

# ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA Y ATPasa DE *Rhizopertha dominica* BAJO EL EFECTO DE LAS ATMÓSFERAS MODIFICADAS

CYTOCHROME C OXIDASE AND ATPase ACTIVITY OF *Rhizopertha dominica* UNDER THE EFFECT OF MODIFIED ATMOSPHERES

**Víctor Andrés Levy-de la Torre, Lucía Gómez-García, Jesús Borboa-Flores, Francisco Javier Wong-Corral, Francisco Javier Cinco-Moroyoqui, Oliviert Martínez-Cruz\***

Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México.

## RESUMEN

*Rhizopertha dominica* es un insecto que se alimenta de una gran variedad de cereales y granos almacenados, causando grandes pérdidas económicas. Estudios de la bioenergética de los insectos son necesarios para diseñar estrategias que reemplacen el uso de insecticidas. Un método alternativo es el uso de atmósferas modificadas para comprometer el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad citocromo c oxidasa (COX) y ATPasa de *R. dominica* bajo el efecto de las atmósferas modificadas. Primeramente, se realizó un bioensayo donde se sometieron a los insectos a hipoxia (5% O<sub>2</sub>) por 12 y 24 h y los resultados fueron comparados con los insectos en normoxia (19% O<sub>2</sub>). Se determinó la concentración de lactato, donde se detectó un incremento significativo 75% en los organismos expuestos a la hipoxia. Las mitocondrias de ambos tratamientos fueron aisladas y se evaluó la actividad COX y ATPasa. Se detectó un decremento en la actividad de ambas enzimas a las 24 h de hipoxia con respecto a normoxia. Los resultados sugieren que bajo condiciones hipóxicas la COX reduce su actividad debido a la limitación por el sustrato, mientras que la actividad ATPasa mitocondrial es inhibida para mantener el potencial intermembranal y por consiguiente la homeostasis celular.

**Palabras clave:** hipoxia, insectos, citocromo c oxidasa, ATP-sintasa, atmósferas modificadas.

## ABSTRACT

*Rhizopertha dominica* is an insect that feeds on a large variety of cereals and stored grains, causing significant economic losses. Studies related to insects' bioenergetics are necessary in order to design strategies that replace the use of pesticides. An alternative method is the use of modified atmospheres to compromise the electron transport chain and oxidative phosphorylation. The aim of this research was to evaluate the cytochrome c oxidase (COX) and ATPase activities of *R. dominica* under the effect of modified atmospheres. First, we performed a bioassay where the insects were subjected to a hypoxia (5% O<sub>2</sub>) 12 and 24 h, and the results were compared with those of control insects exposed to normoxia conditions (19% O<sub>2</sub>). Subsequently, lactate concentration was determined, detecting a significant increase of 75% in

hypoxic organisms. Mitochondria were isolated and COX and ATPase activity were evaluated. A decrease in the activity of both enzymes in the organisms during 24 h of hypoxia with respect to normoxia was detected. Our results suggest that under hypoxic conditions, COX reduce its activity since O<sub>2</sub> is the limited substrate, while ATP-synthase is inhibited in order to maintain mitochondrial membrane potential and thereby cellular homeostasis.

**Keywords:** Hypoxia, insects, Cytochrome c oxidase, ATP-synthase, modified atmospheres.

## INTRODUCCIÓN

*Rhizopertha dominica* es un insecto cosmopolita que ocasiona pérdidas económicas al alimentarse de una gran variedad de cereales almacenados, siendo el trigo el cereal por el que muestra mayor afinidad (Belda y Riudavest, 2012). Los métodos de control de plagas tienen la finalidad de disminuir la densidad de población de insectos de tal forma que ya no pueden dañar el grano y así evitar pérdidas económicas, siendo los métodos químicos de control los más utilizados. Estos fumigantes son utilizados en todo el mundo, sin embargo, tienen la desventaja de ocasionarle daño al medio ambiente y a la salud humana. Además, por su uso prolongado y continuo, los insectos desarrollan resistencia a este tipo de compuestos (Bulathsinghala y Shaw, 2014; Harvey *et al.*, 2015). Para reemplazar estos insecticidas, se han desarrollado nuevas estrategias más amigables con el ambiente, conocidas como atmósferas modificadas (AM). Esta tecnología es un tratamiento que puede ser utilizado como una alternativa contra la fumigación (Carvalho *et al.*, 2012), en donde las concentraciones de los gases O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> pueden ser manipuladas de acuerdo a los objetivos del usuario. Así, el estrés ocasionado por el consumo de bajas concentraciones de O<sub>2</sub> en insectos puede resultarles fatal (Cui, 2017).

