

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de doctorado de Fisiología
Bienio 2005-2007

**IDENTIFICACIÓN DE FEROMONAS Y PROTEÍNAS
IMPLICADAS EN LA PERCEPCIÓN FEROMONAL DE
LEPIDÓPTEROS PLAGA**

Memoria presentada por Patricia Acín Viu
para optar al título de Doctor
con mención europea

Tesis realizada en el Departamento de Química Biológica y Modelización Molecular del
Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC) bajo la dirección de la Dra.
Carmen Quero López y la Dra. Glòria Rosell Pellisé

Directoras

Dra. Carmen Quero López
Dept. de Química Biológica y Modelización Molecular
ICAQ
CSIC

Dra. Glòria Rosell Pellisé
Dept. de Farmacología y Química Terapéutica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

Tutora

Dra. Isabel Navarro Álvarez
Dept. de Fisiología
Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Doctoranda

Patricia Acín Viu

3. MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

3.1. INSECTOS

A lo largo de esta tesis se han estudiado diversos aspectos de cinco especies del orden Lepidoptera, tres pertenecientes a la familia Noctuidae (*S. exigua*, *S. littoralis* y *S. nonagrioides*), una de la familia Castniidae (*P. archon*) y finalmente una especie de ropalócero incluida dentro de la familia Pieridae (*Pieris brassicae*). Las técnicas utilizadas en dicho estudio se encuentran detalladas a continuación.

3.2. ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LA ANTENA: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopía electrónica de barrido (*Scanning electron microscope*, SEM) permite obtener una imagen de la superficie de una muestra mediante el escaneo de la misma utilizando la transmisión de electrones a alta energía. Dichos electrones interactúan con los átomos que componen la muestra produciendo así señales, las cuales contienen información acerca de la topografía, composición así como otras propiedades de la superficie de la muestra. El modelo de microscopio utilizado para la captación de las diferentes imágenes de las antenas fue un Stereoscan 360 (Leica Instruments Ltd, Cambridge, UK). Se extrajeron un mínimo de dos antenas por sexo y especie y se depositaron sobre un soporte metálico fijado con un material adhesivo. Previamente a la captación de las imágenes, las muestras se cubrieron con oro. Este tratamiento es preciso para obtener una buena conductividad de la muestra para la transmisión de electrones así como para la mejora de la resolución y del contraste. Así pues, la gran profundidad del enfoque, la elevada resolución y la facilidad de preparación y observación de la muestra, convierte esta técnica en un instrumento de gran utilidad para el conocimiento de la morfología y estructuración de antenas de insectos.

3.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTENAL: ELECTROFISIOLOGÍA

La electrofisiología se define como el estudio de las señales eléctricas que se encuentran en los sistemas biológicos. Esta ciencia se divide en dos tipos, intracelular, cuando el registro se realiza en el interior de la célula y extracelular, cuando éste se lleva a cabo fuera de la célula, es decir, el electrodo de registro no llega a penetrar en esta última con lo que la señal obtenida es más pequeña. Las diferentes técnicas de electrofisiología empleadas a lo largo de esta tesis han sido de registro extracelular, las cuales son

suficientemente idóneas para obtener información acerca de la actividad de los receptores antenales frente a las diversas moléculas odoríferas utilizadas en los ensayos.

3.3.1. Electroantenograma

El electroantenograma (EAG) es una técnica de elevada efectividad para el estudio de moléculas odoríferas, mediante la cual se registra y cuantifica la respuesta bioeléctrica de la antena de un insecto frente a un estímulo de tipo químico, es decir, el sumatorio de los potenciales de recepción producidos por la despolarización de las células olfativas de la parte antenal estimulada. Para medir la diferencia de potencial, se cortan ambos extremos de la antena y se colocan en dos electrodos, uno de registro y otro de referencia, los cuales están conectados a un amplificador de alta impedancia que permite detectar diferencias de potencial que normalmente varían entre 0.1 y 10 mV⁴⁰.

Desde el desarrollo de esta técnica por Schneider⁶², el EAG se ha utilizado ampliamente en el estudio de los mecanismos olfativos de los insectos⁶³⁻⁶⁵ y en la caracterización de los componentes de feromonas sexuales y atrayentes sintéticos⁶⁶. Como se ha comentado con anterioridad, cuando una antena percibe un estímulo químico activo, se desencadena un proceso de intercambio iónico por parte de los receptores olfativos situados en las dendritas de las neuronas olfativas de las sensilas, con la generación posterior de una serie de potenciales de acción que transmiten la información de la molécula captada a los glomérulos antenales, los cuales se encuentran localizados en los lóbulos antenales del deutocerebro. La amplitud de la respuesta obtenida en EAG es proporcional a la concentración del estímulo aplicado, siendo ésta mayor cuanto más elevada es la concentración hasta que se alcanza un nivel de saturación de los receptores antenales.

Además de la concentración del estímulo, la amplitud de la respuesta antenal obtenida depende de varios factores como pueden ser la especie y el sexo. Generalmente la respuesta de machos de lepidópteros nocturnos es mayor que la mostrada en hembras. También influyen otros factores como la condición de la antena y la naturaleza del estímulo entre otros.

3.3.1.1. Descripción del equipo de EAG utilizado

El sistema que se encuentra en nuestro laboratorio posee un par de electrodos unidos (Figura 3.1), los cuales se encuentran ajustados a un amplificador (x 100) de alta

impedancia conectado a una interfase (Interface Data Acquisition Board, Type IDAC-1, Syntech, Kirchzarten, Alemania) conectada a su vez a un ordenador. El amplificador unido a los electrodos así como la fuente de estímulo se hallan protegido frente a cualquier señal eléctrica de origen externo mediante una caja de Faraday (70 x 65 x 60 cm). El ensamblaje de las distintas partes del equipo de EAG así como la caja de Faraday se encuentran conectados a la terminal de tierra del edificio.

La estimulación de la antena se lleva a cabo mediante un controlador de estímulos CS-01 de Syntech, al cual se halla conectado un pedal que permite generar los diferentes estímulos. Finalmente la adquisición de datos se realiza por ordenador mediante la interfase y el programa EAG 2.3 desarrollado por Syntech que permite la adquisición y análisis de las despolarizaciones obtenidas. Con posterioridad, distintas partes del equipo han sido sustituidas por otras más actualizadas a fin de mejorar la señal registrada. La interfase IDAC-1 se ha suplantado por una IDAC-2 para poder trabajar con una versión de software más moderna, lo cual ha conllevado a la consiguiente utilización de una nueva versión del programa utilizado con anterioridad, EAGPro igualmente desarrollado por la empresa Syntech. En la figura 3.2 se muestra un esquema de un sistema de EAG similar al encontrado en nuestro laboratorio.

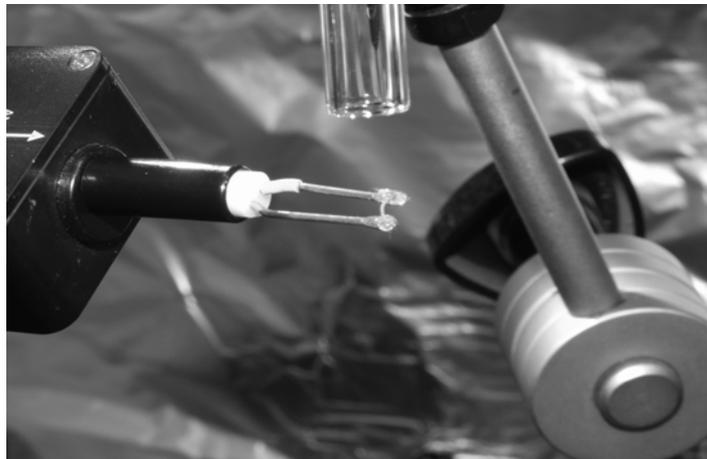


Figura 3.1. Detalle de los electrodos utilizados en los diferentes registros de EAG.

