



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

**Aislamiento y caracterización de la actividad trehalasa del
Sitophilus oryzae (gorgojo de arroz)**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Denis Alexis Molina Molina como requisito parcial para optar al título de licenciado en Biología

Tutores: Dra. Ana Gómez

Prof. Tomas Hermoso

CARACAS, VENEZUELA

Septiembre – 2012.



ACTA

Los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Denis Alexis Molina Molina, C.I. V- 16.604.511, el cual es titulado "Análisis y caracterización de la actividad trichotoma del *Schizophora* *Dryas*"; nos hemos reunido hoy, 21 de Septiembre de 2012, en la Sala Usos Múltiples del Instituto de Biología Experimental, adscrito a la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de Distintiva (19) puntos. Certificamos así que este Trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar el título de Licenciado en Biología.

Dra. Concepción Hernández

Dr. José Habis

Dra. Ana Gómez

Dr. Tomás Heróles

Agradecimientos.

La presente tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia y dándome apoyo.

A mis padres por todo su apoyo y esfuerzo realizado durante mis estudios, para que lograra mis metas académicas.

A mis tutores, la profesora Ana Gómez por toda su paciencia y dedicación al desarrollo de este trabajo de tesis. Y al profesor Tomas Hermoso sin su ayuda no hubiese sido posible realizar este proyecto de tesis.

A cada una de las personas que colaboraron intelectual y materialmente, a ellos un especial agradecimiento, su ayuda fue muy importante en el desarrollo de este trabajo, a la Lic. María Narváez, al Lic. Moisés Gamero, a la Dra. Zelandia Fermín, Lic. María Eugenia Pineda, a la profesora Mighay Lovera, a la profesora Meris Casotto, a la profesora Carolina Pérez.

A los mejores amigos que se puede tener a cada uno de ellos un especial agradecimiento por los años de amistad, por todo su apoyo dentro y fuera de la universidad a la Lic. Carolina Fiol, Lic. Daymile Pérez y a la Lic. Daniela Chame tres chicas muy especiales que conocí durante la universidad y que siempre nos apoyamos mutuamente. A mi buen amigo el Lic. Rony López, que siempre me ayudo dentro y fuera de la universidad.

A mi jurado de tesis, a la profesora Concepción Hernández y al profesor José Bubis.

Al grupo corporativo Loginca y Bio-Rad por toda su colaboración de materiales para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Gracias a todos...

Resumen.

La trehalasa soluble de *Sitophilus oryzae* fue purificada parcialmente a partir de la fracción soluble obtenida del homogeneizado del insecto adulto. Inicialmente se realizó una precipitación salina con sulfato de amonio. Para esto, se ensayaron cinco concentraciones de sal. La concentración de 41% fue la utilizada en el proceso de purificación, debido a que a esta concentración hubo una mayor precipitación de las proteínas presentes en la fracción soluble (41%) y la mayor recuperación de actividad enzimática en el sobrenadante obtenido (84%). Este último fue cromatografiado en una columna hidrofóbica (Metil-HIC), encontrándose un pico de actividad enzimática con una recuperación de 48% y un enriquecimiento de la actividad específica de 3 veces, con respecto al paso anterior de purificación. Las fracciones con actividad eluidas de esta cromatografía fueron reunidas e inyectadas en una columna Bioselect-250, en la cual también se obtuvo un único pico de actividad enzimática con una recuperación de 89% y un enriquecimiento de 14 veces, con respecto al paso anterior. Al final del proceso de purificación se alcanzó un rendimiento de 36% y una actividad específica 6,73 U/mg de proteína. La masa molecular estimada por cromatografía de filtración en gel fue 123 kDa. El efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la trehalasa soluble de *S. oryzae*, y esta presentó una cinética tipo Michaelis-Menten para una reacción con un único sustrato. El K_m y la velocidad máxima determinada bajo esta condición fue 0,36 mM y $1,7 \times 10^{-4}$ μmol de glucosa/minutos, respectivamente para una concentración de enzima de 2 U/mg en 100 μL de reacción.

Tabla de contenido.

Introducción	1
1. Generalidades sobre <i>Sitophilus oryzae</i>	4
1.1 Trehalosa	5
1.1.1 Biosíntesis de trehalosa.....	8
1.2 Trehalosas de insectos	10
1.2.1 Clasificación de las trehalosas.....	12
1.2.2 El sitio activo de la trehalasa de insecto	14
1.2.3 Purificación y características cinéticas de las trehalosas de insectos....	19
2. Objetivo General	25
2.1 Objetivos específicos	25
3. Materiales y métodos.....	26
3.1 Cultivo de <i>Sitophilus oryzae</i>	26
3.2 Determinación de la actividad enzimática.	26
3.3 Preparación de la fracción soluble de la trehalasa de <i>S. oryzae</i>	27
3.4 Purificación de la trehalasa de <i>S. oryzae</i>	28
3.4.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica.	28

3.4.2 Cromatografía de exclusión molecular.....	29
3.4.3 Estimación de la masa molecular de la trehalasa a través de cromatografía de exclusión.....	29
3.5 Determinación de proteínas.....	30
3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes (SDS-PAGE).....	30
3.7 Tinción con plata.....	31
3.8 Determinación del parámetro cinético K_m	31
4. Resultados.....	33
4.1 Purificación de la trehalasa soluble de <i>Sitophilus oryzae</i>	33
4.1.1 Selección de la concentración de sulfato de amonio para la precipitación de proteínas presentes en la fracción soluble.....	34
4.1.2 Cromatografías aplicadas en la purificación de la trehalasa soluble de <i>Sitophilus oryzae</i>	36
4.1.2.1 Separación de proteínas empleando columna metil-HIC.....	36
4.1.2.2 Cromatográfica de exclusión molecular en columna Bio-select 250	39
4.2 Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.....	43
5. Discusión.....	47

5.1 Obtención de la trehalosa soluble de <i>S. oryzae</i> parcialmente purificada...	47
5.2 Características físicas y efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la trehalasa soluble de <i>S. oryzae</i>	50
6. Conclusiones.....	52
7. Referencias.....	53

Introducción.

El gorgojo de arroz es considerado una plaga importante de establecimientos agrícolas. El adulto puede volar e infectar los granos del campo. Conjuntamente, puede actuar también como vector de los hongos de la familia Asteraceae como *Aspergillus flavus*, con lo cual facilita el ataque posterior de otros insectos de infestación secundaria (Pande y Mehrotra, 1998; Rodríguez y col., 2008). Las pérdidas por ataques de insectos en granos almacenados son cuantiosas a nivel mundial, calculándose por encima del 10%, lo que equivale a la cantidad de granos necesarios para alimentar a 130 millones de personas anualmente (Arias, 1993). Esto se agrava en países tropicales, en donde la temperatura favorece el desarrollo del insecto. Las condiciones propicias para su desarrollo se encuentran entre los 25 a 35 °C y una humedad relativa baja (Asano, 2003). Los daños ocasionados por la infestación en granos almacenados son: la pérdida de peso del grano, la disminución del poder germinativo (por el daño del embrión), además de producirse pérdidas en el valor nutritivo del grano.

La aplicación de insecticidas para prevenir y controlar la presencia de insectos, ha sido una manera de proteger los locales de almacenamiento. Sin embargo, estos tratamientos no son específicos para una determinada especie de insecto, lo que conlleva en muchos casos, a la formación de individuos resistentes al compuesto químico presente en el insecticida que se está aplicando. Sumado a esto, el grano puede tener un olor y sabor desagradable.

Desde hace algunos años, se está utilizando el concepto de manejo integrado de plagas (MIP) o control integrado de plagas, el cual supone la combinación de diferentes disciplinas (genética, bioquímica, ecología, entre otras) que permitan integrar cada conocimiento, con el objeto de lograr mejores resultados con un mínimo de impacto ambiental. Para esto, es necesario conocer las especies de plagas, el agroecosistema y sus interrelaciones (Romero, 2004).

Para implementar estrategias de control que sean más específicas para estos organismos y que además, causen menos efectos secundarios en los productos almacenados y en las plantas cultivadas; es necesario conocer el funcionamiento de las enzimas implicadas en el metabolismo de los mismos. La especificidad de las enzimas para un determinado sustrato, viene determinada por su estructura, esto permite diseñar y/o estudiar compuestos químicos que actúen directamente con la enzima de interés, lo que podría ocasionar la aparición de diversas alteraciones metabólicas que afecten el desarrollo del insecto. Como por ejemplo la producción de inhibidores del proceso digestivo (Jouanin y col., 1998; Franco y col., 2002).

En este trabajo, se aislará y caracterizará cinéticamente la(s) trehalasa(s) presentes en *S. oryzae*. Esta enzima es de suma importancia, ya que actúa específicamente sobre el disacárido trehalosa, que es el principal azúcar en la hemolinfa del insecto. A este disacárido se han atribuido múltiples funciones: protección al estrés, crioprotección, regulación de ingesta de nutrientes, entre otras (Richards y col., 2002; Thompson, 2003).

Algunas trehalasas de diferentes ordenes de insectos han sido estudiadas, ellas presentan diferencias en los residuos de aminoácidos que participan en la actividad enzimática, determinados cinéticamente, el K_m y el K_{cat} (constante michaeliana y constante catalítica, respectivamente) y en su interacción con diferentes ligandos. Esto conlleva que no se puedan hacer generalizaciones de esta enzima estudiando un solo orden, y en algunos casos, hasta diferentes géneros de un orden deben ser analizados.

1. Generalidades sobre *Sitophilus oryzae*.

Sitophilus oryzae, conocido como el gorgojo de arroz, pertenece al orden coleóptera, familia Curculionidae (picudos). Es plaga primaria y también es considerado una de las plagas más importantes de granos almacenados, entre los que se encuentran: el maíz, el sorgo, el trigo y el frijol (Lorini y col., 2010).

Descamps y colaboradores (2004), estudiaron la influencia de 21 variedades de trigo en la reproducción de *S. oryzae* y *Tribolium castaneum*, controlando la humedad y la temperatura. Ellos reportaron que los insectos de los granos almacenados pueden multiplicarse con diferentes tasas en las distintas variedades de cereales y que la susceptibilidad de los granos almacenados a las plagas depende de las características fisicoquímica del grano, del cultivar y de la especie de insecto.

Los gorgojos habitan principalmente en los países tropicales, donde la temperatura favorece el desarrollo de los mismos. Su propagación ha ocurrido mediante el transporte de los granos almacenados (Arias y col., 1983).

Entre las características más resaltantes del gorgojo de arroz en cuanto a su morfología y el ciclo de vida se mencionan las siguientes: son insectos pequeños, de 3 a 5 milímetros de longitud, alargados y cilíndricos, de color pardo castaño, la cabeza es proyectada en forma de trompa, en el extremo de la cual se encuentran las piezas bucales (Lorini y col., 2010). El ciclo de vida de este insecto es corto, la hembra cava un pequeño hoyo en el grano, oviposita y luego tapa el hoyo con secreciones. Cada hembra pone entre 300 y 400 huevos que tardan entre 4 a 6

semanas en transformarse en adultos. Las larvas son apodas, (sin patas), gruesas, semicirculares por el dorso y planas por el vientre, de color blanco perla, presentan fuertes mandíbulas que permiten masticar el interior del grano, miden de 2,5 a 3 milímetros de longitud. Posteriormente se transforman en pupas, de color café que miden aproximadamente 4 milímetros de longitud por 2 milímetros de ancho y finalmente se convierten en adultos dentro del grano. El adulto emerge y vive de 4 a 5 meses (Figura 1) (Maes, 1995; Lorini y col., 2010).

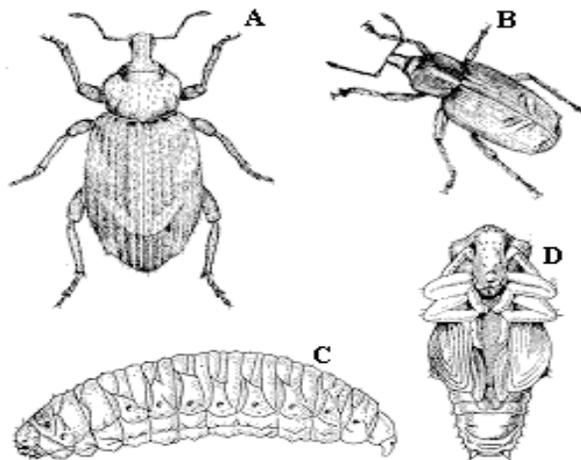


Figura 1. *Sitophilus oryzae*, diferentes estadios del gorgojo, A, B adulto, C larva, D pupa. (Tomado de http://ipm.ncsu.edu/ag295/html/vegetable_weevil.htm)

1.1 Trehalosa.

La trehalosa (α , α -trehalosa o α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido), es un disacárido formado por dos moléculas de D-glucosa, donde los dos carbonos anoméricos reactivos de la glucosa forman el enlace glucosídico α , α -1,1 (Figura 2). Esto confiere al disacárido la propiedad de ser altamente resistente a la hidrólisis enzimática por las diferentes α -glucosidasas, restringiendo su hidrólisis a

la acción de la trehalasa. Además es muy estable en medio ácido (Richards y col., 2002).