*R. dominica* tiene una marcada preferencia por el trigo, de donde obtiene los carbohidratos que necesita para generar energía en forma de moléculas de adenosín trifosfato (ATP), a través de un proceso denominado cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, que depende también del consumo de oxígeno. El complejo IV mitocondrial, citocromo c oxidasa (COX), es la enzima

\*Autor para correspondencia: Oliviert Martínez-Cruz  
 Correo electrónico: [oliviert.martinez@unison.mx](mailto:oliviert.martinez@unison.mx)

**Recibido: 11 de enero de 2018**

**Aceptado: 23 de febrero 2018**

que cataliza la reducción de oxígeno a moléculas de agua, recibiendo los electrones transportados a lo largo de esta cadena, provocando un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal (Blomberg y Siegbahn, 2014). La acumulación de estos protones en el espacio intermembranal activa al complejo V ATP sintasa, complejo enzimático que consiste en un motor rotatorio donde se producen moléculas de ATP a partir de adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) (Papa *et al.*, 2012). Sin embargo, si el consumo de oxígeno disminuye, se ha reportado en mamíferos que la ATP sintasa gira en sentido inverso, y en vez de producir moléculas de ATP, las degrada en ADP y Pi, funcionando como una ATPasa, regresando protones hacia el espacio intermembranal, en un intento por reestablecer el equilibrio quimiosmótico entre este y la matriz mitocondrial (Galli y Richards, 2014).

Se ha reportado que la actividad COX en organismos adaptados a la hipoxia es mayor con respecto a insectos que viven en condiciones naturales de normoxia (Zhang *et al.* 2013; Ali *et al.*, 2012). Por otro lado, de acuerdo con nuestro conocimiento, la actividad F1F0-ATPasa bajo el efecto de la hipoxia no ha sido evaluada en insectos. Sin embargo, existen investigaciones en organismo marinos (Martínez-Cruz *et al.*, 2012) y en mamíferos bajo el efecto de la hipoxia (Scholz y Balaban, 1994). También se ha reportado la actividad de ambos complejos proteicos (COX y F1F0-ATPasa) en plaquetas de cerebro de humanos con Alzheimer bajo condiciones de normoxia (Bosetti *et al.*, 2001).

A la fecha, investigaciones relacionadas con estudios de bioenergética en insectos son pocos y son necesarios para proponer nuevas estrategias efectivas para combatir insectos a un nivel molecular, sustituyendo el uso de insecticidas. Existen pocos estudios que evalúen la respuesta bioquímica, específicamente, la generación de energía en insectos bajo el estrés hipóxico, por lo que el objetivo de esta investigación consistió en evaluar la actividad enzimática de la COX y ATPasa mitocondrial de *R. dominica* expuesta a atmósferas modificadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo madre de *Rhyzopertha dominica*

En un frasco de vidrio se agregaron dos kilogramos de trigo cristalino (*Triticum aestivum*) variedad CIRNO y se infestó con 300 insectos adultos de *R. dominica* no sexados, donados por el Laboratorio de Entomología de la Universidad de Sonora. El cultivo se incubó a 34 °C con 70 % de humedad relativa por 30 días. Transcurrido este tiempo se extrajeron los adultos de *R. dominica*.

### Exposición a atmósferas modificadas

Se agregaron 200 g de trigo cristalino con 150 adultos de *R. dominica* en bolsas de polietileno MSD - DR006 Grainpro, Inc., con dimensiones de 22 x 28 cm. En un equipo Thermo Gas Mixers, (Instrument Corporation la Porte, Indiana, USA), se realizó la mezcla de gases 85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub> para los organismos expuestos a hipoxia y 80% N<sub>2</sub>, 0.1% CO<sub>2</sub> y 19%

O<sub>2</sub> para los organismos control (normoxia). Los organismos se incubaron a las condiciones antes descritas por 12 y 24 h, respectivamente con una variación en la concentración de cada gas de ±1.0%, a una temperatura de incubación de 29 °C y 65% de humedad relativa. Se utilizaron 150 insectos por tratamiento por triplicado. Los insectos fueron muestreados las 12 y 24 h.