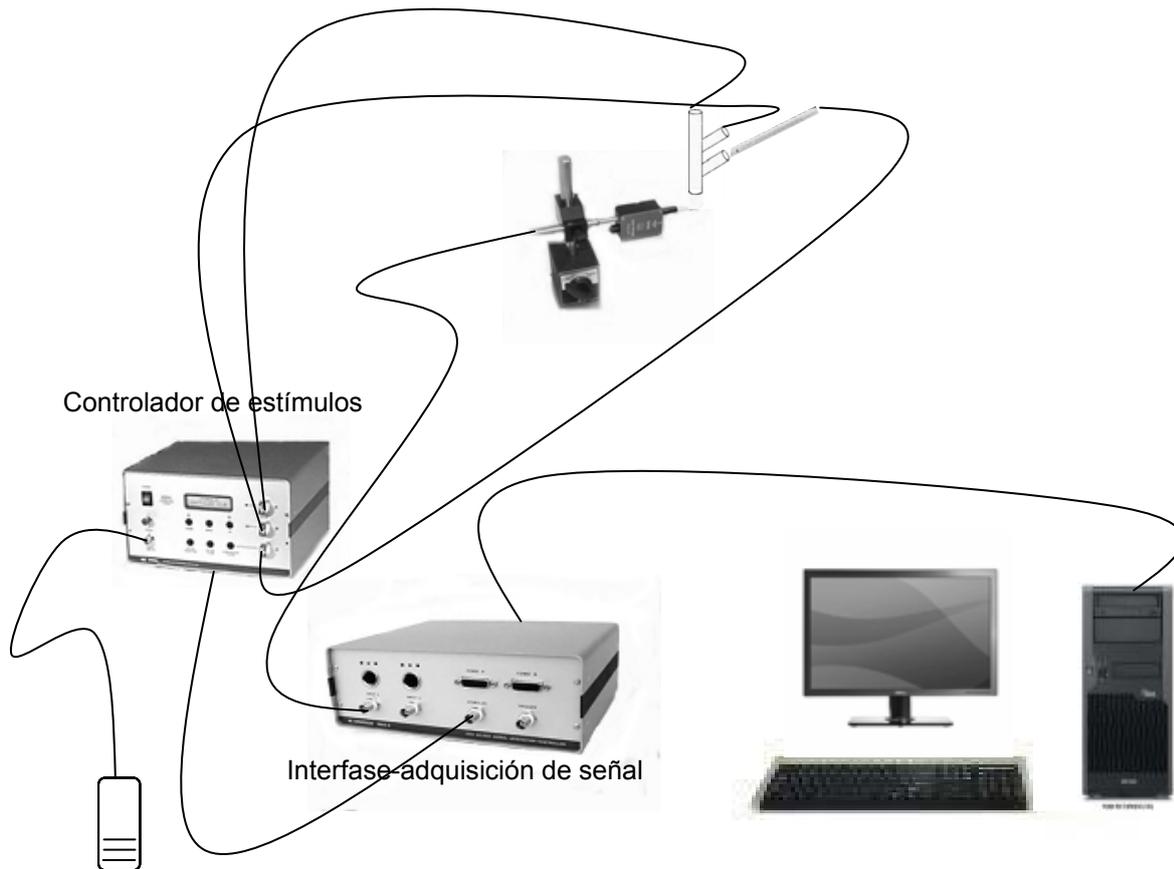


Figura 3.2. Esquema de un sistema de electroantenografía.

Los diferentes ensayos presentados a lo largo de esta tesis se han llevado a cabo mediante la utilización de la antena. La antena de un insecto previamente anestesiado con CO_2 se diseccionaba, se cortaban ambos extremos y se ponían en contacto con una solución conductora Spectra 360 (Parker Laboratories Inc., Hellendoorn, Países Bajos) a fin de evitar la desecación de la misma. Después, la antena se situaba en el electrodo colocado a una distancia de 0,5 cm de la fuente de estímulo. Como dispensador del agente estimulante empleado se utilizaba un tubo de vidrio con tres salidas (Figura 3.3), una conectada a una corriente de aire húmedo continuo a temperatura ambiente, otra a una corriente de aire complementaria para mantener constante el flujo de aire y finalmente el tercer orificio, localizado más próximo a la antena, donde se situaba la fuente de estímulo. Ésta se disponía en un trozo de papel de filtro (Whatman, Maidstone, UK) plegado a modo de abanico y tras la posterior evaporación del disolvente se introducía en una pipeta Pasteur. La duración de los estímulos aplicados era de 0,4 seg con un margen de al menos 40 seg entre estímulo a fin de favorecer la completa recuperación de los receptores antenales y evitar así su saturación. De manera previa se

estimulaba la antena con un blanco, en este caso hexano que fue el disolvente en el que se encontraban disueltos los diferentes compuestos feromonales así como los extractos utilizados. Para cada agente estimulante se hacían tres insufladas, a la media de las tres respuestas obtenidas se restaba la media de las tres respuestas obtenidas frente al blanco, obteniendo de esta manera una respuesta total frente al agente estimulante ensayado. Para el análisis estadístico se realizaba en primer lugar un análisis de la varianza de un factor seguido de una prueba F para analizar la homogeneidad de las varianzas y posteriormente se contrastaba con el test t de Student.

Para la completa eficacia de este sistema, los resultados adquiridos deben complementarse con alguna otra técnica de electrofisiología así como con un ensayo de tipo comportamental, como el túnel de viento que permite estudiar la capacidad de atracción de los compuestos probados en EAG y con ensayos de campo, que reafirman si el atrayente efectivo en túnel lo es también en condiciones medioambientales naturales.

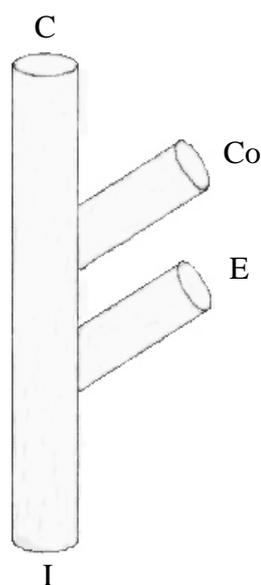


Figura 3.3. Esquema de un vidrio de tres salidas utilizado como dispensador del agente estimulante en EAG. C. Entrada conectada a una corriente de aire continuo. Co. Entrada conectada a una corriente de aire complementaria. E. Entrada donde se coloca la pipeta Pasteur que contiene la fuente de estímulo. I. Salida de aire hacia el insecto.

3.3.2. Cromatografía de gases acoplada a detección antenográfica (GC-EAD)

Esta técnica desarrollada originariamente por Moorhouse et al.⁶⁷, permite conocer qué compuestos de una muestra, como puede ser un extracto de glándula feromonal, provocan cierta actividad sobre la antena de un insecto. La cualidad principal de este

procedimiento es justamente la rápida localización de los compuestos que estimulan las sensilas olfativas de un insecto, descartando de esta forma aquellos compuestos que no tienen actividad biológica.

Un compuesto que provoque una actividad antenal no tiene por qué influir en el comportamiento, aunque la observación de una elevada intensidad de respuesta frente a un compuesto, indica una alta probabilidad de que influya de cierta manera en el comportamiento. Así pues, esta técnica permite dar una cierta prioridad a los compuestos a utilizar posteriormente en un ensayo comportamental.

