



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios dirigidos a la ecología química de insectos plaga mediante semioquímicos

Aroa Domínguez Cuadrado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

PROTEÍNAS ANTENALES DE DOS MICROLEPIDÓPTEROS PLAGA

Capítulo 7

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OLFACCIÓN EN LEPIDOPTEROS

El sistema olfativo en lepidópteros juega un papel fundamental para su supervivencia al estar involucrado en aspectos tan importantes como la búsqueda de individuos conespecíficos para la reproducción, o un lugar idóneo donde alimentarse y ovipositar (Hansson, 1995). Los principales órganos de olfacción en mariposas y polillas adultos son las antenas, donde se encuentran situados distintos tipos morfológicos y fisiológicos de sensilas. La cutícula sensilar está perforada, permitiendo el paso de las moléculas odoríferas a su interior, que está relleno de linfa sensilar. Aquí existen una serie de proteínas que facilitan la detección y el transporte de la molécula odorífera (Wee et al., 2016). Los receptores olfativos (ORs), proteínas de unión a la molécula de olor (OBPs) y enzimas degradadoras de olor (ODEs) son las tres principales familias de proteínas involucradas en el proceso de olfacción, aunque existen otras, como los receptores ionotrópicos (IRs), las proteínas de membrana de las neuronas sensoriales (SNMPs) y las proteínas quimiosensoriales (CSPs) (Su et al., 2009; Guidobaldi & Guerenstein, 2012; Leal, 2015) (Figura 7.1).

Las moléculas volátiles presentes en el medio, que por lo general son hidrofóbicas, han de ser transportadas hasta la membrana de las células sensitivas a través del lumen sensilar que es altamente hidrofílico. Esta tarea es llevada a cabo por las OBPs y las CSPs, las cuales están altamente concentradas en la linfa. En la membrana de las dendritas más externas de las células sensitivas olfativas se encuentran localizados los ORs que están involucrados en el proceso de percepción. La unión de la molécula odorífera con su OR inicia una cascada de la señal en el interior de la célula sensitiva, que finaliza con la transmisión del impulso nervioso al sistema nervioso central. Una vez se ha producido la transducción de la señal, la molécula odorífera es degradada por las ODEs presentes en la linfa, evitando así la saturación de los receptores y permitiendo la percepción de nuevas moléculas (Leal, 2013; Pelosi et al., 2017).

1.1.1 OBPs y CSPs

Las OBPs son polipéptidos de pequeño tamaño (no más de 150 aminoácidos) con una estructura secundaria formada por dominios alfa-hélice que definen una cavidad hidrofóbica de unión y cuya estructura tridimensional se mantiene gracias a tres puentes disulfuro formados entre seis residuos de cisteínas conservadas, aunque su forma puede variar por la unión al ligando o por cambios de pH (Pelosi et al., 2017). Las OBPs son proteínas solubles que están en el lumen de las sensilas olfativas al que son excretadas por las células auxiliares. Las OBPs se encargan de solubilizar las moléculas odoríferas hidrofobas presentes en la linfa antenal, a las que se unen de manera reversible, y transportarlas hasta su receptor afín. La unión del complejo olor-OBP (o solo el olor) con el receptor adecuado inicia la cascada de transducción de señales que genera una señal eléctrica que será transmitida al cerebro (Vogt et al. 1985; Xu et al., 2012; Guidobaldi & Guerenstein, 2015).

Dentro de la familia de las OBPs se establecen distintos tipos de clasificaciones en función del número y patrón de las cisteínas, la longitud de la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo terminal, y la homología de la secuencia de aminoácidos (Vogt et al., 2015; Pelosi et

al., 2017). Ésta última es la clasificación más utilizada y diferencia cuatro grandes grupos: las proteínas de unión a moléculas de feromona (PBPs), las proteínas de unión a moléculas odoríferas generales 1 y 2 (GOBPs), y las proteínas antenales X de unión antenal (Guidobaldi & Guerstein, 2015).

Los genes que codifican este tipo de proteína están presentes en el 98% de las especies de insectos estudiados. Se han encontrado en especies pertenecientes a los principales órdenes de insectos, como Orthoptera, Lepidoptera, Diptera, Blattaria e Isoptera. La primera PBP identificada fue en antenas de machos de la especie *Antheraea polyphemus* en 1981 (Vogt & Rifford, 1981), y desde entonces la mayoría de los estudios de este tipo se han realizado sobre dípteros, sobre todo en *Drosophila melanogaster*, la cual se ha convertido en una especie de referencia para estudios genéticos de OBPs, y en algunas especies de lepidópteros, pertenecientes en su mayor parte a las familias Noctuidae y Bombycidae. Actualmente, nuestro conocimiento sobre los genes relacionados con la codificación de las OBPs y su secuencia de aminoácidos en lepidópteros ha aumentado gracias a la búsqueda de homólogos en *D. melanogaster* (Vogt et al., 2015). Aunque los dominios hidrofóbicos están altamente conservados entre especies y órdenes, la secuencia de aminoácidos de las OBPs pueden ser muy divergentes llegando a conservar únicamente entre el 10-15 % de los residuos entre especies (Pelosi et al. 2017).

Las CSPs pertenecen a otra familia de proteínas involucradas en la detección de semioquímicos. Son pequeñas proteínas solubles de aproximadamente 120 aminoácidos con una estructura tridimensional de alfa-helice similar a la de las OBPs pero con un plegamiento distinto debido a sus 4 residuos de cisteína, y más conservadas que éstas entre especies (Jaquin-Joly et al., 2001). Se encuentran muy concentradas en las sensilas quimiosensoriales presentes en las antenas y otros órganos con funciones gustativas y olfativas, como proboscis, palpos maxilares y labiales (Wanner et al., 2005; Zhang et al., 2012; Zhu et al., 2015); además de haber sido halladas también en otros órganos como patas, alas y glándulas feromonales donde estarían implicadas en procesos de quimiorrecepción por contacto (Zhang et al., 2012) y en el transporte de moléculas hidrofóbicas en diferentes medios acuosos (Jacquin-Joly et al., 2001, Sabatier et al., 2003; Zhang et al., 2012; Gu et al., 2013).

1.1.2. ORs

Los ORs están localizados dentro de la membrana de las dendritas de las células sensoriales que se expanden por la linfa sensilar. En cada célula solo se expresa un tipo o un número reducido de receptores de estos receptores. Los primeros ORs fueron identificados a finales del siglo pasado en *D. melanogaster* como una herramienta bioinformática para encontrar genes de receptores acoplados a proteínas G (Leal, 2013). Están involucrados en el proceso de percepción de semioquímicos y olores presentes en el medio junto con los IRs y las SNMPs (Pelosi et al., 2017). En insectos, se caracterizan por estar formados por 7 dominios intramembranosos con un extremo N-terminal extracelular y otro C-terminal intracelular, a diferencia de los IRs con solo 3 dominios (Carragher et al., 2012) y 2 en el caso de las SNMPs (Liu et al., 2014).

Los ORs presentes en distintas familias de insectos consisten en un complejo heteromérico que consta de un receptor olfativo propiamente dicho y un correceptor. Al receptor olfativo se une la molécula de olor y dicta la selectividad del ligando. Es particular de cada célula sensorial y presentan un porcentaje de identidad en su secuencia muy bajo. Por otro lado, el correceptor, también conocido como *Orco* (odorant receptor co-receptor), presenta una secuencia altamente conservada entre especies y forma parte de un canal de iones controlado por ligandos y que es esencial en el proceso de olfacción, ya que mejora la respuesta a la molécula odorífera (Carragher et al., 2012).