### Aislamiento de mitocondrias de *Rhyzopertha dominica*

Los insectos de ambos tratamientos en los distintos tiempos se lavaron para eliminar partículas de trigo. Los insectos fueron lavados en 20 mL de agua jabonosa, con una proporción de 10:1 v/v, hipoclorito de sodio al 2% y agua destilada. Para el aislamiento de mitocondrias se siguió la metodología de Heddi *et al.* (1992) con ciertas modificaciones que a continuación se describen. Ciento cincuenta insectos fueron macerados en 500 µL de amortiguador A (Sacarosa 250 mM, KCl 50 mM, Pipes 4 mM, EDTA 1 mM, pH 6.8) en frío. Posteriormente, se agregaron 4.5 mL de amortiguador A y se centrifugó el macerado a 1,375 x g por 10 min, donde se recuperó el sobrenadante y se recolectaron 100 µL del mismo para evaluar la concentración de lactato. El sobrenadante se centrifugó a 11,000 x g por 15 min, se recuperó el precipitado y se lavó dos veces con 100 µL del amortiguador B (Sacarosa 290 mM, KCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, Pipes 4 mM, pH 6.8). Se ajustó el volumen a 1 mL de amortiguador B, y se centrifugó a 825 x g por 5 min para recuperar el sobrenadante, el cual se ajustó a 1 mL con el mismo amortiguador. Por último, se centrifugó a 11,000 x g por 15 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 µL de amortiguador B. Todo el procedimiento de aislamiento de mitocondrias se realizó a 4 °C.

### Cuantificación de lactato

Se cuantificó lactato utilizando el kit L-Lactate (Randox, UK) ajustando las instrucciones del fabricante para la evaluación en microplaca. Para ello se utilizaron 20 µL de muestra en 180 µL del reactivo del kit. Posteriormente, se registró la absorbancia a 550 nm utilizando un lector de microplaca xMARK (Bio-rad, U.S.A.). La cuantificación de lactato se hizo por triplicado para cada tratamiento.

### Cuantificación de proteína mitocondrial

La concentración de proteína mitocondrial se midió con el Reactivo de Bradford (RB) (SIGMA-ALDRICH, SainLouis, Missouri, USA) en un espectrofotómetro de microplaca (Thermo Fisher Scientific, modelo Multiskan GO, Japón) a una longitud de onda de 595 nm. Para medir la concentración de la muestra, se utilizaron 250 µL del RB, 45 µL de agua ultra pura y 5 µL del precipitado mitocondrial y se incubó por 20 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm. Todas las lecturas se hicieron por triplicado. Se construyó una curva estándar con albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) de 1 - 0.0625 mg/mL.

Para la solubilización de las mitocondrias, se agregaron a un tubo 100 µg de proteína mitocondrial, 8.0 µL de

digitonina al 5% y amortiguador muestra (ácido aminocaproico 750 mM, imidazol 25 mM, pH 7) en un volumen final de 60  $\mu$ L. La mezcla se agitó mecánicamente por 1 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó por 40 min a 11,000 x g y se recolectó el sobrenadante. Una vez concluido este proceso se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente.

### Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida en gradiente

La evaluación cualitativa de la actividad COX y ATPasa fue realizada en condiciones nativas en geles en gradiente de poliacrilamida del 4 – 12% con 1.0 mm de espesor. La muestra fue preparada con 20  $\mu$ L de amortiguador muestra (agua destilada 2%; Tris-HCl 0.5 M; glicerol 0.1% y azul de bromofenol 0.07%). Para ambas actividades se cargaron 80  $\mu$ g de proteína mitocondrial. Cada muestra se cargó por triplicado. El gel se corrió a 40 mA en una cámara de electroforesis a 4 °C por un tiempo aproximado de 40 min, los amortiguadores utilizados fueron: cátodo (tricina 50 mM, imidazol 7.5 mM, N-dodecil- $\beta$  maltosido 0.01% y desoxicolato de sodio 0.05 %) y para ánodo (imidazol 25 mM, pH 7.0). Para la tinción de proteínas mitocondriales se utilizó azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad, USA) al 0.1% preparado con agua ultra pura 50%; metanol 40% y ácido acético glacial 10%. Los geles fueron teñidos durante 40 min y desteñidos con solución desteñidora (agua ultra pura 50%; metanol 40% y ácido acético glacial 10%) durante 2 h. Los geles con las actividades COX y ATPasa, y el gel teñido con azul de Coomassie fueron documentados en un fotodocumentador de geles Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA).

### Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de citocromo c oxidasa

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

### Evaluación cualitativa de la actividad ATPasa mitocondrial

Una vez terminada la electroforesis se evaluó la actividad ATPasa siguiendo la metodología de Wittig *et al.* (2007). Para ello el gel se incubó con agitación, a temperatura ambiente y durante 1 h en un amortiguador de incubación (glicina 270 mM, Tris 35 mM, pH 8.4). Transcurrido este tiempo se retiró el amortiguador, se agregaron 39 mL de amortiguador de actividad frío (glicina 540 mM, Tris 70 mM, pH 8.4; MgSO<sub>4</sub> 500 mM, ATP 2 mM) y directamente se agregó por goteo 800  $\mu$ L de nitrato de plomo al 10 %, sin depositarlo

directamente sobre el gel, dejándose en agitación baja por 24 h. La presencia de bandas blancas, de fosfato de plomo, muestran las fracciones del complejo enzimático ATP sintasa donde realizaron la hidrólisis del ATP.

### Análisis estadístico

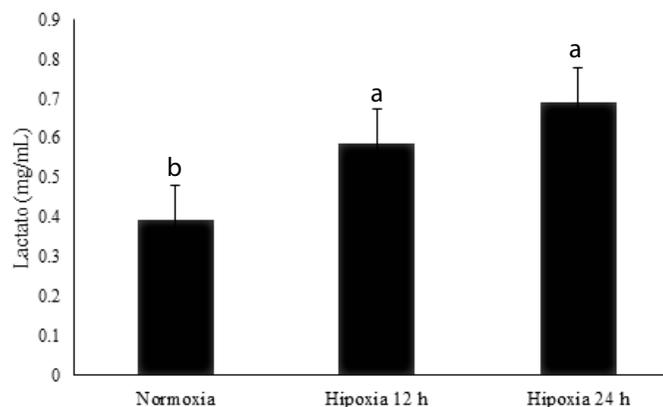
Se realizó un análisis estadístico para los datos obtenidos de la concentración de lactato en las muestras, utilizando pruebas paramétricas de una vía y prueba de comparación múltiple de Tukey en el programa NCSS 2007, considerando un intervalo de confianza de 95 % ( $p=0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cuantificación de lactato

Para la mayoría de los insectos terrestres, hipoxia se define como el porcentaje de oxígeno por debajo de 20.94 %. 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 (Wilps and Zebe, 1976; Feala *et al.*, 2007). En el caso de los organismos bajo hipoxia, la concentración de lactato presentó un incremento significativo de hasta el 75% a las 24 h con respecto a los organismos en normoxia (Fig. 1). Estos resultados son comparables con los reportados por Feala *et al.* (2007), quienes encontraron acumulación de lactato en tejido en la mosca *Drosophila melanogaster* expuesta a bajas concentraciones de oxígeno.

Cuando los niveles de pO<sub>2</sub> (presión parcial de oxígeno) decrecen de tal forma que se acercan o van más allá del punto crítico (1.6-3 % O<sub>2</sub>, 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



**Figura 1.** Concentración de lactato de *Rhyzopertha dominica* sometidos a hipoxia. Diferentes literales denotan diferencias significativas entre los tratamientos. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar.

**Figure 1.** Lactate quantification from *R. dominica* submitted to hypoxia. Different letters represent significant differences between treatments. Bars represent means  $\pm$  SD.

