

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

**Evaluación de la Expresión Génica y Actividad Enzimática de
Serina Proteasas de *Rhizopertha dominica* durante su Ontogenia**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Rafael Enrique Dávila Flores

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

Evaluación de la Expresión Génica y Actividad Enzimática de Serina Proteasas de *Rhizopertha dominica* durante su Ontogenia

Q.A. Rafael Enrique Dávila Flores

Dra. Oliviert Martínez Cruz
Directora de tesis

Dr. Eduardo Guevara Hernández
Co-director

Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui
Secretario

Dr. José Luis Cárdenas López
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

Rafael Enrique Dávila Flores

Dr. Enrique Márquez Ríos
Coordinador del programa del Posgrado

Hermosillo, Sonora, México

Agosto 2017

AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Por su apoyo económico al proyecto con clave 220620 y por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora, por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A cada uno de los miembros de mi comité de tesis: Dra. Oliviert Martínez Cruz, Dr. Francisco Javier Cinco Moroyoqui, Dr. José Luis Cárdenas López y Dr. Eduardo Guevara Hernández. Gracias por su apoyo, disponibilidad y paciencia.

A todos los que formamos parte del laboratorio de Biotecnología del DIPA, presentes y pasados.

A mis amigos de maestría, Andrés, Paola, Ángel, Jesús y Juan Pedro, así como las chicas del laboratorio, Haydeé, Lilly, Marlene y Faby. Por todas las ocurrencias y momentos divertidos.

A Machuy, Brisa y Carretas, porque siguen apoyándome desde ya varios años.

DEDICATORIAS

A Dios, que sigue conmigo y me permite avanzar con mis estudios.

A mi familia, que me ha sostenido a lo largo de mi vida, y a quien le debo gran parte de mis éxitos. Los amo.

A Janette. Por su amor y apoyo incondicional. Has sido mi más grande bendición y motivación estos años.

A mis amigos Carlos, German, Jesús, Mario, Raúl y Pro. Ustedes son de esos amigos que se vuelven parte de tu familia. Gracias por su verdadera amistad.

RESUMEN

A nivel mundial las pérdidas en la producción de cereales como el trigo son una problemática que representa un grave impacto económico. Las principales causas de estas pérdidas se deben principalmente a prácticas deficientes de cosechado y almacenamiento, las cuales promueven la proliferación de plagas primarias como el barrenador menor de los granos *Rhizopertha dominica*. El estudio de la expresión génica de enzimas digestivas, como las del tipo serina proteasas, puede proporcionar información referente a la capacidad de adaptación que poseen las plagas y con ello se podrían desarrollar nuevos métodos específicos de control que no generen resistencia por parte de los insectos. De tal manera que, el objetivo general del presente trabajo fue evaluar la expresión génica y actividad enzimática de tripsina y quimotripsina de *Rhizopertha dominica* durante sus etapas larval y adulta. La metodología consistió en el aislamiento del ARN total de *R. dominica*, la síntesis del ADN complementario (ADNc) y la amplificación de los genes de las enzimas de interés utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias reportadas en bases de datos. El ARN mensajero se detectó y cuantificó por PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los resultados sugieren que existe un incremento en la expresión de ambas enzimas durante la etapa adulta. Por otro lado, se purificaron extractos de larvas y adultos por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica. Utilizando distintas concentraciones de BApNA, un sustrato para enzimas del tipo tripsina, se determinaron los parámetros cinéticos V_{max} y K_m , obteniendo para larvas 0.137 mM/min y 0.075 mM, y para adultos 1.953 mM/min y 0.094 mM respectivamente. Con los parámetros anteriores se logró calcular la eficiencia catalítica, encontrando que a pesar que las proteasas de larvas son más afines al sustrato, las de adultos son mucho más activas lo cual establece una relación con la expresión génica.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Importancia de los Cereales	3
Trigo	3
Producción de Trigo	4
Pérdidas en la Producción de Cereales	5
Plaga Agrícola	6
Plagas de Insectos	6
Métodos de Control de Plagas Agrícolas de Insectos	7
Ciclo de Vida de <i>Rhyzopertha dominica</i>	8
Huevecillo.....	9
Larva	9
Pupa.....	10
Adulto	10
Enzimas Digestivas	12
Tripsina.....	12
Quimotripsina	15
Expresión Génica y Actividad Enzimática en Insectos	17
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Particulares	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Generación de la Colonia de <i>Rhyzopertha dominica</i>	23
Aislamiento del ARNm Total de <i>Rhyzopertha dominica</i>	23
Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total.....	24
Eliminación del ADN Genómico Contaminante Presente en las Muestras de ARNm Total y Síntesis de ADN Complementario.....	24

Amplificación del Gen de Tripsina y Quimotripsina por PCR	25
Cuantificación del ARNm por PCR en Tiempo Real.....	25
Preparación de Extractos Proteolíticos.....	28
Cuantificación de Proteína.....	29
Determinación de los Parámetros Cinéticos.....	30
Análisis por Zimografía	30
Análisis Estadístico	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
Aislamiento y Evaluación de la Integridad del ARN Total.....	32
Digestión del ADN Genómico	33
Amplificación del Gen de Tripsina y Quimotripsina por PCR	34
Expresión Absoluta de Tripsina y Quimotripsina de <i>R. dominica</i>	38
Purificación de Fracciones Proteolíticas.....	43
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES	51
REFERENCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ciclo de vida de <i>Rhyzopertha dominica</i>	11
2.	Sitio activo de tripsina.....	14
3.	Representación esquemática del mecanismo catalítico de quimotripsina.....	16
4.	Integridad del ARN total de <i>R. dominica</i>	32
5.	Digestión del ADN genómico de <i>R. dominica</i>	33
6.	Amplificación de los fragmentos del ADNc de tripsina y quimotripsina de <i>R. dominica</i>	35
7.	Alineamiento de la secuencia parcial obtenida con los tres tipos de tripsina reportadas de <i>R. dominica</i>	36
8.	Alineamiento de la secuencia del fragmento amplificado de tripsina con respecto a la secuencia reportada en GenBank....	37
9.	Alineamiento de la secuencias nucleotídicas de quimotripsina de <i>R. dominica</i>	37
10.	Curvas estándar para la cuantificación absoluta de tripsina y quimotripsina.....	38
11.	Cuantificación del ARNm de tripsina y quimotripsina presente en larvas y adultos de <i>R. dominica</i>	40
12.	Actividad específica del tipo tripsina de extractos proteolíticos de larvas y adultos.....	44
13.	Actividad proteolítica total de extractos y fracciones purificadas de larvas y adultos de <i>R. dominica</i>	46
14.	Actividad proteolítica detectada por zimografía de las fracciones purificadas de larvas y adultos de <i>R. dominica</i>	47

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Condiciones para la cuantificación de los fragmentos de interés por PCR en tiempo real.....	27
2.	Características de los oligonucleotidos diseñados para la amplificación de tripsina y quimotripsina de <i>R. dominica</i>	34
3.	Valores de las curvas estándar de amplificación de serina proteasas de <i>R. dominica</i>	39
4.	Cuadro de purificación de proteasas de larvas y adultos de <i>R. dominica</i>	43

INTRODUCCIÓN

Una de las especies más destructoras con mayor abundancia y distribución en el trigo almacenado es *Rhyzopertha dominica* (Zhu y Baker, 1999). Este insecto es considerado una plaga primaria que durante sus diferentes etapas de desarrollo es capaz de causar grandes daños al grano íntegro (Zhang y col. 2016), lo cual llega a generar grandes pérdidas en la producción de cereales representando un grave impacto económico a nivel mundial (Oerke y col., 2006).

R. dominica posee una gran capacidad enzimática y se adapta rápidamente a condiciones adversas (Cinco-Moroyoqui y col., 2008), dependiendo de proteasas digestivas para poder degradar las proteínas provenientes de los granos a péptidos y aminoácidos, los cuales son esenciales en la biosíntesis de las proteínas estructurales y funcionales del insecto (Dunse y col., 2010; Dunse y col., 2010b). Diversas investigaciones sugieren que tripsina y quimotripsina son las enzimas del tipo serina proteasas más abundantes en el intestino medio de *R. dominica* y son primordiales ya que son las que inician la hidrólisis de las proteínas a péptidos de longitud de cadena variable (Zhu y Baker, 2000). Estas enzimas han sido bastante estudiadas en diferentes insectos como la mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*), el escarabajo mayor de la harina (*Cybaeus angustus*), y la polilla gusano (*Mythimna separat*) (Veillard y col., 2016; Oppert y col., 2006; Zhou y col., 2016), sin embargo, en *R. dominica* son escasas las investigaciones que muestren como ocurre la expresión génica de este tipo de enzimas.

Se ha reportado que diversos factores como la disponibilidad de nutrientes y el estadio de desarrollo en el que los insectos se encuentren, pueden influir en las necesidades celulares de diferentes proteínas, así como variar los mecanismos por los que se regulan sus respectivos genes (Prud'homme y col., 2007).

El grado y tipo de regulación reflejan de forma natural la función del producto proteico del gen, por lo que algunos productos génicos son siempre necesarios y sus genes se expresan a nivel más o menos constante en prácticamente todas las células de una especie u organismo durante todo su desarrollo (Nelson y col., 2009). De tal manera que el objetivo general del presente trabajo fue evaluar la expresión génica y la actividad enzimática de tripsina y quimotripsina de *R. dominica* durante sus etapas larval y adulta. Con los resultados obtenidos eventualmente se podrían desarrollar nuevos métodos específicos de control que no generen resistencia y promover el desarrollo sustentable en la producción de cereales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Importancia de los Cereales

Los cereales se han constituido como la base de la alimentación en muchos pueblos y culturas del mundo, gracias a su facilidad de cultivo, preparación y sus propiedades nutricionales que aportan nutrientes esenciales para nuestra dieta diaria. El trigo, el arroz y el maíz son los cereales de mayor importancia económica, pero hay otros, como el centeno, la cebada y el mijo, que sirven de alimento a millones de personas, especialmente en Europa, Asia y África (CANIMOLT, 2007).

La importancia de los cereales radica en que contienen nutrientes en forma concentrada, son fáciles de almacenar y transportar, se conservan por mucho tiempo y tienen numerosas aplicaciones como materia prima o como producto elaborado. En la alimentación humana se emplean los cereales de diversas maneras para la elaboración una gran variedad de productos. Algunos son destinados en grandes cantidades a la alimentación del ganado, por lo cual, contribuyen indirectamente a la provisión de carne y grasas (CANIMOLT, 2007).

Trigo

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

El trigo se puede clasificar de acuerdo a las diferentes características que presenta. Algunas están relacionadas con su forma de fraccionarse en la molturación y otras relacionadas con las propiedades de la harina y su conveniencia para la elaboración de diferentes productos. De esta manera, se pueden mencionar distintas variedades de trigo como: *Triticum aestivum* (harinero), *T. araraticum*, *T. boeoticum* (escaña silvestre), *T. compactum*, *T. dicoccoides* (escanda), *T. dicoccum* (farro), *T. durum*, *T. monococcum* (escaña cultivada), *T. polonicum* (polaco), *T. spelta* (espelta), entre otros. Los trigos más importantes para el comercio son el *T. durum* (utilizado principalmente para pastas y sémola), el *T. aestivum* (utilizado para elaborar pan) y el *T. compactum* (se utiliza para hacer galletas; Kent, 1975).

Producción de Trigo

El trigo es uno de los tres cereales más ampliamente producidos globalmente, junto al maíz y el arroz. Generalmente, es transformado en harina y ésta es destinada a la elaboración de pan, galletas, pasteles, tortillas y pastas principalmente. Según las proyecciones de la FAO, la producción mundial de trigo aumentará a un ritmo más rápido durante los próximos años; más acelerado que el presentado en el período de la década de los 90, sostenido por un decidido impulso registrado en los países en transición y por un crecimiento más rápido en los principales países productores de trigo de América Latina y el Caribe (FAO, 2004). La producción mundial anual de trigo en el 2012 alcanzó más de los 670 millones de toneladas, siendo China, India y Estados Unidos los principales productores, produciendo en conjunto poco más de 273 millones de toneladas de trigo, lo que representa alrededor del 40 % de la producción total mundial (FAOSTAT, 2012).

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

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

Pérdidas en la Producción de Cereales

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

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

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

Plaga Agrícola

Una plaga agrícola es una población organismos fitófagos que disminuye la producción del cultivo, reduce el valor de la cosecha o incrementa sus costos de producción. El concepto de plaga agrícola implica reducción en el valor o en el beneficio económico que se obtiene de la cosecha; puede tratarse de reducciones en cantidad de la cosecha, en la calidad del producto, o en el incremento de los costos de producción. Se entiende por pérdida de calidad el deterioro en la presentación o aspecto del producto cosechado, o la disminución de su valor nutritivo u otra cualidad que influya en el uso del producto y baje su valor unitario (Cisneros, 1995). Cuando la reducción de la cosecha se produce en grandes extensiones, la escasez del producto suele traer consigo el incremento de su precio en el mercado; en esas condiciones puede suceder que la disminución de la cosecha no necesariamente represente una pérdida económica para los productores.

Plagas de Insectos

Para los cereales almacenados en condiciones estándares puede esperarse una pérdida de entre el 10 y el 30% de la producción total durante una temporada de almacenamiento (FAO, 1985) debido al ataque de las plagas de insectos. Estas plagas se clasifican en dos grupos: primarias y secundarias.

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

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

Métodos de Control de Plagas Agrícolas de Insectos

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

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

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

Ciclo de Vida de *Rhyzopertha dominica*

Como se mencionó anteriormente, el insecto *R. dominica* se clasifica como una plaga primaria que atacan a los granos almacenados. Es una de las especies más destructoras, con mayor abundancia y distribución en grano de trigo almacenado (Cuperus y col., 1986). *R. dominica* es un insecto holometábolo, es decir, se somete a una metamorfosis completa donde su ciclo de vida incluye cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1). La anatomía de las gónadas femeninas y los procesos de vitelogénesis y la formación de los sobres de huevo son similares a los descritos para otros insectos (Szklarzewski y col., 1992).