La especificidad de los ORs está determinada por el modelo llave-cerradura de su sitio de unión. Son activados por conjuntos de moléculas odoríferas que presentan estructuras similares, y algunos tipos son más específicos que otros. Aunque los ORs desempeñan un papel significativo en la selectividad, otras proteínas olfativas contribuyen a la especificidad global del sistema olfativo del insecto (Su et al., 2009; Leal, 2013).

1.1.3. ODEs

Para que la percepción de feromonas sea efectiva, es necesario que exista un mecanismo de desactivación de la señal que permita seguir captando nuevas moléculas de manera continua en la sensila manteniendo así la máxima sensibilidad para poder detectar cambios en las concentraciones de este tipo de moléculas y la procedencia del estímulo. En 1981 cuando Vogt y Riddiford identificaron en las antenas de *A. polyphemus* la primera PBP, también descubrieron la primera esterasa degradadora sensilar (ApoISE) y propusieron un esquema en el que la feromona se unía a las PBPs para ser transportadas a su receptor y posteriormente eran degradadas rápidamente por estas esterazas (Vogt & Riddiford, 1981; Vogt et al., 1985). Unos años más tarde, se descubrió otro tipo de proteína degradadora de tipo aldehído-oxidasa en *Manduca sexta* y *A. polyphemus*, la cual no era activa sobre compuestos feromonales, por lo que dedujeron que este esquema no solo se limitaba a las feromonas, sino también a volátiles de plantas (Rybczynski et al., 1989; Rybczynski et al., 1990). Anteriormente, ya se habían descubierto otras enzimas degradantes en *Bombyx mori* (Kasang, 1971) y en *Trichoplusia ni* por (Ferkovich et al., 1973). Desde la primera esterasa degradadora de feromona identificada, se han descrito varios tipos de enzimas capaces de degradar feromonas: aldehído-oxidasas, alcohol-oxidasas, aldehído-deshidrogenasas, citocromo P-450 oxigenasas, glutatión-S-transferasa, UDP-glucuronosiltransferasas, entre otras, aunque su papel en la terminación de la señal aun es puesto en duda (Leal, 2013).

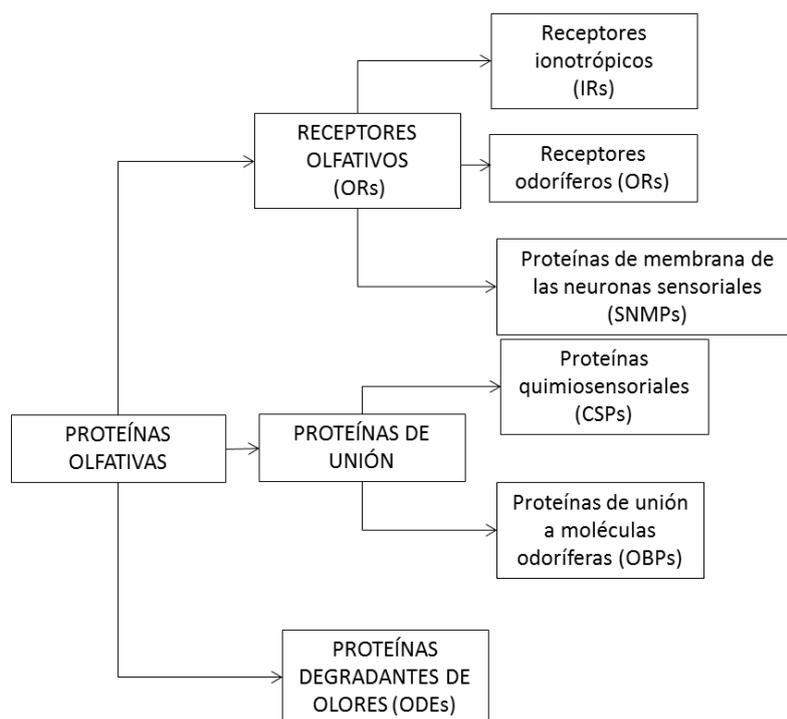


Figura 7.1. Esquema de los tipos de proteínas implicados en el proceso de olfacción de lepidópteros.

1.2. PROTEÓMICA: UNA HERRAMIENTA MÁS EN EL CONTROL DE PLAGAS

Se denomina proteoma al conjunto de proteínas codificadas por un genoma que se expresan en una célula en unas condiciones ambientales determinadas, siendo la proteómica la ciencia que se encarga de su estudio. Gracias a las técnicas empleadas en esta disciplina, junto con otras como la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica, se han aislado, identificado y localizado una gran cantidad de proteínas, entre ellas múltiples OBPs, ODEs y compuestos naturales de origen proteico como fitocistaninas, susceptibles de ser utilizados como tal o permitir el desarrollo de nuevas herramientas para un control integrado de plagas (Espinosa et al., 2014).

Las feromonas sintéticas son cada vez más se utilizadas como alternativa a los tratamientos tradicionales para luchar contra distintas especies de plagas. En los casos concretos de *T. absoluta* y *G. molesta* se ha puesto de manifiesto en repetidas ocasiones la gran efectividad del uso de feromonas tanto para el monitoreo como para la captura masiva (Witzgall et al., 2010). Por otro lado, se han desarrollado compuestos que tienen como diana las ODEs como las moléculas inhibitoras del tipo MK y TFMK las utilizadas en el capítulo 5 que impiden la degradación feromonal debido al bloqueo de los receptores antenales por la acumulación de moléculas feromonales, impidiendo así la localización de la hembra por parte del macho. Por esta razón, resulta de gran interés el conocimiento de las bases moleculares del sistema olfativo y consideramos importante llevar a cabo un estudio más profundo de las proteínas antenales involucradas en los procesos de percepción de compuestos odoríferos de *T. absoluta* y *G. molesta* mediante técnicas proteómicas que nos permitan separar, cuantificar, identificar y caracterizar dichas proteínas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. INSECTOS

Los insectos fueron obtenidos a partir de las colonias mantenidas en las instalaciones habilitadas en el IQAC) destinadas para este fin tal y como se describe en el capítulo 3, apartado 1.1 y 1.2. Una vez obtenidas las pupas de *G. molesta* y *T. absoluta* fueron separadas por sexos en cristalizadores colocados en distintas cámaras en las que las condiciones fueron de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ HR y fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad). Los adultos fueron separados diariamente y colocados en cajas que contenían un algodón impregnado con una solución de azúcar al 10% como fuente de alimentación hasta que se les extrajeron las antenas cuando tenían un mínimo de un día de edad y un máximo de tres.

2.2. ANÁLISIS GENERAL DE LAS PROTEÍNAS ANTENALES

El material y métodos empleados en este trabajo, se encuentra ampliamente detallado en distintos apartados del capítulo 3.

2.2.2. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL

2.2.2.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Tras recoger lotes de entre 100 y 200 antenas de machos y hembras de *G. molesta* y *T. absoluta*, respectivamente, como se describe en el apartado 5.1 del capítulo 3, se preparó un homogeneizado para extraer las proteínas que contenían. En primer lugar se sometieron a una rotura mecánica con un émbolo en nitrógeno líquido seguido de un proceso de lisis con una microsonda de ultrasonidos en 400 μl para *G. molesta* y 300 μl para *T. absoluta* de tampón de lisis (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (w/v), Tris-base 40mM, DTT 10mM y agua miliQ) (capítulo 3, 5.2.).