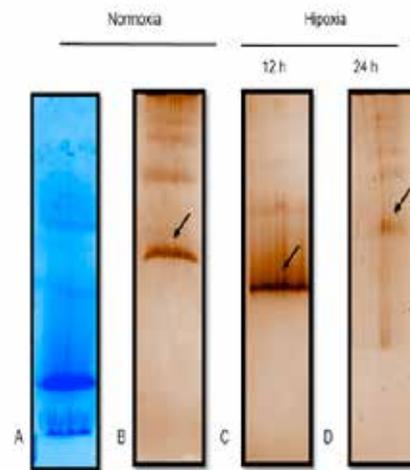
% y estupor, que va desde pérdida de coordinación hasta completa inmovilidad (Csik, 1940; Chadwick y Gilmour, 1940; Ma y Haddada, 1999). Pasadas las 12 y 24 h de tratamiento y de acuerdo a la concentración de gases a la que se sometió *R. dominica*, se observó que todos los insectos se encontraban en 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 tráqueas para permitir un mayor consumo de oxígeno. 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 a las 12 y 24 h, comparado con el grupo normoxia, nuestros resultados confirman que *R. dominica* efectivamente cambió su metabolismo de tal forma que su demanda de ATP fue compensada a través de la ruta metabólica de la glucólisis en un intento de adecuación a este estresante ambiente.

#### Evaluación de la actividad citocromo c oxidasa

El complejo citocromo c oxidasa resulta crucial para el mecanismo del transporte de electrones, debido a que este fija el oxígeno encargado de captar a los electrones transportados. Se ha reportado que sin oxígeno, el complejo mitocondrial citocromo c oxidasa no funciona correctamente y eventualmente el mecanismo de la cadena de transporte de electrones se detiene. Esto provoca una acumulación de protones dentro de la matriz mitocondrial y a su vez, un desequilibrio en el potencial de membrana mitocondrial, provocando la muerte celular (Galli *et al.*, 2014).

La actividad enzimática de la COX a los distintos tiempos y condiciones se muestra en la Fig. 2, donde se observa una banda abundante correspondiente a las 12 h de hipoxia (Fig. 2C) y una banda tenue (de menor intensidad) después de las 24 h de exposición (Fig. 2D), comparado con lo observado en normoxia (Fig. 2B). Estos resultados indican que en las primeras 12 h, la COX de *R. dominica* muestra un aumento en la actividad enzimática durante la hipoxia, mientras que a las 24 h disminuye la actividad enzimática.

Escasos estudios se han realizado en donde se evalúa la actividad COX en insectos sometidos a hipoxia. Ali *et al.* (2012), evaluaron la respuesta en la actividad COX en una mosca del género *Drosophila* adaptada a vivir (después de 200 generaciones) en hipoxia (4% O<sub>2</sub>) y la compararon con el mismo género de moscas no adaptadas a dicho estresor. Las moscas adaptadas a la hipoxia mostraron mayor actividad COX, haciendo más eficiente la oxidación de sustratos a lo largo de la cadena respiratoria, produciendo mayor cantidad de ATP por glucosa y creando menos protones con respecto a las moscas control. En 2008, McMullen y Storey evaluaron la actividad COX de 2 larvas de palomilla *Epiblema scudderiana* y *Eurosta solidaginis* sometidas a hipoxia (24 h), encontrando que la actividad COX disminuyó entre un 30 y 50% por efecto



**Figura 2.** Actividad cualitativa de citocromo c oxidasa en PAGE nativo 4 – 12%. A, proteínas mitocondriales teñidas con azul de Coomassie. B, actividad de Citocromo c oxidasa de *R. dominica* en normoxia. C, actividad de Citocromo c oxidasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 12 h. D, actividad de Citocromo c oxidasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 24 h. Las flechas indican la banda con actividad COX.