Huevecillo

Los huevecillos o huevos de *R. dominica* son depositados en el grano ya sea en grupos o de manera solitaria entre los excrementos producidos por el insecto. El huevo es opaco, de color blanquecino con una apariencia cerosa cuando está recién puesto, pero después de poco tiempo adquiere un color rosado (Kucerova y Stejskal, 2008). El huevo, que es de forma ovalada, es de unos 0.5-0.6 mm de longitud y 0.2-0.25 mm de diámetro (Thompson, 1966; Lecato y Flaherty, 1974; Kucerova y Stejskal, 2008). Las puntas oxidadas oscuras de las mandíbulas y la espina del abdomen de la larva son visibles a través del corion al final del desarrollo de los huevos (Kucerova y Stejskal, 2008). La mayoría de los huevos se ponen durante los primeros días y en la cuarta semana (Golebiowska, 1969).

Larva

Hay un promedio de cuatro estadios de *R. dominica*, el primero de ellos es de aproximadamente 0.78 mm de longitud y 0.13 mm de ancho a través de la cápsula de la cabeza. La larva es muy activa y se mueve rápidamente sobre los granos, los cuales mastica y se convierte en el núcleo a través de los daños causados por los adultos y se mantiene en el grano hasta que se convierte en pupa y emerge como un adulto (Winterbottom, 1922; Potter, 1935). El segundo estadio es similar en forma al primero, pero más grande en tamaño, alcanzando los 1.1 mm de largo, y 0.17 mm de espesor a través de la cápsula de la cabeza (Potter, 1935). En la tercera y cuarta etapa son prácticamente inmóviles y durante estas dos etapas la cabeza se retrae hacia el tórax, que en este momento está hinchada y podría decirse que no hay una diferencia notable en el color entre la primera, segunda y tercera fase larvaria.

Sin embargo, en el cuarto estadio, la región ventral es blanquecina, la cabeza es de color marrón claro, y el color de las mandíbulas de color marrón oscuro o casi negro. El desarrollo a través de todos los estadios tarda alrededor de 16 días en condiciones óptimas para el desarrollo rápido de la fase larvaria (Birch, 1945).

Pupa

Esta etapa no implica la muda y se puede distinguir de las larvas maduras por su forma cilíndrica más alargada y por su cabeza extendida. Durante este estadio no se alimenta y es relativamente inmóvil, pero es capaz de retorcerse limitadamente. La longitud corporal promedio es de 3.15 mm de longitud y el diámetro de la cápsula de la cabeza es 0.5 mm. La duración de la etapa prepupal es muy corta la cual dura alrededor de un día y medio. Las pupas de *R. dominica* no poseen sus apéndices fijados al cuerpo, se encuentran inactivos, y su movimiento corporal se limita a los segmentos abdominales. Las pupas jóvenes son de color blanquecino, pero más tarde se logra apreciar un pigmento marrón (Edde, 2012).

Adulto

Los adultos recién formados emergen del núcleo por la masticación a través de la capa externa del grano y puede estar sin comer durante 3-5 días después de haber emergido. El escarabajo adulto es 2-3 mm de largo y 0.8-1 mm de ancho. El peso corporal oscila desde 0.99 hasta 1.38 mg, mientras que el peso medio corporal es de aproximadamente 1.20 mg. El insecto es de color marrón rojizo a marrón oscuro y el margen anterior del tórax en forma de cúpula es crenulado (Schwardt, 1933).

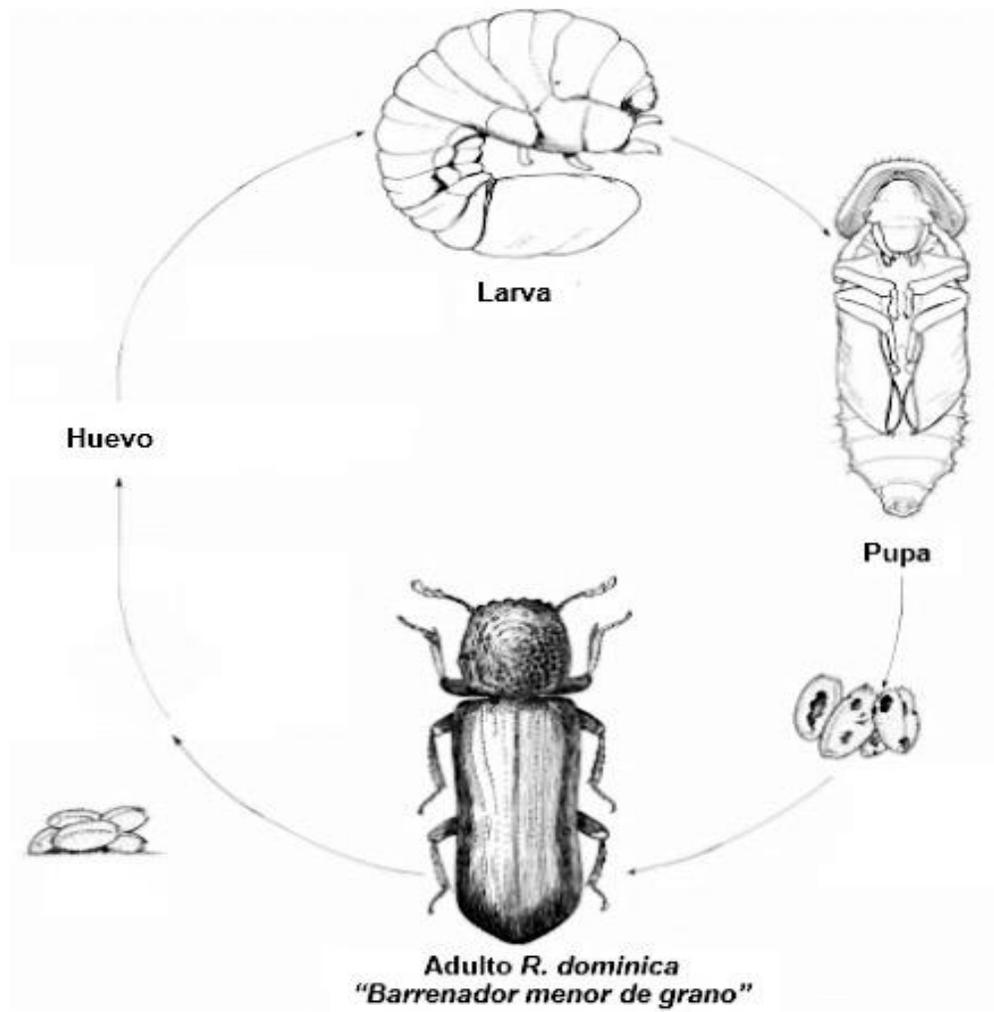


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhyzopertha dominica*. Modificado de Paul Boles. (2016).

Enzimas Digestivas

Los insectos que infestan al grano de los cereales durante su almacenamiento poseen un sistema enzimático muy eficiente que les permite alimentarse exitosamente causando grandes pérdidas económicas. En el caso de *R. dominica*, el insecto posee varias isoamilasas que hidrolizan eficientemente el almidón del grano de trigo (Cinco-Moroyoqui y col, 2006; Cinco-Moroyoqui y col., 2008), así como varias enzimas del tipo serina proteasas (Zhu y Baker, 1999). Las serina proteasas son hidrolasas que degradan enlaces peptídicos y poseen en su centro activo un aminoácido de serina esencial para la catálisis enzimática. Esta clase de enzimas (clasificadas como EC 3.4.21) incluye a la tripsina, quimotripsina, elastasa y otras. Las serina proteasas y las proteasas en general, cortan la cadena polipeptídica en el lado carboxilo de aminoácidos específicos, reconociendo ciertas secuencias en su estructura primaria (Nelson y Cox, 2009). Existe una cierta homogeneidad estructural en las serina proteasas en cuanto a conformación tridimensional, lo que sugiere una relación evolutiva (Rühlmann y col., 1973; Briand y col., 1999).

Tripsina

La tripsina está implicada en las fases iniciales de la digestión de proteínas, escindiendo preferentemente los enlaces internos de las cadenas polipeptídicas en el lado carboxilo de los L-aminoácidos básicos, arginina o lisina. La tripsina ha sido aislada del intestino medio de diversas especies de insectos y típicamente exhiben una masa molar relativa (M_r) de 20 kDa a 35 kDa y pH óptimo alcalino (Terra y Ferrerira, 1994). Investigaciones han demostrado que las especificidades de esta enzima son similares entre tripsinas de diferentes especies. Sin embargo, algunas propiedades de las tripsinas de insectos contrastan con las de las tripsinas de vertebrados.

En vertebrados es producida en forma de tripsinógeno (enzima inactiva), y luego es activada en el duodeno por la enteroquinasa a tripsina donde es esencial para la digestión. Este mecanismo de activación es muy común entre las serina proteasas y sirve para prevenir la autodigestión en el páncreas (Nelson y Cox., 2009). El pH óptimo es 8 y la temperatura óptima es 37 °C. Es una enzima específica ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos arginina o lisina en la cadena, ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial (Graf y col., 1987). Por otra parte, las tripsinas de insectos no se activan ni estabilizan mediante iones de calcio (Ward, 1975; Levinski y col., 1977; Jany y col., 1978; Johnston y col., 1991) y son inestables en pH ácido (Miller y col., 1974, Ward, 1975, Jany y col., 1978, Sakal y col., 1989). Sin embargo, algunas tripsinas son estables en pH ácido como la enzima tipo tripsina de *Musca domestica* (Lemos y Terra, 1992). Otra diferencia interesante entre las tripsinas de insectos y vertebrados es su sensibilidad a los inhibidores naturales presentes en plantas (Purcell y col., 1992).

La tripsina de humano (E.C.3.4.21) consta de una cadena polipeptídica de 224 aminoácidos de longitud que adopta la forma de una molécula globular con dos dominios con una gran cantidad de láminas β plegadas. En el punto de contacto de ambos dominios, la superficie de la tripsina presenta una abertura que alberga el lugar de unión del sustrato (Figura 2). El residuo de aspartato (Asp 189) localizado en la región catalítica de las tripsinas tiene la función de atraer y estabilizar lisinas y argininas (ambas cargadas positivamente) y por ello es responsable de la especificidad de la enzima. Esto significa que las tripsinas predominantemente cortan proteínas en el extremo carboxílico (o extremo C-terminal) de sus residuos de lisinas y argininas, excepto cuando el residuo siguiente es una prolina (Perona y col., 1993).

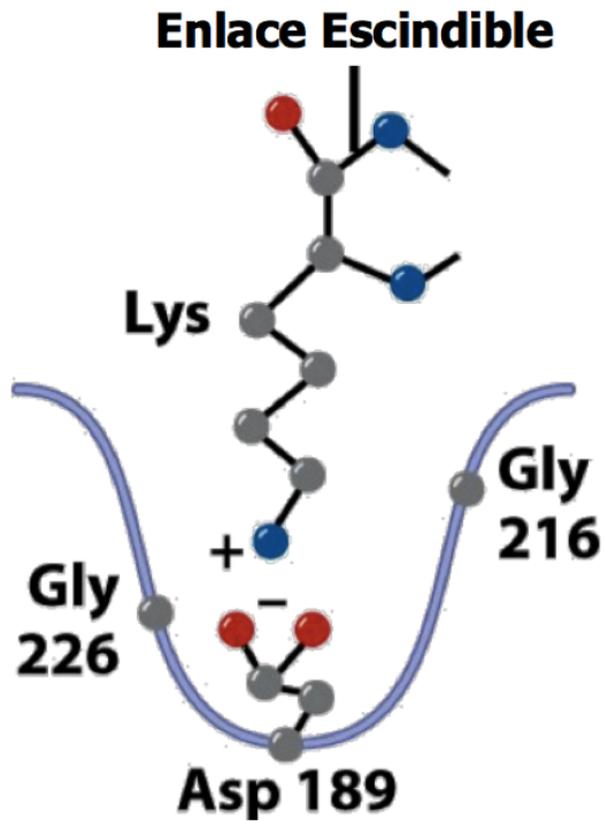


Figura 2. Sitio activo de tripsina (E.C.3.4.21). En el fondo de la hendidura hidrofóbica se encuentra un residuo de Asp 189. La carga negativa del aspartato será estabilizada con aminoácidos de las cadenas laterales que contengan carga positiva, como lo son Arg y Lys. Tomada de (Nelson y Cox, 2009).

Quimotripsina

La quimotripsina (E.C.3.4.21.1) consiste en una cadena polipeptídica de 245 residuos, con cinco enlaces disulfuro (Cohen, 1975). Es una enzima digestiva encargada de degradar las proteínas de los alimentos. Las enzimas de tipo quimotripsina se componen de dos dominios de barril β yuxtapuestos con los restos catalíticos a través del barril (Kraut, 1977; Bazan y Fletterick, 1990).

De la misma manera que con tripsina, algunas propiedades de las quimotripsinas de insectos difieren con las de las quimotripsinas de vertebrados, como su estabilidad a pH ácido (Ward, 1975; Jany y col., 1978) y su fuerte susceptibilidad a ciertos inhibidores (Jany y Pfeleiderer, 1974; Baker, 1981; Sakal y col., 1988). *In vivo* es una enzima proteolítica que actúan en los sistemas digestivos de los mamíferos y otros organismos. Rompe detrás de aminoácidos aromáticos y facilita la rotura de enlaces peptídicos por reacciones hidrolíticas, un proceso que a pesar de ser termodinámicamente favorable ocurre de forma extraordinariamente lenta en ausencia de catalizadores. El principal sustrato de la quimotripsina incluye el triptófano, tirosina, fenilalanina y metionina, que son hidrolizados en el carboxilo terminal (Jelinek y col., 2004; Nelson y Cox, 2009). En la Figura 3 se muestra la serie de reacciones que ocurren cuando quimotripsina hidroliza un enlace peptídico en una proteína sustrato. Tres aminoácidos dentro del sitio activo de la enzima, una serina, una histidina y un ácido aspártico, tienen un papel muy importante. La reacción está dividida en dos pasos donde primeramente un átomo de oxígeno con carga eléctrica negativa de la cadena lateral de la serina de la enzima incide sobre un átomo de carbono del sustrato. Como resultado, se hidroliza el enlace peptídico del sustrato y se forma un enlace covalente entre la serina y el sustrato, lo que desplaza al resto del sustrato como uno de los productos (Botos y col., 2000). La capacidad de la serina para llevar a cabo esta reacción depende del residuo de histidina cercano, el cual atrae al protón del grupo hidroxilo de la serina, lo que aumenta la potencia nucleofílica del átomo de oxígeno del grupo.