Para la cuantificación se empleó el kit RC-DC protein assay (Bio-Rad, España). La cantidad de proteína total en el extracto se cuantificó por duplicado mediante la elaboración de dos rectas patrón de cinco puntos utilizando BSA a una concentración de 4mg/ml como proteína estándar, y por interpolación de los valores en dicha recta (capítulo 3, 5.3.). La medición de la absorbancia se realizó en un lector de placas Spectra Maxplus 360 (Molecular Devices, EEUU) a una longitud de onda de 650 nm.

2.2.2.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Tanto la composición de los tampones como el procedimiento empleado se encuentran detallados en el apartado 5.4 del capítulo 3.

Brevemente, para la primera dimensión, se cargó un volumen de muestra equivalente a 5-25 μg de proteína de cada extracto junto con tampón de rehidratación (capítulo 3, 5.4.1) hasta completar los 125 μl en cada sarcófago donde se colocó a continuación la tira de poliacrilamida para la primera dimensión. Después, los sarcófagos se colocaron en un Ettan IPGphor III (GE Healthcare, Reino Unido) para separar las proteínas según su punto isoeléctrico. El programa utilizado fue rehidratación durante 6 h, después el voltaje se subió a 30 V durante 6 h (modo Step-n-hold), 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, posteriormente alcanzó los 5000 V durante 1 h,

todos estos pasos en modo Gradient y para terminar, en modo “Step-n-hold” a 5000 V hasta que las tiras alcanzarán un voltaje total de 20 KV.

Tras mantener las tiras de poliacrilamida congeladas un mínimo de media hora a -20°C, se realizó su equilibrado en dos pasos, sumergiéndolas primero en tampón de equilibrado (capítulo 3, 5.4.2) con 1% de DTT durante 15 min, y después otros 15 min en la misma solución con 2,5 % (w/v) de IAA. Tras este paso, se transfirieron las tiras a los geles y se colocó un fragmento de papel de filtro Whatman con 3 µl de marcador molecular al lado del polo negativo de ésta. Para favorecer el contacto de la tira con el gel y facilitar la migración de la primera dimensión a la segunda, se añadió aproximadamente 1 ml de agarosa al 0,5% (w/v). La segunda dimensión se llevó a cabo en el sistema de electroforesis Mini-protean 3 (Bio-Rad, España), y el programa utilizado fue de 25 V durante 20 min y luego 100 V durante 120 min.

2.2.2.3. TINCIÓN DE GELES

Para la visualización de las proteínas separadas, se utilizaron dos procedimientos compatibles con espectrometría de masas: la tinción de Azul Coomassie con el kit Quick Coomassie (Generon, Italia) y con nitrato de plata. Ambos procedimientos están descritos en el capítulo 3, apartado 5.4.3.

2.2.3. SEPARACIÓN DE PROTEINAS EN SOLUCIÓN

2.2.3.1. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La preparación de los extractos antenales se realizó a partir lotes que contenían 400 antenas a los que se le añadió 500 µl de un tampón de lisis distinto al citado previamente (TEAB pH 7,6, 100 mM, SDS 2%, DTT 0,1 M) y 250 µl de bolas de óxido de zirconio de 0,5 mm de diámetro. La lisis del material biológico se llevó a cabo en un Bullet Blender (WisBiomed, EEUU). La muestra lisada se centrifugó en una microcentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Alemania) y se retiró el sobrenadante cuidadosamente. El procedimiento detallado aparece en el apartado 5.2 del capítulo 3.

Para la cuantificación de la cantidad de proteína total en los extractos se utilizó de nuevo el kit RC-DC protein assay (Bio-Rad, España), pero esta vez las muestras se cuantificaron por triplicado y se realizaron tres curvas patrón de ocho puntos utilizando de nuevo BSA a una concentración de 4 mg/ml como proteína estándar. La concentración de proteína en la muestra se obtuvo de nuevo por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en la curva patrón, y la medición de la absorbancia se realizó en un lector de placas NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, España) a la misma longitud de onda que en el apartado 2.2.1.1 del presente capítulo.

2.2.3.2. DIGESTIÓN FASP

El procedimiento aparece ampliamente detallado en el apartado 5.5.1 del capítulo 3. En resumen, alícuotas de un volumen de material lisado en tampón equivalente a 100 µg de proteína de cada extracto en el caso de *G. molesta* y 70 µg en el de *T. absoluta*, fueron solubilizados en tampón UA (urea 8M en Tris/HCl 0,1M, pH 8,5) hasta obtener una

concentración de SDS por debajo de 0,1%, a continuación fueron cargados en cada uno de los filtros Amicon Ultra-0.5 ml que anteriormente habían sido pasivados y centrifugados a 14000 rcf a 13°C durante 15 min. Una vez filtrada la mezcla de proteínas se lavó tres veces añadiendo 200 µl de tampón UA al filtro y centrifugando a 14000 rcf durante 10 min a 13°C. Después, las proteínas se alquilaron con 100 µl de tampón de alquilación (0,05 M IAA, urea 8 M, Tris/HCl 0,1 M, pH 8,5) en oscuridad durante 30 minutos a 25°C. Después, el extracto de proteína se lavó tres veces con 100 µl de UA y tres veces con 100 µl de TEAB 200mM. A continuación se realizó la digestión con tripsina (Promega, EEUU) a 37°C durante 18-20 h usando una relación de enzima a proteína de 5:100. Los péptidos trípticos se eluyeron mediante la adición de 3 x 100 µl de 200mM de TEAB 200 mM seguida de una centrifugación a 14000 rcf durante 15 minutos a 13°C.

2.2.3.3. ANÁLISIS POR LC-MS/MS

La mezcla de péptidos trípticos fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) por las Dras. Vanessa Casas y Montserrat Carrascal. El equipo utilizado fue un cromatógrafo líquido HPLC equipado con una bomba capilar nano Agilent 1200 (Thermo Fischer Scientific, España), una bomba binaria, un microinyector con termostatzado y una válvula electromecánica de dos puertos acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, España) equipado con una fuente de ionización nanoelectrospray (Proxeon, ahora Thermo Scientific, España). Las muestras de *T. absoluta* fueron inyectadas por duplicado debido a la gran variabilidad observada en las muestras, mientras que las de *G. molesta* solo una.

Tras la digestión FASP, un volumen de muestra equivalente a 1 µg de péptidos fue evaporado hasta sequedad y resuspendido en 20 µl de 1% ácido fórmico (v/v) y 5% metanol (v/v). Los péptidos fueron separados mediante un cartucho de preconcentración C18 (Agilent Technologies, EEUU) conectado a una columna C18 de 15 cm X 100 µm i.d. (Nikkoy Technos Co., Japón). La fase móvil consistió en acetonitrilo (A) y agua con 0,1% ácido fórmico (B) usando un programa de gradiente lineal de 3% de A, a 40% de B en 360 min y con un flujo de 0.4 µl/min. La fuente de ionización se hizo funcionar en modo positivo con un voltaje de pulverización de 1.8 kV y el análisis de espectrometría se realizó en modo dependiente de los datos, adquiriendo el escaneo completo (*full scan*) en primer lugar, seguido por MS/MS en la trampa lineal de las 10 señales más intensas detectadas en la lista global del *full scan*. Para la adquisición MS en *full scan* el rango de masa utilizado fue de 400-1800 con una resolución de 60.000.