**Figure 2.** Qualitative activity of Cytochrome c oxidase in native PAGE 4–12%. A, mitochondrial proteins stained with Coomassie brilliant blue. B, activity of cytochrome c oxidase from *R. dominica* in normoxia. C, activity of cytochrome c oxidase from *R. dominica* exposed to 12 h of hypoxia. D, activity of cytochrome c oxidase from *R. dominica* exposed to 24 h of hypoxia. Arrows indicate the COX activity in the gel.

del estresor con respecto al grupo control. Por otro lado, 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 más tolerante a la baja concentración de oxígeno, evidenciando mayor actividad COX en hipoxia en contraste con *Locusta spp*, la cual vive en condiciones de normoxia. En este estudio se concluyó que el insecto adaptado a la hipoxia muestra una mayor eficiencia catalítica presentando una mayor afinidad por el citocromo c, donde la tasa de recambio es mayor con respecto al género de *Locusta spp* que vive en condiciones naturales de normoxia. Nuestros resultados sugieren un incremento en la actividad COX a las 12 h de hipoxia posiblemente debido a un incremento en la tasa de recambio ocasionada por una mayor afinidad por el sustrato (citocromo c) en un intento de adecuación a las bajas concentraciones de oxígeno. De modo contrario, a las 24 h se reporta una disminución en la actividad COX que pudo haber sido ocasionada por la baja concentración de sustrato (oxígeno) o la depleción de este, necesario para que el complejo pueda llevar a cabo su correcto funcionamiento.

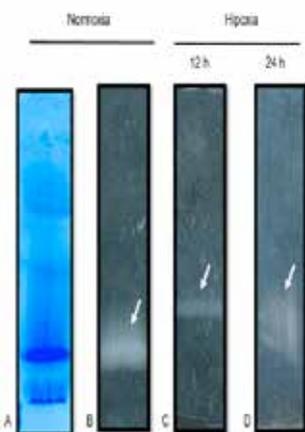
#### Evaluación de la actividad ATPasa

La respiración celular se determina por la actividad metabólica y por la correspondiente tasa de utilización de ATP (Chandel *et al.*, 1997). Una de las principales respuestas o mecanismos de defensa contra la privación de oxígeno es regular la eficiencia en la producción ATP. Se ha reportado que la hipoxia crónica ocasiona daño a la mitocondria y mo-

difica la actividad los complejos involucrados en la cadena de transporte de electrones y el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal, ocasionando la depleción de las reservas de ATP y la acidificación de la matriz mitocondrial (Galli *et al.*, 2014).

El oxígeno es críticamente importante para la generación de ATP, ya que este funge como aceptor final de electrones, necesario para la generación de energía. Durante períodos de hipoxia, la ATP sintasa gira de manera inversa e hidroliza el ATP, en lugar de sintetizarlo, a medida que bombea activamente protones de la matriz hacia el espacio intermembranal, en un intento de mantener el potencial de membrana mitocondrial. Así, durante este periodo la célula hipóxica limita el uso de ATP y evita que se sintetice (Boutillier, 2001).

En este trabajo se detectó la actividad ATPasa mitocondrial en insectos expuestos a 12 y 24 h de hipoxia, con bandas tenues blancas, las cuales no presentan diferencias aparentes entre ambos tiempos de exposición (Fig. 3 C y D). Por otra parte, la actividad en insectos en normoxia se observa una banda intensa (Fig. 3B). En organismos expuestos a hipoxia, la producción de energía es suprimida dentro de la mitocondria debido a la reducción en la fosforilación oxidativa y con ello se reprime la síntesis de ATP (Di Lisa *et al.*, 1995). Debido a su baja eficacia en la producción de ATP, el metabolismo anaeróbico no puede mantener la actividad metabólica. A medida que la condición hipóxica continúa, el desequilibrio entre la producción y la demanda de ATP se hace más grave (Cheng y *et al.*, 2013). Lo anterior podría explicar porque se observan bandas más tenues en insectos expuestos a hipoxia, debido a que el tiempo de exposición fue suficiente para disminuir las reservas energéticas.



**Figura 3.** Actividad cualitativa ATPasa en PAGE nativo 4 – 12%. A, proteínas mitocondriales teñidas con azul de Coomassie. B, Actividad ATPasa de *R. dominica* en normoxia. C, Actividad ATPasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 12 h. D, Actividad ATPasa de *R. dominica* expuesta a hipoxia por 24 h. Las flechas indican la banda con actividad ATPasa.