Las enzimas también utilizan moléculas de agua con frecuencia en las reacciones que catalizan. En el segundo paso que se muestra el enlace covalente entre la enzima y el sustrato se divide por una molécula de agua, lo que devuelve a la enzima a su estado original libre y libera el resto del sustrato como el segundo producto (Gerald, 2006).

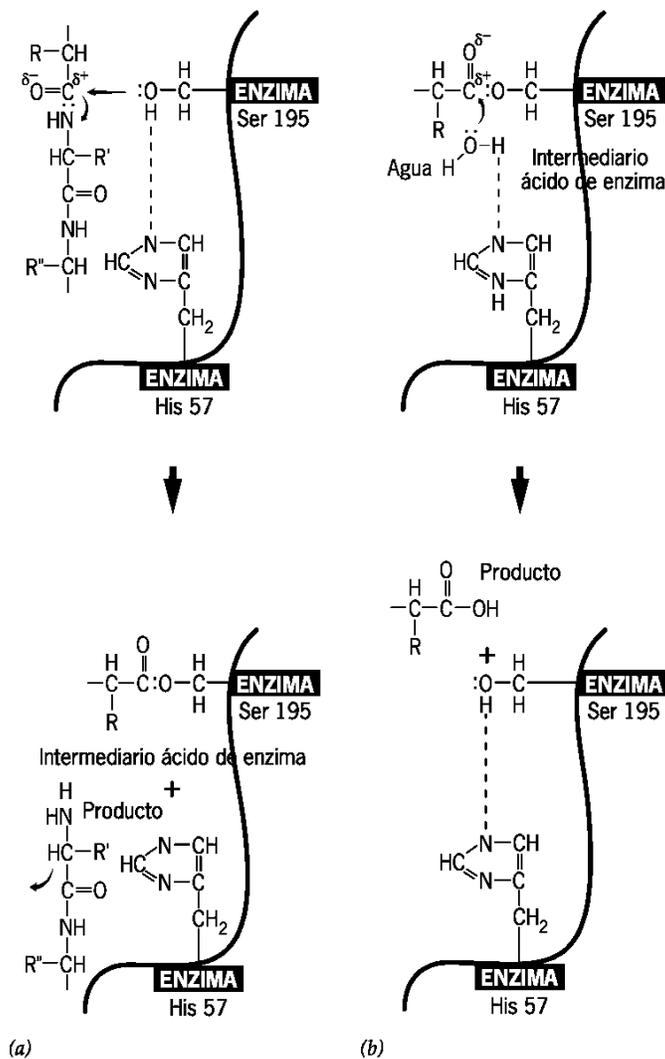


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo catalítico de quimotripsina. Modificado de Gerald, K. (2006).

Expresión Génica y Actividad Enzimática en Insectos

La regulación de la expresión génica constituye un aspecto fundamental en la regulación global del metabolismo celular y en la dirección y mantenimiento de diferencias estructurales y funcionales existentes en células en desarrollo. Debido al alto coste energético de la síntesis proteínica, la regulación de la expresión génica es esencial para que la célula pueda hacer un uso óptimo de la energía disponible (Nelson y Cox, 2009)

De la misma manera que cambian las necesidades celulares de diferentes proteínas, los mecanismos por los que se regulan sus respectivos genes también varían. El grado y tipo de regulación reflejan de forma natural la función del producto proteínico del gen. Algunos productos génicos son siempre necesarios y sus genes se expresan a nivel más o menos constante en prácticamente todas células de una especie u organismo (Gerald, 2006).

En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades mediante la activación o desactivación de la expresión de sus genes. La expresión genética es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero (ARNm) de un gen determinado. Este es un hecho crucial cuando se trata de identificar la presencia de productos celulares específicos ya que el ARNm es traducido en los ribosomas para formar proteínas. Por lo tanto, es posible obtener datos relativos a la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson y col., 2008).

Se ha reportado que diversos factores como la disponibilidad de nutrientes, la presencia de inhibidores y el estadio de desarrollo de los insectos se encuentren, pueden influir en las necesidades celulares de distintas proteínas, así como variar los mecanismos por los que se regulan sus respectivos genes (Prud'homme y col., 2007).

Está demostrado que la inanición en insectos da como resultado una fuerte disminución de la actividad de enzimas del tipo serina proteasa. Esto último presumiblemente representa un mecanismo de ahorro de energía y previene la auto-digestión del intestino medio por una cantidad excesiva de proteasas en el sistema digestivo cuando no hay alimento presente (Spit y col. 2014)

En 1999 un estudio realizado en *Drosophila melanogaster* por White y col., señaló que el incremento en la concentración de ecdisona, hormona que da lugar al inicio de la metamorfosis del insecto, induce la expresión de genes que codifican para proteínas que son requeridas por la larva y causa la formación de sitios de alta expresión y también que dicha expresión disminuye cuando se da la transición de larva a pupa.

Por otra parte, Chougule y col. (2005) encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de cinco proteasas intestinales del tipo tripsina en diferentes estadios del desarrollo larvario de la oruga del tabaco *Helicoverpa armigera*, observando niveles altos de expresión en los primeros estadios. Otras investigaciones han demostrado que la presencia de inhibidores provenientes de las plantas impacta sobre la expresión de diferentes genes. Kuwar y col. (2015) en un estudio sobre *H. armigera*, presentó una regulación adaptativa de serina proteasas digestivas en el intestino medio de larvas en respuesta a un inhibidor de tripsina extraído de la soja, así como disminución de la expresión génica de tripsina y aumento de la expresión de quimotripsina insensible al inhibidor.

Otros resultados en *H. armigera* enfatizan la complejidad de la proteólisis digestiva y su control en el insecto. Se propone que no sólo el insecto es capaz de recurrir a un gran número de genes codificadores de proteasas para producir enzimas con propiedades diferentes para la digestión de proteínas, sino que también es capaz de regular su expresión de forma diferente cuando se introducen inhibidores de proteasa en la dieta y por lo tanto responder a proteínas vegetales defensivas (Bown y col., 2004).

Un ejemplo de esto es lo reportado por Kuwar y col. (2015) donde señalaron que, aunque inicialmente la actividad proteolítica aportada por la expresión de tripsinas y quimotripsinas de *H. armigera* puede ser por medio de una expresión del tipo “shotgun”, donde hay un aumento en la expresión de proteínas independientemente de su clase, las larvas eventualmente regulan selectivamente la expresión génica de proteasas en respuesta a la acción inhibitoria. Se ha sugerido que la producción de proteasas inactivas podría secuestrar los inhibidores de proteasas ingeridos en la dieta y proporcionar así una ventaja adaptativa sin la necesidad de cantidades excesivas de actividad de proteasas en el intestino medio (Mazumdar-Leighton y col., 2000).

Por otra parte, se han encontrado que existen pequeñas variaciones en las regiones conservadas que rodean a los residuos de la tríada catalítica de serina proteasas, de acuerdo con informes previos realizados en diferentes insectos (Zhu y Baker, 1999; Coates y col., 2006; Prabhakar y col., 2007; Marshall y col., 2008). Sin embargo, los efectos de estas variaciones de secuencias sobre la actividad enzimática y la sensibilidad permanecen poco claros.

Las estrategias de control de plagas utilizando inhibidores de proteasas se han basado en el perfil de proteasas intestinales de las etapas larvarias de los insectos, siendo las serina proteasas predominantes. El análisis de los perfiles de proteasas intestinales de diferentes instares revela diferentes niveles de actividad proteolítica en los diferentes estadios. También se ha observado variaciones significativas en las actividades específicas de tripsina, quimotripsina, cisteína proteasa, carboxipeptidasa-A y aminopeptidasa-N a través de los instares de *Epiphyas postvittana* (Simpson, y col., 2007). Se ha reportado que múltiples funciones del desarrollo de los insectos se ven afectadas por la inhibición parcial o total de tripsina, quimotripsina, elastasa, entre otras enzimas digestivas, por parte de inhibidores de serina proteasas, denominados serpinas, los cuales también se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes especies (Li y col., 2017).

Jamal y col. (2015) purificaron un inhibidor de proteasas de las semillas de *Butea frondosa* (*Butea monosperma*) (BmPI), y estudiaron su influencia en la fisiología del desarrollo de *H. armigera*. El inhibidor mostró actividad inhibitoria de tripsina en un amplio intervalo de pH y temperatura y en respuesta la fertilidad y la fecundidad de *H. armigera* disminuyeron mientras que la duración de la etapa larval y pupa se extendió. Sellami y Jamoussi (2016) mostraron que el desarrollo de las larvas minero de la hoja de tomate *Tuta absoluta* en comparación con otras etapas de su ontogenia, fue más afectado por un inhibidor de la β -glucosidasa (D-glucono- δ -lactona) que por el inhibidor de serina proteasas (inhibidor de la tripsina extraído de la soja).

Todas estas observaciones enfatizan la necesidad de estudios bioquímicos y biomoleculares adicionales para conocer más sobre la expresión génica de diferentes enzimas y las implicaciones de las variaciones en las secuencias de aminoácidos de diversas proteasas, así como la susceptibilidad de las enzimas de los insectos a los diferentes inhibidores durante las diferentes etapas de su ontogenia.

HIPÓTESIS

Durante la etapa adulta de *Rhyzopertha dominica* se disminuye la expresión de genes y la actividad enzimática de tripsina y quimotripsina con respecto al estadio larval.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la expresión génica y la actividad enzimática de tripsina y quimotripsina de *Rhyzopertha dominica* durante su ontogenia.

Objetivos Particulares

- Obtener una secuencia parcial del ADN complementario de tripsina y quimotripsina de *R. dominica*.
- Cuantificar el ARNm de tripsina y quimotripsina de *R. dominica* durante su ontogenia por PCR en tiempo real.
- Evaluar la actividad enzimática de las enzimas proteolíticas durante la etapa larval y adulta de *R. dominica* por métodos cualitativos y cuantitativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Generación de la Colonia de *Rhyzopertha dominica*

La colonia se generó a partir de insectos de *Rhyzopertha dominica* obtenidos del Laboratorio de Entomología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Universidad de Sonora, utilizando una población de 100 insectos no sexados para infestar a 1 kg de trigo (*Triticum durum*), y se incubó a 27 °C y 70% de humedad relativa en una cámara de cría durante un período de 15 días de oviposición. Posteriormente, se recuperaron las larvas y los adultos, los cuales fueron lavados para eliminar partículas ajenas al insecto en 20 mL agua jabonosa en una proporción de 10:1, hipoclorito de sodio al 2% y agua destilada, posterior a esto se dejaron secar.

Aislamiento del ARNm Total de *Rhyzopertha dominica*

Para la obtención de las secuencias de ADNc se aisló el ARN total de insectos adultos y larvas, utilizando 50 y 15 mg respectivamente. Los insectos fueron homogenizados en 250 mL del reactivo TRIzol® (Invitrogen, CA), que tiene su fundamento en la metodología descrita por Chomczynski y Sacchi (1987); siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez homogenizados los insectos con 1 mL de TRIzol®, se adicionaron 200 µL de cloroformo, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4 °C. Se colectó la fase acuosa y se repitió la extracción adicionando 500 µL de TRIzol®. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min a 4 °C y se colectó de nuevo la fase acuosa a la que se le adicionó 1mL de isopropanol frío, se incubó por 10 min y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4 °C. Se colectó el pellet resultante, el cual fue lavado con 1 mL de etanol al 75% en agua tratada con 0.1% dietilpircarbonato (DEPC, por sus siglas en inglés) frío. Se llevó a cabo una

última centrifugación a 7,500 x g por 5 min a 4 °C, y se eliminó el sobrenadante, así como el exceso remanente de etanol y posteriormente se adicionaron 30 µL de agua DEPC al 0.1%.

Cuantificación y Evaluación de la Integridad del ARN Total

El ARN total obtenido de la extracción se cuantificó a una longitud de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 v 3.5.2, (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, la integridad del ARN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con UView™ 6x Loading Dye (1 µL/5 µL de muestra; Bio-Rad Laboratories, Inc.) como marcador fluorescente, utilizando 3 µg de ARN total. La electroforesis se corrió a 60 volts y las bandas fueron detectadas en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-rad, USA), empleando el programa informático Image Lab™ Software (Bio-rad, USA).

Eliminación del ADN Genómico Contaminante Presente en las Muestras de ARNm Total y Síntesis de ADN Complementario

Para eliminar la contaminación por ADN genómico (ADNg) en las muestras de ARN total, se trataron 8 µg de cada muestra con DNasa I (1 U/µg de ARN; Sigma, USA) como lo indican las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron las muestras a 37 °C por 20 min y se inactivó la enzima adicionando 1 µL de EDTA 50 mM y elevando la temperatura a 70 °C por 10 min. Una vez terminado el tratamiento se realizó un PCR con la finalidad de confirmar la ausencia del ADNg. El ADN complementario (ADNc) se sintetizó a partir de 5 µg de ARN total de *R. dominica* libre de ADNg empleando el kit comercial Superscript First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, CA), en el cual se homogenizaron los 5 µg de ARN total con 1 µL de oligo dt y 1µL de dNTP mix 10 Mm. Posteriormente se incubó 5 min a 65 °C, al termino se agregaron 10 µL de una mezcla que incluye por reacción 2 µL de buffer RT 10x, 4 µL de MgCl₂ 25 Mm, 2 µL de DTT 0.1M, 1

μL de RNAsaOut (40 U/ μL) y 1 μL de Superscript III RT (200 U/ μL) y se incubó a 50 min a 50 °C, posteriormente, se elevó la temperatura a 85 °C por 5 min y finalmente se incubó por 20 min a 37 °C y se almacenó a -10 °C.