2.2.3.4. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS

Los datos fueron analizados con el software Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Scientific, España). El espectro de fragmentación fue buscado con el motor de búsqueda SEQUEST frente a la base de datos *Lepidoptera*, usando los siguientes parámetros: tripsina con un máximo de 3 puntos de hidrólisis de cisteína ausentes, tolerancia de masa de fragmentación de 0.6 Da, carbamidometilación de cisteína y oxidación de metionina como posible modificación. Las muestras fueron filtradas al 0,1% FDR para descartar falsos positivos, y se consideraron válidas

las proteínas identificadas con uno o más péptidos únicos, los cuales son exclusivos de una única familia de proteínas, y con más de un PSM (Peptide Spectrum Matches). La abundancia relativa de cada una de las proteínas entre machos y hembras de una misma especie fue estimada mediante la realización del cociente del número de PSMs que identificaban una proteína concreta en uno de los sexos entre los PSMs hallados en otro. Se consideraron proteínas sobreexpresadas aquellas cuyo resultado fue superior o igual a 1,5 (Rao et al., 2007).

3. RESULTADOS

3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cantidad promedio de proteína por antena obtenida (media \pm DE) cuando las antenas fueron lisadas con una combinación de rotura mecánica en nitrógeno líquido y microsonda fue de $1,16 \pm 0,23$ y $1,02 \pm 0,38$ $\mu\text{g}/\text{antena}$ para machos y hembras de *G. molesta* respectivamente, y de $0,95 \pm 1,11$ en machos y $1,01 \pm 0,76$ en las hembras de *T. absoluta* (Tabla 7.1). Cuando se cuantificó la cantidad de proteínas presente en extractos antenales preparados a partir de antenas que habían sido sometidas a rotura mecánica con un homogeneizador de tejidos celulares, la cantidad promedio de μg de proteína/antena obtenida fue de $1,04 \pm 0,05$ y $1,13 \pm 0,08$ para machos y hembras de *G. molesta*, y de $0,49 \pm 0,02$ en machos y $0,38 \pm 0,09$ para las hembras de *T. absoluta*, respectivamente (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. μg de proteína/antena extraída para cada lote de antenas por especie y sexo cuando las antenas fueron lisadas con dos métodos distintos.

Método de extracción	Especie	Macho			Hembra		
N ₂ líquido y microsonda	<i>G. molesta</i>	0,89	1,32	1,27	0,89	1,45	0,73
	<i>T. absoluta</i>	2,24	0,38	0,23	0,82	1,84	0,36
Homogeneizador de tejidos	<i>G. molesta</i>	1,03	1,09	1,00	1,22	1,12	1,06
	<i>T. absoluta</i>	0,50	0,47	0,50	0,28	0,46	0,39

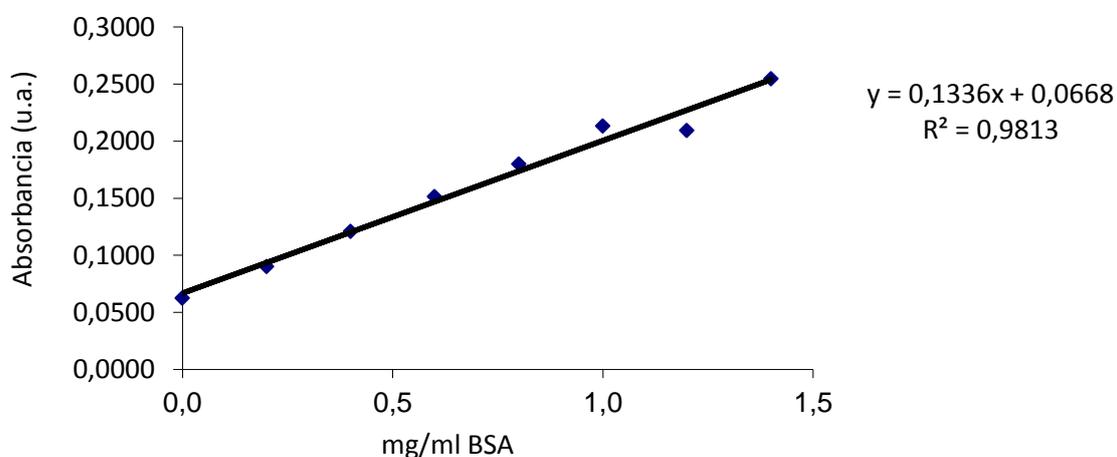


Figura 7.2. Recta patrón elaborada a partir de ocho concentraciones diferentes de 0,2 a 1,4 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA). La concentración de proteína en la muestra se obtuvo por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en la curva patrón.

3.2. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS ANTENALES

3.2.2. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

No se observaron manchas en los geles escaneados correspondientes a extractos antenales de machos y hembras, debido a que la cantidad de proteína mínima requerida para la elaboración de estos geles y poder visualizar bien los distintos puntos era de 100 μg en el caso del método de revelado con Azul Coomassie y de 25 μg con nitrato de plata, los cuales no llegaron a

conseguirse en la mayoría de los extractos realizados, por lo que se desechó esta metodología debido al gran número de antenas necesario para el análisis y se utilizó otra distinta que permitía trabajar con cantidades de proteínas inferiores.

3.2.3. DIGESTIÓN FASP

3.2.3.1. PROTEÍNAS ANTENALES DE *G. molesta*

En los extractos preparados a partir de antenas de hembras de *G. molesta*, se identificaron un total de 1184 proteínas a partir de un total de 3516 péptidos distintos. En el caso de los machos, se identificaron 1120 proteínas a partir de 3237 péptidos. En machos y hembras, los porcentajes de los distintos tipos proteicos son los que se muestran en los gráficos de la figura 7.3.

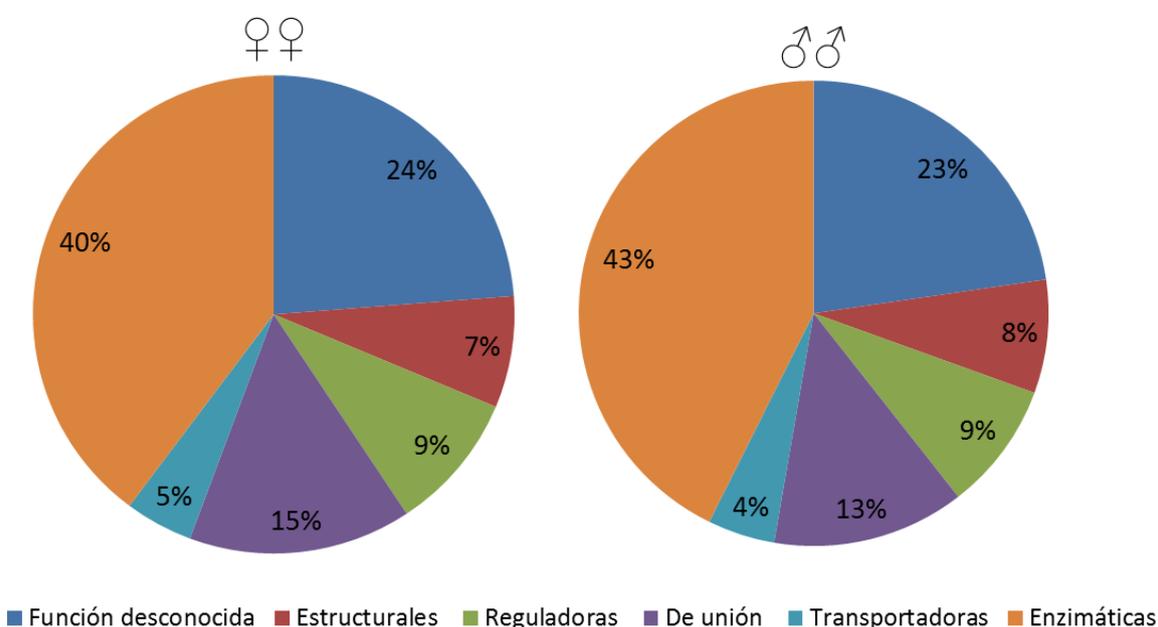


Figura 7.3. Distribución de las proteínas identificadas mediante análisis por espectrometría de masas presentes en antenas de hembras y machos de *G. molesta*.

