

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

5. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS ANTENALES DE TRES ESPECIES DE NOCTUIDOS

5.1. INTRODUCCIÓN

La olfacción en lepidópteros es de crucial importancia para la supervivencia de la especie, de ella depende la capacidad de localizar y encontrar la pareja conespecífica gracias a la captación de moléculas de feromona, así como la percepción de un lugar adecuado para la oviposición y alimentación de la futura progenie mediante la recepción de volátiles de la planta hospedadora.

La detección de las partículas olorosas que entran en la antena necesita de la presencia de tres tipos de proteínas: los receptores odoríferos (ORs), las proteínas de unión a la molécula de olor (OBPs) y los enzimas encargados de la degradación de dichas moléculas (ODEs).

Los ORs son expresados por las neuronas receptoras olfativas (ORNs) y se encuentran localizados en la membrana de las dendritas de estas células. Se piensa que cada célula receptora expresa un tipo de proteína receptora¹¹⁷ aunque esto todavía no está confirmado. De todas formas la percepción del tipo de molécula que entra en las sensilas se lleva a cabo en el deutocerebro del insecto y no en el OR.

Las OBPs conforman un grupo de proteínas hidrofílicas de pequeño tamaño, alrededor de 14 kDa y una longitud de 120-150 aminoácidos, son expresadas por las células de soporte que se encuentran en la sensila y acumuladas en altas concentraciones, estimadamente 10 mM^{118} , en la linfa sensilar¹¹⁹, la función principal de esta familia de proteínas se postula que es la de transportar pequeños ligandos de naturaleza hidrofóbica.

Finalmente las ODEs, también expresadas por las células de soporte, son las que degradan las moléculas de olor con el fin de evitar la saturación de la antena y la consiguiente incapacidad de captar nuevas moléculas. A diferencia de los otros dos grupos de proteínas, las ODEs son las menos específicas, lo que les convierte en proteínas diana en cuanto a inhibición comportamental se refiere.

5.1.1. OBPs

Las OBPs encontradas en el orden Lepidoptera poseen todas ellas una función de tipo olfativo y se les ha prestado un especial interés a lo largo de esta tesis. La mayoría de las OBPs presentan 6 cisteínas en un patrón asimétrico bastante conservado, estas cisteínas forman puentes disulfuro que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas¹²⁰⁻

¹²². Las OBPs se dividen en dos grandes grupos según la homología de la secuencia de aminoácidos, las proteínas de unión a moléculas de feromona (PBPs) y las que se unen a moléculas odoríferas generales (GOBPs)¹²³, las cuales se dividen a su vez, en GOBP1 y GOBP2 según la secuencia de aminoácidos¹²⁴. Las PBPs constituyen un grupo heterogéneo donde la similitud inter e intra específica es moderada¹²³ mientras que las GOBPs presentan una secuencia más conservada.

La primera OBP descrita fue la PBP de la especie *A. polyphemus* en el año 1981¹²⁵, a partir de ahí se ha caracterizado en varias especies de polillas como *B. mori*¹²⁶, *Lymantria dispar*¹²⁷ y *Hyalophora cecropia*¹²⁸, entre otras. El hecho de haber encontrado esta PBP expresada en las antenas de los machos de *A. polyphemus* indujo a pensar que era exclusiva de los mismos, aunque estudios posteriores han demostrado que se expresan también en antenas de hembras¹²⁹⁻¹³¹. De hecho, en ciertas familias de lepidópteros, especialmente la familia Noctuidae, se ha visto una casi total indiferencia en los niveles de expresión de las PBPs en cuanto al sexo²⁸. La expresión de PBPs en hembras podría estar relacionada con el reconocimiento de feromonas de machos¹³², como monitorización de la propia emisión feromonal o percepción de otras hembras conespecíficas, ya que se ha comprobado la capacidad de captación de la mezcla feromonal en varias especies^{5, 133}. Alternativamente, también cabe la posibilidad de que estas proteínas tengan una doble función, implicadas en el transporte tanto de moléculas de feromonas como de volátiles de planta¹³⁴. Por otro lado, las GOBPs, parece que se expresan de manera similar en ambos sexos¹²⁴, aunque otros autores afirman que su abundancia es mayor en las hembras¹³⁵.

Gracias a técnicas como la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica se ha conseguido localizar las diferentes OBPs en las antenas. Las PBPs se encuentran presentes en la linfa sensilar de la sensilas tricoideas, mientras que las GOBPs se encuentran generalmente en sensilas de tipo basicónico. Concretamente, las GOBPs2 siempre se han encontrado en sensilas basicónicas, mientras que las GOBPs1, por otra parte, se han localizado en ambos tipos sensilares aunque sólo en hembras¹³⁵⁻¹³⁸. De hecho, se ha comprobado que volátiles de planta se unen a sensilas tricoideas de hembras, lo que explicaría la existencia de GOBPs en este tipo de sensila. Es por ello, que las GOBPs se les relaciona preferentemente con la unión y transporte de compuestos no feromonales como volátiles de planta y otras moléculas del medioambiente¹³⁹⁻¹⁴¹.

Las PBPs por otro lado, parece que poseen varias funciones adicionales a la del transporte de moléculas de feromona a través de la linfa sensilar, entre las cuales se ha

sugerido la protección de la molécula de feromona de la degradación enzimática, la desactivación feromonal y la interacción de la feromona con el receptor¹⁴²⁻¹⁴⁴.

5.1.2. ODEs

Tan importante es la captación de sustancias olorosas como la desactivación de la señal odorífera, a fin de que el insecto pueda seguir captando señales de manera continua y pueda localizar la fuente emisora. La degradación feromonal comenzó a estudiarse en 1971 en la especie *B. mori*¹⁴⁵ y en 1973 en *T. ni*^{146, 147}, sin embargo pocos han sido los esfuerzos realizados desde entonces en el estudio de las ODEs y se han basado en mayor medida en los ORs y las OBPs. Las ODEs estudiadas hasta el momento atacan a diferentes grupos funcionales, como ésteres de acetato, aldehídos, alcoholes, cetonas y epóxidos, por lo que se asume que pertenecen a familias de genes diferentes²⁸. La primera ODE identificada fue la esterasa de *A. polyphemus*¹²⁵, desde entonces varios tipos de ODEs se han descrito, aldehído-oxidasas, alcohol oxidasas, deshidrogenasas²⁸, y citocromo P450 oxigenasas entre otras, todas ellas encargadas de degradar moléculas de olor. Gracias a los diferentes estudios realizados en ODEs, en especial en esterasas, se ha demostrado como la inhibición de estas enzimas ocasiona una alteración en el sistema de percepción. La utilización de TFK, moléculas inhibidoras de las esterasas⁵⁰, impiden la degradación de las moléculas de feromona. Esto supone la acumulación de feromona en la antena, provocando un bloqueo de los receptores antenales, que impide la localización por parte del macho de la fuente de emisión feromonal¹⁴⁸.

5.1.3. Utilización de la proteómica en el control de plagas

La proteómica es una herramienta que nos permite conocer lo que ocurre en una célula o tejido en respuesta a un estímulo en un momento determinado. La utilización de técnicas proteómicas permite detectar cambios en la expresión de proteínas así como modificaciones en el organismo de estudio.

El proteoma es mucho más complejo y dinámico que el genoma. Un gen puede dar lugar a más de una proteína y cada una de éstas puede sufrir modificaciones postraduccionales como consecuencia de variaciones en el estado físico y el entorno. Para el estudio del proteoma se han desarrollado dos vertientes, la denominada proteómica de expresión y la proteómica funcional. La primera estudia la expresión proteica global en unas condiciones determinadas, pudiéndose detectar las proteínas que presentan variaciones en aquellas condiciones. La proteómica funcional por otro lado,

estudia la localización de los complejos proteicos, su movimiento en la célula, su composición así como las interacciones de las proteínas¹⁴⁹.

El uso de feromonas está adquiriendo cada vez más relevancia como método biorracional de control de plagas, por ello resulta de gran interés el estudio y entendimiento de las bases moleculares del sistema olfativo¹⁵⁰ como una posible herramienta de control alternativa a la utilización de pesticidas que tantos problemas medioambientales así como de salud pública conllevan. Una de las opciones propuestas a lo largo de este capítulo ha sido el estudio preliminar de las proteínas antenales implicadas en la olfacción, mediante proteómica de expresión, a través de la utilización de varias técnicas como la electroforesis bidimensional, el análisis por huella peptídica así como la espectrometría de masas en tándem, pioneras en este tipo de estudio.

Para llevar a cabo este análisis se han considerado tres especies de la familia Noctuidae: *Sesamia nonagriodes*, *S. exigua* y *S. littoralis*, todas ellas causantes de grandes daños en nuestro país.

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Insectos

Las pupas de *S. nonagrioides* se obtuvieron de la UdL-IRTA (Lleida, España). Una vez determinado el sexo de las mismas, se mantuvieron por separado hasta el momento de emergencia en cajas de plástico colocadas en cámaras diferentes, cuyas características se hallan descritas en el apartado 4.2.1 del capítulo 4, pág. 51. Los adultos emergidos se separaron diariamente y se colocaron en cajas que contenían un algodón impregnado de una solución azucarada al 10% como fuente de alimentación hasta los dos días de edad, momento en que se utilizaban los insectos. *S. nonagrioides* se utilizó para poner a punto la técnica, así como para hacer estudios de expresión de algunas proteínas antenales a lo largo del fotoperiodo.

Los especímenes utilizados de las especies *S. exigua* y *S. littoralis* provenían de una colonia mantenida en nuestro laboratorio. Las pupas una vez sexadas se mantenían en cajas separadas en las mismas condiciones que las pupas de la especie anterior. Los insectos utilizados fueron igualmente de dos días de edad.

5.2.2. Análisis general de las proteínas antenales

5.2.2.1. Optimización de la técnica

Las proteínas halladas en los extractos antenales se separaron por 2D SDS-PAGE en geles de acrilamida de un tamaño de 7 cm y pH 3-10. La cantidad de proteína cargada en todos los geles fue de 10 µg disueltos hasta 125 µL con tampón de rehidratación.

5.2.2.1.1. Tratamiento de la muestra

Con el fin de obtener una gran cantidad de proteínas bien disueltas a la vez que reducidas, se tuvieron en cuenta dos factores, el tampón de extracción; primordial para asegurar una máxima extracción proteica y la precipitación de la muestra; a fin de conseguir una muestra más limpia y evitar posibles interferencias posteriores en las sucesivas electroforesis.

Tampón de extracción

Los primeros estudios realizados se basaron en la búsqueda de un tampón de extracción idóneo para obtener la máxima cantidad de proteínas. Para ello se prepararon tres extractos antenales diferentes conteniendo cada uno 30 antenas de machos en 300 μ L de tampón de extracción, uno de ellos se elaboró en tampón de lisis conteniendo DTT 10 mM, apartado 3.5.1.1.1 del capítulo 3 (pág. 34), otro tampón Tris pH 8 y un último extracto homogeneizado en tampón fosfato (NaH_2PO_4 0,1 mM + Na_2HPO_4 0.1 mM). El procedimiento utilizado para la homogeneización de las antenas se haya indicada en el apartado 3.5.1.1.1 (pág. 34).

Para cada extracto se elaboraron dos geles de 7 cm (1D: pH 3-10, 2D 12,5% acrilamida). La cantidad de proteína cargada se disolvió con tampón de rehidratación más DTT 20 mM.

Precipitación de la muestra

Una vez obtenida una cantidad óptima de proteínas, se intentó mejorar la resolución del gel. La poca resolución puede ser debida en gran medida a que la muestra posea diversos componentes insolubles, como las sales, que pueden interferir en la primera dimensión. Por ello, se elaboró un extracto antenal de 30 antenas de hembras homogeneizadas en 300 μ L de tampón de lisis. Con el objetivo de precipitar las proteínas presentes en el extracto antenal y eliminar las posibles impurezas, parte del volumen recogido tras la segunda centrifugación se precipitó mediante TCA/acetona. Así pues, en un primer paso, se añadió a los 300 μ L de extracto, el mismo volumen de TCA 10% y se dejó actuar durante 30 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 11000 rpm durante 10 min. Una vez, eliminado el sobrenadante, se añadieron 500 μ L de acetona y se centrifugó a 11000 rpm durante 1 min. Pasado este tiempo y eliminado el sobrenadante resultante, se volvió a añadir 500 μ L de acetona y se centrifugó a 11000 rpm durante otro minuto. Eliminado el sobrenadante se dejó secar unos 5 min y se diluyó posteriormente en tampón de rehidratación más DTT 20 mM. Se elaboró un mínimo de dos geles para cada extracto.

5.2.2.1.2. 1ª Dimensión

Para obtener una resolución óptima de los geles, las proteínas durante la primera dimensión deben hallarse completamente desnaturalizadas y solubilizadas. Para facilitar la migración de las mismas y evitar los consiguientes artefactos que pudieran aparecer por una baja solubilización de las proteínas, el extracto se diluyó, en nuestro caso, con un

tampón de rehidratación previamente al contacto del mismo con la tira. Esto asegura que la proteína a migrar se encuentre reducida y no se agregue, minimizando de esta forma, las posibles interacciones intermoleculares.

Tampón de rehidratación

La composición del tampón utilizado normalmente se encuentra especificada en el apartado 3.5.1.3.1 (pág. 36). Para la puesta a punto, se realizaron pruebas con otro tampón de rehidratación ligeramente modificado, consistente en urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (w/v), azul de bromofenol 0,25% (w/v), tampón IPG 0,5% (w/v). La combinación de ambos caotropos, urea y tiourea puede aumentar el número de manchas visibles en el gel bidimensional así como favorecer la solubilización de las proteínas.

Se elaboraron 10 geles de tres extractos distintos de antenas de hembras, de los cuales, cinco se diluyeron con tampón de rehidratación normal y cinco con el tampón combinado con tiourea.

Utilización de HED

La utilización de DTT como único agente reductor puede conllevar a la aparición de interferencias horizontales en la zona de pH > 7 del gel. Estas interferencias se deben a que el DTT migra hacia el ánodo o polo positivo quedando la parte básica sin la presencia del mismo, ocasionándose por consiguiente, la oxidación inespecífica de los grupos tiol de las proteínas. La utilización de otro agente reductor, como el HED, estabiliza los grupos tiol y mejora la resolución del gel, eliminando la presencia de manchas extras e interferencias horizontales en la zona básica¹⁵¹.

Se realizaron dos extractos antenales de machos, ambos disueltos en el tampón de rehidratación descrito anteriormente, pero a uno de ellos se le añadió DTT 20 mM y a otro DTT 5 mM combinado con HED 200 mM.

5.2.2.2. Preparación de extractos

5.2.2.2.1. Extractos antenales

Para realizar los estudios de expresión de las proteínas antenales, se procedió a la extracción de antenas de machos y hembras de *S. nonagrioides*. Dicha extracción se realizó durante la 4^a h de la escotofase, ya que el periodo de máxima actividad ocurre entre la 4^a-6^a h de la fase oscura. Con el fin de observar la posible variación en la expresión de las proteínas antenales en función del fotoperiodo, se extrajeron antenas de

ambos sexos a diferentes horas de la escotofase, 1, 4 y 7 h después de comenzada la misma y en dos momentos diferentes de la fotofase, 4 y 12 h antes de volver a empezar la fase oscura. En el caso de *S. exigua*, la extracción de las antenas se realizó durante la 6^a-8^a h de la escotofase, de acuerdo al momento de máxima emisión feromonal según observaciones anteriores (apartado 4.3.1. del capítulo 4, pág. 68) y en *S. littoralis* se llevó a cabo durante la 2^a h de la escotofase¹⁵².

Las antenas de *S. nonagrioides* y *S. littoralis* se homogeneizaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1.1.1 del capítulo 3 (pág. 34). En el caso de *S. exigua*, las antenas se trituraron con ayuda de un pistón en un vial eppendorf de 1,5 mL en contacto con nitrógeno líquido. En general, para el análisis diferencial, se elaboró un mínimo de tres extractos por sexo en las especies *S. littoralis* y *S. nonagrioides* para los geles con un porcentaje de acrilamida de 12,5%, a los que cabe añadir tres extractos más por sexo para los geles al 8% de acrilamida en esta última especie. En el caso de *S. exigua*, el número de extractos antenales realizados fue de seis en ambos sexos.

5.2.2.2. Extractos glandulares y de planta

Paralelamente al análisis de expresión diferencial de las proteínas antenales, se realizó un estudio de la respuesta antenal de ambos sexos en la tres especies frente a la mezcla feromonal emitida por la hembra mediante EAG, así como a extractos de la planta hospedadora en el caso de *S. nonagrioides*.

Los extractos glandulares se prepararon con una glándula feromonal en 100 µL de hexano. La extracción de las diferentes glándulas se realizó según el momento de la escotofase en el que la hembra de cada una de las tres especies era más activa. La glándula feromonal se dejó en contacto con el disolvente durante una hora, tras la cual, se procedió a extraer la glándula. Los extractos se conservaron a -80°C.

Para los extractos de plantas, se cortaron en trozos 60 mg de hojas de maíz de aproximadamente un mes y se depositaron en una vial de 3 ml en contacto con 400 µL de hexano durante 3 h. Al igual que los extractos glandulares, una vez extraídas las hojas, los extractos se mantuvieron a -80°C hasta el momento de la utilización.

5.2.3. Análisis de las ODEs

Este estudio preliminar se realizó con extractos antenales de adultos de ambos sexos de la especie *S. nonagrioides*.