La trehalosa es un disacárido no reductor, por lo tanto no puede actuar como molécula reductora de otros compuestos. Esta característica deriva del tipo de enlace que forma el carbohidrato. La combinación de la estructura molecular y sus propiedades fisicoquímicas hacen de la trehalosa un disacárido muy estable (Petzold y col., 2006). La fórmula y el peso molecular de la trehalosa son $C_{12}H_{22}O_{11}$ y 342.31 g/mol respectivamente (Richards y col., 2002). Es altamente soluble en agua y en etanol; y es cristalizada como un dihidrato, con un punto de fusión de aproximadamente 96 °C.

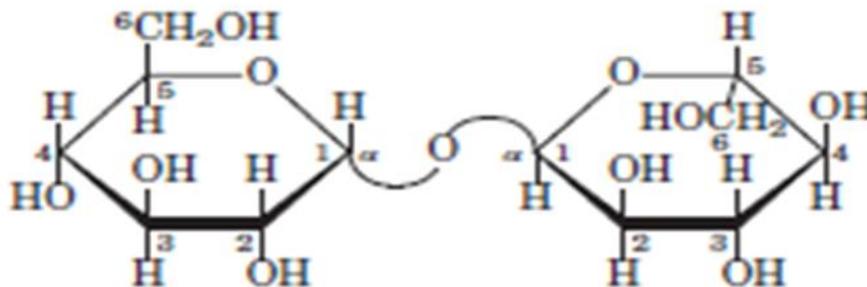


Figura 2. Estructura de la $\alpha, \alpha, 1$ -trehalosa (Tomado de Elbein y col., 2003).

Este azúcar se encuentra presente en una gran variedad de organismos, entre los cuales se incluyen: bacterias, levaduras, hongos, plantas e insectos, funcionando como fuente de energía y carbono (Elbein y col., 2003). En el reino animal, la trehalosa fue inicialmente reportada en insectos (Wyatt y Kalf, 1957 citado por Elbein y col., 2003). Este carbohidrato ha sido aislado a partir de todas las especies de insectos estudiadas y se ha encontrado que es el principal azúcar en

la hemolinfa (aproximadamente entre 80-90% del total de carbohidratos) y puede constituir alrededor de un 20% del contenido de carbohidratos durante las etapas específicas del desarrollo del insecto (Bounias y col., 1993).

En muchos organismos, la trehalosa juega un papel importante sobre todo en las respuestas de la supervivencia y el estrés (Thompson, 2003).

Entre las funciones que han sido atribuidas al disacárido de trehalosa se pueden destacar:

- **Fuente de energía y reserva de carbonos:** La glucosa es un sustrato esencial para el metabolismo energético de los animales. En vertebrados, es el principal azúcar en la sangre, lo que permite que sea distribuido a través de los diversos órganos del cuerpo (Wegener y col., 2010). Por el contrario, en organismos invertebrados como los insectos, la trehalosa es el azúcar más abundante en la hemolinfa (Elbein y col., 2003). Este disacárido es osmóticamente menos activo que la glucosa y puede ser tolerado a elevados niveles en la hemolinfa.
- **Preservación de células y tejidos en condiciones de estrés:** el disacárido de trehalosa interactúa con las proteínas y con las membranas celulares a través de sus grupos hidroxilos, conservando su estructura nativa durante el congelamiento. En animales que sobreviven a bajas temperaturas o que pasan largos periodos de desecación, el disacárido es encontrado en altas concentraciones (Richards y col., 2002). También se ha propuesto que la trehalosa probablemente protege a los insectos de los

efectos nocivos de anoxia y otros problemas ambientales (Thompson, 2003).

- **Regulación de ingesta de nutrientes:** los niveles de metabolitos en la hemolinfa, incluyendo trehalosa, son un indicador del estado nutricional del insecto y sirve para regular la ingesta de nutrientes y el comportamiento de la alimentación a través de mecanismos de retroalimentación fisiológicos (Thompson, 2003).

La síntesis de trehalosa en los insectos se efectúa en los cuerpos grasos. Este órgano consiste en células mesodérmicas organizadas en un tejido definido, unido a los diferentes órganos y bañada por la hemolinfa y es visible en varios insectos y se extiende desde la cabeza hasta el abdomen (Becker y col., 1996; Klowden, 2007).

Los cuerpos grasos son el principal órgano del metabolismo intermediario en los insectos y realiza las funciones que en los vertebrados son ejecutados por el hígado y el tejido adiposo (Becker y col., 1996).

1.1.1 Biosíntesis de trehalosa.

Hasta el momento se han reportado tres vías diferentes para la síntesis de trehalosa en los distintos organismos:

1. Vía trehalosa sintasa (TS): esta enzima realiza un rearrreglo intramolecular de la maltosa convirtiendo el enlace glucosídico α -1,4 a el enlace α, α 1,1 que forma el disacárido de trehalosa.

2. Vía maltooligosiltrehalosa sintasa (Tre Y): implica la conversión de maltooligosacáridos del almidón a trehalosa.

3. Vía trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS): se encuentra presente en la mayoría de los organismos (Figura 3). Implica la transferencia de glucosa a partir de la UDP-glucosa u otro nucleótido de glucosa a la glucosa 6-fosfato, para formar trehalosa 6-fosfato, esta reacción es catalizada por la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS). Posteriormente este intermediario es hidrolizado por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa específica (TPP) (hidroliza el éster de fosfato), seguido de la liberación de la trehalosa en la hemolinfa (Thompson, 2003).



Figura 3. Esquema que ilustra la vía metabólica de la síntesis de trehalosa. (Tomado de <http://www.isb.vt.edu/news/2003/news03.mar.html>)

En algunos casos un mismo organismo presenta dos o más vías de síntesis, como por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis que contiene los genes para las tres vías distintas, indicando la importancia que la trehalosa podría tener para esta bacteria (Valenzuela y col., 2009).

La regulación de la síntesis de trehalosa en insectos es dada a nivel hormonal. Los cuerpos cardíacos producen hormonas hipertrehalocémicas (neuropeptidos) que son liberadas en la hemolinfa del insecto, estimulando los cuerpos grasos para sintetizar trehalosa. Los péptidos actúan disminuyendo la concentración de fructosa 2,6-bisfosfato en las células de los cuerpos grasos (Becker y col., 1996).

La fructosa 2,6-bisfosfato, es un importante metabolito que modifica alostericamente la actividad enzimática de la fosfofructoquinasa 1 (PFK-1) como de la fructosa 1,6 bifosfatasa (FBPasa-1), con el fin de regular el metabolismo de la glucólisis y de la gluconeogénesis. Mientras que la primera ruta se ve potenciada por este metabolito, la segunda se encuentra inhibida. La baja concentración de fructosa 2,6-bisfosfato promueve una disminución de la vía glucolítica y activa la hidrólisis del glucógeno para la producción de glucosa, la cual será usada para la síntesis de trehalosa. De esta manera, se regulan los sustratos a ser utilizados por las vías de síntesis de la trehalosa (Becker y col., 1996).

1.2 Trehalasa de insectos.

La trehalasa (EC 3.2.1.28), hidroliza específicamente la trehalosa en dos unidades de glucosa. En 1893 Bourquelot, observó por primera vez la actividad de esta enzima en *Aspergillus niger* y luego Fischer en 1895, reportó esta actividad en *Sacharomice cerevesiae*. A partir de ese momento, se ha reportado en una variedad de organismos: bacterias, hongos, algas, plantas, vertebrados e invertebrados, siendo vital en aquellos que utilizan la trehalosa como principal fuente de energía (Elbein, 2003).

En los insectos esta enzima esta localiza en diferentes tejidos: intestino, músculo del vuelo y glándulas labiales, entre otros. Puede presentarse de forma soluble o anclada en la membrana plasmática o microsomal (Valatis y col., 1993; Terra y col., 1994).

Entre las funciones conocidas de la trehalasa en los insectos se encuentran:

- A nivel del intestino, la trehalasa permite la absorción pasiva de la glucosa que proviene de la ingesta de alimentos del insecto, al mantener un gradiente de concentración entre en lumen y el interior de las células intestinales (Wegener y col., 2010).
- Mantiene los niveles de trehalosa constantes en la hemolinfa para que sea utilizada como fuente de energía y de carbonos en importantes procesos fisiológicos del insecto como la reproducción y la metamorfosis (Ujita y col., 2011).
- Controla y regular el catabolismo de la trehalosa en los principales órganos del cuerpo, entre ellos los músculos que intervienen en el vuelo (Wegener y col., 2010).

Es interesante mencionar que la actividad de trehalasa ha sido identificada en organismos que no sintetizan trehalosa. Como es el caso de varias especies de mamíferos, incluyendo el *Homo sapiens*. En este último, se ha demostrado la expresión de esta enzima en el intestino delgado y en el riñón. La función atribuida a la localizada en el intestino delgado, en las microvelocidades de las células de los enterocitos, es digestiva. Esta enzima hidroliza la trehalosa presente de forma natural en los alimentos consumidos por el ser humano, como por ejemplo, los hongos. Además este disacárido se encuentra como aditivo en la preparación de varios alimentos secos (Murray y col., 2000; Mascorrollo-Gallardo, 2005). Sin embargo, para la trehalasa presente en el riñón, en las microvelocidades de las células epiteliales del tubo renal, su función no está clara. Algunos autores sugieren que esta enzima se expresa en

el riñón en condiciones de estrés, debido a que el disacárido no está presente en la sangre. Se ha descrito un aumento de esta enzima en ciertos problemas renales y en pacientes con diabetes (Ishihara y col., 1997). No obstante, ambas enzimas han sido poco estudiadas en mamíferos.

1.2.1 Clasificación de las trehalasas.

Las enzimas se pueden clasificar en base a diferentes criterios. En la clasificación según la unión internacional de bioquímica y biología molecular (IUBMB de sus siglas en inglés “International Union of Biochemistry and Molecular Biology”), se establece un catálogo de enzimas (“Enzyme Catalog”, abreviado EC) que asigna a cada enzima un código numérico basado en el tipo de reacción catalizada y en la especificidad de sustrato. Cada código de enzimas consiste en las dos letras EC seguidas por 4 números separados por puntos. Estos números representan una clasificación progresivamente más específica. Las glicosil hidrolasas son definidas como (EC 3.2.1.x), donde los tres primeros dígitos indican: que es una hidrolasa (3), que actúa sobre enlaces glicosídicos (2), en compuestos O-glicosídicos (1) y el cuarto (x) indica el tipo de sustrato. Dentro de esta clasificación la trehalasa es denominada EC 3.2.1.28. Aunque esta clasificación es de gran utilidad, no aporta información sobre aspectos importantes de las enzimas como son su estructura molecular y sus relaciones filogenéticas (Herrera y col., 2004).

Para suplir estas limitaciones se ha establecido una clasificación de las glicosilhidrolasas en familias en base a la similitud de las secuencias de aminoácidos que presentan estas proteínas. Estas familias a su vez pueden ser agrupadas en clanes, debido a las semejanzas que presenta las diferentes

proteínas que conforman una familia, en cuanto a las estructuras terciarias (el plegado de las proteínas es más conservado que su secuencia) y mecanismos catalíticos. Generalmente, las familias que conforman un clan tienen un ancestro evolutivo común (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993).

Hasta el momento las glicosil hidrolasas están agrupadas en 130 familias y 14 clanes. Esta clasificación se encuentra en el servidor denominado CAZy (por sus siglas en inglés Carbohydrate Active Enzymes) disponible en internet (<http://www.cazy.org/>).

Las trehalasas secuenciadas de los diferentes organismos han sido identificadas dentro de dos familias; la familia 37 y la familia 65 (Cazy, <http://www.afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>). En la familia 37 se han agrupado a las trehalasas de insectos que hasta el momento han sido secuenciadas. A esta también pertenece la trehalasa soluble de la bacteria *Escherichia coli* siendo la primera trehalasa con estructura tridimensional conocida (Gibson y col., 2007). Estas proteínas presentan un mecanismo catalítico ácido base, donde al parecer participan dos residuos de aminoácidos ácidos como donadores y aceptores de protones.

