



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudios dirigidos a la ecología química de insectos plaga mediante semioquímicos

Aroa Domínguez Cuadrado

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

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

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

MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

Capítulo 3

1. ESPECIES DE ESTUDIO

En esta tesis se han estudiado distintos aspectos relacionados con la biología de tres especies, dos pertenecientes al orden Lepidoptera, una de la familia Gelechiidae (*Tuta absoluta*) y otra de la familia Tortricidae (*Grapholita molesta*), además de una especie perteneciente al orden Orthoptera de la familia Acrididae (*Dociostaurus maroccanus*).

1.1 *Tuta absoluta*

T. absoluta (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) es un microlepidóptero polífago que afecta principalmente a cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) y patata (*Solanum tuberosum*) y en menor medida a otras solanáceas cultivadas, como la berenjena (*Solanum melongena*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*), y silvestres como el estramonio (*Datura stramonium*) (Desneux et al., 2010), siendo capaz de provocar pérdidas de hasta el 80-100% de la cosecha tanto en cultivos de invernadero como al aire libre sin las medidas de control adecuadas. Esta especie es originaria de Sudamérica y se encuentra distribuida mundialmente. En el año 2006 se encontró por primera vez en España (Castellón), y se expandió rápidamente por toda la cuenca del Mediterráneo, habiéndose detectado recientemente también en invernaderos comerciales en el centro y oeste de Europa (Desneux et al., 2010; Cuthbertson et al., 2013).

T. absoluta es un insecto holometábolo y multivoltino, capaz de desarrollarse durante todo el año y con un alto potencial reproductivo (Torres et al., 2001). Desde la eclosión de los huevos hasta la emergencia del adulto pasa por cuatro fases larvarias que se desarrollan en el interior del mesófilo de las hojas de la planta hospedadora, por lo que el control de esta plaga es caro y requiere el uso de compuestos químicos que han de ser aplicados en repetidas ocasiones para atacar a las larvas fuera de las galerías. En los últimos años se han documentado casos de resistencia a algunos insecticidas debido al uso repetido de los pocos compuestos activos autorizados (Silva et al., 2011; Siqueira et al., 2017); además, estos insecticidas afectan también a los enemigos naturales de la plaga, haciendo que el control biológico sea imposible (Vacas et al., 2011). Debido a esto, y puesto que el uso de una sola técnica no es suficiente para luchar contra ella, se hace necesario combinar distintas prácticas dentro de lo que conocemos como manejo integrado de plagas para conseguir la actuación más adecuada en cada momento.

• CRÍA EN EL LABORATORIO

La colonia establecida en las instalaciones del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC) fue originada a partir de insectos que habían sido recogidos en un invernadero infestado en Mataró (Barcelona) que se encontraban en diferentes fases de desarrollo. Siguiendo con el ejemplo de la mayoría de artículos publicados (Urbaneja et al., 2009; González-Cabrera et al., 2011; Proffit et al., 2011), los individuos fueron mantenidos en plantas de tomate (*S. lycopersicum*, var. *America*) de unos 25 cm de altura aproximadamente, que habían sido introducidas individualmente en cilindros de metacrilato (33 x 20 cm) y cubiertas con una malla en su parte superior para evitar que los insectos escaparan y permitir la aireación. Los insectos permanecieron durante todo su desarrollo a una temperatura de 25 ± 2°C, humedad relativa de 60 ± 10% y fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad). Cada planta se infestó

con 30 hembras y machos adultos (ratio 1:1) a los que se les proporcionó una solución de azúcar al 10% (w/v) como fuente de alimento. Durante 3-4 semanas se controló el desarrollo de las larvas a diario y se suministraron plantas nuevas cada vez que fue necesario hasta alcanzar la fase de pupa, momento en el cual fueron recogidas de la planta, sexadas y agrupadas por sexos en cristalizadores almacenados en distintas cámaras en las condiciones anteriormente citadas hasta la emergencia de los adultos. Éstos fueron separados diariamente y colocados en cajas que contenían un algodón impregnado con la solución azucarada hasta que alcanzaron la edad requerida para cada uno de los ensayos (Figura 3.1).

1.2 *Grapholita molesta*

G. molesta (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) es un microlepidóptero originario del noroeste de China, desde donde se ha distribuido a lo largo de regiones templadas de Asia, Europa, América, África y Australia (Rothschild & Vickers, 1991). Presenta 5 generaciones anuales y posee hábitos nocturnos. Es una especie polífaga con predilección por los frutales de hueso y pepita de la familia de las rosáceas, como el melocotón, albaricoque, nectarina, ciruela, cereza, manzana y pera (Rothschild & Vickers, 1991; Piñero & Dorn, 2009). El daño en los cultivos es provocado por las larvas, las cuales se alimentan de los brotes durante la primavera, en los cuales realizan galerías que provocan el marchitamiento y desecación de las hojas, mientras que en verano, debido a la ausencia de brotes, penetran en los frutos realizando galerías para alimentarse de la pulpa (Barea, 2012; Núñez & Scatoni, 2013).

Tradicionalmente, el control de esta plaga se ha basado en aplicaciones de uno o más insecticidas organofosforados, como el azinfos-metil y fosmet, para los que se ha documentado el desarrollo de resistencias cruzadas con carbamatos (Kanga et al., 1997; Kanga et al., 1999; Shearer & Usmani, 2001; Usmani & Shearer, 2001). Existen también una serie de prácticas culturales y de enemigos naturales capaces de afectar a distintas etapas del desarrollo de esta especie y que pueden reducir su incidencia en cultivos (Atanassov et al., 2002; Atanassov et al., 2003), aunque su uso es limitado puesto que no son demasiado eficaces (Avilla et al., 2008). La confusión sexual ha demostrado tener altos niveles de eficacia para el control de esta plaga, aunque en ocasiones sigue siendo necesario el uso de ciertos tratamientos insecticidas como refuerzo (Trimble et al., 2001, Atanassov et al., 2002).

• CRÍA EN EL LABORATORIO

La colonia de esta especie mantenida en el IQAC procedía de otra que se había establecido previamente en el ETSEA (Lérida), que a su vez procedía de una población cedida por el Departamento de Protección de Cultivos de la UDL-IRTA. La metodología empleada para la cría fue la misma que la indicada por Varela et al. (2011) utilizando un fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad), 25 ± 2 °C de temperatura, y humedad relativa del 40 - 60 %. Se introdujeron machos y hembras adultos en tubos de cría de vidrio en cuyas paredes las hembras depositaron sus huevos. Cuando los huevos eclosionaron, las larvas neonatas fueron depositadas de una en una con un pincel sobre una dieta artificial modificada de la empleada por Ivaldi-Sender (1974) (Tabla 3.1) hasta el final de su desarrollo. Cuando alcanzaron los últimos estadios larvarios, se les suministró cartón corrugado para que pupasen, momento en el que se sexaron y se agruparon por sexos en cristalizadores distintos hasta que emergieron

los adultos, de donde eran extraídos a diario y colocados en cajas que contenían un algodón impregnado con la solución azucarada hasta que alcanzaron la edad requerida para cada uno de los ensayos (Figura 3.1).

Tabla 3.1. Composición de la dieta artificial empleada para la cría de *G. molesta* en el laboratorio.

Compuesto	Cantidad (4l)	Función
Agua	4 l	Proporcionar humedad
Agar	128 g	Retener el agua y dar consistencia
Ácido benzoico	14.4 g	Conservante
Harina de maíz	896 g	Nutricional
Germen de trigo	224 g	Nutricional
Levadura	240 g	Nutricional
Ácido ascórbico	32 g	Vitamina
Metilparabeno (Nipagin)	11.2 g	Fungicida
Formaldehido 4%	4 ml	Antibiótico

1.3 *Dociostaurus maroccanus*

D. maroccanus (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae) es una plaga con capacidad migratoria que se encuentra presente en Europa, África y en Asia Central, Medio Este y noreste de Irán, afectando a un total de 25 países (Latchininsky, 1998; Baldachino et al., 2004; Baldachino et al., 2012). Se alimenta de cereales, alfalfa, hortalizas, pinos y de prácticamente todos los cultivos que encuentran en las zona de invasión, atacando la totalidad de órganos de la planta (FAO, 2006; Antonatos et al., 2013), si bien solo desarrolla una generación al año (Quesada-Moraga & Santiago-Álvarez, 2001). Además, como otras especies de acrididos, presenta dos fases: una solitaria y otra gregaria. En su fase gregaria forma enjambres de una gran voracidad, provocando serios daños con abundantes pérdidas económicas en los cultivos de los que se alimenta (Martín Bernal et al., 1993).

Para controlar esta plaga los métodos químicos juegan un papel fundamental, utilizándose una gran cantidad de insecticidas como el malatión ULV, fenitrotión y diflubenzurón, que se aplican en tierra o en avionetas en función de la extensión para prevenir la propagación de la plaga a áreas no infestadas (del Moral, 1986; Quesada-Moraga & Santiago-Álvarez, 2000; del Moral et al., 2005). Los graves inconvenientes asociados a la utilización de insecticidas ha llevado al desarrollo de nuevas investigaciones en búsqueda de nuevas técnicas más respetuosas con el medio ambiente, como el uso de entomopatógenos de los géneros *Beauveria sp* y *Metarhizium sp* (Crespo & Santiago-Álvarez, 1997; Jiménez-Medina et al., 1997), aunque ninguna de ellas ha llegado aún a la fase de aplicación práctica.