**Figure 3.** Qualitative ATPase activity in native PAGE 4–12%. A, mitochondrial proteins stained with Coomassie brilliant blue. B, ATPase activity from *R. dominica* in normoxia. C, ATPase activity from *R. dominica* exposed to 12 h of hypoxia. D, ATPase activity from *R. dominica* exposed to 24 h of hypoxia. Arrows indicate the ATPase activity in the gel.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman que *Rhyzopertha dominica* cambia su metabolismo de aerobio a anaerobio en respuesta a la hipoxia. En un intento de adecuación a las bajas concentraciones de oxígeno en este insecto, la actividad COX aumentó a las 12 h posiblemente incrementando su eficiencia catalítica como ya ha sido reportado previamente. En contraste, la actividad COX a las 24 h disminuyó, probablemente a que la concentración de sustrato no fue la adecuada para que el complejo IV mitocondrial continuara con su función regular. En respuesta, la actividad ATPasa mitocondrial disminuyó o detuvo su actividad en un intento por mantener regulado el equilibrio quimiosmótico, evitando así la muerte celular. Se sugiere que en futuras investigaciones se evalúe de manera cuantitativa la actividad enzimática de estos dos complejos respiratorios para comparar los resultados obtenidos en la presente investigación.

## AGRADECIMIENTOS

VALT agradece a CONACyT por la beca otorgada para realizar sus estudios de maestría. OMC agradece a CONACyT por el apoyo financiero del proyecto 220620.

## REFERENCIAS

- Ali, S.S., Hsiao, M., Zhao, H.W., Dugan, L.L., Haddad, G.G. y Zhou, D. 2012. Hypoxia-adaptation involves mitochondrial metabolic depression and decreased ROS leakage. *PLOS ONE*. 7: e36801.
- Belda, C. y 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: 381-385.
- Bailey, J.R. y Driedzic, W.R. 1996. Decreased total ventricular and mitochondrial protein synthesis during extended anoxia in turtle heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 271: R1660-R1667.
- Blomberg, M.R. y Siegbahn, P.E. 2014. Proton pumping in cytochrome c oxidase: Energetic requirements and the role of two proton channels. *Biochimica et Biophysica Acta*. 7: 1165-1177.
- Bosetti, F, Brizzi, F, Barogi, S, Mancuso, M, Siciliano, G, Tendi, E.A, y Solaini, G. 2002. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 23: 371-376.
- Boutillier R.G. 2001. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *Journal of Experimental Biology*. 18: 3171-3181.
- Bulathsinghala, A.T. y Shaw, I.C. 2014. The toxic chemistry of methyl bromide. *Human & Experimental Toxicology*. 33: 81-91.
- Burkett, B.N. y Schneiderman, H.A. 1974. Roles of oxygen and carbon dioxide in the control of spiracular function in *Cecropia* pupae. *The Biological Bulletin*, 147: 274-293.
- Carvalho, M.O., Pires, I., Barbosa, A., Barros, G., Riudavets, J., Garcia, A.C. y Navarro, S. 2012. The use of modified atmospheres to control *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus*