Otros parámetros han sido utilizados en la clasificación de las trehalasas. De acuerdo al pH óptimo en el cual ocurre la reacción enzimática, han sido agrupadas en trehalasas ácidas y trehalasas neutras (Silva y col., 2006). Según su localización, las trehalasas pueden ser solubles o encontrarse ancladas a la membrana plasmática o microsomal (Terra y Ferreira, 1994).

1.2.2 El sitio activo de la trehalasa de insectos.

El mecanismo catalítico propuesto para estas glucosidasas es ácido base. Los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos que se encuentran en el sitio activo y/o en su proximidad, pueden actuar como bases y ácidos durante la reacción enzimática (Campbell y Farrel, 2004). Los grupos funcionales que pueden desempeñar un papel catalítico incluyen el grupo imidazol de la histidina, el grupo hidroxilo de la serina, las cadenas laterales carboxílicas del aspartato y el glutamato, el grupo sulfhidrilo de la cisteína, la cadena lateral amínica de la lisina y el grupo fenol de la tirosina.

Las trehalasas son invertasas, o sea, catalizan la hidrólisis de trehalosa con inversión del carbono anomérico. Durante la reacción enzimática el oxígeno glucosil de la trehalosa es protonado, seguido de la liberación de una molécula de glucosa, llevando a la formación de un ion carbanion, sobre el cual la molécula de agua realiza un ataque nucleofílico. Tanto el grupo protonado que ataca al oxígeno glucosilo, como el grupo desprotonado que estabiliza la formación del ion carbanion, son grupos carboxilos (Figura 4).

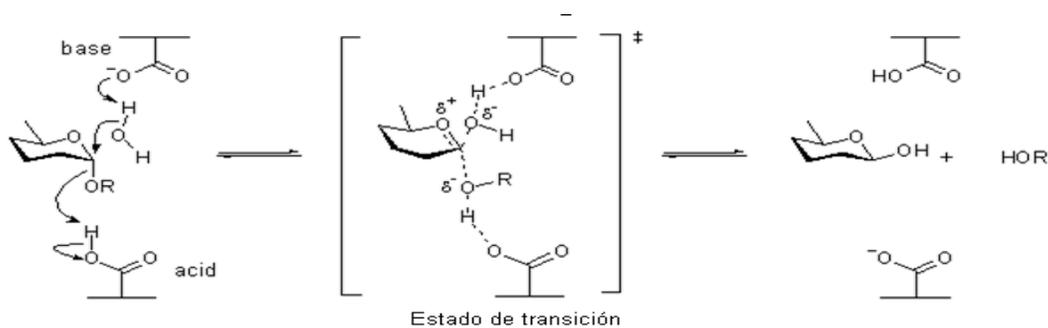


Figura 4. Representación del mecanismo de acción ácido-base de las α -glucosidasas, (tomado de http://es.encydia.com/ca/Hidrolasa_glicos%C3%ADdica)

La primera evidencia de este mecanismo, fue demostrado por Clifford en 1980, quien estudio la trehalasa presente en la mosca de la carne *Sarcophaga barbata*. La enzima fue incubada con su sustrato en un medio enriquecido con H^2O^{18} y la glucosa formada fue analizada por cromatografía de gases y espectrometría de masa. Los resultados mostraron que la α , α -trehalosa es hidrolizada por trehalasa, produciendo una mezcla equimolar de α -D-glucosa y de β -D-glucosa. La incorporación del O^{18} en el β -epímero, sugirió que la enzima hidroliza el sustrato con inversión estereoquímica anomérica.

En el 2007 Gibson y colaboradores cristalizaron la trehalasa 37A de *Escherichia coli* interaccionando con los inhibidores validoxylamide A y thiatrehazolin.

Basado en las distancias entre los átomos de los residuos de aminoácidos y los inhibidores, estos investigadores plantearon que el Asp312 y el Glu496 eran, respectivamente, los grupos catalíticos ácido y básico. Además, los residuos catalíticos presentes en el sitio activo están en posición consistente con un mecanismo de inversión.

Para la determinación de los grupos ionizables de las trehalasas de insectos (pK_{e1} y pK_{e2}), se ha empleado el estudio del efecto del pH sobre la V_{max} y el K_m . Además, se ha ensayado la actividad enzimática en presencia de modificadores químicos específicos para diferentes residuos de aminoácidos. El conjunto de estos datos permitió inferir los residuos de aminoácidos que participan en la catálisis ácido base en las diferentes trehalasas de insectos estudiadas.

Terra y colaboradores en 1978, sugieren que en la trehalasa soluble intestinal de la larva de *Rhynchosciara americana* están presentes dos grupos carboxilos esenciales para la actividad de la enzima con valores de pKa 5,28 y pKa 7,74.

Estos datos fueron obtenidos a través del estudio de la actividad enzimática en presencia de carbodimida (compuesto que reacciona específicamente con grupos carboxilos), a diferentes pH. Además, indicaron con los estudios de modificación con protección del sustrato, que el grupo de pKa 5,28 se localiza en el sitio activo de la enzima y que el grupo con el pKa más elevado se encontraba cerca pero no en el sitio activo, debido a la falta de protección del sustrato durante la modificación. Posteriormente, Valaitis y Bowers en 1993, mostraron que la trehalasa soluble del intestino medio de *Lymantria dispar* es inactivada por dietilpirocarbonato (compuesto que reacciona con el grupo imidazol de la cadena lateral del aminoácido His). Los autores indicaron que el residuo de His no estaría involucrado directamente en la catálisis ya que la actividad enzimática no se abolía completamente. Resultados semejantes fueron reportados para la trehalasa soluble de *Apis mellifera*, la enzima presenta dos grupos ionizables esenciales con $pK_{e1} = 5,3$ y $pK_{e2} = 8,5$ los cuales corresponden a grupos carboxilos. Además indican que hay un residuo de His fundamental para la actividad enzimática. Sin embargo, no aclaran cual es la función de este grupo en el sitio activo (Lee y col., 2001). En la trehalasa soluble intestinal de la larva de *Tenebrio molitor*, también se identificó un residuo de His fundamental en la actividad de la enzima, y se sugirió que este residuo modifica el pKa del grupo carboxilato nucleofílico. (Gómez, 2005).

En las trehalasas digestivas obtenidas desde las larvas de *Tenebrio molitor* (Gómez, 2005) y *Spodoptera frugiperda* (Silva y col., 2004), se describe que el sitio activo de estas enzimas está constituido por dos subsitios donde interaccionarían las dos moléculas de glucosa que componen al sustrato, esto es

obtenido a través de la interacción de la enzima con diferentes inhibidores y además verificando la protección de la actividad enzimática de estos compuestos en presencia de diferentes modificadores químicos. En ambas enzimas los grupos catalíticos son grupos carboxilos de los residuos de aminoácidos ácidos. Sin embargo, en el sitio activo de la trehalasa intestinal de *S. frugiperda* se encuentran tres grupos guanidínicos originarios de los residuos de arginina que son indispensables en la estabilización del sitio activo y por ende para la actividad de la enzima. Mientras que en la enzima de *T. molitor*, los residuos que estabilizan el sitio activo, son un grupo guanidilo y un grupo imidazol, derivados de una arginina y una histidina respectivamente.

En el 2009 Silva y colaboradores clonaron y expresaron el cDNA que codificaba para dos trehalasas presentes en el intestino de la larva de *S. frugiperda*, utilizando como molde cDNA obtenido a partir de la extracción del RNA de las células del intestino medio del insecto. Estas fueron denominadas SfTRE1 y SfTRE2 y correspondían a una trehalasa soluble y a una trehalasa de membrana, respectivamente. Los ensayos cinéticos (valor de K_m y estabilidad térmica) de SfTRE1 fueron semejantes a los obtenidos para la enzima nativa soluble intestinal estudiada por los autores en el 2004. Realizaron alineamientos de la secuencia de aminoácidos de la trehalasa recombinante SfTRE1 contra las de secuencias de aminoácidos de varias trehalasas en la que se incluía la trehalasa de *E. coli* (Gibson y col., 2007), que es la primera trehalasa con estructura tridimensional conocida hasta el momento. Los resultados indicaron similitud entre las enzimas de *E. coli* y SfTre1 y plantearon que en la trehalasa de *S. frugiperda* los residuos de aminoácidos D322 y E520 probablemente actuarían como grupo donador de

protón y nucleófilo, respectivamente. Por otra parte, los estudios de modificación química realizados en la trehalasa nativa y recombinante de *S. frugiperda* demostraron la participación de tres residuos de Arg importantes para la actividad de la enzima (Silva y col., 2004, 2006, 2009). Sin embargo, ninguno de los residuos de Arg conservados se encontraba lo suficientemente cerca (menos de 3.5 angstroms) al D322 en la SfTre1, para que pudiera afectar significativamente su ionización. Los autores propusieron que podía ser debido a las diferencias en la estructura terciaria de las enzimas bacterianas y la de insecto (32% de identidad, 50% de similaridad). Otra posibilidad era que los inhibidores co-cristalizados con la trehalasa (Gibson y col., 2007) se unieran diferente del sustrato e interactuaran de manera diferente con el sitio activo. En este sentido, Silva y colaboradores (2009) llegaron a la conclusión de que la estructura de la trehalasa de *E. coli* no parece ser un modelo útil para realizar las comparaciones con la trehalasas en los animales y proponen que la resolución de la estructura 3D de la SfTre1 y los estudios de mutagénesis sitio dirigida de los residuos en la vecindad del sitio activo son necesarios para detallar el mecanismo catalítico de esta enzima y conocer el papel de ciertos residuos en el sitio activo.

1.2.3 Purificación y características cinéticas de las trehalasas de insecto.

Para la purificación de las trehalasas de insectos de diferentes órdenes, se ha empleado la combinación de variadas técnicas. Sin embargo, pocas han sido purificadas hasta homogeneidad.

Distintas trehalasas solubles han sido purificadas a partir de extractos obtenidos con todo el insecto y frecuentemente son consideradas como intestinales (Terra y Ferreira, 1994). Sin embargo, las trehalasas solubles también están presentes en otros tejidos además del intestino, como los músculos que intervienen en el vuelo, los túbulos de Malpighi y las paredes corporales que incluye la musculatura corporal y el exoesqueleto del insecto (Wegener y col., 2003; 2010; Silva y col., 2006), además de la hemolinfa. Por esta razón, no es cierto que las trehalasas solubles purificadas de la totalidad de los animales provengan del intestino.

Kalf y colaboradores en 1957 purificaron parcialmente la trehalasa soluble de la larva del lepidóptero *Galleria mellonella* (polilla de la cera). Las larvas fueron homogenizadas en 0,05 M de buffer malato (pH 6,5). Utilizaron técnicas de precipitación combinadas. Primero precipitaron con sales, realizando dos precipitaciones continuas con sulfato de amonio al 30 y 70%. Seguido de una precipitación con solvente orgánico (acetona). Reportaron un nivel de purificación de 50 veces, pH óptimo de 5,5 y un K_m de 0,13 mM, con un rendimiento del 33%.

En el año 1978, fue purificada parcialmente la trehalasa soluble intestinal de *Rhynchosciara americana* (mosca) orden díptera, por el grupo de Walter Terra del Laboratorio de Bioquímica de Insectos de la Universidad de Sao Paulo – Brasil.

Los intestinos fueron homogenizados en 0,05 M de citrato/fosfato pH 6. El homogeneizado de insectos se sometió a una ultracentrifugación y el sobrenadante obtenido fue dializado. Con esto, prepararon la muestra para aplicarla en un gel de electroforesis en condiciones nativas, del cual recuperarían la banda con actividad. La recuperación de la actividad fue entre el 53 al 63% con respecto al homogenizado original. El grado de purificación fue de 26 veces. Se estimó una masa molecular para la enzima de 122 kDa; pH óptimo de 6,0; pI 4,6 y el K_m aparente de la trehalasa fue de 0,67 mM, posteriormente, el mismo grupo purificó la trehalasa intestinal de larvas de *Spodoptera frugiperda* (lepidóptero) (Silva y col., 2004) y *Tenebrio molitor* (coleóptero) (Gómez, 2005) hasta homogeneidad. En la purificación de la trehalasa intestinal de larvas de *Spodoptera frugiperda* (lepidóptero) (Silva y col., 2004), utilizaron técnicas cromatográficas alternadas con precipitación por sales (sulfato de amonio 1,7 M), como se describe a continuación: cromatografía de intercambio iónico (High Q, intercambiador anionico), precipitación salina, columna de interacción hidrofóbica (Econo-pac metil-HIC), las fracciones activas provenientes de esta última cromatografía fueron colectadas y desalinizadas, luego aplicadas a una columna de intercambio iónico semejante a la anterior (High Q), seguido de otra precipitación salina y por ultimo aplicada en una columna de interacción hidrofóbica (Resource isopropílica). El buffer empleado en cada etapa de la purificación fue 20 mM trietanolamina pH 7, que además contenía $MnCl_2$ 12 mM para evitar la inactivación de la enzima durante las etapas de purificación. La masa molecular de la enzima monomérica fue estimada en 67 kDa mediante electroforesis en condiciones disociantes. El rendimiento obtenido durante la

purificación fue del 18% y un factor de purificación de 2896. En los ensayos cinéticos se determinó un K_m 0,47 y un pH óptimo de 7,0.