De todas las proteínas identificadas, se encontraron 27 relacionadas con el proceso de olfacción, de las cuales 7 eran proteínas quimiosensoriales, 1 receptor olfativo, 3 proteínas sensoriales de membranas de neuronas y 16 pertenecían a distintos tipos de proteínas de unión a moléculas de olor. De todas éstas, 9 se hallaron con mayor grado de expresión en hembras y 4 en machos (Anexo, Tabla 5). Las más abundantes en antenas de hembras fueron las proteínas GmolCSP11, GmolOBP3, GmolOBP15, GmolOBP20, PxutOBPA10, GmolPBP3, y EposSNMP, además de la HassOBP y GmolOBP1 que se identificaron solo en este sexo.

Por otro lado, las proteínas que estaban más expresadas en machos fueron GmolOBP6, CpunOBP6 y GmolOBP8, además de la proteína quimiosensorial GmolCSP que ya había sido identificada en otro estudio anterior llevado a cabo en esta misma especie (Zhang et al., 2012) que ha sido encontrada únicamente en este sexo (Figura 7.4).

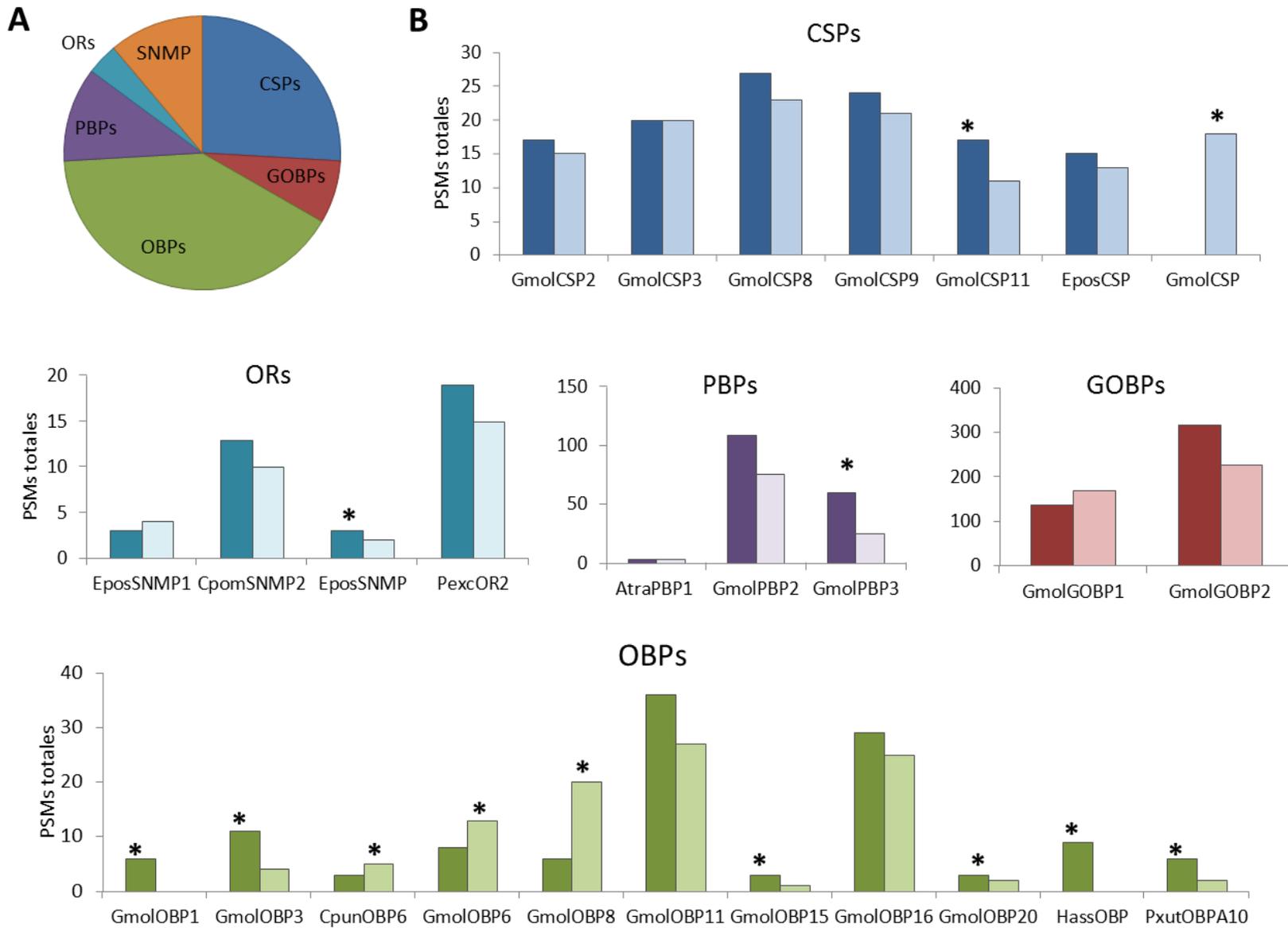


Figura 7.4. A) Porcentaje de los diferentes tipos de proteínas olfativas identificadas en antenas de machos y hembras de *G. molesta*. B) Diagramas de barras indicando la expresión de cada una de las potenciales proteínas olfativas halladas en antenas de hembras (gama de colores oscuros) y machos (gama de colores claros) en función del número de PSMs totales. Asterisco sobre las barras indica expresión diferencial entre sexos para dicha proteína

3.2.3.2. PROTEÍNAS ANTENALES DE *T. absoluta*

En los extractos preparados a partir de antenas de hembras de esta especie, se han identificado un total de 1145 proteínas a partir de un total de 3372 péptidos distintos. En el caso de los machos, se identificaron 1338 proteínas a partir de 3988 péptidos. En machos y hembras, los porcentajes de los distintos tipos proteicos son los que se muestran en los gráficos de la figura 7.5.