5.2.3.1. Sonicación

Para la extracción del mayor número de proteínas antenales durante la elaboración del extracto se utiliza la sonicación, el cual es un método de disrupción celular muy vigoroso, que mediante la acción de ondas sonoras de alta frecuencia ocasiona la ruptura de las membranas celulares. Muchas de las ODES, como esterasas y alcohol-oxidasas, al igual que las OBPs, se encuentran localizadas en el fluido que baña las células sensoriales, la linfa sensilar, es decir, son extracelulares, con lo que la utilización de un método de homogeneización más suave podría permitir la obtención de un menor número de células entre las que se incluirían entre otras, estos tipos de ODEs. Por lo cual, una de las alternativas elegidas para el análisis de este tipo de enzimas fue justamente la variación del método de ruptura celular empleado en la elaboración de los extractos. Se realizaron cuatro extractos antenales sometidos a distintas condiciones:

1. Control: Extracto realizado siguiendo el protocolo habitual, tampón lisis, homogeneización 10 min, sonicación 12 seg seguido de dos centrifugaciones a 11000 rpm.
2. Prueba 1: Extracto antenal en el que se prescindió del paso de sonicación.
3. Prueba 2: Extracto antenal en el que la única variación realizada fue el cambio de la sonicación por el baño de ultrasonidos durante 15 min. Este método algo más suave que el anterior permite, mediante la generación de ondas supersónicas, la disolución de compuestos difíciles de disolver.
4. Prueba 3: Extracto antenal realizado en tampón Tris en vez del tampón de lisis, en el que tras la homogeneización durante los 10 min correspondientes se utilizó el baño de ultrasonidos.

5.2.3.2. Electroforesis 2D en condiciones nativas

La segunda alternativa en el estudio de las ODEs se centró en la localización de las esterasas, enzimas implicados en la degradación de los ésteres de acetato. Para este fin se procedió a la realización de geles bidimensionales en condiciones nativas. La ausencia de agentes reductores o desnaturalizantes evita la pérdida de actividad de las esterasas existentes en los extractos antenales y permite la posterior tinción de los geles

mediante un método de tinción idóneo para la visualización de este tipo de enzimas, como es la tinción con acetato de α , β -naftilo (α , β -naftil acetato)¹²⁵.

Así pues se hicieron unos primeros geles bidimensionales de 7 cm y pH 3-11 NL con una mezcla de tres esterasas comerciales (esterasa del hígado de cerdo (LP), esterasa de *Mucor miehei* (MM) y acetilcolinesterasa (AChE)) y BSA en agua milliQ a una concentración de 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ cada una, disueltas en 100 μL de tampón de rehidratación compuesto simplemente de CHAPS 2% (w/v), Azul de bromofenol 10% (w/v) e IPG buffer 1% (v/v). Una vez separadas las distintas proteínas mediante isoelectroenfoque, se equilibraron con un tampón compuesto sólo de Tris-HCl 50 mM, glicerol 30% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (w/v), sin DTT o IAA. La segunda dimensión se corrió en geles sin SDS al 12,5% de acrilamida. Para la visualización de las manchas resultantes se utilizaron tres métodos de tinción: α , β -naftil acetato, Coomassie¹⁵³ y plata (apartado 3.5.1.5, pág. 38) con el fin de determinar con cual de ellos se apreciaban mejor las distintas proteínas.

Paralelamente se elaboraron tres geles monodimensionales cargando en cada pocillo cada una de las proteínas utilizadas en la mezcla con el fin de observar que peso molecular tenían y facilitar su localización en los geles bidimensionales resultantes.

Así mismo se procedió a la elaboración de un extracto de 60 antenas homogeneizadas en 600 μL de tampón Tris-HCl. Este tampón no contiene ningún compuesto reductor o desnaturizante que pueda alterar la actividad de las esterasas existentes en el extracto. La separación 1DE y 2DE de las proteínas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento y tampones anteriores. Los dos métodos de tinción utilizados en el revelado de las proteínas fueron α , β -naftil acetato y plata.

5.2.3.3. Electroforesis 2D en condiciones desnaturizantes

La última alternativa fue modificar el porcentaje de acrilamida de los geles siguiendo el protocolo utilizado para la separación de las proteínas antenales en los geles al 12,5% de acrilamida (págs. 36 y 37). Un tamaño de poro mayor permite el fácil desplazamiento de las proteínas más pequeñas mientras que las proteínas mayores que los poros del gel permanecen casi inmóviles. Por consiguiente, los geles elaborados fueron de un 8% de acrilamida, obteniendo así una mayor separación de la región comprendida entre 25 y 150 KDa.

5.2.4. Respuesta antenal en EAG

Se estudió la respuesta antenal frente a extractos correspondientes a una glándula feromonal en machos y hembras de las tres especies de noctuidos objeto de estudio. Así mismo, se realizó un estudio de la respuesta antenal frente a 1 µg de la mezcla sintética Z11-16:Ac, Z11-16:OH y Z11-16:Ald en una proporción 84:15:1 así como a extractos de hoja de maíz en ambos sexos de *S. nonagrioides*. Los extractos glandulares así como los de plantas se evaporaron manualmente con ayuda de una pipeta Pasteur hasta aproximadamente 10 µL, que fue el volumen final depositado en los papeles de filtro (Whatman). Las antenas se estimularon tres veces con cada uno de los agentes estimulantes y a la media resultante de las tres insufladas se le restó la obtenida con el disolvente utilizado como blanco, en este caso, hexano. Se utilizó un total de 10 antenas provenientes de machos y hembras diferentes de cada especie. Los productos sintéticos se obtuvieron de Sigma y la pureza se determinó mediante GC.

5.3. RESULTADOS

La optimización de la electroforesis bidimensional en la primera especie objeto de estudio, *S. nonagrioides* (Figura 5.1), ha permitido llevar a cabo el análisis de las proteínas antenales no solo en esta especie sino también en los otros dos noctuidos.



Figura 5.1. Adulto de *S. nonagrioides*.

5.3.1. Optimización de la técnica

En un primer estudio se prepararon extractos antenales con tres tampones de extracción diferentes (lisis, Tris y fosfato) a fin de observar con cual de ellos se obtenía mayor cantidad de proteína. Una vez realizada la cuantificación del contenido proteico total del extracto antenal se observó una gran disparidad en la cantidad de proteína total presente en los extractos antenales según el tampón utilizado. El total de proteína obtenida en los diferentes extractos fue de 13,4 μg /antena (N=25) con tampón de lisis, 4,2 μg /antena (N=3) con tampón Tris y finalmente 3,4 μg /antena (N=1) con tampón fosfato. De esto se deduce que el tampón de lisis, rico en agentes reductores, desnaturalizantes así como solubilizadores, permite una mayor extracción de las proteínas halladas en las antenas.

No sólo se observaron grandes diferencias a nivel de la cantidad total de proteína extraída sino el nivel de resolución de los tres geles fue igualmente bastante diferente (Figura 5.2). En los geles donde el tampón utilizado fue fosfato y Tris no sólo la cantidad de manchas observadas fue menor que con el tampón de lisis sino que la resolución de los geles a lo largo de todo el rango de pH fue muy baja. Tras estas observaciones, el tampón utilizado en la preparación de los extractos posteriores fue en todos los casos el tampón de lisis.

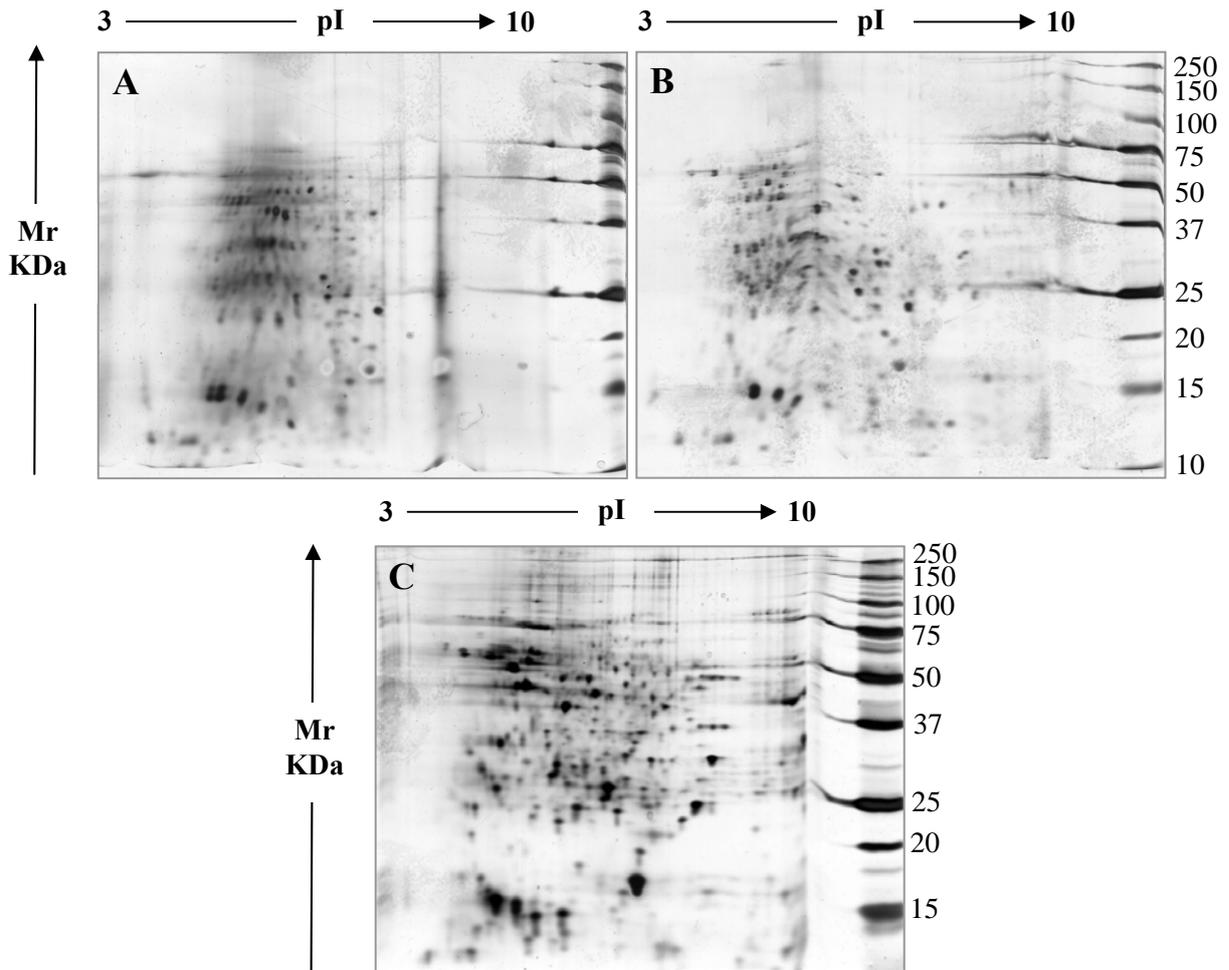


Figura 5.2. Imágenes de tres geles 2D de 7 cm y pH 3-10 de extractos antenales de machos de *S. nonagrioides* preparados con tres tampones diferentes. A) tampón fosfato, B) tampón Tris, C) tampón lisis.

El siguiente paso fue mejorar la resolución del gel. Se realizó la comparación de geles de un extracto antenal elaborado según el protocolo habitual, con otros en el cual el extracto antenal había sido precipitado previamente a la primera dimensión. En el gel del extracto precipitado se observó en general un mayor número de manchas especialmente en la zona básica, aunque la resolución de ambos geles fue prácticamente muy similar (Figura 5.3). A pesar de este incremento en el número de manchas observadas, la cantidad de las mismas no fue significativa, además se debe añadir el hecho de una mayor pérdida en la cantidad total de proteínas en el extracto debido al proceso de precipitación, 0,21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en el extracto precipitado frente a 0,94 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ obtenidos en el extracto sin precipitar. Al observar una pérdida de contenido proteico $>75\%$, los geles posteriores se realizaron con la muestra sin precipitar.

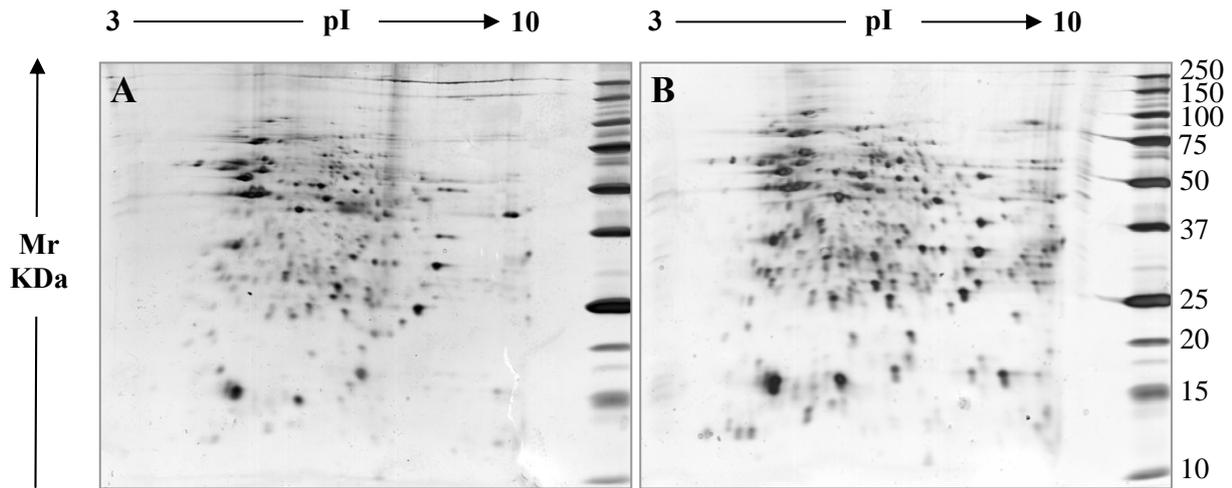


Figura 5.3. Imágenes de dos geles 2D de 7 cm y pH 3-10 de extractos antenales de hembras de *S. nonagrioides* con dos tratamientos de la muestra diferentes. A) Extracto antenal sin precipitar. B) Extracto antenal precipitado con TCA/acetona.

Para conseguir una resolución mayor se diluyeron las muestras en dos tampones de rehidratación, el tampón utilizado habitualmente, con urea como agente desnaturizante (pág. 36) y otro tampón compuesto por una combinación de urea y tiourea. Los geles obtenidos mostraron claras diferencias resolutivas (Figura 5.4). En los geles donde los extractos antenales se diluyeron en el tampón de rehidratación compuesto por una combinación de urea y tiourea se observó un mayor número de manchas, aunque en la parte ácida la resolución fue muy baja. La cantidad de tiourea óptima difiere según el tipo de muestra, así mismo la presencia de la misma puede ocasionar artefactos y una disminución en la resolución de la zona ácida¹⁵⁴. Con lo cual, el tampón de rehidratación utilizado para la realización de los posteriores geles sólo contenía urea como agente desnaturizante.

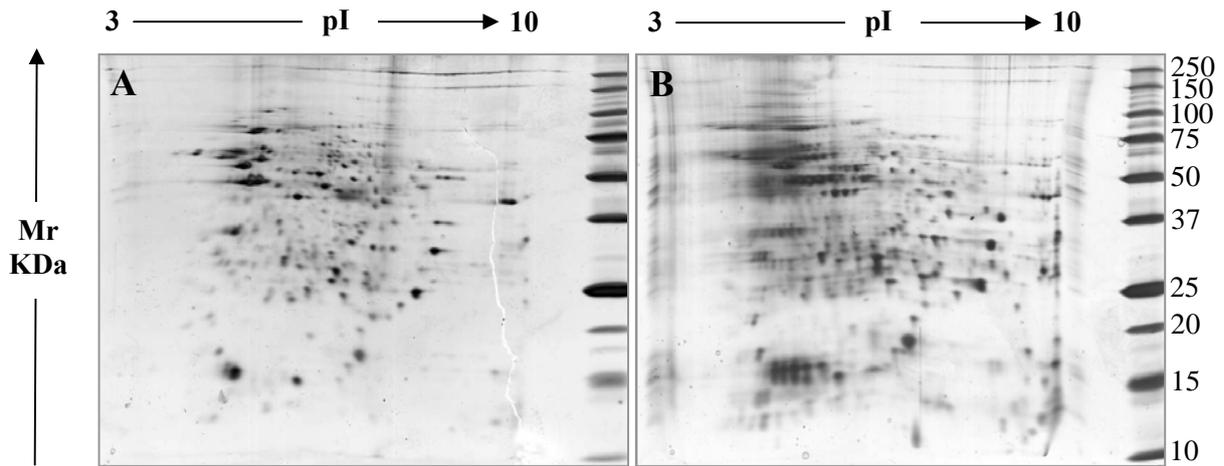


Figura 5.4. Imágenes de dos geles 2D de 7 cm y pH 3-10 de extractos antenales de hembras de *S. nonagrioides* disueltos en dos tipos de tampón de rehidratación durante la 1ª dimensión conteniendo: A) TR urea. B) TR urea y tiourea.

Finalmente se compararon dos extractos antenales disueltos en el tampón de rehidratación elegido anteriormente. A uno de ellos se le añadió DTT 20 mM como agente reductor y a otro una combinación de DTT 5 mM y HED 200 mM. Como puede apreciarse en la figura 5.5. la adición de HED estabiliza las proteínas en la zona básica, observándose por consiguiente, un mayor número de manchas.

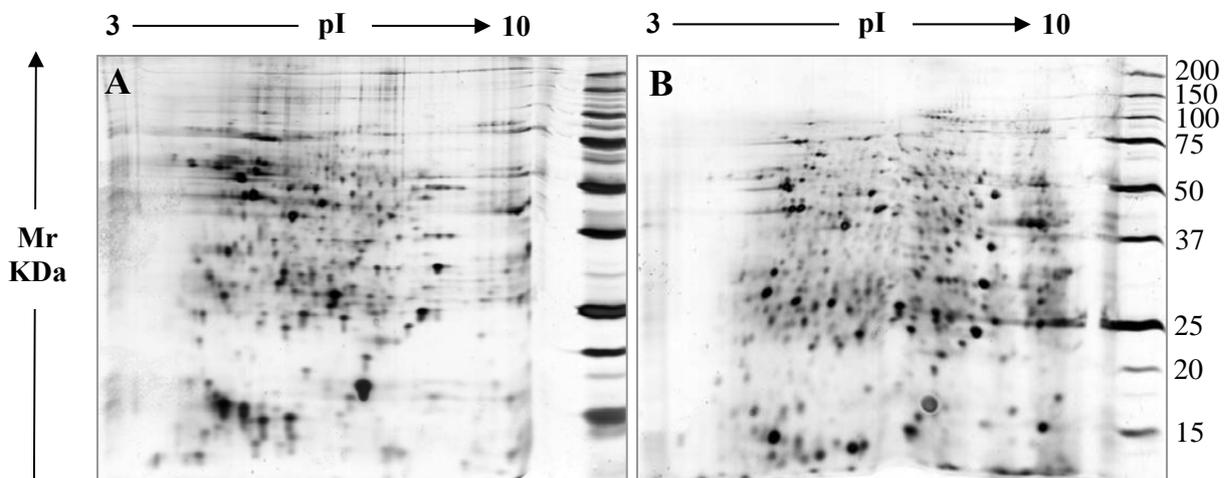


Figura 5.5. Imágenes de dos geles 2D de 7 cm y pH 3-10 de extractos antenales de machos de *S. nonagrioides* disueltos en tampón de rehidratación. A) TR con DTT 20 mM. B) TR con DTT 5 mM y 200 mM HED. TR: tampón de rehidratación.