- oryzae* on stored rice in Portugal. Journal of stored products research. 50: 49-56.
- Csik, L. 1940. The susceptibility to oxygen want of different *Drosophila* species. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 27: 304-310.
- Chadwick, L.E. y Gilmour, D. 1940. Respiration during flight in *Drosophila repleta* Wollaston: the oxygen consumption considered in relation to the wing-rate. Physiological Zoology 13: 398-410.
- Chandel, N.S., Budinger, G.S., Choe, S.H. y Schumacker, P.T. 1997. Cellular respiration during hypoxia role of cytochrome oxidase as the oxygen sensor in hepatocytes. Journal of Biological Chemistry. 272: 18808-18816.
- Cheng, W., Lei, J., Ahn, J. E., Wang, Y., Lei, C. y Zhu-Salzman, K. 2013. CO<sub>2</sub> enhances effects of hypoxia on mortality, development, and gene expression in cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus*. Journal of insect physiology. 59: 1160-1168.
- Chiappini, E., Molinari, P. y Cravedi, P. 2009. Mortality of *Tribolium confusum* J. du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) in controlled atmospheres at different oxygen percentages. Journal of stored products research. 45: 10-13.
- Cui, S., Wang, L., Qiu, J., Liu, Z. y Geng, X. 2017. Comparative metabolomics analysis of *Callosobruchus chinensis* larvae under hypoxia, hypoxia/hypercapnia and normoxia. Pest Management Science. 73: 1267-1276.
- Di Lisa, F., Blank, P.S., Colonna, R., Gambassi, G. I. O. V. A. N. N. I., Silverman, H.S., Stern, M.D. y Hansford, R.G. 1995. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. The Journal of physiology. 486: 1-13.
- Feala, J.D., Coquin, L., McCulloch, A.D. y Paternostro, G. 2007. Flexibility in energy metabolism supports hypoxia tolerance in *Drosophila* flight muscle: metabolomic and computational systems analysis. Molecular Systems Biology. 3: 99.
- Galli, G.L. y Richards, J.G. 2014. Mitochondria from anoxia-tolerant animals reveal common strategies to survive without oxygen. Journal of Comparative Physiology B, 184: 285-302.
- Goodman, J.C., Valadka, A.B., Gopinath, S.P., Uzura, M. y Robertson, C.S. 1999. Extracellular lactate and glucose alterations in the brain after head injury measured by microdialysis. Critical care medicine. 27: 1965-1973.
- Harvey-Samuel, T., Morrison, N.I., Walker, A.S., Marubbi, T., Yao, J., Collins, H.L. y Shelton, A.M. 2015. Pest control and resistance management through release of insects carrying a male-selecting transgene. BMC boil. 13: 49.
- Heddi, A., Lefebvre, F. y Nardon, P. 1993. Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Insect biochemistry and molecular biology. 23: 403-411.
- Hoback, W.W., Podrabsky, J.E., Higley, L.G., Stanley, D.W. y 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: 307-314.
- Kwast, K.E. y Hand, S.C. 1993. Regulatory features of protein synthesis in isolated mitochondria from *Artemia* embryos. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 265: R1238-R1246.
- Kwast, K.E. y Hand, S.C. 1996. Acute depression of mitochondrial protein synthesis during anoxia. Contributions of oxygen sensing, matrix acidification, and redox state. Journal of Biological Chemistry. 271: 7313-7319.
- Kwast, K.E. 1996. Oxygen and pH regulation of protein synthesis in mitochondria from *Artemia franciscana* embryos. Biochemical Journal. 313: 207-213.
- Ma, E., Xu, T. y Haddada, G.G. 1999. Gene regulation by O<sub>2</sub> deprivation: an anoxia-regulated novel gene in *Drosophila melanogaster*. Molecular Brain Research. 63: 217-224.
- Martinez-Cruz, O., de la Barca, A.C., Uribe-Carvajal, S. y Muhlia-Almazan, A. 2012. The function of mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP-synthase from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* muscle during hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology. 162: 107-112.
- McMullen, D.C. y 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: 367-373.
- Mitcham, E., Martin, T. y Zhou, S. 2006. The mode of action of insecticidal controlled atmospheres. Bulletin of entomological research. 96:213-222.
- Papa, S., Martino, P.L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmio, D., Signorile, A. y Petruzzella, V. 2012. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. In Advances in Mitochondrial Medicine (pp. 3-37). Springer Netherlands.
- Scholz, T.D. y Balaban, R.S. 1994. Mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase activity of canine myocardium: effects of hypoxia and stimulation. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 266: H2396-H2403.
- Storey, K.B. y Storey, J.M. 1988. Freeze tolerance in animals. Physiological Reviews. 68: 27-84.
- Storey, K.B. y Storey, J.M. 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. The Quarterly Review of Biology. 65: 145-174.
- Wilps, H. y Zebe, E. 1976. The end-products of anaerobic carbohydrate metabolism in the larvae of *Chironomus thummi thummi*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences. 112: 263-272.
- Wittig, I., Karas, M. y Schägger, H. 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. Molecular & Cellular Proteomics. 6: 1215-1225.
- Yang, J., Zhu, J. y 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: 1992-1998.
- Zhang, Z.Y., Chen, B., Zhao, D.J. y 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: 20122758.