

Tesis de Posgrado

Síntesis de proteínas cuticulares durante la metamorfosis de la mosca mediterránea *Ceratitis capitata*

Boccaccio, Graciela Lidia

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Boccaccio, Graciela Lidia. (1991). Síntesis de proteínas cuticulares durante la metamorfosis de la mosca mediterránea *Ceratitis capitata*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2420_Boccaccio.pdf

Cita tipo Chicago:

Boccaccio, Graciela Lidia. "Síntesis de proteínas cuticulares durante la metamorfosis de la mosca mediterránea *Ceratitis capitata*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2420_Boccaccio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Síntesis de proteínas cuticulares
durante la metamorfosis de la mosca
mediterránea *Ceratitis capitata*.**

Autor: Graciela Lidia Boccaccio
Director: Dr. Luis Alberto Quesada-Allué
Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar"

**Tesis presentada para optar al título de Doctor
en Ciencias Químicas - Año 1991**

Tesis
2420
ej. 2.

Agradecimientos:

*al Consejo Directivo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas
"Fundación Campomar", por permitirme realizar
este trabajo de Tesis en sus instalaciones.*

al personal técnico y administrativo del IIB, por su colaboración.

*al Dr. Luis Alberto Quesada-Allué,
por el apoyo brindado durante la realización de esta Tesis.*

a Luis, el "jefe", por su amistad.

*a Pablo Wappner, por sus consejos valiosos.
Y por el tiempo compartido.*

a Alejandro Rabossi, amigo y excelente compañero de laboratorio.

a Silvia Moreno, por su amistad atenta y comprensiva.

a Eduardo Cafferata, por los buenos ratos.

a Alfredo Curá, quien siempre sabe escuchar.

*a mis amigos del IIB, Andrea Roschild,
Fernando Ardila, Vivian Alvarez, Eduardo Guillén, Carlos Labriola,
Diana Tolmasky, Silvana Merello, Maia Bosch, Martín Radrizzani,
por los almuerzos y cafés que compartimos.*

*en especial a Roberto Couso, Clara Krisman, A. J. Parodi, Juana Tandecartz,
Ricardo Wolosiuk, quienes de distinta manera me brindaron
sus conocimientos y su afecto.*

a Luis R. Marechal, desde la época en que éramos vecinos.

*a María Carmen Galli y Angel Boccaccio, a quienes les debo en gran medida
lo que soy y hago.*

Abreviaturas.

A ₂₆₀	Absorbancia a 260 nm.
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm.
ACP	Proteína(s) cuticular(es) de adulto.
AZ	Zona de ensamblado.
BAC-16	Cloruro de Bencil-dimetil-n-hexadecilamonio.
BHT	Butil-hidroxitolueno.
BSA	Seroalbúmina bovina.
CBB	Coomassie Brilliant Blue.
CBBG-250	Coomassie Brilliant Blue G-250.
CBBR-250	Coomassie Brilliant Blue R-250.
Con A	Concanavalina A.
cpm	Cuentas por minuto.
DNA	Acido desoxiribonucleico.
DOC	Deoxicolato de sodio.
EDTA	Acido diamino-etilén-tetraacético.
FPLC	Cromatografía líquida y rápida de proteínas.
fuc	Fucosa.
glc	Glucosa.
Hepes	Acido N-2-hidroxi-etil-piperazin-N'-2-etanosulfónico.
kD	Kilodaltons.
LCG	Glicoproteína(s) cuticular(es) larval(es).
LCP	Proteína(s) cuticular(es) larval(es).
LsCP	Proteínas cuticulares de larva en el momento del salto.
man	Manosa.
Mr	Movilidad relativa.
Po	Pupario blanco.
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida.
PAGE-SDS	ver SDS-PAGE.
PAS	Tinción de ácido peryódico-reactivo de Schif.
PCG	Glicoproteína(s) cuticular(es) pupal(es).
PCP	Proteína(s) cuticular(es) pupal(es).
PMSF	Fluoruro de fenil-metilsulfonilo.
PPO	2,5 difeniloxazol.
PTU	Feniltiourea.
RNA	Acido ribonucleico.
SDS	Dodecilsulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante (SDS) en geles de poliacrilamida.
TBS	Buffer Tris 50 mM pH 8 NaCl 150 mM.
TCA	Acido ticloroacético.
TE	Buffer Tris 10 mM pH 8 EDTA 1mM.
Tris	Tri(hidroximetil)-aminometano.
TX-100	Tritón X-100.

Indice

	Pág.
I. Introducción.	
1. La metamorfosis.	2
2. El tegumento.	3
2.1 Estructura.	3
3. Principales componentes cuticulares.	9
3.1 Quitina.	9
3.2 Proteínas cuticulares.	11
3.3 Estructura supramolecular.	18
4. Otras estructuras extracelulares.	19
5. El proceso de muda.	21
5.1 Cambios en el tegumento durante el proceso de muda.	21
5.2 Secreción de proteínas cuticulares y proceso de ensamblado.	22
6. La metamorfosis en dípteros ciclorrafos.	24
7. Regulación del proceso de muda.	24
8. <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae).	26
 II. Materiales y métodos.	
1. Insectos.	29
1.1 <i>Ceratitis capitata</i> .	29
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> .	30
1.3 <i>Triatoma infestans</i> .	30
1.4 <i>Trichogramma sp.</i>	30
2. Preparación de proteínas cuticulares de distintos estadios de <i>C. capitata</i> .	31
2.1 Preparación masiva.	31
2.2 Preparación de cutículas individuales.	32
3. Obtención de extractos proteicos no cuticulares.	32
3.1 Proteínas totales.	32
3.2 Proteínas de hemolinfa.	33
4. Determinación de proteínas.	33
4.1 Métodos empleados.	33
4.2 Interferencia del SDS en el ensayo de Bradford.	34
5. Análisis de afinidad por quitina.	37
5.1 Columnas de afinidad de quitina.	37
5.2 Digestión de cutículas con quitinasa.	38
6. Técnicas electroforéticas.	38
6.1 Electroforesis desnaturizante.	38
6.2 Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa.	38
7. Radiomarcación <i>in vivo</i> .	39
7.1 Microinyección.	39
7.2 Radiomarcación <i>in vivo</i> seguida de "chase" <i>in vitro</i> .	39
8. Técnicas inmunológicas.	40
8.1 Preparación de antisueros en conejos.	40

8.2 Revelado de membranas de nitrocelulosa con antisueros.	40
8.3 Inmunoprecipitación.	41
9. Análisis de glicoproteínas.	42
9.1 Tinción de ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS).	42
9.2 Unión de concanavalina A en membranas de nitrocelulosa.	43
9.3 Determinación de azúcares en proteínas.	43
9.4 Obtención de monosacáridos de PCG-100.	44
9.5 Cromatografía en papel.	45
10. Otros.	45
10.1 Preparación de ácidos nucleicos.	45
10.2 Análisis con sondas de DNA.	47
 III. Proteínas cuticulares durante el desarrollo de <i>Ceratitis capitata</i>.	
Resultados.	
1. El ciclo de vida de <i>Ceratitis capitata</i> .	49
2. Preparación masiva de proteínas cuticulares de <i>Ceratitis capitata</i>	52
2.1 Obtención en masa de cutículas de distintos estadios.	52
2.2 Extracción de proteínas cuticulares.	54
3. Perfil electroforético de proteínas cuticulares durante el desarrollo.	55
3.1 Análisis de los distintos estadios.	55
3.2 Perfil de proteínas larvales (LCP), pupales (PCP) y de adulto (ACP)	57
3.3 Proteínas cuticulares de larvas de tercer estadio tardío.	58
3.4 Proteínas cuticulares durante la metamorfosis.	59
4. Composición proteica de las distintas partes del cuerpo de la pupa.	62
5. Solubilización y solubilidad de proteínas cuticulares en <i>C. capitata</i> .	63
5.1 Solubilización de proteínas cuticulares pupales.	63
5.2 Solubilización de proteínas cuticulares larvales.	64
5.3 Eliminación del SDS de los extractos proteicos.	65
5.4 Solubilidad.	67
6. Unión a quitina.	68
6.1 Digestión de cutículas con quitinasa.	69
6.2 Afinidad por quitina.	69
7. Constancia del perfil electroforético en moscas de distinto origen.	72
7.1 PCP y ACP en cepas salvajes.	72
7.2 Análisis de PCP en mutantes de color de cutícula.	74
8. Análisis de proteínas cuticulares en otros insectos.	75
Discusión.	
1. El ciclo de vida de <i>Ceratitis capitata</i> .	77
2. Proteínas cuticulares durante el desarrollo.	78
3. Proteínas cuticulares pupales durante la muda a adulto farado.	84
4. Distribución de proteínas cuticulares en distintas partes del cuerpo.	85
5. Extracción y solubilidad de proteínas cuticulares de <i>Ceratitis capitata</i> .	86
6. Variabilidad en las proteínas cuticulares.	90

IV. Estudios inmunológicos de proteínas cuticulares de *C. capitata*.

Resultados.

- | | |
|--|-----|
| 1. Preparación de antisueros contra proteínas cuticulares. | 92 |
| 2. Análisis inmunológico de PS-44. | 94 |
| 2.1 Presencia de PS-44 en distintos estadios. | 94 |
| 2.2 Localización tisular de PS-44. | 96 |
| 2.3 Relación inmunológica con otras especies. | 97 |
| 3. Estudios inmunológicos de la PCP mayoritaria. | 99 |
| 3.1 Proteínas reconocidas con antisueros anti-PCG-100. | 99 |
| 3.2 Especificidad de estadio y tejido de la PCG-100. | 101 |
| 3.3 Acumulación de PCG-100 durante la metamorfosis. | 102 |
| 3.4 Relación inmunológica con otras especies. | 104 |

Discusión.

- | | |
|---|-----|
| 1. PS-44 es no-cuticular. | 105 |
| 2. Antigenicidad y epitopes de la PCG-100. | 107 |
| 3. PCG-100: especificidad de estadio y tejido. | 108 |
| 4. Deposición de PCG-100 durante la metamorfosis. | 109 |
| 5. Relación inmunológica entre proteínas cuticulares de distintas especies. | 110 |

V. Estudios a nivel de ácidos nucleicos.

Resultados.

- | | |
|---|-----|
| 1. Preparación de ácidos nucleicos. | 113 |
| 1.1 Preparación de DNA. | 113 |
| 1.2 RNA y RNA poliA+ de distintos estadios. | 113 |
| 2. Estudios con sondas de DNA de <i>Drosophila melanogaster</i> . | 114 |

Discusión.

- | | |
|--|-----|
| Homología con genes de <i>Drosophila</i> . | 118 |
|--|-----|

VI. Síntesis *in vivo* de proteínas cuticulares pupales.

Resultados.

- | | |
|---|-----|
| 1. Radiomarcación <i>in vivo</i> . | 122 |
| 2. Síntesis de proteínas durante la metamorfosis. | 123 |
| 3. Síntesis <i>in vivo</i> de PCP. | 124 |
| 4. Síntesis <i>in vivo</i> de PCG-100. | 127 |
| 4.1 Inmunoprecipitación. | 127 |
| 4.2 Síntesis de PCG-100 durante la metamorfosis. | 128 |

Discusión.

- | | |
|--|-----|
| 1. Radiomarcación de proteínas cuticulares <i>in vivo</i> . | 131 |
| 2. Síntesis <i>in vivo</i> de proteínas cuticulares pupales. | 132 |

VII. Glicosilación, procesamiento, secreción y deposición de proteínas cuticulares en *Ceratitis capitata*.

Resultados.

1. Presencia de hidratos de carbono en proteínas cuticulares de *C. capitata*. 137
2. Otras modificaciones post-traduccionales. 138
3. Contenido de azúcares de las PCP. 139
4. Estudios por radiomarcación *in vivo*. 142
 - 4.1 Incorporación de azúcares a PCP. 142
 - 4.2 Azúcares presentes en PCG-100. 144
 - 4.3 Presencia de fucosa en PCG-100. 146
5. Síntesis, procesamiento y deposición de PCG-100 en la cutícula. 147
 - 5.1 Cinética. 147
 - 5.2 Especies moleculares de PCG-100 antes de su deposición. 149

Discusión.

1. Modificaciones post-traduccionales. 152
2. Glicosilación y procesamiento de PCG-100. 153
3. Deposición de PCG-100 en la cutícula. 157

VIII. Proteínas de pupario de *Ceratitis capitata*.

Resultados.

1. Proteínas de pupario de *Ceratitis capitata*. 160
2. Propiedades de solubilidad. 161
3. Proteínas en mutantes de color de pupario. 162
4. Síntesis *in vivo* de proteínas de pupario. 164
 - 4.1 Radiomarcación *in vivo* con [³⁵S]-metionina. 164
 - 4.2 Síntesis *in vivo* durante la pupariación. 165
 - 4.3 Lugar de síntesis de PMP-26. 168
 - 4.4 Exportación e incorporación al pupario. 170

Discusión.

1. Cambios en la composición proteica de la cutícula larval durante la pupariación. 172
2. ¿Un nuevo tipo de proteínas cuticulares exclusivas de pupario? 174
3. Síntesis *in vivo* de proteínas de pupario. 175

IX. Resumen de los resultados obtenidos, conclusión y perspectivas.

1. Resumen. 181
2. Conclusión y perspectivas. 185

X. Bibliografía. 188

I. Introducción.

The shock arose not for the creatures abilities
(intelligence, calculation, cunning and aggressiveness)
but from the fact that they possessed internal skeletons,
leathery skins and flexible bodies.
They moved like primitive animals of the jungles but their
intelligence was undeniable.
The discovery had caused consternation in the scientific community,
which had postulated that no creature
lacking a protective exoskeleton
would survive long enough to evolve true intelligence.

A. D. Foster. *Nor Crystal Tears*, 1982.

Durante el desarrollo post-embriionario de los insectos el exoesqueleto cuticular es reemplazado periodicamente por uno nuevo.

Los genes involucrados en la construcción del exoesqueleto -entre ellos los que codifican para proteínas cuticulares- constituyen un excelente modelo experimental para el estudio de la expresión genómica durante el desarrollo. Sin embargo, se han realizado relativamente pocos trabajos y los estudios en biología molecular de proteínas cuticulares están sólo en sus inicios (Roberts y Willis, 1980 a, b; Snyder et al., 1981; Silvert, 1985; Fristrom et al., 1986; Rebers y Riddiford, 1988; Skelly y Howells, 1988; Souliotis y Dimitriadis, 1989).

1. La metamorfosis.

La existencia del exoesqueleto representa para los artrópodos (insectos, crustáceos y arácnidos, principalmente) una restricción en tamaño y forma. La cutícula es cambiada varias veces durante el desarrollo del animal, permitiendo el crecimiento. Es decir, el desarrollo se produce en forma discontinua, existiendo distintos estadios. El proceso de transición entre un estadio y el siguiente es denominado muda.

De acuerdo a los cambios que ocurren durante el desarrollo, los insectos se dividen en dos grandes grupos: holometábolos y hemimetábolos. En los holometábolos, o de metamorfosis completa, se produce un cambio completo en la forma del organismo. Ejemplo de éstos son las moscas y mosquitos (Dípteros) y las mariposas (Lepidópteros), en los que los estadios larvales son de tipo anelidiano, blandos y marcadamente diferentes del adulto, hexápodo, alado y generalmente mucho más rígido.

En los hemimetábolos o de metamorfosis incompleta, los estadios larvales, usualmente denominados ninfas, son bastante similares al adulto, a excepción de la falta o tamaño menor de las alas y otros apéndices. Las cucarachas y langostas son ejemplos de insectos hemimetábolos.

El desarrollo de los insectos holometábolos abarca un estadio embrionario, varios estadios larvales, seguidos por un estadio pupal, durante el cual se produce una gran reorganización tisular y las estructuras del adulto se generan a partir de grupos de células que han permanecido sin diferenciarse hasta este momento. Estas son las células de los discos imaginales y los histoblastos.

Las cutículas de los distintos estadios son sintetizadas por distintos linajes celulares. En la síntesis de las cutículas larvales interviene la epidermis larval únicamente, en tanto que las cutículas pupal y adulta son sintetizadas por células de la ex-epidermis larval y células de linaje imaginal.

Dependiendo de los estadios, la nueva cutícula puede tener propiedades físicas y biológicas radicalmente distintas de las de la cutícula anterior. En insectos holometábolos, las cutículas larvales, pupal y adulta son usualmente muy distintas: la larval es flexible y parcialmente extensible durante el crecimiento de la larva, la pupal es menos flexible y la de adulto está en gran parte esclerotizada.

2. El tegumento.

La cutícula de los artrópodos está compuesta fundamentalmente por quitina y proteínas. Constituye una importante adquisición evolutiva: sirve a la vez de esqueleto externo, ofreciendo una superficie donde anclar los músculos y de interfase con el medio ambiente.

En los insectos, la cutícula reviste todo el cuerpo y los apéndices, los tubos traqueales, los ductos de ciertas glándulas y las regiones anterior y posterior del tracto digestivo. Puede ser blanda y elástica, o dura y rígida, y adaptarse a distintas funciones, desde permitir la visión hasta brindar protección física mediante estructuras muy duras, como en los coleópteros (escarabajos). El grosor, flexibilidad, resistencia y permeabilidad de una cutícula son características que dependen de su composición.

El compartimento cuticular no es una estructura inerte, sino que está metabólicamente controlado por la epidermis mediante secreción, endocitosis y transporte de iones y moléculas a través de la membrana plasmática.

2.1 Estructura.

La estructura de la cutícula ha sido descrita en numerosos insectos, mediante estudios por microscopía óptica y electrónica (Neville, 1975;1984; Richards, 1978; Andersen 1979; Hepburn 1985).

Todas las cutículas descritas son variaciones de un mismo esquema fundamental (ver figura I.1). Están formadas por capas, siendo las dos principales la epicutícula, que es la capa más externa y delgada, y la procutícula, que constituye la mayor parte de la cutícula, seguida inmediatamente por la zona de deposición o zona de autoensamblado. Esta se halla en contacto directo con la epidermis, constituida por una monocapa de células que secretan los componentes cuticulares. El conjunto de cutícula más epidermis se denomina tegumento. El tegumento constituye una unidad anatómica y metabólica bien diferenciada del resto del animal.

Cada una de las capas mencionadas está compuesta por sub-capas, las cuales corresponden a distintas actividades secretorias de las células epidérmicas. Estas capas son distinguibles por microscopía. La composición de algunas de ellas no se conoce aún definitivamente.

La estructura en capas no es continua en toda la superficie del animal, sino que se ve interrumpida por la presencia de conductos de glándulas secretorias y sensoriales, poros y canales por los que se transportan ceras y otros materiales.

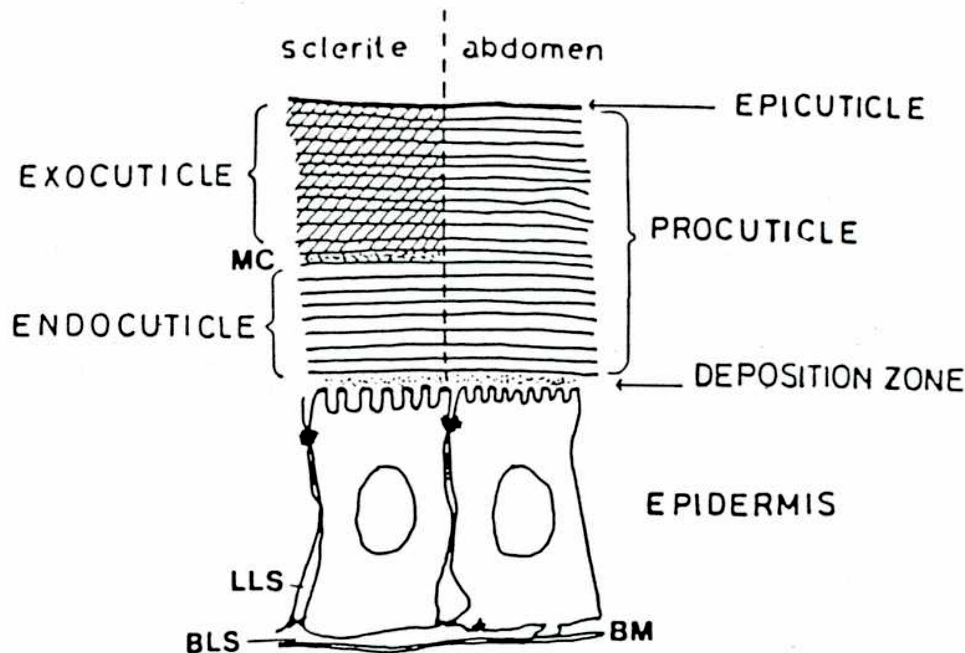


Figura I.1: Esquema general de la cutícula de los insectos. Las proporciones de las distintas capas no están en escala. MC, mesocutícula; BLS, espacio hemolinfático basal; BM, membrana basal; LLS, espacio linfático lateral. Tomado de Quesada-Allué (1987).

2.1.1 La epicutícula.

La epicutícula, de 0.1-3 μm de grosor, no contiene quitina. Compuesta por lípidos, proteínas y otras sustancias hidrofóbicas, su función principal es regular la captación y pérdida de agua. Constituye también una defensa física y contra la injuria química. La composición en lípidos cuticulares varía a lo largo del desarrollo y también de acuerdo a las condiciones ambientales y a la alimentación del insecto (Blomquist et al., 1987).

En la epicutícula se observan varias capas, usualmente cuatro, distintas en composición y propiedades. La más externa está compuesta por ceras, seguida por una capa de "cemento" y a continuación por la cuticulina o epicutícula externa y la epicutícula interna.

Capa de cemento: Poco conocida, se cree que está formada por lípidos y proteínas entrecruzados por compuestos polifenólicos. En algunos casos, la capa de "cemento" está ausente (Hepburn, 1985).

Capa de cera: Compuesta por hidrocarburos alifáticos (n-alcanos y n-alquenos, C_{12} - C_{31}) y ceras (ésteres de alcoholes alifáticos de cadena larga y ácidos grasos). Existen también trazas de ácidos grasos libres, alcoholes, cetonas, colesterol y otros esteroides. Esta y la capa de cemento son secretados por células epiteliales especializadas, después de que se depositaron las capas más internas. En algunos casos (escarabajos) también hay ceras depositadas por arriba de la capa de cemento (Hepburn, 1985).

Epicutícula externa o cuticulina: (12-18 nm) Neville (1975) postuló que la capa de cuticulina sería un poliéster de ácidos grasos hidroxilados. Dada su resistencia a la degradación, Locke (1976) propuso que estaría compuesta por sustancias similares al polietileno, lo cual se vería confirmado por un reciente trabajo de Hackman (1986), en el cual el análisis por RMN y por espectroscopía infraroja indican la presencia de grupos CH_2 principalmente y en menor medida carbonilos y aromáticos. Se conoce también la presencia de proteínas en la capa de cuticulina (Quesada-Allué, 1987).

Epicutícula interna: De composición poco conocida, se cree que la capa más interna de la epicutícula está constituida por una red de lípidos unidos a proteínas.

2.1.2 La procutícula.

La procutícula es la capa más gruesa (entre 10 y 400 μm) y de ésta dependen la mayor parte de las propiedades físicas y mecánicas de la cutícula. Está compuesta esencialmente por quitina y proteínas. Estos dos componentes llegan a constituir el 90% de la procutícula. Otros componentes procuticulares minoritarios son pigmentos, polifenoles y compuestos inorgánicos. En general, los lípidos cuticulares están presentes solamente en la epicutícula. En larvas de ciertos dípteros se encuentran lípidos también en la procutícula (Hackman, 1984).

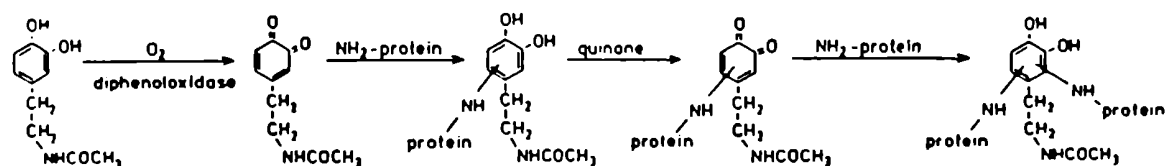
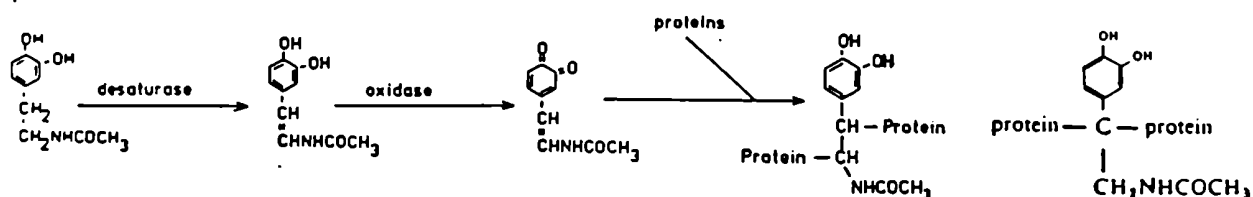
La relación quitina/proteína varía en distintas cutículas. Las cutículas altamente estirables de abdómenes de *Rhodnius* (insecto) y *Boophilus* (arácnido) contienen 11.2 y 3.8% de quitina, respectivamente, siendo los valores más bajos descriptos para los artrópodos (Andersen, 1979). En general, el contenido de quitina varía entre el 20 y el 50% (ver tabla I.1).

La procutícula suele estar esclerotizada en mayor o menor medida. Cuando la región más externa está muy esclerotizada se denomina exocutícula. El proceso de esclerotización consiste en una serie de reacciones enzimáticas en las cuales compuestos fenólicos son oxidados a quinonas y utilizados como agentes de entrecruzamiento entre las macromoléculas depositadas: proteínas y quitina.

Se acepta la existencia de por lo menos tres tipos de esclerotización mediadas por quinonas: la O-esclerotización, la β -esclerotización (Andersen, 1985) y la esclerotización mediada por metidos de quinonas (Andersen 1989) (ver figura I.2). En la O-esclerotización interviene directamente el anillo quinónico, dando a la cutícula una típica coloración marrón en la mayoría de los insectos. La β -esclerotización involucra el carbono β de las quinonas, dando como producto una cutícula esclerotizada e incolora.

Las quinonas que participan en el proceso de esclerotización son productos de la oxidación enzimática de catecolaminas. Las catecolaminas involucradas son: N-acetildopamina y las β -alanilcatecolaminas: β -alanildopamina y β -alanilnorepinefrina (Andersen, 1985; Kramer y Hopkins, 1987). La unión a proteínas tendría lugar a través de N de anillos de histidina o ϵ -NH₂ de lisinas (Schaefer et al, 1987; Kramer y Hopkins, 1987). La unión a quitina sería vía OH (ver figura I.3).

O-esclerotización.

 β -esclerotización.

esclerotización por metidos.

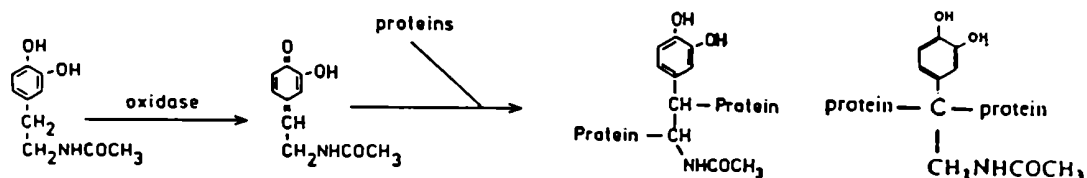


Figura I.2: Mecanismos de esclerotización mediados por catecolaminas (ver texto) (tomados de Andersen, 1985; 1989).

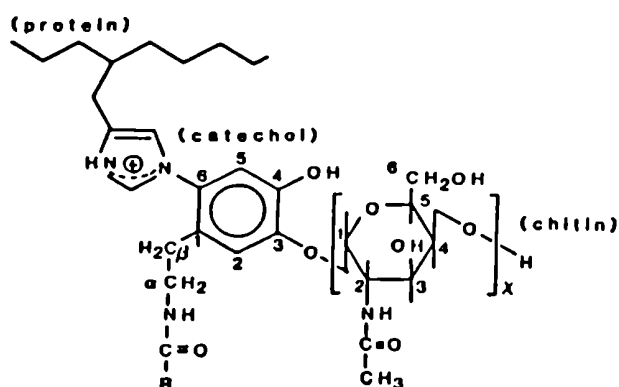


Figura I.3: Estructura propuesta para el entrecruzamiento entre proteínas y quitina mediado por catecolaminas (tomado de Schaefer et al., 1987).

Junto con el entrecruzamiento, se produciría en la mayoría de los casos una deshidratación parcial de la cutícula. Las proteínas cuticulares se tornan insolubles y la cutícula se endurece notablemente. El grado de esclerotización es muy variable de una especie a otra y también en distintas partes del cuerpo de un animal. Por ejemplo, las piezas bucales de una larva son mucho más duras que la cutícula que recubre el cuerpo, blanda y flexible.

La región más interna de la procutícula, la endocutícula, no está o está muy poco esclerotizada. Entre ésta y la exocutícula se puede distinguir frecuentemente una zona de menor espesor, la mesocutícula. Hay casos en que esta zona intermedia no está presente y casos en que no se produce esclerotización y toda la procutícula es química y físicamente indistinguible. Esto hace que ciertas propiedades varíen a través de la procutícula (ver figura I.4)

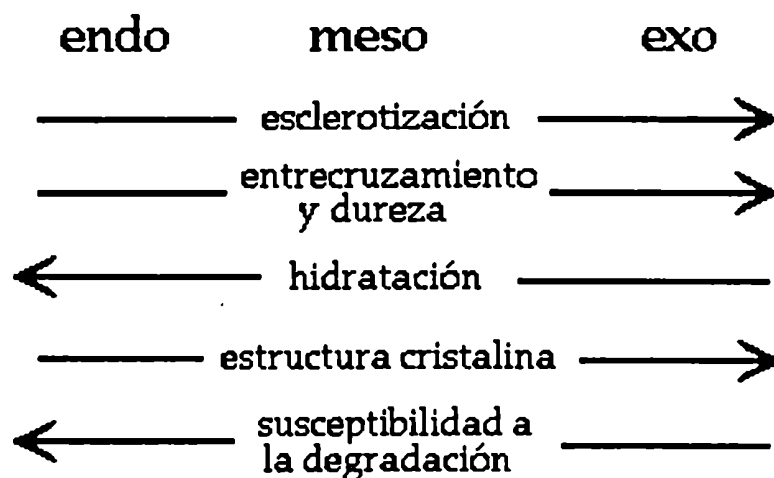


Figura I.4: Esquema generalizado de la variación de propiedades a través de la procutícula de insectos (existen numerosas excepciones -ver texto-). Las flechas indican el sentido en el que se incrementan las características mencionadas.

2.1.3 La zona de deposición.

Esta la zona donde se ensambla la cutícula. Pese a que el espacio de ensamblado es física y metabólicamente importante, no es tenido muy en cuenta por la mayoría de los autores, y ha sido poco estudiado.

De grosor variable entre 0.5 y 1 μm , se la observa durante la deposición de la procutícula, pero no durante la formación de la epicutícula (Locke, 1976). Observada al microscopio electrónico, se detecta en esta zona la presencia de microfibrillas. Según Zacharuk (1976) en esta región tendría lugar la formación de las uniones covalentes quitina-proteínas. Se desconoce si existen componentes distintos a los necesarios para la construcción de la procutícula (quitina y proteínas, fundamentalmente). Neville (1975) y Zacharuk (1976) sugirieron la presencia de mucopolisacáridos, los cuales serían capaces de formar una matriz permeable a macromoléculas.

3. Principales componentes cuticulares.

3.1 Quitina.

La quitina es un polímero lineal de N-acetilglucosamina con uniones β -(1,4). Está presente también en algas y hongos, combinada con otros materiales. Su peso molecular varía según el origen entre $1-2 \times 10^6$ (Neville, 1975; Hackman, 1984; Pont Lezica y Quesada-Allué, 1990). Algunos de los grupos amino están deacetilados, en grado variable. Esto le confiere un caracter ligeramente básico y polar, lo cual influencia la interacción con otras macromoléculas.

Así como se conoce bastante acerca de su estructura molecular, se conoce poco sobre la biosíntesis, su regulación y genética (Neville, 1975; 1984; Kramer et al., 1985; Kramer y Koga, 1986; Chen, 1987; Pont Lezica y Quesada-Allué, 1990).

La quitina se halla en forma de varillas constituídas por 18-25 moléculas que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno. Los primeros estudios de difracción de rayos X fueron realizados por Rudall (1976). Se describieron tres patrones de difracción, correspondientes a distintas estructuras cristalinas, denominadas α -quitina, β -quitina y γ -quitina.

La diferencia fundamental es la disposición paralela o antiparalela de las cadenas de quitina (ver figura I.5). Los patrones de difracción de rayos X están bastante conservados en distintas especies. El tipo α -quitina es el más abundante, el más densamente empaquetado y el que permite menor solvatación (Hepburn, 1985).



Figura I.5: Disposición de las cadenas de quitina sugeridas por Rudall (1976) para los tres tipos cristalográficos α -, β - y γ -quitina.

En los insectos (en artrópodos en general) se la encuentra covalentemente unida a proteínas, por lo tanto puede decirse que en estado nativo se trata en realidad de una glicoproteína.

Existen numerosos trabajos en donde se describe la presencia de aminoácidos o residuos proteicos en preparaciones de quitina (Hackman, 1976).

Hackman (1976) y Strout et al (1976) sugirieron uniones covalentes del tipo N-aspartil o N-histidil glucosamina, así como la existencia de uniones mas débiles del tipo de base de Schiff. Posteriormente, Hackman (1984) propuso -dado que el único aminoácido siempre presente en muestras de quitina es ácido aspártico- que éste sería el que formaría el puente quitina-proteína, probablemente como N-aspartil glucosamina.

En puparios de *Sarcophaga bullata*, después de exhaustivas degradaciones químicas y enzimáticas, se encontraron péptidos unidos covalentemente a poli-N-Acetilglucosamina (péptidoquitodextrinas) (Lipke y Strout, 1972). Estos péptidos están compuestos fundamentalmente por ácidos aspártico y glutámico, serina, glicina y alanina. La unión es resistente a la hidrólisis alcalina, lo cual sugiere que no se trata de azúcar-O-Ser/Tre. Estos autores sugieren que grupos polifenólicos o polindólicos formarían un puente entre la quitina y grupos ϵ -amino de lisinas u otros grupos amino no identificados.

Recientemente, estudios de RMN de estado sólido de ^{13}C (Schaefer et al., 1987) revelaron la existencia de uniones quitina-catecolamina-proteína (ver figura I.3), de acuerdo a la idea de Lipke et al. (1972).

Por otra parte, Mukha et al. (1987) demostraron en discos imaginales de *Drosophila* la síntesis de quitinoproteínas (poli-N-acetilglucosamina-proteína) con unión probablemente O-glicosídica. Quesada y Fristrom (datos no publicados) encontraron que estos compuestos no sufrirían β -eliminación, lo cual indicaría que en la unión no participa Ser ni Tre. Estas quitinoproteínas se exportarían, pero no está claro si están o no involucradas en la síntesis de la quitina o si forman parte de la matriz extracelular o del exoesqueleto (Mukha et al., 1987).

Dados los métodos comunmente empleados para la obtención de muestras de quitina, no se conoce la relación molar quitina/proteína unida covalentemente. Tampoco queda claro si esta unión tiene lugar durante la síntesis de las macromoléculas o posteriormente, durante el proceso de ensamblado en la cutícula o durante la esclerotización. En este último caso, la unión mediada por polifenoles, ejemplificada en la figura 1.3, es la más probable. La información reunida hasta la fecha no permite descartar que exista también algún otro tipo de unión.

3.2 Proteínas cuticulares.

No obstante ser las cutículas de los insectos muy distintas, la quitina es un componente constante en todas. Son las proteínas existentes en las distintas cutículas las que permiten que exista dicha variabilidad. Pese a ser un componente cualitativa y cuantitativamente importante, se conoce menos sobre la estructura y variedades de las proteínas que de la quitina.

Las proteínas se hallan unidas a la quitina en forma covalente y no covalente. Esta última sería en parte responsable de la afinidad por quitina mostrada por proteínas extraídas de cutícula (Hackman, 1976; Fristrom et al., 1978; Silvert et al., 1984).

Las proteínas pueden ser extraídas de la procutícula no esclerotizada mediante la acción de distintos solventes, según la fuerza de la interacción que las mantenga unidas. Estos solventes son: agua, soluciones de sacarosa, buffers de pH alcalino, ácido acético, soluciones de KCl, urea, SDS o cloruro de guanidina (Fristrom et al., 1978; Roberts y Willis, 1980a; Willis et al., 1981; Silvert, 1985; Andersen et al., 1986). Hackman (1976) estableció una serie de solventes, de acuerdo al tipo de enlace que se rompa durante la extracción:

Solvente:	Proteínas extraídas:
Agua pH 7, 48 hs a 25 °C	solubles, no unidas.
Na ₂ SO ₄ 0.167M pH 7, 48 hs a 25 °C	débilmente unidas (fuerzas de Van der Waals).
Urea 7M pH 7, 48 hs a 25 °C	puentes de hidrógeno.
NaOH 0.01 M, 5 hs a 25 °C	fuerte unión iónica.
NaOH 1M, 5hs a 50-60 °C	uniones covalentes: bases de Schiff y algunas uniones peptídicas.

Un factor importante es la temperatura a la cual se realiza la extracción. Por ejemplo, las proteínas cuticulares de fémur de *Locusta migratoria* son más fácilmente extraídas en soluciones acuosas a 4 °C que a 21 °C, lo cual es característico de proteínas estabilizadas por interacciones hidrofóbicas (Andersen et al. 1986).

La presencia de puentes disulfuro parece poco importante, dado que la cisteína es un aminoácido escaso en las proteínas cuticulares de insectos (ver más adelante, Andersen, 1979). En *Locusta migratoria*, el perfil electroforético de proteínas cuticulares no se ve afectado al ser tratadas con el agente reductor 2-SH-etanol (Andersen et al., 1986).

Las proteínas de la epicutícula se hallan unidas covalentemente a lípidos o entrecruzadas, por lo que no resultan extraíbles; así como las proteínas esclerotizadas de la exocutícula. Es decir que siempre que se trate con alguno de los solventes mencionados, las proteínas extraídas provendrán mayoritariamente de la endocutícula.

La extracción secuencial de proteínas es indicativa de la fuerza de la interacción existente con otros componentes cuticulares tales como quitina u otras proteínas, pero no es un criterio absoluto: un mismo tipo de unión puede presentar variaciones en cuanto a la fuerza de la interacción. También hay que tener en cuenta que pueden existir enlaces que resulten inaccesibles al solvente. Finalmente, la facilidad de extracción depende también de la solubilidad de las proteínas *per se*, propiedad que en general no es tomada en cuenta en la bibliografía.

Se ha dedicado poca atención a la genética molecular y a la regulación de la expresión de estas proteínas a lo largo del desarrollo. La mayor parte de los estudios realizados apuntan a la caracterización bioquímica y a la determinación de la composición aminoacídica de proteínas de distintas cutículas, con el objeto de establecer una relación entre el tipo de proteína(s) y las propiedades de la cutícula. A partir de estos trabajos, pueden hacerse ciertas generalizaciones:

3.2.1 Heterogeinidad de las proteínas cuticulares.

En los últimos años se han descripto las proteínas cuticulares de distintas especies (ver tabla III.5, páginas 79-82). En todos los casos descriptos, las cutículas contienen una mezcla de distintas proteínas, en distintas proporciones. El número de polipéptidos presentes es muy variable: en cutículas flexibles larvales existen relativamente pocas proteínas, por el contrario, la cutícula de adulto de *Locusta migratoria* presenta unos 100 polipéptidos distintos (Højrup et al., 1986a).

Inicialmente, la fracción de proteínas extraídas de cutícula fue denominada "artropodina" y la fracción no extraíble, esclerotizada "esclerotina". Dada la heterogeneidad de las preparaciones de proteínas cuticulares, los términos "artropodina" y "esclerotina" fueron cayendo en desuso.