Amplificación del Gen de Tripsina y Quimotripsina por PCR

Se implementaron condiciones óptimas para la amplificación por PCR de los fragmentos de los genes de tripsina y quimotripsina. Durante el proceso de amplificación se utilizó como templado el ADNc sintetizado libre de contaminante. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de secuencias codificantes de tripsina y quimotripsina de *R. dominica* reportadas en las bases de datos (GenBank: AF127088.1, AF130842.1, AF130841.1, AF130840.1) con las siguientes características: 40-60% GC, longitud entre 17 y 23 pares de bases y GC clamp en los extremos. También se diseñaron con la finalidad de obtener un amplicón de entre 150 y 250 pares de bases, tamaño suficiente para poder realizar la evaluación de la expresión génica. El tamaño de las bandas resultantes de la amplificación por PCR de los genes de tripsina y quimotripsina, fueron verificadas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Uview® 6x loading dye (Bio-Rad, USA). Cada gel se corrió a 60 volts y las bandas fueron reveladas en un fotodocumentador de luz Gel Doc™ EZ System de Bio-Rad.

Cuantificación del ARNm por PCR en Tiempo Real

La cuantificación del ARNm de los genes por RT-PCR en tiempo real fue realizada en un equipo StepOne Real-Time PCR-System (Applied Biosystems, USA) basado en la detección y cuantificación del fluoróforo SYBR-Green intercalado en las dobles cadenas de los productos de PCR. Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 1. Cada reacción de PCR en tiempo real incluyó 12.5 μL de una mezcla Master mix for real-time qPCR with green-fluorescent DNA stain (Jena Bioscience, Germany), 0.8 μM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido) y

200 ng de ADNc sintetizado a partir de ARN total de cada muestra. Así mismo en cada reacción de PCR en tiempo real se incluyeron controles negativos sin templado y sin oligonucleótidos. Se construyó una curva estándar para el gen de la tripsina y quimotripsina utilizando producto de PCR purificado como templado. Se realizaron 10 diluciones seriadas de 0.25 ng a 2.5×10^{-9} ng para las curvas estándares de tripsina y quimotripsina. La eficiencia del PCR (%) fue calculada para cada fragmento y comparada entre ellos de manera equivalente.

Tabla 1. Condiciones para la cuantificación de los fragmentos de interés por PCR en tiempo real.

Gen	Paso	Temperatura	Tiempo	
Tripsina	1	95 °C	10 min	
	2	95 °C	15 s	
	3	42 °C	25 s	40 ciclos
	4	72 °C	20 s	
	5	95 °C	15 s	
	6	42 °C	25 s	Curva de disociación
	7	95 °C	15 s	
Quimotripsina	1	95 °C	10 min	
	2	95 °C	15 s	
	3	52 °C	25 s	40 ciclos
	4	72 °C	20 s	
	5	95 °C	15 s	
	6	52 °C	25 s	Curvas de disociación
	7	95 °C	15 s	

Preparación de Extractos Proteolíticos

La preparación de los extractos proteolíticos se realizó según la metodología propuesta por Osuna-Amarillas y col. (2012), donde se muestrearon larvas y adultos de *R. dominica* tomando 100 y 200 ejemplares respectivamente, los cuales se homogenizaron en buffer de ensayo (buffer fosfato 100 mM, pH 8). La mezcla se hizo pasar a través de papel filtro Whatman® Grade 42 y se centrifugó a 10,000 x g durante 30 min a 4 °C en donde se recuperó el sobrenadante. El homogeneizado se saturó con sulfato de amonio al 25% durante 1 h. El precipitado formado se centrifugó a 10,000 x g durante 1 h, se disolvió en buffer de ensayo y fue pasado a través de filtros de nylon de 0.45 µm. Se llevó a cabo una cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH), donde aproximadamente 45 mg de proteína de la fracción resultante se cargaron en una columna de fenil sefarosa equilibrada con buffer de ensayo con 25% (w / v) de saturación de sulfato de amonio. Después de que toda la proteína no unida se desprendió de la columna con buffer de equilibrio, la proteína con actividad proteolítica se eluyó con un gradiente lineal de etilenglicol en buffer de ensayo sin sulfato de amonio.

Ensayos Proteolíticos

Se colectaron las fracciones obtenidas de la cromatografía de interacción hidrofóbica que presentaron actividad utilizando un sustrato específico para tripsina (BApNA, N-benzoil-arginina-p-nitroanilida). Dicha actividad fue determinada mediante un ensayo enzimático que consiste mezclar 75 µL de la fracción, 325 µL de buffer de ensayo, 200 µL solución BApNA (BApNA 0.4 mg/mL, 200µL dimetil sulfóxido, buffer de fosfato 100 mM, pH 8). Esta mezcla de reacción fue incubada durante 10 min a 37 °C, posteriormente se detuvo la reacción con 150 µL de ácido tricloroacético al 30%.

Finalmente, se tomó lectura de absorbancia a una longitud de onda de 410 nm. Se estableció una unidad de actividad como el cambio en 0.01 unidades de absorbancia en las condiciones del ensayo.

También se realizó un ensayo de actividad proteolítica total, utilizando azocaseína como sustrato basándose en la metodología de An y col. (1994). La mezcla de reacción consistió en 100 μL de la fracción purificada, 100 μL de buffer de ensayo, y 300 μL de azocaseína al 0.5%. La reacción fue detenida con 500 μL de ácido tricloroacético al 30% transcurrida 1 h de incubación a 37 °C. Posteriormente, se centrifugó a 2,000 x g por 5 min, y al sobrenadante se le agregó 60 μL NaOH 10 N. Finalmente, se tomó lectura de absorbancia a una longitud de onda de 428 nm. De igual manera que el ensayo de actividad del tipo tripsina, se estableció una unidad de actividad como el cambio en 0.01 unidades de absorbancia en las condiciones del ensayo.

Cuantificación de Proteína

El contenido de proteína de los extractos proteolíticos de insectos se determinó por el método de Lowry con una modificación que da una respuesta espectrofotográfica lineal a una longitud de onda de 650 nm (Hartree, 1972). El ensayo se realizó por triplicado y consistió inicialmente en 100 μL de la muestra, 900 μL de agua y 900 μL de solución A (Na_2CO_3 al 2%, NaOH 0.1 M). Se incubó la mezcla durante 10 min a 50 °C. Seguido de esto se mantuvo a temperatura ambiente por 3 min y se agregaron 100 μL de la solución B (tartrato sódico-potásico al 2%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%). Transcurridos 10 min se agregaron 3 mL de la solución C (reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua en proporción 1:15) y se incubó nuevamente durante 10 min a 50 °C. El blanco consistió en la misma mezcla de reacción a excepción que se sustituyó el volumen de la muestra por un volumen de agua.

Se construyó una curva estándar con albúmina de suero bovino al 0.1% (BSA, por sus siglas en inglés). A partir de esta concentración se realizaron alícuotas en el rango de 0 a 100 μg en intervalos de 20 μg y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Determinación de los Parámetros Cinéticos

Para determinar K_m y V_{max} , se combinaron cinco concentraciones de BApNA en el intervalo de 0.1 / 1.0 mM con 20 unidades de actividad de proteasa en buffer de fosfato 100 mM, pH 8.0. Las reacciones se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente en el apartado de ensayos proteolíticos. La estimación de los parámetros se obtuvo ajustando los valores observados de V_0 frente a la concentración de sustrato a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando software de ajuste de curva de correlación no lineal (SigmaPlot; Systat software). Con la determinación de los valores de V_{max} y K_m se logró calcular la eficiencia fisiológica (V_{max}/K_m)

Análisis por Zimografía

Los homogeneizados proteolíticos crudos y las fracciones reunidas de la cromatografía de interacción hidrófoba se analizaron por zimografía en condiciones semidesnaturalizantes (Laemmli, 1970; Garcia-Carreno y col., 1993). Las alícuotas de proteasas se combinaron en una relación 5:1 con buffer muestra sin β -mercaptoetanol y solamente con 4% de SDS, sin la realización de un tratamiento térmico. Se cargaron 30 U de actividad de cada muestra en un sistema de gel de poliacrilamida que consistía en un gel de separación de acrilamida al 12% y un gel de compactación al 4%, ambos conteniendo 1.35% de bisacrilamida. La separación de proteínas se realizó a un amperaje constante de 20 mA durante 3 h. El buffer de corrida fue Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1 %, pH 8.3. Después de la electroforesis, se recuperó el gel que contenía las proteasas y

se sumergió en una solución de caseína al 2% (pH 8.0) para primeramente ser incubado con agitación 30 min a temperatura de refrigeración, y posteriormente a 37 °C durante 6 h. Finalmente, el gel fue teñido con azul de Coomassie al 0.1% y desteñido al transcurrir las 2 h.

Análisis Estadístico

Los datos de la evaluación de la expresión génica y actividad enzimática fueron analizados estadísticamente por una prueba t de student en el software NCSS versión 2007, comparando los datos de adultos y larvas. Se consideró un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0.05$), además de la utilización de estadística descriptiva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y Evaluación de la Integridad del ARN Total

Se realizaron las extracciones de ARN total de 3 muestras de larvas y 3 muestras de insectos adultos. Una vez cuantificadas, se evaluó la integridad del ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 4), en donde se observan las bandas correspondientes a las subunidades del ARN ribosomal 18 y 28S entre los 800 y 1000 pares de bases reportadas por la bibliografía, además, de la ausencia de barrido en las muestras confirmando de esta manera la integridad del ARN (Sambrook y col., 1989).

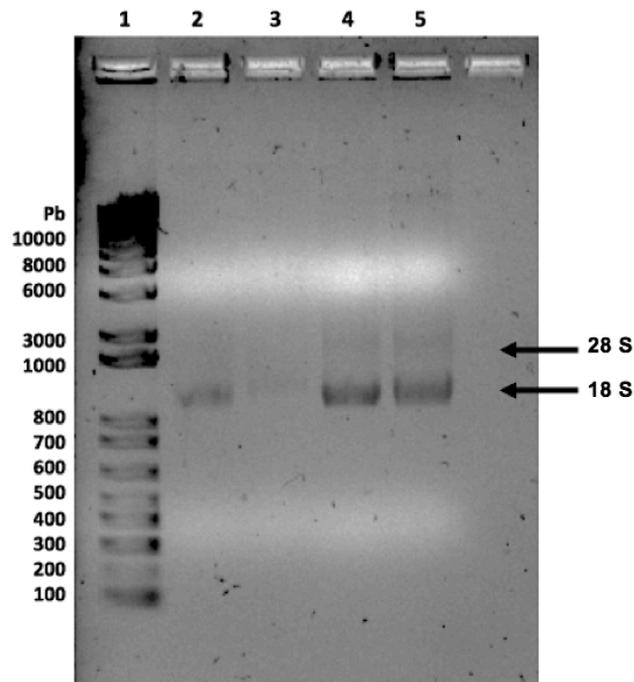


Figura 4. Integridad del ARN total de *R. dominica*. 1) 1 KB Plus como marcador molecular. 2-5) Muestras de ARN total de *R. dominica*.

Digestión del ADN Genómico

Dado que el ADN genómico (ADNg) intrínseco del insecto cuenta con secuencias codificantes (exones), las cuales están presentes en el ARNm maduro, se realiza una digestión de éste con la finalidad de evitar posibles interferencias en la evaluación de la expresión génica. En la Figura 5, se corrobora la eliminación de ADNg por la enzima DNAsa I debido a la ausencia de una banda de amplificación del gen de tripsina (carril 2-3), el control negativo (carril 4) indica que todos componentes del PCR se encuentran libres de contaminantes y el control positivo de tripsina (carril 5) indica un buen funcionamiento de los ciclos de amplificación del PCR.

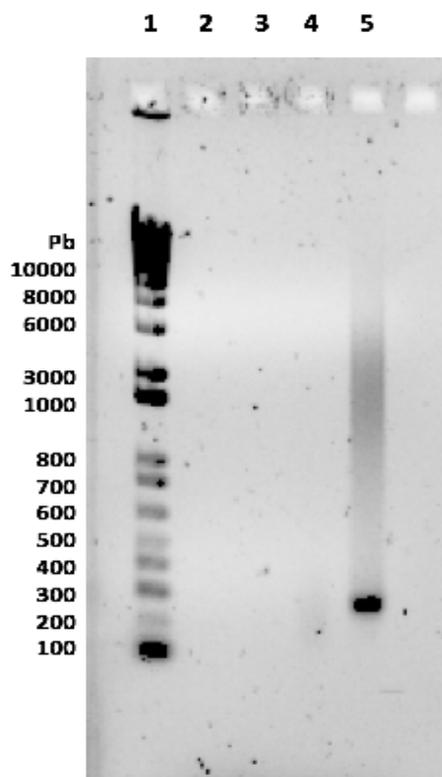


Figura 5. Digestión del ADN genómico de *R. dominica*. 1) Marcador molecular 1 KB Plus. 2-3) ARN tratado con DNAsa I. 4) Control negativo de la amplificación con tripsina. 5) Producto de PCR conocido amplificado con tripsina.

Amplificación del Gen de Tripsina y Quimotripsina por PCR

A partir de secuencias de *R. dominica* reportadas en bases de datos, codificantes a tripsina y quimotripsina (GenBank: AF127088.1, AF130842.1, AF130841.1, AF130840.1), se diseñaron los oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento de ADNc de 213 pb de tripsina y 243 pb de quimotripsina. Las características de cada oligonucleótido se describen en la Tabla 2, observándose que cada uno cuenta con las propiedades necesarias para ser utilizados en la evaluación de la expresión génica.

Tabla 2. Características de los oligonucleótidos diseñados para tripsina y quimotripsina de *R. dominica*.

Gen	Oligo	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)	Amplificación (pb)
Tripsina	RdoTRFW	TCGTCACGGGTTGGGG	16	57.8	213
	RdoTRRV	ACCATATCCCCAAGAAAC	18	48.9	
Quimo- tripsina	RdoQFW3	CAACAT TTGCACGCTCACCA	20	56.7	243
	RdoQRV1	GCCGAAACTGCGTTTATTAGAAC	23	54.7	

pb: pares de bases; Tm: temperatura de fusión.