- **MANTENIMIENTO EN EL LABORATORIO**

Dado que no se ha podido implementar un método de cría de *D. maroccanus* en el laboratorio debido a que el periodo embrionario de esta especie se prolonga durante varios meses (Quesada-Moraga & Santiago-Álvarez, 2001), los insectos que se utilizaron para los ensayos fueron capturados en el campo desde mayo hasta julio. Se recogieron ninfas y adultos de diversas edades procedentes de áreas infestadas de las comunidades de Aragón (Alhama de Aragón, Zaragoza), Extremadura (Mérida, Badajoz) y Castilla-León (Salamanca). Los insectos fueron enviados en primer lugar a Zaragoza, donde fueron separados por sexo y edad por la Dra. M. del Milagro Coca (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, CITA), y posteriormente a Barcelona, donde fueron mantenidos a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y $50 \pm 10\%$ HR con un fotoperiodo de 14:10 luz:oscuridad en las instalaciones del IQAC destinadas para dicho fin en jaulas de aluminio (50 x 50 x 50 cm), que poseían una apertura lateral para facilitar el manejo de los especímenes y una lámpara de luz blanca de 60 W para proporcionar una iluminación homogénea. Todos los días, se pulverizó las jaulas con agua y se suministró alimento fresco a los insectos, consistente en alfalfa, hojas de trigo, carrizo y otras poáceas, y se retiró el sobrante de días anteriores (Figura 3.1).

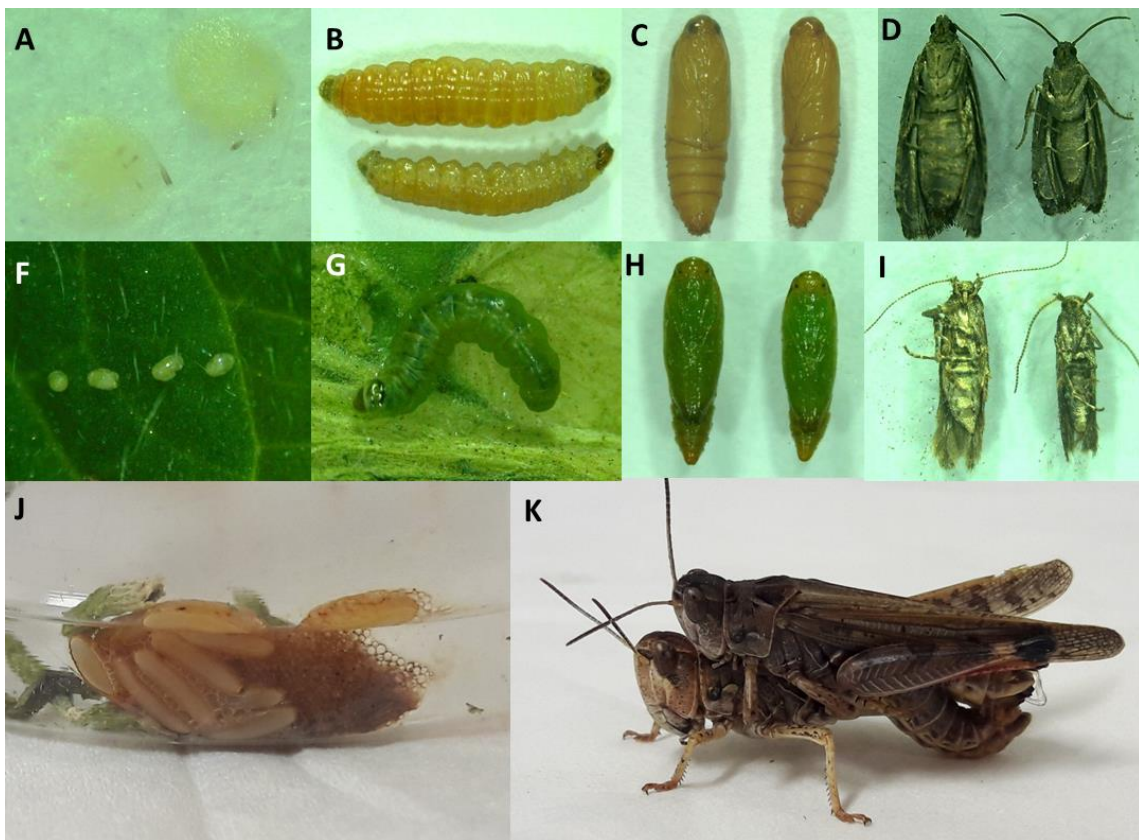


Figura 3.1. Individuos en distintas fases de desarrollo de las especies objeto de estudio. De izquierda a derecha, fila superior: huevos, larvas de 5º estadio, pupas y adultos de ambos sexos de *G. molesta*; segunda fila: huevos, larvas de 3º estadio, pupas y adultos de ambos sexos de *T. absoluta*; fila inferior: huevos y pareja copulando de *D. maroccanus*.

2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTENAL: ELECTROFISIOLOGÍA

La electrofisiología es la rama de la ciencia que estudia las propiedades eléctricas de células, tejidos y órganos en reposo o actividad excitable. Se basa en medidas de cambio de voltaje o corriente eléctrica a distintas escalas, desde un canal iónico de proteínas, pasando por la actividad eléctrica de neuronas, hasta órganos completos como el corazón; y pueden realizarse mediciones tanto dentro (intracelular) como fuera de las células (extracelular). Los registros de señales eléctricas de las antenas de los insectos empleados en la presente tesis se pueden considerar registros electrofisiológicos extracelulares.

2.1. ELECTROANTENOGRAMA

La electroantenografía es una técnica utilizada en entomología experimental para detectar volátiles que son percibidos por el sistema olfativo de los insectos (Van der Pers, 1998). Esta técnica cuantifica la respuesta bioeléctrica producida en la antena de un insecto por un estímulo químico y es igual al sumatorio de los potenciales de recepción negativos provocados por la despolarización de las células olfativas de la antena estimulada (Van der Pers, 1998; Lánský & Getz, 2001). La amplitud de la respuesta del electroantenograma (EAG) aumenta a medida que se incrementa la concentración del estímulo hasta que se alcanza el nivel de saturación, pero también puede verse influida por otros factores como la temperatura, la humedad y las características intrínsecas del propio insecto (Van der Pers, 1998).

El EAG fue desarrollado por Schneider en 1957 para analizar la actividad electrofisiológica de extractos glandulares sobre antenas de machos de *Bombyx mori*, y con el que observó pequeñas fluctuaciones de voltaje entre el extremo y la base de la antena durante la estimulación con feromona. Desde entonces, esta técnica se ha utilizado en un buen número de estudios relacionados con la percepción olfativa en insectos, como por ejemplo en la selección de compuestos biológicamente activos (Van der Pers, 1998).

El sistema empleado en esta tesis estaba formado por un par de electrodos unidos entre sí y colocados sobre un micromanipulador y que a su vez estaban conectados a un amplificador IDAC-2 (x100) para la adquisición de la señal (Interface Data Acquisition Board, Type IDAC-1, Syntech, Alemania) y a un controlador de estímulos (CS-01, Syntech, Alemania) conectados a un ordenador para su visualización y manejo. El estímulo, que se dirigía sobre la antena a través de una pipeta Pasteur que contenía un papel de filtro (Whatman, Reino Unido) plegado, se generaba a través de un pedal que estaba conectado al controlador de estímulos. La pipeta se introducía en uno de los tres brazos de un tubo de vidrio que servía para aplicar el agente estimulante. El segundo brazo de la estructura de vidrio conectaba con una corriente de aire complementaria para mantener un flujo de aire constante sobre la antena, mientras que por la parte superior del brazo principal llegaba una corriente de aire húmedo continua que evitaba la desecación de la muestra. Todo el sistema se encontraba protegido por una caja de Faraday (70 x 65 x 60 cm) y conectado a una toma de tierra para aislarlo de cualquier señal eléctrica procedente del exterior. La adquisición y el análisis de los datos se realizaron con el programa EAG-Pro v2 (Syntech, Alemania) (Figura 3.2).