5.3.2. *Sesamia nonagrioides*

5.3.2.1. Morfología de las antenas

Las antenas de machos y hembras de esta especie presentan diferencias morfológicas apreciables. La antena de la hembra es de mayor longitud y menos gruesa que la del macho, el cual presenta una antena bipectinada que le confiere una superficie sensilar a lo largo de toda la antena mucho más desarrollada que la de la hembra. Tal y como puede apreciarse en la figura 5.6, el número así como la longitud de sensilas tricoideas, encargadas de la percepción feromonal, es mayor en machos ya que requiere de las mismas para la captación de las moléculas emitidas por la hembra. En concordancia con esta observación se encuentran los resultados obtenidos en la cuantificación de la proteína total de los extractos antenales realizados, encontrándose en machos una mayor cantidad proteica, concretamente una media de $13,4 \pm 2,1$ $\mu\text{g}/\text{antena}$ (N= 25 extractos), frente a los $10,2 \pm 1,7$ $\mu\text{g}/\text{antena}$ (N= 18 extractos) hallados en hembras.

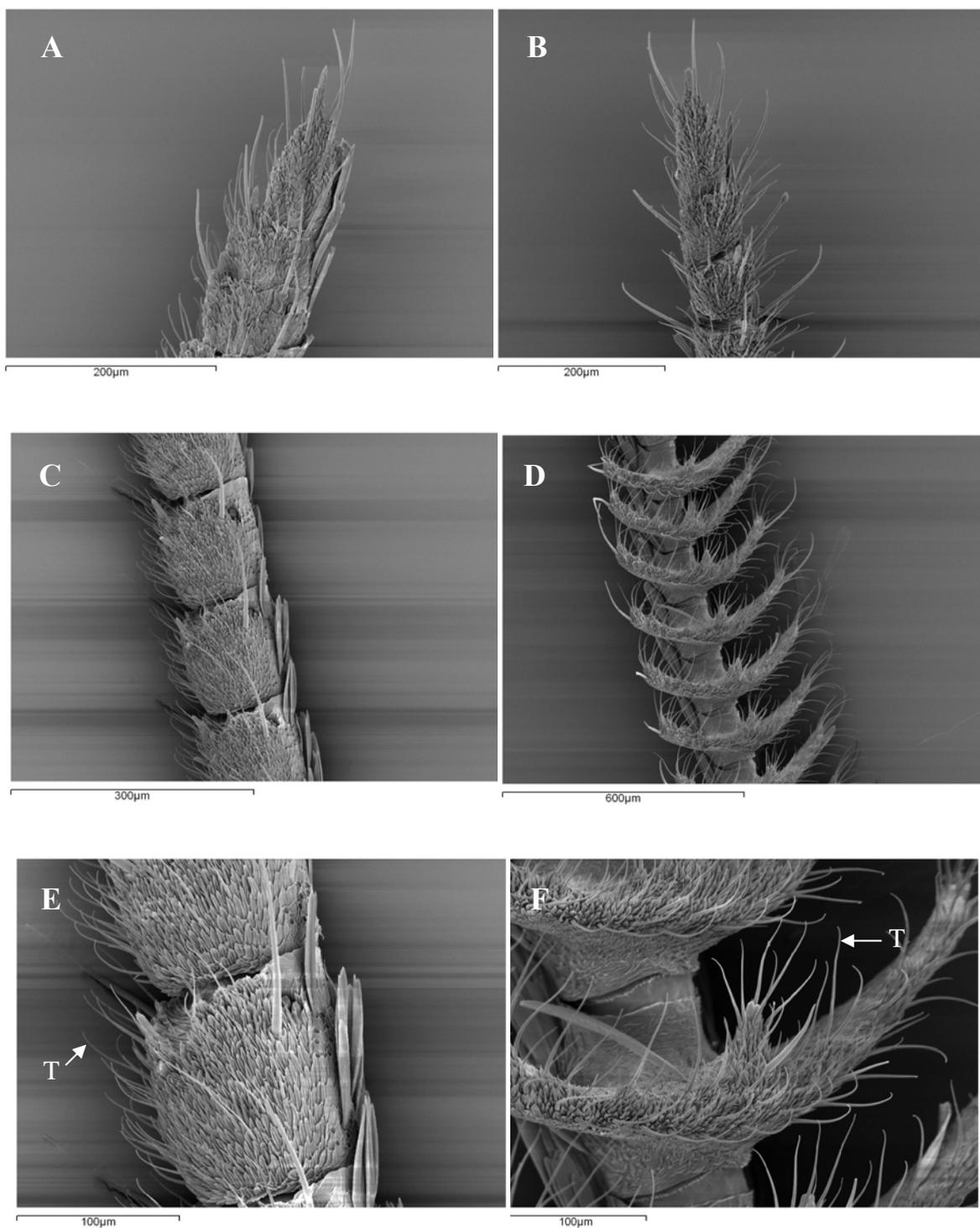


Figura 5.6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de dos antenas de ambos sexos de *S. nonagrioides*, en la columna izquierda se muestran las hembras y en la derecha los machos. A-B) Extremo distal de una antena, C-D) Zona central de la antena, E-F) Ampliación de un artejo antenal de la zona central de una antena. T: Sensila tricoidea.

5.3.2.2. Análisis de las proteínas antenales

Las imágenes obtenidas de los geles escaneados correspondientes a extractos antenales de machos y hembras se compararon entre sí. Se detectó una media de 800 manchas, de las cuales 500 se emparejaron en todos los geles. Tras el análisis diferencial y posterior recomprobación visual, se determinaron 10 manchas con expresión diferencial en machos y hembras. Nueve de estas manchas proteicas se encontraron localizadas en la zona de bajo peso molecular inferior a los 20 KDa y sólo una se halló en la región > 25 KDa.

De todas las manchas determinadas como diferenciales, cinco se hallaron con mayor grado de expresión en hembras, las correspondientes a la numeración **7, 9, 10, 11** y **12** y cinco en machos (manchas **2-6**) (Figura 5.7).

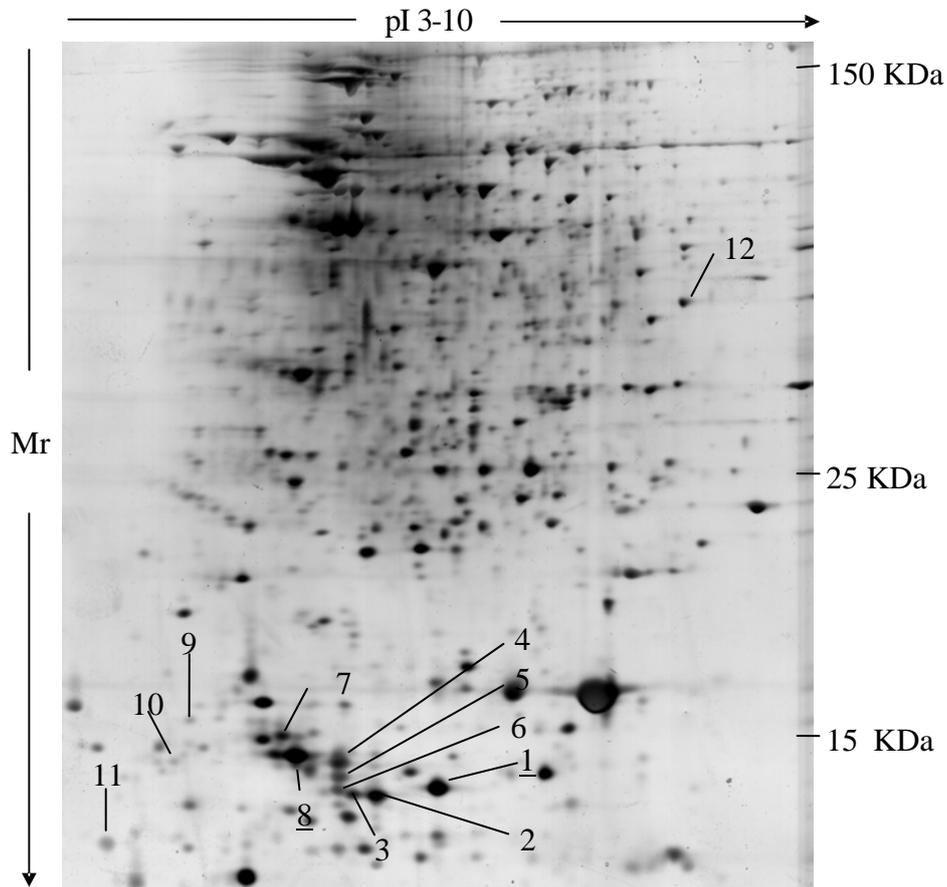


Figura 5.7. Imagen de un gel bidimensional de un extracto antenal de machos de *S. nonagrioides* de 18 cm de longitud y pH 3-10, polimerizado al 12,5% acrilamida. Los números indican las manchas que se expresan de manera diferencial en ambos sexos y los números subrayados se refieren a manchas de igual expresión en machos y en hembras. Todas ellas fueron recortadas y digeridas con posterioridad para la identificación de las mismas.

5.3.2.3. Identificación de las proteínas antenales diferenciales

Las 10 manchas diferenciales así como las correspondientes a las manchas numeradas como **1** y **8** en la figura 5.7, se digirieron con tripsina y el extracto peptídico resultante se sometió a un primer análisis mediante MALDI-TOF MS. De las 12 manchas, tan sólo dos pudieron identificarse por PMF. La denominada mancha **1** se identificó como proteína de unión al ácido retinoico celular por homología con la especie *Manduca sexta* y presentó el mismo nivel de expresión en ambos sexos. CRABP pertenece a la familia de las lipocalinas y su función es la de transportar el ácido retinoico, implicado en la diferenciación y crecimiento celular. A su vez la mancha **8** se identificó por homología como la GOBP2 de *Heliothis virescens*. Esta GOBP2 se encontró expresada de manera equivalente en machos y hembras.

Del resto de manchas, se consiguieron identificar seis mediante un posterior análisis del extracto peptídico por ESI-MS/MS. Los espectros obtenidos mediante MS/MS fueron posteriormente recomprobados con los PMFs que confirmaron los resultados. Cinco de las manchas identificadas estaban relacionadas con la olfacción. La mancha numerada como **2** se identificó como PBP2 de *S. nonagrioides*¹⁵⁵. Los espectros de MS y MS/MS de esta proteína se muestran en la figura 5.8 como ejemplo típico de un mapeo peptídico.

Las manchas correspondientes a los números **4**, **5** y **6**, cuyos espectros de PMF resultantes eran idénticos entre sí (Anexo 9.3), se identificaron como PBP1 de *S. nonagrioides*, ya que esta proteína se encuentra también en la base de datos. Las cuatro manchas identificadas como PBPs se encontraron mayormente expresadas en machos. Finalmente, la última mancha relacionada con la detección de moléculas olorosas fue la correspondiente al número **7**, identificada por homología como la GOBP1 de *Helicoverpa assulta*. La GOBP1 se encuentra más expresada en hembras.

Finalmente, la mancha numerada como **12** pudo ser igualmente identificada, pero su función no estaba relacionada con la olfacción. Esta mancha resultó ser la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, enzima catalizadora de la conversión del gliceraldehido-3-fosfato durante el proceso de glicolisis, con mayor grado de expresión en hembras que en machos.

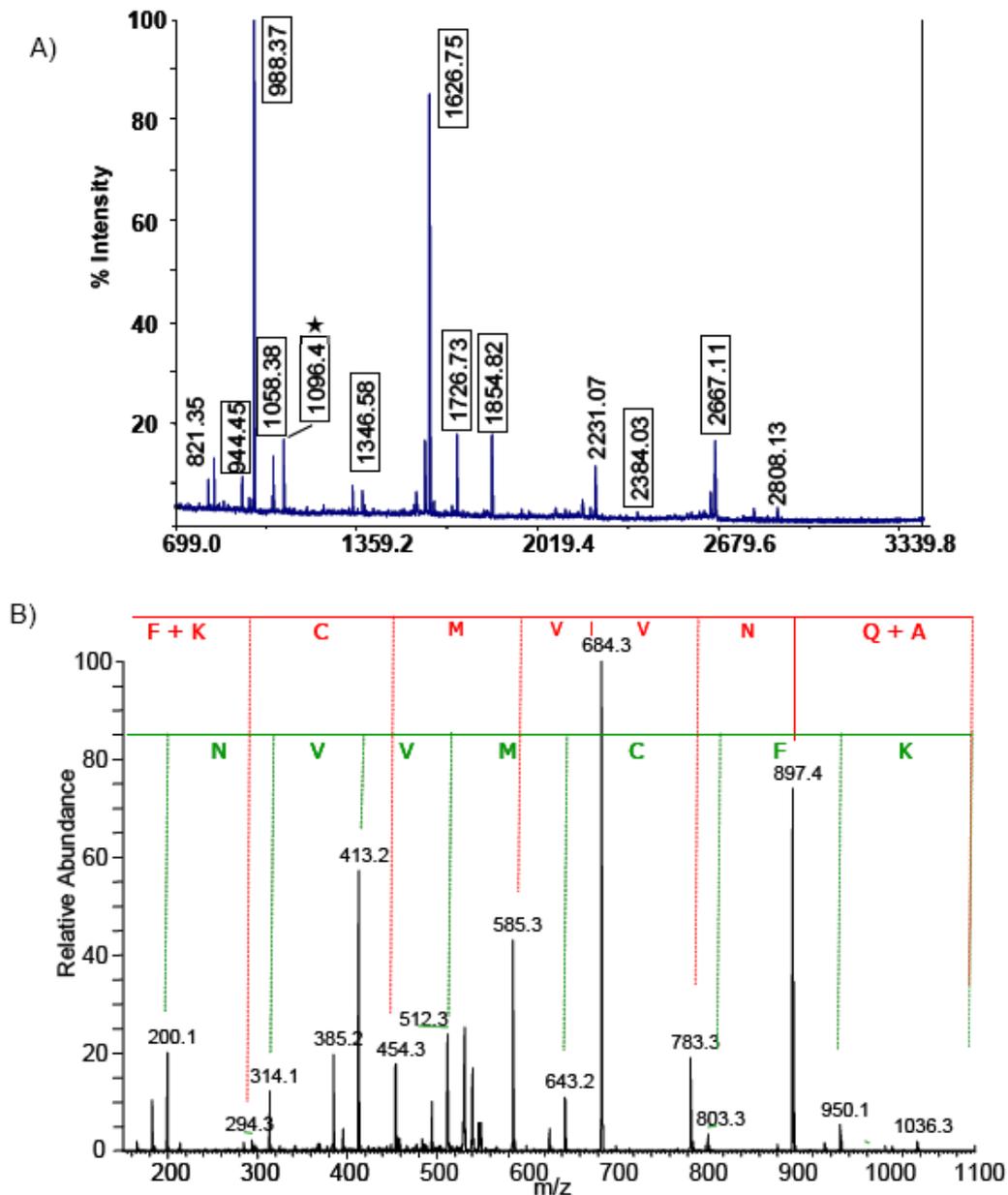


Figura 5.8. Identificación de la mancha 2 mediante espectrometría de masas. A) Espectro de MS, se muestran marcados con un recuadro los iones correspondientes a la proteína identificada. Con una estrella se señala el ion fragmentado por MS/MS. B) Espectro de MS/MS del ion 1096.4. Se muestran los iones y y z de las correspondientes secuencias.

El resto de manchas determinadas como diferenciales no pudieron ser identificadas debido a la poca abundancia de las mismas. La intensidad así como el número de los fragmentos de iones obtenidos por MS resultaron ser insuficientes para una búsqueda exhaustiva.

5.3.2.4. Estudio de las ODEs

En los geles realizados con anterioridad la zona de alto peso molecular (> 50 KDa) es cuantitativamente rica en proteínas, siendo difícil el análisis diferencial de esta región del gel. Las ODEs, enzimas de enorme importancia en el proceso de olfacción, son proteínas de alto peso molecular. En los geles resultantes de las primeras pruebas realizadas según el tipo de disrupción celular, se observó una diferencia notoria entre el gel elaborado en las condiciones menos agresivas, esto es tampón Tris en vez de lisis y utilización del baño de ultrasonidos en lugar de sonicación, con el resto de geles. Sin embargo, a pesar de presentar un menor número de proteínas en la zona de interés, la resolución obtenida con el tampón Tris, tal y como se había comprobado en la puesta a punto de la técnica, no es muy elevada, dificultando el análisis de las proteínas expresadas. Por otro lado, en los otros geles en los que se utilizó tampón de lisis en la muestra, independientemente del método de disrupción celular empleado, apenas se apreciaron diferencias en el número de manchas, salvo en la zona de peso molecular 25-37 KDa comprendida en un rango de pH 4-7 (Figura 5.9) donde se apreció una ligera disminución en el número de manchas expresadas en los geles de la prueba 1 (sin sonicación) y 2 (baño de ultrasonidos) en comparación con el control. Sin embargo las proteínas de interés se hallaban localizadas en zonas de masa molecular mayor con lo que esta observación se consideró irrelevante.