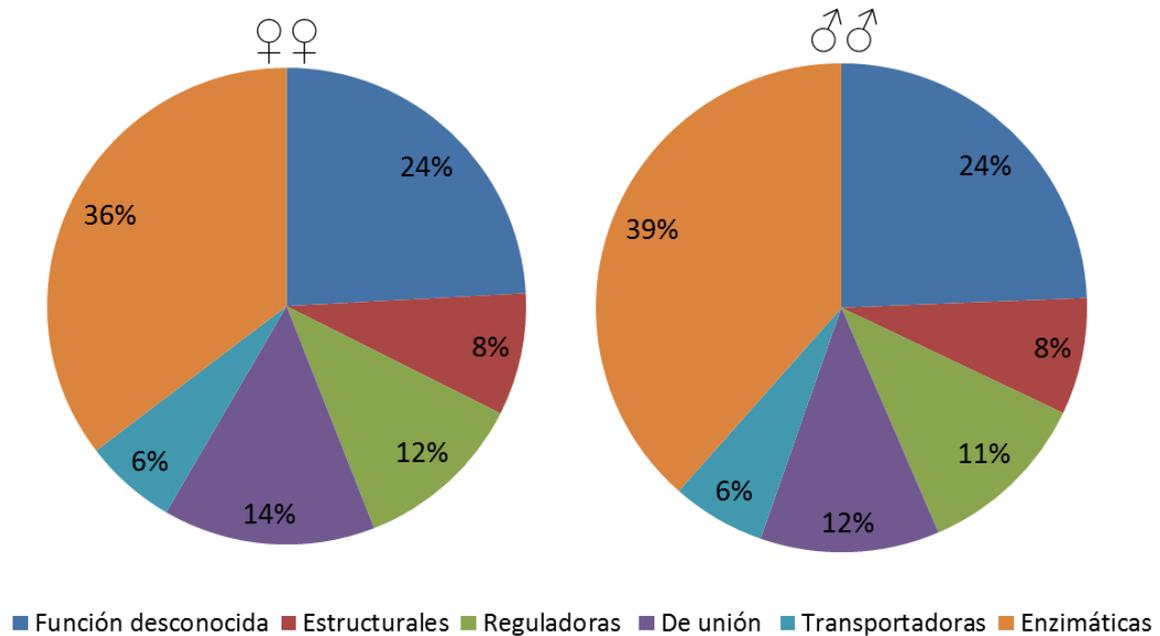


Figura 7.5. Distribución de las proteínas identificadas mediante análisis por espectrometría de masas presentes en antenas de hembras y machos de *T. absoluta*.

Entre todas las proteínas identificadas, se han encontrado 28 proteínas relacionadas con el proceso de olfacción en esta especie, de las cuales 8 eran proteínas quimiosensoriales, 2 receptor olfativo, 1 proteína sensorial de membrana de neurona y 17 pertenecían a distintos tipos de proteínas de unión a moléculas de olor. De todas éstas, 18 estaban sobreexpresadas en antenas de machos, de las cuales 16 fueron halladas solo en antenas de este sexo, mientras que solo 5 fueron significativamente más abundantes en antenas de hembras, de las que únicamente 1 fue exclusiva de este sexo (Anexo, Tabla 6) (Figura 7.6).

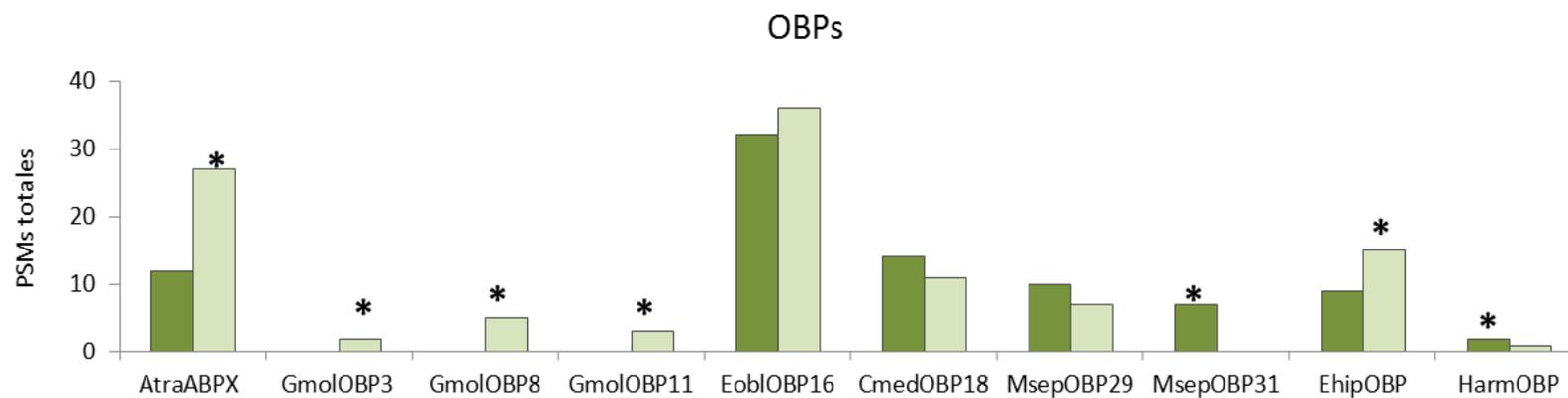
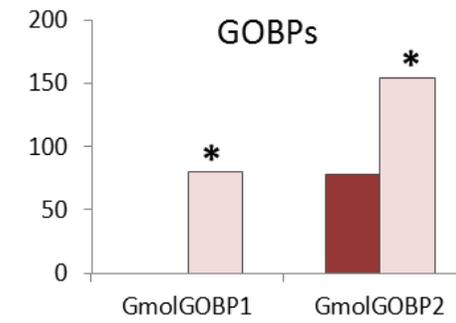
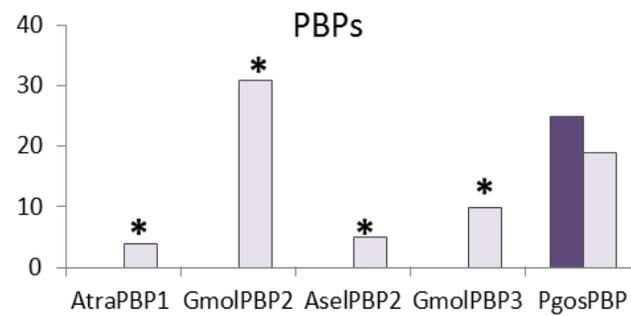
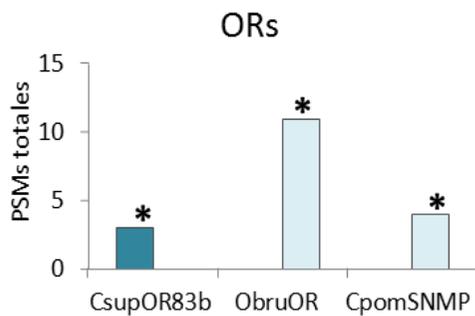
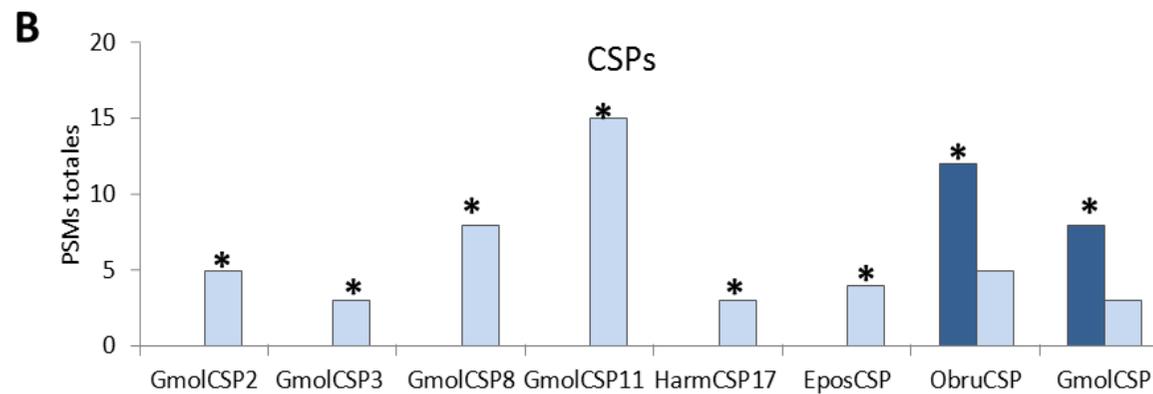
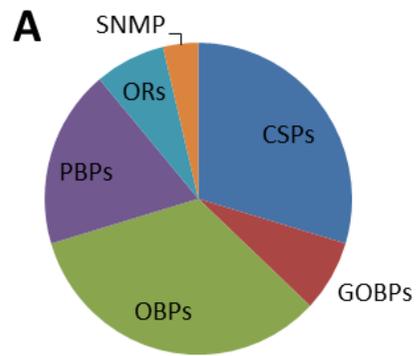