Con el ADNc sintetizado y oligonucleótidos específicos previamente diseñados se logró llevar a cabo la amplificación para los fragmentos de los genes de tripsina y quimotripsina de *R. dominica* por PCR convencional. En la Figura 6 se muestran las bandas de amplificación de quimotripsina (carril 3) y tripsina (carril 7) en conjunto con varios controles negativos (carril 4-6). Las bandas obtenidas sugirieron la obtención de los fragmentos de interés de 213 pb correspondientes a tripsina y 243 pb a quimotripsina.

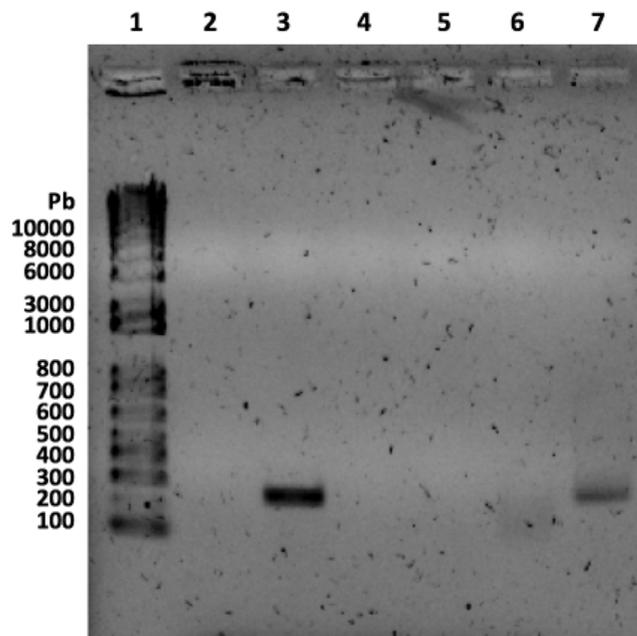


Figura 6. Amplificación de fragmentos de ADNc de *R. dominica*. 1) Marcador molecular 1 KB Plus. 2) Fragmento no amplificado para quimotripsina. 3) Fragmento de ADNc amplificado para quimotripsina. 4) Control negativo para quimotripsina. 5) Control negativo para quimotripsina. 6) Control negativo para tripsina. 7) Fragmento amplificado de tripsina.

Las secuencias nucleotídicas completas reportadas de quimotripsina y tripsina de *R. dominica* fueron comparadas con la secuencias obtenidas en el laboratorio a partir de los fragmentos amplificados que fueron elucidadas en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Utilizando los algoritmos BLAST y Clustal W se realizaron alineamientos múltiples entre las secuencias depositadas en bases de datos y las secuencias obtenidas experimentalmente (TRYRdoSEC y QTRYRdoSEC). En el caso de tripsina los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados para amplificar los tres tipos reportados (Zhu y Baker, 1999), por lo que se hizo un alineamiento múltiple entre todas las secuencias (Figura 7), obteniendo específicamente un 99% porcentaje de identidad con la tripsina tipo 3 (GenBank: AF130842.1; Figura 8). Por otro lado, se observó un porcentaje de identidad del 97 % entre las secuencias de quimotripsina (Figura 9). Una vez obtenidas y confirmadas estas secuencias se prosiguió con la evaluación de los cambios en la expresión de los genes de las enzimas por qRT-PCR.

```

R. dominica TRYT1      GTCAATTTAAAGGATTGCCAAGAAGCCTACGGAGGAGACGTGGATGAGTCCATGATATGT
R. dominica TRYT2      -----GGAGCCACACCCACTCAGCTTCAGAGCGTGGTAGTTCATCCATC
R. dominica TRYT3      GTTTCGTTGGAAGAATGCAGAGCTGCATATGGACAAGCGGATGTCACCGATAGGATGGTT
TRYRdoSEC              GTTTCGTTGGAAGAATGCAGAGCTGCATATGGACAAGCGGATGTCACCGATAGGATGGTT
                        **      *

R. dominica TRYT1      GCAGGCCGAATACTTAGATGGTGAAAAGATTCATGCCAGGGTGAAGTCTGGTGACCCTT
R. dominica TRYT2      TGCGCCGGAGTGAAGAGGGAGGCAAGGACGCATGCCAGGGTGATTCTGGCGGCCCACTG
R. dominica TRYT3      TGCGCCGGATACACTGAGGGTGAAAAGGATGCTTGTCAGGGTGATTCTGGTGCCCCCTG
TRYRdoSEC              TGCGCCGGATACACTGAGGGTGAAAAGGATGCTTGTCAGGGTGATTCTGGTGCCCCCTG
                        * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

R. dominica TRYT1      GTGATAAATGGCGTGCAATATGGTATTGTTTCATGGGGATACGGTTGCGCTTTGCCTGGA
R. dominica TRYT2      GTCGCAGATGACGTGCTCGTCTCGTCTCCTGGGGATATGGTTGTGCCAGGCCCAAC
R. dominica TRYT3      GTTGTAGGTGATGAACTTATTGGTATCGTTTCTTGGGGATATGGTTGTGCAAGGCCAAC
TRYRdoSEC              GTTGTAGGTGATGAACTTATTGGTATCGTTTCTTGGGGATATGGTAAANCC-----
                        **      * * * * * *      * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 7. Alineamiento de la secuencia parcial obtenida con los tres tipos de tripsina reportadas de *R. dominica* (GenBank: AF130842.1, AF130841.1, AF130840.1). El símbolo (*) indica las bases que se conservan en las secuencias.

```

R. dominica TRYT3   GGTGGATCATTGCCTTCCATCCTCCAGGTGGTGC-AGGTGCCGATCGTTTCGTTGGAAGA
TRYRdoSEC          -----AGCATCCTCATCCTCCAGGTGGTGCAGGTGCCGAATCGTTTCGTTGGAAGA
                      ***** * * *****

R. dominica TRYT3   ATGCAGAGCTGCATATGGACAAGCGGATGTCACCGATAGGATGGTTTGCGCCGATACAC
TRYRdoSEC          ATGCAGAGCTGCATATGGACAAGCGGATGTCACCGATAGGATGGTTTGCGCCGATACAC
                      *****

R. dominica TRYT3   TGAGGGTGGAAAGGATGCTTGTGTCAGGGTGATTCTGGTGGCCCCCTGGTTGTAGGTGATGA
TRYRdoSEC          TGAGGGTGGAAAGGATGCTTGTGTCAGGGTGATTCTGGTGGCCCCCTGGTTGTAGGTGATGA
                      *****

R. dominica TRYT3   ACTTATTGGTATCGTTTCTTGGGGATATGGTTGTGCAAGGCCTAACTACCCAGGAGTATA
TRYRdoSEC          ACTTATTGGTATCGTTTCTTGGGGATATGGTTAAANCC-----
                      ***** *

```

Figura 8. Alineamiento de la secuencia del fragmento amplificado de tripsina con respecto a la secuencia reportada con la que se presenta 99% de identidad (GenBank: AF130842.1). El símbolo (*) indica las bases que se conservan en las secuencias.

```

R. dominica QTRY   GGAGAAGGAACCTTGCAAGGGAGATTCAGGTGGACCACTGGTAGCCAATGGCAAATTGGTT
QTRYRdoSEC        -----NTACTGCANGGAGATCAGGTGGACCACTGGTAGCCAATGGCAAATTGGTT
                      * * *****

R. dominica QTRY   GGTGTTGTGTCTTGGGGAAATCCATGTGCCAAGGGTGAGCCTGATGGGTATAACAAGGGTA
QTRYRdoSEC        GGTGTTGTGTCTTGGGGAAATCCTNGTGCCAAGGGTGAGCCTGATGGGTATAACAAGGGTA
                      *****

R. dominica QTRY   TCGCACTATGTTCGATTGGATAAGAGAGAAAACCTGGTTTGGAAAGTTTAATTGTTTGATTAA
QTRYRdoSEC        TCGCACTATGTTCGATTGGATAAGAGAGAAAACCTGGTTTGGAAAGTTTAATTGTTTGATTAA
                      *****