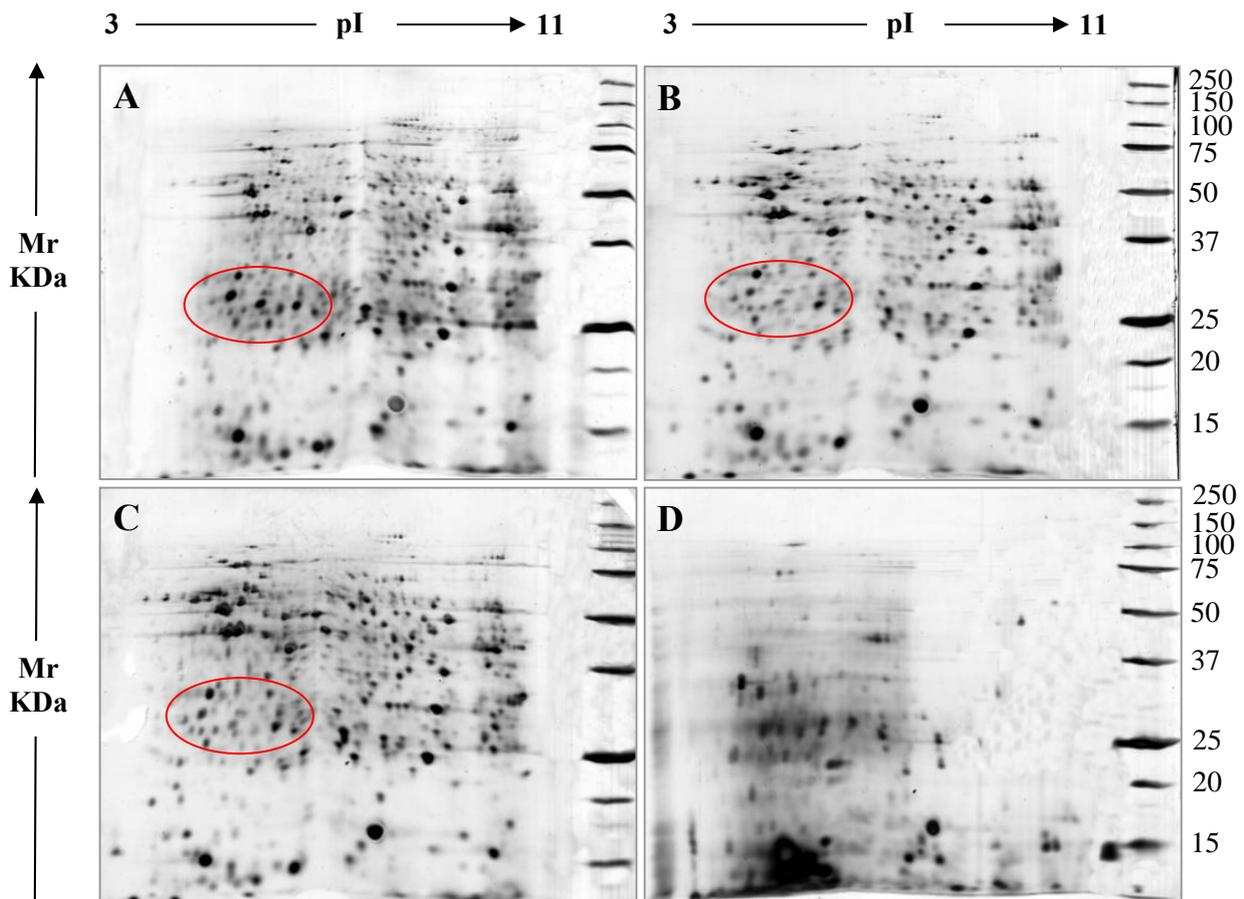


Figura 5.9. Imágenes de geles bidimensionales de 7 cm de extractos antenales de machos de *S. nonagrioides* sometidos a distintas condiciones. A) Control, B) Prueba 1: Sin sonicación, C) Prueba 2: Baño de ultrasonidos, D) Prueba 3: Tampón Tris y baño de ultrasonidos. Con una elipse se señala la zona donde se aprecia una disminución del número de manchas en los geles correspondientes a las pruebas 1 y 2 en comparación con el gel control.

A raíz de los resultados anteriores, se procedió a la localización de las esterasas. Para este fin se realizaron geles bidimensionales en condiciones nativas. Tal y como puede apreciarse en la figura 5.10 en los geles teñidos con la tinción especial de esterasas, naftil acetato, tan sólo se pudieron visualizar dos enzimas, la correspondiente a la LP y la AChE, mientras que las manchas observadas en el extremo derecho no se corresponden en peso a la MM. En cambio con los otros dos métodos de tinción se consiguió visualizar todas ellas, incluida la BSA, que por no ser esterasa no se llegó a teñir en la tinción utilizada en primer lugar.

Una vez se hubo comprobado que las esterasas podían visualizarse con las condiciones anteriores, se procedió a la elaboración de un extracto antenal en tampón Tris, que a pesar de una menor resolución final en el gel, no contiene ningún compuesto reductor o desnaturante que pueda alterar la actividad de las esterasas existentes en el extracto. Como se puede comprobar en la figura 5.11 tan sólo se apreció una mancha bien

definida. Esta mancha sólo pudo observarse una vez los geles se hubieron teñido con plata y no con naftil acetato.

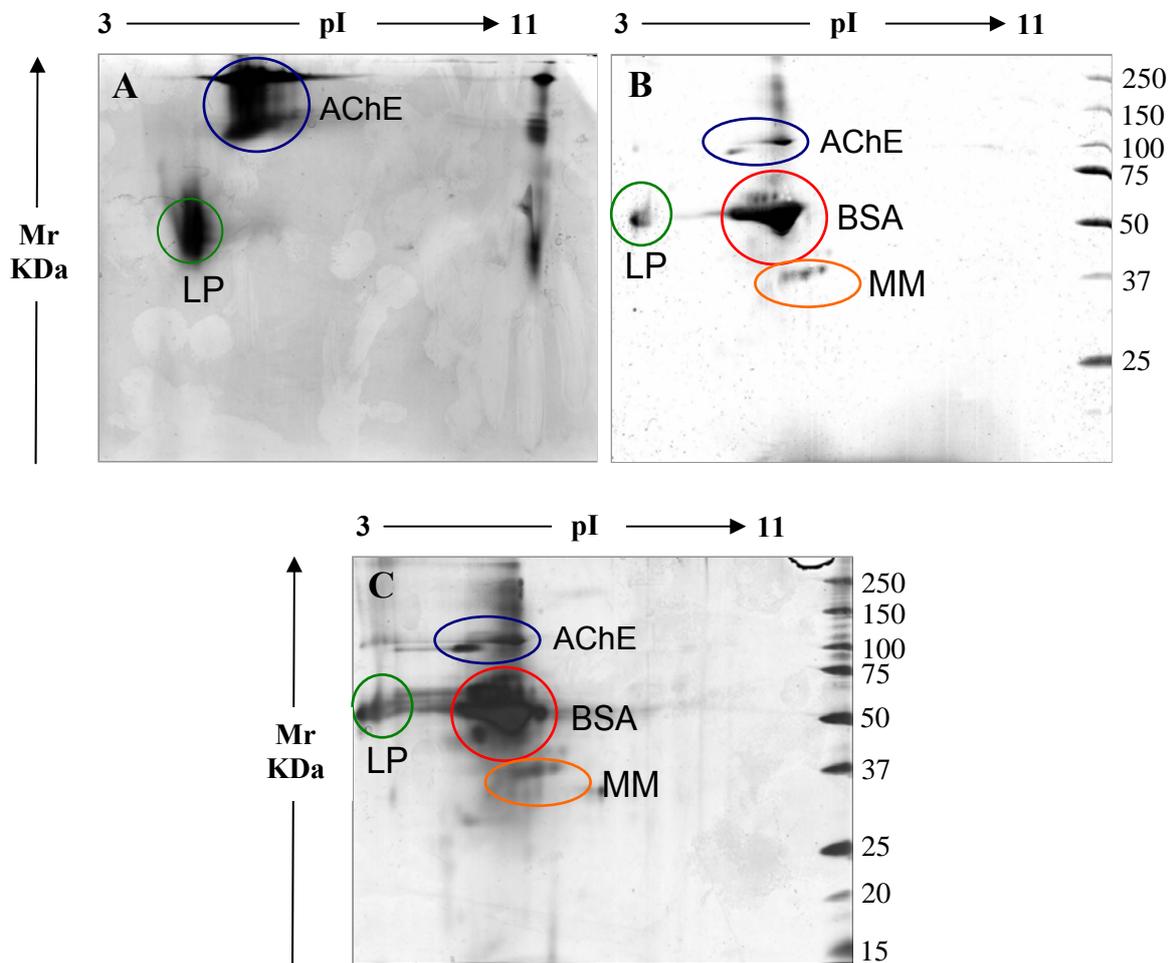


Figura 5.10. Imágenes de geles bidimensionales de una mezcla de tres esterasas más BSA teñidos mediante tres métodos diferentes: A) Naftil acetato, B) Coomassie, C) Plata. Las manchas señaladas con un círculo corresponden a las diferentes proteínas de la mezcla. LP: Esterasa de hígado porcino, MM: Esterasa de *Mucor miehei*, AChE: Acetilcolinesterasa, BSA: Albúmina de suero bovino.

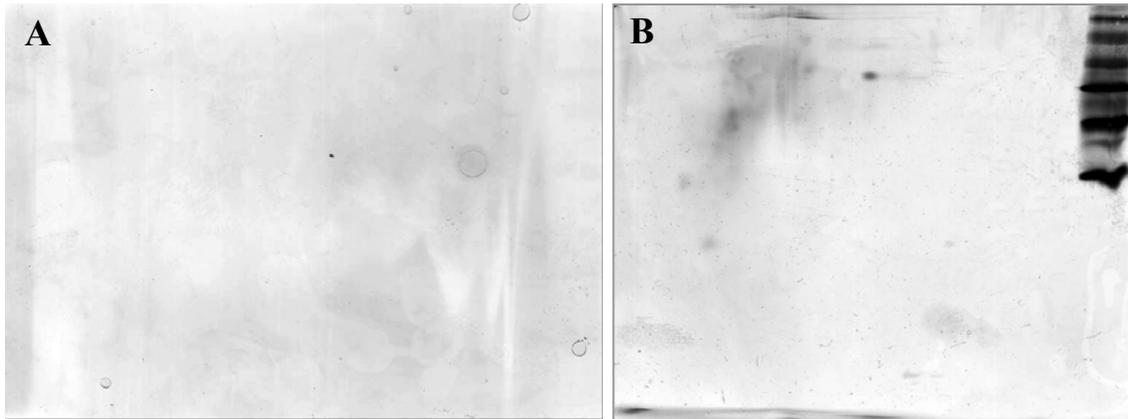


Figura 5.11. Imágenes de dos geles bidimensionales de un extracto antenal de antenas de machos de *S. nonagrioides* sometido a condiciones nativas y teñidos mediante dos métodos distintos de tinción: A) Naftil acetato, B) Plata.

Finalmente la última alternativa fue modificar el porcentaje de acrilamida a 8% permitiendo así una mejor visualización de las proteínas de alto peso molecular. En este caso, se detectó una media de 850 manchas, a diferencia de los geles al 12,5%, donde en la misma región se habían detectado menos de 400 manchas. Entre las 850 manchas, 620 se emparejaron entre todos los geles. De todas estas manchas detectadas, tan sólo seis se consideraron como diferenciales (Figura 5.12), de las cuales, cinco se encontraron con un mayor nivel de expresión en hembras (**13**, **14**, **16**, **17** y **18**) y tan sólo una (**15**) en machos.

Una vez digeridas las seis manchas con tripsina, en un primer análisis mediante MALDI-TOF MS, no pudo ser identificada ninguna de ellas, siendo necesario un análisis secundario mediante LC-MS/MS, tras el cual se consiguió la identificación de una única mancha, la denominada **13**, como proteína ribosomal 60, implicada en la traducción del RNA a proteína, de mayor expresión en hembras que en machos. El resto de manchas no pudieron ser identificadas por hallarse en muy poca cantidad en la mayoría de los casos.

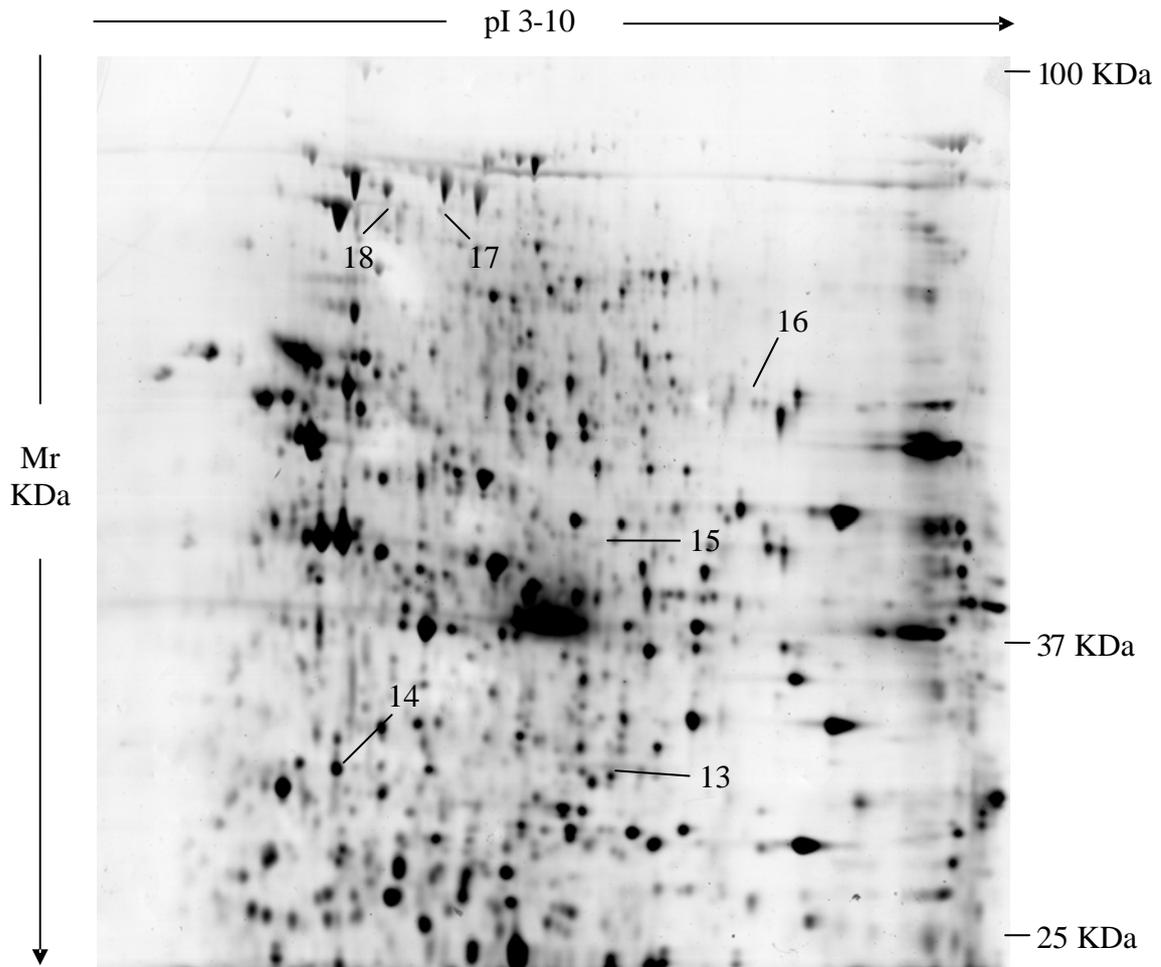


Figura 5.12. Imagen de un gel bidimensional de un extracto antenal de hembras de *S. nonagrioides* de 18 cm de longitud y pI 3-10, polimerizado al 8% de acrilamida. Los números indican las manchas que se expresan de manera diferencial en ambos sexos. Todas ellas fueron recortadas y digeridas con posterioridad para la identificación de las mismas.

En total el número de manchas proteicas expresadas de manera diferencial en machos y hembras de *S. nonagrioides* se reduce a 16, de las cuales, 10 se hallaron más acentuadas en hembras y 6 en machos (Figura 5.13). De todas ellas, prácticamente la mitad han podido ser identificadas (Tabla 5.1).

Con objeto de poder determinar el resto de manchas proteicas no identificadas, se elaboraron dos geles de cada porcentaje anteriormente utilizado, 12,5% y 8% acrilamida con una cantidad doble de proteína cargada, esto es 200 µg en vez de 100 µg. A pesar de la mayor proporción proteica, el resultado fue similar, puesto que las proteínas diferenciales de bajo nivel de expresión, no identificadas con anterioridad, continuaron expresándose en poca proporción, sin poder identificarlas (Anexo 9.4).