La purificación de la trehalasa intestinal de *Tenebrio molitor* (coleóptera) (Gómez, 2005) no requirió la alternancia de técnicas cromatográficas con precipitación por sales, ni tampoco de agregar iones divalentes como fue para el caso anteriormente descrito, lo que refleja posible diferencias entre las enzimas de estos insectos. Esta enzima fue purificada a partir de varias cromatografías (iónica, de exclusión e hidrofóbica), obteniéndose una recuperación de 46%; una masa molecular de 49 kDa; un K_m 0,43 mM; un pI 4,0 y un pH óptimo de 5,6.

La trehalasa soluble del intestino medio de la larva del lepidóptero *Lymantria dispar* (Valaitis y Bowers, 1993) fue purificada por dos métodos. El primero implicaba una cromatografía de afinidad (sefarosa trehalosa), seguida de una electroforesis en condiciones no disociantes, del cual extraían la banda purificada y con actividad. El rendimiento obtenido fue muy bajo. El segundo método de purificación incluía dos pasos cromatográficos (filtración de gel intercambio iónico) empleando como buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6. Luego de efectuar las diferentes cromatografías a la muestra se le realizó un electroenfoque (pH 3-10). La electroforesis reveló una banda única de 60 kDa. El porcentaje de recuperación fue de 2,5%; pI = 4,6; K_m = 0,4 mM; pH óptimo entre 5,4 a 6,0 y resultó térmicamente estable hasta 65 °C. Previo a la aplicación de ambos métodos al homogeneizado se le realizó una precipitación con sulfato de amonio, cuyo porcentaje de saturación fue entre 40-65%.

Huang y colaboradores (2006) purificaron la trehalasa de huevos en desarrollo de *Bombyx mori* (gusano de seda). Para la purificación también aplicaron una serie de cromatografías, incluyendo de afinidad con (A-sefarosa). Los autores reportaron dos picos de actividad, indicando la presencia de dos enzimas (PI y PII). Determinaron en condiciones nativas una masa molecular de 140 kDa para la PII y de 73 kDa para la PI. En condiciones disociantes la masa molecular tanto de PI como de PII era de 64 kDa, indicando que PII era un dímero. La constante de Michaelis-Menten fue de 1,56 mM y 0,44 mM; el pH óptimo de 5,5 y 6,5 para PI y PII, respectivamente.

Forcella y colaboradores (2010) purificaron la trehalasa de membrana de larvas del mosquito *Chironomus riparius*, la membrana fue solubilizada con el detergente CHAPS, luego de tener la enzima soluble, se emplearon técnicas cromatográficas de intercambio iónico (mono Q, intercambiador anionico), (buffer 20 mM Tris-HCl, pH 6,8 y 1 M NaCl para eluir la proteína) y de afinidad concanavalina A (buffer 20 mM Tris-HCl, pH 6,8 conteniendo 0,5 M NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, y para la elución se empleo 0,2 M α -metil-D-manósido) reportando una purificación de 1080 veces con una actividad específica de 75 U/mg; un K_m de 0,48 mM; pH óptimo de 6,5 y un rendimiento del 34,2%. La masa molecular de la trehalasa fue estimada en 67 kDa, tanto por electroforesis (SDS-PAGE) como por cromatografía superdex 200 HR 10/30 (buffer sodio fosfato 50 mM, pH 7) empleando un sistema FPLC. Esta enzima de membrana representa un 38% de la actividad total presente en el homogenizado.

Si bien la enzima está distribuida en diferentes órganos, las más estudiadas son las trehalasas intestinales debido a que el procedimiento de disección del animal para extraer este tejido resulta más fácil en comparación con otros órganos del cuerpo.

En la tabla 1, se resume el grado de purificación, los parámetros cinéticos y el pH (óptimo) de las trehalasas de varios insectos. Los pesos moleculares de las trehalasas están en el rango de 40-140 kDa (para larvas de *Bombix mori* se reportó que la trehalasa P1 es un dímero de 64 kDa en condiciones disociantes y 140 kDa en condiciones nativas), los valores de K_m varían de 0,4 a 1,56 mM. Los pH óptimos de las trehalasas se encuentran en el rango de 4,8 a 6,0 que en algunos casos es independiente del pH del lumen de los intestinos a partir de las cuales fueron aisladas y los puntos isoeléctricos varían desde 4 a 7,2.

Los diferentes métodos de purificación de las trehalasas solubles provenientes de diferentes insectos, aunque pertenezcan a un mismo orden, indican que estas enzimas presentan propiedades físicas y químicas diferentes. Por lo tanto, hay que establecer un método de purificación para cada enzima de interés.

Esta enzima es crucial en el metabolismo de los insectos, ya que actúa específicamente sobre el disacárido trehalosa, al cual se han atribuido múltiples funciones para el mantenimiento y la sobrevivencia de estos organismos. Además de ser el principal azúcar en la hemolinfa del animal.

2. Objetivo General.

Iniciar el estudio cinético de la(s) trehalasa(s) soluble(s) presentes en *Sitophilus oryzae* (L.)

2.1 Objetivos específicos:

- Purificar parcialmente la(s) actividades trehalasa(s) solubles del insecto, utilizando diferentes técnicas cromatográficas.
- Determinar los parámetros cinéticos constante Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima de la(s) enzima(s) purificada(s).

3. Materiales y métodos.

3.1 Cultivo de *Sitophilus oryzae*.

En el presente estudio se utilizaron gorgojos de arroz adultos *S. oryzae* (L.) (Coleóptera: Curculionidae). Los insectos se mantuvieron en envases de vidrio tapados con una malla y protegidos de la luz, a temperatura ambiente y alimentados con arvejas verdes (*Pisum satibum*), secas, partidas y peladas de origen comercial. Para el mantenimiento de los insectos se infectaron lotes de aproximadamente 150 g de arveja con 200 individuos adultos (padres), luego de un mes se retiraron los padres del cultivo y se esperó la eclosión de la F1 (aproximadamente dos semanas).

3.2 Determinación de la actividad enzimática.

La trehalosa (disuelta en tampón citrato-fosfato 100 mM, pH 6), se empleó como sustrato de la enzima a una concentración de 14 mM y la actividad enzimática sobre este sustrato, se midió por la detección de glucosa a 510 nm, mediante el estuche glucosa oxidasa (Industrias Invelab, Caracas), siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de glucosa se determinó por medio de una curva de calibración de glucosa ($Y = 0,028 X + 0,072$; $R = 0,999$). Esta curva fue realizada a partir de una solución madre de glucosa, 1g/L.

Los ensayos se realizaron incubando la mezcla de reacción (30 μ L del sobrenadante que contiene la enzima, más 70 μ L de sustrato) en diferentes tiempos. Las actividades fueron determinadas en condiciones que la formación de producto fue proporcional al tiempo y a la concentración de enzima, y se

expresaron en unidades (cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato por minuto). Se prepararon los controles sin enzima y sin sustrato (blanco de enzima y de sustrato respectivamente).

La reacción de detección de glucosa por el método de glucosa oxidasa se muestra en la figura 5. La glucosa se oxida por acción de la glucosa oxidasa para dar ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con un cromógeno (4-aminoantipiridina (4-AAP)) y con el ácido 4-hidroxibenzoico (HBA) en presencia de una peroxidasa originando una quinonimina que absorbe entre 460 y 560 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa.

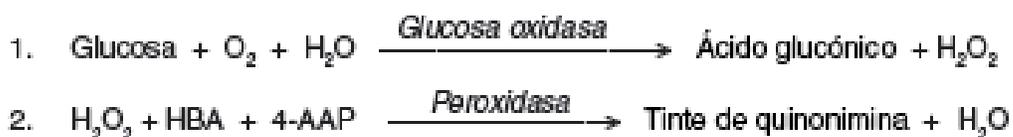


Figura 5. Esquema de la reacción que ilustra la oxidación de la glucosa.

3.3 Preparación de la fracción soluble de la trehalasa de *S. oryzae*.

Los gorgojos se inmovilizaron por congelación y luego fueron homogeneizados en buffer citrato-fosfato 100 mM, pH 6 (40 gorgojos/mL), en un homogenizador Potter-Elvehjem, acoplado a un homogeneizador mecánico (Tecnal, modelo TE-039). Luego se centrifugó a 10000 g por 15 minutos a 4 °C, separando el sobrenadante (fracción soluble) del precipitado que contiene las proteínas que no son de interés. Al sobrenadante se le realizaron precipitaciones salinas (Salting out) empleando sulfato de amonio a diferentes concentraciones (25, 30, 35, 41, 50%) para

determinar la concentración óptima de sulfato de amonio a emplear en la purificación.

Para separar el precipitado del sobrenadante, este se centrifugó en las mismas condiciones antes descritas, el sedimento se descartó y el sobrenadante se utilizó para purificar la enzima.

3.4 Purificación de la trehalasa de *S. oryzae*.

La trehalasa se purificó a partir de dos etapas cromatográficas. A las fracciones eludidas en cada cromatografía se les determinó la actividad enzimática como se describe en la sección 3.2

3.4.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica.

La cromatografía se realizó con la fracción soluble proveniente de la precipitación con sulfato de amonio 41% (sección 3.3), utilizando una columna hidrofóbica metil-HIC de 5 mL (marca comercial Bio-Rad). La columna se lavó con 10 mL de buffer citrato-fosfato 100 mM, pH 6 (dos volúmenes de columna) y luego se equilibró con 10 mL buffer citrato-fosfato 100 mM conteniendo 1,7 M de sulfato de amonio, pH 6 (dos volúmenes de columna). Se utilizó en sistema cromatográfico de baja presión Biologic LP (marca comercial, Bio-Rad). La elución se realizó con un gradiente decreciente de sulfato de amonio desde 1,7 M a 0 M, bajo un flujo de 1 mL/min. Se recolectaron fracciones de 1 mL y a estas se les determinó la actividad a 510 nm como se describe en la sección 3.2.

3.4.2 Cromatografía de exclusión molecular.

La cromatografía se realizó con el material proveniente de la cromatografía de interacción hidrofóbica (sección 3.4.1), utilizando las columna Bio-select 125 y Bio-select 250 (marca comercial, Bio-Rad). Las columnas fueron equilibradas con 5 mL de buffer citrato-fosfato, pH 6; 100 mM (equivalente a cinco volúmenes de columna). Se utilizó un sistema Biologic Duo-Flow marca comercial, Bio-Rad). La elución se realizó con un sistema isocrático con un flujo de 0,4 mL/min. Se recolectaron fracciones de 0,4 mL y se monitoreo la actividad a 510 nm como se describe en la sección 3.2.

3.4.3 Estimación de la masa molecular de la trehalasa a través de cromatografía de exclusión.

Se estimó la masa molecular de la trehalasa en condiciones nativas, a través de cromatografía de exclusión molecular, columna Bio-select 250, empleando marcadores de masa molecular para cromatografía de exclusión (marca comercial, Bio-Rad), los cuales están formados por: Tiroglobulina (670 kDa), gamma globulina (158 kDa) ovoalbúmina (44 kDa) mioglobina (17 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa). Los marcadores de masa molecular se aplicaron a la columna siguiendo las condiciones descrita en la sección (3.4.2), la curva de calibración obtenida a partir del log de la masa molecular en función del tiempo de retención fue: $Y = -0,1942 + 8,9798$ con un r^2 de 0,99.

3.5 Determinación de proteínas.

La cuantificación de proteínas en pasos de purificación se determinó según el método de Bradford (1976). A 10 μ L de muestra se le añadieron 790 μ L de agua destilada y 200 μ L del reactivo de Bradford. Se mezcló por agitación y se dejó en reposo por 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteínas se calculó mediante una curva de calibración de albúmina sérica bovina ($0,0739X + 0,028$; r^2 0,99).

3.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones disociantes (SDS-PAGE).