El GC-EAD, como el nombre indica, consiste básicamente en la separación de una muestra por una parte hacia el detector del cromatógrafo de gases (GC) y por otra hacia el sistema de EAG. El GC permite la separación y determinación de la abundancia relativa de los compuestos hallados en una muestra, ya sea extracto feromonal o mezcla sintética, éstos, según su polaridad quedan más retenidos por la columna y salen a un tiempo de retención determinado, el cual es constante según las condiciones utilizadas; este parámetro permite posteriormente identificar los compuestos. Por otra parte, el EAG, como se ha comentado anteriormente, permite conocer cuales de estos compuestos estimulan la antena. La separación del efluente se realiza al final de la columna, donde parte se dirige al detector y parte va a parar a un dispositivo conectado a una corriente de aire continuo que es el que llega a la antena. El cambio de potencial que ocurre en la antena como consecuencia de la actividad de los diferentes compuestos pasa a un amplificador el cual lleva la señal amplificada a un ordenador. Con ayuda de un software especial se obtiene un registro de ambas señales. La observación de cambios de potencial de ambas partes de manera sincrónica, se traduce en la sensibilidad olfativa de un insecto frente a un compuesto con un tiempo de retención determinado.

3.3.2.1. Descripción del equipo utilizado

Del equipo utilizado a lo largo de los diferentes capítulos, la parte del EAG ha sido prácticamente la misma a lo largo del desarrollo de esta tesis salvo en última instancia que como comentado anteriormente fue ligeramente modificada. Por otro lado, la referente al cromatógrafo de gases en un principio se utilizó un Carlo Erba serie Vega modelo 6000 (Carlo Erba Instruments, Milan, Italia). Este cromatógrafo utilizaba hidrógeno como gas portador y el flujo de gases se debía regular manualmente. Para obtener una buena señal de registro el flujo de los gases se debían fijar a las siguientes condiciones: H₂ 60 KPa, Make up (N₂) 50 KPa, Aire 100 KPa, gas portador 130 KPa y

finalmente Make-up II (N₂) a 230 KPa. Este equipo se empleó para los primeros experimentos realizados con la especie *P. archon*, pero fue sustituido por otro modelo más actual, un Focus GC (Thermo-Instruments, Barcelona, España) con helio como gas portador y con todos los gases fijados de manera digitalizada, excepto el Make up II, que se estableció manualmente a 230 KPa. Ambos cromatógrafos se encuentran dotados de una válvula en el interior que permite regular la proporción de muestra hacia el detector del cromatógrafo y hacia el EAG. El detector en ambos cromatógrafos es un detector de ionización de llama (FID) el cual es sensible a todas las moléculas orgánicas. La columna utilizada en todos los casos fue una HP-5 (Agilent Technologies, Madrid, España) de 30 m x 0,25 mm i.d. y las ramas que conducen al FID y al EAG fueron de columna capilar de sílica fundida desactivada de 35 cm de longitud x 0,25 mm i.d. Para evitar problemas de condensación, el tubo capilar que se dirige al EAG, pasa por el interior de un tubo de cobre sobre el que se enrolla una resistencia térmica que permite calentarlo hasta una temperatura máxima de 230°C. Tras pasar por el tubo de cobre calentado, el capilar de sílica que va hacia el EAG, se inserta dentro de un tubo de vidrio de 5 x 2 cm. Por la parte superior de este tubo, se hace pasar una corriente de aire continua que lleva los compuestos eluyentes de la columna cromatográfica a la antena del insecto, colocada a una distancia mínima del vidrio a fin de conseguir la excitación del mayor número posible de receptores (Figura 3.4).

El tratamiento de datos se llevó a cabo originariamente a través del programa EAD 2000 (Syntech) que permite el registro simultáneo de dos canales, uno para el EAG y otro para el FID, pero sustituido con posterioridad por el EAD 2.3, que es una versión más actualizada.

El GC-EAD se ha convertido en una herramienta muy útil en estudios dirigidos a la identificación de nuevas feromonas de insectos y otros compuestos semioquímicos activos.

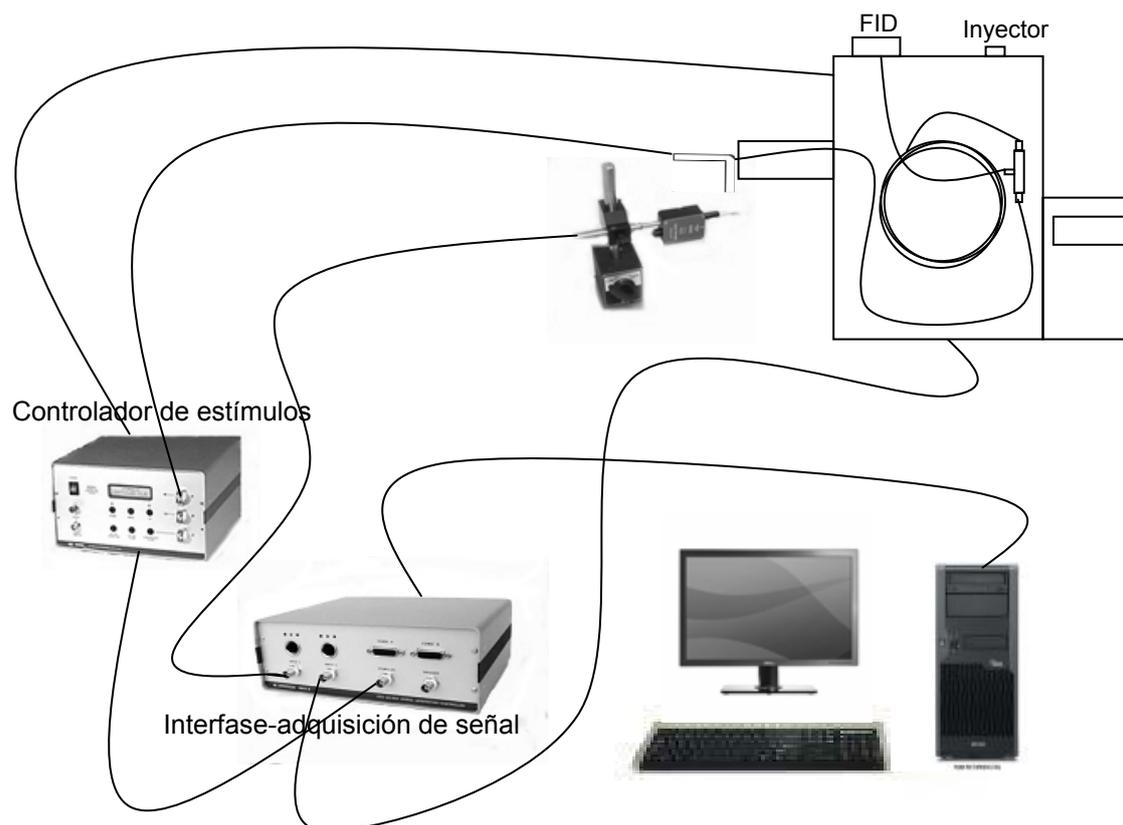


Figura 3.4. Esquema de un sistema de GC-EAG similar al instalado en nuestro laboratorio.

3.3.3. Registro en sensila única

La técnica de registro en sensila única (SSR) es similar al EAG pero en lugar de medir la suma de despolarizaciones de toda la antena, registra la actividad bioeléctrica de una única sensila olfativa, permitiendo así conocer cómo están organizados los receptores feromonales en las sensilas así como la abundancia de los mismos. Esta técnica ha sido de gran ayuda en la investigación en el ámbito de las feromonas, como la identificación de los compuestos feromonales^{68, 69} y de sus antagonistas naturales⁷⁰.