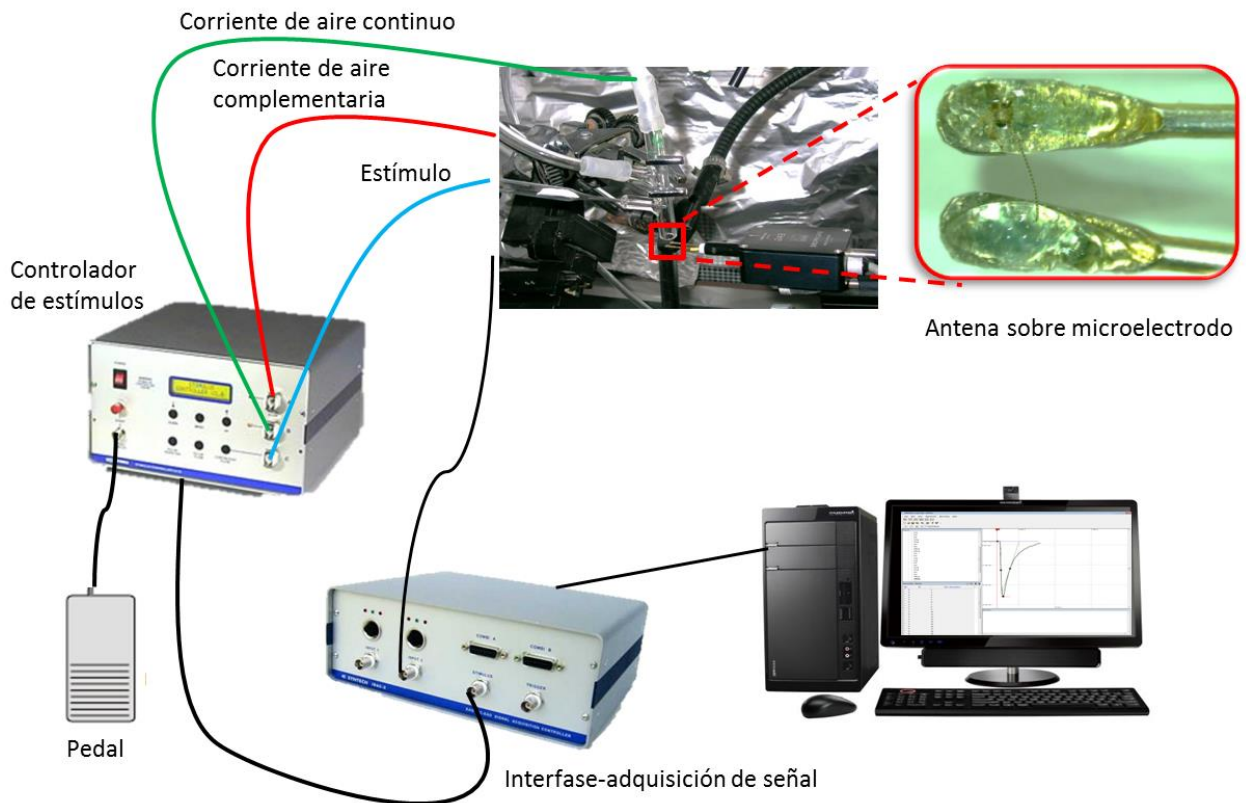


Figura 3.2. Esquema del sistema de electroantenografía utilizado, con la preparación de una antena de *T. absoluta*.

Para los ensayos realizados con microlepidópteros, se utilizó la antena del insecto unida a la cabeza. Para la preparación de la unidad muestral, se anestesió brevemente al insecto con CO_2 y se le extirpó la cabeza eliminándole una de las antenas por la base. La cabeza se colocó sobre el electrodo de referencia y la antena, a la que se le habían quitado un par de antenómeros de la zona distal, sobre el electrodo de medición. Sobre ambos electrodos se había aplicado previamente una pequeña cantidad de gel conductor Spectra 360 (Parker Laboratories Inc., Países Bajos) (Figura 2.2). En el caso de *D. maroccanus*, se utilizó la antena únicamente, por lo que a cada individuo se le extrajo una de las antenas por su base y se le cortó un par de antenómeros de la zona distal. La base de la antena se colocó en el electrodo de referencia mientras que el otro extremo se situó sobre el de medición. Los estímulos se aplicaron durante 0,2 s cada 60 s para permitir la recuperación de la antena y evitar su saturación.

Como hemos dicho anteriormente, el EAG permite conocer si una mezcla de sustancias sintéticas o extracto natural es activo sobre la antena de un determinado insecto; sin embargo, para conocer qué componentes específicos de éstos son capaces de generar respuesta se ha de utilizar otras técnicas electrofisiológicas, como la cromatografía de gases acoplada a electroantenografía.

2.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ELECTROANTENOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica analítica que permite la separación de compuestos orgánicos volátiles de una mezcla al hacerlos pasar a través de una fase estacionaria gracias al flujo de una fase móvil que los transporta por ella. Esta técnica fue empleada por primera vez por Tswett en 1903 para separar pigmentos vegetales, y en la actualidad presenta múltiples variantes en función de la naturaleza de su fase estacionaria y móvil, y del tipo de soporte de éstas. Una de estas variantes es la cromatografía de gases (GC), en la que la fase estacionaria inmóvil es un sólido presente en una columna capilar, y la fase móvil un gas inerte, en nuestro caso helio.

Con la ayuda de esta técnica, a lo largo de esta tesis hemos podido detectar la presencia de componentes individuales en mezclas complejas, y acoplada al EAG nos ha permitido conocer qué sustancias concretas son capaces de provocar respuesta en las antenas de los insectos y descartar aquéllas que no tienen actividad biológica. La identificación del compuesto concreto se ha de realizar a posteriori con la ayuda de un equipo acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) en base a su espectro de masas y tiempo de retención. Esta técnica fue desarrollada por Moorhouse y col. (1969).

El cromatógrafo de gases acoplado al EAG (GC-EAD) presente en el laboratorio era un Focus GC (Thermo-Instruments, España) que utilizaba helio como gas portador y estaba equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna de sílica fundida desactivada HP-5 (Agilent Technologies, España) de 30 m x 0,25 mm i.d. El flujo de la columna se dividía en dos (1:1) para llevar a cabo una detección simultánea por el FID y el EAG. El flujo procedente del cromatógrafo se dirigía sobre la antena, preparada como se ha descrito anteriormente, a través de un tubo de vidrio con forma de L (12 cm X 6 mm i.d.) gracias a una corriente de aire humidificado. Para la grabación y análisis de las señales de ambos, se utilizó el programa Syntech GC-EAD v4.6 software (Syntech, Alemania) (Figura 3.3).

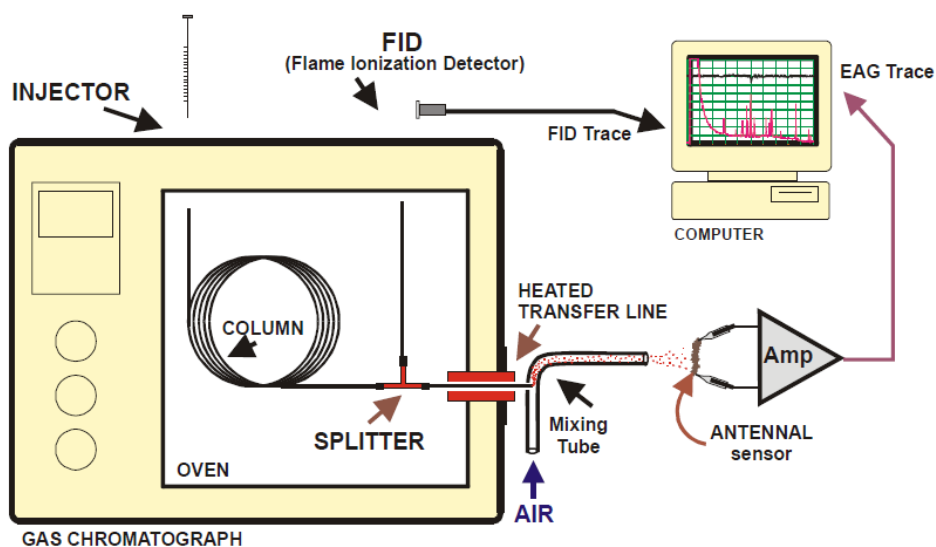


Figura 3.3. Esquema del sistema GC-EAG utilizado durante los trabajos de la presente tesis. Fuente: Syntech manual (Kirchzarten, Alemania).

3. ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO

Los ensayos de comportamiento son determinantes para determinar cómo afecta un compuesto concreto al comportamiento de un insecto. A la hora de diseñarlo ha de tenerse en cuenta qué tipo de comportamiento queremos evaluar en nuestro estudio, los factores, tanto externos como intrínsecos al insecto, que pueden influir en la respuesta y que los resultados han de ser reproducibles para considerarse válidos (Guerrero, 1988).

3.1. OLFACÓMETROS

A lo largo de esta tesis se han utilizado bioensayos con distintos diseños en función del tipo de comportamiento que se quería evaluar en cada momento sobre las especies objeto de estudio. Los olfactómetros empleados son los siguientes:

Olfactómetro “no choice”. Es aquel en el que solo se presenta una opción a los individuos sin otra alternativa para elegir. Los ensayos llevados para evaluar el efecto antialimentario de distintos aceites esenciales sobre larvas de *T. absoluta* y *G. molesta* empleados en el capítulo 5 son de este tipo. Estos ensayos se llevaron a cabo en placas Petri de 10 cm de diámetro en las que se delimitó un área central donde se liberaron las larvas, y en un lateral de la placa se situó la fuente de alimento en ausencia (control) o presencia (tratamiento) de cierta cantidad de distintos aceites esenciales. Las placas se rodearon con cilindros de papel para que los estímulos procedentes del medio no influyeran en los movimientos de las larvas (Figura 3.4.A).