La electroforesis fue realizada en gel de poliacrilamida en la presencia de SDS y β -mercaptoetanol, utilizando el sistema de tampones descritos por Laemmli (1970). La concentración de poliacrilamida en el gel de corrida fue de 12% y del gel de apilamiento 4%, ambos con SDS al 0,1%. Las muestras fueron concentradas en SpeedVac Concentrator SC210A (Thermo Electron Corporation), y resuspendidas en tampón de muestra (buffer tris 0,5 mol/L, pH 6,8 glicerol 50%, SDS 100 g/L, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 10 g/L) y finalmente calentadas por 5 minutos a 100 °C. La electroforesis se realizó a 70 voltios para apilar la muestra y luego a un voltaje constante de 200 voltios a temperatura ambiente para la separación de las mismas, hasta que el azul de bromofenol utilizado como marcador de frente se observó en el borde inferior de la placa.

3.7 Tinción con plata.

Para detectar las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida en condiciones disociantes se utilizó el método de tinción con plata, descrito por Switzer y colaboradores (1979). El gel se colocó en agitación durante 5 minutos en metanol al 50%. Este procedimiento se realizó dos veces. A continuación fue colocado por 20 minutos en la solución de nitrato de plata, la cual está compuesta de dos soluciones: (solución A: 0,2 gr/mL nitrato de plata en agua milli-Q para un volumen final 4 mL y solución B: 21 mL de hidróxido de sodio al 0,36% conteniendo 1,4 mL hidróxido de amonio, para preparar la solución de nitrato de plata se agrega gota a gota la solución A en la solución B, luego se enrasa hasta 100 mL con agua milli-Q. Posterior a esta incubación, se realizaron tres lavados con agua milli-Q, cada uno de cinco minutos. Seguidamente se agregó la solución reveladora (1,2 mL de ácido cítrico al 1% conteniendo 120 μ L formaldehído, disueltos en agua milli-Q, en un volumen final de 250 mL) donde se espero la tinción de las bandas (aproximadamente de 10 a 15 minutos) y por último se agregó la solución de parado de la tinción (metanol 50%, ácido acético 5% y agua 45%). Los geles fueron digitalizados en un densitómetro y los pesos moleculares de cada banda fueron determinados.

3.8 Determinación del parámetro cinético K_m .

Los ensayos fuerón realizados en baño con temperatura controlada a 30 °C. La enzima se incubó en seis concentraciones de sustrato diferentes (trehalosa) (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,6; 0,8 mM). Las velocidades de hidrólisis de las diferentes

concentraciones de sustrato se determinaron a velocidad inicial, es decir, se medirá el incremento de producto en diferentes tiempos (0, 25, 50, 75, 100 minutos). Los valores de velocidad inicial se determinaron como la pendiente al inicio de la reacción para cada concentración de sustrato. El K_m y la velocidad máxima de hidrólisis del sustrato, se determinaron por linealidad de la curva de Michaelis-Menten obteniendo la curva de Lineweaver-Burk (Segel, 1975).

4. Resultados.

4.1 Purificación de la trehalasa soluble de *Sitophilus oryzae*.

Para la purificación parcial de la trehalasa soluble de *S. oryzae* se utilizó el homogeneizado de insectos adultos en una proporción de 40 insectos/mL de buffer citrato-fosfato 50 mM, pH 6. En los diferentes pasos de purificación se midió la actividad enzimática en función de la aparición del producto y fue expresada en unidades de actividad enzimática (U). El ensayo de actividad enzimática consistió en cuantificar la cantidad de glucosa liberada por medio de un método colorimétrico con la enzima glucosa oxidasa acoplada a la enzima peroxidasa (ver sección 3.2 de materiales y métodos). Para corregir la presencia de glucosa en las mezclas de reacciones se realizaron dos controles: (1) control para la solución de sustrato, que consistió en incubar en las condiciones y el tiempo de la reacción enzimática, la solución de trehalosa sin el homogeneizado que contiene la enzima, la reacción para cuantificar glucosa dio negativo, verificándose de esta manera que no había glucosa presente en la solución de sustrato. (2) control para la enzima. En este caso, la fracción soluble que contiene la enzima fue incubada en las condiciones y el tiempo de la reacción enzimática en ausencia del sustrato, cuantificándose 1,3 μmol glucosa/mL (0,23 mg de glucosa/mL) que provenían de los insectos. Este valor fue restado en la determinación de la actividad enzimática presente en el sobrenadante. Este último fue tratado igual que el control dos (2) y se cuantificó el mismo valor de $\mu\text{moles/mL}$ de glucosa que para la fracción soluble.

La actividad enzimática presente en el homogeneizado fue de 3,38 U. Luego de centrifugar este material, se separó el precipitado de la fracción soluble. En este último, se determinó una actividad enzimática de 2,81 U. Este paso de centrifugación llevó a una pérdida de actividad enzimática del 17%. La fracción soluble fue el material de partida para la purificación de la trehalasa soluble. Como primer paso de purificación, se le realizó una precipitación fraccionada de proteínas por la adición de sulfato de amonio, como se describe a continuación.

4.1.1 Selección de la concentración de sulfato de amonio para la precipitación de proteínas presentes en la fracción soluble.

Se evaluaron cinco concentraciones (25, 30, 35, 41, 50%) de la sal. Estas concentraciones fueron escogidas de acuerdo a las reportadas en la bibliografía para la purificación de otras trehalasas solubles de insectos (Valaitis y Bowers, 1993; Silva y col., 2004).

El criterio para seleccionar la concentración de sulfato de amonio a utilizar, se estableció en base a la actividad enzimática recuperada y a la cantidad de proteínas eliminadas (con respecto a la fracción soluble), del material que permaneció en el sobrenadante después que las muestras fueron centrifugadas. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que la concentración de 50% de sal produce una pérdida del 78% de la actividad enzimática. Concentraciones entre 41–25% de sal, no afectaron significativamente las actividades enzimáticas determinadas. Sin embargo, en estas concentraciones, la cantidad de proteínas precipitadas fue afectada por la concentración de la sal. A medida que incrementa la concentración de sal en la

fracción soluble, disminuye la concentración de proteínas en el sobrenadante. El conjunto de estos datos permitió seleccionar la saturación de 41%, que corresponde a una concentración 1,7 M de sulfato de amonio, ya que precipita el 41% de las proteínas presentes en la fracción soluble y se recupera un 84% de actividad enzimática de la trehalasa en el sobrenadante. En este paso de precipitación fraccionada se obtuvo un enriquecimiento de la muestra de 1,4 veces.

Tabla 2. Precipitación de proteínas presentes en la fracción soluble en diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

Porcentaje de saturación de sulfato de amonio (%)	Actividad enzimática (U/mL)	Concentración de proteínas solubles (mg/mL)	Actividad enzimática específica (U/mg)
Fracción soluble	0,37	3,73	0,10
50	0,08	1,93	0,04
41	0,30	2,20	0,14
35	0,31	2,38	0,13
30	0,32	2,58	0,12
25	0,33	3,30	0,10

Para evaluar el número de proteínas presentes en el homogeneizado, en la fracción soluble y en el sobrenadante procedente de la precipitación fraccionada a la concentración 1,7 M de sulfato de amonio, fue realizado un SDS-PAGE al 10% (Figura 6). La cantidad de proteínas sembradas en el gel para cada muestra fue

de 9 μg . Comparando el conjunto de bandas reveladas para cada muestra, se puede notar que el sobrenadante presenta un enriquecimiento de algunas proteínas entre 120 kDa y 20 kDa con respecto a la fracción soluble.

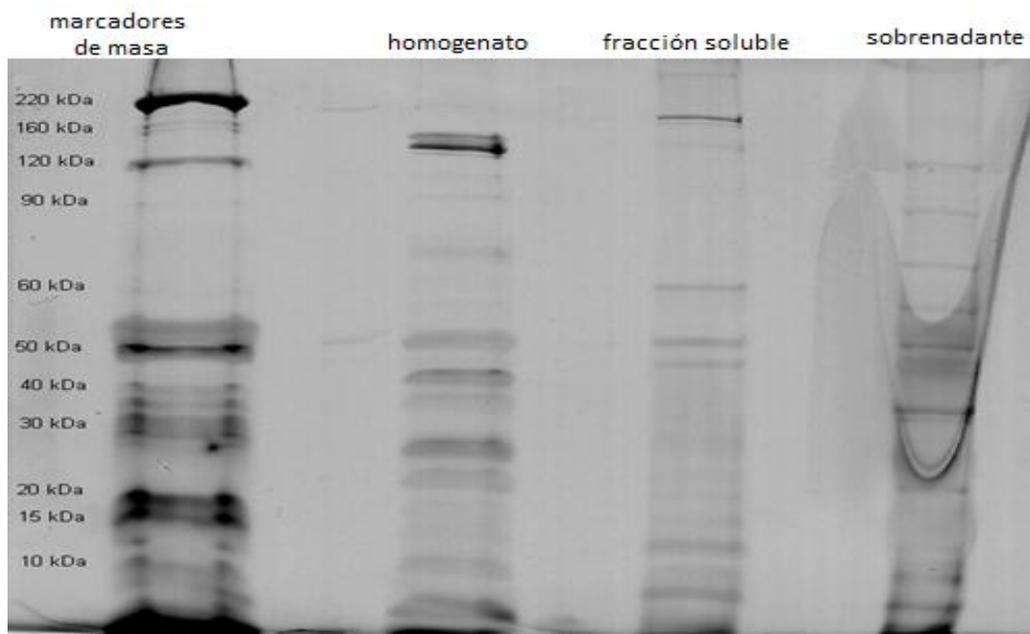


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones disociantes, de las muestras de homogenizado, fracción soluble y del sobrenadante procedente de la precipitación fraccionada con 1,7 M de sulfato de amonio.

4.1.2 Cromatografías aplicadas en la purificación de la trehalasa soluble de *Sitophilus oryzae*.

4.1.2.1 Separación de proteínas empleando una columna de Metil HIC.

El sobrenadante obtenido en la precipitación con sulfato de amonio, fue aplicado a una cromatografía hidrofóbica en un sistema de baja presión (columna metil-HIC). En la figura 7, se presenta el perfil de elución de proteínas (280 nm), el perfil de

detección de glucosa mediante el kit glucosa oxidasa (510 nm) y el gradiente decreciente de sulfato de amonio desde 1,7 M a 0 M.

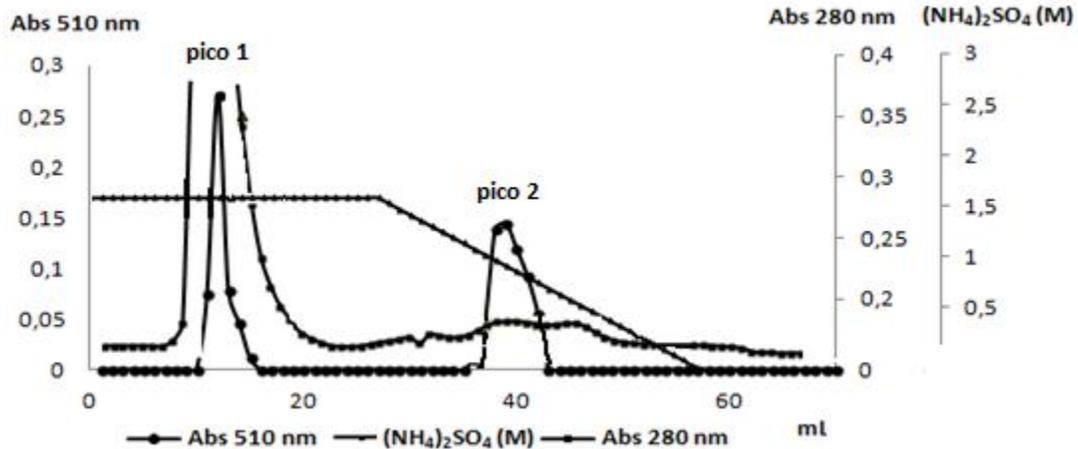


Figura 7. Perfil de detección de glucosa (510 nm) y de proteínas (280 nm) obtenidos después de la cromatografía hidrofóbica en sistema de baja presión en columna metil-HIC, del sobrenadante obtenido en la precipitación de proteínas de la fracción soluble utilizando sulfato de amonio 1,7 M. También está representado el gradiente de sulfato de amonio.

Luego de incubar cada una de las fracciones con el sustrato, se detectaron dos picos positivos para glucosa, pudiendo corresponder a la actividad enzimática de la trehalasa. Las fracciones 11, 12 y 13 que conforman el pico 1, eluyeron al 100% (1,7 M) de sulfato de amonio, es decir, antes de comenzar la formación del gradiente. Por otra parte, las fracciones ubicadas entre la fracción 38 y la 41, que constituyen el pico 2, eluyeron a una concentración de sulfato de amonio de 1 M (Figura 7).