3.3.3.1. Descripción del equipo utilizado

Esta parte del trabajo se realizó en Alemania en el departamento de neuroetología del Max-Planck Institute of Chemical Ecology en Jena y se utilizó para estudiar los tipos de sensilas hallados en la especie *S. exigua*.

Para evitar vibraciones, los micromanipuladores donde se sujetaban los electrodos, la fuente de luz, la lupa binocular (Leica S8 APO) así como el soporte donde se colocaba el insecto se encontraban sobre una mesa neumática. A su vez, todo el equipo se hallaba

protegido de las señales eléctricas externas mediante una caja de Faraday. El equipo consistía en dos electrodos, uno de referencia y otro de registro, ambos de tungsteno. En nuestro caso se trabajó con el insecto entero a fin de obtener un registro más prolongado. Los machos utilizados se introdujeron en puntas de pipetas de 100-1000 μL y la cabeza se inmovilizó con cera dental, una vez fijada la punta sobre un portaobjetos mediante un poco de cera, la antena se fijó con goma ecológica Erkogum (Erkodent, Pfalzgrafenweiler, Alemania), de tal forma que se consiguió inmovilizar completamente la antena.

El electrodo de referencia se puso en contacto con el abdomen del insecto y el de registro en la base de la sensila. El extremo del electrodo de registro se afiló para atravesar la base de la sensila y realizar así el registro de las neuronas halladas en ella. Para afilar los electrodos se introdujeron en un sistema de Syntech que contenía una solución de KNO_2 y a la que se aplicó una corriente de 7 V. El grado de afilamiento de la punta se controló mediante una lupa binocular y una vez afilado el electrodo de registro se dirigió con ayuda de un micromanipulador hasta establecer contacto con la base de la sensila. Para confirmar el establecimiento de un contacto se utilizaron unos altavoces conectados al amplificador que permitían discernir entre un contacto con la base sensilar y el ruido de fondo. Este contacto se traduce en una secuencia repetitiva de sonidos, a modo de latidos, correspondientes a los potenciales de acción asociados a la actividad espontánea de las células sensoriales de la sensila.

La antena se mantuvo en contacto con un flujo de aire continuo. La duración del estímulo aplicado fue de 1 seg con un margen de aproximadamente 0,4 min entre estímulo. Cada uno de los agentes estimulantes utilizados se dispuso en un papel de filtro (Whatman) introducido en una pipeta Pasteur.

Los datos se registraron y analizaron mediante el programa Autospike 3.7 de Syntech.

3.4. TÚNEL DE VIENTO

En el estudio de las feromonas no sólo es suficiente la identificación de los compuestos que constituyen la mezcla feromonal y la determinación de la actividad de los mismos, sino que es necesario el estudio de la capacidad de atracción de los distintos componentes feromonales. Estos compuestos son emitidos en una determinada proporción que induce un comportamiento específico en los machos receptores. En polillas macho la captación de varias moléculas de feromona desencadena una serie de pautas de comportamiento sucesivos, como son el enderezamiento de la antenas y vibración de las alas, que confirma la actividad de las moléculas captadas, vuelo en zigzag contra el viento, a modo de orientación a lo largo de la pluma feromonal, aproximación a la fuente de atracción y evaginación de los penachos de sedas situados en las valvas del final del abdomen que finaliza con los intentos de cópula.

Desde la percepción de la mezcla feromonal hasta el desencadenamiento de la respuesta comportamental, el mensaje feromonal debe ser interpretado y traducido en una respuesta motora. Durante la orientación hasta la fuente feromonal, el macho es capaz de discernir diferentes concentraciones de feromona. Aumentos de la concentración de feromona son codificados como valores crecientes de potenciales de acción que se dirigen hacia el cerebro³⁶. Finalmente el sistema nervioso central es el encargado de integrar el patrón de potenciales de acción para poder así identificar el olor percibido.

Para realizar dicho estudio en condiciones de laboratorio se utiliza el túnel de viento, el cual es un modelo físico del ambiente en el que la feromona es transportada por una corriente de aire formando una traza que se ensancha por turbulencia y difusión a medida que avanza la corriente⁷¹. La ventaja principal de este sistema es que se pueden realizar diversos ensayos de manera continua a lo largo del tiempo sin depender de las variaciones climáticas. Así mismo, las condiciones de humedad, temperatura y velocidad del aire pueden ser reproducidos día a día, sin encontrar una variación diaria en los resultados, a diferencia de lo que ocurre con las pruebas de campo.

El modelo de túnel de viento que se encuentra en las instalaciones del CSIC es de vidrio con forma rectangular (180 cm de longitud x 55 cm de anchura x 50 cm de altura). Dispone de un ventilador en un extremo que recoge aire de la cámara que pasa a través de un filtro de lana de vidrio y lo impulsa hacia el túnel y en el otro hay un extractor que conduce el aire contaminado al exterior. Las pantallas regulan las turbulencias del aire permitiendo un régimen laminar. Al interior del túnel se accede mediante dos puertas correderas. Tanto la velocidad del ventilador, como la del extractor se encuentran

reguladas de forma simultánea por un reostato controlado manualmente. En el extremo cercano al ventilador se pone la fuente de atracción y en el extremo opuesto el soporte donde se sitúan los insectos para que inicien la salida. En un lateral se encuentra un tubo fluorescente de luz roja de 58 W envuelto a su vez de varias láminas de papel de filtro para reducir la intensidad de la luz. En la figura 3.5 se observa un esquema de este modelo.

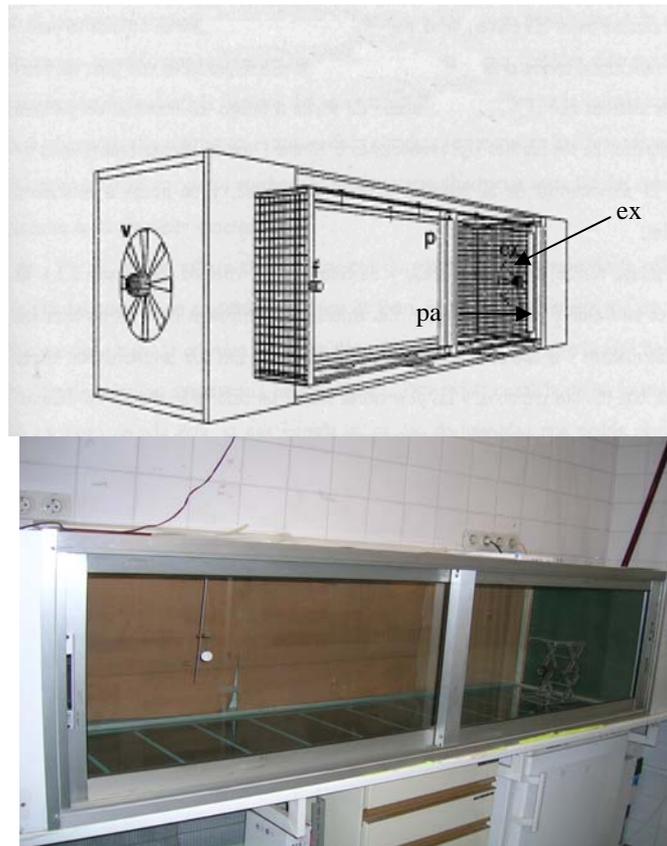


Figura 3.5. Esquema de un túnel de viento (v: ventilador, f: filtro de lana de vidrio, p: puertas correderas, ex: extractor, pa: pantalla). Abajo foto del túnel de viento instalado en el laboratorio.