En ciertas estructuras cuticulares especializadas, como los ligamentos involucrados en el vuelo o en el salto, se encuentra una proteína particularmente "elástica": la resilina. Esta proteína está presente en numerosos insectos y probablemente también en crustáceos y arácnidos. La composición aminoacídica es muy similar en distintas especies: es rica en glicina, prolina y aminoácidos hidrofílicos. No contiene hidroxiprolina, triptofano ni aminoácidos con azufre. Está entrecruzada a intervalos regulares por dímeros y trímeros de tirosina y no presenta estructura terciaria definida (Hackman, 1984; Hepburn, 1985).

La resilina sería sintetizada en células epiteliales especializadas, y se polimerizaría extracelularmente por la acción de una peroxidasa sobre residuos de tirosina (Hackman, 1984).

Pueden existir diferencias en la composición proteica cuticular de distintas partes del cuerpo de un mismo individuo. En general las mayores diferencias dentro de un mismo organismo se encuentran cuando se comparan partes duras con partes blandas. En algunos casos se han descripto diferencias cuantitativas en la composición proteica de abdómenes de adultos de distintos sexos (Andersen y Højrup, 1987).

Se encontraron también diferencias en la composición proteica de las distintas capas procuticulares. En *Drosophila melanogaster*, se determinó por inmunolocalización que las capas mas externas de la procutícula pupal contienen proteínas de bajo peso molecular que no están presentes en las capas más internas. En éstas, se encuentran otras proteínas, de alto peso molecular, que no están presentes en la región distal de la procutícula (Wolfgang et al., 1986). Esta variación en la composición proteica se correlaciona con una diferencia morfológica observada al microscopio electrónico: en la zona externa las lamelas muestran un empaquetamiento más denso que en la zona proximal.

Andersen y Højrup (1987) encontraron que las proteínas cuticulares de abdomen de *Locusta migratoria* son diferentes según se extraigan antes o después de la ecdisis. Se asume que las proteínas extraídas antes de que se produzca la esclerotización, es decir antes de la ecdisis, son exocuticulares, en tanto que las extraídas después de la ecdisis pertenecen a la endocutícula.

3.2.2 Composición aminoacídica.

Los datos de composición o secuencia aminoacídica conocidas para algunas proteínas cuticulares, permiten hacer ciertas observaciones generales:

Existen diferencias en la composición aminoacídica de proteínas de cutículas blandas, en comparación con las de cutículas endurecidas: Las cutículas blandas son ricas en aminoácidos polares, cargados y con abultadas cadenas laterales, en tanto que en las cutículas duras predominan los residuos pequeños, hidrofóbicos, no polares (Andersen, 1979; Andersen et al., 1986; Hepburn, 1985).

Las proteínas de cutículas flexibles de larvas de coleópteros, dípteros y lepidópteros tienen alto contenido en aminoácidos con abultadas cadenas laterales, como prolina, tirosina y ácidos dicarboxílicos (Hackman, 1976; Hackman y Goldberg, 1976). En *Sarcophaga bullata* (díptero) las proteínas larvales son abundantes en ácidos aspártico y glutámico, glicina, serina, valina y lisina (Lipke et al., 1981). En *Locusta migratoria* (ortóptero), las proteínas de abdomen de adulto también son ricas en aminoácidos ácidos (ácidos aspártico y glutámico: 20-30%), prolina (6-18%), glicina y alanina (20%) (Andersen y Højrup, 1987).

Por supuesto, existen excepciones, como es el caso de ciertos escarabajos (Andersen et al., 1986). Andersen et al. (1986) encuentran que la mayor diferencia entre proteínas cuticulares de partes duras y blandas de *Schistocerca gregaria* es la relación de los contenidos en glicina y alanina. Las cutícula duras tienen alto contenido en alanina y las flexibles son ricas en glicina.

En general, los aminoácidos más abundantes en cutículas blandas están presentes en empaquetamientos poco densos, lo cual estaría relacionado con la flexibilidad de estas cutículas (Hepburn, 1985). Esto concuerda con los datos de difracción de rayos X según los cuales estas proteínas serían globulares, con muy poca estructura helicoidal (Hackman, 1984). Por el contrario, la secuencia aminoacídica de proteínas de cutículas duras, ricas en residuos pequeños, predice la presencia de "β-turns" y tramos cortos de α-hélice (Højrup et al., 1986a).

Las proteínas de cutículas blandas de ciertas larvas son de relativamente bajo peso molecular y de punto isoeléctrico más bien ácido (3.3-5.7) (Hackman, 1976; Hackman y Goldberg, 1976; Fristrom et al., 1978; Lipke et al., 1981; Skelly y Howells, 1987). Las 21 proteínas del último estadio larval de *Sarcophaga bullata* muestran puntos isoeléctricos entre 4.5 y 6. Sus pesos moleculares varían entre 16 y 24 kD. Por el contrario las proteínas extraídas de adulto de *Locusta migratoria* presentan puntos isoeléctricos entre 6.4 y 11 y un peso molecular entre 15 y 37 kD (Lipke et al., 1981).

3.2.3 Proteínas cuticulares durante el desarrollo.

La composición en proteínas cuticulares suele ser diferente en distintos estadios del desarrollo de un insecto. En los dípteros *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina* y *Dacus oleae*, las proteínas del tercer estadio larval son distintas de las pupales y éstas de las de adulto (Chihara et al., 1982; Skelly y Howells, 1988; Souliotis et al., 1988a). En *Tenebrio molitor* y *Anthonomus grandis* (coleópteros) las proteínas abdominales son distintas en los estadios larval, pupal y adulto (Lemoine y Delachambre, 1986; Stiles y Leopold, 1990). En *Galleria mellonella* (lepidóptero) también se observaron diferencias entre las proteínas cuticulares de los mismos estadios (Srivastava, 1970; 1971, citado en Skelly y Howells, 1988).

Existen casos en que estadios distintos comparten ciertas proteínas. En *Hyalophora cecropia* (lepidóptero) existen por lo menos cuatro proteínas presentes en cutículas flexibles de larva y adulto, y tres en estructuras rígidas de pupa y larva (Willis, 1989).

3.2.4 Homología entre proteínas cuticulares de distintas especies.

De los pocos casos en que se aislaron genes o se conocen las secuencias aminoacídicas de proteínas cuticulares, se concluye que éstas estarían relativamente conservadas a lo largo de la evolución.

La proteína larval SC1 de *Sarcophaga bullata* (díptero) muestra un 65% de homología con la proteína cuticular larval LCPI de *Drosophila melanogaster*. Otras proteínas larvales de *Sarcophaga* presentan menor grado de homología (Henzel et al., 1985).

Durante el desarrollo de esta tesis, Souliotis et al. (1988b; 1989) identificaron en *Dacus oleae*, mosca muy emparentada evolutivamente con *Ceratitis capitata*, genes que codifican para proteínas cuticulares larvales haciendo uso de su homología con los genes de *Drosophila melanogaster*.

Inclusive en especies evolutivamente distantes se han encontrado secuencias aminoacídicas conservadas entre las distintas proteínas cuticulares. En *Manduca sexta* (mariposa del tabaco) la proteína larval LCP-14 presenta dos regiones idénticas en un 70% a LCPI de *Drosophila*. Otra proteína de *Manduca sexta*, LCP16/17 tiene el extremo carboxi-terminal muy similar a las proteínas LCPI, LCP3 y CP-GART de *Drosophila melanogaster*, esta última de estadio pupal (Rebers y Riddiford, 1988).

En *Hyalophora cecropia* (lepidóptero) la secuencia N-terminal de cuatro proteínas presentes en cutículas flexibles de larva y adulto, muestran homología con las proteínas larvales de *Drosophila* (Willis, 1987; 1989).

3.2.5 Familias de proteínas cuticulares.

Las proteínas cuticulares pueden agruparse en familias, de acuerdo a su similitud en secuencia o relación inmunológica. Estas familias serían:

I. Las resilinas, proteínas de las cutículas elásticas mencionadas anteriormente.

II. Las de cutículas flexibles. Pertenecerían a esta familia las proteínas cuticulares larvales de *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina*, *Dacus oleae*, *Sarcophaga bullata*, *Manduca sexta* y *Hyalophora cecropia* y las proteínas cuticulares pupales de bajo peso molecular de *Drosophila* (Willis, 1989; Silvert, 1985).

III. Las proteínas cuticulares pupales de alto peso molecular de *Drosophila melanogaster* (Silvert et al., 1984).

IV. Las de cutículas rígidas ricas en alanina (25-42%), de estructura similar a proteínas de corion, descritas en *Locusta migratoria* por Højrup et al. (1986 a, b).

V. Las de cutículas rígidas de *H. cecropia*, ricas en serina (10%), cuyos 28 aminoácidos N-terminales presentan un 43% de homología con las queratinas de vertebrados (Willis, 1989).

3.2.6 Lugar de síntesis de las proteínas cuticulares.

La cutícula es depositada por la epidermis. Por lo tanto, el sitio más probable de síntesis de las proteínas cuticulares es la célula epitelial. Sin embargo, hay trabajos que indican en algunos casos la presencia de proteínas de hemolinfa en la cutícula. En *Manduca sexta* y en *Locusta migratoria*, algunas proteínas cuticulares presentan la misma movilidad electroforética que ciertas proteínas de hemolinfa (Hepburn, 1985). En *Periplaneta americana* (cucaracha americana) y *Manduca sexta*, ciertas proteínas cuticulares muestran reacción inmunológica cruzada con proteínas de hemolinfa (Hackman, 1984). En *Calliphora*, König et al. (1986) demostraron la incorporación a la cutícula de la proteína mayoritaria de hemolinfa.

Mediante radiomarcación *in vitro* de tegumento de larva de *Hyalophora cecopia* se demostró que la síntesis de la mayoría de las proteínas cuticulares ocurre en la epidermis (Willis et al., 1981). Se ha comprobado la síntesis de todas las proteínas cuticulares pupales mayoritarias en discos imaginales de *Drosophila melanogaster* incubados *in vitro* (Fristrom et al., 1982; Doctor et al., 1985). En *Manduca sexta*, se detectó en epidermis el mRNA codificante para una proteína cuticular larval (Rebers y Riddiford, 1988).

Los datos acumulados parecen indicar que la síntesis de las proteínas cuticulares mayoritarias ocurre en la célula epitelial y que en algunos casos se incorporan a la cutícula proteínas que son sintetizadas en el cuerpo graso y transportadas vía hemolinfa. Estas últimas estarían eventualmente involucradas en procesos de esclerotización (Schenkel y Scheller, 1986; König et al., 1986).

3.3 Estructura supramolecular.

Las microfibrillas de quitina se hallan rodeadas por moléculas de proteínas unidas covalente y no covalentemente. Este complejo está inmerso en una matriz de proteínas más debilmente unidas (Hackman, 1976). La estructura resultante es muy resistente a la tensión, comparable en resistencia al acero. En algunos casos (crustáceos) se adiciona a esta matriz de proteínas calcio mineral, lo cual incrementa la dureza de la cutícula.

Las microfibrillas pueden estar organizadas de acuerdo a diferentes patrones. De esta organización dependen en gran medida las propiedades mecánicas de la cutícula. Las microfibrillas se disponen más o menos paralelamente a la superficie de la cutícula, formando láminas. En el patrón más común, el eje de cada lámina se encuentra formando un ángulo con el eje de la lámina inmediata anterior. Este ángulo, pequeño y constante, es contrario a las agujas del reloj. La disposición helicoidal da lugar a la formación de lamelas (una lamela = una vuelta de 180°), las cuales presentan distinto grosor en la endocutícula y exocutícula, dependiendo del ángulo de giro entre las láminas de microfibrillas (Neville, 1975; Hepburn, 1985).

Si las proteínas son removidas desaparecen ciertas bandas en el patrón de difracción de rayos X, indicando que éstas se hallan dispuestas con regularidad. La extracción de proteínas con agua o soluciones salinas no produce cambios notables en el patrón de difracción. Por el contrario, la remoción de proteínas con soluciones de urea 7M provoca grandes alteraciones en el patrón (Hackman, 1976). Las bandas de difracción afectadas corresponden a 31 Å y 41 Å, lo cual indica que las unidades repetitivas se encuentran, en ese caso, cada 3 ó 4 residuos de quitobiosa (Rudall, 1976; Hackman, 1976). Por otra parte, se sabe que en muchas cutículas, cada siete residuos existe uno deacetilado.

4. Otras estructuras extracelulares.

Existen en la naturaleza numerosas estructuras extracelulares, construídas en base a distintos polímeros. Los principales polímeros estructurales con funciones de soporte son la quitina, la celulosa y el colágeno. Este último es una glicoproteína, componente fundamental del tejido conectivo de vertebrados.

Entre los invertebrados, las cutículas de los artrópodos, moluscos, y ciertas estructuras cuticulares de los anélidos y celenterados están compuestas en mayor o menor grado por quitina y proteínas. En los anélidos y ciertos nematodos la cutícula está formada fundamentalmente por proteínas similares al colágeno con uniones disulfuro y mucopolisacáridos (Bird, 1984).

Las plantas y hongos también presentan estructuras extracelulares, con la diferencia de que éstas recubren sólo una célula y no todo el organismo. En las plantas, esta pared celular está compuesta fundamentalmente por celulosa y otros polisacáridos (ver tabla I.1). En ciertos hongos, el polisacárido más abundante es la quitina, a la cual suelen unirse covalentemente β -glucanos (Pont Lezica y Quesada, 1990). En *Mucor rouxi* y otros hongos, el principal componente de la pared celular es quitosano, polímero similar a la quitina formado por glucosamina con uniones β -(1,4) (Muzarelli, 1976).

Estructura:	Exoesqueleto de los artrópodos	Pared celular de las plantas
Polisacárido mayoritario Abundancia:	Quitina: β -(1,4)-NAcGlc 20-50 %	Celulosa: β -(1,4)-Glc 10-70%
Proteínas: Características:	50-80% Muy variables (ver texto). En gral., de bajo contenido en aminoácidos con S.	Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (extensina) y proteoglicanos. Enzimas.
Otros componentes Lípidos:	Hidrocarburos alifáticos principalmente.	Ceras, terpenos, etc.
Polisacáridos:	Quitina.	Celulosa y también: pectina (metilgalactouronato) hemicelulosa (polímeros ramificados de pentosas [β (1,4)-xilanos])
Agua:	15-55 %	25-60 %
Minerales:	Carbonato y fosfato de calcio en los crustáceos.	Potasio, calcio, magnesio, siliconas.
Polifenoles:	Polifenoles involucrados en la esclerotización.	Lignina: polímero de polifenoles.
Estructura supramolecular:	Microfibrillas de quitina embebidas en una matriz proteica. Disposición en lamelas.	Microfibrillas de celulosa rodeadas de una capa de hemicelulosa rígida, pectinas y otros polímeros hidratados. Disposición en lamelas.
Uniones covalentes entre macromoléculas:	Esclerotización: entrecruzamiento proteína-proteína y proteína-quitina.	Lignificación: entrecruzamiento entre proteoglicanos y xiloglucanos. (hemicelulosas).

Tabla I.1: Principales características de dos de las estructuras extracelulares más frecuentes en la naturaleza: la cutícula artropodiana y la pared extracelular de las plantas. Los datos con los que se confeccionó esta tabla fueron tomados de Neville (1975); Andersen (1979); Rudall (1976); Richards (1978); Hepburn (1985); Sevel dran y Ryden (1990); Franz y Blaschek (1990).

5. El proceso de muda.

5.1 Cambios en el tegumento durante el proceso de muda.

El proceso de muda ha sido estudiado detalladamente mediante microscopía electrónica en distintas especies (Locke, 1976; 1984; Gnatzy y Romer, 1984; Hepburn, 1985).

Lo primero que se observa en el proceso de muda es un aumento en el tamaño de las células epiteliales, seguido de una activa mitosis. Luego se produce la separación de la membrana plasmática apical de las células epidérmicas de las capas más internas de la cutícula, creando el espacio ecdisial o exuvial. Este proceso es denominado apólisis. Simultáneamente se observa la secreción del fluido ecdisial o de la muda. Este contiene pro-enzimas que se encargarán de digerir parcialmente la vieja cutícula. Antes de que se inicie la degradación, la epidermis secreta la capa de cuticulina de la nueva epicutícula. Esta cubre la superficie de la epidermis aislándola de la acción digestiva de las enzimas ecdisiales. La cuticulina es secretada por las placas de la membrana plasmática. Estas son regiones muy especializadas de la membrana plasmática localizadas en los extremos de las microvellosidades apicales. La cuticulina se secreta en forma de parches que crecen horizontalmente y luego se fusionan formando una capa continua.

La digestión es presumiblemente disparada por cambios en el medio, provocados por las células epiteliales (Locke, 1984). En *Manduca sexta* y *Hyalophora cecropia*, la activación del fluido ecdisial parece coincidir con un transporte activo de iones K^+ a través del nuevo exoesqueleto en formación (Gnatzy y Romer, 1984).

Recientemente se han caracterizado algunas de estas enzimas en *Antheraea polyphemus*, *Manduca sexta* y *Drosophila melanogaster* (Brookhart y Kramer, 1990 y referencias citadas en Brookhart y Kramer, 1990). Se han descripto actividades de endoquitinasas, exo- β -N-acetilglucosaminidasa, endoproteasas y aminopeptidasas. El mecanismo de activación de estas enzimas no ha sido aún determinado (Brookhart y Kramer, 1990). La degradación parece ser un proceso secuencial: primero, las proteasas atacarían la matriz proteica, permitiendo el acceso de las quitinasas a las microfibrillas de quitina (Fukamizo y Kramer, 1985).

Sólo se degradaría la parte no esclerotizada de la procutícula, quedando la exuvia constituida por la epicutícula y la exocutícula

(Zacharuk 1976; Richards, 1978). Los productos de degradación de la vieja cutícula se cree que difunden y son capturados por pinocitosis antes de que se complete la nueva epicutícula. Se forman cuerpos multivesiculares, a los cuales se fusionan lisosomas y la digestión se completa.

Luego las vesículas secretorias provenientes del aparato de Golgi secretan las capas internas de la epicutícula. Posteriormente se depositan la quitina y proteínas procuticulares y en general, se produce la ecdisis, proceso por el cual el insecto emerge de la exuvia o vieja cutícula. En algunos casos, la nueva cutícula se estabiliza por esclerotización, la cual, en general, ocurre después de la ecdisis. La deposición de la endocutícula tiene lugar después de esclerotizada la exocutícula. En *Locusta migratoria*, ésto ha sido correlacionado con un cambio en el perfil electroforético de proteínas cuticulares (Andersen y Højrup, 1987).

Se acepta en general que la deposición de la nueva cutícula tiene lugar después de que se produjeron los reordenamientos celulares asociados a la morfogénesis de nuevas estructuras. En *Ceratitis capitata*, se observó la formación de la primer cutícula larval en embriones de 38-40 horas, tiempo en que los movimientos morfogenéticos han terminado (Callaini y Dallai, 1987). En discos imaginales de *Drosophila melanogaster* incubados *in vitro* en presencia de β -ecdisona, se observó que los discos primero desarrollan completamente la forma de los apéndices adultos y luego se deposita la cutícula pupal (Fristrom et al., 1982). De otra manera, el contacto de las capas más internas de la cutícula en formación con las células epidérmicas podría impedir los reordenamientos celulares o la evaginación de los apéndices.

5.2 Secreción de proteínas cuticulares y proceso de ensamblado.

Este es un aspecto de la construcción del exoesqueleto poco estudiado. Se acepta que los componentes cuticulares son secretados por la cara apical de la epidermis mediante las vesículas secretorias que provienen del Golgi y las placas de la membrana plasmática. Estas últimas se hallan involucradas en la deposición de cuticulina y de la quitina de la procutícula. Las vesículas secretorias se encargarían de la secreción de las proteínas de las capas internas de la epicutícula y de la procutícula (Locke, 1976).

Aunque no ha sido demostrado que se sinteticen en polirribosomas unidos a membrana, las LCPI, LCP2, LCP3 y LCP4 de *Drosophila* presentan un péptido hidrofóbico de 15-16 aminoácidos, similar al péptido señal de proteínas de secreción (Silvert et al., 1984; Snyder et al., 1982). La traducción *in vitro* de estas proteínas cuticulares larvales da polipéptidos de peso molecular un poco mayor del que presentan *in vivo* (Snyder et al., 1981) por lo que se deduce que éste es clivado en algún momento durante la síntesis. En la secuencia aminoacídica de dos proteínas cuticulares larvales de *Manduca sexta* también se encuentra la secuencia consenso de clivaje VXA/N, lo cual indicaría que los 16 aminoácidos iniciales son clivados durante el tránsito intracelular (Rebers y Riddiford, 1988).

Cuando el gen que codifica para la proteína larval LCPf2 de *Drosophila melanogaster* es expresado en células de glándulas salivares, éstas son capaces de procesar y secretar correctamente la proteína exógena. El polipéptido es clivado en el mismo sitio y secretado apicalmente, tal como ocurriría en la célula epitelial. Esto sugiere que la maquinaria involucrada en el tránsito de proteínas cuticulares no sería específica de células epiteliales y que toda la información requerida se halla en la secuencia aminoacídica de la proteína cuticular (Tojo et al., 1987) y confirmaría que la secreción es producida por vacuolas provenientes del aparato de Golgi.

El ensamblado con la quitina (secretada por las placas de la membrana plasmática) y la orientación en microfibrillas y lamellas son un proceso extracelular, y no está claro si ocurre espontáneamente o favorecido de alguna manera por las células epiteliales. Esto podría ser regulado a través del control del medio externo (Neville, 1975). Dado que la quitina es un homopolímero insoluble que adquiere fácilmente estructura cristalina, Hackman (1976) propone que probablemente sea ésta la que primero se deposita y orienta espontáneamente en microfibrillas. Las proteínas, por el contrario, son heterogéneas y por sí mismas no tienen una estructura altamente ordenada. Estas se orientarían respecto de las microfibrillas de quitina.

Por otra parte, en el momento en que se sintetizan y depositan en cutícula las proteínas cuticulares pupales de *Drosophila*, éstas son detectadas en vacuolas secretorias y en la cutícula, pero no en la zona de ensamblado (Wolfgang et al., 1986).

La idea de Hackman concuerda con la existencia de microfibrillas, (observadas por microscopía electrónica) asociadas a las placas de la membrana plasmática, y la no detección de proteínas cuticulares en la zona de autoensamblado. Todo sugiere que el tránsito de las proteínas por esta zona ocurriría rápidamente, asociándose con las microfibrillas de quitina tan pronto como se exportan al compartimento extracelular.

6. La metamorfosis en dípteros ciclorrafos.

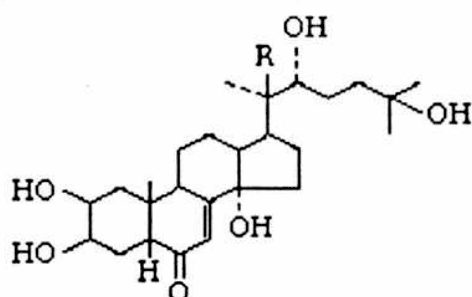
En dípteros ciclorrafos, la metamorfosis tiene lugar dentro de una cápsula formada por la cutícula del último estadio larval, que se modifica y esclerotiza durante la pupariación (formación del pupario). En la muda de larva a pupa no se produce ecdisis. La ex-cutícula larval convertida en pupario es abandonada junto con la pupal, cuando la metamorfosis se ha completado.

La cutícula larval sufre dos procesos de esclerotización: el primero tiene lugar inmediatamente después de su síntesis y deposición. El segundo ocurre en forma retardada, durante la pupariación, lo cual lo diferencia de la mayoría de los procesos de esclerotización. El proceso de pupariación ha sido estudiado en *Ceratitis capitata* por otros miembros de nuestro laboratorio (Wappner, 1989; Wappner et al., 1991).

7. Regulación del proceso de muda.

Tanto los procesos de degradación de la vieja cutícula como la síntesis, deposición y esclerotización de la nueva están precisamente controlados por la acción de hormonas. Las dos más importantes son la hormona de la muda, generalmente 20-OH-ecdisona o β -ecdisona (hormona esteroide) y la hormona juvenil (JH) (sesquiterpenoide) (ver figura 1.6). La acción combinada de la hormona juvenil y la β -ecdisona desencadena en las células epiteliales la expresión de programas genómicos alternativos y secuenciales.

A

ecdysone $R = H$ β -ecdysone $R = OH$

B

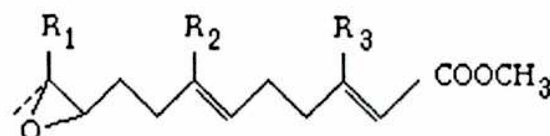
JH I $R_1 = R_2 = C_2H_5 ; R_3 = CH_3$ JH II $R_1 = C_2H_5 ; R_2 = R_3 = CH_3$ JH III $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$ JH O $R_1 = R_2 = R_3 = C_2H_5$

Figura I.6: Estructura de las hormonas de la muda (A) y juveniles (B).

Poco antes de cada muda ocurren dos incrementos en los niveles de ecdisona. El primero, relativamente bajo, es la señal que indica un nuevo proceso de muda. Si durante este pulso de ecdisona está presente también la hormona juvenil, no habrá reprogramación y el nuevo estadio será igual al anterior. (Es el caso de las mudas entre los distintos estadios larvales). El segundo incremento en ecdisona es mayor y es el que inicia los eventos asociados a la muda: crecimiento y división de las células epiteliales, secreción de enzimas degradativas, deposición de una nueva cutícula (Coudron et al., 1981).

En los últimos años se han caracterizado algunos genes implicados en la construcción del exoesqueleto regulados directa o indirectamente por la acción de la β -ecdisona. Estos codifican algunas de las enzimas degradativas: la aminopeptidasa de tegumento de *Drosophila melanogaster* es inducible por β -ecdisona (Hall, 1988). La síntesis de quinonas implicadas en la esclerotización es dependiente de actividades enzimáticas reguladas por la β -ecdisona (Coudron et al., 1981).

La síntesis y degradación de la quitina también depende de las fluctuaciones en los niveles de β -ecdisona presentes en la hemolinfa, aparentemente mediante la regulación de la expresión de los genes que codifican las enzimas correspondientes (Kramer y Koga, 1986).

En algunos casos, se demostró la influencia de la hormona de la muda en la síntesis de lípidos cuticulares (Blomquist et al., 1987).

Se han realizado pocos estudios sobre la regulación endócrina de la síntesis de proteínas cuticulares. En algunos casos, se demostró la influencia de la β -ecdisona en la expresión de los correspondientes genes (Roberts y Willis, 1980b; Doctor et al, 1985; Horodyski y Riddiford, 1989).

8. *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae).

La mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) pertenece a la familia de Tephritidae, cuyos miembros son conocidos como "moscas de la fruta". Estos se diferencian de las especies de *Drosophila* por ser los adultos de mayor tamaño (ver figura I.7).



Figura I.7: Hembra adulta y pupario de la cepa salvaje "INTA ARG-17" de *Ceratitis capitata*.

Ceratitis es una plaga de cultivos de frutas y hortalizas que provoca graves pérdidas. La zona de su influencia abarca las regiones de clima templado y subtropical de todo el mundo. En nuestro país afecta

fundamentalmente la región Mesopotámica, la provincia de Buenos Aires, el Noroeste y Cuyo. Debido a ésto se han realizado estudios tendientes a desarrollar técnicas que permitan el control químico o biológico de esta plaga. En nuestro país, *Ceratitis capitata* es objeto de estudios genéticos en el Instituto de Genética Inta, Castelar y desde hace varios años se cuenta con diversas líneas de mutantes.

Sin embargo, se conoce poco sobre la bioquímica y biología de esta mosca (Greene, 1929; Christenson y Foote, 1960). Los estudios bioquímicos realizados hasta el inicio de esta tesis consisten en análisis de intermediarios de la glicosilación de proteínas (Quesada et al. 1976; Quesada y Belocopitow, 1978; Quesada, 1980), algunos estudios sobre enzimas (Psarianos et al., 1987). Uno de los aspectos bioquímicos más estudiados en *Ceratitis capitata* es la composición de proteínas de hemolinfa y su síntesis durante el desarrollo (Chrysanthis et al., 1981; Mintzas y Reboutsicas, 1984; Mintzas y Rina, 1986). Hasta donde sabemos, no han sido reportado ningún avance en genética molecular de *Ceratitis capitata*.

Al contrario de lo que ocurre con *Drosophila*, sobre la cual existen detallados estudios acerca de la metamorfosis, los cambios bioquímicos y morfológicos que se producen durante el desarrollo de *Ceratitis* han sido poco estudiados. Los cambios en el color de ojos a lo largo del ciclo de vida fueron propuestos por Rhum y Calkins (1981) como criterio para determinar la edad en cultivos realizados en masa. Estos estudios se han ampliado recientemente con el análisis de los pigmentos oculares (pteridinas) durante el desarrollo realizados por Rabossi (1991). También en nuestro laboratorio (Rabossi et al., 1991; Rabossi et al., manuscrito en prep.) han sido estudiados en detalle los cambios morfológicos que se producen durante la metamorfosis.

Dado que el exoesqueleto es la interfase entre el insecto y el medio ambiente, el conocimiento de su estructura y formación resulta muy útil para el desarrollo de estrategias de lucha, ya sea por agentes químicos (insecticidas) o biológicos (párasitos).

En esta tesis tomamos a *Ceratitis capitata* como modelo experimental para el estudio de la síntesis de componentes cuticulares y su regulación durante el desarrollo.

II. Materiales y Métodos.

1. Insectos.

El principal animal experimental fue *Ceratitis capitata*, mosca mediterránea de la fruta. Para estudios comparativos se utilizó *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre). Como modelo de insecto hemimetábolo se utilizó *Triatoma infestans* (vinchuca). También se emplearon distintas especies de *Trichogramma* (avispa parásita) como ejemplo de himenóptero.

1.1 *Ceratitis capitata*.

Se utilizaron la cepa salvaje INTA ARG-17 y tres líneas mutantes, *White pupae*, *Black pupa* y *niger*, generosamente provistas el Dpto. de Genética, INTA, Castelar. En algunos casos se utilizó la cepa salvaje provista por D. Stilinovik, del Dpto. de Fitopatología INTA, Castelar. A menos que se indique lo contrario, la cepa salvaje utilizada fue INTA ARG-17. Para algunos experimentos, como los realizados *in vivo*, los insectos se criaron en pequeña escala en nuestro laboratorio. Los cultivos fueron mantenidos a 23 °C, 55-80% de humedad relativa con un régimen de 16 hs luz- 8 hs oscuridad. En estas condiciones, el ciclo de vida presentó una duración de 600 hs: embrión, 54 hs; estadios larvales, 11 días; pupa y adulto farado, 12 días (ver capítulo III, 1).

Embriones: Para permitir la oviposición, se colocaron esferas de plástico huecas, con pequeñas perforaciones, simulando frutos, en frascos que contenían adultos sexualmente maduros. Los huevos fueron recogidos en el interior de las esferas. Se lavaron con abundante agua y se congelaron a -70°C o fueron decorionados por tratamiento con hipoclorito de sodio 5% durante 10 minutos y luego congelados.

Larvas: Entre 150 y 200 huevos fueron recogidos en pequeños trozos de papel de filtro y colocados en la superficie de un medio nutriente basado en zanahoria (Terán, 1977).

Las larvas fueron separadas del medio de cultivo por flotación en NaCl 8%. Se lavaron con abundante agua, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 4% y se guardaron a -70 °C o se usaron en el momento.

Pupas: a) **en masa:** Al final del tercer estadio larval, las larvas fueron recogidas sobre arena para permitir la pupariación. A distintos tiempos, los insectos fueron separados de la arena por tamizaje. Los individuos muertos o dañados (menos del 1%) fueron separados por flotación en agua. Los insectos fueron usados en el momento o congeladas a -70°C , previa desinfección con hipoclorito de sodio 4%.

b) **en pequeños cultivos:** Se sincronizaron los insectos en el momento de la inmovilización con un rango de 30 min-2 hs, según el caso. Se mantuvieron en cajas de Petri a 23°C hasta el momento en que se utilizaron.

Adultos: Se colocaron cincuenta o sesenta adultos no emergidos en frascos de 600 ml. Un día antes de la emergencia se suministró agua y alimento en pequeños recipientes conteniendo agar 1% y una mezcla seca de levadura y sacarosa (1:3). El manipuleo de los ejemplares adultos se realizó previa anestesia por enfriamiento a 4°C durante 15 minutos o colocando un algodón humedecido en éter sulfúrico dentro del frasco.

1.2 *Drosophila melanogaster*.

Las larvas de tercer estadio y pupas utilizadas fueron de la cepa Oregon R-Berkeley. Los puparios fueron de la cepa Samarkand, gentilmente cedida por el Dr. J. Muñoz, de la CONEA.

1.3 *Triatoma infestans*.

Las ninfas de V estadio y ejemplares adultos fueron provistas generosamente por el Dr. Josué Nuñez, del Dpto. de Ciencias Biológicas FCEyN, UBA y por el Dr. Eduardo Zerba, del CIPEIN-CITEFA.

1.4 *Trichogramma* sp.

Los ejemplares adultos de distintas especies de estas avispas fueron provistas por D. Stilinovic del Dpto. de Fitopatología, INTA Castelar. Las especies utilizadas -identificadas por el Dr. Luis de Santis, a quien agradecemos- fueron *T. pinto*, *T. fuentessi* y *T. sp.*

2. Preparación de proteínas cuticulares de distintos estadios de *Ceratitis capitata*.

2.1 Preparación masiva.

Basándose en el método descripto para *Drosophila melanogaster* (Chihara et al., 1982), se puso a punto un método para la preparación masiva de cutículas de *Ceratitis capitata*.

2.1.1 Larvas.

Todos los pasos fueron realizados a 4 °C y todos las soluciones empleadas contuvieron BHT 2 mM, PTU 5 mM y PMSF 1 mM.

Se homogeneizaron las larvas en solución de Ringer (Chen, 1968) en una microlicuadora Omnimixer. El material particulado se recogió en filtro de seda (400 µm), se lavó con abundante agua deionizada y se volvió a homogeneizar en Omnimixer en buffer Tris-maleato 5 mM pH 7.0 NaCl 0.5M. Se lavaron las cutículas en agua y se extrajeron en SDS 1%.

2.1.2 Pupas y adultos farados.

El método se discute en detalle en Resultados. Se licuaron los insectos tal como en el caso de las larvas, una vez en solución de Ringer y una vez en Tris-maleato 5 mM pH 7.0 NaCl 0.5M. Los puparios se separaron de las cutículas pupales por diferencia de flotación en NaCl 9.5-10%. (Las cutículas pupales flotan y los puparios no.) Las cutículas se extrajeron en SDS 1% a 4°C, previo lavado con abundante agua bidestilada. Se eliminaron los restos de cutículas de los extractos por filtración a través de lana de vidrio o centrifugación a 10000 x g. Los extractos proteicos obtenidos fueron guardados en alícuotas a -20 °C, o se precipitaron las proteínas en acetona. Para ésto, se agregaron 4 volúmenes de acetona fría conteniendo BHT y PTU y se mantuvo a 4 °C entre 30 min y 16 hs. Se centrifugó a 8000xg, se lavó el precipitado 4 veces con acetona, se dejó secar a temperatura ambiente durante 30' y se trató el precipitado con SDS 1%. Estos extractos se guardaron en alícuotas a -20 °C.

2.2 Preparación de cutículas individuales.

Larvas: Se aislaron *in vivo* cutículas de larvas de primer, segundo y tercer estadio. Las larvas fueron enfriadas en solución de Ringer, se colocaron entre dos papeles Whatman 3 y se pasó un rodillo aplastando las larvas en el sentido posterior-anterior. Esta operación elimina la mayor parte de los tejidos internos. Se recuperaron las cutículas y se limpiaron cuidadosamente bajo lupa binocular en solución de Ringer conteniendo PMSF 1 mM y antioxidantes: BHT, PTU. Finalmente se enjuagaron en solución de Ringer y se secaron sobre papel Whatman 1.

Pupas y adultos farados: Los puparios fueron abiertos cuidadosamente, bajo una lupa binocular. Las cutículas fueron disecadas en solución de Ringer conteniendo PMSF y antioxidantes (BHT, PTU), se enjuagaron y se secaron sobre papel como se indicó para el caso de las larvas.

En algunos casos, se utilizó el procedimiento de aplastado entre papeles descrito más arriba. Este no fue aplicable a pupas de menos de 48 horas de edad, dada la fragilidad de la cutícula pupal a edades tempranas.

3. Obtención de extractos proteicos no cuticulares.

3.1 Proteínas totales.

Método I: Los insectos fueron homogeneizados y extraídos individualmente en el “cracking buffer” de Laemmli (1970). Después de una breve centrifugación a 10000 x g, las muestras fueron sometidas directamente a electroforesis.

Método II: Se obtuvieron extractos proteicos de animales individuales, libres de lípidos, mediante la puesta a punto del siguiente micrométodo (Boccaccio y Quesada, 1991):

- i) se homogeneizaron en 0.4 ml de metanol conteniendo BHT y PTU.
- ii) se agregaron 0.6 ml de cloroformo.
- iii) se centrifugó 5 min a 10000 rpm en microcentrífuga Eppendorf.
- iv) se lavó el precipitado con 0.2 ml de metanol.
- v) se secó ligeramente a temperatura ambiente.
- vi) se extrajo el precipitado con SDS 1% o con “cracking buffer”, disgregándolo por sonicación.

3.2 Proteínas de hemolinfa.

La hemolinfa fue recogida mediante dos métodos alternativos:

Método I (larvas): Se pincharon las larvas con un alfiler entomológico fino en la zona posterior de la cabeza y se recogió la gota de hemolinfa en Parafilm®. Se enjuagó el Parafilm® con 10 µl de solución de Ringer conteniendo BHT y PTU.

Método II (Larvas, pupas, adultos): Se empleó la técnica descrita para *Drosophila* (Kambysellis, 1984). Se pincharon los insectos en el tórax y se colocaron sobre un colchón de lana de vidrio. Se centrifugó a baja velocidad recogiendo la hemolinfa sobre 10µl de solución de Ringer conteniendo BHT, PTU y PMSF.

El método I proporcionó muestras más límpidas que el método II. La hemolinfa fue empleada directamente o previa separación de los hemocitos por centrifugación a 200 x g (Marmaras y Tsakas, 1988).

4. Determinación de proteínas.

4.1 Métodos empleados.

El contenido en proteínas fue determinado mediante los siguientes métodos:

i) Medición de la absorbancia a 280 nm, tomando como coeficiente de absorción $1\text{DO}=1 \text{ mg/ml}$.

ii) Método de Lowry et al. (1951). En algunos casos se precipitaron las proteínas previamente con TCA 10% y se redisolviéron en NaOH 1M antes del ensayo.

iii) Método de Bradford (1976) y método de Bradford modificado (Boccaccio y Quesada, 1989b) en extractos que contenían SDS (ver 4.2). Se precipitó el detergente presente en los extractos mediante el siguiente tratamiento: a) se agregaron 450 µl de KCl 100 mM a 50 µl de la muestra a determinar.

b) después de 10' a temperatura ambiente, se centrifugó durante 5' en una microcentrífuga Eppendorf.

c) se agregaron 100 µl de sobrenadante a 1 ml de reactivo de Bradford y se leyó absorbancia a 595 nm, contra blanco de 1ml reactivo de Bradford + 100 µl de KCl 100mM. Se utilizaron BSA y ovoalbúmina como estándares.

iv) Las bandas de proteínas separadas por electroforesis en geles de pliacrilamida (ver 6.1) fueron cuantificadas mediante elución del colorante unido y lectura de $A_{560 \text{ nm}}$ (Ball, 1986).

En todos los casos las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Beckman.