Conociendo que la muestra utilizada en este paso cromatográfico contenía 1,3 μmol de glucosa/mL de muestra (glucosa presente en los insectos), se

procedió a realizar el control de enzima y de sustrato para cada pico eluido. Los resultados obtenidos para la detección de glucosa, al incubar el pool de fracciones del pico 1 en presencia y ausencia del sustrato fue 1,2 μmol de glucosa/mL muestras, valores que resultaron ser igual al encontrado en el sobrenadante. Esto indica que la glucosa cuantificada en el pico 1 corresponde a la glucosa presente en los insectos

Para el pool constituido por las fracciones que forman el pico 2, no se detectó glucosa en ausencia de sustrato y al incubarlo en presencia de trehalosa se cuantificó 0,73 μmol glucosa/mL de muestra.

En la figura 8 se presenta los datos obtenidos en la cromatografía hidrofóbica en función de la actividad enzimática. En el cromatograma se muestra un único pico de actividad enzimática de trehalasa con una recuperación 48% y un enriquecimiento de 3 veces respecto al paso anterior (ver tabla 3).

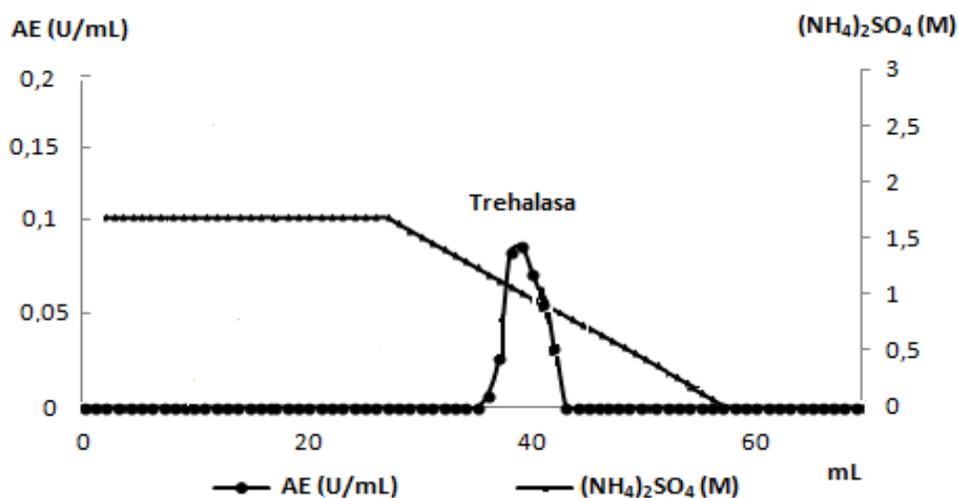


Figura 8. Perfil de la actividad enzimática obtenida después de la cromatografía hidrofóbica en sistema de baja presión en columna metil HIC, del sobrenadante obtenido en la precipitación de proteínas de la fracción soluble utilizando sulfato de amonio 1,7 M. También está representado el gradiente de sulfato de amonio.

4.1.2.2 Cromatografía de exclusión molecular en columna Bio-select 250.

Las fracciones que presentaron mayor actividad en la cromatografía hidrofóbica, fueron reunidas y aplicadas en una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Bio-select 250 (Bio-Rad). Los resultados muestran un único pico de actividad trehalasa (fracciones 20, 21, 22, 23, 24) como se observa en la figura 9, con una recuperación de la actividad de 89% y un enriquecimiento de 14 veces en relación al material anterior (ver tabla 3).

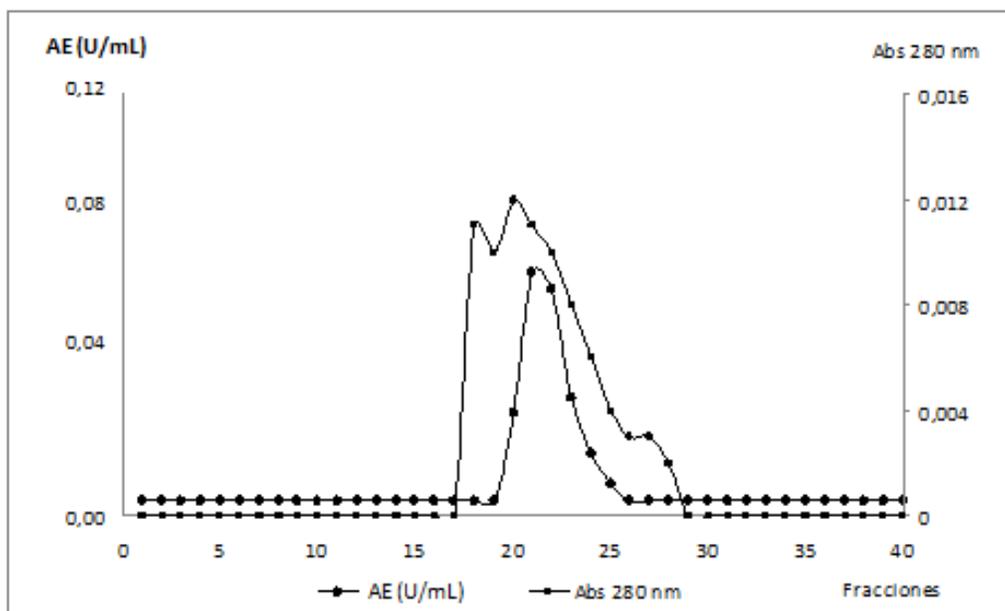


Figura 9. Perfil de actividad enzimática y de proteínas, obtenidos después de la cromatografía de exclusión molecular, realizada en columna Bio-select 250 (Bio-Rad), de las fracciones más activas trehalasa obtenidas en la cromatografía hidrofóbica.

A las fracciones eluidas (20, 21, 22, 23 y 24) con mayor actividad enzimática se les realizó un SDS-PAGE al 10% en condiciones disociantes (Figura 10), sembrando en el gel 7 μ g para cada una de las fracciones.

Se observó una banda consistente en todas las fracciones correspondiente a 62 kDa. Además, en las fracciones 20, 21 y 22 hay tres bandas de proteínas con una masa molecular de 110, 100 y 80 kDa, siendo la banda de 110 kDa la de mayor intensidad. La fracción con mayor actividad enzimática es la fracción 21, en donde se observa dos bandas enriquecidas de 62 y 110 kDa.

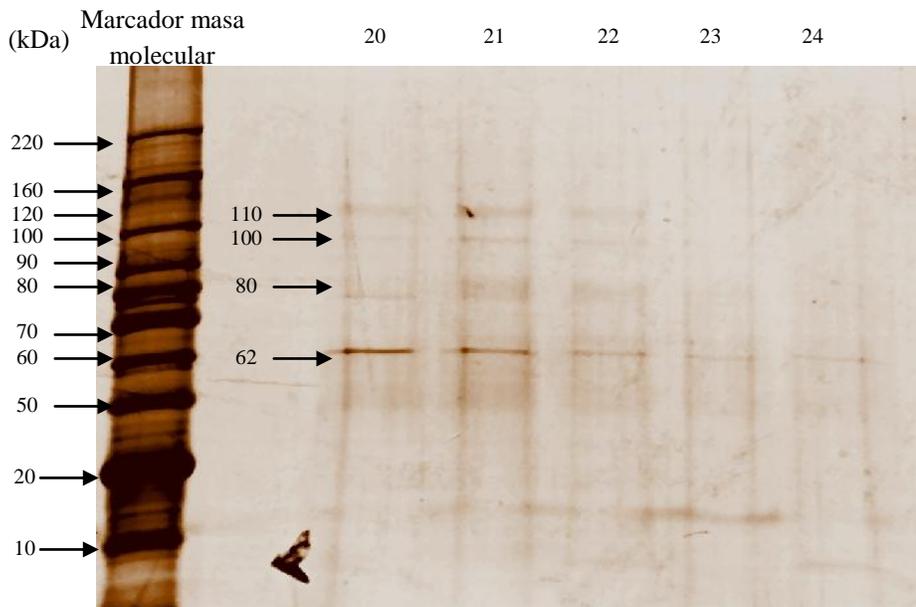


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones disociantes, de las fracciones eluidas con actividad enzimática en la cromatografía de exclusión molecular. Gel revelado con tinción de plata, según Switzer y col., 1979.

Se estimó la masa molecular de la trehalasa en condiciones nativas. El perfil de elusión de los marcadores se muestra en la figura 11.

Al graficar el log de la masa molecular en función del tiempo de retención se obtuvo la siguiente recta $Y = -5,1002 + 46,016$ con un r^2 de 0,99. La enzima trehalasa eluyó en 20 minutos. A partir de estos datos se calculó una masa molecular para la trehalasa de 123 kDa.

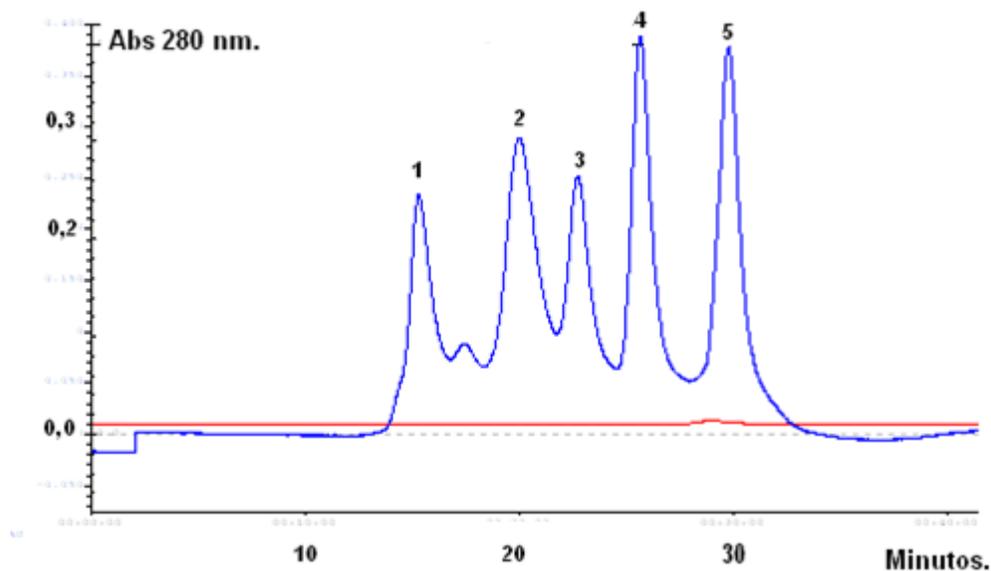


Figura 11. Perfil de elución de marcadores de masa molecular: (1) Tiroglobulina 670 kDa, (2) Gamma globulina 158 kDa, (3) Ovoalbúmina 44 kDa, (4) Mioglobina 17 kDa, (5) Vitamina B12 1,6 kDa, para cromatografía de exclusión molecular en comluna Bio-select 250.

En la tabla 3 se resumen los datos obtenidos de la actividad total, proteína total y actividad específica para la trehalasa con respecto a la fracción soluble. La enzima después de los pasos cromatográficos realizados presento un enriquecimiento de 52 veces y una actividad específica de 6,73 U/mg.

Tabla 3. Proteína y actividad recuperada en los pasos usados para la purificación de la trehalasa solubles de *Sitophilus oryzae*.

Etapas de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Fracción soluble	22,13	2,81	0,13	1,0	100
Precipitación NH ₄ (SO) ₂	13,00	2,35	0,18	1,4	84
Cromatografía hidrofóbica (Metil-HIC)	2,28	1,12	0,49	4	40
Cromatografía filtración en gel (Bs-250)	0,14	1,00	6,73	52	36

4.2 Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática.

El estudio del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la trehalasa soluble de *S. oryzae*, fue determinado a la velocidad inicial de reacción para cada concentración de sustrato estudiada.

Para obtener la velocidad inicial de reacción se procedió a cuantificar la cantidad de producto formado por unidad de tiempo para una determinada concentración de sustrato. La representación gráfica del producto formado en función del tiempo permitió estimar la velocidad inicial a partir de la pendiente de la curva al comienzo de la reacción, cuando la reacción inversa es insignificante. Para cada

concentración de sustrato estudiada se mantuvo fija la concentración de enzima 2 U/mg de proteína en 100 μ L de reacción.

En la figura 12, se representa un ejemplo de la determinación de la velocidad inicial para una concentración de sustrato de 0,05 mM. La pendiente de esta curva fue 3×10^{-5} μ moles de glucosa/minutos y corresponde a la velocidad inicial medida a esa concentración de sustrato.