R. dominica QTRY   AAGATTTGTATGAAAGTTCTAATAAACGCAGTTTCGGCATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
QTRYRdoSEC        AATATTTGTATGAAAGTGTCCAAANTCGAATTTCTA-----
                      ** ***** * * ** * ****

```

Figura 9. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de quimotripsina de *R. dominica* reportada con respecto a la obtenida del fragmento amplificado (GenBank: AF127088.1). El símbolo (*) indica las bases que se conservan en las secuencias.

Expresión Absoluta de Tripsina y Quimotripsina de *R. dominica*

La cuantificación de ARN mensajero se realizó de manera absoluta mediante una curva estándar del fragmento de ambos genes de concentración conocida. Para cada una de las seis diluciones, el cambio en la fluorescencia (ΔR_n) se midió y se representó frente a los ciclos umbrales (CT). Se generó una curva estándar trazando los valores de CT contra la concentración de ARN conocida (Figura 10).

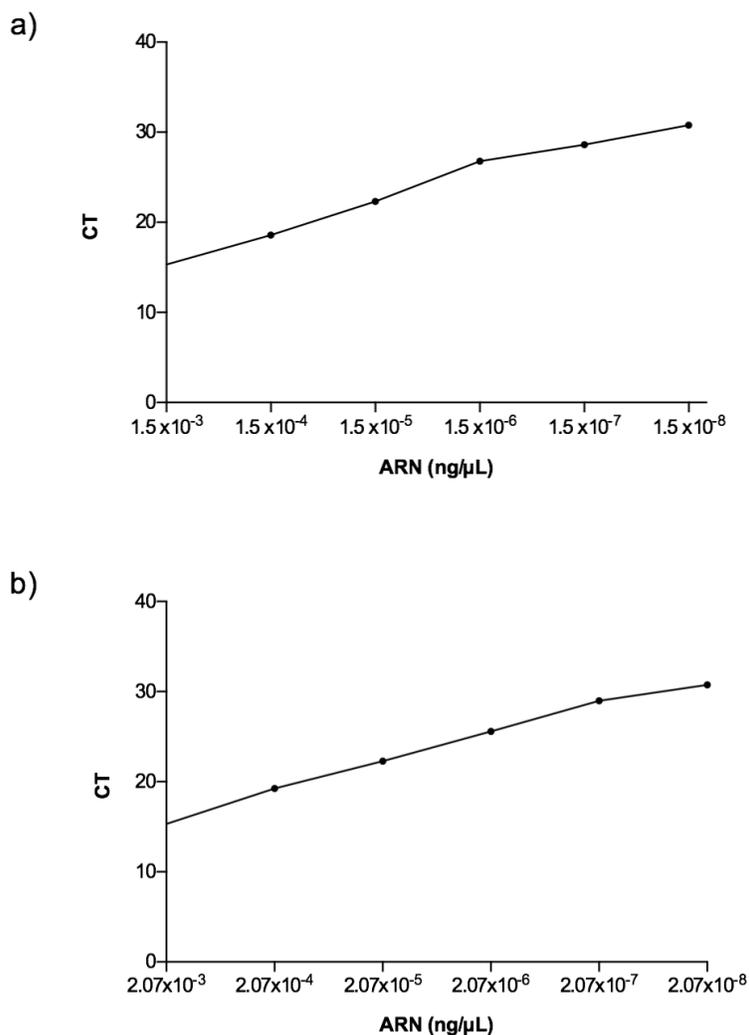


Figura 10. Curvas estándar para la cuantificación absoluta de a) tripsina y b) quimotripsina a partir de concentraciones conocidas de ARN.

La eficiencia de las reacciones fue alrededor del 108 % en ambos casos y se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar (Tabla 3). Aunque comúnmente y con la finalidad de simplificar el análisis de la expresión relativa de un gen se asume que las eficiencias para todas las curvas son del 100%, es importante conocer la eficiencia real de la reacción y tomarla en cuenta al momento de calcular la expresión relativa del gen de interés, ya que al tratarse de un incremento exponencial en el número de copias se puede sobreestimar o subestimar los niveles de expresión relativa (Pfaffl, 2001).

Tabla 3. Valores de la curva estándar de amplificación de serina proteasas de *R. dominica*.

Gen	Pendiente (ln)	Intercepto Y	R ²	Eficiencia (%)
Tripsina	-1.38	6.71	0.98	108.64
Quimotripsina	-1.36	7.45	0.99	108.44

En una reacción de PCR en tiempo real no se detecta cuanto ADNc se acumula al final, sino que se va midiendo continuamente para determinar en qué ciclo de la PCR se alcanza un valor umbral (CT). Cuanto antes se alcance (número de ciclos más bajo) mayor será la concentración inicial del ARNm. En la Figura 11 se muestran los resultados de la cuantificación del ARNm de larvas y adultos para los genes de tripsina y quimotripsina obteniendo 6.32×10^{-6} y 3.90×10^{-4} ng/ μ L y 6.83×10^{-6} y 3.88×10^{-4} ng/ μ L respectivamente. Dado que la expresión genética es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero (ARNm) de un gen determinado, se concluye que existe una mayor expresión génica de ambos genes en la etapa adulta del insecto.

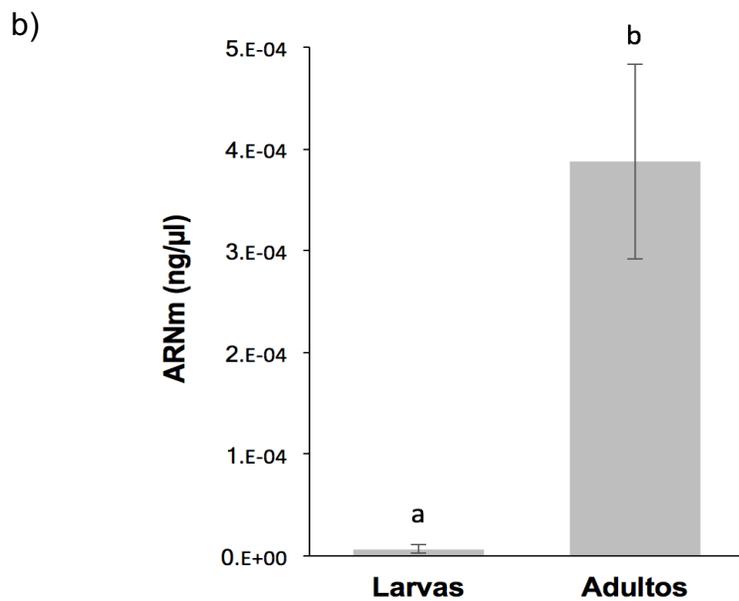
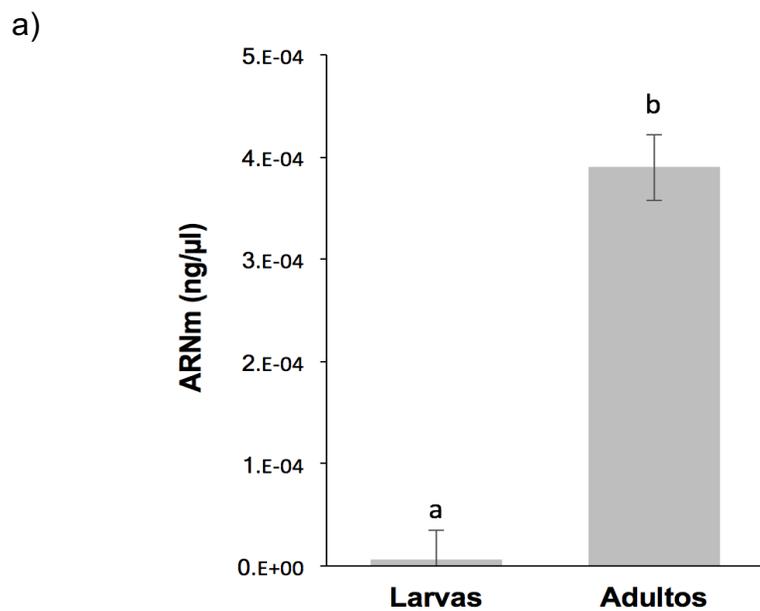


Figura 11. Cuantificación de ARNm de a) tripsina y b) quimotripsina de larvas y adultos de *R. dominica*. Diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Los insectos cuentan una gran diversidad de hábitos y fuentes de alimentación, por lo que poseen una alta versatilidad en la estructura y funcionalidad de su tracto intestinal. Los cambios mayores en la estructura intestinal y en su función casi siempre ocurren en aquellos insectos en los que los alimentos larvarios y adultos son diferentes, como es el caso de los insectos con metamorfosis completa (Nation, 2008). Es por eso que las diferencias de expresión génica obtenidas pueden tener una explicación fisiológica, ya que el paso de larva a adulto requiere una serie de cambios drásticos que ocurren durante la fase de pupa, que es un estado inmóvil intermedio entre larva y adulto (Koopmanschap y col., 1995; Wheeler y col., 2000;). La reorganización de los tejidos tiene lugar por medio de la acción de enzimas digestivas que destruyen la mayor parte de las células, lo cual recibe el nombre de histólisis y los nutrientes derivados de este proceso son usados para construir los nuevos tejidos del adulto en el proceso de histogénesis (Denlinger, 2002; Triplehorn y col. 2005).

Los resultados muestran que probablemente algunos tipos de serina proteasas se expresen mayormente en adultos de *R. dominica* con respecto a las larvas, lo cual propone una expresión diferencial a través de las distintas etapas de la ontogenia del insecto. Un comportamiento similar ha sido observado en las larvas de la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), las cuales poseen serina proteinasas de tipo tripsina y quimotripsina, mientras que las moscas adultas sólo presentan proteinasas de tipo quimotripsina (Silva y col., 2006). Lo anterior sugiere que algunas proteínas son específicas de cada etapa de la ontogenia de los insectos, sin embargo, los estudios realizados hasta ahora no son suficientes para establecer que existen conjuntos de genes específicos que gobiernan cada etapa de desarrollo.

Se ha demostrado que los insectos recurren a un gran número de genes codificadores de proteasas para producir enzimas con propiedades diferentes para la digestión de proteínas, y regulan su expresión de forma diferente cuando se introducen inhibidores de proteasa en la dieta (Bown y col., 2004). Por lo que las diferencias significativas detectadas en la expresión de los genes de las dos enzimas digestivas entre las etapas de desarrollo estudiadas en este trabajo, pueden también estar relacionadas por una respuesta adaptativa ante inhibidores presentes en el trigo, esto con base a lo reportado por Kuwar y col. (2015), quienes señalan que existe diferentes grados de susceptibilidad a inhibidores de serina proteasas dentro de las etapas de la ontogenia de la oruga del tabaco (*Helicoverpa armigera*). Por otro lado, la producción de proteasas inactivas podría secuestrar los inhibidores de las proteasas ingeridos en la dieta y proporcionar así una ventaja adaptativa sin la necesidad de cantidades excesivas de actividad de proteasas en el intestino medio (Mazumdar-Leighton y col., 2000).

Otros estudios de expresión genética diferencial a diferentes dietas alimenticias realizados en el gorgojo castaño de la harina (*Tenebrio molitor*) y el gorgojo de las harinas (*Tribolium castaneum*) han demostrado que las enzimas proteolíticas que se encuentran en el tracto digestivo de estos insectos son diversas y que pueden expresarse de acuerdo al tipo de inhibidores que presenta el alimento que consumen las larvas (Terra y col., 1985; Terra, 1990; Thie y Houseman, 1990; Terra y Ferreira 1994; Vinokurov y col., 2006). En *R. dominica*, Zhu y Baker (1999) reportaron tres tipos de genes que codifican a diferentes tripsinas, lo que sugiere que el mismo comportamiento se pudiera estar presentando ante la existencia de inhibidores de serina proteasas que se encuentran de manera natural en los cereales.

Purificación de Fracciones Proteolíticas

Se eluyó una sola fracción que presentó actividad proteolítica del tipo tripsina de la columna de fenil sepharose con etilenglicol al 50%, en ambos casos para las proteasas de larvas y adultos de *R. dominica*. El procedimiento cromatográfico permitió la eliminación del material proteínico que carecía de actividad proteolítica, dejando por un lado las proteasas unidas a la columna de fenil sepharose. Se optó por trabajar con fracciones proteolíticas ya que se presentaron dificultades para la separación de las proteasas debido al carácter hidrofóbico similar que poseen. La tabla de purificación (Tabla 4) muestra los valores de la actividad proteolítica del tipo tripsina de las fracciones purificadas, así como la de los extractos crudos de larvas y adultos de *R. dominica*. Se calculó la actividad específica a partir de las lecturas de absorbancia y la concentración de proteína. Los resultados de la determinación de la actividad específica del tipo tripsina (Figura 12) mostraron una mayor actividad en las proteasas de adultos con respecto a las de las larvas.

Tabla 4. Cuadro de purificación de proteasas de larvas y adultos de *R. dominica*.

Paso de purificación	Volumen (mL)	Proteína total (mg/mL)	Actividad específica tipo tripsina (U/mg)	Actividad proteolítica total (U/mg)
ECA	7.5	4.3 ± 0.3	203.7 ± 0.01	70.0 ± 0.01
FA	3	3.1 ± 0.2	402.1 ± 0.01	48.3 ± 0.01
ECL	3	9.7 ± 0.3	81.4 ± 0.03	34.8 ± 0.03
FL	3	1.4 ± 0.3	110.9 ± 0.01	19.3 ± 0.01

ECA: Extracto crudo de adultos; FA: fracción purificada de adultos; ECL: Extracto crudo de larvas; FL: Fracción purificada de larvas; U: cambio en 0.01 unidades de absorbancia.

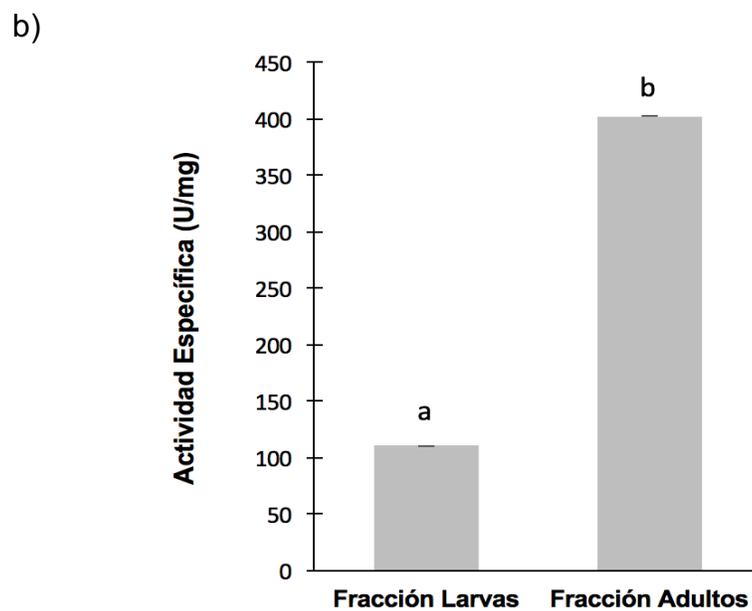
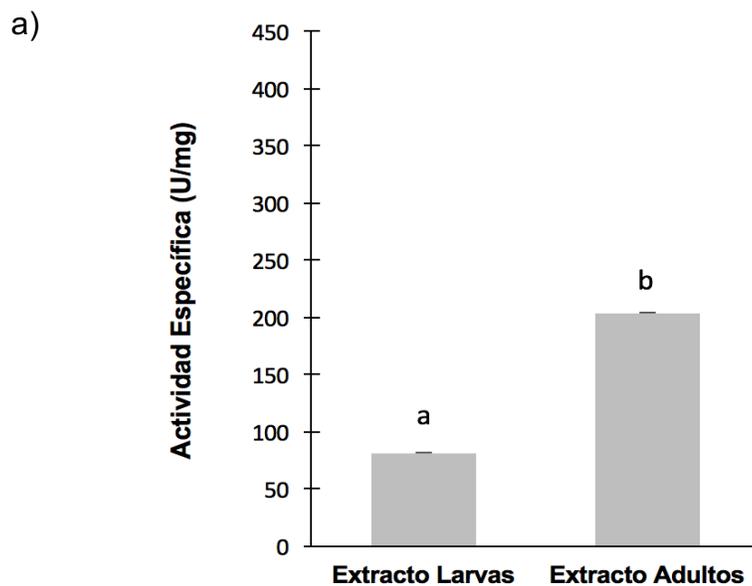
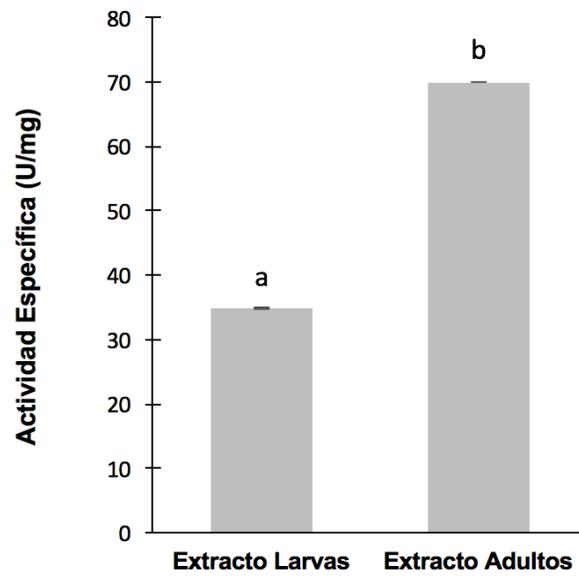


Figura 12. Actividad específica del tipo tripsina de a) extractos y b) fracciones purificadas por cromatografía de interacción hidrofóbica de larvas y adultos. Diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Los resultados de la determinación de la actividad proteolítica total presentan el mismo comportamiento que la actividad del tipo tripsina, obteniendo mayor actividad proteolítica en adultos (Figura 13). Esto resulta congruente ya que diversos estudios han descrito que la mayor actividad digestiva presente en el intestino medio de los insectos es correspondiente a tripsina (Nation, 2008). Cabe destacar que se observa mayor diferencia entre las actividades de tripsina de larvas y adultos en comparación con las actividades proteolíticas totales, lo que sugiere que diferentes proteasas varían su actividad según la etapa de desarrollo en el que el insecto se encuentre. Este comportamiento ya ha sido reportado en otros estudios, como el realizado por Borovsky (2005) en un estudio sobre tripsina y quimotripsina de larvas y pupas del mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti*).

Se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} utilizando BApNA como sustrato, obteniendo para larvas 0.075 mM y 0.137 mM/min, y para adultos 0.094 mM y 1.953 mM/min, respectivamente. A partir de los parámetros anteriores se logró estimar la eficiencia fisiológica (1.82 min^{-1} para larvas y 20.77 min^{-1} para adultos), encontrando que a pesar que las proteasas de larvas presentan ligeramente una mayor afinidad al sustrato, las de adultos son mucho más activas, lo cual establece una relación con la expresión génica determinada anteriormente. Osunas-Amarillas y col. (2012) reportaron en un estudio con este mismo tipo de proteasas, valores similares para K_m y V_{max} , obteniendo 0.07 mM y 2.8 mM/min respectivamente. Por otro lado, la K_m para la actividad de tripsina de la polilla de la col (*Mamestra brassicae*) fue 0.069 mM (Chougule y col., 2008) y para la actividad de serina proteinasas de varias cepas del gorgojo de maíz (*Sitophilus Zeamais*) se presentaron variaciones dentro de un intervalo de 0.22 y 0.34 mM (Araújo y col., 2008; Silva y col., 2010).

a)



b)

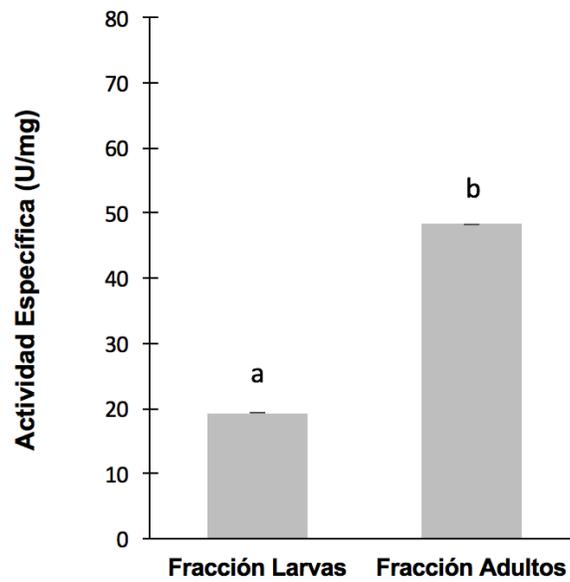


Figura 13. Actividad proteolítica total de a) extractos y b) fracciones purificadas de larvas y adultos de *R. dominica*. Diferentes literales representan diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Después de separar por electroforesis las proteasas presentes en las muestras, el gel implementado fue incubado con caseína para detectar la actividad proteolítica de los extractos y fracciones purificadas de larvas y adultos. Se observaron zonas desteñidas donde fueron ubicadas las diferentes proteasas, lo cual es consecuencia de que la caseína que fue impregnada en el gel fue degradada, demostrando así la actividad de las mismas (Figura 14).

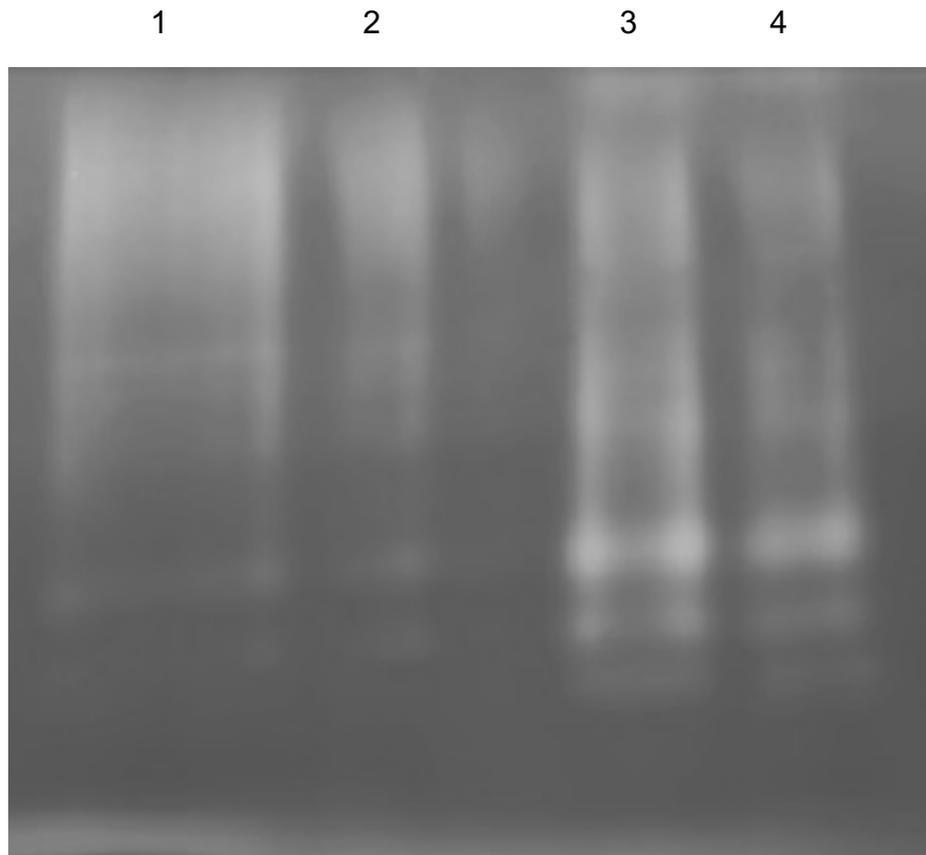


Figura 14. Actividad proteolítica detectada por zimografía. La figura muestra la tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE con los extractos crudos y las fracciones proteolíticas purificadas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica de larvas (carril 1-2) y adultos (carril 3-4) respectivamente.

Se detectaron patrones de bandeo similares a los reportados por Osuna-Amarillas y col. (2012) y se observó que la degradación de la caseína fue más marcada en las muestras de adultos, indicando que existe mayor actividad en estas y coincidiendo con los resultados de actividad específica determinados anteriormente. De la misma manera otros coleópteros tales como *S. seamais*, *T. granarium*, *T. molitor* y *T. castaneum* utilizan múltiples proteasas para digerir las proteínas provenientes de la dieta (Reeck y col., 1999; Hosseininaveh y col., 2007, Vinokurov y col., 2006, Oppert y col., 2003). También se observó que la intensidad de ciertas bandas aumenta en las muestras de adultos con respecto a las de larvas, esto sugiere que la actividad de esas proteasas aumenta conforme el insecto se va desarrollando.