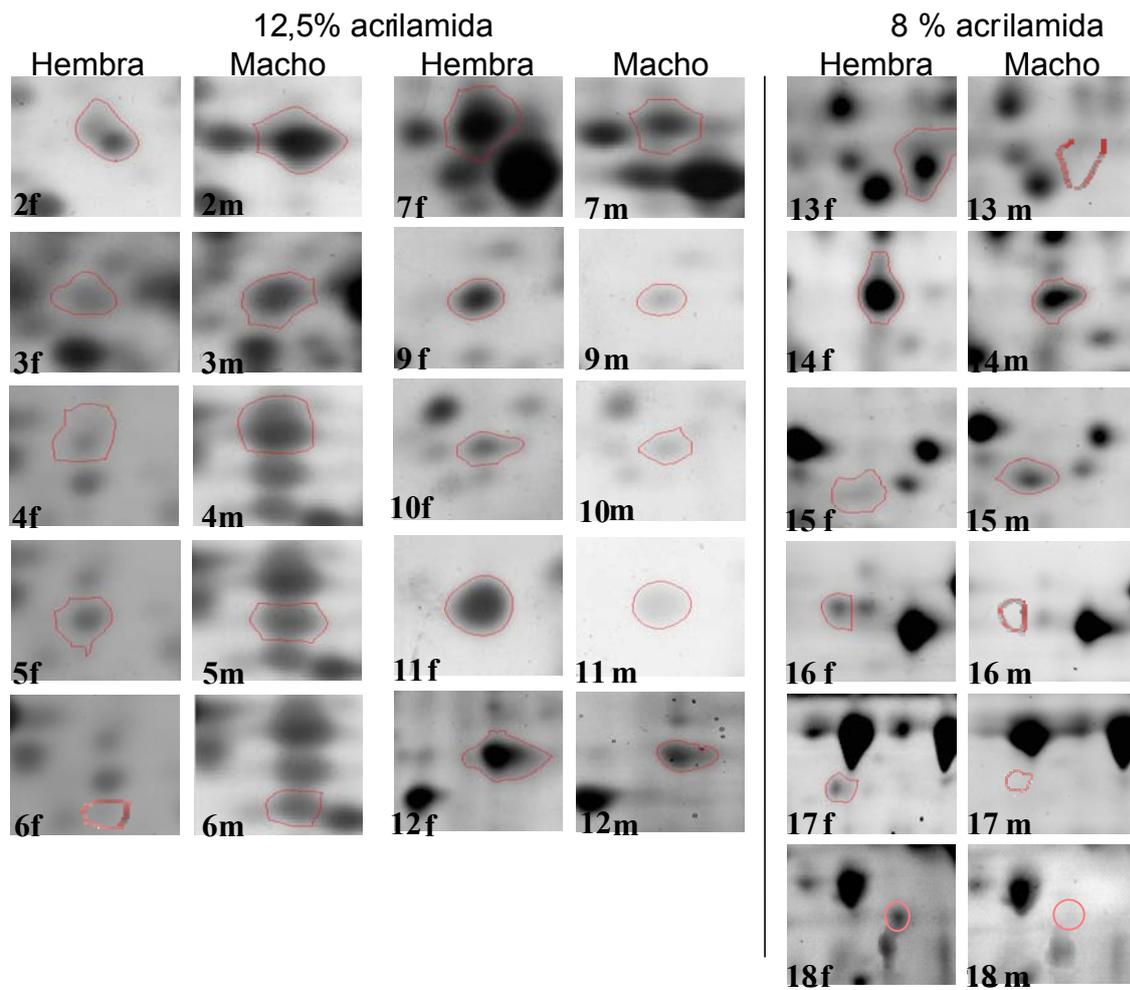


Figura 5.13. Imágenes de las 16 manchas diferenciales halladas en los dos tipos de geles bidimensionales realizados con extractos antenales de hembras (f) y machos (m) de *S. nonagrioides*. Diez manchas en los geles al 12,5% acrilamida y seis en los del 8% acrilamida. Los números corresponden al número de mancha.

Tabla 5.1. Proteínas identificadas en *S. nonagrioides* por MS/MS, excepto las manchas **1** y **8** identificadas por PMF.

Número mancha	Nombre	Mr/pI Teor. ¹	Exp. ²	Péptidos coincidentes	Secuencia peptídica	Especie	Número acceso
1	CRABP ³	15/5,7	14/6,4	-	-	<i>B. mori</i>	NP001037364
2	PBP2	19/6,0	14/5,8	1058:130-138 1096:139-147	R)EPADDPCVR(A) (R)AQNVMCFK(A)	<i>S. nonagrioides</i>	AAS49923
4, 5, 6	PBP1	19/5,2	14/5,6	1051:62-69 1402: 70-81	EEYELVNR(D) (R)DLGCMVMCMASK(L)	<i>S. nonagrioides</i>	AAS49922
7	GOBP1	17/4,8	15/4,4	1263:8-19 1324:48-58	NVTLGFGQALDK ELGCAIQCMSR	<i>H. assulta</i>	AAW65076
8	GOBP2	18/5,3	15/5,1	-	-	<i>H. virescens</i>	CAA65606
12	GPDH ⁴	35/7,7	37/8,1	1427:198-212 1468:232-245	(R)GAQQNIIPASTGAAK(A) (R)VPVANVSVVDLTVR(L)	<i>B. mori</i>	ABA43638
13	Proteína ribosomal 60	34/5,7	32/6,8	1352:135-146	(K)TSFFQALSIPTK (I)	<i>B. mori</i>	NP001037123

¹ Teor.: Teórica² Exp.: Experimental³ CRABP: Proteína de unión al ácido retinoico celular.⁴ GPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

5.3.2.5. Expresión de las OBPs a lo largo del fotoperiodo

Estudios previos en *S. nonagrioides* determinaron un periodo de máxima emisión feromonal a lo largo de la quinta hora de la escotofase¹⁵⁶. Con la finalidad de observar si existía cierta variación en la expresión de las proteínas identificadas como OBPs a lo largo del fotoperiodo se estudió la expresión de estas proteínas en la escotofase así como en la fotofase. Para este fin se elaboró un mínimo de dos geles por sexo para la comparación de las proteínas en los diferentes momentos del fotoperiodo estudiados.

En la cuantificación de los diferentes extractos antenales realizados, la cantidad de proteína total encontrada, tanto en machos como en hembras, no difería significativamente a lo largo del fotoperiodo, esto es debido, a que el resto de proteínas halladas en las antenas, como son las de tipo estructural se expresan independientemente del momento del fotoperiodo.

En relación a las seis manchas identificadas como OBPs, las tres manchas correspondientes a la PBP1 (4-6), se hallaban más expresadas a lo largo de todo el fotoperiodo en machos que en hembras, siendo el grado de expresión de las tres proteínas ligeramente mayor durante la escotofase. En la figura 5.14 se muestra el grado de expresión de la mancha 4 a lo largo del fotoperiodo. Así mismo, en hembras cabe destacar la menor expresión de la PBP1 a lo largo de todo el fotoperiodo, aunque con un cierto aumento al principio de la fase oscura. Respecto a la PBP2, al igual que la PBP1, se halló mayormente expresada en machos, alcanzando su máximo de expresión una hora después de comenzada la escotofase; en hembras sin embargo, el nivel de expresión varió ligeramente a lo largo del fotoperiodo.

Las GOBPs, por otro lado, se hallaron mayormente expresadas en hembras en comparación con los machos, siendo esta diferencia más remarcada en la GOBP1. En hembras, esta proteína presentó un ligero aumento al final de la escotofase, al igual que en machos. La GOBP2 se halló más expresada en hembras que en machos, aunque no se observaron diferencias significativas entre ambos. Igualmente, no se apreció ningún aumento relevante a lo largo del fotoperiodo.

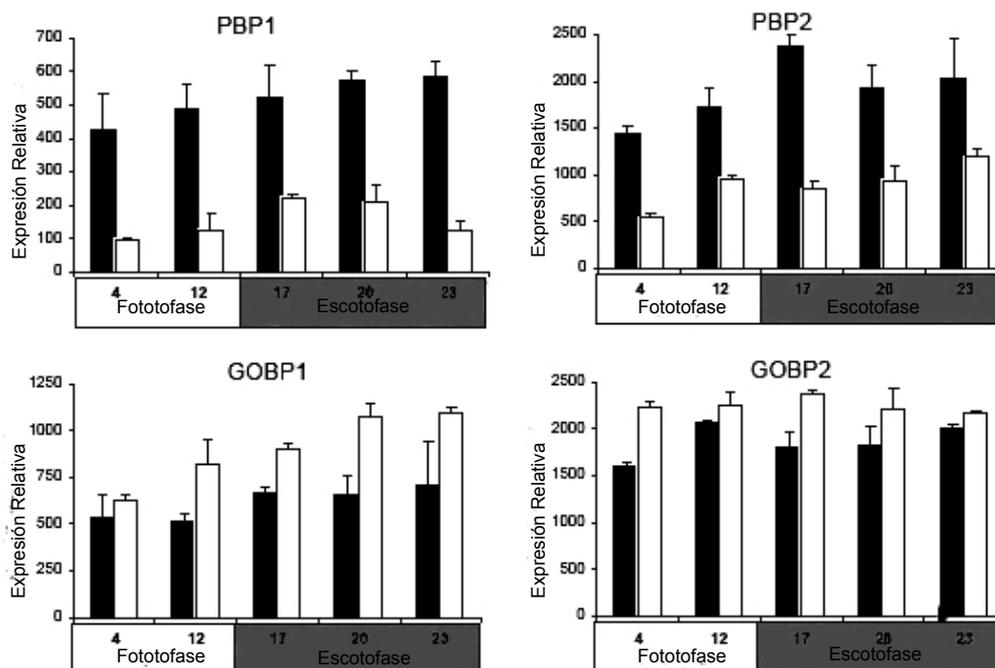


Figura 5.14. Expresión de la PBP1 (mancha 4), PBP2 (mancha 2), GOBP1 (mancha 7) y GOBP2 (mancha 8) a lo largo del fotoperiodo. Las barras negras indican machos y las blancas hembras. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

5.3.2.6. Estudio de las 3 manchas correspondientes a la PBP1

Los espectros obtenidos mediante MS y MS/MS de las tres manchas identificadas como PBP1 no mostraron ninguna diferencia apreciable. La existencia de estas tres manchas con una diferencia de tan solo 200 Da, podría deberse a una modificación postraducciona, aunque también cabe la posibilidad que se trate de una falta de reducción de los puentes disulfuro. Con el fin de comprobar esta última hipótesis se realizaron varios extractos donde se adicionaron diferentes concentraciones de DTT 10 mM, 40 mM, 60 mM y 80 mM. A su vez, cada uno de estos extractos se diluyó con dos tampones de rehidratación distinto, uno contenía DTT 5 mM y HED 200 mM y el otro tampón de rehidratación combinado únicamente con DTT 20 mM. En total se realizó un mínimo de dos extractos por cada tratamiento.

Tal como se aprecia en la figura 5.15, independientemente de la cantidad de DTT en el tampón de muestra y de la composición del tampón de rehidratación, sigue apareciendo más de una mancha. Cabe resaltar la diferencia en el patrón proteico expresado en la zona ácida, dependiendo de la presencia de uno o dos agentes reductores en el tampón de rehidratación empleado. En los extractos rehidratados con tampón conteniendo sólo DTT, la zona de pH bajo es poco resolutive, observándose trenes de manchas, en especial en la región donde se encuentran las OBPs, donde es difícil la localización de las mismas. La combinación del DTT y HED permite la obtención de unas manchas mucho más definidas y evita la aparición de trenes de manchas, resultantes de la oxidación inespecífica de las proteínas como consecuencia de la migración del DTT hacia el ánodo.

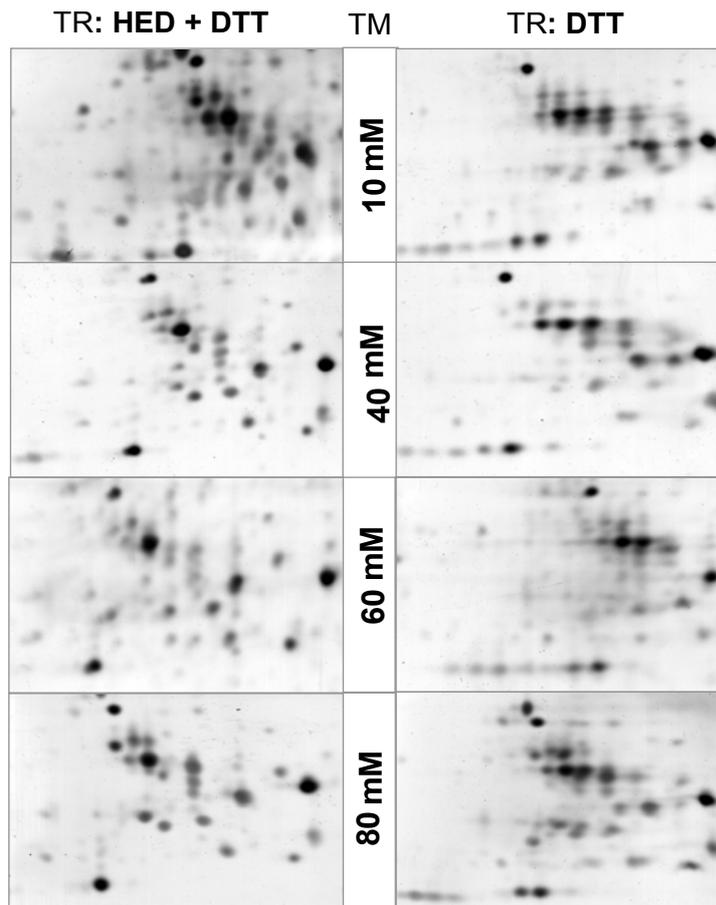


Figura 5.15. Imágenes comparativas de la región de bajo peso molecular (10-20 KDa) y de 4-6 pH en función del porcentaje de agente reductor utilizado en el tampón de muestra (TM) para la preparación del extracto antenal y tampón de rehidratación (TR) utilizado en el enfoque de las proteínas durante la primera dimensión.

5.3.2.7. Respuesta antenal en EAG

Los resultados obtenidos en EAG reflejan la falta de percepción por parte de la hembra de su propio extracto glandular así como de la mezcla sintética, a pesar de que los niveles de expresión de las PBPs son significativos. Los machos en cambio, ofrecen una gran respuesta a ambos agentes estimulantes, presentando una respuesta de > 1 mV frente al extracto de 1 glándula. La respuesta registrada frente a extractos de hojas de la planta hospedante fue similar tanto en machos como hembras (Figura 5.16).

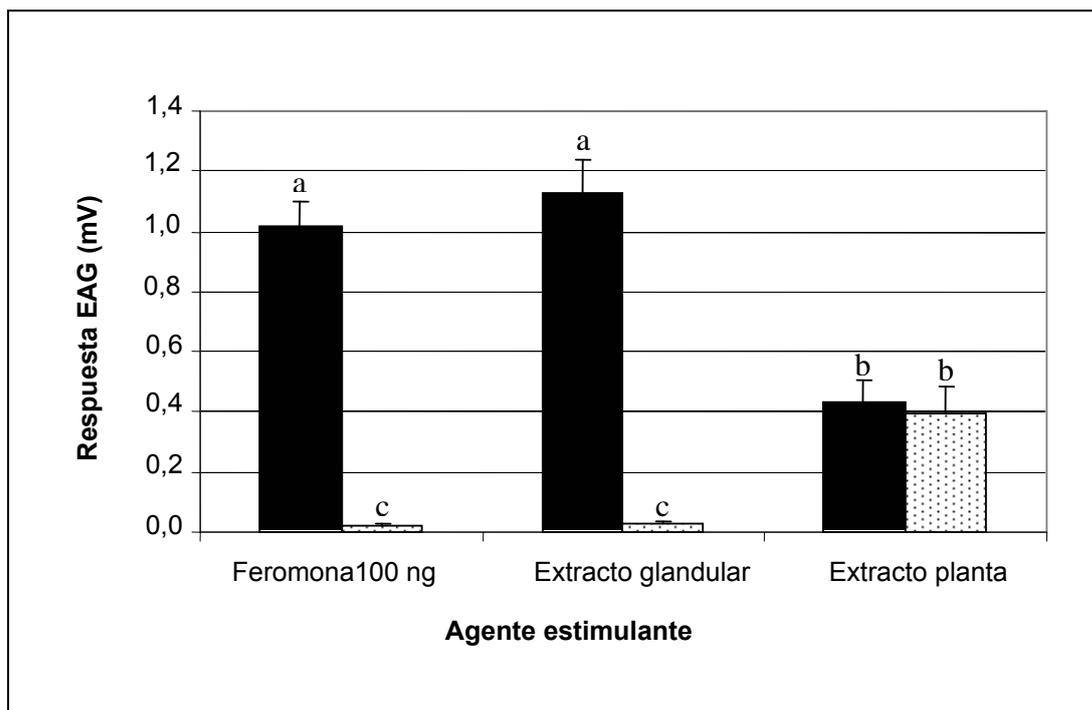


Figura 5.16. Respuesta en EAG de 10 antenas de machos y hembras de *S. nonagrioides* frente a distintos agentes estimulantes. Las barras negras representan los machos y las punteadas las hembras. Las barras corresponden al error típico. Letras iguales sobre columnas indican que no hay diferencias significativas (ANOVA, t de Student, $P < 0,05$).

5.3.3. Estudio de la expresión de las proteínas antenales en machos y hembras de otras dos especies de noctuidos: *Spodoptera exigua* y *Spodoptera littoralis*

Se estudió el patrón proteico expresado en antenas de machos y hembras de dos especies más de la familia Noctuidae, *S. exigua* y *S. littoralis*, en especial las proteínas expresadas en la región donde se encuentran localizadas las OBPs, con el fin de comprobar la semejanza del patrón proteico en las tres especies.

5.3.3.1. *Spodoptera exigua*

5.3.3.1.1. Análisis diferencial de las proteínas antenales

En esta especie, a diferencia de *S. nonagrioides*, no existe una diferencia tan acentuada a nivel macroscópico en la morfología de las antenas entre machos y hembras. En las imágenes tomadas mediante SEM (Figura 5.17), se pudo apreciar ciertas diferencias entre ambos sexos. Al igual que la especie anterior los machos poseen un mayor número de sensilas de tipo tricoideo que las hembras, siendo estas sensilas de mayor tamaño para facilitar la captación de las moléculas de feromona. La abundancia de sensilas

tricoideas se observa desde el extremo distal, con una distribución homogénea hasta el extremo final de la antena. Así mismo, respecto a la cantidad de proteínas total encontrada en los extractos antenales, los machos presentan mayor proporción que las hembras, $7,5 \pm 0,8$ $\mu\text{g}/\text{antena}$ respecto a $4,8 \pm 0,6$ $\mu\text{g}/\text{antena}$ utilizando 10 μL de tampón de extracción por antena. La abundancia total de proteínas hallada en los extractos antenales es menor (casi la mitad) que la encontrada en *S. nonagrioides*.