También se utilizó otro tipo de olfactómetro “no choice” para evaluar el efecto disuasorio de los aceites esenciales sobre la oviposición de las dos especies. En este caso, el dispositivo consistía en un contenedor de plástico transparente de 400 ml de volumen cubierto con una malla en la parte superior de la que se colgaba un papel de filtro Whatman sobre el que se aplicaba el aceite esencial a probar. En los ensayos con *T. absoluta* se introdujo una rama de planta de tomate como soporte para la oviposición (Figura 3.4.B). Se utilizó otra variante de este tipo de ensayo para evaluar el papel de distintas variables sobre la oviposición de *T. absoluta*. En este caso el dispositivo fue de mayores dimensiones y se llevó a cabo en el interior de un cilindro de metacrilato de 30 x 20 cm, donde se colocaron distintos tipos de fuentes de olor y sustrato.

Olfactómetro de doble elección. Este tipo de ensayo se utilizó con machos de *T. absoluta* para comprobar el posible efecto repelente que ejercían ciertos aceites esenciales sobre ellos. Constaba de una pieza de vidrio central en forma de T (9 cm de alto el brazo vertical, 20 cm de largo el brazo horizontal, y 9 cm de diámetro en ambos casos) que unía dos jaulas Bugdorm (30 x 30 cm, Megaview Science, Taiwan) situadas en el interior del túnel de viento que se describe más adelante. En el interior de las jaulas se colgaba un difusor tipo septum de poliuretano en el que se depositaba la feromona o el compuesto a probar. Los distintos tratamientos se enfrentaban a otra jaula en cuyo interior se había depositado hexano (blanco) (Figura 3.4.C).

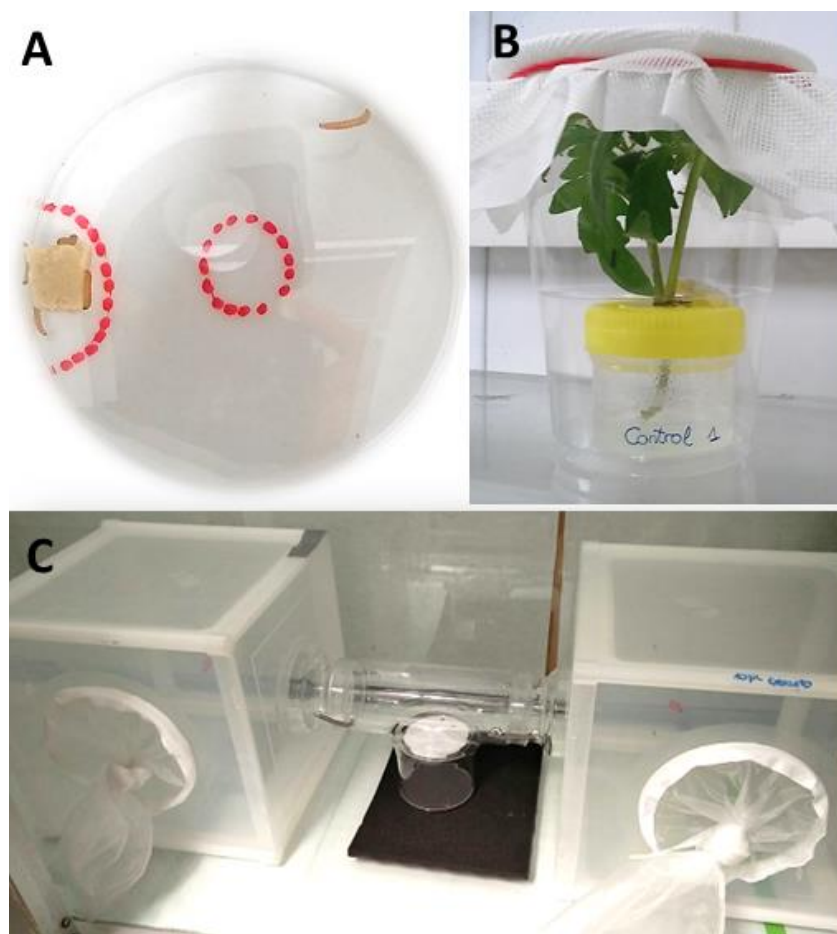


Figura 3.4. Olfactómetros utilizado para evaluar la actividad de distintos aceites esenciales sobre larvas (A), hembras (B) y machos (C) adultos de *T. absoluta* y *G. molesta* (Capítulo 6).

Con *D. maroccanus* también se empleó un olfactómetro de doble elección pero con un diseño diferente. Éste estaba formado por una cámara principal de metacrilato de 20 x 40 x 21 cm, cuya base estaba perforada con agujeros de 4 mm de diámetro para permitir la entrada de vapores, y una franja central de 8 cm de ancho no agujereada en el centro donde se liberaban los insectos (Figura 3.5.A). Bajo esta cámara se situaban otras dos más pequeñas (15 x 15,5 x 19 cm) separadas donde se colocaron dos discos de papel de filtro Whatman (25 mm de diámetro), uno sobre el que se depositaron los distintos tratamientos y otro con el control. En cada una de estas dos cámaras entraba por su parte inferior una corriente de aire de 600-650 ml/min, previo paso por un filtro de carbón activo, produciendo dos corrientes independientes dentro del ensayo. Para evitar la acumulación y mezcla de vapores en el interior de la cámara principal, se colocó un extractor en la parte superior de ésta. Este olfactómetro se rodeaba con una caja de cartón durante los ensayos para proveerlo de un entorno visual homogéneo y evitar interferencias externas (movimiento de personas, brillos indeseados, etc).

Olfactómetro de 4 vías. Otro de los aparatos empleados con *D. maroccanus* estaba formado por una cámara central de metacrilato de 40 x 40 x 8 cm de la que partían cuatro brazos en cuyo extremo se colocaba una cámara de captura seguida por otra más pequeña donde se colocaba el papel de filtro impregnado con el tratamiento y control (Figura 3.5.B). A cada uno de los brazos se hacía llegar una corriente de aire de 300 ml/min que había pasado

anteriormente por un filtro de carbón activo para evitar contaminaciones. Sobre el centro de la cámara central se disponía una bomba aspiradora para evitar la acumulación de vapores en ella. En los dos brazos opuestos del olfactómetro se colocaba el tratamiento, y en los otros dos el control.

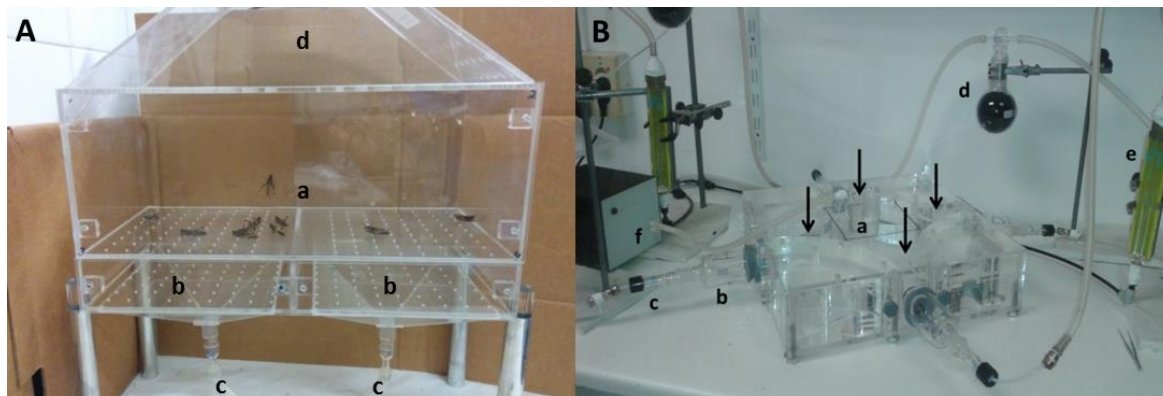


Figura 3.5. Tipos de olfactómetros empleados en los ensayos realizados con *D. maroccanus*. (A) Olfactómetro de doble elección, formado por una cámara principal donde se liberan los insectos (a), cámaras de olor (b), dos entradas de aire filtrado previamente con carbón activo (c) y un sistema de extracción (d). (B) Olfactómetro de 4 vías, formado por una cámara principal con abertura para la liberación de insectos (a), cámara de captura (b), cámara de olor (c), filtro de carbón activo (d), flujómetro (e), bomba aspiradora (f). Las flechas negras indican las áreas de olor.

3.2. TÚNEL DE VIENTO

El túnel de viento es una herramienta muy utilizada en ingeniería para el estudio del comportamiento de objetos sólidos bajo el efecto de masas de aire que se mueven a su alrededor. Sin embargo, el túnel de viento también ha resultado ser una herramienta muy útil en el estudio de las respuestas de insectos a feromonas y volátiles de plantas (Miller & Roelofs, 1978), puesto que permite estudiar el vuelo libre de un insecto en una corriente de aire conteniendo un atrayente (Miller & Roelofs, 1978; Baker & Linn, 1894). La ventaja que presenta respecto el resto de los olfactómetros descritos anteriormente es que éstos solo permiten una observación parcial de la secuencia estímulo-respuesta (Kennedy, 1977).

