, H. S. (1978). Gradients of O₂ concentration in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 253(14), 4874-4880.
- Kadenbach, B., & Hüttemann, M. (2015). The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 24, 64-76.
- Krishnan, S. N., SUN, Y. A., Mohsenin, A., Wyman, R. J., & Haddad, G. G. (1997). Behavioral and electrophysiologic responses of *Drosophila melanogaster* to prolonged periods of anoxia. *Journal of insect physiology*, 43(3), 203-210.
- LaManna, J. C., Kutina-Nelson, K. L., Hritz, M. A., Huang, Z., & Wong-Riley, M. T. (1996). Decreased rat brain cytochrome oxidase activity after prolonged hypoxia. *Brain research*, 720(1), 1-6.

- Lapierre, P., Shial, R., & Gogarten, J. P. (2006). Distribution of F-and A/V-type ATPases in *Thermus scotoductus* and other closely related species. *Systematic and applied microbiology*, 29(1), 15-23.
- Li, W., Chen, L., Wang, K., Johnson, J. A., & Wang, S. (2015). Performance of controlled atmosphere/heating block systems for assessing insect thermotolerance. *Biosystems Engineering*, 135, 1-9.
- Lipton, P., & Whittingham, T. S. (1982). Reduced ATP concentration as a basis for synaptic transmission failure during hypoxia in the in vitro guinea-pig hippocampus. *The Journal of Physiology*, 325(1), 51-65.
- Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X., & Schulz, D. W. (1964). Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *Journal of Biological Chemistry*, 239(1), 18-30.
- Luna-Ortiz, P., Flores-Chávez, P., & Martínez-Rosas, M. (2014). Las mitocondrias como blanco terapéutico. (Spanish). *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37(4), 283-296.
- Luo, Y., Gao, W., Gao, Y., Tang, S., Huang, Q., Tan, X., ... & Huang, T. (2008). Mitochondrial genome analysis of *Ochotona curzoniae* and implication of cytochrome c oxidase in hypoxic adaptation. *Mitochondrion*, 8(5), 352-357.
- Ma, E., & Haddad, G. G. (1999). Isolation and characterization of the hypoxia-inducible factor 1 β in *Drosophila melanogaster*. *Molecular brain research*, 73(1), 11-16.
- Mani, M. S. (2013). Ecology and biogeography of high altitude insects (Vol. 4). Springer Science & Business Media.
- McMullen, D. C., & Storey, K. B. (2008). Mitochondria of cold hardy insects: responses to cold and hypoxia assessed at enzymatic, mRNA and DNA levels. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(3), 367-373.

- Mahon, P., & Dupree, P. (2001). Quantitative and reproducible two-dimensional gel analysis using Phoretix 2D Full. *Electrophoresis*, 22(10), 2075-2085.
- Martinez-Cruz, O., Garcia-Carreño, F., Robles-Romo, A., Varela-Romero, A., & Muhlia-Almazan, A. (2011). Catalytic subunits atp α and atp β from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* F O F 1 ATP-synthase complex: cDNA sequences, phylogenies, and mRNA quantification during hypoxia. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 43(2), 119-133.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). Bioquímica. Pearson Education.
- Matrix Science. Mini-tutorial:Understanding Mascot Reports (MS/MS Ion Search Results).Recuperado el 1 de julio de 2017 de <http://cbio.ufs.ac.za/fgap/download/Mascot%20data.pdf>
- McKee, T., McKee, J. R. T., & McKee, J. R. (2003). Bioquímica: la base molecular de la vida. McGraw-Hill/Interamericana,.
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), 111-142.
- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N., & Tagawa, K. (1993). Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between α and β -subunits of F1F0 ATPase upon de-energization of mitochondria. *The Journal of Biochemistry*, 113(3), 350-354.
- 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 chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191(4784), 144-148.
- Muneyuki, E., Noji, H., Amano, T., Masaike, T., & Yoshida, M. (2000). F O F 1-ATP synthase: general structural features of 'ATP-engine'and a problem on free energy transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1458(2), 467-481.
- Nijtmans, L. G., Taanman, J. W., Muijsers, A. O., Speijer, D., & Van den Bogert, C. (1998). Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *The FEBS Journal*, 254(2), 389-394.

- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinosita Jr, K. (1997). Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, 386(6622), 299.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Ohnishi, T. (1998). Iron–sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1364(2), 186-206.
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford G. A., Sugiana C., Boneh A., Chen W. K. & Hill, D. E. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134(1), 112-123.
- Park, B. S., Lee, B. H., Kim, T. W., Ren, Y., & Lee, S. E. (2008). Proteomic evaluation of adults of *Rhyzopertha dominica* resistant to phosphine. *Environmental toxicology and pharmacology*, 25(1), 121-126.
- Poyton, R. O., & Burke, P. V. (1992). Oxygen regulated transcription of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1101(2), 252.
- Reyes-Guzmán, R., Borboa-Flores, J., Cinco-Moroyoqui, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Osuna-Amarillas, P. S., Wong-Corral, F. J., Ortega-Nieblas M. M. & León-Lara, J. D. (2012). Actividad insecticida de aceites esenciales de dos especies de Eucalyptus sobre *Rhyzopertha dominica* y su efecto en enzimas digestivas de progenies. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 18(3), 385-394.
- Richards, J. G. (2011). Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 214(2), 191-199.
- Riudavets, J., Castañé, C., Alomar, O., Pons, M. J., & Gabarra, R. (2009). Modified atmosphere packaging (MAP) as an alternative measure for controlling ten pests that attack processed food products. *Journal of stored products research*, 45(2), 91-96.
- Sahebzadeh, N., & Lau, W. H. (2017). Expression of heat-shock protein genes in *Apis mellifera meda* (Hymenoptera: Apidae) after exposure to monoterpenoids and infestation by *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). *European Journal of Entomology*, 114, 195.

- Sandiford, S. L., Dong, Y., Pike, A., Blumberg, B. J., Bahia, A. C., & Dimopoulos, G. (2015). Cytoplasmic actin is an extracellular insect immune factor which is secreted upon immune challenge and mediates phagocytosis and direct killing of bacteria, and is a Plasmodium Antagonist. *PLoS pathogens*, 11(2), e1004631.
- Schumacker, P. T., Chandel, N. A. V. D. E. E. P., & Agusti, A. G. (1993). Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 265(4), L395-L402.
- Scholz, T. D., & Balaban, R. S. (1994). Mitochondrial F1-ATPase activity of canine myocardium: effects of hypoxia and stimulation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 266(6), H2396-H2403.
- Slavin, J. (2004). Whole grains and human health. *Nutrition research reviews*, 17(1), 99-110.
- Solaini, G., & Harris, D. A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochemical Journal*, 390(2), 377-394.
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1988). Freeze tolerance in animals. *Physiological Reviews*, 68(1), 27-84.
- Sun, M., Lu, M. X., Tang, X. T., & Du, Y. Z. (2014). Characterization and expression of genes encoding three small heat shock proteins in *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae). *International journal of molecular sciences*, 15(12), 23196-23211.
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U., & Flanagan, J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *The EMBO journal*, 15(2), 408.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A., & Masaki, S. (1986). Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press on Demand.

- Velázquez, E. P., & Contreras, A. (2005). Efecto del paraíso (*Melia azedarach* (L.)) en polvo vegetal como insecticida sobre el gorgojo menor de los granos *Rhyzopertha dominica* (F.) en arroz. (Spanish). *Revista Centro Agrícola*, 32(2), 85-87.
- Virani, N. A., & Rees, B. B. (2000). Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, *Fundulus grandis*, during hypoxia and recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126(3), 397-405.
- Vijayasathy, C., Damle, S., Prabu, S. K., Otto, C. M., & Avadhani, N. G. (2003). Adaptive changes in the expression of nuclear and mitochondrial encoded subunits of cytochrome c oxidase and the catalytic activity during hypoxia. *The FEBS Journal*, 270(5), 871-879.
- Westermeier, R., Postel, W., Weser, J., & Görg, A. (1983). High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 8(4), 321-330.
- Wheaton, W. W., & Chandel, N. S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(3), C385-C393.
- Williams, S. L., Valnot, I., Rustin, P., & Taanman, J. W. (2004). Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7462-7469.
- Wright, V. F., Fleming, E. E., & Post, D. (1990). Survival of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera, Bostrichidae) on fruits and seeds collected from woodrat nests in Kansas. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 344-347.
- Yano, T., Magnitsky, S., & Ohnishi, T. (2000). Characterization of the complex I-associated ubisemiquinone species: toward the understanding of their functional roles in the electron/proton transfer reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1459(2), 299-304.
- Yang, J., Zhu, J., & Xu, W. H. (2010). Differential expression, phosphorylation of COX subunit 1 and COX activity during diapause phase in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Journal of insect physiology*, 56(12), 1992-1998.

- Zhang, Z. Y., Chen, B., Zhao, D. J., & Kang, L. (2013). Functional modulation of mitochondrial cytochrome c oxidase underlies adaptation to high-altitude hypoxia in a Tibetan migratory locust. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 280(1756), 20122758.
- Zhu, Y. C., & Baker, J. E. (1999). Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(12), 1053-1063.
- Zieseniss, A. (2014). Hypoxia and the modulation of the actin cytoskeleton—emerging interrelations. *Hypoxia*, 2, 11.
- Zuñiga, T. (1985). Conceptos basicos de entomologia y manejo de plagas. Programa de las Naciones Unidas (PNUD).