Una vez teñidas las proteínas tras la separación electroforética y correspondiente análisis general de las imágenes, se determinaron siete manchas que se expresaban de forma diferencial en machos y hembras. Al igual que en *S. nonagrioides*, la mayoría de las manchas expresadas de manera diferencial, concretamente seis, se encontraron en la zona de bajo peso molecular < 25 KDa. Así mismo, estas seis manchas se localizaron en la región comprendida entre 4-6 pl. En adición a las siete manchas diferenciales, se digirieron cuatro más debido a su localización próxima a las manchas identificadas como OBPs en la especie anterior (Figura 5.18). De las siete manchas diferenciales cinco presentaban mayor grado de expresión en machos (**2**, **3**, **4**, **9** y **10**) y dos en hembras (**6** y **11**) (Figura 5.19).

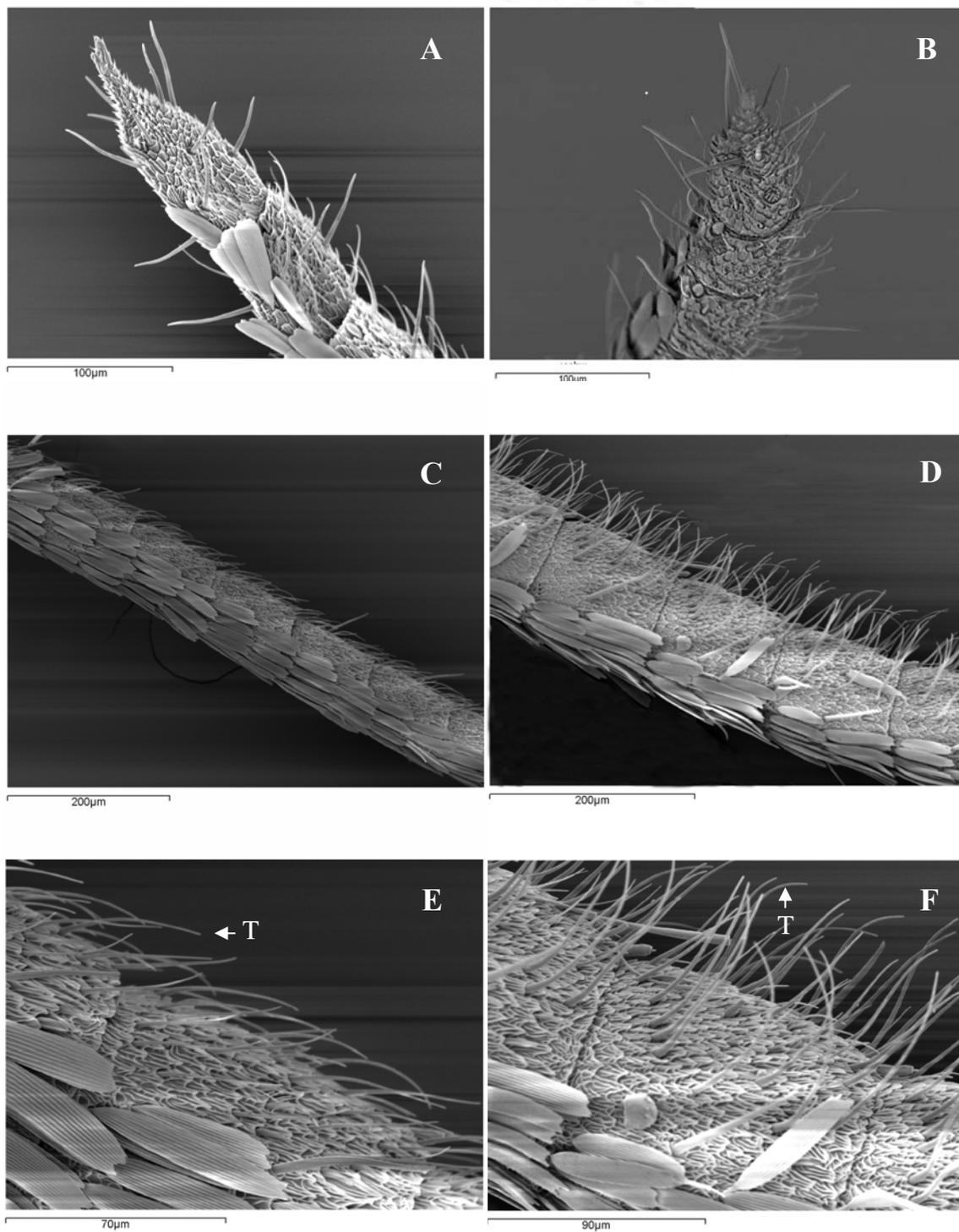


Figura 5.17. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de dos antenas de ambos sexos de *S. exigua*, en la columna izquierda se muestran las hembras y en la derecha los machos. A-B) Extremo distal de una antena, C-D) Zona central de una antena, E-F) Ampliación de un artejo antenal de la zona central de una antena. T: Sensila tricoidea.

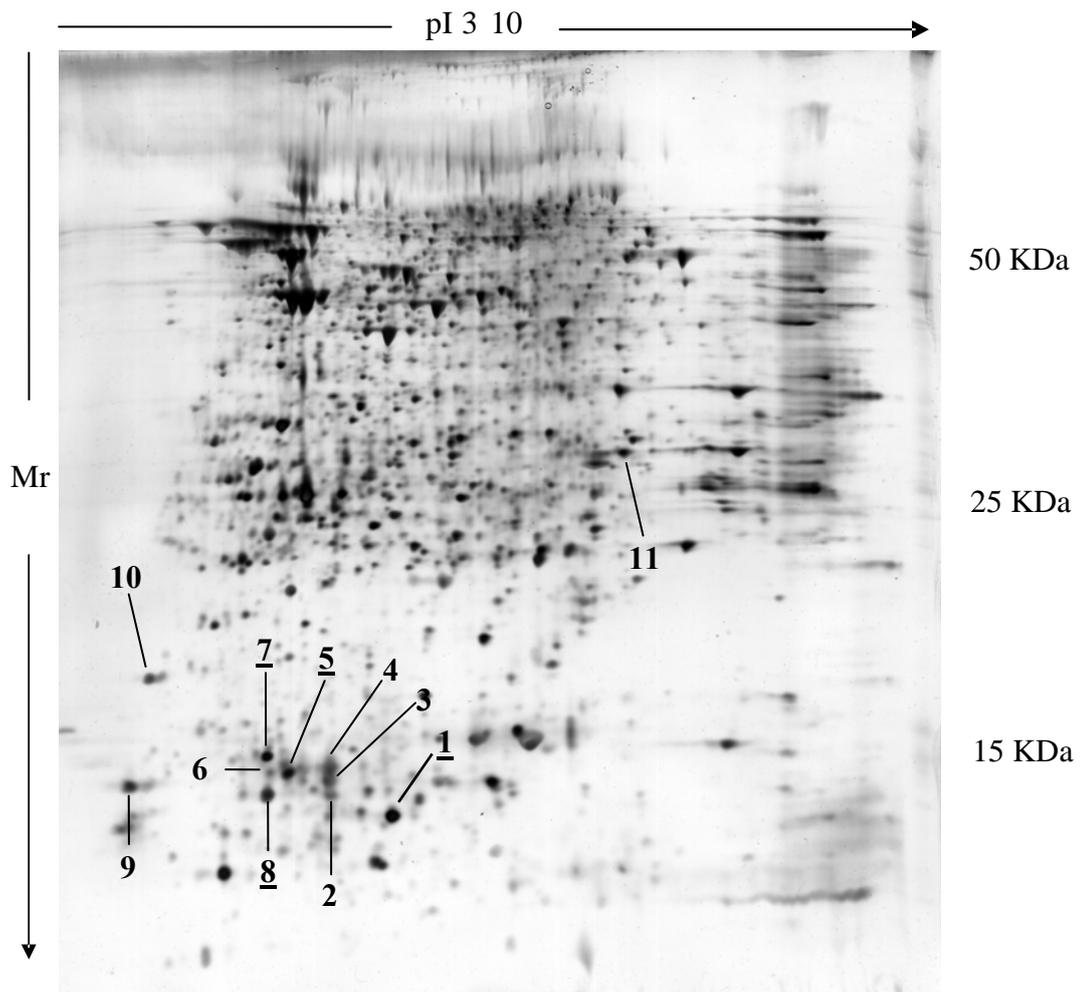


Figura 5.18. Imagen de un gel 2D de un extracto de antenas de machos de *S. exigua*. Las manchas señaladas con un número subrayado presentan el mismo nivel de expresión en ambos sexos.

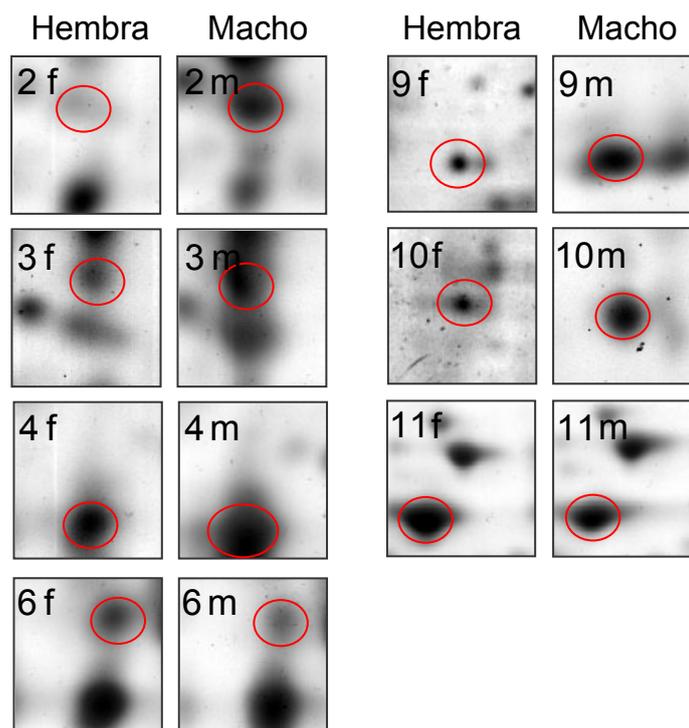


Figura 5.19. Imágenes de las siete manchas diferenciales halladas en los geles 2D de extractos antenales de hembras (f) y machos (m) de *S. exigua*. Los números mostrados corresponden al número de mancha .

5.3.3.1.2. Identificación de las manchas recortadas

Las 11 manchas recortadas, se digirieron con tripsina y el extracto peptídico resultante se sometió a un primer análisis por MALDI-TOF MS. A diferencia de la especie anterior, gracias a esta técnica se pudieron llegar a identificar cinco de las manchas digeridas. Las manchas correspondientes a los números **2**, **3** y **4** fueron determinadas como PBP1. Al igual que ocurrió en *S. nonagrioides*, tres manchas con el mismo pl, con una diferencia aproximada de 200 Da, fueron identificadas como PBP1 de *S. exigua*, caracterizada por Xiu y Dong en el 2007¹⁵⁷. La mancha **8** se identificó como PBP2 de la misma especie objeto de estudio¹⁵⁷; finalmente la mancha **5**, se logró identificar como GOBP2. De estas tres proteínas pertenecientes a la familia de las OBPs, las tres manchas pertenecientes a la PBP1, se expresaban con mayor intensidad en machos que en hembras, tal y como ocurría en *S. nonagrioides*, sin embargo, en *S. exigua*, ni la PBP2 ni la GOBP2 mostraron diferencias de expresión entre ambos sexos. Las seis manchas restantes que no pudieron ser identificadas mediante MALDI-TOF MS, se analizaron mediante LC-MS/MS así como dos de las manchas anteriormente identificadas (**3** y **4**). En este análisis posterior, se consiguió identificar las manchas **1** y **7** y se corroboró que las manchas **3** y **4** correspondían a la PBP1. Las manchas correspondientes a los números **6**, **9**, **10** y **11** no pudieron ser identificadas porque los espectros obtenidos no presentaban una señal

suficientemente abundante. De las dos manchas identificadas, la **1** resultó ser la proteína de unión del ácido retinoico, de igual expresión en ambos sexos y la **7** se identificó como ATP-sintasa, igualmente expresada de manera similar en machos y hembras. En la tabla 5.2 se muestran las diferentes proteínas identificadas en esta segunda especie de noctuido.

Tabla 5.2. Proteínas identificadas en *S. exigua* por MALDI-TOF MS y LC-MS/MS.

Número mancha	Nombre	Mr/pi		Secuencia	Especie	Número acceso
		Teor. ¹	Exp. ²			
1	CRABP ³	15/5.6	13/5.8	VGEEFDEDR	<i>M. sexta</i>	AAC24317
				VTPTVELR		
2	PBP1	16/5.3	13/5.3	-	<i>S. exigua</i>	ABK41046
3	PBP1	16/5.3	14/5.3	DAADDFR	<i>S. exigua</i>	ABK41046
				VLELSK		
4	PBP1	16/5.3	15/5.3	VLEISK	<i>S. exigua</i>	ABK41046
				HIMPDMYNYVVR		
5	GOBP2	16/5.2	15/4.6	ELGCAIICMSNK	<i>S. exigua</i>	CAC12831
7	ATP-sintasa	17/5.7	15/4.8	SAAQEALSK	<i>B. mori</i>	NP001093091
8	PBP2	16/5.1	14/4.8	-	<i>S. exigua</i>	ABK41049

¹ Teor.: Teórica

² Exp.: Experimental

³ CRABP: Proteína de unión al ácido retinoico celular.

5.3.3.2. *Spodoptera littoralis*

5.3.3.2.1. Análisis diferencial de las proteínas antenales

La especie *S. littoralis* (Figura 5.20), al igual que *S. exigua* no presenta dimorfismo sexual en las antenas a nivel macroscópico, pero sí se observan ciertas diferencias a nivel microscópico. Gracias a la microscopía electrónica se ha podido observar las antenas con mayor detalle, comprobando así la existencia de ciertas diferencias entre las sensilas antenales de ambos sexos. Tal y como se aprecia en la figura 5.21 no existen diferencias apreciables en el extremo distal de la antena pero a lo largo de ésta y de manera similar a lo observado en las dos especies estudiadas con anterioridad, la longitud y el número de sensilas de tipo tricoideo en cada segmento antenal es mayor en machos que en hembras, aunque esta diferencia no es tan evidente como en *S. nonagrioides*.



Figura 5.20. Adulto de *S. littoralis*.

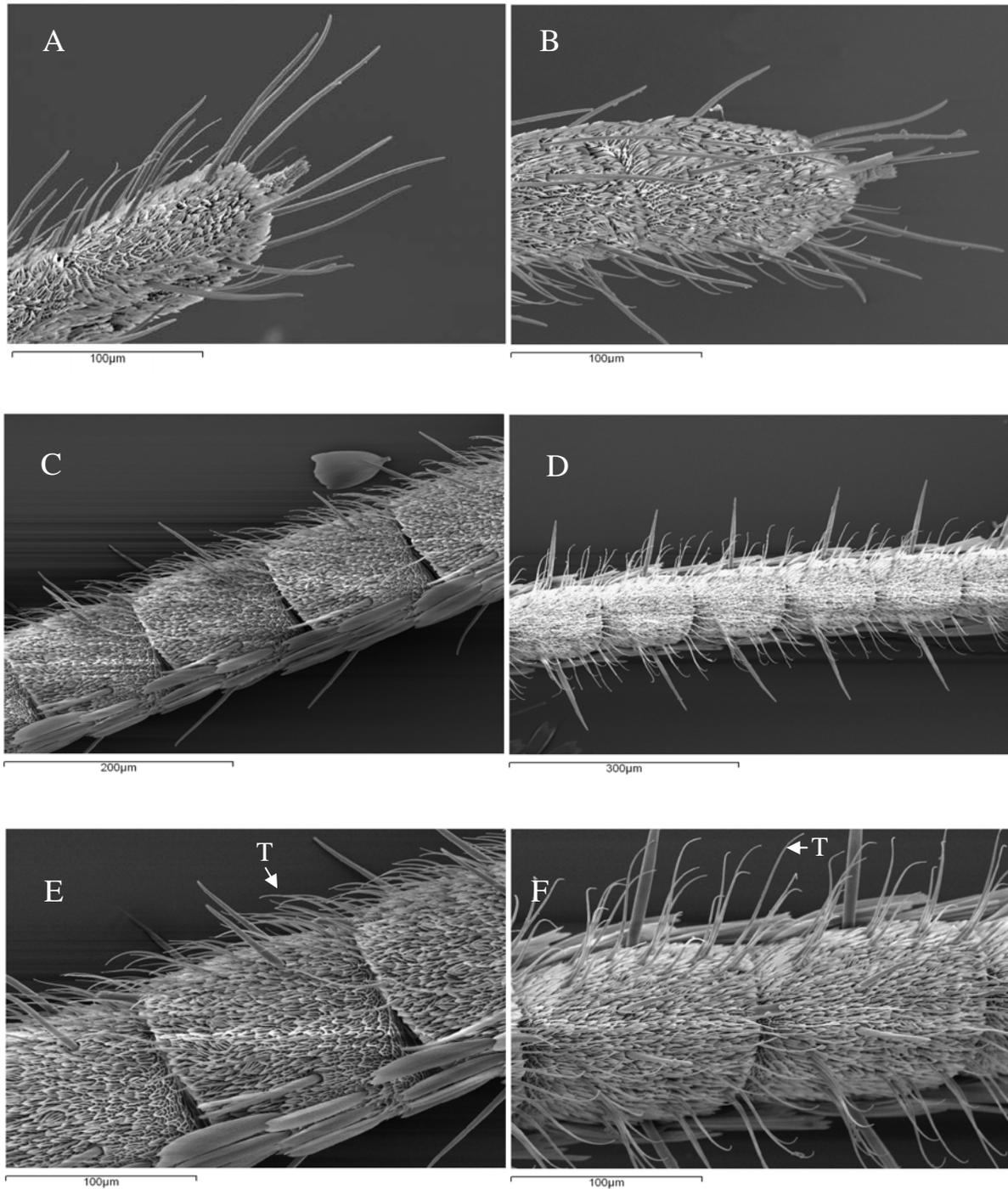


Figura 5.21. Fotografías de microscopía electrónica de barrido de dos antenas de ambos sexos de *S. littoralis*, en la columna izquierda se muestran las hembras y en la derecha los machos. A-B) Extremo distal de una antena, C-D) Zona central de una antena, E-F) Ampliación de un artejo antenal de la zona central de una antena. T: Sensila tricoidea.