El túnel de viento instalado en el laboratorio era de vidrio y presentaba una sección rectangular de 180 cm de largo x 55 cm de ancho x 50 cm de alto. La corriente de aire en su interior se generaba por un ventilador colocado en uno de los extremos que introducía el aire en el interior del túnel, y un extractor en el lado opuesto que lo expulsaba al exterior. El ventilador recogía el aire del exterior y lo conducía a través de un filtro de lana de vidrio para eliminar contaminaciones. La velocidad del ventilador y del extractor estaba regulada mediante un reostato que era controlado manualmente. El aire filtrado se hacía pasar por un par de rejillas que, colocadas convenientemente, configuraban un régimen de flujo laminar, fundamental para el vuelo del insecto. Al interior del túnel se accedía mediante dos puertas laterales correderas. Para los distintos estudios, la fuente de atracción se colocaba próxima al ventilador, y cerca del extractor se colocaba una plataforma de lanzamiento en la que se liberaba el insecto sometido a estudio. La fuente de luz procedía de un fluorescente de luz blanca (Figura 3.6).



Figura 3.6. Túnel de viento instalado en el laboratorio.

4. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Como se ha mencionado anteriormente, la cromatografía de gases suele emplearse para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada. Sin embargo, para una caracterización más completa y segura de dicho compuesto o de todos los componentes de una mezcla, se necesita la ayuda complementaria de otras metodologías, resultando especialmente útil el acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas (GC-MS).

La espectrometría de masas es una técnica que nos permite determinar las moléculas que componen una sustancia en función de su masa, y ha sido utilizada a lo largo de la tesis para la identificación de compuestos feromonales y de proteínas presentes en extractos realizados a partir de distintos tipos de material biológico de las especies objeto de estudio.

Un espectrómetro de masas está formado por un inyector de la muestra, una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. La muestra objeto de estudio se introduce a través del inyector en la fuente de ionización, donde las moléculas neutras de la mezcla son transformadas en iones por bombardeo con electrones, iones, moléculas, fotones o alternativamente por energía térmica o eléctrica. Los iones obtenidos son transferidos por campos magnéticos o eléctricos al analizador, donde son acelerados y separados en función de su relación masa/carga (m/z) y finalmente, son detectados por medio de un detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada, almacenada y mostrada por un ordenador. El espectro de masas obtenido dependerá de la abundancia de los diferentes iones en función de la relación m/z de cada uno de ellos, lo que depende a su vez de la estructura química de cada compuesto.

Existen varios tipos de cada uno de los componentes que forman parte del espectrómetro. A lo largo de la tesis, esta técnica se ha utilizado acoplada a cromatografía de gases (GC-MS) y cromatografía de líquidos (HPLC-MS), por lo que los sistemas de entrada han sido siempre cromatográficos. Las fuentes de ionización, por su parte, pueden clasificarse en fuentes de

fase gas o de desorción, en función de si la muestra es volatilizada o se prescinde de la vaporización antes de la ionización de las moléculas. En los sistemas GC-MS, la muestra se vaporiza en el inyector y se ioniza posteriormente por bombardeo electrónico. Además, los analizadores de los equipos empleados fueron del tipo cuadrupolo, mientras que los detectores variaban de unos equipos a otros.

A lo largo de los distintos capítulos de esta tesis se han utilizado varios equipos de GC-MS. Para la identificación de cada uno de los compuestos feromonales presentes en glándulas de hembras de *T. absoluta*, los extractos se inyectaron en un espectrómetro de masas MD 800 (Fisons Instruments, Reino Unido) con un analizador tipo cuadrupolo, acoplado a un cromatógrafo de gases Fisons GC 8000 series (Fisons Instruments, Reino Unido) equipado con una columna apolar HP-5 (Agilent Technologies, España, 30 m x 0,22 mm i.d.). Para la detección de fital en extractos de *D. maroccanus*, las muestras fueron inyectadas en un equipo de cromatografía de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 con un analizador tipo cuadrupolo y un detector multiplicador de electrones con diodo de alta energía (HED). Para la identificación de las proteínas glandulares y antenales de los microlepidópteros objeto de estudio, el equipo utilizado fue un LTQ Orbitrap (Thermo Scientific, España) dotado de una fuente de ionización nanoelectrospray (Proxeon Odense, Dinamarca, ahora Thermo Scientific) conectada en línea a un cromatógrafo de líquidos nano-HPLC Easy-LC (Proxeon), descrito detalladamente en el apartado 5.5.2.

5. TÉCNICAS PROTEÓMICAS

Se denomina proteoma al conjunto de proteínas expresadas por un genoma en una célula, tejido u organismo en un momento determinado bajo unas condiciones ambientales específicas. La ciencia que se dedica a su estudio se denomina proteómica, y se encarga de identificar, categorizar y clasificar las proteínas según su función y las interacciones que existen entre ellas y los organismos.

Para el estudio del proteoma se requiere la utilización de varias técnicas que permitan extraer las proteínas presentes en una muestra, separarlas, cuantificarlas, identificarlas y caracterizarlas. Las dos metodologías principales para convertir las proteínas presentes en una muestra biológica en péptidos listos para ser analizados por espectrometría de masas son las digestiones “en gel” o “en solución”. Ambas técnicas han sido empleadas a lo largo de esta tesis y se describen detalladamente a continuación. La digestión “en gel” se llevó a cabo en las instalaciones del IQAC, mientras que la digestión “en solución” se realizó en el laboratorio de proteómica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) bajo la supervisión de las Dras. Vanessa Casas y Montserrat Carrascal.

5.1. RECOGIDA DE MUESTRAS

Para llevar a cabo tanto los estudios de expresión de las proteínas antenales y los de inhibición de esterases, se cortaron antenas de machos y hembras de entre 1 y 3 días de edad de ambas especies. Las antenas fueron extraídas de insectos previamente anestesiados con CO₂ utilizando unas pinzas entomológicas, y se depositaron en viales Eppendorf de 1,5 ml introducidos en un Dewar con nieve carbónica para evitar la degradación de las proteínas. Se recogieron lotes de 100 a 400 antenas, y los viales se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

Paralelamente, también se recogieron glándulas feromonales de hembras de *T. absoluta* para estudiar el contenido feromonal y proteico de las mismas, así como sus posibles variaciones al ser sometidas a distintas condiciones. Las glándulas se extrajeron de hembras vírgenes y copuladas de 2 días de edad durante la primera hora de la fotofase. Para ello, las hembras se anestesiaron con CO₂, se presionaron suavemente los últimos segmentos del abdomen para que evaginaran la glándula y una vez expuesta, se extrajo con unas pinzas tirando suavemente de ella. Las glándulas fueron colocadas en viales Eppendorf (Alemania) de 1,5 ml introducidos en nieve carbónica en lotes de 2 o 20 glándulas, en función del experimento. Los extractos glandulares también fueron almacenados a -80°C hasta que fueron analizados.

5.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para llevar a cabo los estudios de expresión de las proteínas presentes en las muestras biológicas recogidas se prepararon homogeneizados siguiendo dos metodologías distintas. Durante la preparación de la muestra es necesario utilizar agentes caotrópicos, surfactantes y reductores que provoquen la desnaturalización y solubilidad de las proteínas presentes, necesario para los pasos posteriores. Los agentes caotrópicos, como la urea y la tiourea, provocan la desnaturalización de las proteínas debido a la ruptura de puentes de hidrógeno, lo que conlleva la exposición de los residuos hidrofóbicos que serán solubilizados por agentes surfactantes, como el CHAPS (sulfonato de 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propano). Los agentes reductores por su parte, como el DTT (ditiotreitól), desnaturalizan las proteínas al provocar la rotura de los puentes disulfuro (Vercauteren et al., 2007; Smith, 2009).

En el primer método la preparación de los extractos se realizaron a partir de lotes de entre 100-200 antenas, las cuales fueron sometidas primero a una rotura mecánica con un émbolo al sumergir el Eppendorf que las contenía en nitrógeno líquido, y posteriormente a un proceso de lisis mediante una microsonda de ultrasonidos SFX 150 digital (Branson, España) en un tampón de lisis formado por una mezcla de urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (w/v), Tris-base 40mM, DTT 10mM y agua miliQ. Los extractos así preparados fueron utilizados para realizar posteriormente una electroforesis bidimensional para separar las proteínas presentes en la muestra.

En el segundo método, la preparación de cada uno de los extractos se realizó a partir de lotes de 400 antenas o de 20 glándulas feromonales, a los que se le añadió 500 µl de un tampón de lisis diferente al anterior, formado en esta ocasión por bicarbonato de trietilamonio (TEAB) pH 7,6, 100 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% y DTT 0,1 M. Esta mezcla fue incubada durante 30 min a 95°C en un agitador Thermomixer comfort (Eppendorf, Alemania) a 450 rpm, y después se utilizó un homogeneizador de tejidos celulares Bullet Blender (WisBiomed, EEUU) durante 3 min. Con este aparato se consiguió una rotura y homogeneización más eficiente del material biológico gracias a la presencia de unas “bolas” en su interior que golpeaban desde fuera los tubos con la muestra, de manera controlada y repetida provocando fuertes movimientos de la muestra dentro de los tubos debido a la adición de un volumen de 250 µl de bolas de óxido de zirconio de 0,5 mm de diámetro (Next advance, EEUU). Posteriormente se centrifugó la muestra durante 2 min a 11000 rcf en una microcentrífuga MiniSpin (Eppendorf, Alemania). Una vez que la muestra se había lisado correctamente, se retiró el sobrenadante

cuidadosamente y se prepararon alícuotas que se almacenaron a -40°C hasta su cuantificación y digestión FASP (Filter Aided Sample Preparation).