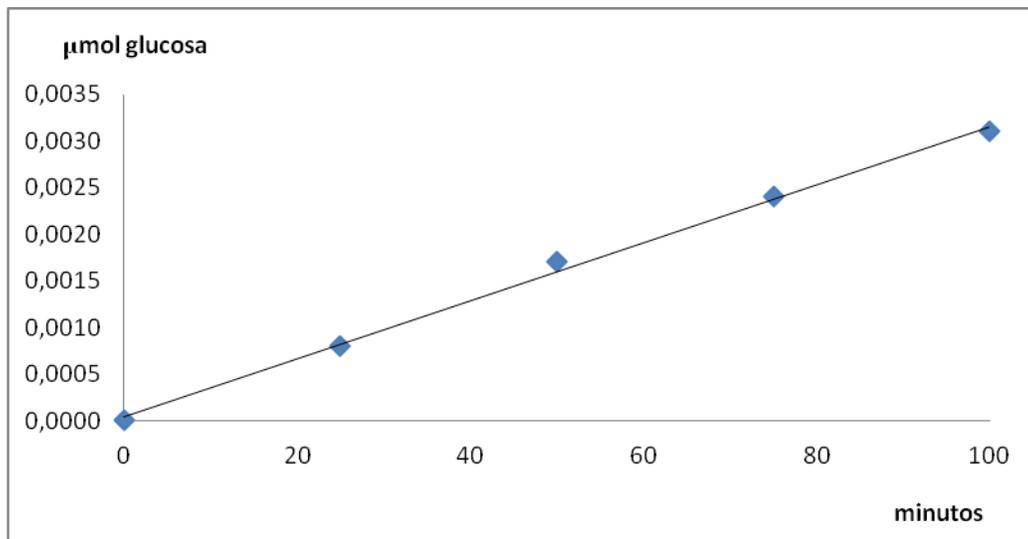


Figura 12. Curva de formación de producto en función del tiempo para una concentración de sustrato de 0,05 mM.

Al representar las velocidades iniciales obtenidas en función de las concentraciones de sustratos ensayadas (Figura 13), se obtuvo una hipérbola rectangular. Se puede observar que a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción (V_0) es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Al incrementar la concentración de sustrato la velocidad deja de ser lineal, hasta permanecer constante, es decir, no aumenta por más que incremente la concentración de sustrato.

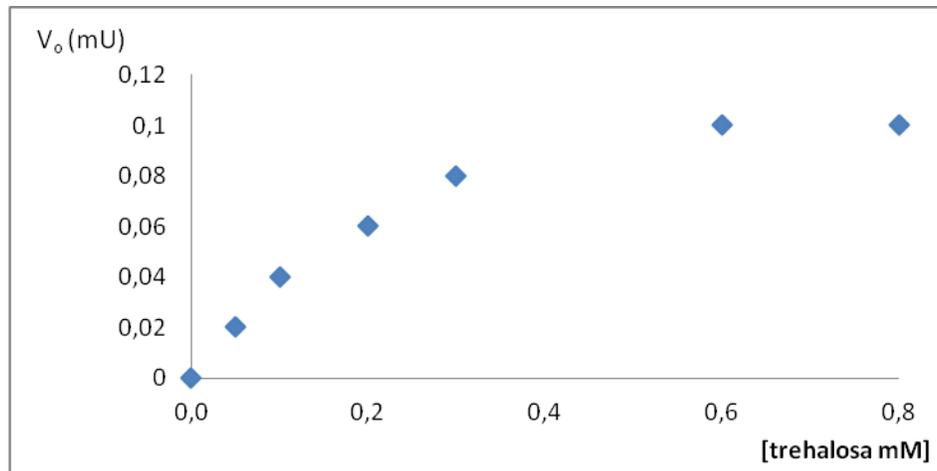


Figura 13. Representación de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración de sustrato.

Este resultado corresponde a un modelo de cinética michaeliana para una reacción con un único sustrato. La ecuación de velocidad que representa este fenómeno fue descrita por Henri, Michaelis y Menten en 1913:

Ecuación 1.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

En esta ecuación están descritos dos parámetros cinéticos: (1) la velocidad máxima, en la cual los sitios activos de las enzimas están saturados con las moléculas de sustrato. (2) la constante de Michaelis-Menten, que caracteriza a la enzima por la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Estas constantes cinéticas son difíciles de estimar en gráficas no lineales (Figura 13); por tal razón, se han desarrollado diversos métodos para linearizar la ecuación de Michaelis-Menten. En nuestros datos se utilizó la descrita por Lineweaver-Burk:

Ecuación 2:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

En la figura 14 se muestra el resultado de la representación de Lineweaver-Burk. La recta obtenida fue: $y = 2143,3X + 5959,3$; con un R^2 de 0,99. El punto de corte con el eje de las ordenadas equivale a $1/V_{max}$, y el punto de corte con el eje de las abscisas equivale a $-1/K_m$.

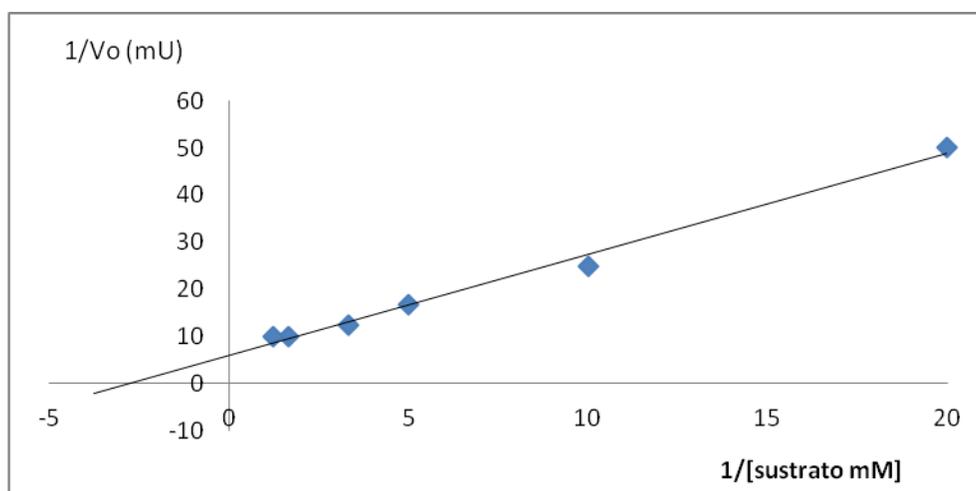


Figura 14. Representación de Lineweaver-Burk, inversos de las velocidades enzimáticas frente a los inversos de las concentraciones de sustrato.

Con la representación de Lineweaver-Burk se determinó de manera más exacta que la trehalasa soluble de *Sitophilus oryzae* posee un K_m de 0,36 mM para la trehalosa y una $V_{m\acute{a}x}$ de $1,7 \times 10^{-4}$ μmol de glucosa/minutos para 2 U/mg de proteínas. Esta puede aumentar o disminuir con respecto a la concentración de enzima ensayada, según la siguiente formulación $V_{m\acute{a}x} = k_3 [E]$, donde: k_3 es la constante catalítica y $[E]$ es la concentración de enzima presente en el ensayo cinético.

5. Discusión.

5.1 Obtención de la trehalasa soluble de *S. oryzae* parcialmente purificada.

Para la purificación de la trehalasa soluble de *S. oryzae*, se partió de la fracción soluble obtenida a partir del homogeneizado de los insectos. La actividad enzimática de trehalasa cuantificada en la fracción soluble representó un 83% de la actividad total presente en el homogeneizado. Posiblemente el 17% restante de la actividad corresponda a trehalasas de membranas que fueron separadas durante el proceso de centrifugación. Estas enzimas están distribuidas en diferentes tejidos del insecto (intestino, músculos del vuelo, cuerpos grasos y glándulas labiales), encontrándose solubles o ancladas a las membranas celulares (Terra y Ferreira, 1994; Silva y col., 2006). Silva y colaboradores en el 2004, purificaron la trehalasa soluble intestinal de larvas de *Spodoptera frugiperda*. Ellos reportaron que un 10% de la actividad presente en el homogeneizado del intestino corresponde a la enzima de membrana, siendo predominante la actividad de la trehalasa soluble intestinal. Posteriormente, Forcella y colaboradores en el 2010, purificaron la trehalasa de membrana del insecto adulto de *Chironomus riparius*, y encontraron que esta enzima representa un 38% de la actividad total presente en el homogeneizado.

El primer paso de purificación de la trehalasa soluble consistió en una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. La adición de esta sal a una saturación de 41% permitió precipitar una mayor cantidad de proteínas presentes en la fracción soluble y la actividad enzimática medida en el sobrenadante

resultante (alrededor de 84%) mostró que esta enzima no precipita a esta concentración. Al aumentar la saturación al 50% de sulfato de amonio, se cuantificó una pérdida considerable de la actividad enzimática en el sobrenadante obtenido, indicando precipitación de trehalasa. En la purificación de la trehalasa soluble intestinal de *S. frugiperda*, y de *T. molitor*, se ha reportado la utilización de sulfato de amonio a la concentración de 41% (Silva y col., 2004; Gómez 2005), obteniendo una recuperación de la actividad entre 90 y 100%.

Luego de cromatografiar este sobrenadante en una columna hidrofóbica se detectaron dos picos correspondientes a la detección de glucosa (Figura 7) que es el producto formado posterior a la incubación de la trehalasa con su sustrato. El primer pico eluyó al inicio de la cromatografía donde la concentración de sulfato de amonio era de 100 % (1,7M), mostrando que el material eluido de la columna no interactuaba con la misma. Como fue descrito en los resultados, los controles realizados para esta cromatografía demostraron que la glucosa presente en las fracciones que formaron el pico 1, correspondía a la glucosa endógena de los insectos, la cual había sido separada de la enzima de interés. Para la relación de 40 insectos homogenizados en 1 mL de tampón se cuantificó 1,3 μmol de glucosa/mL de muestra (0,234 mg de glucosa). Este dato es cercano a lo reportado por Lugo en el 2009, quien estandarizó un método químico enzimático para cuantificar los niveles de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz mantenidos en arvejas verdes peladas; para una relación de 60 insectos en 2 mL de tampón citrato-fosfato, encontró $1,16 \pm 0,08$ mg de glucosa.

Por otra parte, las fracciones de la 38 a la 41 eluidas a 1 M de sulfato de amonio, contenían la enzima de interés (Figura 8), ya que al incubar estas fracciones en ausencia del sustrato no se encontró glucosa en el medio de reacción. Este paso cromatográfico enriqueció 3 veces la actividad específica y se obtuvo un rendimiento del 48% respecto al paso anterior de purificación.

El pool formado por las fracciones del pico 2, que presentaron actividad enzimática, fue cromatografiado en una columna Bio-select 125 de exclusión molecular. Los resultados mostraron que la trehalasa eluía en el volumen muerto de la columna, indicando que su masa molecular era superior a 100 kDa. En base a esto, se procedió a inyectarla en la columna Bio-select 250, cuyo rango de separación de proteínas está entre 10 y 300 kDa.

Los valores de rendimiento (89 %) y enriquecimiento (14 veces), obtenidos en este paso de purificación con respecto al anterior, indican que es una etapa eficiente en la purificación. Efectivamente hay un enriquecimiento considerable de la actividad específica con poca pérdida de actividad enzimática.

En el intento de purificar a homogeneidad la trehalasa, se realizó una cromatografía de intercambio iónico en columna Resource Q, con el pool formado por las fracciones que presentaron actividad en la cromatografía de exclusión molecular, obteniéndose que en esta cromatografía hubo pérdida absoluta de la actividad enzimática.

Para analizar si un método de purificación es adecuado se debe tomar en cuenta tanto la recuperación como el grado de purificación alcanzados al final del proceso de purificación. Para las trehalasas parcialmente purificadas de *G. mollenella* y

R. americana, ha sido reportado un rendimiento de 33% y 53% y un grado de purificación de 50 veces y 26 veces, respectivamente (Kalf y col., 1957; Terra y col., 1978). En la purificación de la trehalasa de *R. americana* hay un mayor rendimiento, sin embargo, la enzima presentó un menor grado de purificación. Estos resultados fueron similares a los obtenidos aquí para la trehalasa soluble de *S. oryzae*, donde al final del proceso de purificación se obtuvo un rendimiento de 34% y un enriquecimiento de 52 veces con respecto a la fracción soluble. Para las enzimas que han sido purificadas a homogeneidad, como por ejemplo, la proveniente de *S. frugiperda*, se ha conseguido un rendimiento de apenas 18% al final del proceso de purificación (Silva y col., 2004).