4.2 Interferencia del SDS en el ensayo de Bradford para la cuantificación de proteínas.

Ha sido descrito por otros autores (Kapp y Vinogradov, 1978) que el SDS y otros detergentes interfieren en la medición de proteínas por el método de Bradford. En la tabla II. 1 se observa que la interferencia no se corrige por simple sustracción de la absorbancia de los blancos correspondientes, tal como fue indicado inicialmente por Spector (1978). Esto sugiere una interacción del detergente con el colorante CBB. Este presenta en solución tres especies protonadas diferentemente: aniónica, neutra y catiónica (Compton y Jones, 1985). La abundancia relativa de estas especies es dependiente del pH (figura II.1). La longitud de onda de los máximos de absorción de estas especies son $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$, 650 nm y 480 nm , respectivamente.

SDS ($\mu\text{g/ml}$)	BSA (0 μg)	BSA (40 μg)	BSA (80 μg)
0	0	0.7	1.3
10	0.14	0.55	1.1
30	0.57	0.47	0.68
50	0.70	0.71	0.53
100	0.75	0.82	0.82
200	0.60	0.60	0.69

Tabla II. 1 : Interferencia del SDS en el ensayo de Bradford. Se midió la absorbancia a 595 nm contra blanco de reactivos.

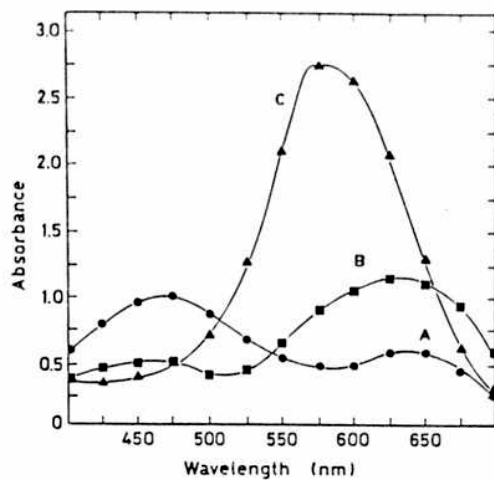


Figura II.1: Espectro de absorción de soluciones de CBBG 0.01% a tres distintos pH. A: H_3PO_4 12.75 % w/v; B: H_3PO_4 5% w/v; C: NaOH 0.01 N

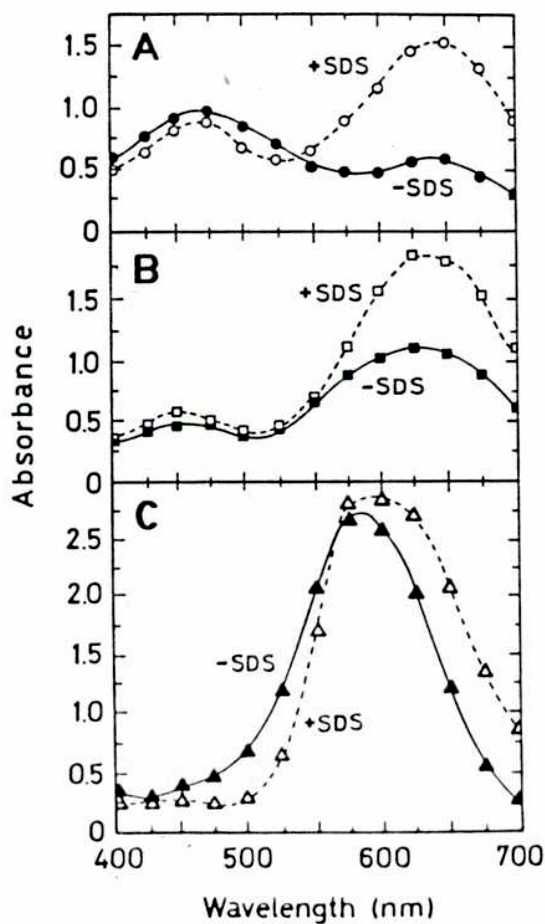


Figura II.2: Espectro de absorción de CBBG en presencia o ausencia de SDS 0.01%. A, B y C son las condiciones indicadas en la figura II.1.

Se observa en la figura II.2 que en presencia de SDS, el máximo de absorción a 650 nm, correspondiente a la forma neutra, aumentó, en tanto que la concentración de las especies catiónica y aniónica disminuyó. Esto sugiere que el SDS desplazó el equilibrio entre las distintas especies al estabilizar preferencialmente a la forma neutra, posiblemente por incluirla en el entorno hidrofóbico de la micela. En la figura II.3 se cuantifica la concentración de las distintas especies en función de la cantidad de detergente. Es de hacer notar que incluso a bajas concentraciones de SDS (0.001%) se obtienen valores de absorbancia a 595 nm (longitud de onda empleada para determinar proteínas por el método de Bradford) superiores a 0.1.

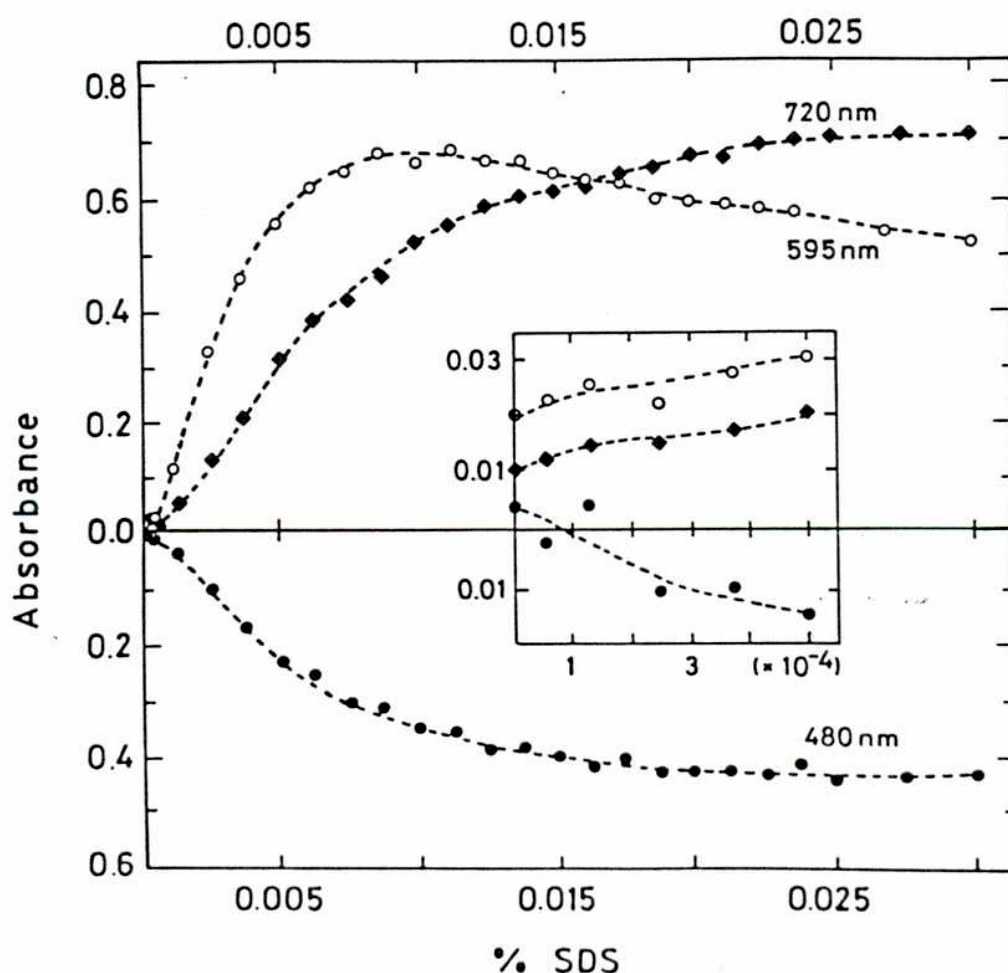


Figura II.3: Interacción del SDS con el reactivo de Bradford. Absorbancia contra blanco de reactivo a tres longitudes de onda: 480 nm (●); 595 nm (○) y 720 nm (▲); especies catiónica, aniónica y neutra, respectivamente.

Estos resultados indican que la interferencia del SDS no se debería sólo a la capacidad de formar micelas que ocultan las moléculas de proteína, sino que también interaccionaría con el colorante, desplazando el equilibrio a la especie neutra. Un efecto similar ha sido descrito para detergentes no iónicos (Rosenthal y Koussale, 1983). La interacción SDS-CBB, discutida en detalle en Boccaccio y Quesada (1989b), permitió cuantificar el SDS con el reactivo de Bradford por medición de la absorbancia a 720 nm. Esto fue muy útil para el estudio del comportamiento del SDS en columnas de afinidad por quitina.

El ensayo de Bradford resultó aplicable en nuestros extractos previa eliminación del SDS con KCl 100 mM, tal como se detalló anteriormente.

Otros métodos descritos por otros autores (Kapp y Vinogradov, 1978) para eliminar el SDS consisten en a) diálisis o electrodiálisis; b) intercambio iónico. Los métodos basados en diálisis consumen mucho tiempo y dada la relativamente alta concentración micelar crítica del SDS, no se logra eliminar totalmente el detergente (Kapp y Vinogradov, 1978). La eliminación del SDS en columnas de intercambio iónico se realizan en general en soluciones conteniendo alta concentración de urea, lo cual trae aparejado el inconveniente de la posterior eliminación de la misma.

El método de eliminación por precipitación con KCl propuesto presenta varias ventajas: i) es rápido (menos de 15'); ii) no se producen pérdidas de proteínas; iii) es aplicable a muestras pequeñas, lo cual lo hace muy útil para la determinación de proteínas por el ensayo de Bradford.

5. Análisis de afinidad por quitina.

5.1 Columnas de afinidad de quitina.

Se utilizaron microcolumnas de 0.5 cm de diámetro en las cuales se empaquetó quitina comercial previamente lavada con NaOH 1N, neutralizada con HCl 0.1 N y equilibrada en buffer Tris 5 mM pH 7.5. El volumen ocupado por la quitina fue de aproximadamente 1-1.5 ml. Se sembraron las muestras de proteínas (0.1-0.5 mg en 0.1 ml) en presencia o ausencia de SDS y se mantuvo la columna cerrada a temperatura ambiente durante 4 horas. Se lavó con dos volúmenes de columna de buffer Tris 5 mM pH 7.5, y se eluyó con Tris 0.5 M pH 9. Como se indica en Resultados, se incluyó o no SDS 0.1% en las soluciones de lavado y elución. Luego se eluyó con Tris 0.5 M pH 8.5 urea 7M. Se recogieron fracciones de 0.2 ml en las que se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford o el método de Bradford modificado (ver 4.1) en los casos en que la cromatografía se desarrolló en presencia de SDS.

5.2 Digestión de cutículas con quitinasa.

Las cutículas fueron extraídas exhaustivamente con SDS 1%, como se describió más arriba. Luego se lavaron con abundante agua y se trataron durante 16 hs a 25°C con 1 mg de quitinasa en 1 ml de buffer (CaCl_2 20 mM; MgCl_2 1 mM; $\text{Na}(\text{CH}_3\text{CO}_2)$ 100 mM, pH: 5). Después de la digestión se agregó SDS hasta 1% final y se extrajo durante 2 hs. Se separaron las cutículas por centrifugación, las proteínas fueron precipitadas en TCA 10% y analizadas en SDS-PAGE. Los sobrenadantes fueron neutralizados con NaOH, desalados por pasaje a través de MB-3, liofilizados y analizados por cromatografía ascendente en papel, usando Butanol-piridina-agua (4:3:4) como solvente de desarrollo. Se detectaron compuestos que migraron como $(\text{NAcGlc})_{1-4}$.

6. Técnicas electroforéticas.

6.1 Electroforesis desnaturalizante.

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida con el sistema desnaturalizante de Laemmli (1970). Se utilizaron geles y mini-geles verticales de 15cm x 13cm x 0.15cm y 50mm x 50mm x 0.5mm respectivamente. En los primeros, el amperaje fue 20 mA para el gel concentrador y 40 mA para el separador o 6 vatios (aproximadamente 10 mA) durante toda la noche. Los minigeles fueron desarrollados a intensidad constante (10-25 mA) durante 0.5-2 hs.

Se utilizaron marcadores de peso molecular de Sigma o Pharmacia, tratados con "craking buffer". Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue G o R y fotoduplicados utilizando papel Kodak positivo.

Para la detección de bandas radioactivas, se realizó autorradiografía o fluorografía utilizando salicilato o PPO como fluorógrafos (Bonner y Laskey, 1974; Chamberlain, 1979).

6.2 Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa.

Dado que se trabajaba con proteínas poco solubles, se ensayaron distintas condiciones de transferencia para asegurar una total elución de las proteínas del gel. Esto se verificó por tinción del gel con CBB después de la transferencia. Se transfirieron las proteínas a hojas de nitrocelulosa (Schleicher & Schüll, BA 85) en buffer 20 mM Tris, 150 mM glicina, 20% (v/v) metanol en un aparato BioRad a 80 voltios durante 16 horas a 4 °C.

En todos los casos se colocaron simultáneamente dos hojas de nitrocelulosa. La mas próxima al gel fue empleada en la detección con sueros ("immunoblotting") o lectinas ("affinoblotting") (ver 8.2.1 y 9.2) y la siguiente fue teñida con tinta china (Hancock, 1983) y utilizada como referencia para localizar proteínas y marcadores de peso molecular.

7. Radiomarcación *in vivo*.

7.1 Microinyección.

Se microinyectaron pre-pupas y pupas de *Ceratitis capitata* siguiendo la técnica de microinyección descrita por Wappner (1989) para el caso de pre-pupas de *Ceratitis*. Se introdujo la aguja perforando el pupario y la cutícula pupal hasta la parte anterior del insecto en el caso de las pre-pupas (ver figura VI.1 en el capítulo VI) y sólo hasta la zona abdominal en el caso de las pupas, para evitar dañar las estructuras torácicas en formación. Se utilizaron agujas de acero de 90 μm de diámetro interno, adosadas a una cánula de plástico la que a su vez va adosada a una jeringa tipo Hamilton de 0,5 μl . El dispositivo de inyección fue cedido generosamente por el Dr. J. Nuñez.

Se inyectaron entre 0.5-0.7 μl de solución conteniendo el compuesto radioactivo requerido. Se dejaron los insectos a 23 °C durante el tiempo necesario y se procesaron inmediatamente o se congelaron a -20 °C.

7.2 Radiomarcación *in vivo* seguida de "chase" *in vitro*.

Se radiomarcaron insectos por microinyección con [^{35}S]-metionina como se detalla más arriba. Después del pulso se lavaron extensivamente, se cortaron longitudinalmente y se sumergieron en medio de Grace (1962) (0,2-0,5 ml) conteniendo L-metionina (10-25 mg/ml). Esto equivale a una relación molar metionina/[^{35}S]-metionina entre 10^5 y 5×10^6 . Se mantuvieron los insectos a 23 °C y a distintos tiempos de "chase" se congelaron a -20 °C.

Los insectos radiomarcados por pulso y "chase" fueron utilizados para distintos análisis. En todos los casos se midió la radioactividad inyectada e incorporada a material precipitable en TCA 10%. En los casos en que se practicó inmunoprecipitación, los animales fueron homogeneizados previa adición de SDS, Nonidet P-40 y Tris pH 8.0 en cantidades suficientes para

obtener las concentraciones requeridas en el buffer de lisis (ver 8.3.1). No se agregó NaCl, dada la alta concentración de sales en el medio de cultivo (Grace, 1962).

8. Técnicas inmunológicas.

8.1 Preparación de antisueros en conejos.

En todos los casos las proteínas fueron aisladas mediante electroforesis preparativas en geles desnaturalizantes. Los porcentajes de poliacrilamida se escogieron de acuerdo al peso molecular de las proteínas a separar: 10% para PCG-100; 15% para LCPs y PS-44; 17.5% para PMP.

Después de la electroforesis se cortaron tiras del gel, se tiñeron con CBB y se usaron como guías para cortar las bandas correspondiente a la proteína requerida. En algunos casos, se tiñó totalmente el gel con CBBR 250 0.3% en agua. El fragmento de gel conteniendo la proteína se molió finamente en un mortero enfriado con nitrógeno líquido, se emulsionó con 1ml de coadyuvante completo de Freund y se inyectó subcutáneamente en el dorso del animal. A los 15 días se inyectó un refuerzo de proteína y coadyuvante incompleto. Se utilizaron aproximadamente 400 µg de proteína en cada inyección. La respuesta inmune fue seguida tomando periódicamente muestras de suero y ensayándolo por la técnica de "dot blot". Cuando el título resultó bajo, se aplicaron nuevos refuerzos. Dos semanas después de la última inyección se sangraron los conejos por punción cardíaca. Después de la coagulación, el suero se separó por centrifugación a 1000 x g y se guardó en alícuotas a -70 °C.

8.2 Revelado de membranas de nitrocelulosa con antisueros.

8.2.1 "Inmunoblotting".

Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente con agitación constante. Después de la electrotransferencia o siembra en un aparato comercial (técnica de "dot-blot"), los filtros de nitrocelulosa fueron secados a temperatura ambiente y bloqueados con seroalbúmina bovina (BSA) 3% en buffer Tris 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM (TBS-BSA) durante 30 minutos. Las membranas fueron incubadas durante 2 horas con el antisuero diluido convenientemente en TBS-BSA. Después de la incubación, los filtros fueron enjuagados dos veces con TBS y luego lavados durante 15 minutos con TBS.

Se trataron con [^{125}I]-proteína A ($0.5\text{-}2 \times 10^6$ cpm/ml) durante una hora. Se lavaron con TBS como antes y se realizó un lavado adicional con 0.1% Nonidet P-40 en TBS durante exactamente 10 minutos. Se enjuagaron los filtros en TBS y se dejaron secar ligeramente sobre papel de filtro. Se realizó autorradiografía con placas Kodak X-OMAT K.

8.2.2 Cuantificación de PCG-100 por "immunoblotting".

Después de la autorradiografía se cortó la nitrocelulosa y se midió la radioactividad de ^{125}I en los fragmentos (0.5×1 cm) en un contador Beckman γ -4000. La linealidad se mantuvo hasta por lo menos 20 μg de PCG-100 por carril. Los experimentos mostrados aquí resultaron por debajo de este valor, es decir que las cpm medidas fueron linealmente proporcionales a la cantidad de PCG-100 presente en las muestras.

8.3 Inmunoprecipitación.

8.3.1 A partir de extractos proteicos totales.

Las características de solubilidad y la capacidad de extracción de las proteínas cuticulares fueron tenidas en cuenta en la elección del buffer y condiciones empleadas (ver capítulo VI, 4.1). Los insectos fueron homogeneizados individualmente en 0.5 ml de buffer de lisis (Tris 50 mM pH 8; NaCl 150 mM; Nonidet P-40 0.5 %; SDS 1%). Como se detalla mas adelante, este buffer resultó eficaz para extraer cuantitativamente PCG-100 después de 2 hs a 4 °C. Los homogenatos se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm. Se clarificaron los extractos obtenidos mediante el agregado de 50 μl de proteína A-Sefarosa, agitación durante 30' y centrifugación a 10000 rpm. Luego se incubó con 40 μl de suero/ 400 μl extracto durante una hora a 0 °C. Los inmunocomplejos se precipitaron con proteína A-Sefarosa (30-40 min a 0 °C, con agitación).

Los lavados y la elución fueron realizados según el tipo de análisis a realizar posteriormente:

a) se lavaron los precipitados tres veces con 1 ml de buffer de lisis conteniendo 1mg/ml de seroalbúmina bovina y dos veces con 1ml de buffer de lisis. Se extrajo dos veces con 50 μl de "cracking buffer" (Laemli, 1970) a 100 °C y se sometió a electroforesis.

b) para la purificación de PCG-100 seguida de análisis de monosacáridos, la proteína A-Sefarosa fue colocada en una microcolumna y se procedió al lavado con buffer de lisis conteniendo BSA 1mg/ml; y luego buffer de lisis hasta que la radioactividad eluída alcanzó valores constantes (ver figura II.4). Luego se lavó con agua y se procedió a la elución con 7M urea 0.01 M HCl.

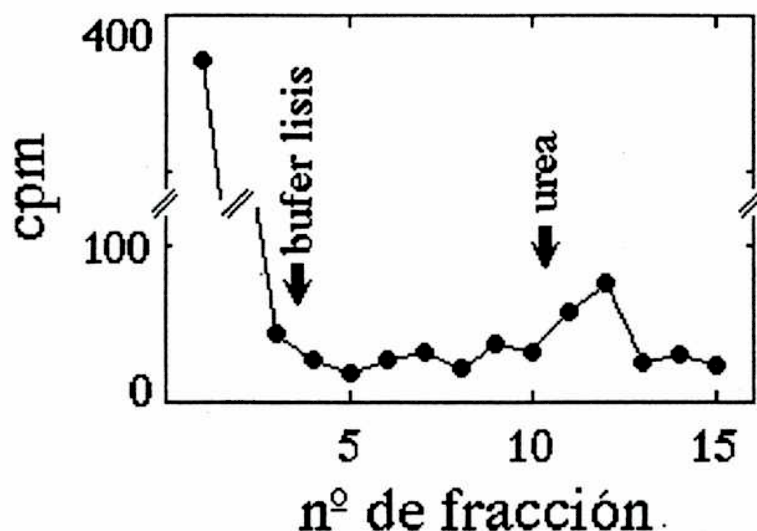


Figura II.4: Se cargó una microcolumna con Proteína A-Sefarosa en la cual previamente se inmovilizó PCG-100 radiomarcada con $2[^3\text{H}]$ -manosa. Se realizaron los lavados y la elución como se indica en el texto y se midió la radioactividad en un contador de centelleo.

8.3.2 A partir de extractos de proteínas cuticulares.

Después de la radiomarcación, se disecaron las cutículas y se extrajeron las proteínas en SDS1% como se indicó más arriba. Se agregó BSA (0.5 mg) y se precipitaron las proteínas mediante el agregado de cloroformo/metanol (1:2). El precipitado se disolvió en 0.5 ml de buffer de lisis y se procedió a la incubación con antisuero como se detalla en 8.3.1.

9. Análisis de glicoproteínas.

9.1 Tinción de ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS).

Se empleó la técnica descrita por Fairbanks et al. (1971) con algunas modificaciones. Después de la electroforesis, se fijaron las proteínas en metanol-ácido acético-agua (40:7:53) durante 4-16 hs. Se mantuvo el gel durante 2 ó 3 hs en ácido peryódico 0.7%, ácido acético 5%. Se incubó 1 hora con arsenito de sodio 0.5% en ácido acético 5% y luego dos veces durante 20 min con arsenito de sodio 0.1% ácido acético 5%. Se lavó con ácido acético 5%

(10-20 min). Se incubó durante 2-16 hs con el reactivo de Schiff preparado como se indica a continuación y se lavó con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0.5% en HCl 10 mM.

Preparación del reactivo de Schiff: Se disolvieron 5g de fucsina básica en 1 litro de agua. Se agregaron 100 ml de HCl 1N y 8.5g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y se trató con carbón activado durante una hora. Se guardó a 4 °C en botella oscura.

9.2 Unión de concanavalina A en membranas de nitrocelulosa.

Se utilizó el método descrito por Faye y Chrispeels (1985). Se electrotransfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (ver 6.2) y se fijaron en ácido acético-isopropanol-agua (10:25:65). Las nitrocelulosas fueron usadas inmediatamente, o se guardaron en la solución de fijación o secas. Se bloqueó durante una hora con BSA 3% en NaCl 0.5 M, Tris 20 mM pH 7.4. Faye y Chrispeels (1985) indican gelatina como agente bloqueante. En nuestro caso, ésta dió mucho más señal de fondo que la BSA. Se incubó durante una hora con Concanavalina A (25 mg/ml) en NaCl 0.5M, Tris 20 mM pH 7.4, BSA 1%, CaCl_2 1 mM, MnCl_2 1mM. Se lavó cuatro veces durante 15 min en NaCl 0.5M, Tris 20 mM pH 7.4, Tween-20 0.1%, CaCl_2 1 mM, MnCl_2 1mM. Se incubó durante una hora con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de peroxidasa Sigma tipo V disuelta en NaCl 0.5 M, Tris 20 mM pH 7.4, BSA 1%, CaCl_2 1 mM, MnCl_2 1mM y se repitieron los lavados. Se reveló la peroxidasa unida con 60 mg de 4 Cl-1-naftol, previamente disueltos en 2 ml de metanol, y 100 μl de H_2O_2 en 100 ml de NaCl 0.5M, Tris 20 mM pH 7.4. Las bandas se hicieron visibles en 5 min. La reacción se detuvo lavando con abundante agua. Se fotografió inmediatamente y se guardó en la oscuridad.

Para evaluar la unión inespecífica se realizó la incubación con Con A y los lavados siguientes en presencia de metil- α -D-manósido 200 mM y luego se procedió como se indicó.

9.3 Determinación de azúcares en proteínas.

Se realizó por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956). Se determinó el contenido de azúcares en la ovalabúmina, utilizando manosa como estándar (ver figura 11.5). Se calculó un promedio de 7 residuos de manosa por molécula de ovoalbúmina. Esto concuerda muy bien con el valor esperado para 2 oligosacáridos de alta manosa. Se comprobó

también que la presencia de 400 μg de BSA (proteína no glicosilada) produjo una absorbancia menor de 0,05. Es decir, las cadenas polipeptídicas no interfirieron en la determinación de azúcares por este método.

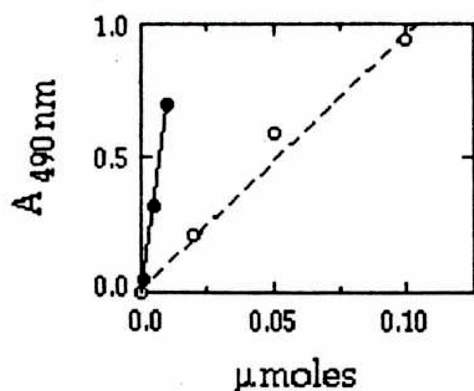


Figura II.5: Determinación del contenido de azúcares en ovoalbúmina por el método del fenol-ácido sulfúrico. Los volúmenes de los reactivos indicados (Dubois et al., 1956) fueron reducidos a la mitad. Se midió A_{490nm} en un espectrofotómetro Beckman. (---o---) manosa; (---*---) ovoalbúmina.

9.4 Obtención de monosacáridos de PCG-100.

Se purificó PCG-100 radiomarcada *in vivo* por inmunoprecipitación (ver 8.3). Se digirió la muestra proteica con proteasa Sigma tipo XIV, previamente tratada durante una hora a 55 °C, en buffer Tris 100 mM, pH 8. La digestión se realizó durante 16-24 hs, con una concentración de proteasa aproximada de 4 mg/ml. Después de la incubación se mantuvo a 100 °C durante 10 minutos y se centrifugó a 10000 $\times$ g. El sobrenadante se liofilizó y redisolvió en 100 μl de agua. Se pasó por una columna de Biogel P2 para desalar. La fracción conteniendo radioactividad (ver figura II.6) se liofilizó y redisolvió en 200 μl de HCl 1N. La hidrólisis fue llevada a cabo durante 4 hs a 100 °C. Después de evaporar con corriente de nitrógeno a temperatura ambiente, se disolvieron los azúcares en agua y se sometió a análisis cromatográfico.

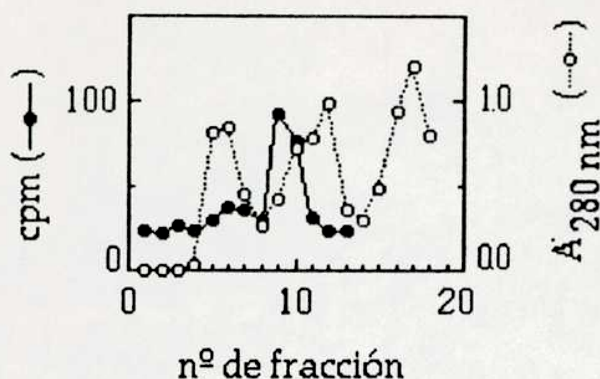


Figura II.6: Columna de Biogel P2. Después de la hidrólisis ácida (ver texto) se pasó por Biogel P2. Se midió la absorbancia a 280 nm y la radioactividad por centelleo líquido.

9.5 Cromatografía en papel.

Los hidratos de carbono fueron analizados por cromatografía descendente en papel Whatman 1, con los siguientes solventes de desarrollo:

BUPI 1033: butanol/piridina/agua (10:3:3).

BUPI 434: butanol/piridina/agua (4:3:4).

ISACH: isopropanol/ácido acético/agua (27:4:9).

Ol 38: etanol/ácido acético/1M acetato de amonio (75:26:4).

La radioactividad fue detectada en un "scanner" o cortando el papel en fragmentos de 0.5-1 cm y contando en un centelleador, utilizando el líquido de Bray como centelleador.

Los estándares, no radioactivos, fueron revelados por reducción de AgNO_3 en medio alcalino.

10. Otros.

10.1 Preparación de ácidos nucleicos.

10.1.1 RNA.

Se trabajó con material de vidrio tratado con dietilpirocarbonato (DEPC) como se describe en Maniatis et al. (1982). Todas las soluciones que no contienen aminas primarias fueron también tratadas con DEPC 0.1% y luego autoclavadas.

Se molieron los insectos finamente en un mortero enfriando con nitrógeno líquido. Se homogeneizó en buffer Tris 50 mM pH 7.6, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.5%, 2-mercaptoetanol 15 mM. Se utilizaron aproximadamente 6 ml de buffer por cada gramo de insectos. Se procedió a

la extracción con fenol-cloroformo y luego se precipitó en acetato de sodio 150 mM mediante el agregado de 2.5 volúmenes de etanol. Después de redissolver el precipitado en agua, se agregó igual volumen de una solución conteniendo LiCl 4M y EDTA 10 mM. Se dejó en hielo durante dos horas y se centrifugó a 8000 rpm. De este modo se elimina gran parte del tRNA, DNA y polisacáridos presentes.

10.1.2 RNA poliA⁺.

Se desnaturalizó el RNA (5mg) por calentamiento a 65 °C durante 5 min y enfriamiento rápido en buffer Hepes /NaOH 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, SDS 0.1%, LiCl 4 M y se pasó por una columna conteniendo 300 mg (aproximadamente 1 ml) de oligo dT-celulosa. Se recogió el eluido, se mantuvo a 65 °C durante 5 min y se volvió a pasar por la columna. Esto se repitió dos veces más. Luego se lavó la columna con cinco volúmenes del mismo buffer, verificándose que la A_{260 nm} fue cercana a cero. Se pasaron 4 volúmenes de buffer Hepes/NaOH 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, SDS 0.1%, LiCl 0.1 M y se eluyó con el mismo buffer sin LiCl, calentado a 45-50 °C. Se juntaron las fracciones correspondientes al RNA poliA⁺ detectado por medición de la A_{260nm}.

10.1.3 DNA.

Se molieron los insectos (1 gramo) finamente en un mortero enfriando con nitrógeno líquido y luego se homogeneizaron en 30 ml de buffer Tris 100 mM pH 7.6, sacarosa 0.32 M, CaCl₂ 5 mM, KCl 50 mM, Tritón X-100 1%. Se filtró a través de cuatro capas de tela de queso y luego a través de una malla de nylon (0.2 mm). Se centrifugó a 2000 x g durante 5 min. El precipitado nuclear fue resuspendido en 5 ml del mismo buffer utilizado en la homogeneización y centrifugado nuevamente. Para el caso de *Ceratitis capitata*, fue necesario lavar bien el precipitado de núcleos antes de proceder a la digestión con proteinasa. Esto disminuyó la cantidad de lípidos que, de otro modo, hubieran dificultado la disgregación del precipitado. Se resuspendió en 5 ml de NaCl 75 mM, EDTA 25 mM, se agregó SDS lentamente, hasta 1% final y se digirió durante 1-2 horas a 37 °C con 50 µg/ml de proteinasa K previamente incubada a 37 °C durante 15 min.

Luego se extrajo con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol. Se resuspendió en TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1mM) y se incubó durante una hora con RNAsa pancreática. Se extrajo nuevamente con fenol-cloroformo y se precipitó en etanol.

10.2 Análisis con sondas de DNA.

Los ácidos nucleicos fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa BA 85 Schleicher & Schüll por las técnicas de "Northen" y "Southern" descritas por Maniatis et al. (1982). Las sondas fueron radiomarcadas con [α - 32 P]dCTP por "nick traslation" utilizando el Nick Translation Kit de BRL, gentilmente cedido por el Dr. C. A. Frash. Se purificaron por centrifugación suave a través de Sephadex G-50, como se describe (Maniatis et al., 1982).

Las incubaciones con las sondas radiomarcadas fueron realizadas en SSC 5x; formamida 50%; Tris pH 7.5 50 mM; Denhardt 10x; EDTA 1 mM; DNA de esperma de salmón 50-100 μ g/ml, durante 16 hs a 37 °C. Los lavados fueron realizados en SDS 0.1%, SSC 0.5-2x, según se indique, a 45-48 °C. Se secaron ligeramente las membranas de nitrocelulosa y se realizó autorradiografía a -70 °C con pantallas intensificadoras.

III. Proteínas cuticulares durante el desarrollo de *Ceratitis capitata*.

Situado en alguna nebulosa lejana
hago lo que hago
para que el universal equilibrio del que soy parte
no pierda el equilibrio.

Antonio Porchia. *Voces*, 1943.

En este capítulo se describe el sistema experimental, se estudian las proteínas cuticulares de los distintos estadios de *Ceratitis capitata* y se presentan las proteínas adoptadas como modelo de estudio: PCG-100, PS-44.

Se analizan en detalle las propiedades de solubilidad y afinidad por quitina de estas proteínas.

Resultados.

1. El ciclo de vida de *Ceratitis capitata*.

Como en otros dípteros ciclorrafos, en *Ceratitis capitata* existen tres estadios larvales, seguidos de dos estadios que se desarrollan dentro del pupario: pupa y adulto farado. La figura III.1 esquematiza el ciclo de vida de esta mosca a 23 °C. Este no ha sido descrito en detalle con anterioridad a nuestros estudios (Rabossi et al., manuscrito en prep.; Rabossi et al., 1991).

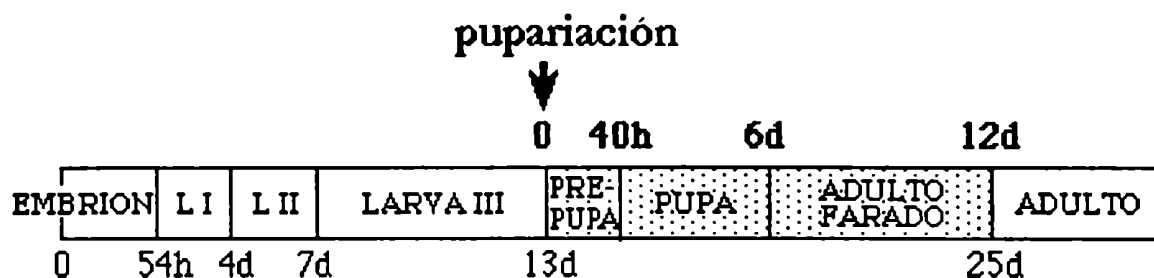


Figura III.1: Ciclo de vida de *Ceratitis capitata*. La duración de cada estadio en horas es válida en las condiciones de cultivo indicadas en Materiales y Métodos.

El ciclo de vida descrito corresponde a las condiciones de cultivo indicadas (23 °C, 55-80% humedad relativa, ciclo luz/oscuridad 16h/8hs). En otras condiciones, los estadios tienen distinta duración.

Estadios larvales: En el laboratorio, al finalizar el estadio embrionario, la larva de primer estadio eclosiona y se sumerge en el medio alimenticio dentro del cual se desarrollan todos los estadios larvales. La primera muda se produce aproximadamente dos días después de la eclosión y la transición entre el segundo y tercer estadio larval, alrededor del quinto día. Al final del tercer estadio larval, la larva deja de alimentarse; finalmente, el undécimo día emerge y se aleja del alimento mediante saltos hasta alcanzar un sustrato seco en donde permanecerá hasta la eclosión del adulto. Como se indicó en Materiales y Métodos, en los cultivos mantenidos en el laboratorio, el sustrato seco es arena.

Pupariación: Unas ocho horas después de haber abandonado el medio húmedo del alimento, la larva se inmoviliza definitivamente y adopta una forma ovoide, marcando el inicio de la pupariación. Durante este proceso la cutícula larval, transparente y flexible, se tanifica (colorea) y esclerotiza convirtiéndose en una cápsula oscura y rígida: el pupario. En el momento de la inmovilización la cutícula es todavía incolora (Pupario Blanco) y poco después inicia su coloración hasta alcanzar, a las 16 hs, su color marrón rojizo definitivo (Rabossi et al. 1991). La ex-cutícula larval así transformada tiene ahora una nueva función: la de proteger y aislar del medio ambiente al insecto durante el período de metamorfosis.

A lo largo de los estudios realizados, hemos observado que el momento de la inmovilización definitiva, es decir, cuando no se produce respuesta frente a estímulos mecánicos, es un excelente criterio para la sincronización de cultivos y -por tanto- del ciclo de vida. Se verá más adelante que en individuos sincronizados de esta manera, los cambios morfológicos y bioquímicos que tienen lugar durante las etapas siguientes del desarrollo resultan perfectamente sincrónicos. Arbitrariamente definimos como "tiempo cero" de la metamorfosis el inicio de la pupariación (pupario blanco o larva inmóvil) (Rabossi et al., 1991).

Pupación: Una vez inmovilizada definitivamente la larva, comienza la etapa pre-pupal. Durante este período se produce una serie de eventos que culminará con una reorganización tisular que conduce a la aparición de los esbozos estructurales del adulto. Las nuevas estructuras son producto de la diferenciación de las células de discos imaginales (ver Introducción). A las 20.5 hs se observó la formación de una burbuja abdominal, lo cual indicaría que la apólisis tiene lugar en ese momento (Ashburner, 1989). De acuerdo a muchos autores, la apólisis marcaría el inicio de la pupación. A las 40 hs se observa la morfología correspondiente a la pupa temprana: la cabeza y los apéndices no están evertidos aún y sólo la parte posterior del tórax es visible. Entre las 46-48 hs se produce la eversión de la cabeza y miembros torácicos y a las 72 hs se alcanzan las proporciones definitivas de la cabeza, tórax y abdomen (Rabossi et al., 1991).

Adulto farado e imago: Al sexto día desde la iniciación de la pupariación se produce la transición pupa-adulto farado (no emergido). Las estructuras propias del adulto se completan en los días siguientes y al final del estadio el adulto no emergido se encuentra rodeado por las cutículas pupal y larval, esta última convertida en pupario. Hacia el día 12 se produce la emergencia y cuatro o cinco días después se alcanza la madurez sexual.

A temperaturas menores, el ciclo de vida se alargó y el adulto alcanzó la madurez sexual más tarde. La humedad relativa tuvo influencia en la duración del período transcurrido entre el primer salto de la larva III y la inmovilización: la pupariación se vió retardada cuando las larvas fueron mantenidas en atmósferas más húmedas. En todos los experimentos mostrados en esta tesis, las edades se refieren al ciclo de vida estándar a 23 °C indicado en la figura III.1.

Para los estadios que se desarrollan dentro del pupario (pre-pupa, pupa y adulto farado), fué posible determinar la edad con precisión por observación de la morfología (Rabossi et al., manuscrito en prep.). A lo largo de los estudios realizados, se hizo evidente que ciertos eventos bioquímicos, los cuales se describen más adelante, tienen lugar en determinados momentos y ésto ocurre con gran precisión, de modo que resultan buenos marcadores de la edad fisiológica. Se estableció la correlación (por los criterios morfológicos y bioquímicos mencionados) entre las edades de cultivos mantenidos a distintas temperaturas. La figura III.2 muestra la correlación de los tiempos de eventos fisiológicos a 21 °C y a 23 °C.

A 21 °C, transcurren 17 días desde la pupariación hasta la emergencia. Se observa en la figura III.2 que el estadio pupal resultó más sensible a los cambios en la temperatura, alargándose notablemente entre el tercer y quinto día, en tanto que el adulto no emergido pareció desarrollarse a la misma velocidad que a 23 °C.