Figura 7.6. A) Porcentaje de los diferentes tipos de proteínas olfativas identificadas en antenas de machos y hembras de *T. absoluta*. B) Diagramas de barras indicando la expresión de cada una de las potenciales proteínas olfativas halladas en antenas de hembras (gama de colores oscuros) y machos (gama de colores claros) en función del número de PSMs totales. Asterisco sobre las barras indica expresión diferencial entre sexos para dicha proteína

4. DISCUSIÓN

A lo largo del presente capítulo, se ha llevado a cabo un estudio de las proteínas olfativas expresadas en las antenas de ambos sexos de dos especies de microlepidópteros pertenecientes a dos familias y cuya composición feromonal es muy diferente. Para ello, se han utilizado técnicas proteómicas que han permitido la identificación de varias proteínas relacionadas con el proceso de olfacción en ambas especies utilizando una cantidad mínima de muestra biológica. En estos análisis, a partir de proteínas extraídas de antenas de machos y hembras de *T. absoluta* y *G. molesta* se obtuvieron péptidos tripticos que fueron cuantificados mediante métodos libres de etiquetas y analizados mediante LC-MS/MS. En *T. absoluta* la cantidad de proteína hallada fue más abundante en machos que en hembras, mientras que en el caso de *G. molesta* la cantidad de proteína por antena obtenida fue muy similar en ambos sexos.

Se han identificado más de 1000 proteínas en antenas de hembras y machos de *T. absoluta* y *G. molesta*, de las cuales alrededor de 30 son proteínas olfativas, no llegándose a identificar ningún enzima encargado de la degradación de dichas moléculas (ODEs). Las proteínas olfativas halladas en *G. molesta* fueron muy similares cualitativamente en machos y hembras, ya que solo se encontró una proteína olfativa exclusiva en cada sexo. A nivel cuantitativo sí se apreciaron diferencias significativas en los niveles de expresión de las proteínas olfativas, estando la mayoría de ellas sobreexpresadas en antenas de hembras, de lo que hablaremos más adelante. En el caso de *T. absoluta* de todas las proteínas olfativas halladas 16 se expresaron únicamente en antenas de machos y solo dos eran específicas de hembras. También se observaron otras proteínas olfativas comunes a los dos sexos, algunas de las cuales se sobreexpresaron en machos o en hembras.

Se han encontrado distintos tipos de CSPs en las antenas de ambos sexos de las especies estudiadas. En *G. molesta* se encontraron diversos tipos de CSPs con un grado de expresión similar entre sexos, a excepción de la GmolCSP11 que se sobreexpresó en hembras, y la GmolCSP que únicamente se encontró en machos. Estas proteínas presentan un alto porcentaje de identidad con CSPs encontradas en otras especies, como por ejemplo, la proteína GmolCSP, encontrada únicamente en antenas de machos, con un 75% de identidad con la CSP6 de *Agrotis ipsilon* y la CSP3 de *Choristoneura fumiferana*, y un 65% con la CSP14 de *B. mori*. En el caso de *T. absoluta*, la mayoría de las CSPs halladas aparecieron sólo en antenas de machos, únicamente dos de ellas se expresaron en ambos sexos (CmedCSP y ObruCSP), donde además fueron significativamente más abundantes en hembras. Aquellas proteínas que se encontraron sólo o más expresadas en antenas de machos probablemente están relacionadas con la unión y transporte de feromonas sexuales hasta los receptores, además de otros muchos tipos de moléculas (Briand et al., 2002; Zhang et al., 2014; Zhu et al., 2015). Por ejemplo, la CSP19 de *Sesamia inferens* está más expresada en antenas de machos y se demostró que poseía gran afinidad por compuestos de la feromona sexual de hembras de esta especie, además de por otros compuestos emitidos por la planta hospedadora (Zhang et al., 2014). Otras CSPs presentes en las antenas y proboscis de machos de *Manduca sexta* también demostraron tener capacidad de unión con componentes feromonales de esta especie así como de otros compuestos análogos (Bohbot et al., 1998; Nagnan-Le Meillour et al., 2000;

Jaquin-Joly et al., 2001). Sin embargo, en un estudio posterior llevado a cabo con esta misma especie se demostró que las CSPs obtenidas de glándulas feromonales también tenían afinidad por la feromona, pudiendo estar implicadas en el transporte de los componentes feromonales desde el citosol a la membranas de las células (Jaquin-Joly et al., 2001). En otro estudio llevado a cabo con distintas CSPs aisladas de diferentes órganos y fases de desarrollo de *B. mori* quedó reflejado que estas proteínas estaban involucradas en diversos procedimientos celulares y que en algunos casos podrían no estar relacionadas con la quimiorrecepción (Qiao et al., 2013). La implicación en distintos procesos explicaría la presencia de este tipo de proteínas en antenas de ambos sexos de estas dos especies (Jaquin-Joly et al., 2001, Qiao et al., 2013, Zhu et al., 2015).

Se han identificado varias OBPs pertenecientes a diferentes subfamilias cuya expresión diferencial entre sexos varía en las dos especies de estudio. En *G. molesta* la mayoría de las OBPs identificadas aparecen en antenas tanto de machos como de hembras si bien con distinto grado de expresión, mientras que en *T. absoluta* un gran número de este tipo de proteínas se encontraban expresadas únicamente en machos. Las OBPs sobreexpresadas en antenas de machos o tenían que podrían estar relacionadas con la detección de feromonas sexuales, mientras que aquellas que lo hicieron en antenas de hembras podrían estarlo con la detección de olores generales procedentes de plantas hospedadoras (Jia et al., 2016); sin embargo la localización y funciones de estas proteínas son muy variadas. Por ejemplo, las proteínas OBP8, OBP11 y OBP15 de *G. molesta* pertenecen a la subfamilia de las ABPXs, (Vogt et al., 1991), se expresaban en antenas de ambos sexos y poseían la capacidad de unirse a más de 30 volátiles de melocotones y peras, por lo se relacionaron con la percepción y transporte de volátiles de plantas hospedadoras (Li et al., 2016b). La OBP8 de la especie *Chilo suppressalis* también se relacionó con procesos de unión y transporte de volátiles de plantas debido a su gran afinidad por los compuestos β -ionona, nerolidol, farnesol y 2-hexanona (Yang et al., 2016). Sin embargo, no todas las OBPs identificadas han sido halladas en antenas de insectos adultos, existen estudios en los que se ha puesto de manifiesto la presencia de estas proteínas en otros órganos, incluso algunos de ellos sin relación aparente con el proceso de olfacción (Sun et al., 2011; Yang et al., 2016). Por ejemplo, en los trabajos realizados en la presente tesis para caracterizar las proteínas presentes en las glándulas de *T. absoluta* recogidos en el capítulo 3 también se han hallados algunas OBPs, con las que sería interesante llevar a cabo estudios de “unión” con distintos ligandos para conocer su función específica en esta especie.