5.2 Características físicas y efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática de la trehalasa soluble de *S. oryzae*

La masa molecular de la trehalasa determinada a través de la columna Bio-select 250 fue de 123 kDa. Valores semejantes han sido reportados en condiciones nativas para trehalasas solubles purificadas parcialmente: *Rhynchosciara americana*, 122 kDa (Terra y col., 1978); *Pyrearinus termitilluminas*, 110 kDa (Colepicolo-Neto y col., 1986); *Apis mellifera*, 135 kDa (Talbot y Hubert 1975). No obstante, en el gel de electroforesis en condiciones disociantes, realizado para cada una de las fracciones que eluyeron con actividad enzimática, no se observó ninguna banda que correspondiera a 123 kDa. Las más cercanas fueron las de 100 y 110 kDa. Diferencias en las masas moleculares determinadas por diversos métodos ya fueron observadas en varias enzimas de

insectos (Terra y col., 1994). Otra posibilidad es que esta trehalasa, sea un dímero formado por dos subunidades de 62 kDa, debido a que una banda con esta masa molecular, está presente en todas las fracciones estudiadas con actividad y se encuentra más enriquecida con respecto a las otras bandas. Huang y colaboradores (2006), reportaron dos isoenzimas solubles (PI y PII) en la purificación de la trehalasa de huevos en desarrollo de *Bombyx mori*. En condiciones nativas determinaron una masa molecular de 73 kDa y 140 kDa, para PI y PII, respectivamente. Esta última, era un dímero formado por dos subunidades de 64 kDa.

El valor determinado de la constante de Michaelis-Menten para la trehalosa (0,36 mM) fue semejante a los reportados para otras trehalasas solubles de insectos, siendo la mayoría pertenecientes a trehalasas intestinales, entre las que se encuentran: la trehalasa de *Lymantria dispar* con un K_m de 0,4 mM (Valatis y Bowers, 1993), la de *Tenebrio molitor* con un K_m de 0,43 mM (Gómez, 2005), la de *Bombyx mori* con un K_m 0,44 mM (Huang y col., 2006) y la trehalasa de *Spodoptera frugiperda* con un K_m 0,47 mM (Silva y col., 2004). La similitud entre el valor del K_m obtenido y los reportados para las trehalasas intestinales de diferentes insectos, pudiera indicar que se trata de la trehalasa soluble intestinal de *S. oryzae*.

6. Conclusión.

- En este trabajo se consiguió purificar parcialmente una trehalasa soluble de *Sitophilus oryzae*.
- Con la utilización de dos técnicas cromatográficas distintas (cromatografía hidrofóbica y cromatografía de exclusión molecular), se encontró un único pico de actividad enzimática, apuntando a que en este insecto, la enzima se encuentra presente como una única trehalasa soluble.
- Al final del proceso de purificación se obtuvo un rendimiento de 34% y una actividad específica de 6,73 U/mg proteínas con un factor de purificación de 52 veces.
- La enzima presentó una masa molecular de 123 kDa, determinada en condiciones nativas por cromatografía de exclusión molecular
- La constante de Michaelis-Menten determinada para la trehalasa fue de 0,36 mM
- El valor de K_m es muy similar a los de las trehalasas intestinales purificadas de otros insectos, lo cual sugiere que la enzima aquí estudiada pudiera ser la trehalasa soluble intestinal de *S. oryzae*

7. Referencias.

- Arias, C. 1993. Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural: Conservación y protección de los granos almacenados. Obtenido en: <http://www.fao.org/docrep/X5027S/x5027S0h.htm> [consultada 22 de agosto de 2011]
- Arias, C. y Trivelli, H. 1983. Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Obtenido en: <http://www.fao.org/docrep/X5030S/x5030S00.htm#Contents> [consultada 11 de mayo de 2012].
- Asano, N. 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*. **13**: 93-104.
- Becker, A., Schloder, P., Steele, J. E., Wegener, G. 1996. The regulation of trehalose metabolismo in insects. *Birkhauser Verlag Basel*. **52**: 433-439.
- Bounias, M., Bahjou, A., Gourdou., Moreau, R. 1993. Molecular activation of a trehalase purified from the fat body of a coleopteran insect (*Tenebrio molitor*), by an endogenous insulin-like peptide. *Biochem. Molec. Biol. Int.* **31**: 249-266.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Campbell, M. K y Farel, S. O. 2004. **Bioquímica** (4ª ed.), International Thomson Editores S.A. México, pp 172-179.

- Clifford, K. H. 1980. Stereochemistry of the hydrolysis of trehalosa by the enzyme trehalasa prepared from the flesh fly *Sarcophaga Barbata*. *European Journal Biochemistry*. **106(1)**: 337-340.
- Colepicolo-Neto, P., Bechara, E. J. H., Ferreira, C., Terra, W. R. 1986. Evolutionary considerations of the spatial organization of digestion in the luminescent predaceous larvae of *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridat). *Insect Biochemistry*. **16**: 811–817.
- Descamps, L. R., Reviriedo, M. E., Suárez. A. A., Ferreiro. A. A. 2004. Reproducción de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Cuculionidae) y de *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae) en cultivares de trigo argentinos. *Boletín de Sanidad Vegetal - plagas*. **30 (1)**: 171-176.
- Elbein, A., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. 2003. New insight on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. **13**: 17-22.
- Forcella, M., Cardona, F., Goti, A., Parmeggiani, C., Cipolla, L., Gregori, M., Schirone, R. 2010. A membrane-bound trehalase from *Chironomus riparius* larvae: purification and sensitivity to inhibition. *Glycobiology*. **20 (9)**: 1186-1195.
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Grossi-de-Sá, M. F. 2002. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*. **269**: 397-412.
- Gibson, R. P., Gloster, M., Shirley, R., Warren, J., Storch de Gracia, I., Chiara, J. 2007. Molecular basis for trehalase inhibition revealed by the

structure of trehalase in complex with potent inhibitors. *Angewandte Chemie International*. **46**: 4115-4119.

- Gómez, A. G. 2005. Caracterização da trealase intestinal da larva de *Tenebrio molitor* e clonagem do cDNA que a codifica. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. **280**:309-316.
- Henrissat, B., Bairoch, A. 1993. New families in the classification of glycosyl hidrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*. **293**:781–788.
- Huang, J., Furusawa, T., Sadakane, K., Sugimura, Y. 2006. Purification and properties of two types of soluble trehalases from embryonic larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*. **75**: 1-8.
- Ishihara, R., Taketani, S., Sassai-Takedatsu, M., kino, M., Tokugana, R., Kobayshi, Y. 1997 Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human trehalasa. *Gene*. **202**: 69-74.
- Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., Gilband, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*. **131**: 1-11.
- Kalf, F. G., Rieder, S. V. 1957. The purification and properties of trehalasa. Department of biochemistry, Yale University, New Haven, Connecticut. 691-698.

- Klowden, M. J. 2007. Physiological systems in insects. (2^a ed.). Editorial Elsevier. Idaho, EE.UU. pp 294.
- Koolman, J., Rohm, K. 2005. Bioquímica. (3^a ed.). Editorial Medica Panamericana. Madrid, Espana. pp 488.
- Laemmi, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lee, J., Tsui, M., Nakamura, M., Nishimoto, M., Okuyama, M., Mori, H. 2001. Purification and identification of the essential ionisable groups of honeybee *Apis mellifera* L., trehalasa. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. **65**: 2657-2665.
- Lorini, I., Krzyzanowski, F., Franca-Neto, J., Henning, A. 2010. Principais pragas e métodos de controle em sementes durante o armazenamento. *Embrapa soja* **73**: 1-12.
- Lugo, A. 2009. Evaluar por un método químico enzimático el efecto del consumo de carbohidratos simples y complejos sobre el contenido de glucosa, trehalosa y glucógeno en el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae*). Tesis de grado. Universidad central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Maes, J. 1995. Museo de entomología, S.A.E. Ficha de "insectos plagas" No 9. pp 1-2.
- Mascorro-Gallardo, J. O., Avonce, N. Iturriaga, G. 2005. Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo*. **11**:193-202.
- Michaelis, L., Menten, M. 1913. Die Kinetik der invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*. **49**: 333-369.

- Murray, J. A., Coupland, K., Smith, J. A., Ansel, I. D., Long, R. G. 2000. Intestinal trehalase activity in UK population establishing a normal range and the effect of the disease. *British Journal of Nutrition*. **83**: 241-245.
- Pande, N. y Mehrotra, B.S. (1998). Rice weevil (*Sitophilus oryzae* Linn.): vector for toxigenic fungi. *National Academy Science Letters, India* **11(1)**: 3-4.
- Petzold, E. W., Himmelreich, U., Mylonakis, E., Rude, T., Toffaletti, D., Cox, G. M., Miller, J. L., Perfect J. R. 2006. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. **74**: 5877-5887.
- Richards, A. B., Krakowka, S., Dexter, L. B., Schmid, H., Wolterbeek, A. P. M., Waalkens-Berendsen, D. H., Shigoyuki, A., Kurimoto, M. 2002. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Toxicology*. **40**: 871-898.
- Rodriguez, M. S., Moreira, M. I., Gimenez, A. R., Russo, S., Marquez, A. M., Ricco, R., Gurni, A. A. 2008. Acción insecticida de extractos de *Picrasma crenata* (Vell) Engl. (Simaroubaceae) en el gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidae). *Dominguezia*. **24(2)**: 86-101.
- Romero, F. R. 2004. Manejo integrado de plagas: las bases, los conceptos su mercantilización. (1ª ed.), Tezcoco, Mexico. pp 7-9
- Segel, I. H. 1975. Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems. *Wiley*, New York.

- Silva, C. P. M., Terra, W. R., Ferreira, C. 2006. Absorption of toxic β -glucoside produced by plants and their effect on tissue trehalases from insects. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **143B**: 367-373.
- Silva, M. C. P., Rilbeiro, A. F., Terra, W. R., Ferreira, C. 2009. Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalases and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. *Insect Molecular Biology*. **18**: 769-784.
- Silva, M. C. P., Terra, R. W., Ferreira, C. 2004. The role of carboxyl, guanidine and imidazole groups in catalysis by a midgut trehalasa purified from an insect larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **34**: 1089-1099.
- Switzer, R. C., Merrill, C. R., Shifrin, S. A. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. **98**: 231-237.
- Talbot, B. G., Huber, R.E. 1975. Partial purification, stabilization and characterization of adult honey bee midgut trehalase and a new trehalase specific disc gel stain method. *Insect biochemistry*. **5**: 337-347.
- Terra, R. W., Ferreira, C., De Bianchi, A. G. 1978. Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalasa and a thermodynamic approach to the nature of its active site. *Biochimical et Biophysical*. **524**: 131-141.
- Terra, R. W., Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentization and funtion. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **109B**: 1-62.

- Thompson, N. 2003. Trehalose-The insect Blood Sugar. *Advances in insect physiology*. **31**: 205-285.
- Trinder, P. 1969. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* **6**: 24-25.
- Ujita, M., Yamanaka, M., Maeno, Y., Yoshida, K., Ohshio, W., Ueno, Y., Benno, Y. 2011. Expression of active and inactive recombinant soluble trehalasa using baculovirus-silkworm expression system and their glycan structures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **111**: 22-26.
- Valaitis, A. P., Bowers, F. D. 1993. Purification and properties of the soluble midgut trehalasa from the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **23**: 599-606.
- Valenzuela, A. J. P. y Valenzuela, S. E. M. 2009. Trehalosa: El azucar de la resurrección. *Revista Ciencia y Desarrollo*. **35**: 58-65.
<http://www.conacyt.mx/comunicacion/revista/229/Articulos/Trehalosa/Trehalosa3.html> [consulta 22 de agosto de 2011]
- Wegener, G. Macho, C. Schlöder, P. Kam, G. y Ando, O. 2010. Long-term effects of the trehalase inhibitor trehazolin on trehalase activity in locust flight muscle. *Journal of Experimental Biology*, **213**: 352-3861.
- Wegener, G., Tschiedel, V., Schloder, P., Ando, O. 2003. The toxic and lethal effects of the trehalasa inhibitor trehazolin in locusts are caused by hypoglycaemia. *Journal of Experimental Biology*. **206**: 1233-1240.
- Consultas en línea:

- http://es.encydia.com/ca/Hidrolasa_glicos%C3%ADica
[consulta el 26/05/11]
- http://ipm.ncsu.edu/ag295/html/vegetable_weevil.htm [consulta el 22/08/11]
- <http://www.isb.vt.edu/news/2003/news03.mar.html> [consulta el 22/08/11]