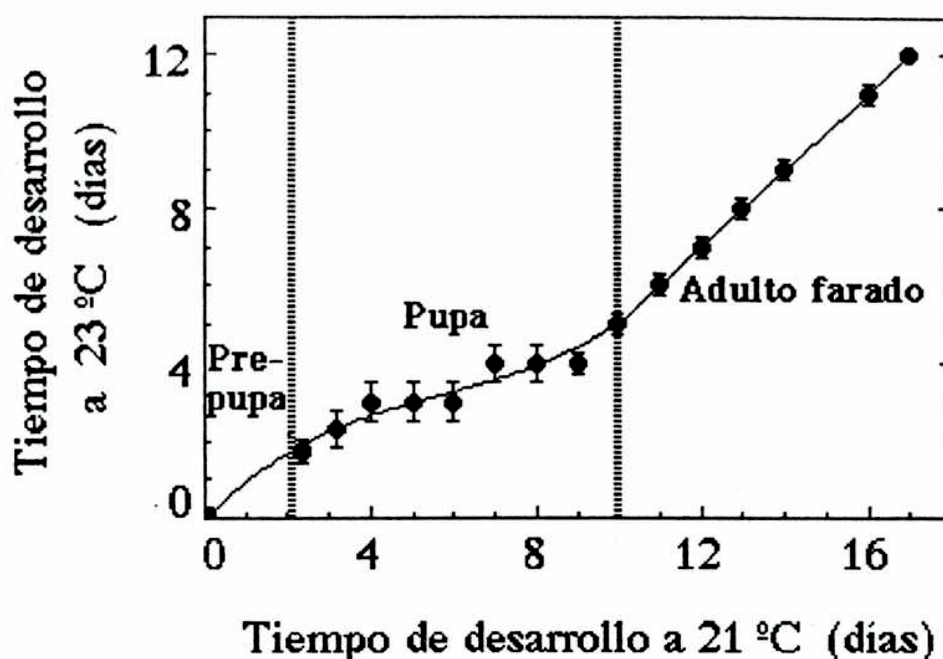


Figura III.2: Se correlacionaron los tiempos transcurridos desde el inicio de la pupariación a 23 °C con los tiempos transcurridos a 21 °C para la ocurrencia de los eventos morfológicos (aparición y/o pigmentación de estructuras) y bioquímicos mencionados en el texto.

2. Preparación masiva de proteínas cuticulares de *Ceratitis capitata*.

2.1 Obtención en masa de cutículas de distintos estadios.

Larvales: Las cutículas larvales fueron aisladas como se describe en Materiales y Métodos (ver 2.1.1, página 31).

Pupales y de adultos farados: En la figura III.3 se esquematiza el procedimiento descrito en Materiales y Métodos para la obtención en masa de cutículas de los estadios que se desarrollan dentro del pupario (pupa y adulto farado).

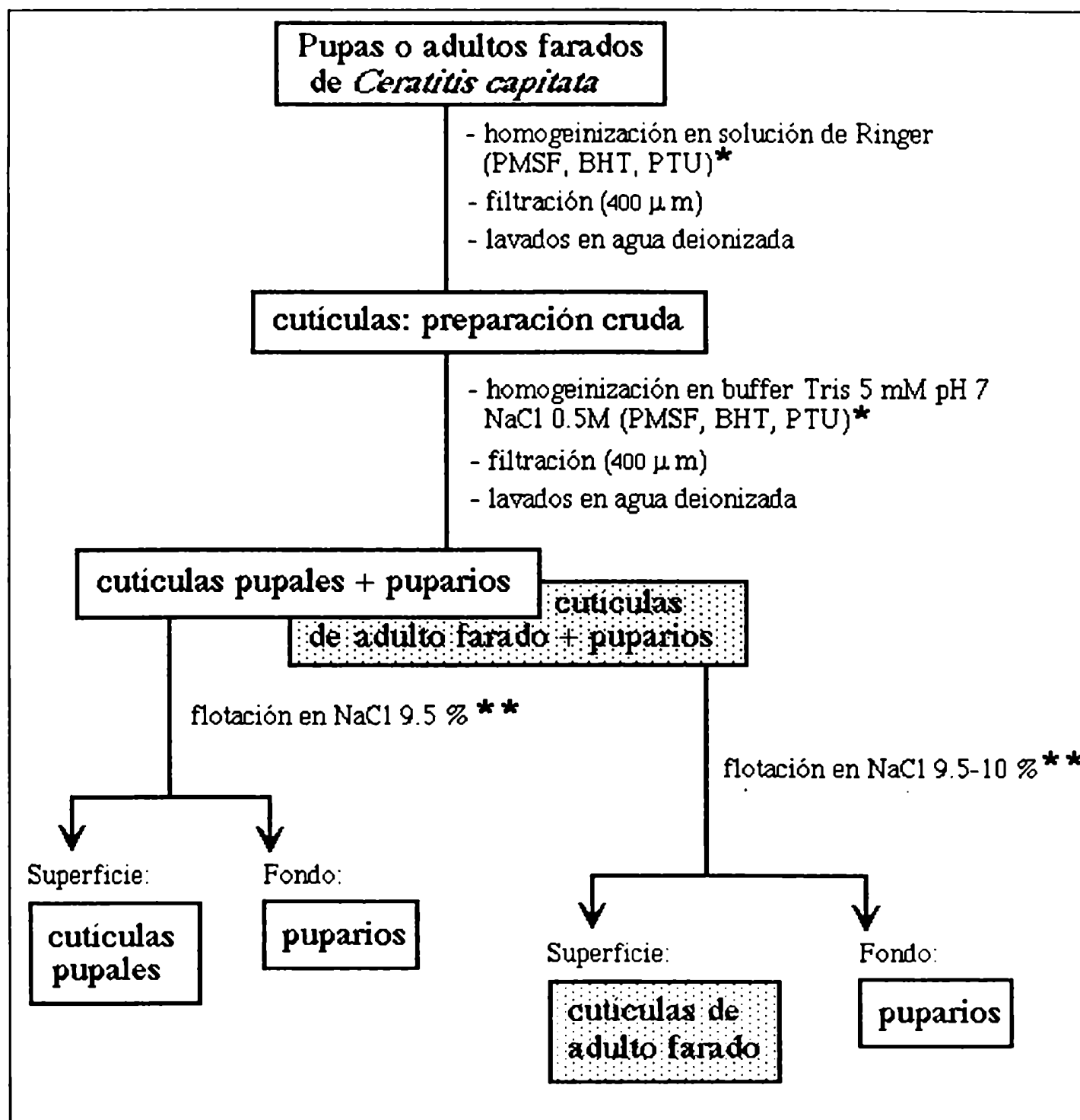


Figura III.3: Esquema de obtención de cutículas de pupas o adultos farados de *Ceratitis capitata* (ver texto).

La presencia del antioxidante (BHT) butil-hidroxi-tolueno 1-2 mM y del inhibidor de tirosinasas feniltiourea (PTU) 5 mM constituyó un requerimiento absoluto durante todos los pasos de la preparación (ver figura III.3, *).

La concentración de NaCl necesaria para la flotación de las cutículas no tanificadas resultó distinta para el caso de las cutículas pupales y de adulto farado de *Ceratitis* (ver figura III.3, **), no resultando suficiente NaCl 8.5% como en el caso de *Drosophila*. Esto indicaría que las cutículas tienen distintas densidades, lo cual puede deberse a una distinta relación [lípidos]/[proteína]/[quitina].

Las cutículas obtenidas resultaron libres de material celular contaminante al ser observadas al microscopio óptico. Se observó la presencia de cerdas, pelos de revestimiento y ojos pigmentados en las preparaciones de adulto farado. Las cutículas pupales, por el contrario, resultaron incoloras y transparentes.

2.2 Extracción de proteínas cuticulares.

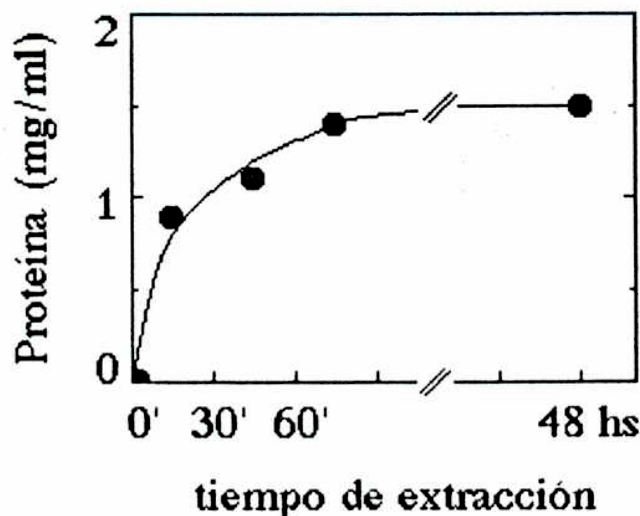


Figura III.4: Se extrajeron cutículas de adulto farado aisladas en masa en SDS 1% a 4 °C. A los tiempos indicados, se determinó la concentración de proteína en los extractos por el método de Bradford modificado descrito en Materiales y Métodos, usando BSA como estándar.

Las cutículas fueron extraídas en SDS 1% a 4 °C. Como se observa en la figura III.4, la cantidad de proteína liberada después de 1.25 hs de extracción resultó comparable a la cantidad extraída a las 48 horas. Los extractos analizados en SDS-PAGE presentaron el mismo patrón de proteínas para todos los tiempos de extracción (no mostrado). Tampoco se observaron diferencias en el tipo o cantidad de proteína extraída a distintas temperaturas. En los experimentos que se muestran aquí, la extracción se realizó a 4 °C durante 2 horas o toda la noche.

Después de separar las cutículas por centrifugación a 10000 x g, se observó la presencia de material menos denso en la superficie. La abundancia de este material, aparentemente lipídico, pareció depender de las condiciones en las que se realizó la extracción; siendo más abundante en extracciones prolongadas o realizadas a temperatura ambiente. Como se describe en Materiales y Métodos, después de la extracción en SDS 1%, se precipitaron las proteínas mediante el agregado de acetona. La presencia de lípidos en los extractos dificultó la redisolución del precipitado en SDS 1%. Se verá más adelante que las proteínas cuticulares pupales de *Ceratitis capitata* presentan distintas propiedades de solubilidad, siendo más insolubles las de mayor peso molecular. Por lo tanto, es posible que la composición proteica de los extractos se viera alterada después de la precipitación con acetona y re-extracción del precipitado con SDS 1%. En algunos casos se omitió la precipitación con acetona, y cuando fué necesario, las proteínas fueron deslipidificadas por precipitación en $\text{Cl}_3\text{CH-MeOH}$ (1:2).

3. Perfil electroforético de proteínas cuticulares durante el desarrollo

3.1 Análisis de los distintos estadios.

Se obtuvieron en forma masiva proteínas cuticulares de larvas de tercer estadio, de pupas y de adultos farados de distintas edades. Claramente, el perfil electroforético (ver figura III.5) de las proteínas larvales (L) resultó distinto al de proteínas correspondientes a los estadios que se desarrollan dentro del pupario (P₂-P₁₀).

Dada la insolubilidad de las proteínas cuticulares (ver 5.4) éstas no presentan buena resolución en geles nativos (ver Discusión); por lo que en la mayoría de los estudios se utilizaron geles monodimensionales desnaturalizantes en SDS. En algunos casos se emplearon geles bidimensionales utilizando el sistema descrito por Macfarlane (1989), en BAC-16 (detergente catiónico)/SDS (detergente aniónico) (no mostrado).

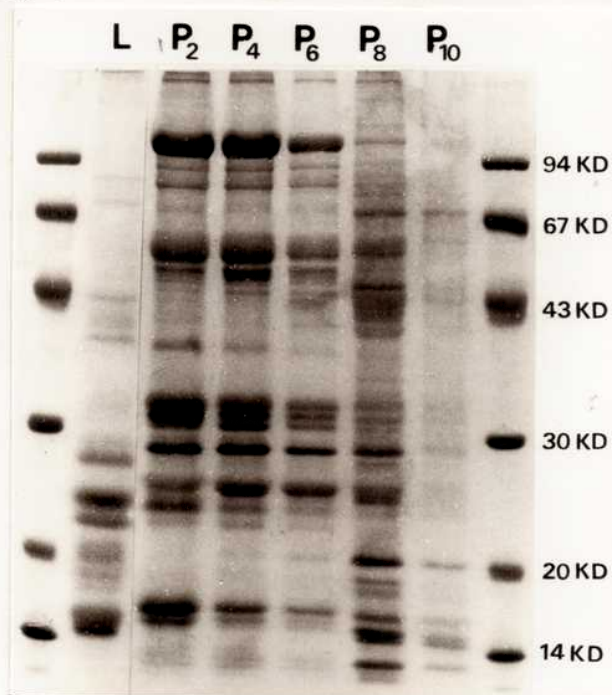


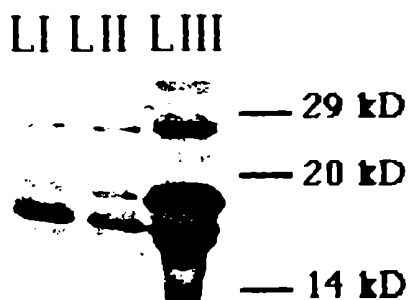
Figura III.5: Proteínas cuticulares en *Ceratitidis capitata*. Se prepararon masivamente proteínas cuticulares de un cultivo de larvas de tercer estadio (L). Otro cultivo fue sincronizado en el momento del salto y se prepararon masivamente proteínas cuticulares a los 2, 4, 6, 8 y 10 días (P₂-P₁₀).

Las proteínas larvales resultaron de menor peso molecular y fue menor el número de bandas en este estadio en comparación con los estadios siguientes. Al comienzo del estadio pupal (P₂) apareció un nuevo patrón de proteínas, permaneciendo hasta el sexto día, momento en el cual fue remplazado por un nuevo perfil electroforético (P₈ en la figura III.5). Estos dos últimos patrones son de mayor complejidad en cuanto al número de bandas que el estadio L III, y presentan proteínas de mayor peso molecular.

Como se verá más adelante, existe una estricta correlación entre los cambios en el perfil electroforético y los cambios morfológicos que se producen durante la metamorfosis. El cambio de composición proteica entre el sexto y el octavo día corresponde a la transición pupa-adulto farado. El patrón de proteínas P₈ y P₁₀ en la figura III.5 se compara muy bien con el patrón de proteínas de adultos emergidos (no mostrado)

Los estadios larvales I y II presentaron un perfil de proteínas cuticulares iguales entre sí y distinto del correspondiente al tercer estadio larval (ver figura III.6).

Figura III.6: Se disecaron individualmente (ver Materiales y Métodos) cutículas de 40 larvas de primer estadio, 10 larvas de segundo estadio y una larva de tercer estadio. Se extrajeron las proteínas en SDS 1% y se analizaron en mini-PAGE-SDS 15 %.



3.2 Perfil de proteínas larvales (LCP), pupales (PCP) y de adulto (ACP) de *Ceratitis capitata*.

De acuerdo a la nomenclatura utilizada en la bibliografía (Chihara et al., 1982; Skelly y Howells, 1988), las proteínas cuticulares larvales de tercer estadio se denominaron LCP; las pupales, PCP y las de adulto, ACP. En la figura III.7 se muestran los perfiles electroforéticos en condiciones desnaturalizantes de LCP, PCP y ACP de *Ceratitis capitata*. Los números indican los pesos moleculares aparentes en SDS-PAGE. También se indica si se trata o no de glicoproteínas, según fue establecido por distintos métodos. (Los estudios realizados respecto al grado y tipo de glicosilación se detallan en el capítulo VII). De este modo, por ejemplo, LCP-28 indica Proteína Cuticular Larval de peso molecular aparente 28 kD; PCG-100 significa Glicoproteína Cuticular Pupal de peso molecular aparente 100 kD, etc.

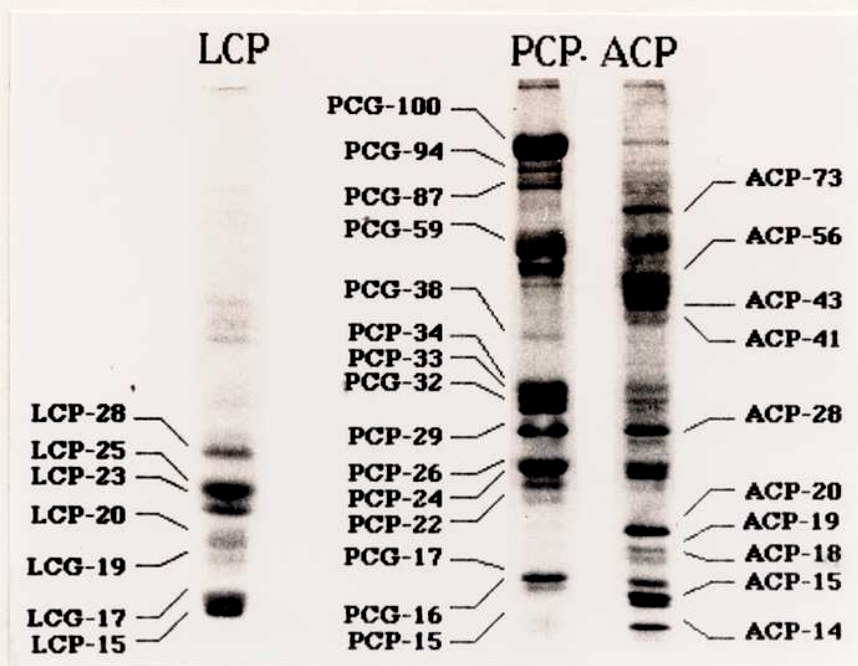
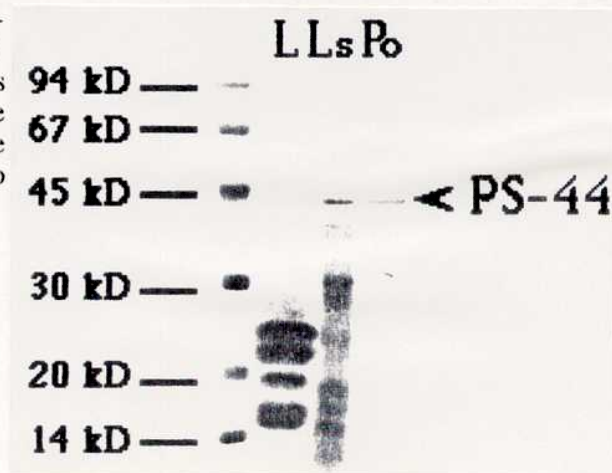


Figura III.7: Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE 12.5% de LCP, PCP y ACP de *Ceratitis capitata*. La nomenclatura se explica en el texto.

3.3 Proteínas cuticulares de larvas de tercer estadio tardío.

Se analizaron las LCP durante los últimos momentos del estadio larval. No se detectaron cambios en el perfil electroforético durante los tres días previos a la inmovilización (no mostrado). En la figura III.8 se observa que al final del estadio, en el momento del salto, apareció una nueva proteína en el perfil electroforético: PS-44 (Proteína de larva de Salto de 44 kD). Esta está presente también en el "pupario blanco" (ver figura III.8). Sin embargo, como se verá más adelante, criterios inmunológicos y otros parecen indicar que PS-44 no sería de origen cuticular.

Figura III.8: Se analizaron en SDS-PAGE 15% preparaciones masivas de proteínas de cutícula de Larva III (L), Larva de salto (Ls) y Pupario blanco (Po).



3.4 Proteínas cuticulares durante la metamorfosis.

3.4.1 Perfil electroforético y cambios morfológicos.

Se analizaron las proteínas cuticulares durante la metamorfosis mediante disección de pupas y adultos farados de distintas edades, extracción de las proteínas de las cutículas individuales y separación en geles de poliacrilamida. Los cambios en el perfil electroforético fueron correlacionados con los cambios morfológicos observados durante la pupación y metamorfosis de *Ceratitis capitata*, los cuales fueron simultáneamente estudiados en nuestro laboratorio (Rabossi et al., 1991; Rabossi et al., manuscrito en prep.). La figura III.9 muestra claramente que el patrón de PCP no permaneció constante durante el estadio pupal (40 hs-7 días). Al comienzo del estadio se detectaron algunas proteínas minoritarias que desaparecieron del perfil electroforético pocas horas después (48 hs) y que no están presentes en las preparaciones masivas. A 40 hs la cutícula es muy frágil y delgada y resulta difícil limpiarla completamente de los tejidos internos. Es probable que proteínas observadas a las 40 hs provengan de este material. Por otra parte, estas proteínas no parecen ser sintetizadas en ese momento, a juzgar por la falta de incorporación de [³⁵S]-metionina (ver páginas 124-126).

La "aparición" de PCG-100 en el perfil electroforético se produjo siempre en el momento en que se observó la eversión de la cabeza (48 hs en la figura III.9). En las horas siguientes (3 y 4 días), la cantidad de PCG-100 extraída aumentó y se detectaron algunas de las proteínas de menor peso molecular (PCP-34, PCP-29).

Hacia el fin del estadio pupal (6to y 7mo días), las PCP "desaparecieron" gradualmente del perfil electroforético y fueron luego reemplazadas por las ACP (9-12 días). En ese momento, hacia el 6to día, los ojos adquirieron un color anaranjado ("buff") y fue posible distinguir los ocelos (7mo día en la figura III.9). Hacia el noveno día se distinguen un par de manchas torácicas y las vibrisas orales. En los días siguientes, el patrón de ACP se completó (11 y 12 días) y se alcanzó la morfología del adulto farado, es decir el imago antes de la emergencia (Rabossi, 1991).

Se comprobó siempre la correlación indicada en la figura III.9 a lo largo de los estudios realizados (se hicieron numerosas observaciones). Esto también fue válido en cultivos mantenidos a distintas temperaturas, los cuales presentaron estadios de distinta duración (ver 1, página 51).

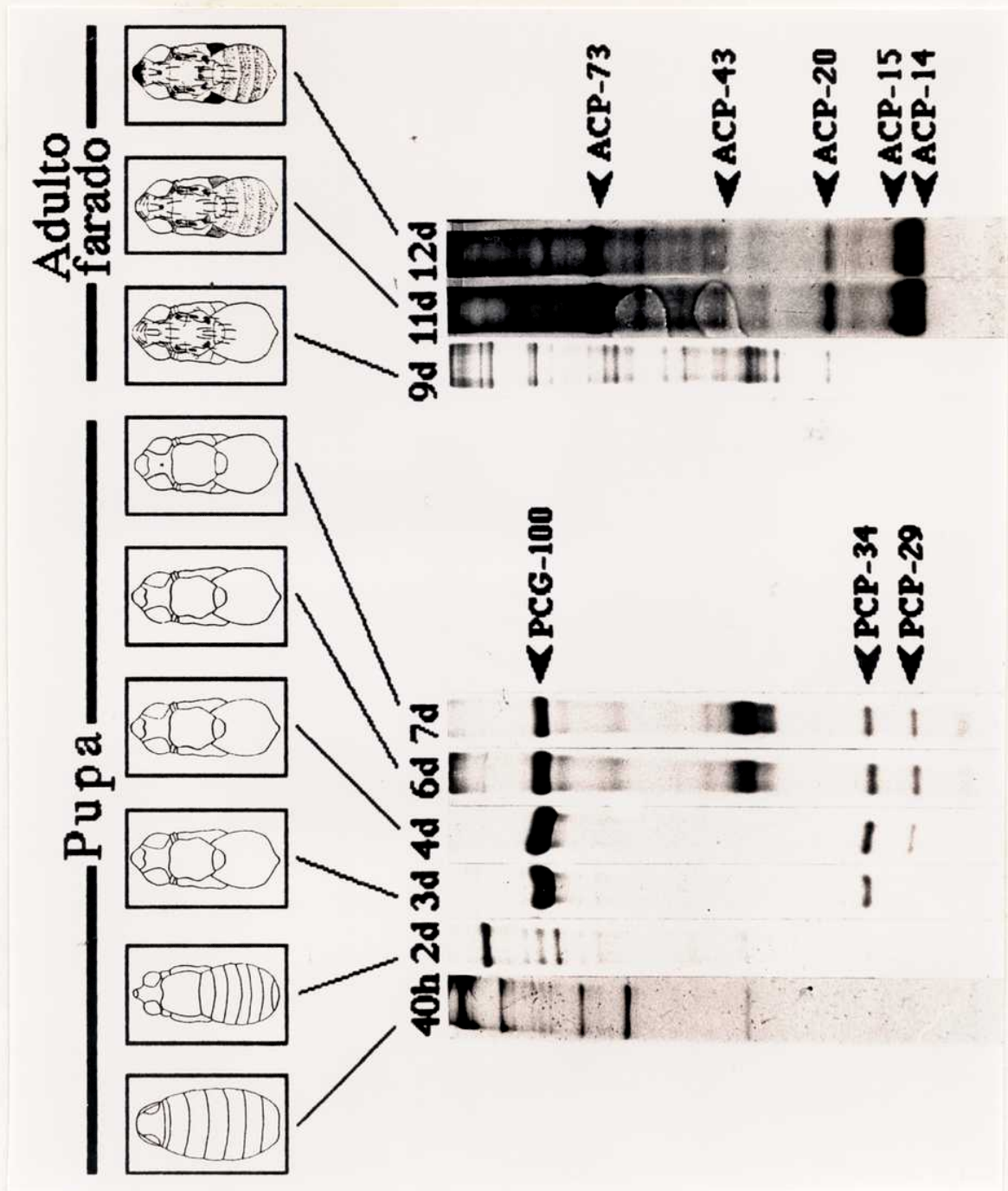


Figura III.9: Se analizaron en SDS-PAGE las proteínas extraídas de cutículas individuales a distintos tiempos después de la pupariación. Las observaciones morfológicas fueron realizadas por Alejandro Rabossi, como se describe (Rabossi et al., 1991).

3.4.2 Acumulación de PCP en la cutícula durante la metamorfosis.

Como se vió más arriba, las PCP aparecen en la cutícula pupal en formación al comienzo del estadio, aumentan en cantidad en los días siguientes y desaparecen hacia el séptimo día. La figura III.10 muestra la acumulación de PCG-100 medida por cuantificación en SDS-PAGE (ver Materiales y Métodos). Se observa que la cantidad de proteína en la cutícula aumentó desde las 40 hs, hasta alcanzar el valor máximo a las 72 hs y luego permaneció constante durante varios días. Hacia el séptimo día, la cantidad de PCG-100 extraída disminuyó notablemente. En este momento se produjo la muda; el adulto farado se encuentra recubierto por una nueva cutícula y la cutícula pupal, ya desprendida, presentó el aspecto de una película delgada y transparente. Cuando 10 de estas cutículas pupales fueron extraídas exhaustivamente en SDS 2% a 65 °C, no se obtuvo proteína en los extractos.

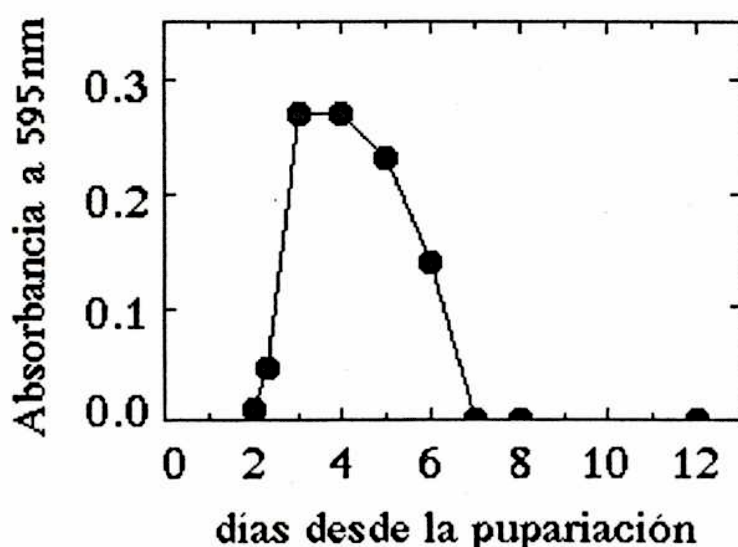


Figura III.10: Se extrajeron en SDS 1% cutículas pupales individuales obtenidas por disección. Se separaron las proteínas en SDS-PAGE 10%, se tiñó con CBBR y el colorante en la banda de PCG-100 fué eluido como se describe en Materiales y Métodos. Se midió la absorbancia a 595 nm.

4. Composición proteica de las distintas partes del cuerpo de la pupa.

La cutícula pupal de la cabeza y tórax es producto de las células epiteliales provenientes de la proliferación y diferenciación de los discos imaginales. En cambio, la cutícula abdominal es de origen mixto, siendo producida por células descendientes de conglomerados de células imaginales (histoblastos) conjuntamente con células epiteliales remanentes del estadio larval.

La figura III.11 muestra que parecen existir diferencias en el perfil de proteínas presentes en las cutículas secretadas por células imaginales únicamente (cabeza y tórax) y por células imaginales y células de origen larval (abdomen). PCG-100 está presente en todos los casos. En cambio, ciertas proteínas de bajo peso molecular aparente (PCP-22, PCG-17, PCG-16 y PCP-15) parecen ser exclusivamente abdominales.

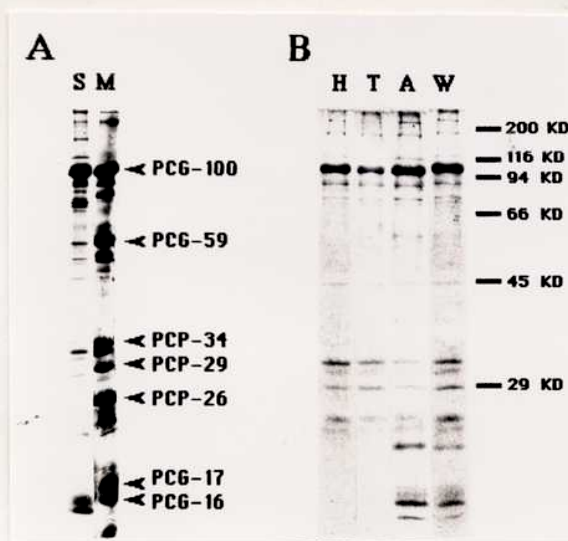


Figura III.11: Se analizaron en SDS-PAGE 12.5% proteínas cuticulares de pupas de 4 días. A: S: proteínas extraídas de una cutícula pupal obtenida por disección. M: preparación masiva de PCP. B: Se disecaron las cutículas de 2 cabezas (H), un tórax (T), un abdomen (A) o un animal completo (W) y se extrajeron con "craking buffer" (ver Materiales y Métodos).

Al analizar las PCP extraídas de cutículas individuales obtenidas por disección se observó que PCG-100 resultó la proteína mayoritaria, constituyendo aproximadamente el 80% de las PCP. (ver figuras III.11 y III.21). En las preparaciones masivas descritas anteriormente (ver figura III.7), PCG-100 apareció como una de las proteínas más abundantes pero no la mayoritaria absoluta.

Esta diferencia entre preparaciones individuales y masivas puede deberse a varios factores: a) es probable que el método mediante el cual se aislan las cutículas pupales, basado en homogeneizaciones y flotaciones, genere una preparación enriquecida en cutículas abdominales. Esto es posible ya que las cutículas de tórax y cabeza son más frágiles y la cutícula de los apéndices (alas y patas) son fragmentos pequeños que pueden perderse fácilmente en las filtraciones y flotaciones. Teniendo en cuenta que la distribución de proteínas en las distintas partes del cuerpo no es uniforme (ver figura III.11) ésto podría ocasionar una composición proteica diferente de la que existe en la cutícula completa, apareciendo enriquecida en proteínas abdominales, de bajo peso molecular.

b) Dado que las PCP de mayor peso molecular son menos solubles que las de menor peso molecular (ver 5.4), es posible que se favorezca la presencia de éstas en los extractos después de la precipitación con acetona y re-extracción del precipitado con SDS 1% (ver Materiales y Métodos). Por lo tanto, es posible que en las preparaciones masivas ocurran artificios que alteren la abundancia relativa de las distintas proteínas.

5. Solubilización y solubilidad de proteínas cuticulares en *C. capitata*.

5.1 Solubilización de proteínas cuticulares pupales.

Las proteínas cuticulares pupales de *Ceratitis capitata* no resultaron extraíbles en agua ni en soluciones de moderada o alta fuerza iónica, requiriéndose la acción de agentes desnaturizantes.

La figura III.12 muestra las proteínas extraídas de cutículas pupales individuales en distintos medios. En Ringer (1) o NaCl 0.5M (2) pocas proteínas fueron liberadas a la solución. Estas fueron de bajo peso molecular y están presentes en forma minoritaria entre las proteínas extraídas con "buffer muestra" a 100 °C (6). Claramente, las proteínas cuticulares mayoritarias que no fueron extraídas en soluciones salinas, resultaron extraídas en SDS 1% (3), urea 7M (4) o SDS 1% más urea 7M (5). Las mismas cutículas fueron extraídas posteriormente en "buffer muestra" a 100 °C, no detectándose proteína por tinción con plata del SDS-PAGE correspondiente (no mostrado). El SDS 1% resultó un agente desnaturizante eficaz para la extracción cuantitativa de todas las proteínas cuticulares pupales, y es el que se usó en todos los casos, a menos que se indique lo contrario.

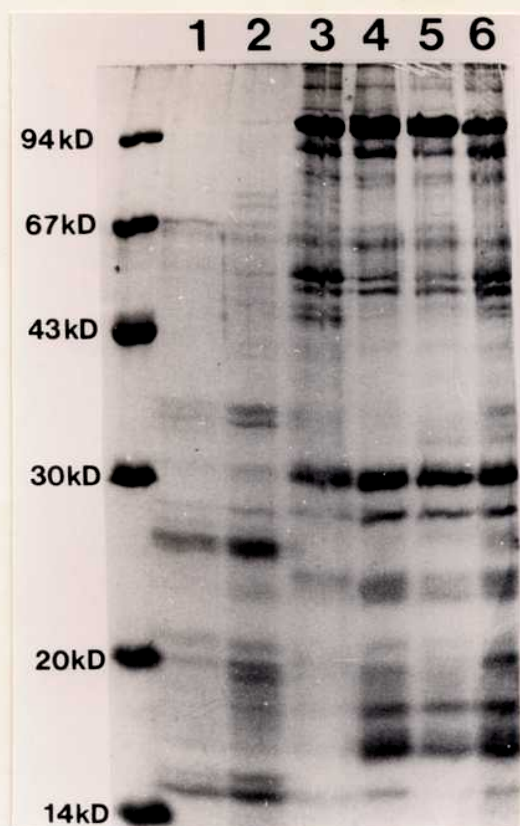


Figura III.12: Se extrajeron cutículas individuales de pupas de cinco días con solución de Ringer (1), NaCl 0.5M (2), SDS 1% (3), urea 7M (4) o SDS 1% más urea 7M (5), a 25 °C durante 16 horas, o a 100 °C durante 10' con buffer muestra (6).

5.2 Solubilización de proteínas cuticulares larvales.

Al contrario de las PCP, las LCP resultaron extraíbles en ausencia de agentes desnaturalizantes. La figura III.13 muestra las proteínas liberadas de cutículas de larva III por extracción sucesiva en solución de Ringer, NaCl 0.5M y finalmente SDS 1%. Las LCP mayoritarias (LCP-25, LCP-23, LCP-17 y LCP-15) fueron solubilizadas en ausencia (carriles 1 y 2) o presencia de detergente (3). También en los dos primeros estadios larvales las proteínas cuticulares resultaron solubilizadas en solución de Ringer (datos no mostrados). Es de hacer notar que la composición proteica de los extractos depende del solvente utilizado: la PS-44 se libera en NaCl 0.5M, pero no en la solución de menor fuerza iónica (1). En presencia de SDS, la abundancia relativa de LCP-23 fue mayor que en los extractos anteriores. Los perfiles electroforéticos de preparaciones masivas o individuales de LCP resultaron indistinguibles (ver figura III.14).

Figura III.13: Se aislaron cutículas de larvas en el momento del salto. Se homogeneizaron sucesivamente en solución de Ringer (1) y NaCl 0.5M (2). Luego fueron extraídas en SDS 1% (3). Las proteínas fueron analizadas en SDS-PAGE 12.5%.

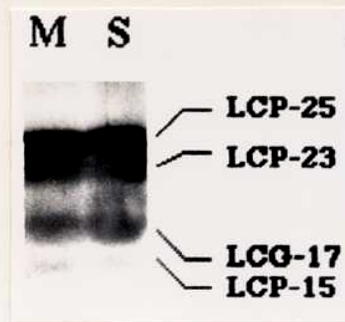
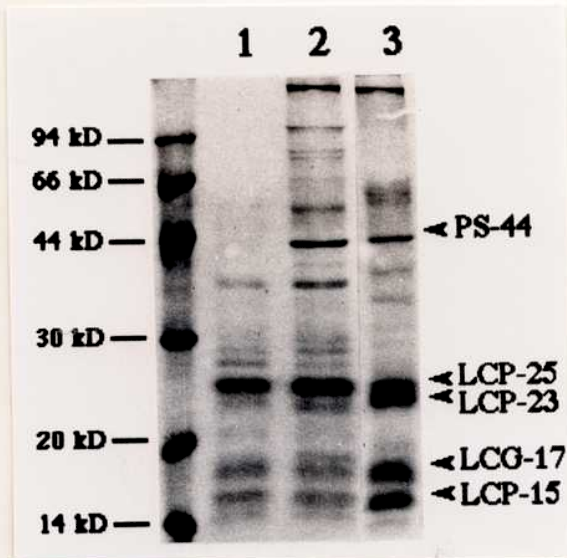


Figura III.14: Se analizaron en SDS-PAGE 15 % las proteínas extraídas de cutículas de larvas de tercer estadio aisladas masivamente (M) o por disección (S), como se describe en Materiales y Métodos.

5.3 Eliminación del SDS de los extractos proteicos.

Con frecuencia se requirió, durante el desarrollo de esta tesis, la necesidad de eliminar o disminuir la concentración de detergente presente en los extractos proteicos. Especialmente en casos de digestiones enzimáticas, columnas de afinidad por lectinas o quitina, medición de proteínas, etc.

Teniendo en cuenta la naturaleza iónica del SDS, se trató de eliminarlo por precipitación elevando la concentración salina del medio. Siendo que la solubilidad relativa de los dodecilsulfatos alcalinos disminuye en el orden $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$, se decidió emplear potasio como catión. Se eligió cloruro como contraión por ser una de las especies más frecuentes en las soluciones y buffers usados. Se obtuvieron resultados similares con fosfato de potasio.

Encontramos que KCl 100 mM resultó suficiente para precipitar, en 10 min a temperatura ambiente, el SDS presente en las concentraciones comunmente usadas (0.1-2%) (ver Materiales y Métodos). A concentraciones de KCl mayores de 250 mM comenzó a observarse pérdida de proteínas, probablemente por efecto "salting out". En las condiciones mencionadas (10 min a temperatura ambiente, KCl 100 mM) no se produjeron pérdidas significativas de proteínas cuticulares, a juzgar por los valores de absorbancia a 280 nm y por la determinación de proteínas por el método de Lowry (ver tabla III.1). El análisis en SDS-PAGE no reveló diferencias en la composición proteica de los extractos antes y después de la eliminación del SDS (ver figura III.15).

μg (A _{280 nm})		μg (Lowry)	
-	+	-	+
5	4.5	5	4.3
15	13.9	15	13.8

Tabla III.1 : Se eliminó el SDS de un extracto de proteínas cuticulares pupales. Se determinó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm o por el método de Lowry antes (-) o después (+) de la precipitación con KCl 100 mM.

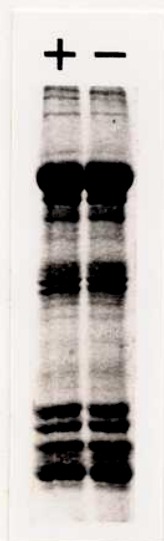


Figura III.15: mini-PAGE-SDS 10 % de extractos de PCP antes (+) o después (-) de eliminar el SDS.