En todos los ensayos, la velocidad del viento fue fijada a alrededor de 20 cm/seg y una intensidad luminosa de 1 lux, para medir este parámetro se utilizó un luxómetro (PANLUX electronic 2 7905-1007Y0). La temperatura media fue de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa $43\pm 10\%$.

Previamente a la ejecución de los ensayos, en el caso de que el túnel no haya sido utilizado durante un periodo de tiempo prolongado, debe procederse a la limpieza del mismo con el fin de evitar contaminaciones. Para ello se utiliza alcohol al 70% en el caso de las paredes, soporte donde se sitúan los insectos, las cajas donde se disponen las hembras o la fuente de atracción. Para el lavado de los filtros de las pantallas situadas en

el conducto entre el ventilador y el túnel se realiza un baño con una solución jabonosa seguido de varios lavados con agua hasta la completa desaparición de restos de jabón. Este proceso de limpieza de filtros se debe realizar cada mes para evitar posibles contaminaciones debido al empleo continuado de feromonas. Igualmente, tras la finalización de las diferentes pruebas, se procede a la limpieza de todo el sistema también con alcohol al 70% y se deja circular una corriente de aire durante media hora con el fin de evitar una posible contaminación del sistema.

El comportamiento de los insectos frente a la liberación de feromona o la respuesta frente a la misma se encuentra regulado por vía neural y hormonal. Así pues, una polilla hembra libera feromona en un tiempo determinado durante la escotofase, periodo que suele coincidir con el periodo de máxima respuesta por parte del macho. Si un macho es sometido a una composición y concentración óptima de feromona fuera del periodo de emisión no se apreciará respuesta alguna en cuanto a inducción de vuelo se refiere o ésta se verá muy disminuída. Por esta razón los ensayos de túnel de viento deben realizarse en el periodo de tiempo donde la hembra realiza el comportamiento de llamada.

3.5. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS ANTENALES MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS

La proteómica es la ciencia que se encarga del estudio del proteoma, entendiendo éste como el conjunto de proteínas que se expresan en una célula, tejido, organismo o fluido biológico en un momento determinado bajo unas condiciones específicas. Las proteínas no sólo pueden sufrir diferentes modificaciones postraduccionales sino que a su vez, el nivel de expresión puede variar en función de varios parámetros como cambios en el entorno o el estado fisiológico celular entre otros.

El consiguiente estudio del proteoma requiere del uso de varias técnicas que permitan separar, cuantificar, identificar y caracterizar las proteínas (Figura 3.6). A lo largo de esta tesis se han utilizado diferentes técnicas proteómicas explicadas a continuación.

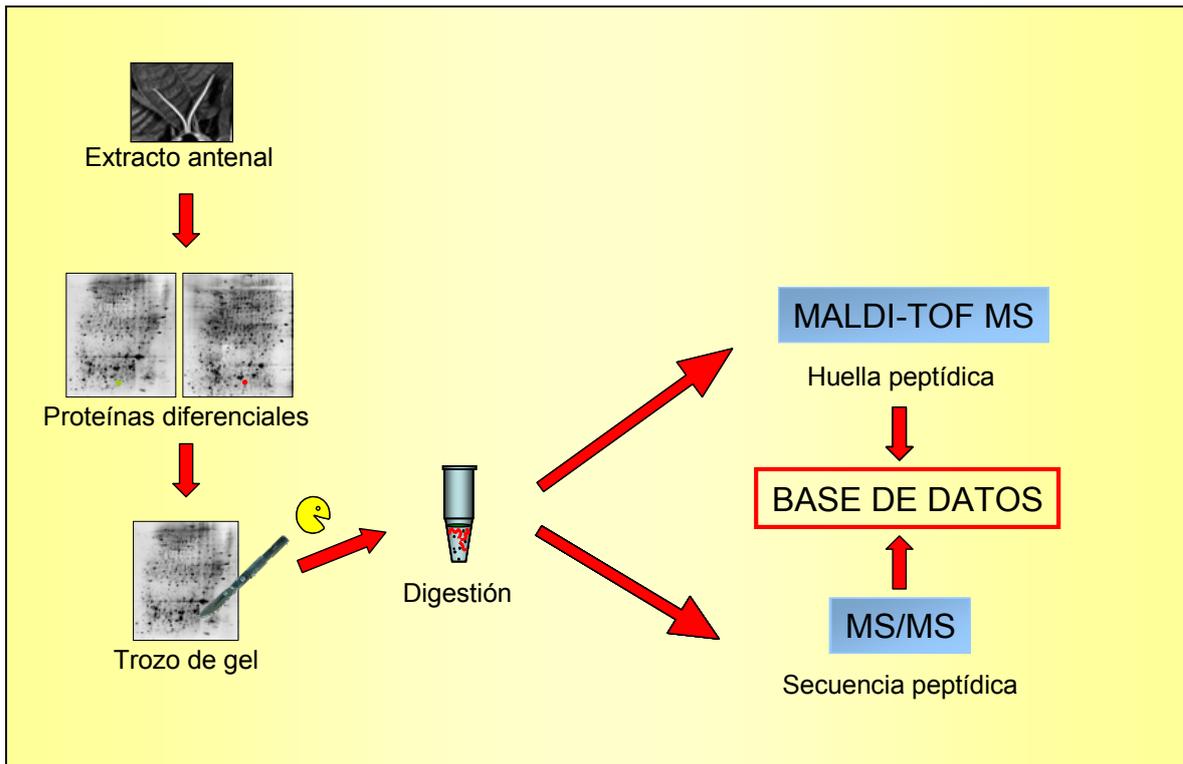


Figura 3.6. Esquema del procedimiento básico seguido para el análisis de las proteínas antenales.

3.5.1. Electroforesis bidimensional

La utilización de la electroforesis bidimensional permite el análisis de mezclas proteicas complejas. Mediante esta técnica las proteínas se separan primeramente en base a su carga mediante isoelectroenfoque (IEF) y posteriormente en función de su tamaño molecular mediante electroforesis en geles de acrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Ambas técnicas combinadas permiten detectar una gran cantidad de proteínas pudiendo llegar a resolver más de 10000 especies proteicas⁷².

3.5.1.1. Preparación de la muestra

Una separación electroforética bidimensional útil, reproducible e interpretable depende de una preparación óptima de la muestra a analizar. La separación electroforética requiere que las proteínas a separar se encuentren en solución durante todo el procedimiento. Por ello se utilizan varios agentes en la preparación de la muestra y tampones de electroforesis a fin de asegurar la solubilidad de las proteínas⁷³.

3.5.1.1.1. Procedimiento utilizado

Para realizar la extracción de las antenas, se utilizó CO₂ con el fin de anestesiarse a los insectos y unas pinzas finas para quitarlas. Una vez extraídas, las antenas se depositaron en viales eppendorf de 1,5 mL introducidos en un Deware con nieve carbónica para evitar la degradación de las proteínas. Una vez finalizado el proceso de extracción, los viales se conservaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

En la elaboración de los extractos antenales, se utilizaron generalmente 30 antenas homogeneizadas en 300 µL de tampón de lisis para los geles de 7 cm y 60 antenas en 600 µL de tampón para los de 18 cm. Dicho tampón de extracción contenía una mezcla de urea 7 M, tiourea 2 M, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]1-propano (CHAPS) 4% (w/v), Tris-base 40 mM y ditiotreitól (DTT) 10 mM. La urea y la tiourea son agentes caotrópicos neutrales que desnaturalizan las proteínas, el CHAPS es un detergente que favorece la solubilización de la muestra y previene la agregación de las proteínas y el DTT es un agente reductor que mantiene la proteína en estado reducido. Esta mezcla de compuestos es necesaria para mantener a las proteínas completamente desnaturalizadas, de manera que se encuentren solubilizadas y disgregadas para así favorecer la migración de las mismas a lo largo de la electroforesis.