Las enzimas del tipo serina proteinasas pertenecen a familias multigénicas que pudieron haber evolucionado para proporcionar un mecanismo más eficiente para la digestión de proteínas, así como para proporcionar una ventaja adaptativa para las especies de fitófagos que se alimentan de plantas o dietas artificiales que poseen inhibidores de proteinasas (Reeck y col., 1999). Por lo que el comportamiento observado mediante los resultados obtenidos, podría atribuirse a la relación entre el tipo de inhibidores de proteasas que poseen los cereales y la selección evolutiva para el tipo y el número de proteasas secretadas por insectos (Terra, 1988). Se ha reportado que algunos insectos responden al consumo de un inhibidor de tripsina secretando enzimas adicionales similares a tripsina que permiten una susceptibilidad diferencial al inhibidor y / o enzimas hiperproductoras para compensar la inhibición (Broadway, 1995; Broadway y Villani, 1995). Bayés y col. (2006) identificaron y purificaron una enzima carboxipeptidasa B en el intestino del gusano del algodón *Helicoverpa zea*, que no es inhibida por el inhibidor de la carboxipeptidasa de la papa, que típicamente inhibe las carboxipeptidasas de los insectos; la carboxipeptidasa B no se inhibió en varias otras especies de lepidópteros estudiadas.

Muchos insectos secretan más de un tipo de proteinasas, incluyendo múltiples formas moleculares de algunas de ellas (Moffatt y col., 1995). Se detectaron por lo menos 20 bandas de isoenzimas de tripsina mediante isoelectroenfoque en homogeneizados de *A. aegypti* (Graf y Briegel, 1985). Lopes y col., (2006) encontraron evidencia a partir de análisis estructurales que los sitios activos de tripsina de insecto se han vuelto más hidrófobos en el curso de la evolución, aparentemente como una adaptación para resistir la inhibición por inhibidores de proteínas vegetales que típicamente tienen residuos de aminoácidos polares (hidrófilos) en sus sitios de unión activos. Las isoenzimas múltiples y la hiperproducción de algunas enzimas pueden permitir alguna medida de escape de los inhibidores ingeridos (McManus y col., 1994).

Sin embargo, los miembros de un grupo taxonómico pueden no poseer el mismo tipo de proteinasas por lo que en ocasiones es arriesgado generalizar a partir de estudios basándose solamente en un pequeño número de insectos ya que existe una gran diversidad de ellos, y se debe tener en cuenta que puede haber excepciones en detalles menores, o incluso mayores, de estos estudios reportados hasta ahora (Thie y Houseman, 1990, Wolfson y Murdock, 1990). Por lo tanto, estos resultados indican la necesidad del desarrollo de nuevas investigaciones que ayuden elucidar los mecanismos de regulación y adaptación de los insectos, para poder contrarrestar de una manera mas eficiente los efectos adversos de los mismos a los campos de cultivo y promover el desarrollo sustentable en la producción de cereales.

CONCLUSIONES

Las muestras secuenciadas confirmaron la amplificación de los fragmentos de tripsina y quimotripsina, obteniendo altos porcentajes de identidad con respecto a las secuencias reportadas de *R. dominica* de esos genes.

En contra de la hipótesis inicial, los datos de la evaluación de la expresión absoluta mediante la cuantificación del ARNm, mostraron una mayor expresión génica de ambas enzimas en la etapa adulta de *R. dominica*.

Con base en los resultados de los ensayos de actividad proteolítica total, los parámetros cinéticos V_{max} y K_m determinados y el análisis por zimografía se concluye que las enzimas digestivas del tipo serina proteasas de *R. dominica*, son mucho más activas en la etapa adulta de su ontogenia. Lo anterior establece una relación con la expresión génica determinada.

RECOMENDACIONES

Determinar la expresión relativa con referencia en la expresión de un gen constitutivo.

Desarrollar nuevas metodologías para optimizar la purificación de tripsina y quimotripsina.

Evaluar el efecto de inhibidores de serina proteasas en la expresión génica y actividad enzimática de ambas proteasas.

Estudiar la expresión génica y actividad enzimática de otras enzimas digestivas como amilasas y lipasas.

REFERENCIAS

- An, H., Seymour, T., Wu, J., & Morrissey, M. (1994). Assay systems and characterization of Pacific whiting (*Merluccius productus*) protease. *Journal of Food Science*, 59(2), 277-281.
- Araújo, R. A., Guedes, R. N. C., Oliveira, M. G. A., & Ferreira, G. H. (2008). Enhanced proteolytic and cellulolytic activity in insecticide-resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, 44(4), 354-359.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J., Delaporte, M., Pouvreau, S., Van Wormhoudt, A., & Moal, J. (2005). Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 140 (4): 635-646.
- Baker, J. & Woo S. (1981). Properties and specificities of a digestive aminopeptidase from larvae of *Attagenus megatoma* (Coleoptera: *Dermestidae*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 69B, 189-193.
- Bayés, A., de la Vega, M., Vendrell, J., Aviles, F., Jongsma, M., & Beekwilder, J. (2006). Response of the digestive system of *Helicoverpa zea* to ingestion of potato carboxypeptidase inhibitor and characterization of an uninhibited carboxypeptidase B. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8), 654-664.
- Bazan, J. & Fletterick, R. (1990). Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases. *Seminars in Virology*. 1, 311-322.
- Billingsley, P. F. (1990). The midgut ultrastructure of hematophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 219-248.
- Birch, L.C. (1945). The mortality of the immature stages of *Calandra oryzae* L. (small strain) and *Rhizopertha dominica* Fab. in wheat of different moisture contents. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 23, 141e145.

- Birch, L.C. (1945). The influence of temperature on the development of the different stages of *Calandra oryzae* L. and *Rhizopertha dominica* Fab. (Coleoptera). Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 23, 29e35.
- Borovsky, D. (2005). Control of mosquito larval trypsin with Aea-trypsin modulating oostatic factor (TMOF) and its analogues. Pestycydy-Warszawa-, 3, 71.
- Botos, I., Meyer, E., Nguyen, M., Swanson, S. M., Koomen, J. M., Russell, D. H., & Meyer, E. F. (2000). The structure of an insect chymotrypsin. Journal of Molecular Biology, 298(5), 895-901.
- Boules, P. (2006). Lifecycle of *Rhyzopertha dominica*. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.
- Bown, D. P., Wilkinson, H. S., & Gatehouse, J. A. (2004). Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. Physiological Entomology, 29(3), 278-290.
- Briand, L., Chobert, J. M., Gantier, R., Declerck, N., Tran, V., Léonil, J. & Haertlé, T. (1999). Impact of the lysine-188 and aspartic acid-189 inversion on activity of trypsin. FEBS letters, 442(1), 43-47.
- Broadway, R. M. (1995). Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? Journal of Insect Physiology, 41(2), 107-116.
- Broadway, R. M., & Villani, M. G. (1995). Does host range influence susceptibility of herbivorous insects to non-host plant proteinase inhibitors? Entomologia Experimentalis et Applicata, 76(3), 303-312.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4), 611-622.
- CANIMOLT. Cámara de la Nacional Industria Molinera de Trigo. México (2007). Disponible en: <http://www.canimolt.org/> (Fecha de acceso: 2 de febrero de 2015).

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- Chougule, N. P., Giri, A. P., Sainani, M. N., & Gupta, V. S. (2005). Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 355-367.
- Chougule, N. P., Doyle, E., Fitches, E., & Gatehouse, J. A. (2008). Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology*, 54(3), 563-572.
- Cinco-Moroyoqui, F. J., Díaz-Malváez, F. I., Barrón-Hoyos, J. M., Cárdenas-López, J. L., Cortez-Rocha, M. O., & Wong-Corral, F. J. (2008). Isolation and partial characterization of three isoamylases of *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(2), 153-160.
- Cinco-Moroyoqui, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Borboa-Flores, J., Cortez-Rocha, M. O. (2006). α -Amylase activity of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) reared on several wheat varieties and its inhibition with kernel extracts. *Journal of Economic Entomology*, 99(6), 2146-2150.
- Cisneros, F. (1995). Control de plagas agrícolas. AGCIS Electronics. Lima. Perú.
- Coates, B.S., Hellmich, R.L., & Lewis, L.C., (2006). Sequence variation in trypsin- and chymotrypsin-like cDNAs from the midgut of *Ostrinia nubilalis*: methods for allelic differentiation of candidate *Bacillus thuringiensis* resistance genes. *Insect Molecular Biology*. 15, 13e24.
- Cohen, A. B. (1975). The interaction of α -1-antitrypsin with chymotrypsin, trypsin and elastase. *Biochimical Biophysical Acta (BBA)-Enzymology*, 391(1), 193-200.
- Cuperus, G. W., Prickett, C. K., Bloome, P. D., & Pitts, J. T. (1986). Insect populations in aerated and unaerated stored wheat in Oklahoma. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 620-627.

- Denlinger, D.L. 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology*. 478: 93–122.
- Dow, J.A.T. 1986. Insect midgut function. *Advances in Insect Physiology*. 19: 187–328.
- Dunse, K.M., Kaas, Q., Guarino, R.F., Barton, P.A., Craik, D.J., & Anderson, M.A., (2010). Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 15016e15021.
- Dunse, K.M., Stevens, J.A., Lay, F.T., Gaspar, Y.M., Heath, R.L., & Anderson, M.A., (2010). Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107, 15011e15015.
- Edde, P. A. (2012). A review of the biology and control of *Rhyzopertha dominica* (F.) the lesser grain borer. *Journal of Stored Products Research*, 48, 1-18.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma (2004). Departamento Económico y Social. Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas, proyecciones al año 2010. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5143s/y5143s00.pdf> (Fecha de acceso: 19 de Junio de 2015).
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2015). Gestión Pos cosecha de Cereales. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/ags/gestion-poscosecha/cereales/es/> (Fecha de acceso: 18 de Junio de 2015).
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Italia (1985). Departamento de Agricultura. Prevención de pérdidas de alimentos pos cosecha manual de capacitación.
- FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas Para La Alimentación y la Agricultura (2012). Dirección de Estadística. Producción mundial de trigo. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Fecha de acceso: 8 de Marzo del 2015).

- García-Lara, S., Espinosa Carrillo, C., & Bergvinson, D. J. (2007). Manual de plagas en grano almacenado y tecnologías alternas para su manejo y control. CIMMYT.
- Gerald, K. (2006). Biología Celular y Molecular, Conceptos y Experimentos. Mc Graw Hill.
- Golebiowska, Z. (1969). The feeding and fecundity of *Sitophilus granarius* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in wheat grain. Journal of Stored Products Research, 5(2), 143-155.
- González, A. U. (1995). El maíz y su conservación. Editorial Trillas. México, DF.
- Graf, L., Craik, C. S., Patthy, A., Roczniak, S., Fletterick, R. J., & Rutter, W. J. (1987). Selective alteration of substrate specificity by replacement of aspartic acid-189 with lysine in the binding pocket of trypsin. Biochemistry, 26(9), 2616-2623.
- Graf, R., & Briegel, H. (1985). Isolation of trypsin isozymes from the mosquito *Aedes aegypti* (L.). Insect Biochemistry, 15(5), 611-618.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry, 48(2), 422-427.
- Heussen, C. & Dowdle, E.B (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical Biochemistry 102, 196e202.
- Hosseinaveh, V., Bandani, A., Azmayeshfard, P., Hosseinkhani, S., & Kazzazi, M. (2007). Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera). Journal of Stored Products Research, 43(4), 515-522.
- Jamal, F., Pandey, P. K., Singh, D., & Ahmed, W. (2015). A Kunitz-type serine protease inhibitor from *Butea monosperma* seed and its influence on developmental physiology of *Helicoverpa armigera*. Process Biochemistry, 50(2), 311-316.

- Jany K. D. & Pfeleiderer G. (1974). Purification and some physical properties of a chymotrypsin-like protease of the larva of the hornet, *Vespa orientalis*. Eur. Journal Biochemical. 42, 419-428.
- Jany K. D., Haug H. & Ishay J. (1978). Trypsin- like endopeptidases from the midguts of the larvae from the hornets of *Vespa orientalis* and *Vespa crabro*. Insect Biochemical. 8, 221-230.
- Jany K. D., Haug H., Pfeleiderer G. & Ishay J. (1978). Enzymatic and chemical properties of an endopeptidase from the larva of the hornet *Vespa crabro*. Biochemistry 17, 4675-4682.