5.4 Solubilidad.

Como se indicó anteriormente, en algunos casos se hizo necesaria la eliminación del exceso de SDS presente por precipitación con KCl (ver 5.3). Con el tiempo o la mayor temperatura, en ausencia de detergente las proteínas cuticulares pupales tendieron a precipitar.



Figura III.16: Se eliminó el SDS de una solución que contenía PCP (4 mg/ml) y BSA (2 mg/ml) y se mantuvo a 21 °C. A distintos tiempos, se centrifugó a 10000 rpm y se analizaron los sobrenadantes en mini-PAGE-SDS 12.5 %.

La figura III.16 muestra las proteínas cuticulares pupales remanentes en solución después de mantener a 25 °C durante distintos tiempos los extractos libres de SDS. Se observa que las proteínas de mayor peso molecular (PCG-100 y otras) permanecieron en solución durante las dos primeras horas, pero desaparecieron de la fracción soluble después de 16 horas a 21 °C.

En cambio, la solubilidad de las proteínas de menor peso molecular no pareció afectarse considerablemente durante la incubación. En las mismas condiciones, la BSA agregada como referencia interna permaneció soluble durante todo el lapso de tiempo analizado (ver figura III.16).

En la figura III.17 se observa que, a medida que se aumentó la temperatura, las proteínas tendieron a desaparecer de la fracción soluble (S) y a aparecer en la fracción insoluble (P).

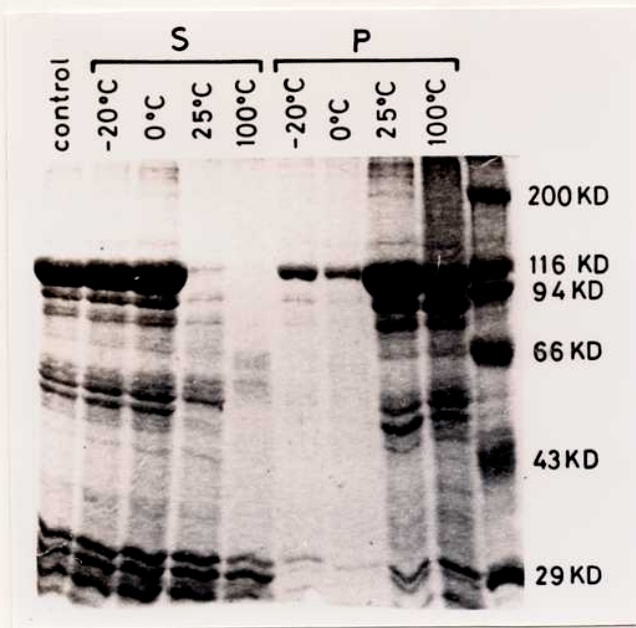


Figura III.17: Se eliminó el SDS de un extracto de PCP y éste se mantuvo a -20°C , 0°C ó 25°C durante 16 hs o 10' á 100°C . Se centrifugó a $10000 \times g$. Las proteínas en solución (S) y las precipitadas (P) fueron analizadas en mini-PAGE-SDS 12.5 %. Control: extracto de PCP libre de SDS sin tratamiento alguno.

También en este caso las proteínas de mayor peso molecular se tornaron insolubles en condiciones en que las de menor peso molecular permanecieron en solución (comparar carriles S de 0°C y 25°C). Se descartó que esta insolubilización sea debido a algún posible efecto salino pues lo mismo se observó después de eliminar el KCl por diálisis.

Por lo tanto, la presencia de SDS parece ser un requerimiento no sólo para extraer proteínas de la cutícula (lo cual implica la disociación de uniones no covalentes quitina-proteína y proteína-proteína), sino también para mantener las de mayor peso molecular en solución. Sin embargo, se pueden mantener los extractos libres de SDS sin que se produzcan pérdidas de proteína por precipitación durante por lo menos 2 horas a temperatura ambiente (ver figura III.16) o a 16 horas a baja temperatura (carriles S y P a 0°C en la figura III.17).

6. Unión a quitina.

Se acepta (ver Introducción) que las proteínas cuticulares estarían fuertemente asociadas a la quitina, formando una estructura cuasi-cristalina y que esta fuerte interacción sería en gran parte responsable de las dificultades en la extracción de las proteínas cuticulares. Durante el proceso de esclerotización se forman, además, enlaces covalentes mediados por quinonas (ver Introducción).

6.1 Digestión de cutículas con quitinasa.

Se investigó si la digestión de las cutículas con quitinasa era capaz de liberar proteínas de cutículas pupales.

Se extrajeron cutículas de pupas de cuatro días con SDS 1%, se recuperaron las cutículas y se las digirió con quitinasa como se describe en Materiales y Métodos. Se agregó detergente y los extractos fueron analizados en SDS-PAGE. No se detectaron proteínas liberadas según este método. Aparentemente, esto no se debió a la presencia de proteasas, pues en un experimento similar en que se agregó BSA antes de la digestión, ésta fue recuperada al final del ensayo. Se comprobó la acción de la enzima sobre la quitina por análisis cromatográfico de los productos obtenidos (ver Materiales y Métodos, página 38).

No disponemos -hasta la fecha- de datos sobre la eventual liberación de proteínas cuticulares por un tratamiento con quitinasa en una secuencia: extracción con SDS-lavado-quitinasa-extracción con SDS.

6.2 Afinidad por quitina.

6.2.1 Proteínas cuticulares pupales.

Se ensayó la unión de PCP a quitina en columnas de afinidad como se describe en Materiales y Métodos. Estos análisis se realizaron en distintas condiciones, en presencia o ausencia de SDS (ver tabla III.2).

SDS en el extracto*	SDS en los buffers#	% de proteína†:	
		no unida	unida
+	+	100	0
+	-	90	10
-	-	70	30

Tabla III.2: Unión de PCP a quitina .

* El extracto de PCP en SDS 1% fue pasado directamente (+) o previa eliminación del detergente por precipitación con KCl (-).

Se incluyó (+) o no (-) SDS 0.1% en las soluciones de lavado y elución.

† La cantidad de proteína en las fracciones unida y no unida fue determinada por el método de Bradford modificado como se describe en Materiales y Métodos.

Cuando el ensayo se hizo en presencia de SDS 0.1%, no se observó unión. Cuando no se incluyó SDS en las soluciones empleadas y no se eliminó el detergente presente en los extractos, sólo el 10% quedó retenido. El análisis en SDS-PAGE de las fracciones unida y no unida no reveló diferencias en la composición proteica (no mostrado).

En otros casos, se pasó un extracto de PCP libre de SDS. El 30% de la proteína se unió a la columna (ver tabla III.2) y se eluyó con el buffer de pH 9 (ver figura III.18 A). No se detectó proteína en eluidos con urea 7M (ver Materiales y Métodos, página 37).

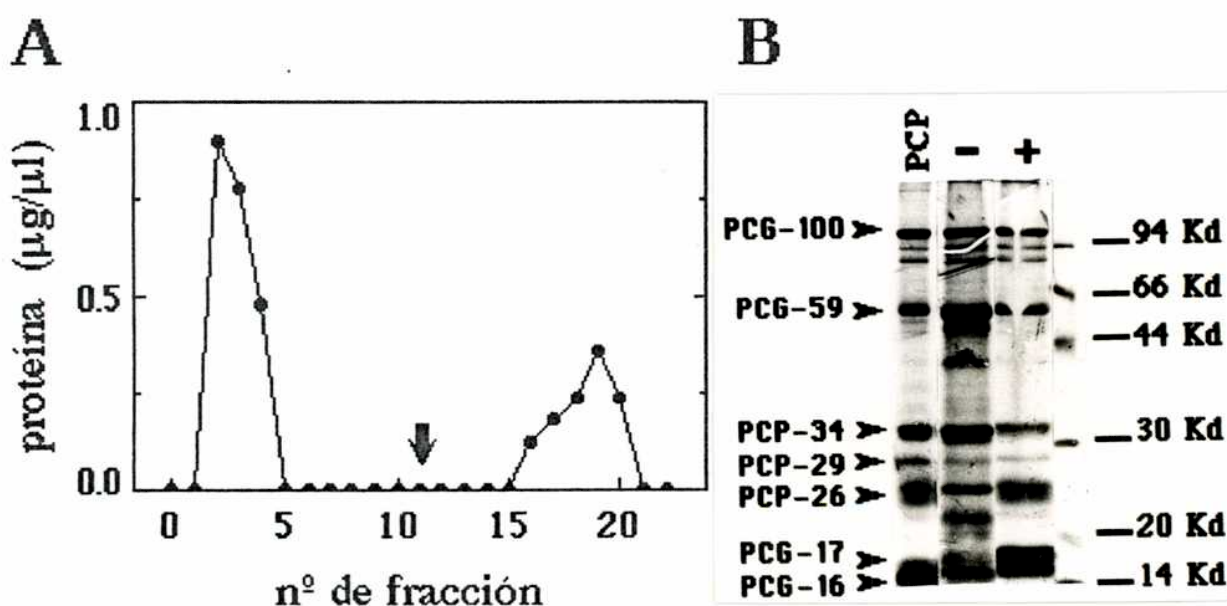


Figura III.18: Se eliminó el SDS presente en los extractos de PCP por precipitación con KCl 100 mM (ver 5.3). Se pasaron las proteínas por una columna de quitina y se dejó equilibrar como se describe en Materiales y Métodos. Se eluyó con buffer Tris pH 7.5 (fracciones 0-10) y luego (flecha) con buffer Tris pH 9. **A:** La cantidad de proteína fue determinada por el método de Bradford modificado como se describe en Materiales y Métodos. **B:** se analizaron en SDS-PAGE 12.5 % alícuotas de las fracciones unida (+) y no unida (-).

Se observa en la figura III.18 B que algunas proteínas parecieron mostrar mayor afinidad por quitina que otras. Tratándose de proteínas de bajo peso molecular que, como se vió se mantienen solubles en ausencia de SDS, no puede atribuirse el retardo observado a fenómenos de insolubilización o precipitación dentro de la columna. La fracción proteica no unida volvió a cromatografiarse en las mismas condiciones y no se observó unión a quitina. Esto descarta que los sitios activos de la columna se encontraran saturados con las proteínas sembradas y sugiere, en cambio, que esta fracción proteica es realmente incapaz de unirse a quitina.

6.2.2 Proteínas cuticulares larvales.

Se ensayó también la afinidad por quitina de las LCP. En este caso, se las extrajo en condiciones no desnaturalizantes. Como se vió anteriormente, las LCP son parcialmente liberadas de la cutícula por tratamiento con soluciones salinas y la composición proteica de los extractos obtenidos de esta manera no difiere de los obtenidos en presencia de SDS.

Se observa en la figura III.19 A que, a diferencia de lo que ocurre en los extractos de PCP, toda la proteína fue retenida en la columna de afinidad y fue eluída con el buffer alcalino. A excepción de PS-44, todas las proteínas presentes en el extracto sembrado (ver figura III.19 B, carril 1) aparecieron en la fracción eluída (ver figura III.19 B, carril 2). A juzgar por la tinción de CBBG, la abundancia relativa de las distintas proteínas fue muy similar en los dos carriles, lo cual indicaría que todas mostraron similar afinidad por quitina.

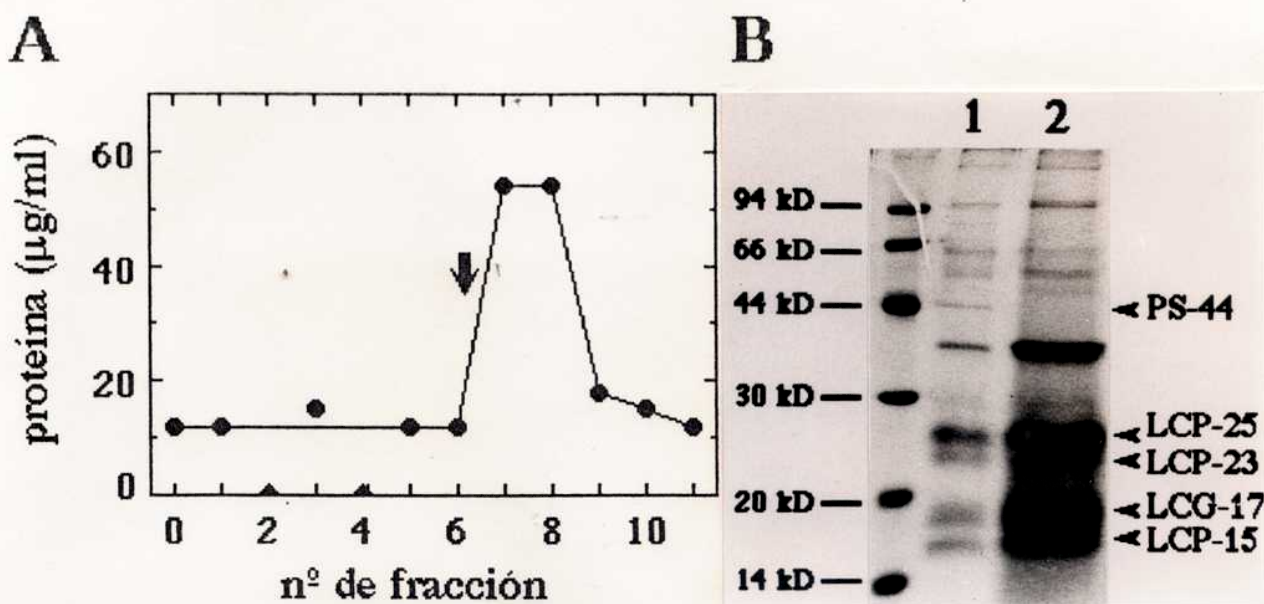


Figura III.19: Se aislaron en forma masiva cutículas de larvas inmóviles. Se extrajeron en NaCl 0.5M como se describe anteriormente. Se dializó contra Tris 5mM pH 7.5 y se pasó por una columna de quitina, como se describe en Materiales y Métodos. Se eluyó primero con buffer Tris pH 7.5, luego (flecha) con buffer Tris pH 9 y luego con TRIS pH 8.5, urea 7M. **A:** Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford, usando como blanco los buffers correspondientes. **B:** SDS-PAGE 12.5 %: 1: extracto de LsCP; 2: se precipitaron con TCA 10% las fracciones 7 y 8 eluidas de la columna.

7. Constancia del perfil electroforético en moscas de distinto origen.

7.1 PCP y ACP en Cepas salvajes.

Se analizaron preparaciones masivas de proteínas cuticulares de cepas salvajes distintas de *Ceratitis capitata* (ver tabla III.3) para detectar posibles diferencias en la composición proteica entre poblaciones.

CULTIVO	LINEA o CEPA	PROCEDENCIA	CONDICIONES DE CULTIVO
I	Cepa salvaje	Fitopatología INTA	A
II	Cepa salvaje	Fitopatología INTA	A
III	INTA ARG-17	Genética INTA	B
IV	INTA ARG-17	Genética INTA	B
V	<i>niger</i>	Genética INTA	B
VI	<i>Black pupa</i>	Genética INTA	B

Tabla III.3: La cepa INTA ARG-17 es cepa salvaje, las cepas *niger* y *Black pupa* son mutantes de coloración de pupario (ver Materiales y Métodos). A y B se refieren a distintas condiciones de cultivo: humedad y composición del medio.

Como se ve en la figura III.20, los patrones electroforéticos de proteínas pupales y de adulto farado resultaron los mismos para los distintos cultivos analizados.



Figura III.20: Se prepararon masivamente proteínas cuticulares de pupas (P) y adultos farados (Af) de los cultivos indicados en la Tabla III.3.

7.2 Análisis de PCP en mutantes de color de cutícula.

La figura III.21 muestra las PCP de cutículas individuales de 24 individuos de dos cepas salvajes distintas, 12 individuos *Black pupa* y 12 individuos *niger* (ver tabla III.3). En todos los casos los insectos fueron escogidos al azar en poblaciones de 200-500 individuos.

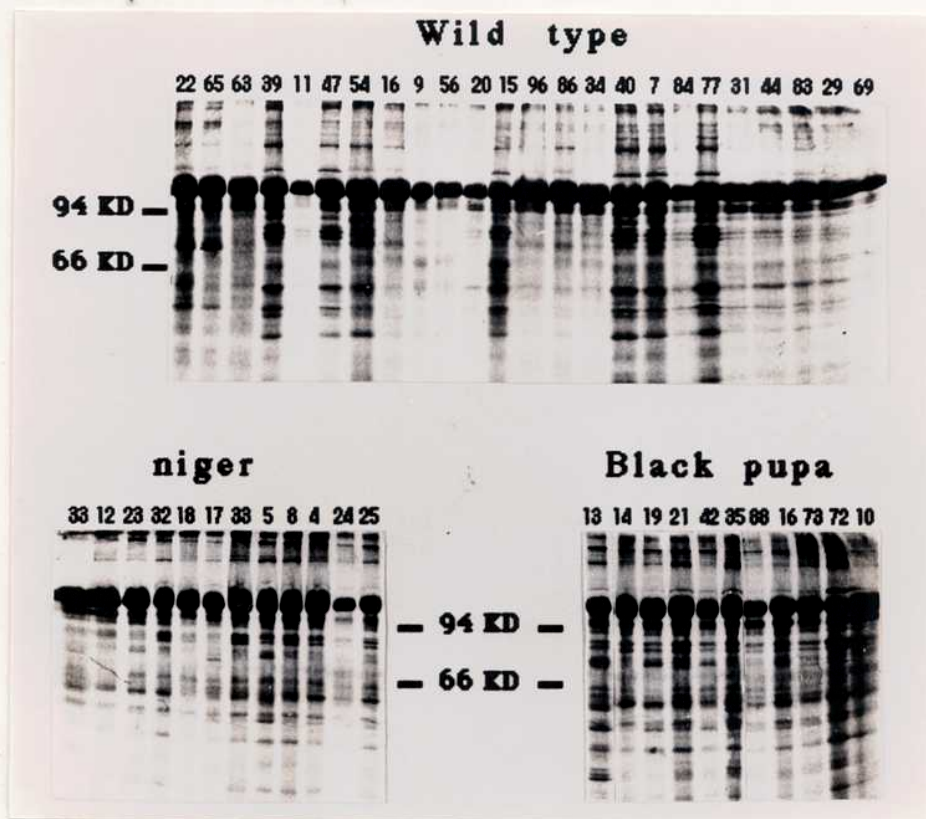


Figura III.21: Cutículas individuales de pupas cepa salvaje (wt), *Black pupa* (B) y *niger* (n) de 3 ó 4 días de edad fueron extraídas y las proteínas analizadas en SDS-PAGE 12.5 %.

Se observa en la figura III.21 que PCG-100 fue el principal polipéptido en todos los individuos analizados y que sólo se detectaron ligeras diferencias en la movilidad de algunas bandas minoritarias. Tampoco se encontraron diferencias significativas en los perfiles electroforéticos de LCP (ver capítulo VIII) de las distintas cepas salvajes y mutantes analizadas.

8. Análisis de proteínas cuticulares en otros insectos.

A los efectos de extender y comprobar nuestra metodología en otras especies, se realizaron ocasionalmente análisis de sus cutículas. En la figura III.23 (página 83) se muestra el perfil electroforético de PCP y LCP de *Drosophila melanogaster*. También se analizaron las proteínas cuticulares de adultos de distintas especies de *Trichogramma*. No se detectaron diferencias en el perfil electroforético de las distintas especies estudiadas (no mostrado).

La familia *Trichogrammatidae* incluye especies de gran importancia económica en programas de control biológico. Esta familia presenta caracteres morfológicos muy homogéneos, por lo que la identificación de las especies por métodos convencionales resulta complicada y no siempre exacta cuando no es realizada por especialistas.

Como se mencionó arriba, los perfiles electroforéticos de proteínas cuticulares de adulto no permitieron distinguir entre distintas especies. Se logró establecer un criterio de identificación analizando la fracción de proteínas totales solubles en soluciones salinas (ver figura III.22 y tabla III.4). Las especies utilizadas fueron identificadas mediante taxonomía clásica por el Dr. de Santis, a quien se agradece, como *T. fuentesi* (1; 2), *T. pinto* (3; 4) y *T. sp* (5; 6).

Para asegurar la validez de estos resultados, sería necesario analizar cepas de distintos orígenes y también ampliar el estudio a otras especies de *Trichogrammatidae*.

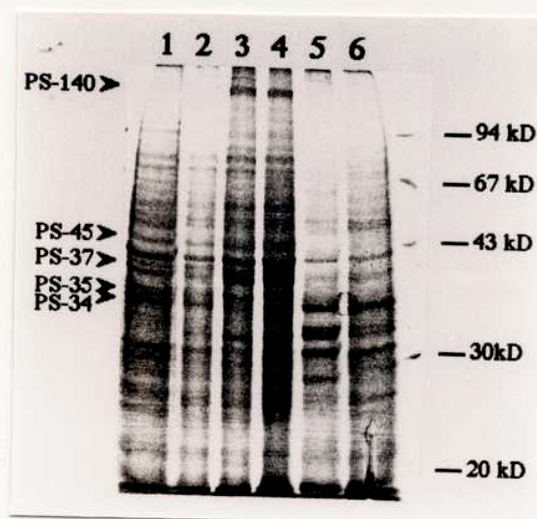


Figura III.22 Se analizaron los extractos de proteínas solubles en NaCl 0.5 M de distintas especies de *Trichogramma*. (ver texto).

Proteína:	PS-140	PS-45	PS-37	PS-35	PS-34
<i>T. fuentesi</i> (1; 2)	+	+	+	+	+
<i>T. pintoi</i> (3; 4)	+	+	+	+	-
<i>T. sp.</i> (5; 6)	-	-	-	-	+

Tabla III.4: Proteínas marcadoras en distintas especies de *Trichogrammatidae*. Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de las proteínas marcadoras en los perfiles electroforéticos de proteínas solubles (ver figura III.22).

Discusión.

1. El ciclo de vida de *Ceratitis capitata* .

Durante el desarrollo de esta tesis se realizó, conjuntamente con otros miembros del laboratorio, un estudio detallado de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren durante el ciclo de vida de *Ceratitis capitata* (Rabossi et al., 1991). Se estableció, además, la correlación temporal entre estos eventos.

De este modo, se hizo posible determinar con precisión la edad fisiológica a partir de observaciones morfológicas y mediciones bioquímicas, lo cual se requiere no sólo en el trabajo experimental del laboratorio, sino que también es de gran utilidad en programas de control biológico en los que se utilizan cultivos de *Ceratitis* en gran escala.

Al analizar la dependencia del ciclo de vida de la temperatura hemos encontrado que la duración del estadio pre-pupal resultó poco sensible: este período dura aproximadamente 40 horas a 23 °C y 48 horas a 21 °C (ver figura III.2). El estadio pupal fue aparentemente el más afectado por los cambios de temperatura. Este se extiende hasta el quinto día a 23 °C, pero a 21 °C duró hasta el décimo día. La velocidad de desarrollo del adulto farado no pareció muy afectada al descender la temperatura de 23 °C a 21 °C (ver figura III.2). Como se mencionó, la etapa pupal tardía comprendida entre el tercer y quinto día se alargó notablemente. En este período no se produjeron importantes cambios morfológicos (ver figura III.9; Rabossi et al., manuscrito en prep.). Tampoco existieron cambios notables en la actividad bioquímica relacionada con componentes cuticulares. Hacia el tercer día, se han depositado casi totalmente las proteínas cuticulares pupales (ver figura III.5) y el pupario está ya completamente esclerotizado y tanificado. Es decir que el descenso en la temperatura parece provocar un arresto en un estado metabólico de escasa actividad morfogenética y bioquímica (ver "meseta" 3-10 días en la figura III.2).

Una vez iniciada la cascada de cambios morfológicos (10 días a 21 °C, ver figura III.2) que culminan en la emergencia del imago (17 días a 21°C, ver figura III.2), los eventos que la componen parecen ocurrir en forma más o menos independiente de la temperatura (10-17 días en la figura III.2). Podría decirse que el período pupal actuaría como regulador de la duración de la metamorfosis, retrasando la emergencia del adulto cuando la temperatura ambiente es baja, lo cual sería, sin duda, una adaptación ecológica importante.

2. Proteínas cuticulares durante el desarrollo.

Al inicio de los estudios aquí presentados, eran relativamente pocos los trabajos referentes a síntesis y deposición de proteínas cuticulares durante el desarrollo. Durante el transcurso de los últimos años éstos han ido incrementando en número de modo tal que se tiene actualmente un panorama más amplio. En la tabla III.5 se comparan los resultados encontrados por nosotros en *Ceratitis capitata* y los datos de bibliografía referentes a otras especies. Nuestros resultados, conjuntamente con lo descrito en *Drosophila melanogaster* (Fristrom et al., 1978; Chihara et al., 1982) y recientemente en *Dacus oleae* (Souliotis et al., 1988a) y *Lucilia cuprina* (Skelly y Howells, 1987; 1988) apoyan fuertemente la idea de que el programa que controla la construcción del exoesqueleto en las distintas mudas, sería similar en distintos dípteros, existiendo grupos de proteínas específicos de cada estadio (LCP, PCP y ACP para los estadios larva III, pupa y adulto, respectivamente).

El tercer estadio larval de *Ceratitis* mostró cinco proteínas mayoritarias. A semejanza de *Drosophila melanogaster* (Chihara et al., 1982; Silvert et al., 1984 y figura III.23), *Lucilia cuprina* (Skelly y Howells, 1987) y *Dacus oleae* (Souliotis et al., 1988) estas LCP son de bajo peso molecular (entre 15 y 28 kD) y aparentemente no están glicosiladas.

En *Ceratitis capitata* (esta tesis), *Drosophila melanogaster* (Silvert et al., 1984) y *Lucilia cuprina* (Skelly y Howells, 1987, 1988) las PCP resultaron de mayor peso molecular aparente que las de los estadios larvales. Al igual que en *Drosophila*, varias de las PCP de *Ceratitis* están glicosiladas, a juzgar por diferentes criterios (ver capítulo VII).

HOLOMETABOLOS:

ESPECIE:	EXTRACCION:	ANALISIS:	PROTEINAS CUTICULARES	REFERENCIA
----------	-------------	-----------	-----------------------	------------

Dipteros:

<i>Ceratitis capitata</i> (mosca de la fruta)	SDS 1%	geles desnaturalizantes sueros policlonales	L I = L II ≠ L III L III ≠ P ≠ A	esta tesis, Di Paola; Boccaccio y Quesada, (no publicado)
<i>Lucilia cuprina</i> (mosca de la oveja)	H ₂ O, SDS 2%, urea urea 7M	geles nativos geles nativos	L I = L II ≠ L III L III ≠ P ≠ A	Skelly y Howells, 1987 Skelly y Howells, 1988
<i>Drosophila melanogaster</i> (mosca del vinagre)	urea 7M SDS 1%, urea 7M	geles nativos y desnaturalizantes geles nativos, desnat. y bidimensionales.	L I = L II ≠ L III L III ≠ P ≠ A L III ≠ P.	Chihara et al., 1982 Silvert et al., 1978
<i>Sarcophaga bullata</i>	SDS 0.5%	geles desnaturalizantes	L III	Lipke et al., 1981 Willis et al., 1981
<i>Dacus oleae</i> (mosca del olivo)	urea 7M	geles nativos y desnaturalizantes	L I = L II ≠ L III L III ≠ P ≠ A	Souliotis et al., 1988

Tabla III.5: Comparación de lo estudiado en esta tesis en *Ceratitis capitata* con lo descripto hasta la fecha en otras especies de insectos.

Coleópteros:				
<i>Tenebrio molitor</i>	SDS 1%	geles desnaturalizantes	proteínas abdominales de L ♀ P ♀ A. Algunas proteínas en común. L III = L IV = L V	Roberts y Willis, 1980a
	H ₂ O	geles desnaturalizantes	proteínas abdominales de L ♀ P ♀ A.	Lemoine y Delachambre, 1986
	H ₂ O	anticuerpos monodireccionales	proteína específica de adulto	Lemoine et al., 1989
<i>Anthonomus grandis</i> (escarabajo del algodón)	SDS 2%, urea 7M o HCl guanidina 8M	geles desnaturalizantes	proteínas abdominales de L ♀ P ♀ A, relacionadas inmunológicamente. Algunas proteínas comunes.	Stiles y Leopold, 1990
Lepidópteros:				
<i>Antheraea polyphemus</i>	SDS 2%, Urea 8M, HCl guanidina 8M.	geles desnaturalizantes	P ♀ A	Sridahara, 1983
	SDS 2%	geles bidimensionales	alas P ♀ alas A	Sridahara, 1985
<i>Galleria mellonella</i>			L ♀ P ♀ A	Srivastava, 1970, 1971 (cit. en Skelly y Howells, 1988)

Tabla III.5: (continuación)

<i>Hyalophora cecropia</i>	HCl guanidina 8M	geles bidimensionales	L ♀ P, L ♂ A familias multigénicas distintas en cutículas blandas y rígidas de L y P.	Willis et al., 1981 Cox y Willis, 1987a
	HCl guanidina 8M	anticuerpos polidionales (Western blot)	L y P presentan proteínas en común	Cox, 1987
	HCl guanidina 8M	Geles bidimensionales y secuencia N-terminal	proteínas específicas de L, P o A	Willis, 1989
		síntesis in vitro	abdómen L ♀ abdómen P familia multigénica específica de estadio larval tardío	Klely y Riddiford, 1985 (cit. en Cox y Willis, 1987a) Horodyski y Riddiford, 1988
HEMIMETABOLOS				
ESPECIE: EXTRACCION: ANALISIS: PROTEINAS CUTICULARES: REFERENCIA:				
Ortópteros:				
<i>Locusta migratoria</i>	urea 4M, SDS 1% o acético 1M	geles bidimensionales	fémur ♀ tórax ♀ ala ♀ abdómen	Andersen et al., 1986

Tabla III.5: (continuación)

<i>Schistocerca gregaria</i>	urea 6 M	geles bidimensionales	adulto farado	Andersen, 1988
Hemípteros:				
<i>Triatoma infestans</i> (vinchuca)	SDS 1%	geles desnaturalizantes, anticuerpos policlonales (Westernblot)	Proteínas abdominales de N I = N II = N III = N IV = N V. PC-45 presente en todos los estadios ninfales.	Wappner y Quesada, com. per.

Tabla III.5: (continuación)

Las cutículas de los estadios pupal y adulto farado presentaron mayor complejidad en cuanto al número de bandas presentes en geles desnaturalizantes (ver figura III.7). Como se discute más adelante, el mayor número de proteínas reflejaría la mayor especialización de estas cutículas, en cuanto a que es mayor el número de estructuras presentes en estos estadios en comparación con los estadios larvales. Esto concuerda con el hecho de que en las cutículas pupal y adulta parecen existir proteínas específicas de estructura (alas, patas, etc.).

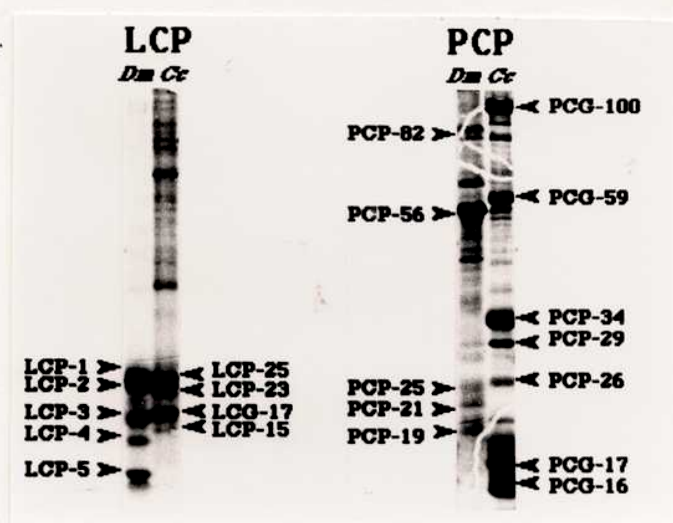


Figura III.23: Comparación de LCP y PCP de *Drosophila melanogaster* y *Ceratitidis capitata*. Cutículas larvales y pupales fueron obtenidas en masa y extraídas en SDS 1%. Las proteínas se separaron en SDS-PAGE 15 %. La identidad de las proteínas de *Drosophila* fue asignada en base a la movilidad relativa, adoptando la nomenclatura de Fristrom et al. (1978) y Silvert et al. (1984).

Como ya se mencionó, estos estudios y los realizados por otros autores en otros insectos (ver tabla III.5) indican que estadios distintos presentan proteínas cuticulares distintas. Esto quiere decir que los genes que codifican para estas proteínas se expresan específicamente en los estadios correspondientes. Este principio parece cumplirse siempre en insectos holometábolos (de metamorfosis completa), pero no es válido en insectos hemimetábolos (de metamorfosis incompleta). En este último caso, estadios distintos presentan a menudo proteínas en común (ver tabla III.5). En estos casos los mismos genes serían activados varias veces, en distintos momentos de la vida del animal. Los distintos estadios de muchos insectos hemimetábolos son fisiológicamente similares y en general se desarrollan en el mismo medio ambiente. Siendo el exoesqueleto la estructura que aísla y comunica al animal con el medio externo, parece lógico que las cutículas de estadios que ocupan nichos ecológicos similares presenten una composición proteica similar. Por el contrario, para estadios funcionalmente diferentes, que eventualmente se desarrollan en condiciones ambientales distintas, podría esperarse la existencia de proteínas cuticulares distintas.

Hemos encontrado que el patrón de proteínas de exoesqueleto de la larva III de *Ceratitis* es distinto al de los estadios larvales I y II (ver figura III.6). El mismo fenómeno ha sido descrito en *Drosophila melanogaster* (Chihara et al., 1982) y recientemente en *Lucilia cuprina* (Skelly y Howells, 1987). En general, en dípteros ciclorrafos, las larvas de los dos primeros estadios crecen y mudan dentro del medio alimenticio. El tercer estadio larval se desarrolla también en el mismo medio. La cutícula de este estadio se convertirá luego en pupario. Durante el proceso de pupariación, las proteínas cuticulares de larva III sufren fenómenos de esclerotización (ver Introducción y capítulo VII).

3. Proteínas cuticulares pupales durante la muda a adulto farado.

Hemos observado en *Ceratitis capitata* un cambio en la composición proteica de las cutículas correspondiente a la muda pupa-adulto farado. A la vez que "aparecen" las proteínas de adulto, "desaparecen" las proteínas pupales (ver figura III.5). Como se vió en la figura III.10, la cantidad de proteína cuticular pupal mayoritaria, PCG-100, disminuye entre el séptimo y el octavo día, y finalmente ésta "desaparece". Esta "desaparición" de las

PCP puede explicarse por degradación o a que tienen lugar fenómenos de esclerotización que convierten a estas proteínas en polímeros de alto peso molecular, no-extraíbles.

La idea generalmente aceptada (ver Introducción) es que durante la apólsis el fluido ecdisial, secretado por las células epiteliales, contiene enzimas encargadas de digerir los componentes de las capas más internas de la vieja cutícula. Los productos de la digestión son luego reabsorbidos por la epidermis y reutilizados. No está claro si esto ocurre en todas las mudas, en todos los insectos.

La esclerotización se produce en general en cutículas todavía en proceso de deposición (aunque en dípteros ciclorrafos la formación del pupario es producto de la esclerotización y tanificación de la ex-cutícula larval, la cual fue depositada anteriormente). En *Ceratitis capitata*, hemos observado que después de la muda a adulto y hasta la emergencia, la cutícula pupal, desprendida, es una película delgada, transparente y flexible, lo cual podría ser indicativo de que no se han producido fenómenos de entrecruzamiento del tipo O-esclerotización (ver Introducción).

Al contrario de lo observado en *Ceratitis*, en *Drosophila* las PCP son extraíbles hasta la emergencia del adulto (Chihara et al., 1982). Tampoco en *Lucilia* se produce un cambio neto en el perfil electroforético al producirse la muda (Skelly y Howells, 1988). Estas observaciones sugieren que el proceso que sufre la cutícula pupal durante la muda a adulto puede presentar variaciones de un díptero a otro.

4. Distribución de proteínas cuticulares en distintas partes del cuerpo.

Así como existen diferencias en la composición proteica de cutículas que pertenecen a estadios funcionalmente distintos, puede esperarse que existan diferencias de composición proteica en el exoesqueleto de distintas partes del cuerpo, sobre todo si se trata de estructuras especializadas. La forma adulta presenta gran cantidad de estructuras especializadas, existiendo regiones de la cutícula con diferentes grados de esclerotización.

El patrón de ACP es relativamente más complejo en cuanto al número de bandas presentes y, cuando se analizaron las proteínas cuticulares de distintas regiones, se encontró que existen ciertas proteínas específicas de ala, otras específicas de cabeza (no mostrado). Esto significaría que existirían genes que se expresan diferencialmente en los linajes celulares descendientes de los distintos discos imaginales.

Se observaron diferencias en la composición proteica de las distintas partes del cuerpo de la pupa (ver figura III.11). Parecen existir proteínas específicas de abdomen. Estas son de bajo peso molecular y aparentemente no están glicosiladas, similarmente a lo que ocurre en las LCP. En *Lucilia* (Skelly y Howells, 1988) y en *Drosophila* (Chihara et al., 1982) existen polipéptidos específicos de cabeza, tórax y abdomen. La cutícula abdominal pupal es secretada por dos tipos de células: las células descendientes de la ex-epidermis larval y los histoblastos. No sabemos si la síntesis de las proteínas abdominales "tipo larva" está limitada al linaje larval o si también se expresan en las células descendientes de los histoblastos. La presencia de PCG-100 en la cutícula abdominal puede deberse a la actividad secretoria de todo el epitelio o, por el contrario, solamente a la expresión específica en la descendencia de los histoblastos. Dado que esta proteína se expresa también en la epidermis del tórax y cabeza de la pupa, ambas constituídas únicamente por células de discos imaginales, la expresión específica de PCG-100 en el linaje histoblástico parece probable.

Aunque no ha sido estudiado exhaustivamente en dípteros, no puede descartarse que en los estadios larvales las proteínas cuticulares tengan una distribución espacial no uniforme, siendo -por ejemplo- distinta la composición en la zona ventral y dorsal o en la parte anterior y posterior de cada segmento. Recientemente se encontró que en *Lucilia* existen ciertas proteínas minoritarias específicas de estructuras ventrales (Skelly y Howells, 1987).

5. Extracción y solubilidad de proteínas cuticulares de *C. capitata*.

Dos son los factores que condicionan la liberación de proteínas de la cutícula: i) la unión covalente y no covalente con otros componentes cuticulares. ii) la solubilidad intrínseca de las proteínas cuticulares, es decir su comportamiento en solución una vez extraídas de la cutícula.

Varios autores han realizado estudios acerca de la solubilización de proteínas cuticulares. Hackman propone una correlación entre la concentración salina necesaria para extraer proteínas y la fuerza de la unión de éstas a otros componentes cuticulares (ver Introducción). En cambio, las propiedades de solubilidad *per se* no han sido estudiadas anteriormente.

5.1 Interacción con otros componentes cuticulares.

Las LCP de *Ceratitis capitata* resultaron extraídas con soluciones de moderada fuerza iónica, en ausencia de agentes desnaturalizantes (página 64). Esto sería indicativo de que existe una débil unión con otros componentes cuticulares. Las PCP mayoritarias, en cambio, requirieron la acción de agentes desnaturalizantes para ser liberadas de la cutícula (página 63), lo cual sugiere la existencia de algún tipo de unión medianamente fuerte, no covalente, de estas proteínas a la cutícula.

Como se señaló en la Introducción, se acepta que existen proteínas unidas covalentemente a la quitina. Al digerir la cutícula pupal con quitinasa no hemos observado la liberación de nuevas proteínas (ver 6.1). Esto no descarta totalmente la existencia de proteínas unidas covalentemente a quitina en la cutícula pupal de *Ceratitis*.