Las antenas se homogeneizaron en el tampón de extracción con la ayuda de un homogeneizador RZR-2000 (Heidolph, Kelheim, Alemania) durante 10 min. Posteriormente el homogeneizado se sometió a vibraciones ultrasónicas en un sonicador Labsonic 1510 (B. Braun, Melsungen, Alemania) a 40 W durante 12 seg con el fin de favorecer la extracción, disgregación y solubilización de las proteínas, ya que la sonicación es un método de disrupción celular muy vigoroso en el que, mediante la acción de ondas sonoras de alta frecuencia, ocasiona la ruptura de las membranas celulares. Finalmente los diferentes extractos se centrifugaron a 4°C con una velocidad de 11000 rpm durante 15 min en una primera centrifugación y 10 min en una segunda para eliminar completamente el residuo. El sobrenadante resultante de ambas centrifugaciones se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

3.5.1.2. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de la cantidad de proteína total en los extractos se utilizó el kit RC-DC protein assay (Bio-Rad, Madrid, España), procedimiento colorimétrico basado en el método de cuantificación de Lowry, que tiene una mayor sensibilidad que el ampliamente utilizado Bradford⁷⁴. Este método colorimétrico es compatible con la presencia de detergentes y agentes reductores, está basado en la determinación de los cambios de

absorbancia ocasionados por la reacción de las proteínas con varios reactivos que forman un complejo coloreado con las mismas. Este método consta básicamente de dos etapas; en la primera la concentración proteica se deja en contacto con una disolución de sales de cobre, los iones cobre en un pH > 7, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Así mismo ocasionan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína dejando expuestos los residuos de tirosina los cuales son oxidados en una segunda etapa. En esta segunda fase, se añade el reactivo de Folin a la proteína tratada con cobre, este reactivo de color amarillo, una vez reducido por los grupos fenólicos de la proteína da lugar a un complejo de color azul intenso⁷⁵. La intensidad de color resultante en la dilución es proporcional a la concentración de proteínas encontrada en la disolución.

Todas las muestras se cuantificaron por triplicado y se realizaron dos curvas patrón, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 4 mg/mL como proteína estándar, con un mínimo de cinco puntos de manera que la concentración de proteína resultante fuera de una fiabilidad elevada. La concentración de la muestra a cuantificar se determinó mediante interpolación de los valores en la curva patrón. La medición de las variaciones de absorbancia se realizó en un lector de placas Spectra maxplus 360 (Molecular Devices, California, USA) con una longitud de onda de 650 nm.

3.5.1.3. Primera dimensión

Durante la primera dimensión las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico. Las proteínas son moléculas anfotéricas, es decir poseen carga neta positiva, negativa o igual a cero dependiendo del pH de su entorno. El punto isoeléctrico es el pH específico donde la carga neta de la proteína es cero. Entendiendo como carga neta el sumatorio de todas las cargas positivas y negativas de los aminoácidos de una proteína así como los grupos carboxi y amino terminales. Así pues, durante el isoelectroenfoque las proteínas se mueven hacia el electrodo de signo contrario a su carga neta bajo la influencia de un campo eléctrico, hasta que llegan a un punto del pH donde la carga neta es cero. Para esta primera dimensión se utilizan tiras comerciales de poliacrilamida con inmobilinas, esto es, con un gradiente de pH inmovilizado de forma covalente, desarrollado por Görg y col.⁷⁶, de diferente tamaño y pH en función de las proteínas que se desean estudiar. Las tiras utilizadas en primer lugar fueron de 7 cm y pH 3-10 y 3-11 NL (no lineal) para la puesta a punto de la técnica y posteriormente de 18 cm, a dos pHs diferentes, 3-10 para tener una visión global de las proteínas expresadas y de 4-7 para hacer un estudio más detallado de las proteínas expresadas en ese rango.

3.5.1.3.1. Procedimiento utilizado

La primera etapa del isoelectroenfoque consiste en la rehidratación de las tiras. En todos los casos, la muestra se carga junto al tampón de rehidratación (TR), consistente en nuestro caso de una mezcla de urea 8 M, CHAPS 2% (w/v), immobilinas del mismo rango de pH que la tira a enfocar y azul de bromofenol, solución que permite mantener a las proteínas reducidas y desnaturalizadas. A su vez, a este tampón se le añadió DTT 5 mM y 200 mM de HED (DeStreak®, GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La cantidad de proteína cargada en los geles de 7 cm fue de 10-20 µg, diluidos con tampón de rehidratación hasta un volumen de 125 µL. En las de 18 cm, se cargaron 100 µg de proteína disueltos en 350 µL de tampón de rehidratación. Una vez disuelta la muestra proteica con el tampón de rehidratación se pasó a cargar los sarcófagos, recipientes donde se depositan las tiras de acrilamida y se ponen en contacto con la muestra para la primera dimensión. Para evitar la desecación de la tira, evaporación de la muestra y consiguiente precipitación de la urea, se aplicó aproximadamente 1,2 mL de aceite mineral (IPG cover, GE Healthcare) encima de la tira. Posteriormente cada uno de los sarcófagos se dispuso en el sistema de IEF.

La etapa del isoelectroenfoque se realizó en un EttanIPGphor III (GE Healthcare) (Figura 3.7) y para enfocar las proteínas durante este paso se utilizaron dos programas, uno para las tiras de 7 cm y otro para las de 18 cm, en el primer caso, las tiras se rehidrataron durante 6 h, posteriormente el voltaje se subió a 30 V por 6 h, luego a 500 V durante 1 h, 1000 V 1 h y finalmente a 5000 V hasta alcanzar 20 KV, momentó en que se paró el IEF, todas las etapas se realizaron en modo Step-n-hold. Por otro lado, el programa utilizado para las tiras de 18 cm fue: 50 V durante 10 h (modo Step-n-hold), 500 V por 1,30 h, subida a 1000 V durante 1,30 h, posteriormente 1,30 h a 2000 V, 1,30 h a 4000 V, 2 h a 8000 V, todos estos pasos en modo Gradient y finalmente en modo Step-n-hold a 8000 V hasta que las tiras habían alcanzado un voltaje total de 50 KV. Posteriormente se dejaron las tiras a -80°C hasta el momento de llevar a cabo la segunda dimensión.



Figura 3.7. Equipo de IPGPhor utilizado para realizar la primera dimensión (IEF).

3.5.1.4. Segunda dimensión

Las tiras se equilibraron en un tampón compuesto de urea 6 M, Tris-HCl 50 mM, SDS 2% (v/v), glicerol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (w/v) antes de ponerlas en contacto con los geles para realizar la electroforesis SDS-PAGE. Durante los primeros 15 min el volumen de tampón utilizado fue de 5 mL con un 1% (w/v) de DTT, que mantiene a las proteínas reducidas; pasado este tiempo, se pusieron en contacto con la misma solución de equilibrado pero con 2,5% (w/v) de iodoacetamida (IAA) también durante 15 min. La IAA además de alquilar el exceso de DTT, alquila los grupos tiol de las proteínas evitando así su reoxidación durante la electroforesis, el resultado de dicha acción es la reducción de artefactos que pueden surgir durante el proceso de revelado. Así como en los geles donde se realiza la segunda dimensión como en la solución de equilibrado hay que resaltar la presencia de SDS, el cual, forma un complejo SDS-proteína con carga negativa, permitiendo de esta forma, que la proteína migre en función de su tamaño y no de su carga. Al lado de cada tira se dispuso un trocito de papel de filtro Whatman con 3 μ L de una mezcla de marcadores moleculares (Unstained Protein Standards, Bio-Rad) y se colocaron en contacto con el gel utilizando una aguja para tal fin, que a su vez permitió eliminar las posibles burbujas formadas por debajo de la tira y que pudieran ocasionar ruido de fondo en el proceso de velado de los geles. Para favorecer el contacto de la tira y el gel y facilitar así la migración de la primera a la segunda dimensión, una vez depositada la tira en el gel se añadió alrededor de 1 mL de agarosa al 0,5% (w/v).