- Jelinek, B., Antal, J., Venekei, I., & Gráf, L. (2004). Ala226 to Gly and Ser189 to Asp mutations convert rat chymotrypsin B to a trypsin-like protease. Protein Engineering Design and Selection, 17(2), 127-131.
- Johnston K. A., Lee M. J., Gatehouse J. A. & Anstee J. H. (1991). The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. Insect Biochemical. 21, 389-397.
- Kent, N. L. (1975). Technology of cereals: with special reference to wheat. Pergamon international library.
- Koopmanschap, A. B., Lammers, J. H., & De Kort, C. A. (1995). The structure of the gene encoding diapause protein 1 of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). Journal of insect physiology, 41(6), 509-518.
- Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. Annual Reviews. Biochemical. 46, 331-358.
- Kucerova, Z., & Stejskal, V. (2008). Differences in egg morphology of the stored-grain pests *Rhyzopertha dominica* and *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Stored Products Research, 44(1), 103.
- Kuwar, S. S., Pauchet, Y., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2015). Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 59, 18-29.
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 22, 77e80.

- LeCato, G. L., & Flaherty, B. R. (1974). Description of eggs of selected species of stored-product insects (Coleoptera and Lepidoptera). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 308-317.
- Lemoine, A., & Delachambre, J. (1986). A water-soluble protein specific to the adult cuticle in *Tenebrio*: Its use as a marker of a new programme expressed by epidermal cells. *Insect Biochemistry*, 16(3), 483-489.
- Lemos F. J. A. & Terra W. R. (1992). Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochemical and molecular Biology*. 22, 613-619.
- Levinsky, H., Birk, Y., & Applebaum, S. W. (1977). Isolation and characterization of a new trypsin-like enzyme from: *Tenebrio molitor* l. Larvae. *Chemical biology and drug design*, 10(3), 252-264.
- Li, B., Yu, H. Z., Ye, C. J., Ma, Y., Li, X., Fan, T., & Xu, J. P. (2017). *Bombyx mori* Serpin6 regulates prophenoloxidase activity and the expression of antimicrobial proteins. *Gene*, 610, 64-70.
- Lopes, A. R., Juliano, M. A., Marana, S. R., Juliano, L., & Terra, W. R. (2006). Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(2), 130-140.
- Marshall, S.D., Gatehouse, L.N., Becher, S.A., Christeller, J.T., Gatehouse, H.S., Hurst, M.R.H., Boucias, D.G., & Jackson, T.A., (2008). Serine proteases identified from a *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: *Scarabaeidae*) midgut EST library and their expression through insect development. *Insect Molecular Biology* 17, 247e259.
- McManus, M. T., White, D. W., & McGregor, P. G. (1994). Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Research*, 3(1), 50-58.
- McPherson, M. J., Hames, B. D., & Taylor, G. R. (2008). *PCR a Practical Approach*. First Editon edn. Oxford University Press Oxford.

- Miller J. W., Kramer K. J. & Law J, H. (1974). Isolation and partial characterization of the larval midgut trypsin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, Johannson (Lepidoptera: *Sphingidae*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 48B, 117-129.
- Moffatt, M. R., Blakemore, D., & Lehane, M. J. (1995). Studies on the synthesis and secretion of trypsin in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110(2), 291-300.
- Nakato, H., Toriyama, M., Izumi, S., & Tomino, S. (1990). Structure and expression of mRNA for a pupal cuticle protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*, 20(7), 667-678.
- Nation, J. L. (2008). *Insect physiology and biochemistry*. CRC press.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger principios de bioquímica* (No. 577.1 LEH). Omega. 205-230.
- Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schönbeck, F., & Weber, A. (2006). *Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops*. Elsevier.
- Oppert, B., Morgan, T. D., Hartzler, K., Lenarcic, B., Galesa, K., Brzin, J., ... & Kramer, K. J. (2003). Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: *Tenebrionidae*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134(4), 481-490.
- Oppert, B., Walters, P., & Zuercher, M. (2006). Digestive proteinases of the larger black flour beetle, *Cynaesus angustus* (Coleoptera: *Tenebrionidae*). *Bulletin of Entomological Research*, 96(02), 167-172.
- Osuna-Amarillas, P. S., Cinco-Moroyoqui, F. J., Cárdenas-López, J. L., Ezquerra-Brauer, J. M., Sotelo-Mundo, R., Cortez-Rocha, M. O. & Borboa-Flores, J. (2012). Biochemical and kinetic characterization of the digestive trypsin-like activity of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: *Bostrichidae*). *Journal of Stored Products Research*, 51, 41-48.

- Perona, J. J., Tsu, C. A., McGrath, M. E., Craik, C. S., & Fletterick, R. J. (1993). Relocating a negative charge in the binding pocket of trypsin. *Journal of Molecular Biology*, 230(3), 934-949.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Potter, C. (1935). The biology and distribution of *Rhizopertha dominica* (Fab.). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 83(4), 449-482.
- Prabhakar, S., Chen, M.-S., Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Smith, C.M., Marshall, J., & Oppert, B., (2007). Sequence analysis and molecular characterization of larval midgut cDNA transcripts encoding peptidases from the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Insect Molecular Biology*. 16, 455e468.
- Prud'homme, B., Gompel, N., & Carroll, S. B. (2007). Emerging principles of regulatory evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (suppl 1), 8605-8612.
- Purcell J. P., Greenplate J. T. & Sammons R. D. (1992). Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochemical Molecular Biology*. 22, 41-47.
- Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., & Huber, R. (1973). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor: Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *Journal of Molecular Biology*, 77(3), 417-436.
- Reeck, G., Oppert, B., Denton, M., Kanost, M., Baker, J., & Kramer, K. (1999). Insect proteinases. In *Proteases New Perspectives* (pp. 125-148). Birkhäuser Basel.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2012). Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/> (Fecha de acceso: 8 de Marzo de 2015).

- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México (2014). Servicio de Información Agroalimentaria Y Pesquera. Trigo Grano. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/trigo-grano/> (Fecha de acceso: 20 de Junio de 2015).
- Sakal E., Applebaum S. W. & Birk Y. (1988). Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. International Journal of Peptide and Protein Research. 32, 590-598.
- Sakal E., Applebaum S. W. & Birk Y. (1989). Purification and characterization of trypsins from the digestive tract of *Locusta migratoria*. International Journal of Peptide and Protein Research. 34, 498-505.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. 2. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Schwardt, H.H., 1933. Life history of the lesser grain borer. Journal of the Kansas Entomological Society 2, 61e66.
- Sellami, S., & Jamoussi, K. (2016). Investigation of larvae digestive β -glucosidase and proteases of the tomato pest *Tuta absoluta* for inhibiting the insect development. Bulletin of Entomological Research, 106(03), 406-414.
- Silva, F. C., Alcazar, A., Macedo, L. L., Oliveira, A. S., Macedo, F. P., Abreu, L. R., & Sales, M. P. (2006). Digestive enzymes during development of *Ceratitidis capitata* (Diptera: *Tephritidae*) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36(7), 561-569.
- Silva, L. B., Reis, A. P., Pereira, E. J. G., Oliveira, M. G. A., & Guedes, R. N. C. (2010). Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and-susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 155(1), 12-19.
- Simpson, R.M., Newcomb, R.D., Gatehouse, H.S., Crowhurst, R.N., Chagné, D., Gatehouse, L.N., Markwick, N.P., Beuning, L.L., Murray, C., Marshall, S.D., Yauk, Y.-K., Nain, B., Wang, Y.-Y., Gleave, A.P., & Christeller, J.T., (2007). Expressed sequence tags from the midgut of *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: *Tortricidae*). Insect Molecular Biology. 16, 675e690.

- Spit, J., Zels, S., Dillen, S., Holtof, M., Wynant, N., & Broeck, J. V. (2014). Effects of different dietary conditions on the expression of trypsin-and chymotrypsin-like protease genes in the digestive system of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 48, 100-109.
- Sridhara, S. (1983). Cuticular proteins of the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Insect biochemistry*, 13(6), 665-675.
- Sridhara, S. (1985). Evidence that pupal and adult cuticular proteins are coded by different genes in the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Insect Biochemistry*, 15(3), 333-339.
- Stiles, B. (1991). Cuticle proteins of the boll weevil, *Anthonomus grandis*, abdomen: structural similarities and glycosylation. *Insect Biochemistry*, 21(3), 249-258.
- Stiles, B., & Leopold, R. A. (1990). Cuticle proteins from the *Anthonomus grandis* abdomen: stage specificity and immunological relatedness. *Insect Biochemistry*, 20(2), 113-125.
- Szklarzewicz, T., Szlendak, E., Boczek, J., & Biliński, S. (1992). Ontogenesis in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 21(1), 63-76.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2, 10-78.
- Terra, W. R. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*. 21(4), 675-734.
- Terra, W. R. (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 181-200.
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109(1), 1-62.

- Terra, W. R., Ferreira, C., & Bastos, F. (1985). Phylogenetic considerations of insect digestion: Disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect biochemistry*, 15(4), 443-449.
- Thie, N. M., & Houseman, J. G. (1990). Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: *Chrysomelidae*). *Insect Biochemistry*, 20(3), 313-318.
- Thompson, V., (1966). Biology of the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) *Bulletin of Grain Technology* 4, 163e168.
- Triplehorn, C. A. J., Borror, N. F., Triplehorn, D. J. C. A., & Johnson, N. F. (2005). Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects (No. QL463 B69 2005).
- Veillard, F., Troxler, L., & Reichhart, J. M. (2016). *Drosophila melanogaster* clip-domain serine proteases: Structure, function and regulation. *Biochimie*, 122, 255-269.
- Vinokurov, K. S., Elpidina, E. N., Oppert, B., Prabhakar, S., Zhuzhikov, D. P., Dunaevsky, Y. E., & Belozersky, M. A. (2006). Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) larvae and role in protein digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 145(2), 138-146.
- Ward, C. W. (1975). Properties and specificity of the major anionic trypsin-like enzyme in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 391(1), 201-211.
- Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F., & Hwang, J. K. (1989). How do serine proteases really work? *Biochemistry*, 28(9), 3629-3637.
- Wheeler, D. E., Tuchinskaya, I., Buck, N. A., & Tabashnik, B. E. (2000). Hexameric storage proteins during metamorphosis and egg production in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (*Lepidoptera*). *Journal of Insect Physiology*, 46(6), 951-958.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., & Hahn, M. (2003). Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Research*, 31(10), e56-e56.

- Winterbottom, D.C., 1922. Weevil in Wheat and Storage of Grain in Bags. A Record of Australian Experience during the War Period (1915 to 1919). Government Printer, North Terrace, Adelaide, Australian.
- Wolfson, J. L., & Murdock, L. L. (1990). Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology*, 16(4), 1089-1102.
- Zhang Y., Zuo X., Bao J. & Zhou X. (2016). Effects of infestation by *Rhyzopertha dominica* in different development stages on wheat storage protein structure. *Chinese Society of Agricultural Engineering*, 32 (12).
- Zhou, X., Fan, D., & Zhao, K. (2016). Characterization of trypsin-like and chymotrypsin-like serine proteases from midgut of *Mythimna separata* Walker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*.
- 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.
- Zhu, Y. C., & Baker, J. E. (2000). Molecular cloning and characterization of a midgut chymotrypsin-like enzyme from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 43(4), 173-184.
- Zúñiga, T. (1985). Conceptos básicos de entomología y manejo de plagas. López Genes, Marceliano; Fernández O., Fernando O.; Schoonhoven, Aart van (eds.). Frijol: Investigación y producción.