Las proteínas GOBP1 y GOBP2 han sido identificadas en las dos especies objeto de estudio. En el caso de *G. molesta*, ambas proteínas se expresaron indistintamente en ambos sexos, mientras que en las antenas de *T. absoluta* el nivel de expresión fue significativamente superior en machos. Las GOBPs intervienen en la percepción de componentes de olores generales emitidos por plantas y de algunos componentes feromonales (Feng & Prestwich, 1997; Smith, 2007; Laughlin et al., 2008, Gong et al., 2009; Li et al., 2016a), mostrando la GOBP2 un mayor espectro de ligandos que la GOBP1 (Feng & Prestwich, 1997; Li et al., 2016a). La abundancia relativa de estas proteínas en antenas de ambos sexos varía dependiendo de la especie de estudio, por ejemplo, en algunas especies como *M. sexta*, *Antherea pernyi* y

Antherea polyphemus, las GOBPs se expresaron igual en machos y hembras (Steinbrecht et al., 1995; Vogt et al., 2002), coincidiendo con los resultados obtenidos en *G. molesta*, en la que no se hallaron diferencias significativas entre sexos. Por otro lado, también existen especies en las que se muestra un mayor grado de expresión en uno de los sexos, como en *B. mori*, *Epiphyas postvittana* y *Sesamia nonagrioides* (Steinbrecht et al., 1995; Newcomb et al., 2002; Konstantopoulou et al., 2006; Acín et al., 2009; Zhang et al., 2012a), al igual que hemos encontrado en *T. absoluta*. El hecho de que en *T. absoluta* los niveles de expresión de GOBPs sea superior en machos que en hembras podría deberse a su implicación en la localización de la planta hospedadora. El reconocimiento de olores del hospedador, sinergizando con la atracción ejercida por las feromonas, facilitaría el encuentro de la planta por parte del macho incrementando sus posibilidades de localizar así a las hembras (Zhang et al., 2012a). Sin embargo, otros autores al realizar el alineamiento múltiple de la GmolGOBP2 observaron que ésta proteína compartía un porcentaje de identidad en su secuencia de nucleótidos más alto con proteínas pertenecientes a la familia de las PBPs que con otras OBPs (Song et al., 2014; Li et al., 2015; Li et al., 2016a), de manera que las PBPs serían las principales responsables del reconocimiento y transporte de los componentes mayoritarios feromonales (Song et al., 2014), mientras que las GOBPs y la GmolABPX actuarían en la percepción y reconocimiento de los componentes minoritarios (Li et al., 2016a).

Otro tipo de proteínas olfativas son las PBPs que tienen la capacidad de unirse y solubilizar distintos componentes feromonales (Song et al., 2014). Por ejemplo, estudios realizados en antenas de *A. ipsilon*, *H. assulta* y *H. armigera* han mostrado los distintos grados de afinidad de las PBPs por los diferentes componentes que forman parte de las feromonas sexuales de estas especies (Guo et al., 2012; Gu et al., 2013). Estos resultados coincidirían con los encontrados en *T. absoluta*, en cuyos extractos antenales se han identificado cinco PBPs, de las cuales cuatro eran exclusivas de los machos. Sin embargo en *G. molesta*, dos de las PBPs identificadas, se encontraron más expresadas en hembras que en machos. A pesar de que en general las hembras no presentan una atracción hacia la feromona tan destacada como los machos, se ha demostrado que en ciertas especies sí existe capacidad de autodetección de la propia feromona por parte de las hembras (Schneider et al., 1998; Stelinski et al., 2006), como es de sobra conocido en *G. molesta* (Stellinski et al., 2014) y como se ha observado en los estudios realizados sobre *T. absoluta* en el capítulo 4 (apartado 3.1.1.2) de la presente tesis. La expresión de PBPs en las antenas de hembras se ha documentado en varias especies de lepidópteros como *A. polyphemus*, *B. mori*, *M. sexta*, *Amyelois transitella*, *H. Zea*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda* y en la propia *G. molesta* (Steinbrecht et al., 1995; Callahan et al., 2000; Vogt et al., 2002; Leal et al., 2009, Song et al., 2014), además de en otros órdenes (Hu et al., 2016). Nuestros resultados en *G. molesta* coinciden con los ya obtenidos por Song y col. en 2014, en los que los niveles de GmolPBP2 y GmolPBP3 también fueron superiores en las antenas de hembras. Estos estudios mostraron una fuerte afinidad de la GmolPBP2 por los tres componentes feromonales (dos acetatos y un alcohol) y por ciertas moléculas odoríferas; mientras que la afinidad de la GmolPBP3 por estos compuestos fue más débil. Según este estudio la GmolPBP2 sería la principal encargada de discriminar y reconocer la feromona de *G. molesta*, mientras que la GmolPBP3 jugaría un papel secundario en la percepción de ésta (Song et al; 2014).

Se ha descrito una alta capacidad de unión de los distintos tipos de OBPs tanto a volátiles de plantas como a feromonas sexuales así como una baja selectividad de algunas de estas proteínas, por lo que muy probablemente la especificidad de la recepción de olores esté determinada por los receptores odoríferos (ORs) (Leal, 2013; Vogt, 2003). Aunque mucho menos abundantes que otras proteínas olfativas, se han encontrado ORs y SNMPs en las especies objeto de estudio. En *G. molesta* se ha detectado la presencia de la proteína PexcOR2 expresada de forma similar en antenas de ambos sexos, mientras que en *T. absoluta* se ha encontrado un receptor distinto en cada sexo. En machos de *T. absoluta* se encontró la proteína ObruOr, ausente en antenas de hembras de esta especie, la cual había sido identificada previamente en sensilas tricoideas de antenas de machos de la especie *Operophtera brumata* y que respondía fuertemente su propia feromona (Zhang et al., 2016). Por otro lado, la proteína CsupOr83b, hallada únicamente en antenas de hembras de *T. absoluta*, se encuentra altamente conservada entre especies de distintos órdenes de insectos y está expresada en un gran número de neuronas olfativas con diferentes especificidades de olor (Larsson et al., 2004). A esta proteína se le ha atribuido una función de correceptor al formar heterodímeros funcionales con otras ORs convencionales, asegurando su función como quimiorreceptores mediante su actividad de canal de iones no selectiva (Nakagawa et al., 2005; Carraher et al., 2012). Además, se han identificado tres SNMPs distintas en *G. molesta*, estando una de ellas más expresada en hembras (EposSNMP). Por otro lado, en *T. absoluta* solo se ha encontrado una SNMP (CpomSNMP2) en antenas de machos. La SNMP1 es una proteína transmembrana que se ha relacionado en numerosas ocasiones con la detección de feromonas; por ejemplo, ha sido descrita en dendritas de neuronas sensibles a estos compuestos en *Heliothis virescens* y como cofactor fundamental en la detección de feromona en *Drosophila* (Benton et al., 2007; Jin et al., 2008). La proteína SNMP2 fue descrita por primera vez en *M. sexta* y también se ha asociado con la percepción feromonal (Rogers et al., 2001a). En *S. exigua*, estas dos proteínas se han encontrado también expresadas en tejidos quimiosensoriales, localizadas en sensilas tricoideas pero también en basicónicas, por lo que podrían estar también implicadas en otros procesos de detección de moléculas odoríferas generales (Liu et al., 2014), al igual que en *A. polyphemus*, donde la SNMP1 además de expresarse en sensilas tricoideas de machos relacionadas con la captación de feromona también fueron halladas en sensilas basicónicas relacionadas con GOBPs en hembras (Rogers et al., 2001b).

En ambas especies se han identificado proteínas olfativas responsables del transporte y recepción de moléculas odoríferas, aunque éstas representan una pequeña parte del total de proteínas identificadas. Es posible que en este estudio no se hayan encontrado todas las proteínas implicadas en estos procesos en *G. molesta* y *T. absoluta* debido a su escasa presencia en las antenas de estas especies, o bien a la falta de bases de datos completas. Se hace necesario desarrollar estudios más exhaustivos para conocer la posible implicación en el proceso de la olfacción de las más de 1000 proteínas identificadas en cada una de las especies.