Algunas PCP parecieron presentar afinidad por quitina cuando se eliminó el SDS del medio. Se observó la existencia de una fracción proteica que no mostró afinidad por quitina (ver 6.2.1). La composición de esta fracción "refractaria" a la unión resultó muy similar a la de la fracción unida. La mayoría de las bandas aparecieron en ambos perfiles electroforéticos. Esto sugiere que se trataría de las mismas especies proteicas y que algunas moléculas habrían perdido su capacidad de unirse a quitina. Es importante recordar que se trabaja con proteínas que fueron desnaturalizadas y que, sin duda, la conformación de estas moléculas es un factor importante en la formación de estructuras supramoleculares. Debe recordarse que la procutícula es una estructura cuasi cristalina, en donde proteínas y quitina tienen una distribución espacial altamente ordenada (ver Introducción). Es posible que después de la eliminación del detergente y durante la incubación a temperatura ambiente, una población de moléculas se renaturalizen o adopten una conformación que les permita

unirse a quitina, en tanto que otras moléculas permanecen desnaturalizadas o con una conformación tal que no pueden asociarse a quitina.

Cuando se realizó el mismo ensayo con LCP solubilizadas en condiciones no desnaturalizantes, toda la proteína mostró afinidad por quitina (ver 6.2.2).

Todo esto sugiere que la conformación nativa de las proteínas cuticulares jugaría un papel importante en la interacción con la quitina y probablemente con otros componentes cuticulares. No puede descartarse que las proteínas que no muestran afinidad por quitina *in vitro*, estén fuertemente asociadas en la matriz de la cutícula *in vivo*.

El ensayo de unión a quitina en columnas, en ausencia de agentes desnaturalizantes, ha sido utilizado como criterio de afinidad por otros autores (Hackman, 1976; Fristrom et al., 1978; Silvert et al., 1984). En el caso de *Drosophila melanogaster*, se han encontrado resultados similares a los aquí descritos. Silvert et al. encuentran que las LCP y PCP de bajo peso molecular presentan fuerte afinidad por quitina *in vitro*. En cambio las PCP de alto peso molecular (PCP-82, PCP-56) están presentes tanto en la fracción unida como no unida. En esos estudios estos autores "renaturalizan" las proteínas cuticulares solubilizadas en 7M urea eliminando ésta por diálisis antes de someterlas al ensayo de unión a quitina. Sin embargo, como se discutió anteriormente, no puede asegurarse que la conformación alcanzada después del tratamiento sea la nativa. Tampoco puede descartarse que ocurran fenómenos de insolubilización durante el desarrollo de la cromatografía. En este sentido, es de destacar que en los estudios de Silvert et al., no toda la proteína es eluída con buffer alcalino, sino que es necesario el agregado de urea en el buffer de elución para recuperar el total de la proteína sembrada.

Sin duda, los resultados obtenidos por cromatografía en columnas de quitina son indicativos de la afinidad que las proteínas cuticulares muestran *in vivo*, pero deben interpretarse cuidadosamente.

5.2 Propiedades de solubilidad.

En lo que respecta a la solubilidad intrínseca de las proteínas cuticulares, hasta donde sabemos no han sido realizados muchos estudios. En cambio, se han realizado numerosos trabajos en donde el agente desnaturizante es diluído o eliminado del medio durante el desarrollo de ciertos ensayos, sin que se haya comprobado la solubilidad de las proteínas cuticulares en esas condiciones. Ejemplo de ésto son la electroforesis en geles no desnaturizantes de proteínas previamente extraídas en 7M urea. Se analizaron de éste modo las proteínas de pupa y adulto de *Lucilia cuprina* (Skelly y Howells, 1988), las proteínas larvales, pupales y de adulto de *Dacus oleae* (Souliotis et al., 1988a). En estos casos se observó siempre la presencia de material que no penetra en el gel compactador. Lo mismo ocurre con las PCP y ACP de *Drosophila melanogaster* (Chihara et al., 1982). También se ha ensayado la afinidad por quitina de LCP y PCP "renaturalizadas", es decir después de haber eliminado el agente desnaturizante (Fristrom et al., 1978; Silvert et al., 1984). Ninguno de estos autores confirmó que las proteínas sigan siendo solubles en ausencia de urea y asumen que ésta sólo es necesaria para extraerlas de la cutícula.

En *Ceratitis capitata*, a lo largo de los estudios realizados, se hizo obvio que el SDS puede ser eliminado del medio, sin que se produzcan pérdidas de proteína por insolubilización. Después de un tiempo, a temperaturas mayores de 0 °C, algunas proteínas tienden a ser insolubles. La PCG-100, que es la proteína cuticular pupal mayoritaria, es la que mostró mayor insolubilidad en ausencia de agentes desnaturizantes. Aparentemente, PCG-100 precipita en agregados homomoleculares (ver figura III.17, 25 °C). Como ya se indicó, se trabaja con proteínas desnaturizadas, por lo tanto no puede descartarse que existan en la cutícula *in vivo* interacciones con otras proteínas u otros componentes cuticulares.

6. Variabilidad en las proteínas cuticulares.

No hemos observado diferencias en las PCP o ACP de distintas líneas salvajes y mutantes de *Ceratitis capitata* (ver 7). Tampoco hemos detectado diferencias entre las LCP de larvas cepa salvaje, *white pupa*, *Black pupa* y *niger* (ver capítulo VIII). Un estudio más exhaustivo requeriría analizar mayor número de cepas salvajes. En *Lucilia cuprina*, el análisis por SDS-PAGE no reveló diferencias entre las LCP de cinco líneas distintas (Skelly y Howells, 1987).

Se ha propuesto anteriormente (Hackman, 1976) que el número de bandas observados en los perfiles electroforéticos de preparaciones masivas de proteínas cuticulares en distintas especies se debe a la existencia de múltiples alelos. Al analizar cutículas individuales, no hemos detectado diferencias entre las PCP de distintas cepas salvajes y de dos líneas mutantes, *Black pupa* y *niger*, de *Ceratitis capitata*. En todos los casos PCG-100 fue la banda mayoritaria (ver figura III.21). Aparentemente, la fracción proteica de la cutícula estaría compuesta por un conjunto heterogéneo de polipéptidos, los cuales se hallan en distintas cantidades. Como se discutió anteriormente, existiría una distribución no uniforme de las distintas proteínas en el cuerpo del animal.

También ha sido comprobada la constancia de los perfiles electroforéticos de proteínas extraídas de cutículas individuales en *Tenebrio* (Roberts y Willis, 1980a) y *Drosophila* (Fristrom et al., 1978). Esto indicaría que existen escasas variantes genéticas de proteínas cuticulares dentro de una determinada población.

En *Trichogramma*, no hemos observado diferencias entre las proteínas cuticulares de adultos de diferentes especies (ver 8). Tampoco se detectaron diferencias entre las LCP de dos especies muy cercanas de *Drosophila* (*D. melanogaster* y *D. virilis*) (Fristrom et al., 1978).

Todo esto indicaría que las proteínas cuticulares se hallan bastante conservadas entre individuos de una misma población y también entre distintas poblaciones.

IV. Estudios inmunológicos de proteínas cuticulares de *Ceratitis capitata*.

En esta sección se describen los estudios realizados mediante el uso de anticuerpos policlonales obtenidos en conejos contra ciertas proteínas cuticulares de *Ceratitis capitata*.

El empleo de anticuerpos constituyó una poderosa herramienta en el estudio de la biosíntesis de proteínas de exoesqueleto y permitió confirmar el origen integumental de estas proteínas, conocer su expresión durante el desarrollo y determinar la existencia de relaciones inmunológicas intra- e inter-especie.

Resultados.

1. Preparación de antisueros contra proteínas cuticulares.

Se decidió la preparación de antisueros policlonales para el estudio de proteínas cuticulares durante la metamorfosis. Se inmunizaron conejos con proteínas representativas de distintos estadios o que presentaron alguna propiedad que las hacía de interés particular (ver tabla IV.1).

Las proteínas fueron purificadas por SDS-PAGE preparativas y aplicadas a los conejos en varias dosis (ver Materiales y Métodos). El título y especificidad de los sueros fueron estudiados por "dot blot" y "Western blot", revelando con proteína A-[¹²⁵I] como se indica en Materiales y Métodos.

Proteína	Características
LCPs	Proteínas cuticulares de Larva III
PS-44	Aparece en la cutícula larval poco antes de la pupariación.*
PCG-100	Es la proteína cuticular pupal mayoritaria. Está glicosilada.
PCP-29§	Es una de las PCP más abundantes de bajo peso molecular.
PCG-16§	Es glicoproteína cuticular pupal específica de abdomen (ver página.62)
PMP-26†	Proteína Mayoritaria de Pupario. Aparece en el pupario hacia las 46 hs.

Tabla IV.1: Proteínas seleccionadas para la preparación de anticuerpos.

* Se verá en esta sección que PS-44 no sería de origen cuticular.

§ En colaboración con G. di Paola.

† PMP-26 y otras proteínas de pupario se estudian más adelante (ver VIII).

En colaboración con P. Wappner.

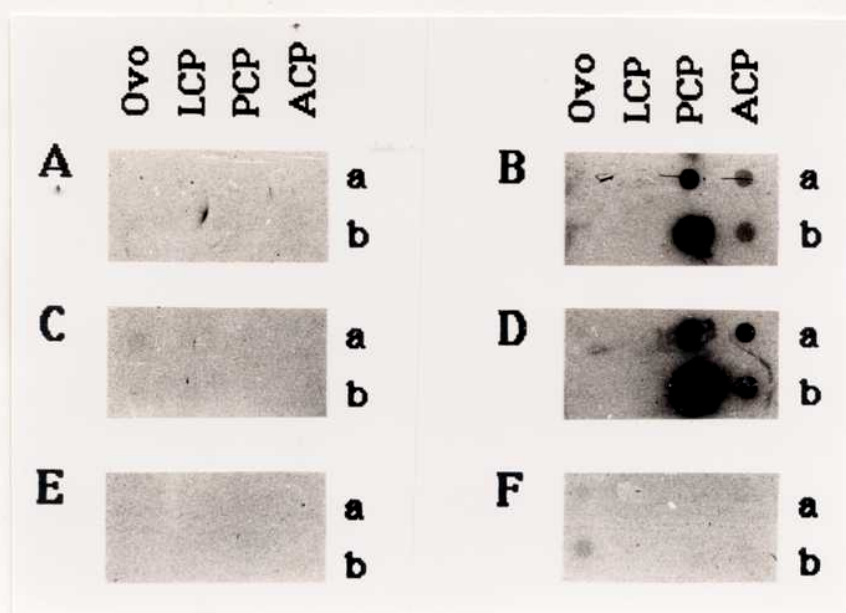


Figura IV.1: "Dot blot" de sueros contra proteínas cuticulares de *Ceratitidis capitata*. A, C y E, sueros preinmunes. B y D, dos sueros anti-PCG-100; F, suero anti-LCP. Cada columna contiene (a) 2 y (b) 10 μ g de proteína, excepto para la ovoalbúmina (Ovo), que contiene 4 y 40 μ g. Todos los sueros fueron diluidos 1/200.

Los sueros de los conejos inyectados con la proteína cuticular pupal mayoritaria PCG-100 dieron reacción positiva con PCP, pero no con LCP y ovoalbúmina (ver figura IV.1). La débil señal detectada con ACP pudo deberse a la existencia de antígenos comunes entre las proteínas de adulto o la eventual presencia de pupas entre los adultos farados utilizados para la preparación de ACP. Se verá más adelante que no existe reacción cruzada entre la PCG-100 y las ACP, de modo que la contaminación con animales de otro estadio parece ser la causa de la señal detectada.

Como se observa en la figura IV.1, la respuesta inmunológica producida por las LCP fue muy baja. Inclusive después de cuatro aplicaciones de antígeno, la señal obtenida fue prácticamente indistinguible de la del suero pre-inmune del mismo conejo.

Los sueros preparados contra la proteína cuticular pupal de bajo peso molecular, PCP-29, fueron de título relativamente bajo y dieron reacción cruzada con otras PCP de alto y bajo peso molecular. También reconocieron proteínas de abdomen de adulto (no mostrado). Los animales inyectados con la glicoproteína específica de abdomen PCG-16 o con la PMP-26 no dieron sueros de título adecuado.

El suero preparado contra PS-44 fue confrontado a preparaciones masivas de proteínas cuticulares de larva III y de larva en el momento del salto. Se observa en la figura IV.2 que este suero reconoció algún antígeno entre las LsCP pero no entre las LCP.

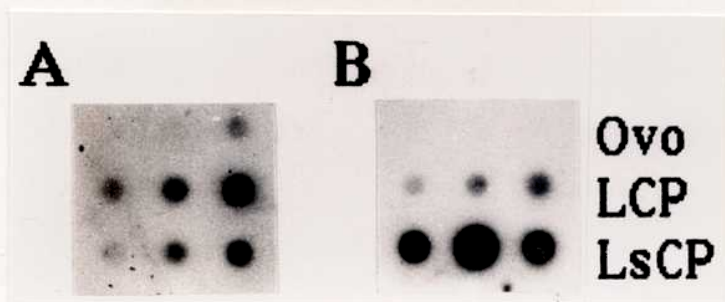


Figura IV.2: "Dot blot" de ovoalbúmina, LCP y LsCP. A: suero preinmune; B: suero anti-PS-44. Cada fila contiene 2, 10 y 100 µg de proteína. La dilución de los sueros fue 1/100.

2. Análisis inmunológico de PS-44.

La PS-44 resultó una proteína de interés particular dada su presunta aparición en la cutícula al finalizar el tercer estadio larval. Como se discute más adelante, el agregado de esta proteína a la cutícula larval podría estar relacionado con los cambios que ocurren en la misma justo antes de iniciarse la pupariación.

Como se ve a continuación, los estudios inmunológicos realizados, tendientes a aclarar la naturaleza de esta proteína, mostraron que se trataría de una proteína de origen no-cuticular.

2.1 Presencia de PS-44 en distintos estadios.

Se estudió la presencia de esta proteína entre las proteínas cuticulares de los distintos estadios de *Ceratitis capitata* por análisis de "Western blot". De acuerdo a lo observado anteriormente (ver página 58) PS-44 fue detectada en las preparaciones masivas de proteínas cuticulares de "larva de salto" y "pupario blanco", pero no en PCP o ACP (ver figura IV.3).

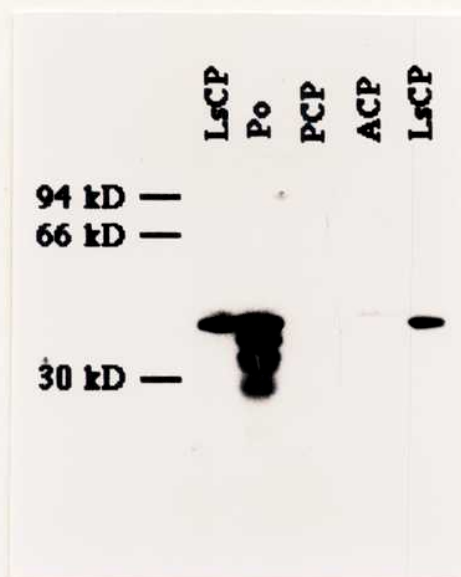


Figura IV.3: "Western blot" de proteínas cuticulares de larva de salto (LsCP), pupario blanco (Po), pupa (PCP) y adulto farado (ACP).

También se analizó la presencia de PS-44 en los estadios larvales I y II. Para esto, se realizó el mismo tipo de análisis con proteínas totales de dichos estadios. Se observa en la figura IV.4 que se detectó PS-44 en larva I y II y también entre las proteínas totales de pupas y adultos farados de distintas edades.



Figura IV.4: "Western blot" de proteínas totales de larvas de segundo y tercer estadio (LII y LIII); larva de salto (Ls); pupas y adulto farados de 1, 4, 6, 8 y 9 días desde la pupariación (P1-9); abdomen (Ab), alas (Al) y cabeza (C) de adulto emergido. LsCP: proteínas cuticulares de larva "saltarina"; M: marcadores de peso molecular.

2.2 Localización tisular de PS-44.

Dado que no se detectó PS-44 en las preparaciones de proteínas cuticulares de pupas o adultos, la respuesta positiva obtenida en el "Western blot" de proteínas totales podría deberse a la presencia de PS-44 en algún tejido distinto al tegumental. Por lo tanto, se analizaron las proteínas totales de distintos órganos, obtenidos por disección de larvas de tercer estadio (ver figura IV.5 A). También se analizaron muestras de hemolinfa y hemocitos (ver figura IV.5 B). Se obtuvo respuesta en todos los órganos analizados: cuerpo graso, glándulas salivales, discos imaginales y cardia (ver figura IV.5 A). No se detectó PS-44 entre las proteínas de hemolinfa o hemocitos (ver figura IV.5 B).

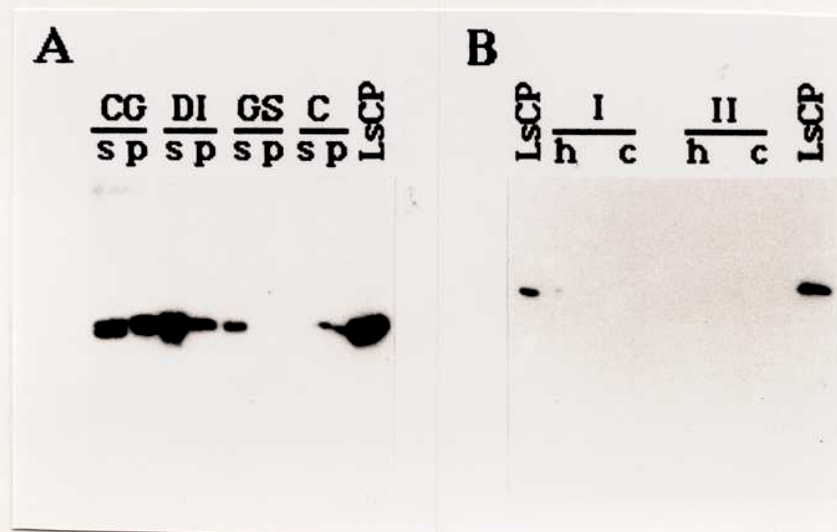


Figura IV.5: "Western blot" de distintos órganos y tejidos de *Ceratitidis capitata*. A: cuerpo graso (CG), discos imaginales (DI), glándulas salivales (GS) y cardia (C) fueron disecados como se describe en Materiales y Métodos y homogeneizados en solución de Ringer. Después de centrifugar 5' a 15000 rpm se separó el sobrenadante (s). Los precipitados (p) fueron solubilizados en buffer muestra. Las proteínas fueron separadas en mini-PAGE-SDS 12.5%. B: se obtuvo hemolinfa de larvas de salto de acuerdo a los métodos descritos en Materiales y Métodos: por centrifugación a través de lana de vidrio (I) o recogiendo la hemolinfa en Parafilm™ (II). Se centrifugaron las muestras 5' a 200 x g y se separó la hemolinfa sobrenadante (h) de las células (c). Las proteínas fueron separadas en mini-PAGE-SDS 15 %.

De estos experimentos se deduce que PS-44 no sería cuticular, pese a que se la detectó siempre en las preparaciones masivas de LsCP y PoCP (ver figuras III.8, página 58, y IV.3). Su presencia en las preparaciones de proteínas cuticulares podría deberse a contaminación con material no-cuticular proveniente o bien de restos de células epiteliales, las cuales se hallan en contacto directo con el exoesqueleto, o bien de otros tejidos (apodemas musculares, cuerpo graso, etc.).

2.3 Relación inmunológica con otras especies.

Se analizó la existencia de polipéptidos inmunológicamente relacionados con la PS-44 en otras especies. La figura IV.6 muestra un "Western blot" de proteínas totales de distintos órganos de distintas especies: *E. coli* ; *Acanthamoeba castellanii* ; *Trypanosoma cruzi* ; cerebro e tegumento de *Bombyx mori* (gusano de seda); cerebro y hepatopáncreas de *Chasmagnatus granulata* (cangrejo de estuario); tercer estadio larval de *Drosophila melanogaster* ; adultos de *Trichogramma pinto* y *T. fuentesi* (avispa parásita); cerebro e hígado de rata y tercer estadio larval de *Ceratitis capitata*. Se vé claramente que el suero anti-PS-44 de *Ceratitis* reconoció proteínas de movilidad similar a PS-44 en todos los insectos ensayados y también en cangrejo. No se detectó respuesta en ameba, rata o *E. coli*.

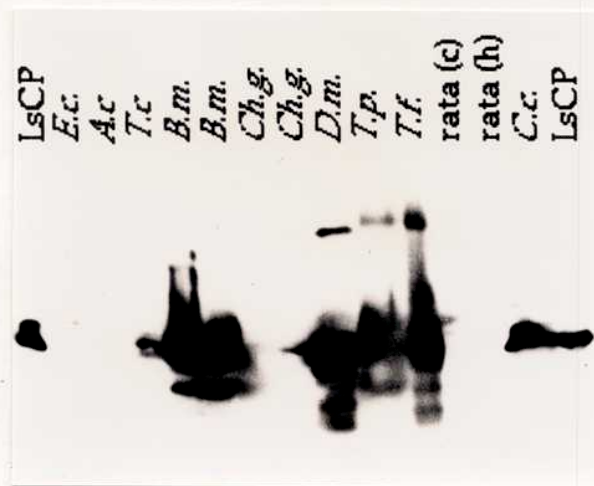


Figura IV.6: "Western blot" de proteínas totales de *E. coli* (*E.c*); *Acanthamoeba castellanii* (*A.c*); *Trypanosoma cruzi* (*T.c*); cerebro y tegumento de *Bombyx mori* (*B.m* (c) y *B.m* (i)); cerebro y hepatopáncreas de *Chasmagnatus granulata* (*Ch.g* (c) y *Ch.g* (h)); tercer estadio larval de *D. melanogaster* (*D.m*); *T. pinto* (*T.p*) y *T. fuentesi* (*T.f*); cerebro (c) e hígado (h) de rata y tercer estadio larval de *Ceratitis capitata* (*C.c*). LsCP: proteínas cuticulares de larva de salto.

Todo ésto indica claramente que se trataría de una proteína bastante conservada en distintas especies de artrópodos, que parece expresarse constitutivamente en distintos órganos. Ciertas propiedades de la proteína celular actina son similares a las de PS-44. Primero, su peso molecular es de aproximadamente 42-45 kD (Lazarides y Weber, 1974; Garrels y Gibson, 1976; Storti et al., 1976). Segundo, se halla muy conservada desde hongos y protozoos hasta mamíferos (Firtel, 1981; Pollard y Cooper, 1986). Tercero, se expresa en todo tipo celular, en forma abundante. En algunas células puede llegar a ser 15-20% de las proteínas totales (Korn, 1982). Cuarto, su localización subcelular -formando parte del citoesqueleto- le confiere propiedades de solubilidad similares a las de PS-44. En algunos casos es parcialmente solubilizada en 0.6 M NaCl (Lazarides y Weber, 1974). Frecuentemente se encuentran filamentos de actina en preparaciones de membrana plasmática, asociados a la cara citosólica (Pollard y Cooper, 1986).

Por lo tanto, parecía posible que la PS-44 fuera actina. Aunque no se la detectó entre las proteínas de cerebro o hígado de rata, podría ser que la cantidad presente en estos extractos no fuera suficiente para dar una respuesta detectable, por lo que se estudió la reacción del suero anti-PS-44 con actina bovina comercial, la cual presentó en geles desnaturalizantes un peso molecular aparente mayor que el de PS-44 (ver figura IV.6 A). Se ve claramente en la figura IV.6 B que no se obtuvo respuesta positiva, de lo cual se concluye que PS-44 no es ni estaría relacionada con la actina de mamífero y -por lo tanto- probablemente tampoco con la de *Ceratitis capitata*. Dado que no se trataría de una proteína cuticular y a que su expresión parece constitutiva, no se avanzó más en el estudio de esta proteína. Se hace una discusión más extensa al final de esta sección (páginas 105-107).

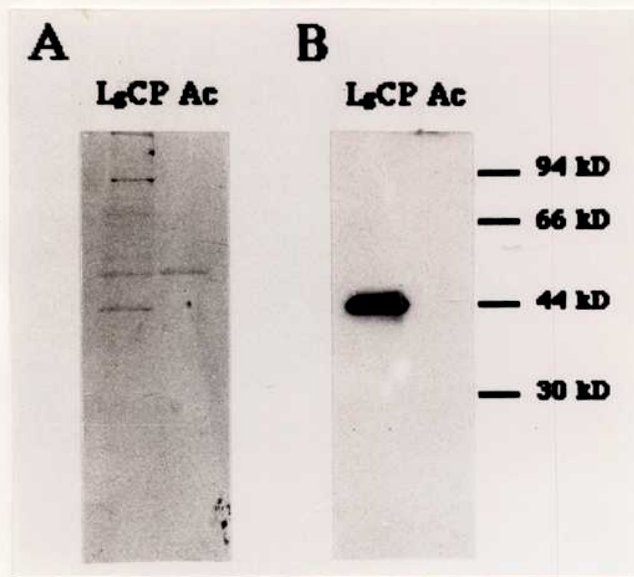


Figura IV.6: Se separaron en SDS-PAGE 10% proteínas cuticulares de larva de salto (LsCP) y actina bovina (5 μ g) (Ac), y se transfirieron a nitrocelulosa. A: tinción con tinta china. B: "Western blot" con suero anti-PS-44.

3. Estudios inmunológicos de la PCP mayoritaria.

Se obtuvieron dos sueros policlonales de buen título contra la proteína cuticular mayoritaria PCG-100, purificada por electroforesis en geles preparativos. Ambos mostraron el mismo patrón de bandas cuando fueron utilizados en el revelado de "Western blot" de proteínas cuticulares pupales de *Ceratitis*. Uno de estos sueros fue utilizado en la mayoría de los experimentos descriptos a lo largo de esta tesis.

3.1 Proteínas reconocidas con antisueros anti-PCG-100.

Se analizaron por "Western blot" seguido de inmunodetección (ver Materiales y Métodos) preparaciones masivas de PCP de *Ceratitis capitata*. Se observó que los sueros anti-PCG-100 reconocieron una banda mayoritaria, que coincidió en movilidad con la PCG-100, y otras de menor peso molecular aparente. La intensidad relativa de estas bandas minoritarias resultó variable en las distintas preparaciones de PCP analizadas. Para determinar si se trataba de productos de degradación o de proteínas cuticulares inmunológicamente relacionadas con PCG-100, se trataron pupas de la siguiente manera:

1. disección de la cutícula *in vivo* en solución de Ringer conteniendo PMSF, BHT y PTU y extracción inmediata de PCP.
2. incubación a 37 °C durante 16 horas y posterior disección.
3. incubación a 37 °C durante 16 horas de la pupa sin el pupario, sumergida en Ringer conteniendo BHT y PTU, pero no inhibidor de proteasas, seguida de disección.

Se observa en la figura IV.7 que después de la incubación a 37 °C, la intensidad de la banda correspondiente a PCG-100 disminuyó, en tanto que aumentaron en número e intensidad las bandas de menor peso molecular.

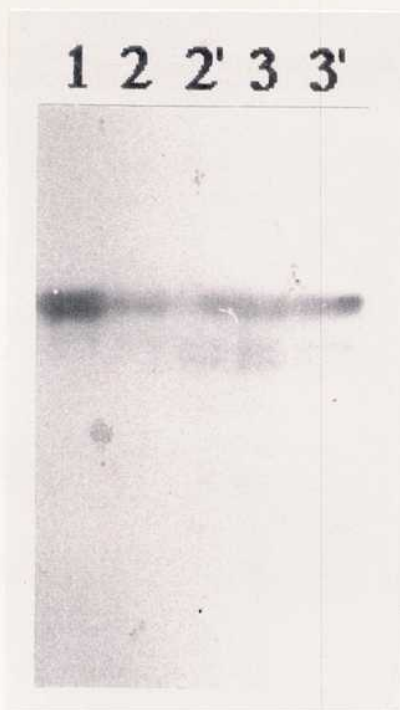


Figura IV.7: "Western blot" de proteínas cuticulares de pupas de 5 días que fueron sometidas a los tratamientos 1, 2 y 3 indicados en el texto. Los dos últimos fueron realizados en duplicado.

Esto significa que el suero anti-PCG-100 reconoció específicamente a esta proteína entre todas las PCP y que las bandas minoritarias detectadas en algunos casos serían productos de degradación, la cual aparentemente logró evitarse en presencia del inhibidor de proteasas PMSF. El carril 1 de figura IV.7 muestran que en estas condiciones, sólo la PCG-100 es reconocida por el antisuero (ver también figura IV.11).

3.2 Especificidad de estadio y tejido de la PCG-100.

Se estudió la presencia de PCG-100 en distintos estadios de *Ceratitis capitata*: embrión, larva III, pupa y adulto farado. Se prepararon extractos de proteínas totales como se indica en Materiales y Métodos y se analizaron por "Western blot" revelado con el antisuero. Como se ve en la figura IV.8, sólo en el carril de pupa se observó la banda correspondiente a PCG-100.

Figura IV.8: Especificidad de estadio de PCG-100. Cantidades equivalentes de proteínas totales de diferentes estadios fueron separadas en SDS-PAGE 12.5%, transferidas a nitrocelulosa y reveladas con suero anti-PCG-100, como se describe en Materiales y Métodos.

Con el mismo tipo de análisis se estudió la presencia de PCG-100 en distintos tejidos: tegumento, hemolinfa y órganos internos. La histólisis que se produce al iniciarse la metamorfosis hace difícil la disección de órganos intactos, por lo que se analizaron juntos todos los tejidos remanentes después de separar la cutícula. Este análisis fue realizado entre las 40 y 72 horas de edad, período en el que la PCG-100 se acumula en la cutícula pupal en formación (ver III, página y figura IV.9).

Se observa en la figura IV.9 que PCG-100 fue detectada en la cutícula pupal a las 48 horas, pero no en hemolinfa ni en órganos internos en el período comprendido entre las 40 y 72 horas. Es importante destacar que la cantidad de proteína sembrada en estos carriles fue mayor (ver figura IV.9 B) y que el tiempo de exposición fue más largo. Estos resultados indican que PCG-100 parece encontrarse sólo en el tegumento (cutícula más epidermis) y sólo durante el estadio pupal.

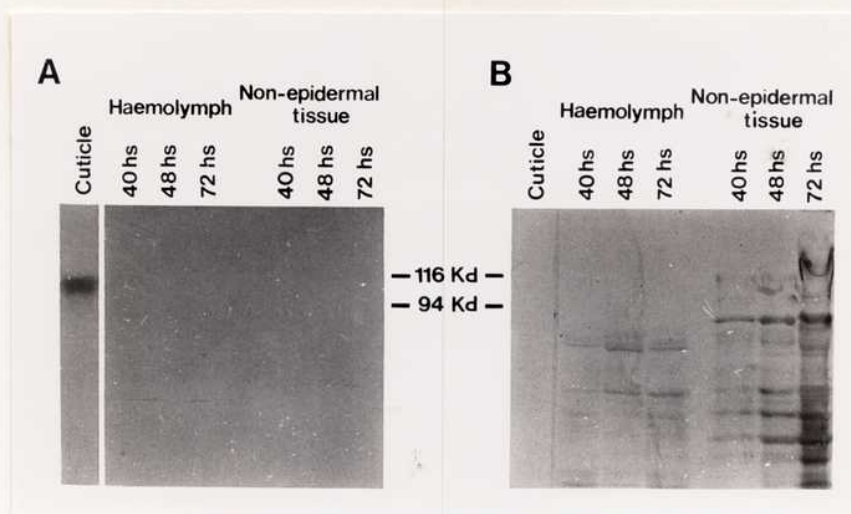


Figura IV.9: Especificidad de tejido de PCG-100. Se separaron en SDS-PAGE 12.5% proteínas de diferentes tejidos y se realizó "Western blot" revelando con suero anti-PCG-100 como se describe en Materiales y Métodos. La cutícula fue obtenida de una pupa de 48 horas, la hemolinfa y órganos internos de animales de 40, 48 y 72 hs. A: autorradiografía. El tiempo de exposición fue de 8 horas para el carril de cutícula y 4 días para los restantes. B: tinción de tinta china de la misma nitrocelulosa que en A.

3.3 Acumulación de PCG-100 durante la metamorfosis.

Se estudió la presencia de PCG-100 durante los estadios que se desarrollan dentro del pupario: pre-pupa, pupa y adulto farado. Para esto, se obtuvieron extractos de proteínas totales libres de lípidos por el método de homogeneización en solventes orgánicos descrito en Materiales y Métodos y se analizaron por "Western blot" (ver figura IV.10 A).

Se cuantificó en el "Western blot" la cantidad de PCG-100, tal como se indica en Materiales y Métodos. Se observa en la figura IV.10 B que la cantidad de PCG-100 acumulada aumentó abruptamente entre las 48 y 76 horas, se mantuvo en sus máximos valores entre el tercer y cuarto día y luego pareció disminuir lentamente. Después del octavo día, cuando ya se produjo la muda a adulto, fue prácticamente indetectable.

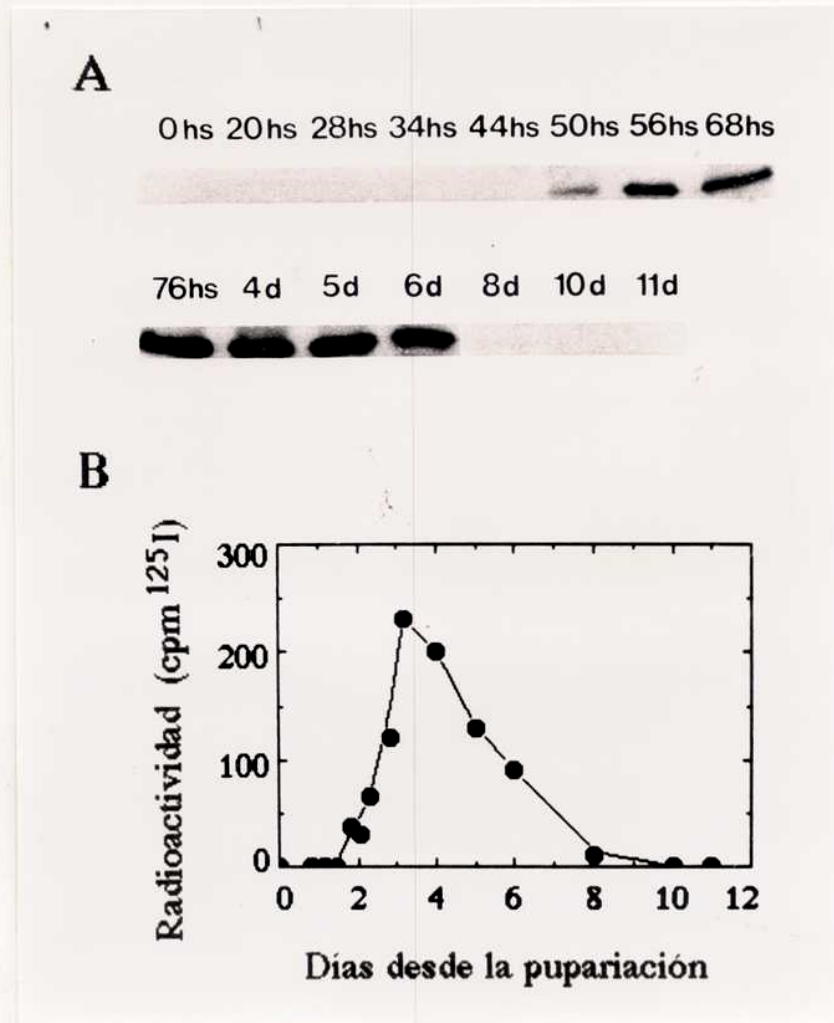
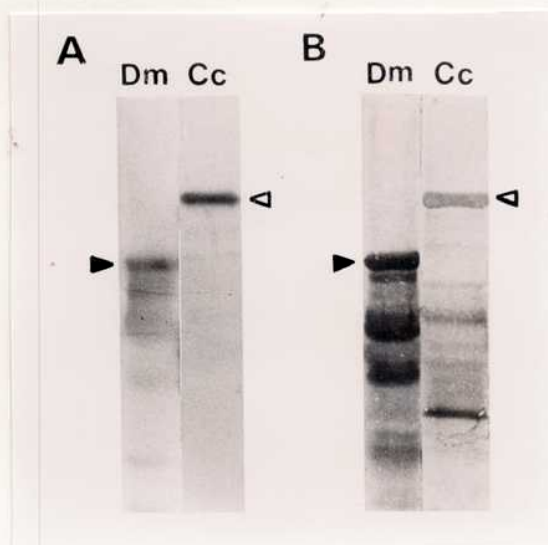


Figura IV.10: Acumulación de PCG-100 durante la metamorfosis. Se obtuvieron extractos proteicos libres de lípidos (ver Materiales y Métodos) de insectos tomados de un cultivo sincrónico. Cantidades equivalentes de los extractos fueron separadas en SDS-PAGE 12.5%, electrotransferidos a nitrocelulosa y revelados con suero anti-PCG-100 seguido de proteína A-[^{125}I]. **A:** autorradiografía. **B:** la radioactividad unida a la nitrocelulosa fue cuantificada como se indica en Materiales y Métodos.

3.4 Relación inmunológica con otras especies.

Se estudió la existencia de polipéptidos inmunológicamente relacionados con PCG-100 en preparaciones masivas de PCP de *Drosophila melanogaster*. Se observa en la figura IV.11 que la PCP-82 de *Drosophila* mostró reacción positiva con el suero anti-PCG-100 de *Ceratitis capitata*. Aparentemente, varias PCP de *Drosophila melanogaster* de alto peso molecular fueron reconocidas, aunque teniendo en cuenta el análisis realizado en 3.1 (página 99), no puede descartarse que sean productos de degradación de PCP-82, que es la banda de mayor peso molecular entre las que dieron señal positiva. La afinidad del antisuero por la PCP-82 resultó bastante menor que para el caso de PCG-100, como se aprecia por los tiempos de exposición requeridos (ver figura IV.11).

Figura IV.11: Se separaron en SDS-PAGE 12.5% preparaciones masivas de PCP de *Drosophila melanogaster* (Dm) y *Ceratitis capitata* (Cc) y se sometieron a "Western blot", revelado con suero anti-PCG-100 seguido de proteína A-[¹²⁵I]. **A:** autorradiografía, **B:** tinción con tinta china. Las flechas indican las posiciones correspondientes a la PCP-82 de *Drosophila* y a la PCG-100 de *Ceratitis*. Los tiempos de exposición fueron de 48 y 8 horas, respectivamente.



Discusión.

Se prepararon sueros policlonales en conejos contra proteínas cuticulares larvales y proteínas cuticulares pupales que presentaban un interés particular: PCG-100, PCP29 y PCG-16. Al igual que en otros dípteros, en *Ceratitis capitata*, las proteínas cuticulares larvales y las PCP de bajo peso molecular resultaron poco antigénicas. Han sido descritas como poco antigénicas las LCP de *Drosophila melanogaster* y *Dacus oleae* (Fristrom et al., 1978; Silvert et al., 1984; Souliotis et al., 1988a). En estos casos sólo se consiguió respuesta inmune entrecruzando las proteínas con glutaraldehído. Por el contrario, la PCG-100 proporcionó sueros de título adecuado con los cuales se determinó la especificidad de tejido y de estadio de esta proteína; así como se facilitó el estudio de su biosíntesis (ver capítulo VI).

También se obtuvo un suero contra la presunta proteína cuticular PS-44. Como se discute inmediatamente, con éste se demostró que esta proteína no sería de origen cuticular, ni específica de epidermis.

1. PS-44 es no-cuticular.

Es importante destacar que PS-44 presentó características que la diferenciaban de las otras proteínas extraíbles de la cutícula larval en el mismo momento del ciclo de vida. Estas características son:

- i) Extractabilidad: en el capítulo III (páginas 64-65) se mostró que la PS-44 no se solubiliza en solución de Ringer, al contrario de lo que ocurre con las LCP. Se requiere NaCl 0.5 M o la presencia de detergentes para extraerla.
- ii) Afinidad por quitina: se vió que en columnas de afinidad PS-44 no eluye en la misma fracción que las LCP.