5.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS

Para la cuantificación de proteína total presente en cada uno de los extractos realizados se utilizó el kit RC-DC protein assay (Bio-Rad, España), que es un método colorimétrico basado en el método de Lowry que nos permite conocer la concentración de proteínas presentes en una muestra al añadir un reactivo que forma un complejo coloreado al unirse con aquéllas, provocando cambios en la absorbancia de la mezcla, siendo la intensidad del color proporcional a la concentración de proteína. La reacción ocurre en dos pasos: primero se añade una solución de tartrato cúprico básico con el que reaccionan las proteínas presentes en la muestra, y posteriormente, se produce la reducción del reactivo de Folin Ciocalteu por los grupos fenólicos de los aminoácidos tirosina y cisteína, presentes en las proteínas, que da lugar a un complejo de color azul. Las ventajas de este kit de cuantificación es que es compatible con los detergentes y agentes reductores utilizados en la preparación de la muestra, tiene una alta sensibilidad y el compuesto coloreado se forma rápidamente (15 min después de la adición del reactivo de Folin) manteniéndose estable hasta 2 h después (Bio-Rad).

El procedimiento consiste en la realización de una recta patrón de ocho puntos utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar. El análisis de cada muestra se realiza por triplicado, determinando la concentración de proteínas en cada una de ellas por interpolación de los valores de absorbancia obtenidos con los de la curva patrón. La medición de la absorbancia se realizó a 650 nm de longitud de onda en dos espectrofotómetros distintos: cuando la cuantificación se realizó en el IQAC, el lector de placas empleado fue un Spectra Maxplus 360 (Molecular Devices, EEUU), mientras que cuando este procedimiento se llevó a cabo en la UAB el espectrofotómetro utilizado fue un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, España).

5.4. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SEPARADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional (2-DE) es una técnica empleada para separar moléculas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, separándose por tamaño y carga eléctrica (Vercauteren et al., 2007). Es una de las técnicas más empleadas para el análisis de mezclas complejas de proteínas, que permite la separación de cientos de proteínas (spots) en un único gel. Esta separación ocurre en dos fases: una primera fase en la que las proteínas se separan según su punto isoeléctrico, y una segunda en la que se separan en base a su tamaño molecular. Este método se lleva a cabo mediante la utilización de geles de acrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

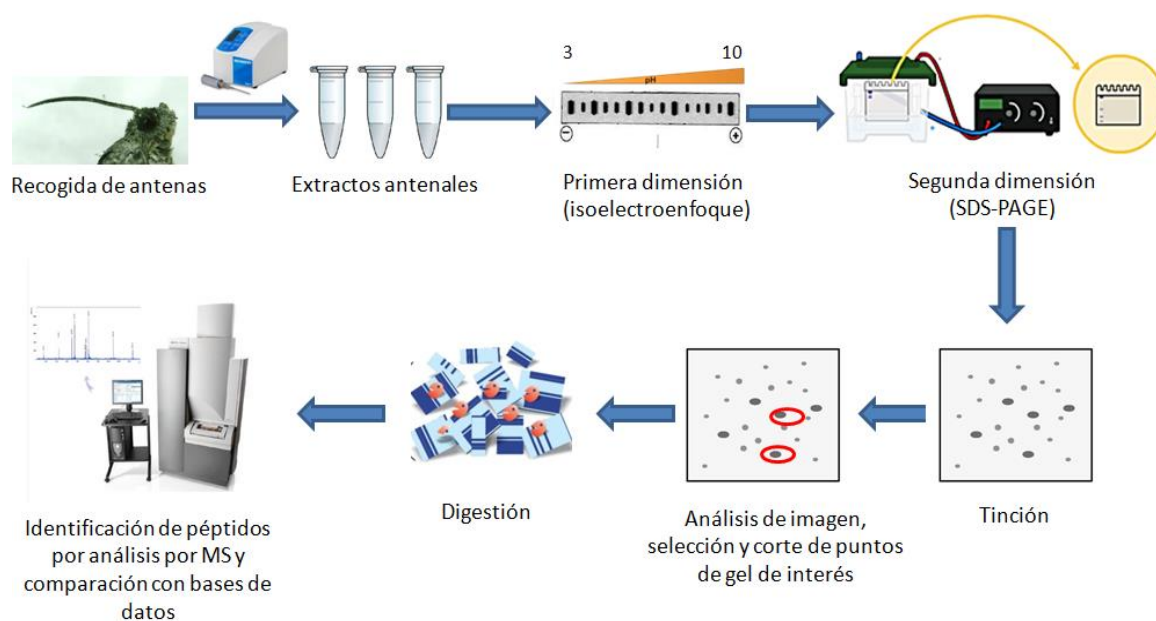


Figura 3.7. Esquema de análisis de proteínas antenales mediante electroforesis bidimensional en gel, incluyendo la separación de proteínas, visualización de las manchas e identificación por espectrometría de masas.

5.4.1 PRIMERA DIMENSIÓN O ISOELECTROENFOQUE

Durante este primer paso, las proteínas se separan en base a su punto isoelectrónico en un gel con un gradiente de pH inmovilizado (Vercauteren et al., 2007; Smith, 2009). Esta primera separación está basada en la propiedad de las proteínas conocida como anfoterismo, es decir, la capacidad que poseen para comportarse como un ácido o una base en función del medio que las rodea, siendo capaces de variar su carga según el pH del ambiente. El punto isoelectrónico (pI) de una proteína es el pH en el que la carga neta de la proteína es igual a cero, es decir, que la suma de las cargas positivas y negativas de los aminoácidos que la componen y de sus grupos carboxilo y amino terminales es igual a este valor. Durante el electroisoelectroenfoque las proteínas se mueven debido a la influencia de un campo eléctrico; aquéllas que tienen carga neta positiva se verán atraídas hacia el cátodo y las de carga negativa hacia el ánodo, deteniéndose en aquel punto de pH igual a su punto isoelectrónico (Vercauteren et al., 2007). El isoelectroenfoque se lleva a cabo a voltajes muy altos, de hasta 8000V en su fase terminal, y en condiciones fuertemente desnaturizantes (p.e. 8M urea) para obtener la máxima resolución y los resultados más limpios y reproducibles posibles.

Para esta primera separación, se emplearon tiras comerciales de poliacrilamida de 7 cm con un pH comprendido entre 3 y 10. El primer paso consistió en la rehidratación de las tiras. Para ello, se colocaron las tiras en un pequeño sarcófago (GE Healthcare, Suecia) junto con 125 μ l de un tampón de rehidratación para mantener las proteínas hidratadas y desnaturizadas, formado por urea 8M, CHAPS 2% (w/v), azul de bromofenol 0.025% (w/v), inmobilinas (IPG buffer) con el mismo rango de pH que la tira de gel 0,5 % (w/v) y agua miliQ; y que previamente se le añadió DeStreak 100nM (GE Healthcare, Reino Unido) y DTT 5 mM. Para evitar la desecación de la tira, se cubrió con 1 ml de aceite mineral. Cada sarcófago así

preparado se colocó en un Ettan IPGphor III para enfocar las proteínas, y el programa utilizado fue: rehidratación durante 6 h, después el voltaje se subió a 30 V durante 6 h (modo Step-n-hold), 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, y posteriormente se alcanzó los 5000 V durante 1 h, todos estos pasos en modo Gradient; y para acabar, de nuevo en modo Step-n-hold a 5000 V hasta que las tiras alcanzaran un voltaje total de 20000 V. Hasta la realización de la segunda dimensión, las tiras permanecieron congeladas a -20 °C.

5.4.2. SEGUNDA DIMENSIÓN O SDS-PAGE

Durante esta fase, las proteínas se separan en función de su tamaño o peso molecular mediante electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS, que completa el desplegamiento de la proteína provocado por el DTT (Vercauteren et al., 2007). Este procedimiento se llevó a cabo en el sistema de electroforesis Mini-protean 3 (Bio-Rad) y el programa utilizado fue de 25 V durante 20 min que permitió el paso de las proteínas desde las tiras al gel y a continuación 100 V durante 120 min.

Como paso previo a la segunda dimensión, fue necesario realizar el equilibrado de las tiras durante 15 min en dos tampones compuestos por urea 6M, Tris-HCl 50 mM, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (v/v), azul de bromofenol 0.025% (w/v) y agua miliQ; además de DTT 1% (w/v) en el caso del primero, y iodoacetamida (IAA) 2,5% en el caso del segundo. El equilibrado facilita la transferencia de las proteínas al gel durante la segunda dimensión, el DTT mantiene las proteínas reducidas impidiendo las interacciones electrostáticas entre ellas, mientras que la función de la IAA es la de compensar el exceso de DTT así como reducir los artefactos provocados por éste y alquilar los grupos tiol de las proteínas evitando su reoxidación durante la electroforesis (Smith, 2009).

Tras el equilibrado, se transfirieron las tiras a los geles que habían sido preparados antes del proceso de equilibrado con agua mili-Q, tampón de resolución (Tris-HCl 1,5 M ajustado a pH 8,8), acrilamida/bisacrilamida al 30% y 0,8% (w/v) y SDS 10% (v/v). Para la polimerización del gel, se empleó persulfato de amonio (APS) y tetrametilendiamina (TEMED). Al lado del polo negativo de la tira, se colocó un fragmento de papel de filtro Whatman con 3 µl de marcador molecular. Con una aguja hipodérmica se eliminaron las burbujas que quedaron entre las tiras y el gel para reducir el ruido que éstas pudieran ocasionar, y para favorecer el contacto de la tira con el gel, se añadió 1 ml de agarosa al 0.5% (w/v).