La segunda dimensión se realizó en el sistema de electroforesis Mini- protean 3 (Bio-Rad) para los geles de 7 cm y en un EttanDalt Six de GE Healthcare (Figura 3.8) para los geles

de 18 cm. Los geles se polimerizaron generalmente al 12,5% de acrilamida. Además del SDS, los geles contenían agua milliQ, Duracryl, (combinación de acrilamida/bisacrilamida al 30% y 0,8% (w/v) respectivamente) y tampón de resolución (Tris-HCl a un pH 8,8). Para iniciar la polimerización se utilizó persulfato de amonio (APS) junto al catalizador tetrametiletilendiamina (TEMED). El programa utilizado en la segunda dimensión fue diferente según el tamaño del gel, los de 7 cm a 30 V durante 20 min y 100 V durante 1:30 h y los de 18 cm, 2,5 W/gel durante 20 min y después a 17 W/gel durante 5 h.

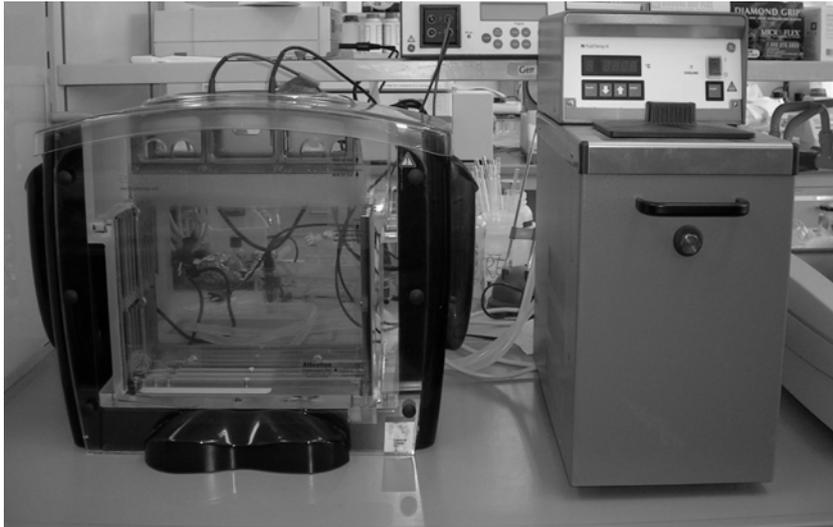


Figura 3.8. Sistema de EttanDalt Six utilizado para la segunda dimensión (SDS-PAGE) de los geles de 18 cm.

3.5.1.5. Tinción

Para la visualización de las proteínas separadas el método de revelado utilizado fue la tinción con plata según Shevchenko y col.⁷⁷ ligeramente modificado, el cual es compatible con espectrometría de masas y de elevada sensibilidad, puesto que permite detectar hasta 1 ng de proteína en el gel.

Este método de tinción consta básicamente de cuatro pasos:

- Fijación, en esta etapa se fijan las proteínas y se eliminan los compuestos que puedan interferir posteriormente.
- Sensibilización, los diferentes reactivos de la solución utilizada se unen a las proteínas y en la etapa posterior se unen a los iones plata.
- Tinción, los geles se impregnan con nitrato de plata.
- Velado, aquí, la plata que se ha unido a las proteínas se reduce a plata metálica.

Para proceder a la tinción, una vez acabada la segunda dimensión, los geles se introdujeron en unas placas (25 x 25 cm) con 200 mL de una solución fijadora, compuesta por 40% (v/v) de etanol y 10% (v/v) de ácido acético durante aproximadamente 12 h a 6°C. Posteriormente con el fin de aumentar la sensibilización de los geles, éstos se pusieron en contacto durante 30 min con 200 mL de otra solución que contenía etanol 30% (v/v), tiosulfato sódico pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,2% (w/v) y acetato sódico ($\text{Na}_2\text{H}_3\text{C}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 6,8% (w/v). Una vez lavados los diferentes geles unas tres veces con agua milliQ con el fin de eliminar cualquier resto de los reactivos anteriores, se procedió a la tinción. Para ello los geles se pusieron en contacto con nitrato de plata diluido 2,5% (w/v) por un periodo de tiempo de 20 min. Tras los cuales y después de dos lavados con agua MilliQ de un minuto de duración, se revelaron con una solución de carbonato sódico 2,5% (w/v) y formaldehído 37% (w/v). La reacción de velado se paró con una dilución de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5% (w/v) durante 10 min, transcurridos los cuales se realizaron tres lavados con agua MilliQ de 5 min cada uno.

3.5.1.6. Análisis de imagen

Para el escaneo de los geles se utilizó un escáner ImageScanner II Desktop (Amersham Biosciences), el análisis diferencial de las imágenes obtenidas se llevó a cabo mediante el software Platinum Image Master (GE Healthcare), el cual permite la detección de las diferentes manchas así como la comparación entre todas ellas. De manera previa, las imágenes de los geles objeto de estudio se recortaron de una manera homogénea, de forma que todas ellas tuvieran el mismo tamaño así como que cubrieran la misma región del gel. Realizada la detección de las distintas manchas, se seleccionó el gel con un mayor número de manchas detectadas como gel de referencia, el cual, permitió la comparación posterior con el resto de geles para observar así la presencia o ausencia de una mancha o el aumento o disminución de la misma. Este análisis se realizó dos veces, considerando en primer lugar como gel de referencia el gel del sexo con la cantidad de manchas más elevada y con posterioridad tomando como referencia otro gel del sexo contrario, así mismo con el mayor número de manchas detectadas. Se midió y comparó el volumen normalizado de cada mancha en cada gel, con el volumen relativo de esa mancha en el resto de geles, de este modo, se pudo determinar las proteínas que se expresaban de forma diferencial. Para determinar si el cambio relativo era estadísticamente significativo se realizó un test de dos colas t de Student ($P < 0,05$). Este análisis se reevaluó de manera visual.

3.5.2. Digestión de las manchas proteicas

Previamente a la digestión de las manchas, los geles se lavaron tres veces con agua MilliQ. Las manchas consideradas de interés, se recortaron manualmente en una campana de flujo laminar vertical con ayuda de un bisturí y se depositaron en una placa de digestión de 96 pocillos (MSD-Proteomics). Para llevar a cabo tal proceso, se utilizó tripsina (Promega, Wisconsin, USA) como endoproteasa. La digestión se realizó mediante un digestor automático (Digest MSPro, Intalvis, Koeln, Alemania), en el cual en un primer paso, las manchas troceadas se lavaron dos veces con bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 25 mM pH 8, posteriormente se realizaron tres lavados con acetonitrilo (ACN). Tras la deshidratación de los trozos mediante el ACN, las proteínas se redujeron con DTT 10 mM en NH_4HCO_3 25 mM durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez reducidas las cisteínas se carbamidometilaron con IAA 55 mM en NH_4HCO_3 25 mM mediante 30 min también a temperatura ambiente en oscuridad. Tras un lavado con NH_4HCO_3 25 mM y tres con ACN se añadió tripsina 50 ng/ μL , proceso realizado a 4°C durante 45 min, pasados los cuales se eliminaron los restos de tripsina no absorbida y los trocitos de gel se recubrieron con NH_4HCO_3 25 mM. La digestión tuvo lugar a una temperatura de 30°C por un periodo aproximado de 16 h. Para la extracción de los péptidos resultantes de la digestión se realizaron tres lavados con ACN/ H_2O 1/1 v/v 0,25% (v/v) trifluoroacético (TFA) y tres lavados posteriores con ACN. Un volumen de 0,5 μL del extracto obtenido en el primer lavado se cargó en la placa de MALDI. El resto del extracto se guardó a -80°C para su análisis posterior. En los casos en que las proteínas de este primer extracto no pudieron ser identificadas, el resto del extracto almacenado a baja temperatura se evaporó a sequedad y se resolubilizó con 5 μL de MeOH/ H_2O 1:2 y 0,1% TFA (v/v), cargando 0,5 μL de esta disolución en la placa MALDI para un segundo análisis.