La aparición en la cutícula larval de esta proteína, de propiedades distintas a las LCP ya depositadas durante el estadio larval, sugería fuertemente que podría estar relacionada con los cambios que ocurren en la cutícula cuando se prepara para convertirse en pupario. En *Drosophila melanogaster* y en *Manduca sexta* han sido descritas modificaciones en la composición proteica y en la morfología de la cutícula al final del último estadio larval (Kimbrell et al., 1988; Horodyski y Riddiford, 1989).

Sin embargo, los estudios inmunológicos realizados, tendientes a aclarar la naturaleza de esta proteína (ver IV.2), mostraron que se trataría de una proteína celular, no cuticular, altamente conservada en artrópodos y que su expresión sería constitutiva a lo largo de todo el ciclo de vida y en todos los tejidos analizados. De estos resultados se deduce que la presencia de PS-44 en las preparaciones de proteínas cuticulares de larva de salto y pupario blanco se debería a contaminación con material celular, probablemente de origen epidérmico. Esto es probable dadas las dificultades técnicas que existen en la preparación en masa a partir de muestras pequeñas, como fue siempre el caso de estos estadíos. La ausencia de PS-44 en las preparaciones de proteínas cuticulares sería indicativa del grado de pureza de las cutículas obtenidas. Este es el caso de LCP, PCP o ACP, como lo confirmó el análisis microscópico (página 54). Dado que los restos de membranas de epidermis adherida a la cutícula es la contaminación más común en preparaciones cuticulares impuras, podría ser que PS-44 sea de membrana o que esté asociada a la membrana plasmática o a membranas internas, lo cual concuerda con las condiciones requeridas para su solubilización (alta sal o detergente).

Como se señaló, PS-44 comparte con la actina ciertas propiedades. Para confirmar o descartar la identidad de estas dos proteínas, se probó si existía relación inmunológica entre las mismas. El análisis por "Western blot" indicó que el suero anti-PS-44 no parece reconocer la actina bovina. Dado que se trata de una proteína muy conservada, inclusive en especies tan distantes como hongos, protozoos y mamíferos (Firtel, 1981; Pollard y Cooper, 1986), ésto descartaría la similitud entre la PS-44 y la actina.

La hemolinfa también podría ser un contaminante eventual en las preparaciones de cutícula. Sin embargo, las proteínas mayoritarias de hemolinfa presentan en *Ceratitis capitata* pesos moleculares de 87; 85; 82 y 81 kD (ver capítulo VIII; Mintzas y Reboutsicas, 1984). Las proteínas mayoritarias de hemocitos, en cambio, son de peso molecular más cercano a 44 kD. La banda principal tiene un peso molecular relativo de 36 kD y es seguida en abundancia por bandas de 47 y 54 kD (Marmaras y Tsakas, 1988). Como se ve en la figura IV.5 tal, ninguna banda de este peso molecular fue reconocido por el anticuerpo anti-PS-44.

La identidad de PS-44 queda por ser determinada, para lo cual es de tener en cuenta, además de todas las características mencionadas, que se detectó una proteína de peso molecular aparente similar en otras especies de insectos y artrópodos (avispa, gusano de seda, *Drosophila melanogaster*, cangrejo de río) pero no se hizo evidente su presencia en especies distantes como rata, ameba, *T. cruzi* o *E. coli*. No caben dudas de que se trata de una proteína muy interesante, cuyo estudio queda fuera del marco de esta tesis, pero que debería ser estudiada especialmente.

2. Antigenicidad y epitopes de la PCG-100.

La proteína cuticular pupal mayoritaria, PCG-100, generó sueros de buen título, que reconocen específicamente a esta proteína. Las otras bandas que fueron reconocidas con menor intensidad en análisis de "Western blot", no parecen corresponder a proteínas inmunológicamente relacionadas con PCG-100, sino más bien a productos de degradación de ésta (ver 3.1).

En otras especies es común encontrar que ciertas proteínas específicas de un determinado estadio presentan reacción cruzada con otras proteínas del mismo o de otros estadios. En *Anthonomus grandis* (gorgojo del algodón), anticuerpos dirigidos contra ciertas proteínas larvales reconocen proteínas de pupa y adulto. No está claro si se debe a secuencias aminoacídicas similares o la existencia de cadenas de carbohidratos en común (Stiles y Leopold, 1990). También en *Antheraea polyphemus* las PCP están inmunológicamente relacionadas con las ACP (Sridhara, 1983, 1985). En *Lucilia cuprina* existe reacción cruzada entre ciertas LCP y proteínas de bajo peso molecular de pupa y adulto farado (Skelly y Howells, 1988). En *Drosophila* existen familias de proteínas cuticulares inmunológicamente relacionadas entre sí e inmunológicamente distintas de las proteínas de otras familias (ver Introducción). Estos grupos o familias son las LCP, las PCP de bajo peso molecular (algunas de ellas relacionadas inmunológicamente con las LCP) y las PCP de alto peso molecular (Silver et al., 1984).

Entre las proteínas de *Ceratitis capitata*, la PCG-100 parece tener determinantes antigénicos que le son propios, ya que hasta ahora no hemos encontrado relación inmunológica con otras proteínas cuticulares o no cuticulares. Teniendo en cuenta que se trata de una glicoproteína, podría esperarse que algunos epítopes oligosacáridicos fueran compartidos con alguna otra glicoproteína. En otros insectos, las mitades oligosacáridicas juegan un papel importante en el reconocimiento de las proteínas cuticulares por sueros policlonales (Cox, 1987). Este no parece ser el caso de PCG-100. Otras proteínas de *Ceratitis*, en su mayoría glicoproteínas de bajo peso molecular, mostraron reacción cruzada con otras proteínas y también con ovoalbúmina (di Paola y Quesada, com. per.). En cambio los sueros anti-PCG-100 no dieron reacción positiva con ovoalbúmina (que contiene oligosacáridos de alta manosa) ni, como ya se señaló, con ninguna otra glicoproteína de insecto.

Concluimos, entonces, que los principales epítopes inmunogénicos de PCG-100 no parecen abundantes, lo que haría que pensar que esta glicoproteína no formaría parte de una familia multigénica, a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila* y otras especies anteriormente mencionadas. Sin embargo, como se discute más abajo, la PCG-100 parecería relacionada con proteínas de *Drosophila melanogaster*.

3. PCG-100: especificidad de estadio y tejido.

Se estableció claramente que PCG-100 es específica de estadio pupal, no detectándose en embrión, larva III o adulto farado. Es decir que la expresión del gen correspondiente estaría restringida a este estadio.

Análisis de "Western blot" determinaron que no existen polipéptidos inmunológicamente relacionados con PCG-100 en hemolinfa ni en órganos internos. Este análisis fue realizado en pupas de 40, 48 y 72 horas, período en el cual la PCG-100 es sintetizada y depositada en la cutícula (ver más adelante). La ausencia de esta proteína o de precursores de la misma en tejidos no-tegmentales sugiere fuertemente que la síntesis de PCG-100 ocurre sólo en la epidermis. Es decir, la expresión de PCG-100 es específica de células epiteliales de estadio pupal. Existen varios casos en que se detectan en la cutícula proteínas de origen no epidérmico.

En *Calliphora vicina* (König et al., 1986) se ha detectado, en las cutículas larval y pupal y en el pupario, la presencia de la principal proteína de hemolinfa, sintetizada en el cuerpo graso. También se detectan proteínas de hemolinfa en cutículas de *Manduca sexta* y de cucaracha americana; y vitelogenina en la cutícula de langostas hembras (ver Introducción).

Tal como se discutió anteriormente (ver III), la presencia de PCG-100 en la cutícula de todo el cuerpo de la pupa plantea la pregunta de si ésta es expresada sólo en células imaginales (de discos imaginales e histoblastos) o si se expresa también en las células abdominales remanentes de origen larval. Esto podría aclararse indirectamente mediante estudios inmunohistológicos con antisueros dirigidos contra PCG-100, los cuales -como se vió- son altamente específicos.

4. Deposición de PCG-100 durante la metamorfosis.

Utilizando antisueros específicos se estudió cuantitativamente el perfil de PCG-100 durante la metamorfosis. En "Western blot" de proteínas totales se vió que PCG-100 se hace detectable poco después del inicio del estadio pupal (44 horas en la figura IV.10), siendo máxima la señal al tercer-cuarto día y decayendo luego hacia el fin del estadio (séptimo día). La curva trazada en la figura IV.10 es muy similar a la de la figura III.10 (página 61), en donde se grafica la cantidad de PCG-100 acumulada en cutícula. El hecho de que la aparición de PCG-100 en extractos de proteínas totales coincida con la aparición de PCG-100 en la cutícula sugiere que esta proteína no se halla almacenada o circulante antes de su secreción y que la síntesis y deposición en cutícula ocurre con un defasaje no mayor de 8 horas.

Como se ve en ambas figuras (IV.10 y III.10) la cantidad de PCG-100 detectada disminuye al finalizar el estadio pupal. Hasta donde sabemos, el que una proteína cuticular deje de ser "detectable" puede deberse a dos razones:

i) se ha degradado por la acción de las enzimas proteásicas secretadas en el fluido ecdisial. Como se indicó en la Introducción, se cree que este proceso de degradación y reuso de materiales existe en toda muda.

ii) se ha esclerotizado, es decir se ha unido covalentemente a otros componentes cuticulares (quitina, proteínas), formando polímeros de alto peso molecular (ver Introducción) de modo tal que ya no es extraíble, aún en presencia de agentes desnaturalizantes. Se acepta en general que este proceso ocurre en las capas más externas de las cutículas en formación, pero no han sido descriptos casos en que esto ocurra en cutículas que están sufriendo un proceso de muda, a excepción de la cutícula larval cuando se transforma en pupario.

Por lo tanto, la "desaparición" de PCG-100 coincidente con la muda a adulto probablemente se deba a su degradación por las enzimas secretadas en el fluido ecdisial. En algunos casos se observó, en análisis de "Western blot" de proteínas totales, que simultáneamente con la desaparición de PCG-100 aparecían algunas bandas de menor peso molecular. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados de las digestiones *in vitro* (ver 3.1), no puede asegurarse que éstos sean los productos de la degradación que PCG-100 sufre *in vivo* por la acción de enzimas ecdisiales.

De todas las proteínas consideradas inicialmente, teniendo en cuenta sus propiedades y los estudios inmunológicos realizados, resulta que PCG-100 es un buen modelo de estudio, dada su abundancia y su especificidad de estadio y tejido. Puede decirse que PCG-100 es un excelente marcador del nuevo programa expresado por las células epiteliales al iniciarse el estadio pupal. El estudio de la síntesis y deposición de esta proteína puede ser tomado como representativo de la actividad biosintética y secretoria de la epidermis en este momento del desarrollo del insecto (ver capítulo VI).

5. Relación inmunológica entre proteínas cuticulares de distintas especies.

El hecho de que antisueros dirigidos contra la PCG-100 de *Ceratitis capitata* reconozcan a la PCP-82 de *Drosophila melanogaster* es indicativo de que estas moléculas presentan cierta similitud. Como se discutió anteriormente, los principales determinantes antigénicos de PCG-100 no parecerían residir en su oligosacárido, lo cual sugiere que los epitopes que son reconocidos en la PCP-82 corresponden a secuencias aminoacídicas presentes en las dos proteínas. Es de hacer notar que, además de la PCP-82, son reconocidos en *Drosophila melanogaster* otras PCP de alto peso

molecular, las cuales, como ya se indicó, pertenecen a una misma familia inmunológica (Silvert et al., 1984).

Estudios inmunológicos realizados por otros autores revelaron que las LCP de *Drosophila melanogaster* presentan reacción cruzada con las LCP de *Lucilia cuprina* y de *Dacus oleae* (Skelly y Howells, 1988; Souliotis et al. 1988a). Esta última es una mosca evolutivamente muy cercana a *Ceratitis capitata*. Las LCP de estas especies presentan perfiles electroforéticos muy similares y fuerte relación inmunológica (Souliotis et al., 1988a). En cuanto a las PCP, no han sido realizados muchos estudios sobre sus relaciones inmunológicas. Sin duda la especie más estudiada es *Drosophila* (Fristrom et al., 1978; Silvert et al. 1984; Doctor et al., 1985), en la cual encontramos que la PCP-82 es homóloga a la PCG-100 de *Ceratitis*.

A excepción de *Dacus* y *Ceratitis*, todos los otros dípteros mencionados se hallan bastante alejados evolutivamente. La reacción inmunológica cruzada entre proteínas cuticulares de especies relativamente alejadas evolutivamente y las homologías de secuencia señaladas en la Introducción, sugieren que estos genes se hallan bastante conservados a lo largo de la evolución de los dípteros.

V. Estudios a nivel de ácidos nucleicos.

The contents of an article shall be new, *true*,
important and comprehensible.

L. DeBakey. *The scientific journal*, 1976.

Se emplearon sondas de DNA de *Drosophila melanogaster* codificantes para proteínas cuticulares larvales con la intención de detectar secuencias homólogas en *Ceratitis capitata*. Se prepararon ácidos nucleicos, DNA y RNA de este insecto para éste y otros propósitos experimentales.

Resultados.

1. Preparación de ácidos nucleicos.

1.1 Preparación de DNA.

Hasta la fecha, los métodos descritos en la literatura para la obtención de DNA de insectos son relativamente escasos (Henry et al., 1990). Hemos preparado DNA de *Ceratitits capitata* de acuerdo al procedimiento de J. Natzle (com. pers.) modificado por nosotros y descrito en Materiales y Métodos (ver página 46). Las preparaciones de DNA fueron analizadas cualitativa y cuantitativamente por medición de las absorbancias a 260, 280 y 320 nm, y por electroforesis en geles de agarosa. Las mejores preparaciones se obtuvieron a partir de pupas. En el caso de adultos de *Ceratitits capitata* -y también en el caso de ninfas de quinto estadio o adultos de *Triatoma infestans*- se obtuvieron preparaciones de DNA coloreadas. Estas muestras fueron parcialmente purificadas por cromatografía en Sephadex G-50. La coloración se evitó totalmente en el caso de *Triatoma infestans* mediante la presencia de antioxidantes (BHT, PTU) en el buffer de homogeneización (Wappner, com. pers.). El DNA obtenido por el método descrito fue de alto peso molecular y resultó un buen sustrato para enzimas de restricción (no mostrado). Estas preparaciones de DNA fueron destinadas a ensayos de "Southern blot" (ver 2) y también a la confección de un banco genómico de expresión (tarea que queda fuera del marco de esta Tesis y que será completada por otro(s) miembro(s) del laboratorio).

1.2 RNA y RNA polIA⁺ de distintos estadios.

Se aisló RNA de distintos estadios de *Drosophila melanogaster* y *Ceratitits capitata*, de acuerdo a los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. El RNA fue sometido a electroforesis en geles de agarosa como muestra la figura V.2 A. Tanto en *Drosophila melanogaster* como en *Ceratitits capitata* se observaron dos bandas que corren con una movilidad ligeramente menor al marcador de 1.9 kb. Dada la intensidad de estas bandas, asumimos que se trata de RNA ribosomal. En otros insectos también ocurre que los dos RNA ribosomales presentan una movilidad muy similar, cercana a la posición en la que suele encontrarse el rRNA de 18S de mamíferos (Souliotis et al., 1989).

A partir de RNA totales se obtuvieron muestras enriquecidas en mRNA por pasaje a través de oligo dT-sefarosa, como se describe en Materiales y Métodos. La proporción de RNA poliA⁺ respecto del RNA total resultó distinta en los distintos estadios (ver tabla V.1).

Estadio:	Larva III	Pre-pupa	Pupa
RNA poliA ⁺ /RNA total:	1.5%	0.86%	1.6%

Tabla V.1: Se aisló RNA de distintos estadios de *Ceratitis capitata* como se describe en Materiales y Métodos. Entre 0.5 y 0.75 mg de RNA de cada estadio fueron pasados por la misma columna de oligodT-sefarosa. Se eluyó como se describe en Materiales y Métodos y se determinó la cantidad de RNA unido y no unido por absorbancia a 260 nm.

Aún teniendo en cuenta los posibles errores en la determinación de las cantidades de RNA total y poliA⁺, creemos que las diferencias en los valores obtenidos en los distintos estadios son significativas. La proporción de RNA poliA⁺ pareció disminuir durante el período pre-pupal. Estos resultados concuerdan con los descriptos anteriormente en *Ceratitis* por Fominaya et al. (1984) e indican que el número de moléculas de RNA mensajero es menor durante este período. Esto sugiere que los genes que estaban siendo transcritos durante el estadio larval se habrían vuelto inactivos y que no se habrían "encendido" aún los genes pupales, lo cual sería coherente con el hecho de que en este momento se produce la histólisis de la mayor parte de los tejidos larvales y no ha comenzado aún la organización de los pupales.

2. Estudios con sondas de DNA de *Drosophila melanogaster*.

Como se vió en la Introducción, existe cierta homología entre genes que codifican para proteínas cuticulares larvales de distintas especies. Por lo tanto se decidió emplear sondas de DNA codificantes para proteínas cuticulares de *Drosophila melanogaster*, con el fin de detectar mRNA o DNA homólogos en *Ceratitis capitata*. La hipótesis de trabajo consistía en la

posibilidad de reconocer secuencias homólogas que correspondieran a proteínas larvales y -eventualmente- de pupa y/o adulto abdominales. En los estudios mostrados aquí, se utilizó una sonda de DNA conteniendo el fragmento genómico que codifica para las LCP mayoritarias de *Drosophila*. Estos genes se encuentran formando un cúmulo o "cluster" en el tercer cromosoma, como lo ilustra la figura IV.1 (Snyder et al., 1981; 1982).

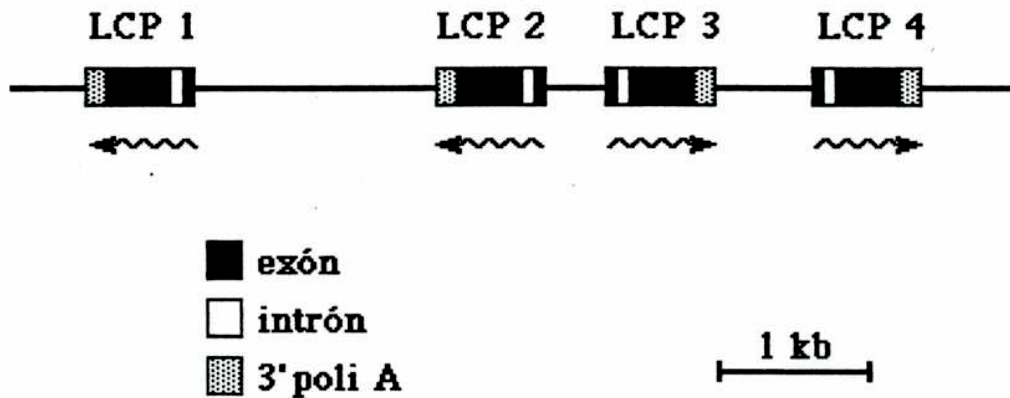


Figura IV.1: Organización genómica de los genes que codifican para las LCP de *Drosophila melanogaster*, basado en Snyder et al. (1981; 1982). Las flechas indican la dirección de la transcripción. Las distancias entre los genes no están en escala. Un plásmido conteniendo este fragmento genómico (pDO-7) fue utilizado en los experimentos mostrados aquí.

Se ensayó con la sonda de *Drosophila* descrita más arriba RNA de distintos estadios de *Drosophila* y *Ceratitis*. Para ésto el plásmido pDO-7 fue amplificado en *E. coli*, purificado en gradiente de CsCl y marcado con ^{32}P por "nick translation" como se indica en Materiales y Métodos. La figura V.2 B muestra un "Northern blot" de RNA de larva III y pupa de *Drosophila*, y larva III, pre-pupa, pupa y adulto farado de *Ceratitis*.

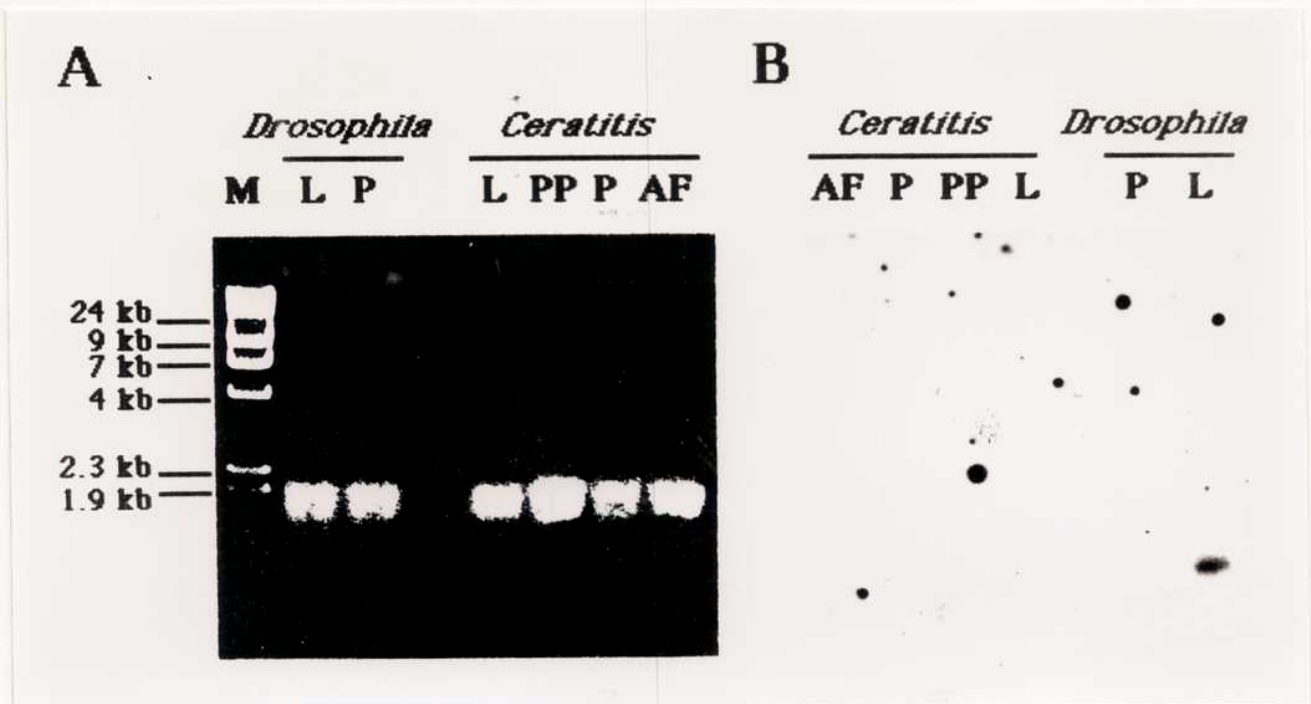


Figura V.2: "Northern blot" de distintos estadios de *Drosophila* y *Ceratitis*: L: larva, PP: pre-pupa, P: pupa, AF: adulto farado. M: marcadores de peso molecular. El RNA fue separado por electroforesis en gel de agarosa 1.2%. A: tinción por bromuro de etidio, 10 μ g por carril. B: Un gel similar (20 μ g por carril) fue transferido a nitrocelulosa e hibridizado. Los lavados fueron realizados en SSC 0.5X a 45 $^{\circ}$ C.

Se observa en la figura V.2 B que en el estadio larval de *Drosophila melanogaster* se detectó una banda ancha de aproximadamente 600 pb. Esta corresponde a los mensajeros de los genes indicados en la figura V.1, los cuales migran juntos con un tamaño aparente de 500-600 pb (Snyder et al., 1981). De acuerdo a lo descrito anteriormente (Snyder et al., 1981; Fristrom et al., 1986), estos mensajeros fueron detectados en el tercer estadio larval pero no en el estadio pupal (ver figura V.2). En estas condiciones, no se observó señal positiva en ninguno de los estadios de *Ceratitis capitata* analizados.

Se hibridizó RNA obtenido de los mismos estadios en condiciones menos estrictas. En el "dot blot" mostrado en la figura V.3, se observa que no se obtuvo señal en los estadios larval y pre-pupal de *Ceratitis*. Aparentemente, la sonda hibridizó con RNA de estadio pupal. Se conoce en *Drosophila melanogaster* la existencia de un gen homólogo a los de LCP que se expresa en muy bajos niveles en el estadio pupal (Henikoff et al., 1986). En las condiciones ensayadas, se obtuvo respuesta en el estadio larval pero no en el pupal de *Drosophila*.

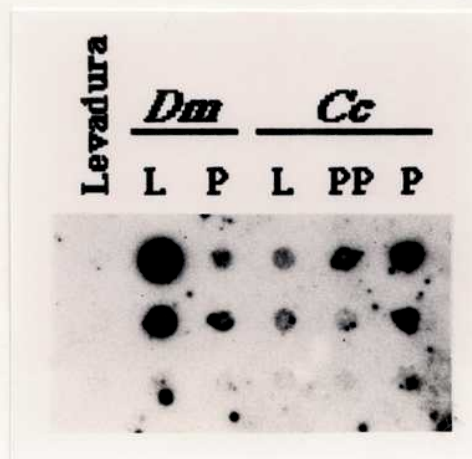


Figura V.3: "Dot blot" de RNA de distintos estadios de *Drosophila* y *Ceratitis* (1, 4 y 20 µg). Se hibridizó con la sonda de *Drosophila* radiomarcada con ^{32}P por "nick translation" y se realizaron los lavados en SSC 2X a 42 °C.

Para confirmar la posible existencia de mensajeros de estadio pupal de *Ceratitis* homólogos a los de *Drosophila*, se realizó un "Northern blot" de RNA poliA⁺. La hibridización fue llevada a cabo en las mismas condiciones salinas y a la misma temperatura que el experimento de "dot blot" (figura V.3). A excepción de los controles positivos correspondientes, no se detectó señal alguna (datos no mostrados).

La misma sonda de *Drosophila melanogaster* fue utilizada para determinar la presencia de secuencias de DNA homólogas en *Ceratitis*. Se digirió DNA de *Ceratitis capitata* con Hind III o EcoRI, y se realizó un análisis por "Southern blot" como se describe en Materiales y Métodos. No se detectó señal positiva, a excepción de los controles de *Drosophila*, pese a que se ensayaron distintas condiciones de temperatura y concentración salina (no mostrado).

Discusión.

Homología con genes de *Drosophila*.

En las condiciones ensayadas, no hemos detectado mensajeros o DNA de *Ceratitis* capaz de hibridizar con la sonda que codifica para las LCP de *Drosophila melanogaster*.

Como se indicó en la Introducción, durante el desarrollo de esta tesis otros autores identificaron en *Dacus oleae*, mosca muy emparentada evolutivamente con *Ceratitis capitata*, genes que codifican para LCP. Aparentemente, éstos serían homólogos a los genes de *Drosophila melanogaster* (Souliotis et al., 1988b; 1989).

Dado que estos presuntos resultados hicieron que empleáramos mucho tiempo en comprobaciones y controles y que existe la sospecha (Quesada-Allué, comunicación personal) de una probable confusión o inclusive fraude, se discuten a continuación los resultados de estos autores.

Es llamativa la similitud de los resultados encontrados por Souliotis et al. con el clon de *Drosophila*, λ DmLCP1, aislado por Snyder et al. (1981) y el de *Dacus*, λ DOCP13, aislado por Souliotis et al. (1989). En el trabajo de 1988, Souliotis et al. utilizan el clon λ DmLCP1 de *Drosophila melanogaster* para seleccionar los mRNA homólogos de *Dacus* y luego traducirlos *in vitro*. Los polipéptidos obtenidos son analizados en geles bidimensionales. En trabajos posteriores, se realiza el mismo ensayo utilizando el clon de *Dacus*, λ DOCP13 para seleccionar los mensajeros (Souliotis et al., 1989).

La figura V.4 muestra los geles bidimensionales correspondientes al ensayo de selección con λ DmLCP1 (A) (Souliotis et al., 1988b) y λ DOCP13 (B) (Souliotis et al., 1989). Claramente, estos autores obtuvieron *la misma intensidad* de las distintas manchas seleccionando los mRNA con *distintas sondas*. A menos que λ DmLCP1 sea *idéntico* a λ DOCP13, es muy poco probable que la abundancia relativa de los distintos mensajeros seleccionados por uno y otro clon sea la misma. Los polipéptidos obtenidos por traducción *in vitro* de los mensajeros seleccionados también deberían diferir en abundancia relativa. Aunque ésto no fuera así es obvio que la figura mostrada en ambos artículos es la misma (comparar A y B en la figura V.4).

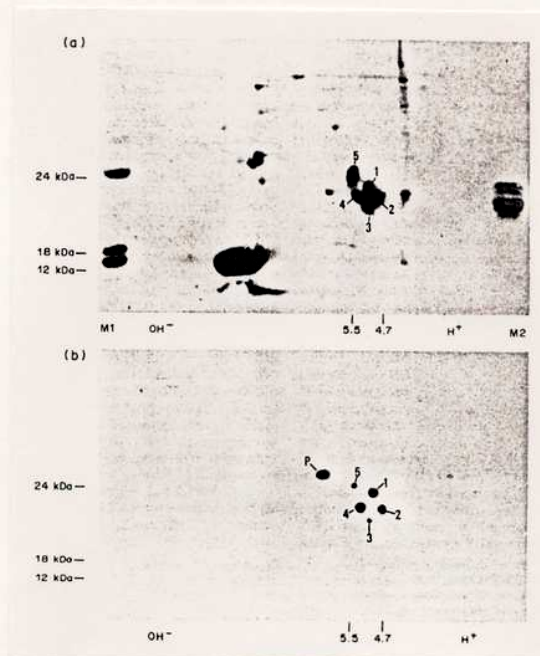
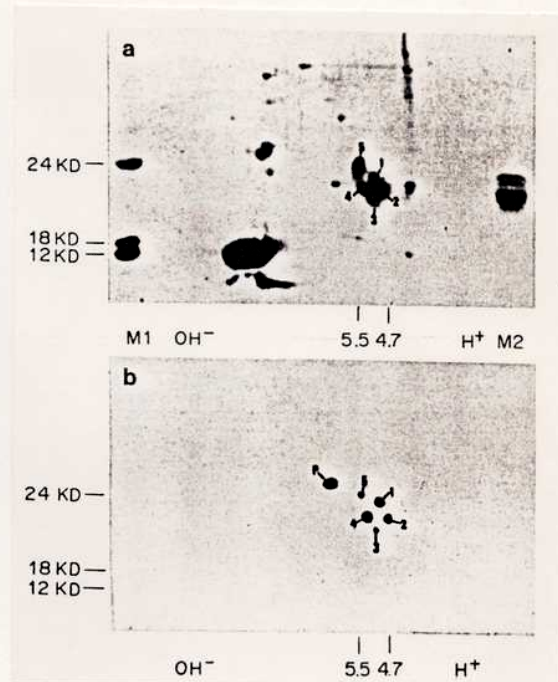
A**B**

Figura V.4: Selección de mRNA de *Dacus oleae* y traducción *in vitro* (tomado de Souliotis et., 1988b; 1989). a: tinción para proteínas del gel bidimensional en donde se analizan los productos de la traducción *in vitro*. b: autorradiografía correspondiente. En A se utilizó el clon λ DmLCP1 de *Drosophila* (Souliotis et al., 1988b) y en B, el λ DOCP13 de *Dacus* (Souliotis et al., 1989).

También son aparentemente los mismos los resultados obtenidos en ensayos HART ("hibrid arrested translation analysis"). Esto consiste en la traducción *in vitro* de RNA que ha sido previamente hibridizado con un exceso de DNA que codifica para cierta(s) proteína(s). La formación de híbridos RNA-DNA impide su traducción.

La figura V.5 A muestra los resultados obtenidos por estos autores haciendo la hibridización con cDNA de proteínas cuticulares (para sintetizar el cual no se aclara qué "primer" se utilizó) (Souliotis et al., 1988b) y en la figura V.5 B se muestra el mismo experimento utilizando DNA de λ DOCP13 (Souliotis et al., 1989). Es asombrosa la reproducibilidad de las manchas espúreas en las dos fluorografías y el hecho de que comparando estos dos experimentos se concluye que el marcador de 45 kD no presenta siempre la misma movilidad.

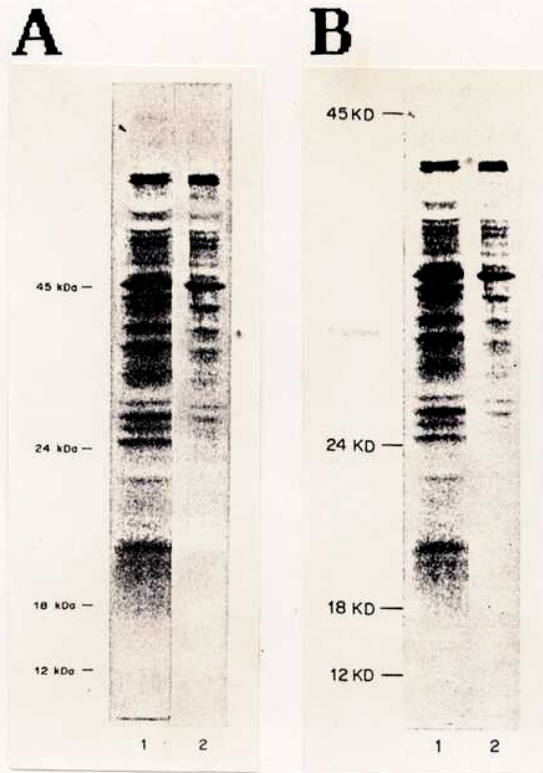


Figura V.5: Traducción *in vitro* de mRNA de *Dacus* prehibridizado con cDNA codificantes para proteínas cuticulares (A) (Souliotis et al., 1988b) o DNA del clon λ DOCP13 (B) (Souliotis et al., 1989).

Es probable que los genes de LCP de *Dacus* sean homólogos a los de *Drosophila melanogaster*, pero a partir de los datos mostrados por Souliotis et al. (1988b; 1989) es imposible concluir el grado de homología entre las dos especies. Dado que *Dacus* es muy cercana evolutivamente a *Ceratitis*, deberíamos sospechar que los genes de esta mosca son similares a los de *Dacus* y -por extensión- a los de *Drosophila*. Sin embargo, en las condiciones experimentales utilizadas por nosotros no hemos podido detectar hibridización de ningún tipo.

VI. Síntesis *in vivo* de proteínas cuticulares pupales.

The day came and he hadn't slept for four days before it. His body felt nervous and ready to burst. Incomprehensible feelings possessed him. Around it all, encapsulating all the mystery and terror and wonder and hope, was a single word.

Metamorphosis.

The process was something you could not avoid, like death. The genes insisted and the body obeyed.

The larva could not delay it.

A dim, fading part of him knew he would sleep for three whole seasons...

A.D. Foster. *Nor Crystal Tears*, 1982

Se estudió la biosíntesis de proteínas cuticulares pupales por radiomarcación *in vivo* con [³⁵S]-metionina.

La mayor parte de los trabajos realizados anteriormente por diferentes autores en otros insectos fueron hechos *in vitro*, tanto en cultivo de tejidos como en sistemas libres de células. Nosotros, mediante la técnica de microinyección, estudiamos la biosíntesis de proteínas cuticulares de *Ceratitis capitata* en condiciones estrictamente fisiológicas.

Resultados.

1. Radiomarcación *in vivo*.

Se realizaron radiomarcaciones con [^{35}S]-metionina *in vivo* (microinyección) e *in vitro* (cultivo de tejidos). En este último caso se aislaron tegumentos (cutículas + epidermis) por disección y se incubaron en medio de Grace (Grace, 1962). Debido a que en los cultivos *in vitro* la reproducibilidad experimental resultó menor, en la mayoría de los experimentos mostrados aquí, se prefirió la marcación *in vivo* por microinyección (figura VI.1)



Figura VI.1: Microinyección de una pre-pupa de 0 hs. Fotografía tomada por Pablo Wappner.

La figura VI.2 muestra el porcentaje de incorporación de [^{35}S]-metionina en función del tiempo de incubación. Se observa que se mantuvo la linealidad hasta aproximadamente siete horas después de la microinyección. Es de destacar que para cada tiempo de incubación los valores de incorporación obtenidos en distintos individuos -con excepción de unos pocos puntos- presentó muy poca dispersión.

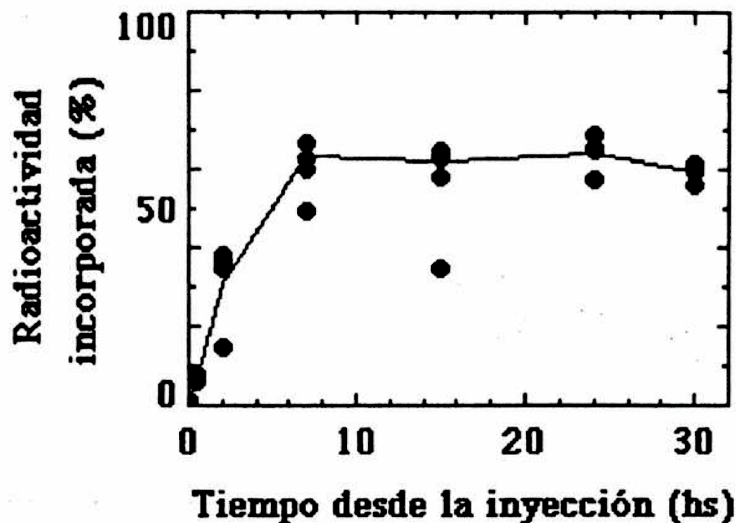


Figura VI.2: Se microinyectaron pre-pupas de 24hs con 0.5 μ l conteniendo 0.1 μ Ci de [35 S]-metionina. A distintos tiempos, grupos de cuatro animales fueron homogeneizados individualmente, previo lavado con abundante agua. Se determinó en los homogenatos la radioactividad total y la radioactividad en material insoluble en TCA 10% y se calculó el porcentaje de incorporación.

Se investigó el daño físico provocado por la inyección. Este pareció depender de la edad de los insectos. Cuando se la aplicó entre las 0 y 24 hs, los animales continuaron su desarrollo normalmente, llegando hasta adultos aproximadamente el 50% de los especímenes. Cuando se microinyectaron pre-pupas entre las 24 y 30 horas, el desarrollo continuó hasta justo antes de la eversión de la cabeza (40 hs), (estadio "pupa temprana" (Rabossi et al., 1991)). Esto probablemente se debe a la disrupción de tejido provocada por la aguja en las estructuras necesarias para evertir la cabeza. En los experimentos aquí descriptos se emplearon pulsos breves (3 ó 4 hs) y también tiempos de marcación más prolongados, para los cuales se hicieron los debidos controles de morfología y proteínas cuticulares marcadoras (ver III, 1 y 3.4.1).

2. Síntesis de proteínas durante la metamorfosis.

La figura VI.3 muestra los valores de incorporación de [35 S]-metionina a proteínas totales, obtenidos en individuos de distintas edades. La ligera caída en los valores de incorporación observados hacia el tercer día en la figura VI.3 puede ser indicativa de una disminución en la síntesis proteica, aunque la dispersión de los datos no permite asegurarlo. Ha sido descripto previamente (Agrell y Lundquist, 1973) que la incorporación de aminoácidos en proteínas durante la metamorfosis de los dípteros decrece hacia la mitad del estadio pupal y aumenta luego hacia el final del estadio.