5.4.3. TINCIÓN Y ANÁLISIS DE IMAGEN

Para la visualización de las proteínas separadas durante la primera y segunda dimensión se han de teñir. Existen diferentes métodos de marcajes de proteínas, como tinciones, radiomarcaje y fluorescencia, entre otras (Patton, 2000; Smith, 2009). Los métodos más empleados durante años han sido la tinción con Azul Coomassie y la tinción con plata, y son las que se han llevado a cabo en el laboratorio.

Para la tinción de Azul Coomassie se utilizó el kit Quick Coomassie (Generon, Italia) por su sencillez y rapidez, ya que constaba de un único paso que consistía en introducir el gel en un recipiente con 25 ml de la solución colorante y retirarlo al cabo de 1-2 h. A pesar de la simplicidad de la técnica, esta metodología tiene el inconveniente de poseer una sensibilidad

muy limitada necesitando grandes cantidades de muestra para conseguir una buena resolución ($\approx 100 \mu\text{g}$).

Por otro lado, también se ha llevado a cabo la tinción con nitrato de plata, en la que el gel se impregna con esta sustancia y se revela por reducción a plata metálica con formaldehído a pH básico. Permite detectar cantidades de proteína muy inferiores al anterior método (5-10 μg) y es compatible con el análisis posterior de las proteínas por espectrometría de masas siempre y cuando no se utilice glutaraldehído. Este procedimiento es más tedioso que el anterior y consta de diversos pasos:

-Fijación. Se introdujeron los geles en un recipiente de vidrio Pyrex con 125 ml de solución fijadora (40% etanol y 10% ácido acético) durante toda la noche a 6°C. Esta fase permite que se fijen las proteínas y la eliminación de otros compuestos que puedan interferir en el revelado.

-Sensibilización. Una vez retirada la solución de fijación, se introdujeron los geles durante 30 min en 125 ml de otra solución compuesta por 30% etanol, tiosulfato sódico pentahidratado 0,2% (w/v) y acetato sódico 6,8% (w/v).

-Tinción. Tras retirar la anterior solución y lavar los geles con agua MiliQ durante 5 min tres veces, se sumergieron en nitrato de plata diluido 2,5% (w/v) durante 20 min. Durante esta fase, los iones de plata se unen a los compuestos utilizados para la elaboración de la solución de sensibilización, los cuales habían quedado unidos a las proteínas previamente.

-Velado. Tras otros dos lavados con agua miliQ durante 1 min de duración, se revelaron los geles con una solución de carbonato sódico 2,5% (w/v) y formaldehído 37% (w/v) que redujeron los iones de plata a plata metálica. Esta reacción se detuvo añadiendo otra solución formada por EDTA-Na.2H₂O 1,46% (w/v) durante 10 min, y lavando de nuevo los geles tres veces durante 5 min con agua MiliQ.

Debido a la pequeña cantidad de proteína presente en las antenas de estas dos especies no se llevaron a cabo los pasos posteriores a la tinción (análisis de imagen, digestión de manchas proteicas, mapeo de masas peptídico y secuenciación de péptido por MALDI-TOF), y se buscó una técnica alternativa más sensible y adecuada para el análisis de estas muestras.

5.5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE PÉPTIDOS DIGERIDOS EN SOLUCIÓN

5.5.1. FILTER AIDED SAMPLE PREPARATION O DIGESTIÓN FASP

Esta metodología se basa en la conversión de proteínas “en solución” presentes en una muestra biológica en péptidos listos para ser analizados por espectrometría de masas, eliminando el uso de detergentes. Para ello se utilizan reactivos caotrópicos como la urea y tiourea, que permiten extraer las proteínas, solubilizándolas y digiriéndolas posteriormente en condiciones de desnaturalización, normalmente seguido de una separación de péptidos bidimensional (Wisniewski et al., 2009). En los últimos años, está ganando popularidad un nuevo método conocido como Filter Aided Sample Preparation o FASP (Manza et al., 2004; Wisniewski, 2016). Esta técnica se realiza en unos filtros verticales que permiten el intercambio del tampón de urea en el que se produce la alquilación de residuos de cisteína

reducidos con el tampón en el que se llevará a cabo la digestión enzimática, la digestión de las proteínas mediante el uso de tripsina, y la elución y desalación posteriores por las que se eliminan agentes desnaturizantes, reductores, alquilantes, ácidos nucleicos y lípidos, proporcionando una muestra lista para el análisis por MS (Manza et al., 2005; Wisniewski et al., 2009; Hernández-Valladares et al., 2016). Este método supone una gran ventaja con respecto a otros métodos en cuanto al tiempo de preparación, la cantidad de muestra requerida y la menor pérdida de muestra, además de proporcionar una identificación de proteínas similar a la conseguida con otras metodologías en solución (Manza et al., 2005; Wisniewski, 2016).

Como paso previo a la Digestión FASP, se llevó a cabo el acondicionamiento y pasivación de las unidades de filtros Amicron Ultra-0.5ml (Milipore™, EEUU) utilizados para filtración con centrífuga. Este procedimiento se lleva a cabo por dos razones. En primer lugar, estos filtros contienen glicerol, el cual es necesario eliminar antes de llevar a cabo la digestión para evitar posteriores interferencias. En segundo lugar se evita que la muestra quede adherida a la membrana y así se puede recuperar una mayor cantidad de ésta. Este proceso se inicia la tarde previa a la digestión y consiste en la realización de una serie de lavados de las membranas con 400 µl de NaOH 0,1 M y un segundo lavado con 400 µl de agua miliQ, centrifugando a 14000 rcf durante 10 min a 13°C. A continuación los filtros son sumergidos en una solución de Tween 20 (Sigma-Aldrich, EEUU) al 5% durante toda la noche y son aclarados tres veces antes de proceder a su utilización.

En el proceso de digestión como tal, alícuotas de un volumen de material lisado en tampón 2% SDS, Tris/HCl 100 mM, DTT 0,1 M con un contenido equivalente a 100 µg de proteína, se solubilizaron en tampón UA (Urea 8M en Tris/HCl 0,1M, pH 8,5) hasta obtener una concentración de SDS por debajo de 0,1% en la muestra, la cual es compatible con el uso de los filtros. En cada filtro se añadió un volumen de 400-430 µl y se centrifugó a 14000 rcf a 13°C durante 15 min, hasta filtrar la totalidad de la muestra. Una vez filtrada toda la muestra, se añadieron 100 µl de IAA 0,05M en tampón UA al filtro y se centrifugó en las condiciones previamente descritas. Posteriormente, se añadieron al filtro 100 µl de tampón UA (x3) seguidos de 100 µl de TEAB 200 mM (x3) centrifugándose de nuevo tras cada adición en las condiciones anteriormente mencionadas. Finalmente, se añadieron 100 µl de tripsina en TEAB 200 mM en una relación enzima/proteína 5:100 a cada uno de los filtros para someterlos a digestión, y se incubaron a 37°C durante 18-20 h. Transcurrido este tiempo, se procedió a la fase de elución del digerido, haciendo tres lavados del filtro con TEAB 200mM y posterior centrifugación. La muestra fue recogida en tubos colectores lavados previamente con acetonitrilo (Figura 3.8). El volumen final de muestra digerida fue acidificada con TFA (ácido trifluoroacético) (1% v/v) y almacenadas a -40 °C hasta su posterior uso.

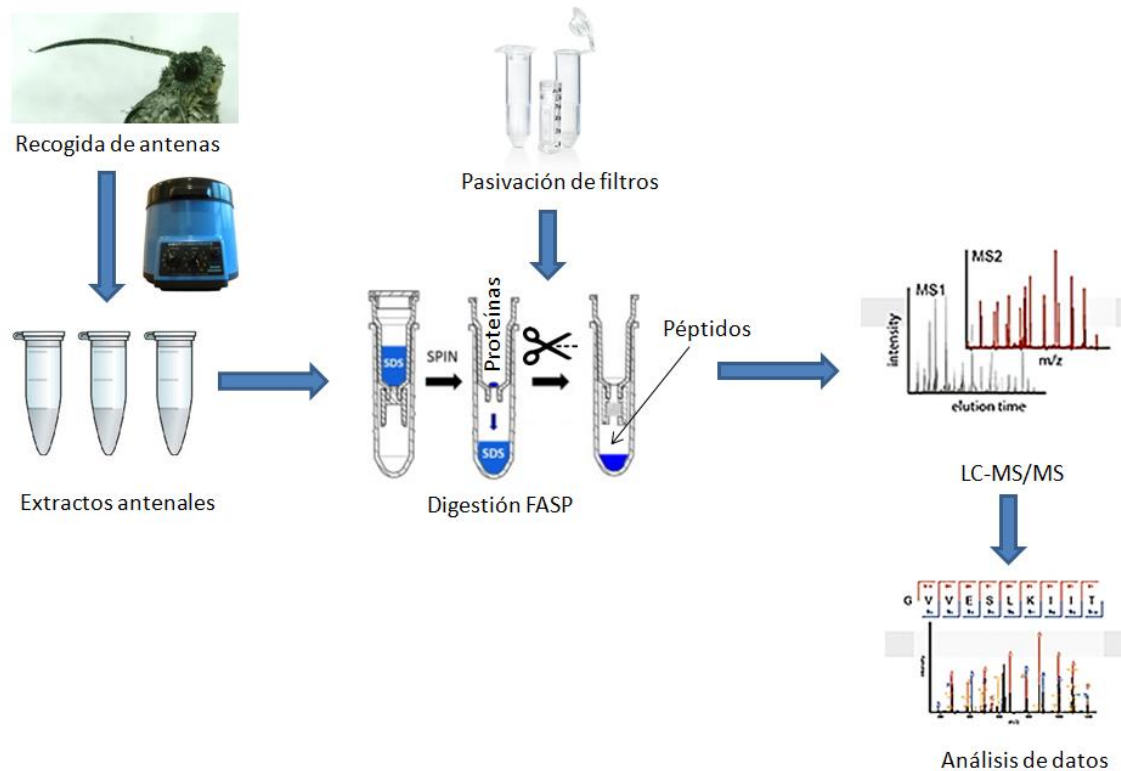


Figura 3.8. Esquema de análisis de proteínas antenales mediante Digestión FASP, incluyendo la preparación de la muestra e identificación por espectrometría de masas.