La longitud de la antena de *S. littoralis* es similar en ambos sexos pero mayor en comparación con las otras dos especies. La cantidad de proteína total encontrada en los extractos antenales resultó ser superior a la hallada en los otros dos noctuidos. No obstante la relación abundancia proteína/sexo siguió siendo más elevada en los machos, hallando una cantidad de $15,22 \pm 1,12$ μg proteína/antena respecto a $12,32 \pm 1,37$ μg proteína/antena en hembras.

Tras el análisis de imagen correspondiente se detectó una media de 900 manchas, de las cuales tan solo una resultó ser diferencial. Esta mancha se encontró localizada en la zona correspondiente a las OBPs, la cual fue recortada y digerida con tripsina así como otras manchas situadas alrededor, en total se recortaron ocho manchas. En la figura 5.22 se muestran las manchas recortadas.

Cada uno de los extractos peptídicos resultantes de la digestión de las ocho manchas se sometió a un primer análisis por MALDI-TOF MS. Mediante esta técnica se pudieron identificar cinco manchas, las correspondientes a los números **2**, **4**, **5**, **6** y **7**. La mancha número **2** se identificó como FABP3, por su similitud a la secuencia de esta proteína en la especie *M. sexta*. La mancha **4**, se identificó como GOBP1 y PBP1 de *S. littoralis*. La número **5** resultó como PBP1, la **6** como PBP2 y la **7** como GOBP2 de *S. littoralis*.

Los extractos peptídicos pertenecientes a las manchas representadas como **1**, **3** y **8** se analizaron por LC-MS/MS, mediante la cual se pudo llegar a la identificación de las tres. La perteneciente al número **1** se identificó como CRABP, la mancha número **3** correspondía a GOBP1 y finalmente la mancha **8** se identificó por homología como PBP4 de *S. frugiperda* (Tabla 5.3).

En el caso de la mancha **4**, la presencia de péptidos pertenecientes a dos proteínas distintas resultó ser consecuencia de la presencia de varias proteínas en una misma mancha. La utilización de un rango de pH menor (pH 4-7) permitió una mayor separación de las proteínas situadas en esta zona pudiéndose así visualizar dos proteínas muy cercanas en lugar de una única mancha como aparecía en los geles de pH más amplio (pH 3-10) (Figura 5.23). La mancha denominada como **4** resultó ser identificada como PBP1 mediante MALDI-TOF MS y la **4a** no pudo confirmarse. La cercanía de esta mancha a la PBP1 y GOBP1 de mayor expresión, resultó en una segunda contaminación de péptidos entre ambas proteínas, dificultando la identificación de la misma.

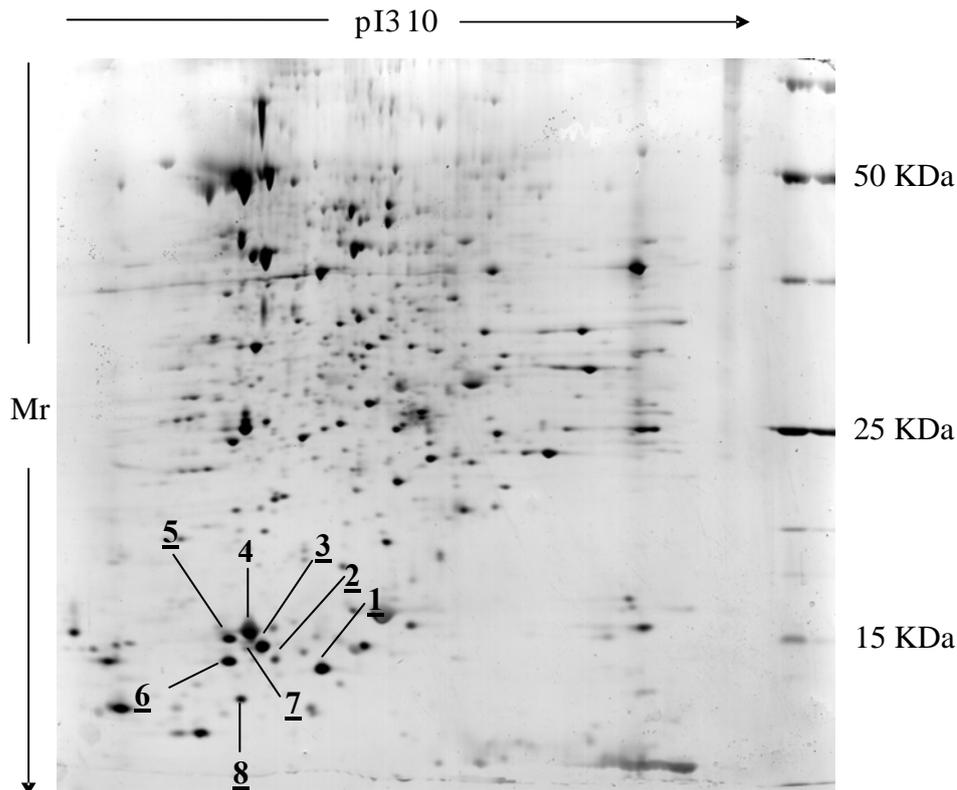


Figura 5.22. Imagen de un gel bidimensional de un extracto antenal de machos de *S. littoralis* de 18 cm y pH 3-10. Aparecen señaladas en círculo las manchas recortadas para ser digeridas. Un número subrayado indica las manchas no diferenciales.

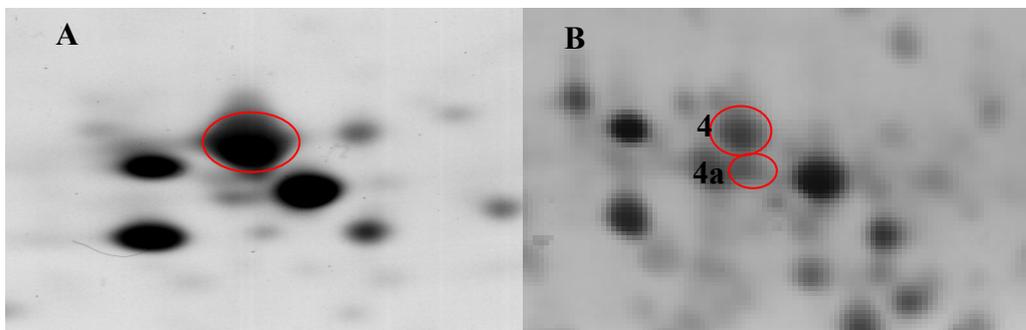


Figura 5.23. Imagen de la zona de 4-5 pI de un gel 2D de 18 cm y distinto pH. A) pH 3-10 B) pH 4-7. Aparecen señaladas las dos manchas que se unen en los geles de pH 3-10.

En la figura 5.24 puede observarse la expresión en ambos sexos de cada una de las manchas recortadas, la mancha correspondiente al número 4 es la única que difiere en cuanto nivel de expresión, siendo mayor en machos que en hembras, las otras siete manchas se expresan de manera similar.

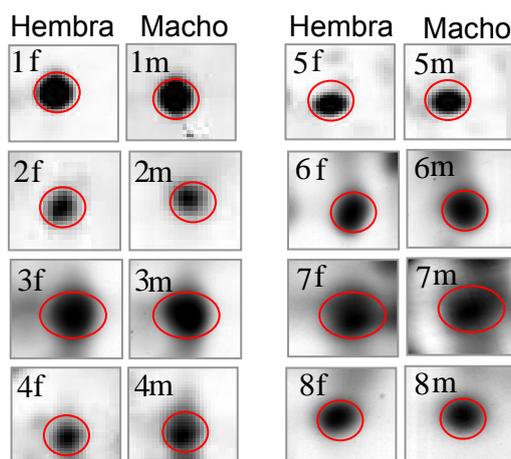


Figura 5.24. Imágenes de las ocho manchas recortadas en geles 2D de extractos antenales de hembras (f) y machos (m) de *S. littoralis*. Los números mostrados corresponden al número de mancha.

Tabla 5.3. Proteínas identificadas en *S. littoralis* por MALDI-TOF MS y LC-MS/MS.

Número mancha	Nombre	Teor. ¹	Mr/pl	Exp. ²	Secuencia peptídica	Especie	Nº acceso
1	CRABP ³	18/5.6		18/5.7	MVSSNFDEFMK AADGMEVSYLR	<i>M. sexta</i>	AAC24317
2	FABP ⁴	15/6.4		19/5.5	GPEEMK MVSSNFDEFMK	<i>H. armigera</i>	ACB54950
3	GOBP1	17/5.2		19/5.3	-	<i>S. littoralis</i>	u.d. ⁵
4	PBP1	19/5.4		20/5.3	-	<i>S. littoralis</i>	u.d.
5	PBP1	19/5.4		20/5.3	-	<i>S. littoralis</i>	u.d.
6	PBP2	18/5.2		19/5.2	-	<i>S. littoralis</i>	u.d.
7	GOBP2	19/5.3		20/5.3	-	<i>S. littoralis</i>	u.d.
8	PBP4	16/5.4		16/5.3	VVSDGEAG(CamC) ⁶ ER RPLTS(CamC)FLEHK	<i>S. frugiperda</i>	AAX98168

¹ Teor.: Teórica

² Exp.: Experimental

³ CRABP: Proteína de unión al ácido retinoico celular.

⁴ FABP: Proteína de unión a ácidos grasos.

⁵ U.d.: Datos sin publicar

⁶ CamC: Carboxiamidometilcisteína

5.3.3.3. Respuesta antenal en EAG de ambas especies del género *Spodoptera*

Tanto en *S. littoralis* como en *S. exigua* la respuesta del macho frente al extracto glandular fue mayor que la de las hembras, siendo la de *S. littoralis* más elevada. Respecto a las hembras, no sólo se observó una respuesta frente a su propia mezcla feromonal en *S. littoralis* como había sido descrita por otros autores¹⁵⁸ sino también en *S. exigua*, siendo la misma de igual intensidad en ambas especies (Figura 5.25).

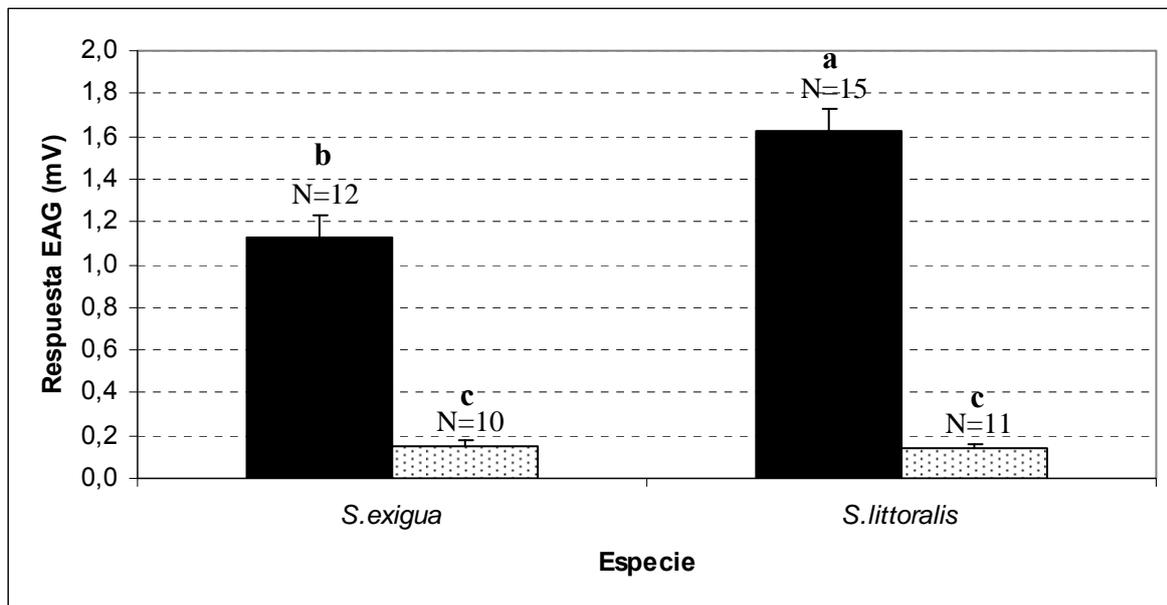


Figura 5.25. Respuesta en EAG de antenas de machos y hembras de *S. exigua* y *S. littoralis* frente a extracto de una glándula feromonal de hembra de la correspondiente especie. Las barras negras representan los machos y las punteadas las hembras. Las barras de error corresponden al error típico. Letras iguales sobre columnas indican que no hay diferencias significativas (ANOVA, test t de Student $P < 0,05$).

5.4. DISCUSIÓN

La utilización de técnicas proteómicas nos ha permitido realizar un estudio diferencial de las proteínas expresadas en las antenas de tres especies de lepidópteros de la familia Noctuidae: *S. nonagrioides*, *S. exigua* y *S. littoralis*, cuya composición feromonal, aunque similar en algunos compuestos feromonales, es bastante dispar. En *S. nonagrioides* consiste en Z11-16:Ac, Z11-16:OH, Z11-16:Ald y 12:Ac en una proporción 69:8:8:15¹⁵⁹, *S. exigua* Z9,14:Ac, Z9,E12-14:Ac, Z9-14:OH, Z11-16:Ac 40:34:22:4 (ver resultados capítulo 4, pág. 73) y *S. littoralis* Z9,E11-14:Ac, Z9-14:Ac, E11-14:Ac, 14:Ac y Z11-14:Ac en proporción 66:12:11:2:9¹⁶⁰.

La importancia principal de este estudio radica no sólo en la novedad del empleo de dichas técnicas para la identificación de proteínas relacionadas con la olfacción, sino en la posibilidad de realizar un estudio comparativo del patrón de expresión de estas proteínas en diferentes especies y sobretodo en el grupo objeto de estudio, los insectos, ya que la inmensa mayoría de análisis realizados en proteómica se basan en plantas y humanos.

Dentro de las proteínas implicadas en el proceso de olfacción o captación de moléculas olorosas, se ha hecho mayor énfasis en las proteínas incluidas dentro del grupo de las OBPs, debido en gran parte a su elevada importancia en su supuesta función de transporte de moléculas de olor en ambos sexos.

Gracias a la utilización de tiras de acrilamida con un rango de pH comprendido entre 3-10 hemos podido visualizar el patrón de expresión general de las proteínas halladas en las antenas de machos y hembras. Esto nos ha permitido observar la gran similitud de las OBPs en cuanto a localización se refiere. Dicha situación se encuentra en la región comprendida entre 4 y 6 pH y zona de peso molecular < 20 KDa.

Para la obtención de imágenes de geles bidimensionales comparables la cantidad de proteína cargada fue de 100 µg para cada sexo y especie, ya que el total de proteína obtenida en los diferentes extractos antenales difirió bastante. En las tres especies, la cantidad de proteína fue mayor en machos que en hembras, posiblemente debido a la mayor superficie sensorial hallada en los machos para la mejor captación de las moléculas de feromona emitidas por las hembras. Así mismo, de las tres especies objeto de estudio, las antenas de machos de *S. littoralis* presentaron una cantidad total de proteína mayor que las otras dos especies. Las antenas con menor porcentaje de proteína se encontraron en *S. exigua* con 7,47 µg/antena frente a los 15,22 y 12,61 µg/antena de *S. littoralis* y *S. nonagrioides* respectivamente.

Desde el descubrimiento de la primera OBP, la PBP en la especie *A. polyphemus*, se han llegado a identificar un elevado número de proteínas similares según la secuencia de aminoácidos, a esta PBP en otras especies. Estas proteínas se han dividido en cuatro clases en función de la secuencia aminoacídica, las PBPs, GOBPs1 y GOBPs2 y la proteína X de unión antenal (ABPX)¹⁶¹. Las GOBPs se encuentran muy conservadas en las diferentes especies mientras que las PBPs presentan una mayor diversidad, presentando una homología en la secuencia de aminoácidos del 32-90%¹⁶².

Las diversas PBPs presentes en una misma especie difieren en la secuencia primaria, por ejemplo, las dos PBPs de *Lymantria dispar* muestra tan solo 49,7% de identidad¹²⁷, las dos PBPs de *Mamestra brassicae* un 40,6%¹⁶³ y la especie *Agrotis ipsilon* mantiene un 50% de identidad entre ambas PBPs¹³⁴. Esta diversidad de la secuencia entre especies podría estar relacionada con la discriminación de la mezcla feromonal mediante la unión selectiva a distintos compuesto feromonales¹⁶⁴.

Hay varios estudios que apoyan la especificidad de cada una de las PBPs por uno de los compuestos feromonales^{150, 165}. Análisis realizados acerca de la especificidad de ligando de dos PBPs recombinantes de la especie *Antheraea pernyi* (Aper-1 y Aper-2) mostraron como cada una de las dos proteínas mostraba más afinidad por uno de los compuestos de la mezcla feromonal^{166, 167}, al mismo tiempo las proteínas Aper-1 y Apol-3 de *A. polyphemus* presentaron a su vez, una alta afinidad por el mismo compuesto. Este hecho ha sido igualmente observado en otras muchas especies, la PBP2 de *M. brassicae* (Mbra-2) se ha visto que presenta una alta homología en el extremo N-terminal con la PBP de otra especie de la familia Noctuidae como es *H. virescens*¹²³, ambas especies poseen el compuesto Z11-16:Ald dentro de su composición feromonal, por lo que posiblemente dichas PBPs presenten afinidad por este compuesto¹⁶⁸. Así mismo, diversos estudios han mostrado cómo ciertos aminoácidos de la cavidad de unión al ligando juegan un papel crucial en el reconocimiento de la longitud de la cadena de la feromona.

Gracias a la previa caracterización de las PBPs de las especies incluidas en este estudio por otros autores así como el cierto grado de similitud entre las mismas han permitido la identificación de estas proteínas mediante las distintas técnicas espectroscópicas. Cuatro de ellas, las correspondientes a la PBP1 y PBP2 de *S. exigua* así como la PBP1 y PBP2 de *S. littoralis* se consiguieron identificar directamente por los espectros resultantes en MALDI-TOF MS, posteriormente reconfirmadas en LC-MS/MS y las dos PBPs, 1 y 2 de la especie *S. nonagrioides* mediante ESI-MS/MS.