3.5.3. Espectrometría de masas

La posterior identificación de las proteínas separadas en los geles se realiza mediante espectrometría de masas (MS)⁷⁸. La MS mide la relación masa-carga de las partículas cargadas permitiendo de esta manera, determinar la abundancia así como el peso molecular de los componentes de una muestra.

Un espectrómetro de masas está constituido por tres partes: la fuente de ionización, el analizador y finalmente el detector. La muestra a analizar es introducida en la fuente de ionización donde se ionizan los componentes de la muestra. Estos iones posteriormente son transferidos por medio de campos eléctricos o magnéticos al analizador donde son

acelerados y separados según su relación masa/carga. Existen diferentes tipos de analizadores, los cuales podríamos dividirlos en cuatro grupos: de tiempo de vuelo (TOF), de resonancia ciclotrónica (ICR), de cuadrupolo (Q) y trampas iónicas (IT).

TOF: Este tipo de analizador utiliza un campo eléctrico para acelerar a los iones y posteriormente mide el tiempo que tardan en llegar al detector. La velocidad de las partículas depende sólo de la masa ya que todas tienen la misma carga.

ICR: Los iones son excitados por un campo eléctrico con frecuencias de radio hasta que impactan en la pared de la trampa donde se localiza el detector. Los iones con diferente masa se determinan según el tiempo de impacto.

Q: Estos analizadores utilizan campos eléctricos oscilantes para estabilizar o desestabilizar en su caso los iones que pasan a través de un campo cuadrupolo de radio frecuencia.

IT: Los iones formados quedan atrapados y posteriormente lanzados en función de su masa/carga.

3.5.3.1. Mapeo peptídico

El método más sencillo para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas es el mapeo de masas peptídico (*Peptide Mass Fingerprinting*, PMF). Las manchas del gel son recortadas y digeridas con una endoproteasa, generalmente se utiliza tripsina, este enzima corta por los aminoácidos lisina y arginina y permite obtener una colección de péptidos de digestión de aquella proteína recortada. La masa molecular de estos péptidos se determina por MS mediante la cual se obtiene una lista de masas denominada huella peptídica.

La utilización de programas de búsqueda, permiten comparar la impronta peptídica obtenida, la cual es característica para cada proteína, con imprentas virtuales almacenadas en bases de datos, como SwissProt, NCBI y muchas otras. Como resultado final de esta comparación es la obtención de un listado de posibles proteínas ordenadas de acuerdo al nivel de identidad encontrado.

La técnica de MS comúnmente utilizada para la identificación de esta impronta peptídica es la desorción por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight*, MALDI-TOF). Esta técnica presenta un límite de detección de más de 300 KDa. Aquí, los péptidos cocrystalizados con una matriz apropiada son convertidos en iones mediante la acción de un láser en el que los

iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico.

3.5.3.1.1. Procedimiento utilizado

La endoproteasa utilizada para la digestión de las manchas diferenciales fue tripsina, posteriormente, se empleó un MALDI-TOF MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Barcelona, España) en modo reflector positivo, para realizar el análisis del extracto peptídico resultante. Para ello, se cargaron en una placa MALDI de 96 x 2 pocillos (Vogayer, Applied Biosystems) (Figura 3.9), de acero inoxidable y cubierta con teflón, un volumen de 0,5 μL de extracto peptídico mezclada con 0,5 μL de matriz α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo/ H_2O 2:1 más 0,1% (v/v) TFA. Esta matriz no sólo protege a los péptidos de ser degradados sino también favorece la vaporización e ionización de los mismos. Los espectros se calibraron externamente mediante la utilización de una mezcla estándar (des-Arg1-bradiquinina [Mr 904,46], Glu1-fibrinopéptido B [Mr 1570,68], angiotensina-1 [Mr 1296,69], hormona adrenocorticotrópica (ACTH) 1-17 [Mr 2093,09], ACTH 18-39 [Mr 2465,20] y ACTH 7-38 [Mr 3657,93] y, cuando fue posible, se realizó igualmente una calibración interna utilizando los iones derivados de la autodigestión de la tripsina (842,51; 1045,56; 2211,10).



Figura 3.9. Imagen de una placa MALDI-TOF Voyager 96 x 2.

El análisis de datos se llevó a cabo mediante el programa MS-FIT del software Protein Prospector (UCSF Mass Spectrometry Facility, University of California) y las bases de datos utilizadas fueron Swiss-Prot (Swiss Institute of Bioinformatics, Ginebra, Suiza) y NCBIInr (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA).

3.5.3.2. Secuenciación de péptidos

El mapeo peptídico por MALDI-TOF es una técnica muy rápida a la vez de sencilla, pero presenta varias limitaciones, así pues, no se puede llegar a la identificación de proteínas que no se encuentren en la base de datos. Es por ello, que en los casos en los que no se puede identificar la proteína mediante mapeo peptídico pero se detectan señales en el espectro de MALDI-TOF, se ha de recurrir a la secuenciación de uno o más de los péptidos de digestión de la proteína mediante técnicas de espectrometría de masas en tándem⁷⁹ (MS/MS). En nuestro caso se utilizaron dos equipos de MS, un espectrómetro de masas con trampa iónica lineal LCQ (Thermo-Instruments), ESI-MS/MS, equipado con una interfase de nanospray (Protana, Odense, Dinamarca), donde el voltaje aplicado fue de 0,85 KV y la temperatura del capilar 110°C. Este equipo se utilizó para la identificación de las proteínas de la especie *S. nonagrioides*. Para el resto de especies estudiadas el equipo de MS utilizado fue un LC-MS/MS (LTQ, Thermo Instruments) con una trampa iónica lineal y una fase de nanospray situada en el interior del sistema.

Para la identificación de las secuencias peptídicas mediante ESI-MS/MS, se utilizó el programa MS Tag del software Protein Prospector, las secuencias de péptidos obtenidas mediante este programa se confirmaron manualmente y en algunos casos se sometieron a una búsqueda por homología mediante la utilización del software FASTA (Dr. W. R. Pearson, University of Virginia, USA), las bases de datos utilizadas en la búsqueda fueron SwissProt y NCBI. Cuando el equipo utilizado fue un LC-MS/MS se utilizó el programa PEAKS, el cual permite identificar secuencias de novo mediante una búsqueda en la base de datos. Para facilitar la búsqueda se utilizaron las secuencias de péptidos en conjunción con los fragmentos de iones apareados, lo cual permitió eliminar apareamientos de falsos positivos así como encontrar variaciones de secuencia o modificaciones que facilitaron la identificación. Posteriormente, todas las secuencias de péptidos obtenidas mediante este programa se introdujeron en un programa de búsqueda llamado BLAST (*Basic Linear Alignment Search Tool*) utilizando como base de datos, SwissProt para la identificación de las proteínas a la cual pertenecían las secuencias.