5.5.2. CUANTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS MEDIANTE LC-MS

La cuantificación de los péptidos obtenidos por el FASP puede realizarse mediante métodos basados en el uso de moléculas marcadoras o por técnicas libres de etiquetas o “label-free”. Los primeros, utilizan sondas fluorescentes, radioactivas o colorimétricas entre otras, y son muy útiles en estudios funcionales de proteínas y de las interacciones entre éstas. Por otra parte, las técnicas “label-free” se basan en propiedades específicas de la molécula de estudio, en este caso la masa del péptido digerido, evitando la presencia de marcajes artificiales que pueden interferir la estructura de la molécula de interés (Fuentes & Orfao, 2012). Permiten una detección específica, rápida y de alta sensibilidad, pero a diferencia del etiquetado diferencial cada muestra biológica ha de medirse por separado.

La cuantificación “libre de etiquetas” es un método de espectrometría de masas que permite determinar la cantidad relativa o absoluta de proteínas en dos o más muestras biológicas. Este método se basa en la intensidad de la señal del ión precursor o en el recuento espectral (Spectral counting). El primero es útil con espectros de masas de alta precisión, como los obtenidos por espectrómetros de tiempo de vuelo (ToF) u orbitrap, ya que su alto poder de resolución facilita la extracción de señales peptídicas en la primera fase de masas (MS1) que se distinguen por su patrón isotópico característico y por su tiempo de retención. El área de la señal peptídica puede integrarse y utilizarse como medida cuantitativa de la concentración original del péptido. Por su parte, el conteo espectral solo cuenta el número de espectros identificados para un péptido determinado en diferentes muestras biológicas y luego integra los resultados para todos los péptidos medidos de la proteína o proteínas que se cuantifican.

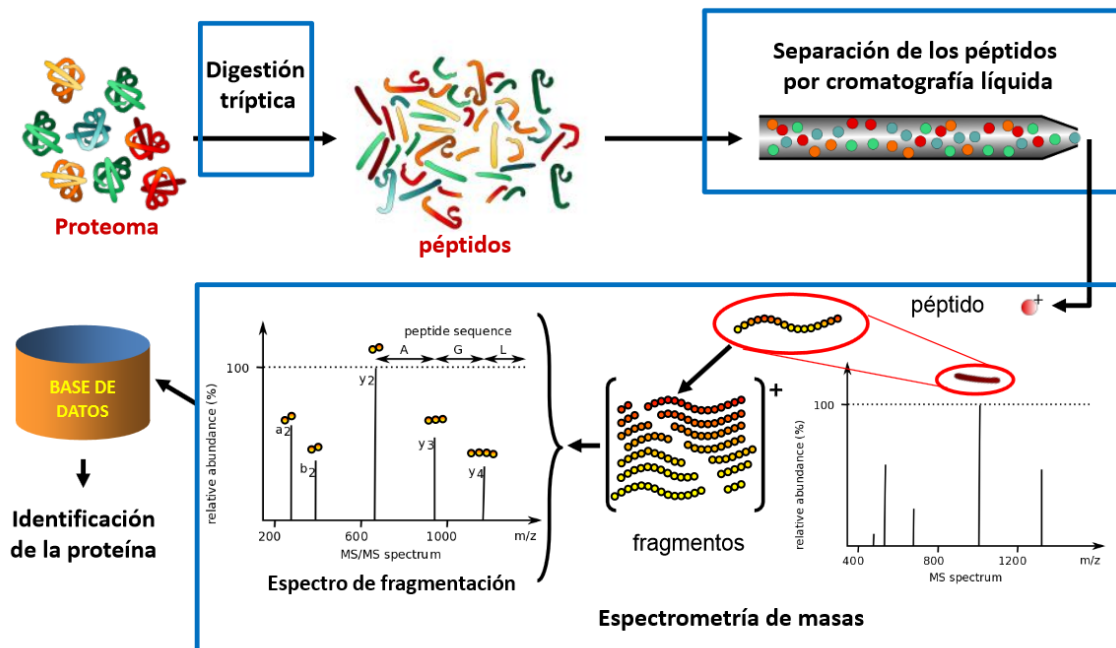


Figura 3.9. Esquema de cada una de las fases del proceso de identificación peptídica. Fuente: <http://ubio.bioinfo.cnio.es/Cursos/Proteomics/cuantificacion.pdf>

La mezcla de péptidos tripticos obtenidos tras la digestión FASP fue analizada por la Dras. Vanessa Casas y Montserrat Carrascal (CSIC-UAB) por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS). Los péptidos se separaron en un cromatógrafo líquido HPLC equipado con una bomba capilar nano Agilent 1200 (Thermo Fischer Scientific, España), una bomba binaria, un microinyector con termostato y una válvula electromecánica de dos puertos. Una vez separados, cada péptido fue analizado mediante un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, España) acoplado al cromatógrafo por una fuente de ionización nanoelectrospray (Proxeon, Dinamarca, ahora Thermo Scientific), que permitía la introducción de la muestra líquida y la ionización de la misma. Este espectrómetro disponía de dos analizadores de masas capaces de detectar iones y recoger espectros que pueden trabajar de forma independiente o coordinada: una trampa iónica lineal (LTQ Velos), y un orbitrap. El analizador de masas de trampa iónica permite obtener múltiples niveles de fragmentación (MSⁿ) y el orbitrap amplía los modos de fragmentación (HCD), por lo que al trabajar de manera acoplada combinan la rapidez y sensibilidad de la primera con la alta resolución y exactitud de masa del segundo. El espectro de fragmentación resultante nos da información de la masa de los péptidos y de su secuencia de aminoácidos (Figura 3.9). A la lista de masas obtenida tras el análisis por MS se le denomina huella peptídica, y gracias a programas de búsqueda, como NCBI y Uniprot, puede compararse con los presentes en las bases de datos y conocer a qué proteína pertenecen, ya que el conjunto de péptidos derivados de la digestión con enzimas específicas de una proteína concreta es característico de ésta y puede utilizarse en su identificación mediante mapeo de masas peptídico. Para mejorar la precisión de la identificación es recomendable repetir varias veces el proceso de identificación del péptido, para disponer así de varios espectros de fragmentación.

De cada una de las muestras digeridas, se evaporó un microgramo de péptidos hasta sequedad y se resuspendió en 20 μ l de 1% ácido fórmico (v/v) y 5% metanol (v/v). Los péptidos fueron separados mediante un cartucho de preconcentración C18 (Agilent Technologies, EEUU) conectado a una columna C18 de 15 cm X 100 μ m i.d. (Nikkyo Technos Co., Japón). La fase móvil consistió en acetonitrilo (A) y agua con 0,1% ácido fórmico (B) usando un programa de gradiente lineal de 3% (A), a 40% de B en 360 min y con un flujo de 0.4 μ l/min. La fuente de ionización se hizo funcionar en modo de iones positivos con un voltaje de pulverización de 1.8 kV y el LTQ XL Orbitrap funcionó en modo dependiente de los datos con una resolución de masa objetivo de 60.000 a m/z 400. El rango de escaneo de cada inyección fue de 400-1800 m/z y hasta los 10 picos más intensos (Casanova et al., 2017).

Los datos obtenidos fueron analizados con el software Proteome Discoverer 1.4.0.288 (Thermo Scientific, España). El espectro de fragmentación fue buscado con el motor de búsqueda SEQUEST frente a la base de datos *Lepidoptera*, usando los siguientes parámetros: tripsina, máximo 3 divisiones perdidas, tolerancia de masa de 0.6 Da, carbamidometilación de cisteína y oxidación de metionina como posible modificación (Casanova et al., 2017). Las muestras fueron filtradas al 0,1% FDR (False Discovery Rate) para descartar falsos positivos, y las secuencias de péptidos obtenidas mediante este programa se confirmaron manualmente, y en algunos casos se sometieron a una búsqueda por homología con la herramienta BLAST disponible en la web del NCBI.