Las distintas PBP1s presentan mayor grado de similitud entre las tres especies que entre las dos PBP1s encontradas en cada una de las especies. Así pues, la PBP1 de las tres especies estudiadas en este capítulo presentan un 56,9% de homología entre todas ellas, la PBP1 de *S.nonagrioides* comparte un 61,8% de la secuencia de aminoácidos con la PBP1 de *S.exigua* (Figura 5.26) y un 64,2% con la de *S. littoralis* mientras que las dos PBP1s de ambas *Spodoptera* presentan un 72,7% de homología, esto podría deberse, como se ha hipotetizado con anterioridad, a la presencia de moléculas de feromona comunes entre ambas especies tales como el compuesto Z9-14:Ac y el Z9,E12-14:Ac.

En el caso de la PBP2 el grado de conservación es también mayor entre especies que intraespecíficamente. Entre las tres especies existe un 60% de homología en la secuencia de aminoácidos. El mayor grado de similitud se observa en la PBP2 de ambas *Spodoptera* (80,6%), igual que con la PBP1, la semejanza en algunos compuestos feromonales así como la mayor cercanía filogenética, posiblemente favorezca esta gran similitud de secuencia. La PBP2 de *S. nonagrioides* con la de *S. exigua* presenta un 60,6% de homología (Figura 5.27) frente a un 67,6% con la de *S. littoralis*. Puesto que no existen similitudes entre la composición feromonal de *S. nonagrioides* y *S. littoralis* y son mínimas con *S. exigua*, ya que el único compuesto feromonal en común es el Z11-16:Ac, el cual es el más abundante en *S. nonagrioides* y minoritario en *S. exigua* (ver resultados capítulo 4), la similitud entre PBP2s con la especie *S. nonagrioides* podría estar relacionada con el tipo de grupo funcional hallado en la mezcla feromonal, ya que las tres especies presentan acetatos en su composición. O tal vez se deba a la unión a otro tipo de molécula odorífera, tipo volátiles de la planta hospedadora, ya que las tres especies son capaces de atacar a la planta de maíz. Esto concordaría con los resultados obtenidos en ensayos realizados con la PBP de *B. mori*, los cuales revelaron una capacidad de unión con ligandos no feromonales, aunque con una menor afinidad¹⁶⁹ Igualmente, estudios realizados con la PBP1 de *A. polyphemus* mostraron que era capaz de unirse a los tres compuestos feromonales con aparente alta afinidad a pHs básicos. Sin embargo en ensayos de competitividad, la PBP1 mostraba una clara preferencia por el componente mayoritario de la mezcla feromonal¹⁷⁰. Estos resultados indican la posible unión de PBP2s a moléculas feromonales diferentes de las de su propia mezcla, si bien con una menor afinidad.

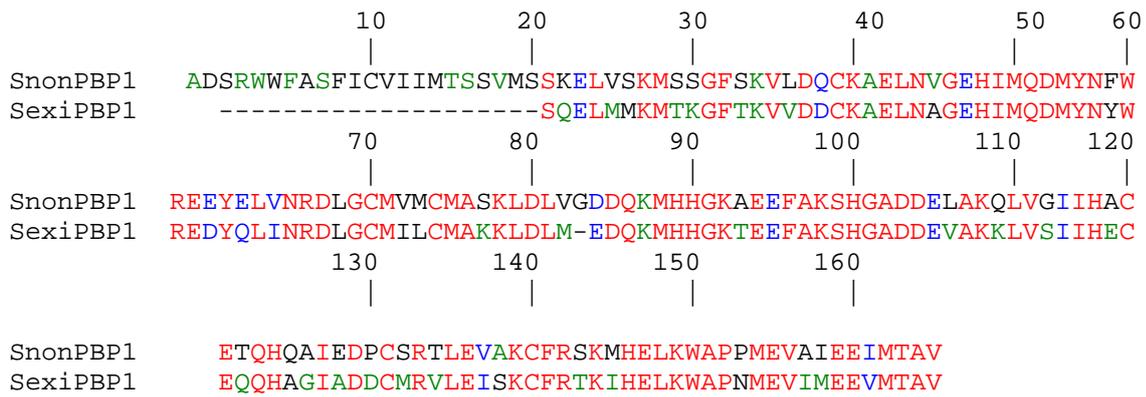


Figura 5.26. Alineamiento de la PBP1 de dos de las especies estudiadas, *S. nonagrioides* y *S. exigua*. Los aminoácidos en rojo son los comunes en las dos especies con un grado de conservación del 90%, los coloreados en verde o azul se encuentran conservados entre 50-90% y los que aparecen en negro son diferentes en las dos especies.

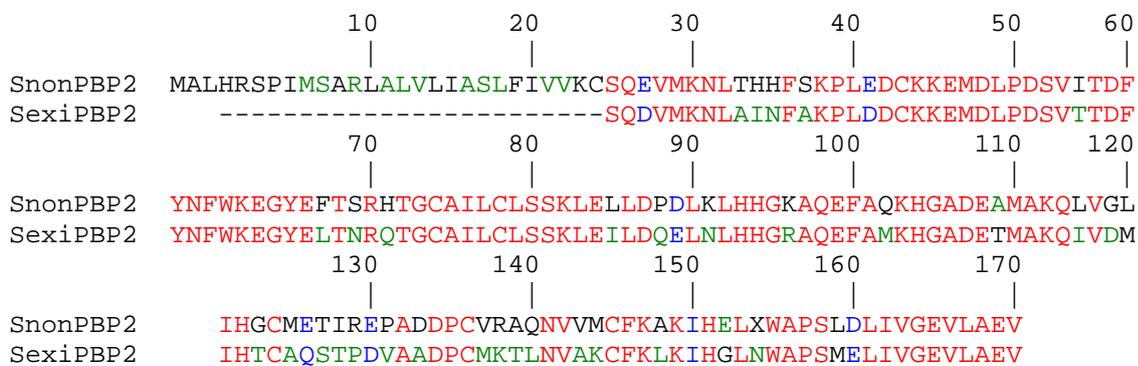


Figura 5.27. Alineamiento de la PBP2 de dos de las especies estudiadas, *S. nonagrioides* y *S. exigua*. Los aminoácidos en rojo son los comunes en las dos especies con un grado de conservación del 90%, los coloreados en verde o azul se encuentran conservados entre 50-90% y los que aparecen en negro son diferentes en las dos especies.

Por otro lado, la PBP1 y PBP2 de *S. nonagrioides* presentan un 39,4% de homología entre ellas, las 2 PBPs de *S. exigua* un 44,8% y las 3 PBPs identificadas en *S. littoralis* muestran un 31,3% de homología, presentando entre las mismas el mismo grado de conservación, es decir, PBP1-PBP2 41,6%, PBP1-PBP3 43,9% y PBP2-PBP3 43,9%. En nuestro caso la PBP3 de *S. littoralis* no se identificó en los geles realizados. Así pues, esta diferencia en el grado de conservación entre las PBPs de una misma especie podría estar así mismo relacionada con la diferente afinidad por los diversos compuestos de la mezcla feromonal.

Respecto a las GOBPs se encuentran igualmente más conservadas interespecíficamente que dentro de la misma especie, siendo la secuencia de aminoácidos para la misma proteína similar en las tres especies. La alineación de las secuencias correspondientes a la GOBP2 de *S. exigua*, *S. littoralis* y *H. virescens*, cuya secuencia permitió la identificación de la GOBP2 de *S. nonagrioides*, mostró un grado de homología de 81,5%

y de 90,1% entre las dos *Spodoptera*. El grado de similitud entre la GOBP1 de *S. littoralis* y la de *H. assulta*, cuya secuencia de aminoácidos permitió la identificación de esta proteína por homología con *S. nonagrioides* es de 79,8%. Así como ocurre con las PBPs, la secuencia en este tipo de proteínas dentro de la misma especie no se haya tan conservada, tal es el caso, de las dos GOBPs, 1 y 2, de *S. littoralis*, las cuales presentan sólo un 47,4% de similitud de secuencia entre ellas.

La primera PBP descrita se encontró expresada únicamente en antenas de machos de la especie *A. polyphemus*. Debido a esta observación y por su localización en el fluido extracelular que bañan las células receptoras de feromonas así como su capacidad de unión a moléculas de feromona se pensó que sólo se expresaban en los machos. Diversos autores apoyan que las PBPs se expresan de manera prioritaria y más abundantemente en las antenas de machos de varias especies, tal es el caso de *L. dispar* y *Orgyia pseudosugata* (Lymantridae) *A. pernyi*¹⁷¹, *A. polyphemus*¹²⁵ y *Hyalophora cecropia* (Saturniidae) y *B. mori* (Bombycidae)¹⁷² entre otras. Estudios posteriores en la especie *M. sexta* (Sphingidae) revelaron altos niveles de expresión de las PBPs en antenas de machos pero también eran detectables en hembras, aunque en niveles más bajos¹⁷³. Posteriormente, ensayos inmunológicos demostraron la expresión de PBPs en hembras de algunas especies donde no habían sido observadas con anterioridad, tal es el caso de *A. polyphemus*, *A. pernyi* y *B. mori* así como en otros lepidópteros, aunque siempre los niveles de expresión encontrados fueron mucho menores que los observados en machos. Así mismo, en algunas especies de la familia Noctuidae, se observaron altos niveles de expresión de las PBPs, tal es el caso de *M. brassicae*, *Helicoverpa armigera*¹⁷⁴, *H. virescens*¹²⁹, *Autographa gamma*¹⁷⁴ o *S. littoralis*¹⁷⁴. En las tres especies estudiadas a lo largo de este capítulo se ha observado expresión de varias PBPs en ambos sexos. En todas ellas, se han podido identificar más de una PBP, lo cual coincide con los hallazgos de otros autores en estas especies, aunque con una cierta disparidad. Como se ha comentado con anterioridad, en la especie *S. littoralis*, donde se ha conseguido secuenciar tres PBPs, la PBP1, PBP2 y PBP3, (Jacquin-Joly, comunicación personal), la PBP3 no se ha podido identificar mediante la utilización de geles 2D, aunque sí se ha identificado otra PBP no identificada previamente en esta especie, la PBP4, por homología con la PBP4 de *S. frugiperda*. Esto podría deberse a un error de secuenciación en la PBP3 o tal vez por encontrarse enmascarada con alguna otra proteína más abundante de punto isoeléctrico y masa molecular similar.

Por lo general, en la mayoría de las PBPs identificadas, se observa un patrón de expresión diferencial, aunque no en todas ellas se cumple una correlación entre el grado de expresión y el sexo. En las tres especies estudiadas, las proteínas identificadas como

PBP1 mostraron un mayor grado de expresión en machos, manteniéndose dichos niveles elevados de expresión a lo largo del fotoperiodo, tal como se ha observado en los estudios de expresión diferencial de las OBPs a lo largo del fotoperiodo en *S. nonagrioides*. Sin embargo esta diferencia de expresión no fue observada en la PBP2, que se expresó de manera similar en antenas de machos y hembras tanto de *S. exigua* como de *S. littoralis*. En la tercera especie en estudio, *S. nonagrioides*, la PBP2 al igual que la PBP1, se halló con un mayor grado de expresión en machos. La función principal de las PBPs es supuestamente, la de transportar moléculas de feromona a los receptores situados en las dendritas de las neuronas olfativas, así pues, la mayor expresión de esta proteína en machos denota una mayor actividad sensorial en el transporte de compuestos feromonales con la correspondiente captación de los mismos. Por otro lado, la expresión de las PBPs en hembras podría estar implicada así mismo, en la detección de su propia mezcla feromonal o al menos de ciertos compuestos. De hecho, se ha observado que varias hembras de diversas especies son capaces de autodetectar su feromona. Ejemplos de las mismas son *Panaxia quadripunctata*¹⁷⁵, *Tricoplusia ni*¹⁷⁶, *M. sexta*¹⁷⁷ o *S. littoralis*¹⁵⁸ entre otras. Ensayos previos de electrofisiología realizados en esta última especie por otros autores, demostraron que las hembras eran capaces de responder a varios compuestos feromonales, aunque por lo general la respuesta obtenida era de menor magnitud que la ofrecida por el macho¹⁵⁸. En los ensayos de EAG realizados en nuestro laboratorio se ha podido comprobar cómo la hembra de esta especie es capaz de responder con una respuesta de 0,15 mV al extracto de una glándula feromonal frente a una despolarización de 1,6 mV por parte del macho. Así mismo, la hembra de *S. exigua* también responde a la mezcla feromonal encontrada en los extractos de glándula con la misma intensidad que la hembra de *S. littoralis*, siendo mayor igualmente, la respuesta obtenida con antenas de machos frente al mismo agente estimulante, aunque en este caso de menor magnitud que la observada en *S. littoralis*. Los elevados niveles de expresión de ambas PBPs en *S. littoralis* así como la PBP2 en *S. exigua* podrían estar relacionadas con el transporte y consiguiente detección de moléculas de feromona. Esto a su vez, explicaría la baja expresión tanto de la PBP1 como de la PBP2 en hembras de *S. nonagrioides*, donde se ha comprobado la falta de respuesta frente a su mezcla feromonal mediante EAG.

La presencia de varias manchas pertenecientes a la misma proteína como es el caso de la PBP1 hallada en las tres especies, con el mismo espectro peptídico, podría ser debido a algún tipo de modificación postraduccional como glicosilaciones o falta de reducción de los puentes disulfuro. Según autores la primera posibilidad no es del todo viable como consecuencia de la falta de sitios de glicosilación unidos al N putativo¹⁷⁸, aunque más

factible que la falta de reducción. Los geles de extractos antenales realizados con diferentes cantidades de agente reductor (DTT), así como la rehidratación previa a la primera dimensión con dos tampones diferentes, conteniendo uno o dos agentes reductores, no lograron obtener una única mancha de PBP1. Lo único que se extrajo de estos ensayos fue una mejor resolución de los geles mediante la utilización de los dos agentes reductores.

A diferencia de las PBPs, las GOBPs se vio en un principio que se expresaban igual en machos y en hembras de varias especies como *M. sexta*¹³⁶, *A. pernyi* y *A. polyphemus*¹³⁵. En cambio la expresión de estas proteínas en especies, como *B. mori*¹³⁵, *Epiphyas postvittana*¹⁷⁸ y *S. nonagrioides*¹⁷⁹, era mayor en hembras. En esta última especie, la GOBP que mostraba mayor grado de expresión en comparación con la de machos, fue la GOBP2, mientras que en nuestro estudio la GOBP que resultó diferencial en ambos sexos de *S. nonagrioides* fue la GOBP1¹⁸⁰. Esta disparidad podría ser debido a que la proteína identificada como GOBP2 por otros autores¹⁷⁹ se determinó gracias a la utilización de un anticuerpo de la GOBP2 de *M. sexta*, la cual podría tratarse de la GOBP1 pero debido a la elevada similitud entre especies y la utilización de un anticuerpo de una única GOBP determinó la identificación de la misma como GOBP2. Por el contrario en nuestro caso se identificó mediante ESI-MS/MS como GOBP1, ya que la secuencia era muy similar a la GOBP1 de *H. assulta*. Por el contrario, la otra proteína identificada en *S. nonagrioides* por homología como GOBP2, se encontraba expresada de manera similar en ambos sexos. Respecto a las otras dos especies del género *Spodoptera*, la GOBP1 y GOBP2 de *S. littoralis* así como la GOBP2 de *S. exigua* se expresaban con la misma intensidad en machos y hembras. La función de este grupo de proteínas se encuentra relacionada con el transporte de moléculas de olor de tipo más general, como pueden ser los volátiles de plantas como alcoholes e isoprenoides¹⁸¹. La captación de los volátiles de la planta hospedadora puede ser de gran relevancia para ambos sexos. En machos de varias especies es fundamental para favorecer la estimulación, así como la localización de la hembra conespecífica, la cual se ha de hallar cerca de un sitio idóneo para el desarrollo de la progenie. Ensayos realizados por otros autores han mostrado que varios volátiles de planta permiten aumentar la capacidad de atracción de la mezcla feromonal emitida por la hembra en muchas especies de noctuidos¹⁸²⁻¹⁸⁴. Así mismo las hembras requieren de la captación de este tipo de volátiles para encontrar un sitio adecuado para la oviposición y posterior alimentación de las larvas para la supervivencia de la progenie¹⁸⁵.

El estudio de la diferencia de expresión de las diferentes OBPs a lo largo del fotoperiodo, así mismo, mediante la realización de geles 2D SDS-PAGE, ha permitido corroborar los

resultados obtenidos con anterioridad. La expresión de las dos PBPs identificadas en machos de *S. nonagrioides* se mantiene elevada a lo largo del fotoperiodo, con un cierto aumento durante la fase oscura. Así mismo la expresión de las PBPs en las hembras se mantuvo a niveles menores de expresión sin ninguna variación importante a lo largo del fotoperiodo. La emisión feromonal por parte de la hembra, ocurre en un determinado momento del día, concretamente determinadas horas de la escotofase, ese periodo de tiempo coincide con la receptividad por parte del macho. Por tanto, el ligero aumento de expresión de las diferentes PBPs en machos durante la escotofase podría estar relacionado con esta mayor receptividad. Esto podría explicar a su vez, el incremento moderado en el grado de expresión de la GOBP1 en hembras, cuyo rango de actividad se restringe a la fase oscura, periodo de tiempo en el que las hembras de hábitos nocturnos se dedican, a parte de llamar al macho, a localizar un lugar adecuado para la oviposición.

Se ha observado una similitud en la localización de las OBPs en las tres especies estudiadas; sin embargo, no se ha conseguido localizar las ODEs mediante 2D SDS-PAGE en concreto las esterasas, enzimas de gran importancia en la degradación feromonal, debido en gran parte a los bajos niveles de expresión, similar en machos y hembras de dos de las especies objeto de estudio *S. nonagrioides* y *S. littoralis*¹⁸⁶ y a la gran abundancia de otras proteínas localizadas en esta misma zona.