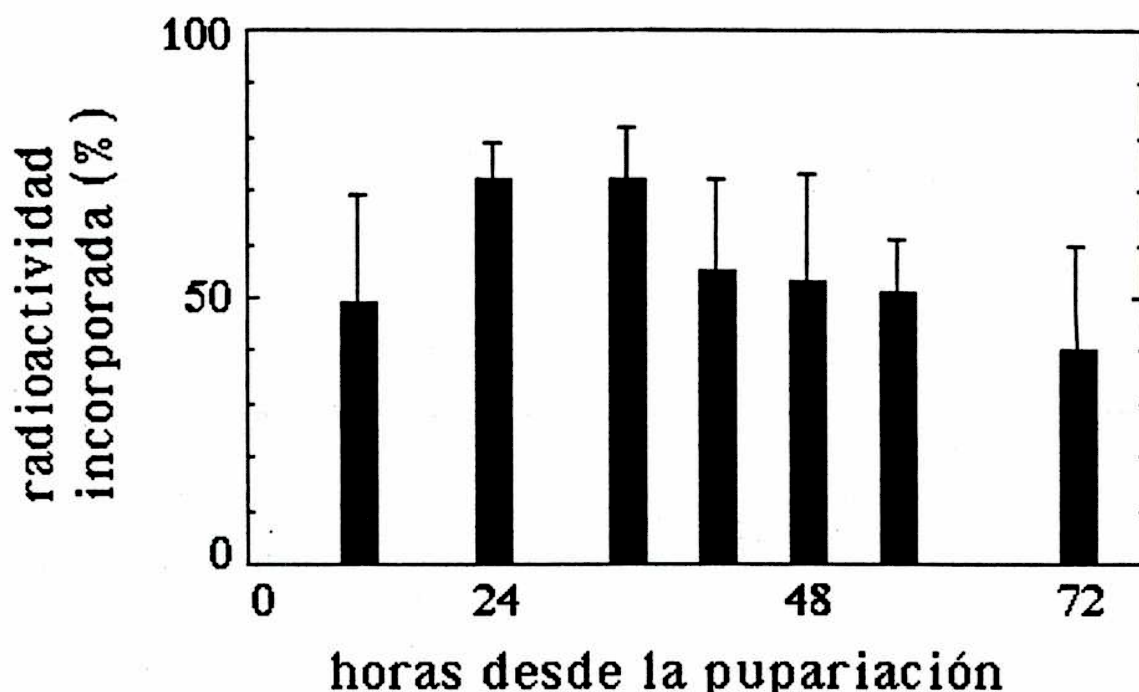


Figura VI.3: Se radiomarcaron por microinyección con [^{35}S]-metionina pre-pupas y pupas de distintas edades durante cuatro horas. Las barras indican el promedio de incorporación de cuatro animales analizados individualmente como se describe en Materiales y Métodos. Las barras de error indican el rango de los valores de incorporación obtenidos.

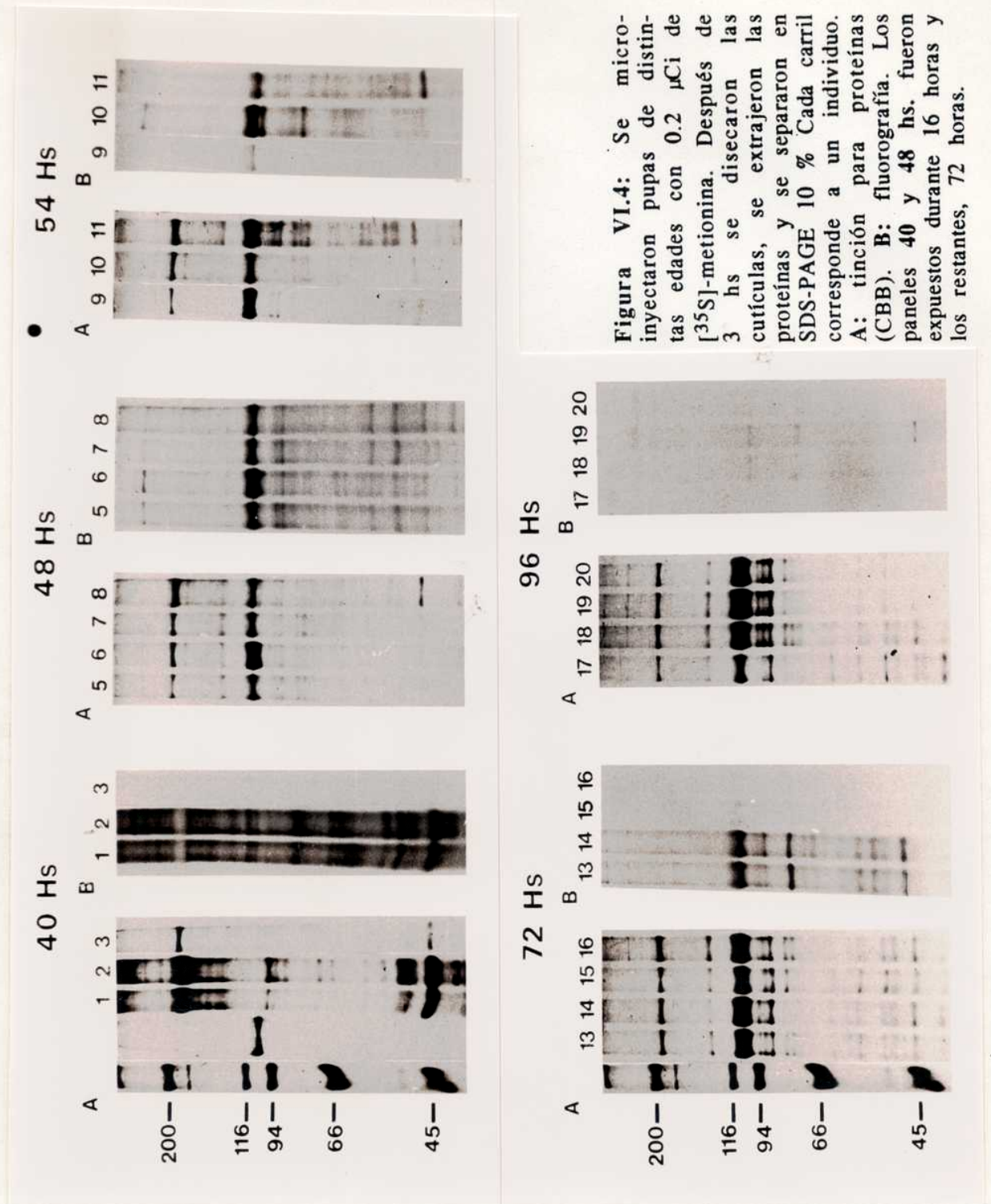
3. Síntesis *in vivo* de PCP.

Se estudió la síntesis de proteínas cuticulares pupales mediante radiomarcación seguida de disección. Se microinyectaron con [^{35}S]-metionina pupas de distintas edades y después de 3 horas de incubación se disecaron las cutículas y se extrajeron las proteínas radiomarcadas depositadas (ver figura VI.4 A y B). En individuos de 40 horas de edad el perfil de proteínas revelado por tinción con CBB (panel A) resultó diferente del perfil de proteínas radiomarcadas (panel B). Esto puede significar que estas proteínas no son sintetizadas en este momento o que no contienen metionina. Como se discute más adelante, han sido descritas varias proteínas cuticulares en las que este aminoácido está ausente. Las bandas

reveladas por CBB (paneles A) o las radiomarcadas (paneles B) observadas a esta edad no parecieron coincidir con ninguna de las PCP mayoritarias descritas en el capítulo III (ver figura III.7, página 58).

Se observa en la figura VI.4 (paneles A) que -tal como se señaló anteriormente (ver capítulo III, 4)- PCG-100 resultó la PCP mayoritaria durante todo el estadio pupal después de las 40 hs. A esta edad no se hizo evidente ninguna banda radioactiva que se identificara con PCG-100. El máximo de radiomarcación de esta proteína se observó a las 48 hs (figura VI.4, paneles B). En este momento comenzó a detectarse la acumulación de PCG-100 en la cutícula (paneles A). En las edades siguientes la cantidad de PCG-100 acumulada fue aumentando y la síntesis fue disminuyendo. A 54 horas, con mayor tiempo de exposición, la radioactividad detectada fue menor y decreció aún mas a las 72 horas. A los cuatro días la síntesis fue indetectable y la proteína acumulada alcanzó el máximo valor (ver también figura III.10, página 61).

PCG-100 resultó la proteína más radiomarcada desde las 48 hasta las 72 horas. Se observaron también bandas de menor importancia, cuya intensidad relativa fue cambiando a lo largo del estadio. Estas también desaparecieron a las 96 horas. Es de destacar que para todos los individuos analizados se comprobó que la incorporación de [³⁵S]-metionina en proteínas totales fue comparable (ver también figura VI.3). De modo que puede asegurarse que la ausencia de bandas radioactivas a las 96 horas indica que no se produce incorporación de metionina en proteínas cuticulares pupales a esa edad.



4. Síntesis *in vivo* de PCG-100.

4.1 Inmunoprecipitación.

Como se vió en III, 5.1, las proteínas cuticulares pupales requieren detergente para su solubilización. Dado que grandes concentraciones de desnaturalizantes interfieren con la técnica de inmunoprecipitación, se ensayaron distintas condiciones de extracción. La PCG-100 fue solubilizada cuantitativamente con un buffer de lisis cuya composición fue: Tris 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM; NP-40 0.5%; SDS 0.1%, (carriles 4 y 5 en figura VI.5 A).

Se homogeneizó una pupa de *Ceratitis capitata* y se extrajo sucesivamente con solución de Ringer, buffer de lisis durante dos horas a 0 °C y luego con buffer "cracking" cinco minutos a 100 °C. La presencia de PCG-100 en estos extractos fue determinada por análisis de "Western blot" como se describe en Materiales y Métodos. (ver figura VI.5A). No se detectó PCG-100 en el extracto acuoso (carril 1), en cambio fue extraída en presencia de detergentes (carriles 2 y 3). Dado que la homogeneización en Ringer extrajo poca proteína (carril 1 en panel B) se omitió este paso en los experimentos mostrados aquí, y se extrajo directamente en buffer de lisis 2 hs a 4 °C.

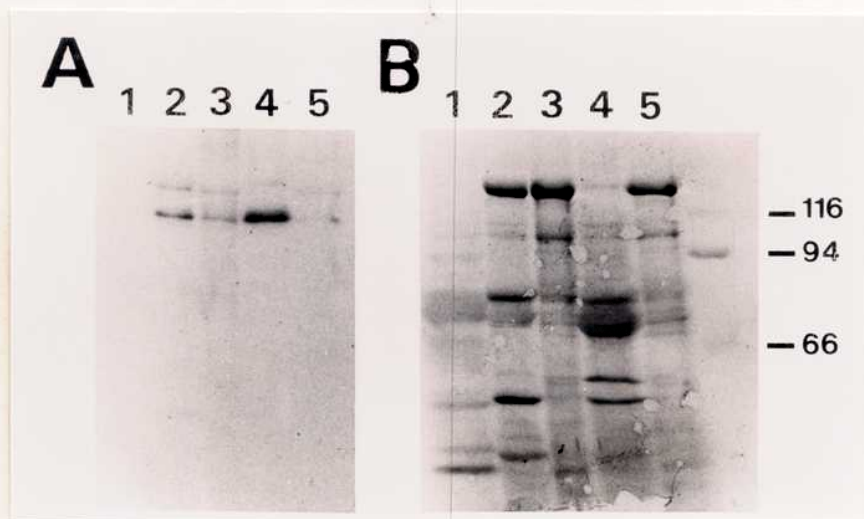


Figura VI.5: Una pupa de 60 hs fue homogeneizada y extraída sucesivamente con solución de Ringer (1), buffer de lisis (Tris 50 mM, pH 8; NaCl 150 mM; NP-40 0.5%; SDS 0.1%) a 0 °C (2) y cracking buffer a 100 °C (3). Otro individuo fue extraído con buffer de lisis (4) y el precipitado resultante con cracking buffer (5). Cantidades equivalentes de los extractos se separaron en SDS-PAGE 7% y se electrotransfirieron a nitrocelulosa. A: se reveló con suero anti-PCG-100/ proteína A [¹²⁵I] seguido de autorradiografía. B: tinción para proteínas (tinta china).

4.2 Síntesis de PCG-100 durante la metamorfosis.

Se estudió la síntesis de PCG-100 durante el estadio pupal mediante radiomarcación seguida de inmunoprecipitación. Se microinyectaron con [^{35}S]-metionina pupas de distintas edades, y después de 4 horas de incubación se aisló, a partir de extractos totales, la PCG-100 radiomarcada mediante inmunoprecipitación con suero anti-PCG-100. Como ya se señaló, este suero resultó muy específico; la PCG-100 fue prácticamente la única proteína radiomarcada inmunoprecipitada (ver figura VI.6 A). La figura VI.6 A y B muestra que la síntesis de PCG-100 se inició entre 43 hs y 54 hs después de la pupariación, fue máxima a las 54 -64 hs y luego decayó abruptamente hacia las 72 hs. En el panel B de la figura VI.6 se observa que incluso con mayor tiempo de exposición, la radioactividad eventualmente incorporada en PCG-100 a las 43 hs fue indetectable. Sí se detectó una síntesis baja después de las 72 hs de edad.

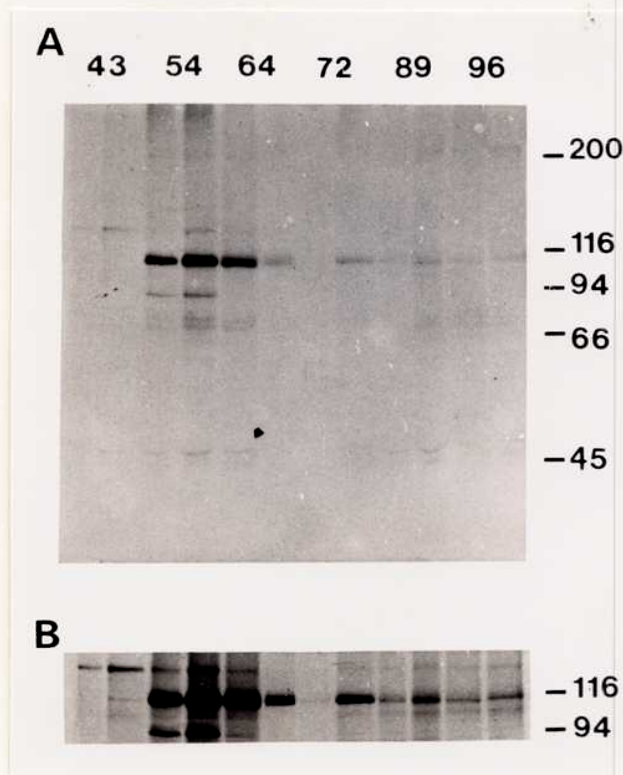


Figura VI.6: Se radiomarcaron pupas de distintas edades durante 4hs con 0.2 μCi de [^{35}S]-metionina. Se homogeneizaron individualmente en buffer de lisis y se inmunoprecipitó con suero anti-PCG-100 como se describe en Materiales y Métodos. Los precipitados fueron extraídos con "cracking" buffer y se analizaron las proteínas en SDS-PAGE 10%, seguido de fluorografía. A: 4 días de exposición y B: 15 días.

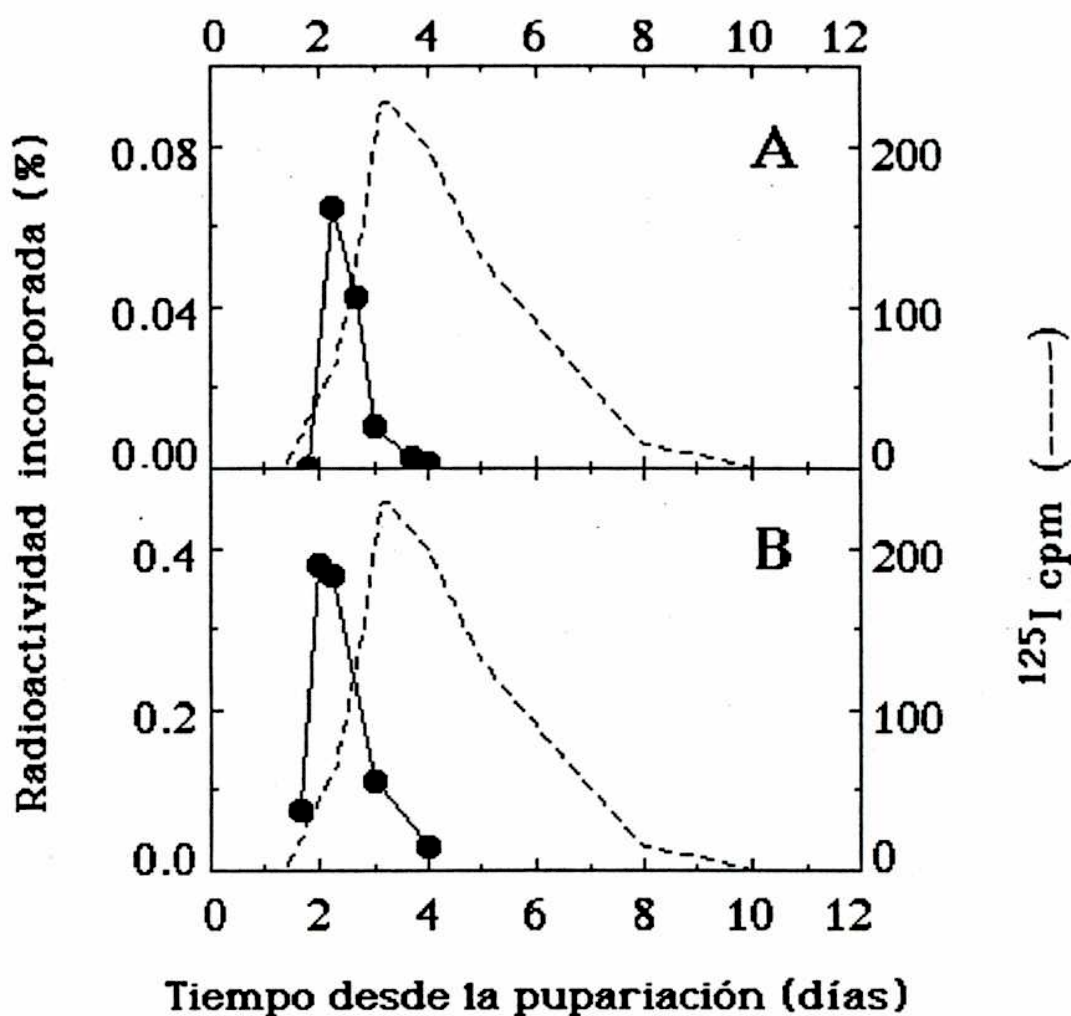


Figura VI.7: La radioactividad incorporada en PCG-100 fue cuantificada cortando la banda correspondiente en los geles mostrados en las figuras VI.4 y VI.6 y contando en un centelleador. Los resultados se expresan como porcentaje de la radioactividad total incorporada. A: radioactividad en PCG-100 aislada por inmunoprecipitación. B: radioactividad en PCG-100 extraída de cutículas disecadas. La línea punteada indica la cantidad total de PCG-100 inmunodetectada en análisis de "Western blot" (ver figura IV.10, página 103).

Los valores de incorporación de [^{35}S]-metionina en PCG-100, expresados como porcentaje de la incorporación en proteínas totales, se grafican en la figura VI.7 A y B. La figura VI.7 A muestra el porcentaje de incorporación en PCG-100 inmunoprecipitada a partir de extractos totales, lo cual es una medida de la síntesis de esta proteína. En la figura VI.7 B, se cuantifica la radioactividad de PCG-100 extraída de cutícula, lo cual es una medida de la síntesis y deposición en conjunto. En ambas resultó que la marca en PCG-100 fue indetectable a las 40-43 hs y alcanzó rápidamente un máximo a las 48-54 hs. Esto sugiere que PCG-100 se deposita en cutícula tan pronto como se sintetiza y que no permanece "almacenada" previamente a su deposición en cutícula, lo cual fue confirmado posteriormente mediante experimentos de pulso y "chase". Luego, a las 72 hs la síntesis decayó y fue prácticamente nula a las 96 hs.

El decaimiento de la síntesis observado a los tres días pareció mas abrupto cuando se midió la radioactividad inmunoprecipitada que cuando se la cuantificó extrayendo la proteína de cutículas disecadas. Esto puede explicarse por la dilución de la PCG-100 marcada con la proteína "fría" acumulada a esta edad. La radioactividad recuperada por inmunoprecipitación sería proporcional a la actividad específica de PCG-100 en los extractos. En cambio, toda la radiomarca incorporada en PCG-100 sería detectada cuando se la extrae de cutículas disecadas.

Estos experimentos muestran claramente que la síntesis de PCG-100 se "dispara" abruptamente a las 48 horas y después de unas 12 horas decae. La proteína sintetizada y acumulada en la cutícula en este período permanece presente durante todo el estadio pupal (hasta el 7^{mo} día) (ver línea punteada en la figura VI.7).

Discusión.

1. Radiomarcación de proteínas cuticulares *in vivo*.

La mayor parte de los estudios sobre biosíntesis de componentes cuticulares realizados por otros autores en otros insectos fueron llevados a cabo por medio de incubaciones *in vitro* de tegumento o de discos imaginales (Willis et al., 1981; Doctor et al., 1985). Si bien ésto permite variar en forma controlada las condiciones del medio de cultivo (concentraciones de hormona, de nutrientes, etc.) se trata de ensayos realizados en condiciones no-fisiológicas. En nuestro caso, mediante microinyecciones, resultó posible analizar -por primera vez *in vivo*- la biosíntesis de proteínas cuticulares, es decir en condiciones estrictamente fisiológicas.

El método de radiomarcación por microinyección, puesto a punto para *Ceratitis capitata* resultó altamente reproducible y -dentro de ciertos límites- no interfirió con el normal desarrollo de los insectos, por lo cual pudieron emplearse tiempos prolongados de incubación (ver también el capítulo VII). Por medio de esta técnica se radiomarcaron las proteínas cuticulares pupales de *Ceratitis capitata* con [³⁵S]-metionina.

Se han descripto numerosos casos en los que no se logra incorporar [³⁵S]-metionina a proteínas cuticulares (ver Introducción). La secuencia de nucleótidos de las LCP2, LCP3 y LCP4 de *Drosophila melanogaster* predice proteínas libres de metionina y cisteína, a excepción de la metionina inicial (Snyder et al., 1982). En *Sarcophaga bullata* (díptero), no existe metionina ni cisteína en la secuencia aminoacídica de las proteínas larvales SC1, SC4 y SC6 (Henzel et al., 1985). La secuencia de un clon de *Manduca sexta* (lepidóptero) que codifica para LCP-15 también indica la ausencia de metionina en esta proteína (Rebers y Riddiford, 1988).

Hay pocos datos acerca de la presencia de metionina en proteínas cuticulares pupales. Algunas PCP de bajo peso molecular de *Drosophila* parecen estar libres de metionina (Henikoff et al., 1986). En el caso de *Ceratitis capitata*, hemos obtenido incorporación de [³⁵S]-metionina en la PCP mayoritaria (PCG-100) y en otras PCP. Esto facilitó el estudio *in vivo* de la biosíntesis de estas proteínas a lo largo del desarrollo.

2. Síntesis *in vivo* de proteínas cuticulares pupales.

Después de la radiomarcación *in vivo* con [^{35}S]-metionina se realizó la microdisección individual de las cutículas y se analizaron las proteínas extraídas de la cutícula. Las proteínas radiomarcadas observadas a las 40 hs (ver figura VI.4, página 126) serían las primeras en ser depositadas en la cutícula pupal. Las bandas observadas a esta edad no parecieron coincidir con ninguna de las bandas mayoritarias identificadas como PCP en preparaciones masivas (ver capítulo III, 3.2). Esto podría deberse a varias razones: es probable que estas proteínas no sean procuticulares, sino provenientes de la epicutícula, cuya composición es muy poco conocida en general. También podría ser que fueran procuticulares y que al depositarse sucesivas capas internas en la cutícula las proteínas depositadas a 40 hs podrían pasar a ser componentes minoritarios o resultar modificadas, haciéndose menos extraíbles y desaparecerían del perfil de PCP descrito. Por otra parte, en momentos tempranos del estadio pupal existen dificultades técnicas en la disección manual de la cutícula, dado que ésta es todavía muy delgada y por lo tanto resulta difícil separarla de la hipodermis, de modo que no puede descartarse por completo que algunas de estas proteínas sean no cuticulares y provengan de material celular contaminante.

A las 48 hs se observó un cambio notorio en el perfil electroforético y en el patrón de síntesis de PCP. Muchas de las bandas proteicas observadas a edades más tempranas desaparecieron, la síntesis de PCG-100 y otras proteínas minoritarias se disparó abruptamente y comenzó a ser detectable la acumulación de PCG-100 en la cutícula. Sabemos que en este momento se producen cambios morfológicos asociados a la pupación. Hasta las 44 hs la pupa es criptocefálica, es decir sin cabeza visible. Entre las 44 y 48 horas se observó la eversión de la cabeza (estadio llamado "cabeza trilobular", Rabossi et al., 1991). Durante las 24 hs siguientes, hasta las 72 hs, se obtuvo el mismo perfil de síntesis, siendo la PCG-100 la proteína radiomarcada más abundante.

El perfil de síntesis de PCG-100 quedó determinado sin ambigüedades a partir de los experimentos de radiomarcación e inmunoprecipitación con suero específico. Cuando no se produjo aún la eversión de la cabeza de la pupa (43 hs en la figura VI.6), la síntesis fue indetectable. Inmediatamente después de evertida la cabeza (44-48 hs) la incorporación de [³⁵S]-metionina en PCG-100 alcanzó su máximo valor. Unas 12 horas más tarde decayó, y fue prácticamente nula cuando la morfología de la pupa no presentó más cambios (3-4 días) (ver figura VI.6).

Aparentemente la síntesis de PCG-100 es tardía, es decir ocurriría cuando ya existen las capas más externas de la cutícula pupal (epicutícula y posiblemente las primeras capas de la procutícula) por lo que se deduce que no forma parte de éstas, sino que se halla confinada a las capas internas. En *Drosophila melanogaster*, la PCP-82 -proteína que presentó reacción inmunológica cruzada con PCG-100 (ver IV, 3.4)- también se expresa tardíamente (Doctor et al., 1985). En este caso, la localización ultraestructural de PCP-82 se conoce por inmunolocalización mediante microscopía electrónica: se la detectó en las laminillas internas, pero no en las capas externas de la procutícula. En estas últimas se localizan las PCP de bajo peso molecular, las cuales son sintetizadas más tempranamente (Fristrom et al., 1986; Wolfgang et al., 1986; Doctor et al., 1985).

La incorporación de [³⁵S]-metionina a PCPs fue disminuyendo hacia las 72 hs y al cuarto día dejó de detectarse, sugiriendo que en este momento la síntesis y deposición de proteínas en la cutícula pupal habría cesado. A edades mayores no se observaron nuevos cambios en el perfil electroforético de PCP, hasta que se produjo la muda a adulto en el séptimo día (figura III.9).

La cutícula de adulto farado comenzó a ser depositada hacia el sexto día (Rabossi et al., 1991), lo cual indicaría que entre el fin de la deposición de la cutícula pupal (4 días) y el inicio de la deposición de la cutícula siguiente (6 días) existiría un período en el cual la actividad secretoria de la epidermis en lo que respecta a síntesis de proteínas cuticulares parece ser muy baja.

Algo similar a lo descripto más arriba para *Ceratitis* parece ocurrir en *Drosophila melanogaster*: Se observa síntesis de PCP-82 y PCP-56 entre las 14-18 horas después de la pupariación. Hacia las 24 horas las PCP son todavía extraíbles pero no se detecta síntesis (Doctor et al.,1985). A su vez, ésto parece ser distinto de lo que ocurre en la cutícula larval, en la que las proteínas cuticulares parecen ser sintetizadas durante todo el estadio, inclusive poco antes de la muda (Kimbrell et al.,1988; Rebers y Riddiford, 1988). En *Drosophila melanogaster*, las LCP3, LCP4 y LCP5 se expresan principalmente en la etapa temprana del tercer estadio larval, en tanto que las LCP1 y LCP2 son predominantemente sintetizadas al final del mismo estadio (Kimbrell et al., 1988). Por otra parte, en *Manduca sexta* existe una familia multigénica de proteínas cuticulares que se expresa también al final del último estadio larval (Rebers y Riddiford, 1988).

Todo parece indicar que en los estadios larvales de dípteros ocurriría un continuo engrosamiento de la cutícula, eventualmente con cambios en la composición proteica, en tanto que en la pupa, la cutícula parecería depositarse tempranamente, completándose bastante antes del fin del estadio. Los cambios en la composición proteica de la cutícula larval podrían estar relacionados con las distintas funciones que esta cutícula desempeña. Durante el estadio larval, en el ambiente húmedo del alimento es una cutícula muy flexible. Justo antes de la pupariación, la cutícula larval de los dípteros ciclorrafos "se prepara" para convertirse en pupario, perdiendo flexibilidad (ver Introducción). Durante el estadio pupal el insecto no cambia de tamaño. La cutícula pupal tiene como función principal la de aislar al animal durante la metamorfosis, la cual se desarrolla por completo dentro del pupario. Una vez depositada, la cutícula pupal permanecería inalterada hasta la próxima muda.

Nuestros resultados en *Ceratitis capitata*, conjuntamente con lo observado anteriormente en *Drosophila* sugieren que la cutícula pupal presentaría capas de distinta composición, las cuales corresponderían a "oleadas" de distintas proteínas, cuya aparición estaría regulada en el tiempo, muy probablemente por la acción de la hormona de la muda sobre la expresión del genoma. (Doctor et al.,1985). En particular, la proteína cuticular pupal mayoritaria de *Ceratitis*, PCG-100, se sintetizaría sólo en el breve período de tiempo transcurrido desde la eversión de la cabeza hasta

el alcance de la morfología definitiva de la pupa (48-72 hs), lo cual sugiere que existiría un control estricto en el "encendido" y "apagado" del gen correspondiente. En última instancia, sería la β -ecdisona la que controlaría la composición proteica del exoesqueleto.

En el caso de las PCP de *Drosophila melanogaster*, la acción regulatoria de la β -ecdisona parece ser bastante compleja. En discos imaginales incubados *in vitro*, la β -ecdisona induce la síntesis de PCP de bajo peso molecular. Para que se produzca la síntesis de las PCP de alto peso molecular, se requiere secuencialmente una disminución y luego una elevación en los niveles de β -ecdisona (Fristrom et al., 1982; Doctor et al., 1985). Es decir, la inducción de estos genes por la β -ecdisona no parece ser simplemente la activación de la transcripción provocada por la unión del complejo receptor-hormona a una secuencia sensible del DNA. En *Drosophila melanogaster*, no está claro si los genes de LCP son regulados directamente por la β -ecdisona. El gen que codifica para LCP-2 no parece contener secuencias sensibles a hormona (Kimbrell, 1989).

La β -ecdisona es capaz de regular la expresión genómica no sólo mediante la activación de la transcripción, sino también a nivel traduccional. Este es el caso de las proteínas de hemolinfa de *Calliphora*, *Drosophila melanogaster* y *Ceratitis capitata* (Mintzas et al., 1983; Schenkel y Scheller, 1986 y referencias citadas en Schenkel y Scheller, 1986). Estas proteínas son sintetizadas durante el estadio larval, al subir los niveles de hormona al comienzo de la metamorfosis la síntesis cesa y los mensajeros están aun presentes. La degradación de éstos ocurre luego, con el aumento gradual de la concentración de β -ecdisona. Es de destacar que en este caso los resultados obtenidos *in vitro* difieren de los *in vivo*. *In vitro* se obtuvo síntesis de proteínas de hemolinfa durante todo el tiempo en que los mRNA están presentes (Mintzas et al., 1983; Schenkel y Scheller, 1986). También fueron realizados *in vitro* (incubación de discos imaginales) los estudios de síntesis de proteínas cuticulares pupales en *Drosophila melanogaster* (Fristrom et al., 1982; Doctor et al., 1985). Por el contrario, nuestros estudios en *Ceratitis capitata* realizados por microinyección permiten asegurar que el patrón de síntesis de proteínas cuticulares observado es el que existe *in vivo*.

VII. Glicosilación, procesamiento y secreción de proteínas cuticulares en *Ceratitis capitata*.

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito;
desde el punto de vista intelectual,
estamos en una pequeña isla
en mitad de un océano ilimitable de inexplicabilidad.
Nuestra tarea en cada generación
es recuperar algo más de tierra.

T.H. Huxley, 1887

Se investigaron las modificaciones post-traduccionales de las proteínas cuticulares de distintos estadios de *Ceratitis capitata*, encontrando que varias de ellas están glicosiladas.

Se caracterizaron parcialmente los oligosacáridos de ciertas PCP y se estudió por radiomarcación *in vivo* con 2[³H]-manosa y [¹⁴C]-glucosa el oligosacárido de PCG-100.

Mediante experimentos de pulso y “chase” se estudió la síntesis, secreción y deposición en la cutícula de la proteína cuticular pupal mayoritaria, PCG-100.

Resultados.

1. Presencia de hidratos de carbono en proteínas cuticulares de *Ceratitis capitata*.

Se determinó la presencia de azúcares en LCP, PCP y ACP de *Ceratitis* por separación de las proteínas en SDS-PAGE y tinción mediante la técnica de ácido peryódico/reactivo de Schiff (PAS) como se describe en Materiales y Métodos.

Como se ve en la figura VII.1 C, dos de las LCP (LCG-19 y LCG-17) y algunas PCP de bajo peso molecular (PCG-59, PCG-38, PCG-32 y PCG-17) resultaron positivas a la tinción de PAS.

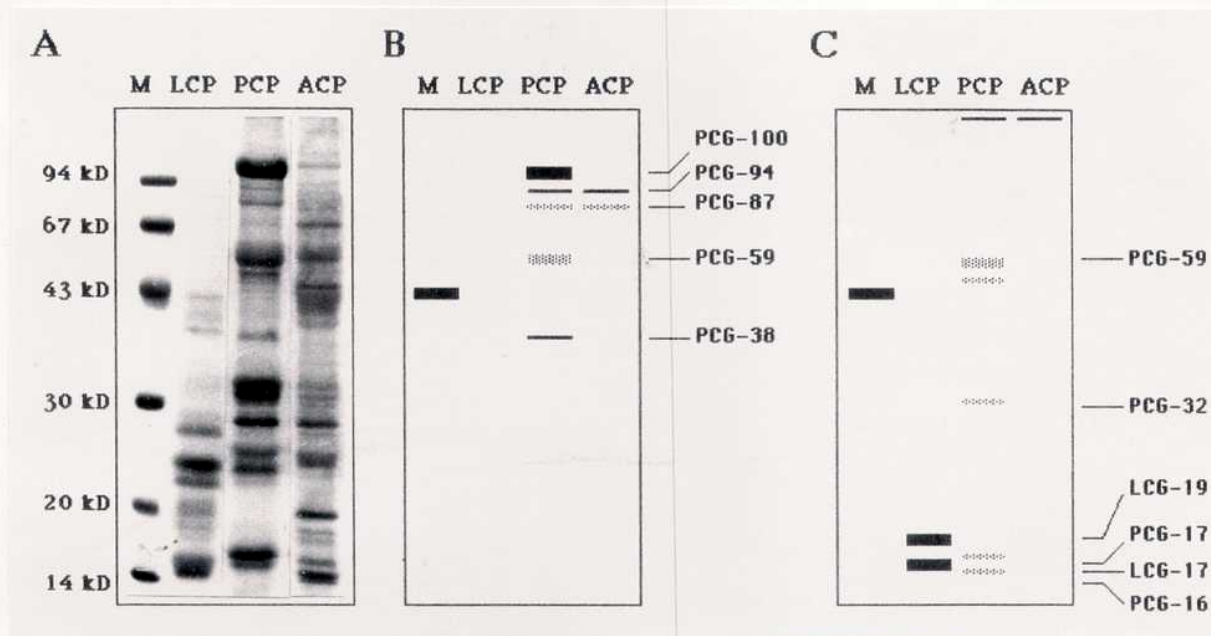


Figura VII.1: Detección de glicoproteínas cuticulares. Se separaron en SDS-PAGE (15%) preparaciones masivas de LCP, PCP y ACP (M: marcadores de peso molecular).

A: Tinción para proteínas (CBBG).

B: Un panel equivalente al mostrado en A fue sometido a electrotransferencia a nitrocelulosa y revelado con Con A seguido de peroxidasa como se indica en Materiales y Métodos.

C: Un panel equivalente a los anteriores fue teñido mediante la técnica de PAS (ver Materiales y Métodos).

El estándar de 43 kD es ovoalbúmina, glicoproteína de alta manosa. A, fotografía del gel; B y C, esquemas.

Se analizó la presencia de glicoproteínas capaces de unir concanavalina A (Con A) por separación en SDS-PAGE, electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa y revelado por Con A/peroxidasa (ver Materiales y Métodos). Se observa en la figura VII.1 B que sólo se detectaron glicoproteínas Con A positivas en las PCP, destacándose por su intensidad una banda cuya movilidad coincidió con la de PCG-100. Las otras proteínas que reaccionaron con la concanavalina A fueron: PCG-94, PCG-87, PCG-59 y PCG-38. A excepción de la PCG-59, éstas no fueron teñidas por PAS, lo cual sugiere que el contenido de azúcares de estas proteínas sería más bien bajo (menor 1%). En el carril correspondiente a ACP, se detectaron bandas de movilidad similar a la de las PCP-94 y PCP-87. Probablemente ésto se deba a la presencia de pupas tardías en la muestra masiva de adultos empleada para la preparación de proteínas cuticulares.

Se comprobó que la unión de Con A a las PCP fue específica realizando el ensayo en presencia del hapteno correspondiente, α -metil-manósido (0.2 M), (ver Materiales y Métodos). En estas condiciones, no se detectaron bandas al revelar con peroxidasa/ 4 Cl-1-naftol (no mostrado), lo cual indica la presencia de oligosacáridos reconocidos específicamente por la Con A.

Se estudió la sensibilidad de PCG-100 a β -endoglucosaminidasa H y β -endoglucosaminidasa F, mediante digestiones enzimáticas seguidas de análisis por "Western blot", revelado con suero específico. Los resultados obtenidos fueron de difícil interpretación, dadas las características de insolubilidad de esta proteína (ver páginas 63-67).

2. Otras modificaciones post-traduccionales.

Se investigó la presencia de fosfato en las PCP por radiomarcación de pupas de 48 y 68 hs de edad con $^{32}\text{PO}_4^-$ y análisis en SDS-PAGE seguido de autoradiografía. Se observa en la figura VII.2 B que a 48 hs se detectaron algunas bandas radiomarcadas, las cuales no parecieron coincidir en movilidad con ninguna de las PCP mayoritarias que son sintetizadas a esa edad (ver figura VII.2 A y capítulo VI, 4.2).

Estas bandas no fueron observadas a las 68 hs, edad a la cual se observó que la síntesis de PCP disminuye (ver capítulo VI).

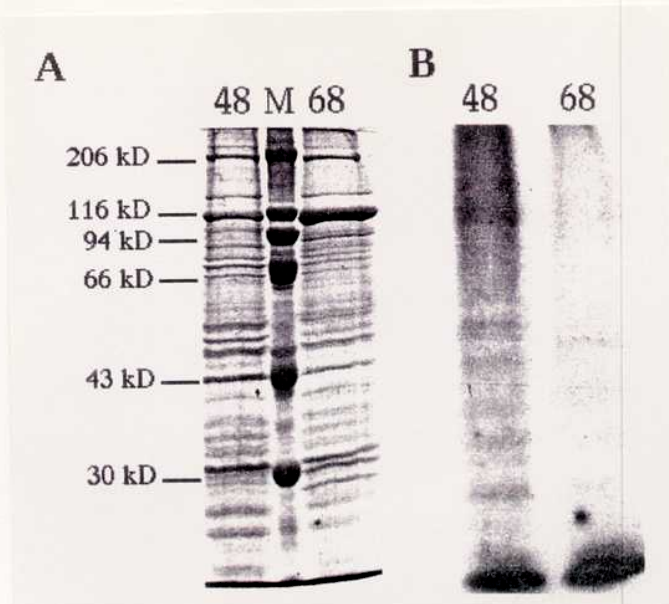


Figura VII.2: Se microinyectaron con 5 μCi de $^{32}\text{PO}_4^-$ pupas de 48 y 68 hs de edad. Después de cuatro horas de incubación *in vivo*, se disecaron las cutículas, se extrajeron las proteínas y se analizaron en SDS-PAGE 10% (A) seguido de autorradiografía (B). Dos individuos por carril.

3. Contenido de azúcares de las PCP.

Para cuantificar el contenido en hidratos de carbono de las distintas PCP, éstas fueron separadas por tamizaje molecular por FPLC en Superosa 6.

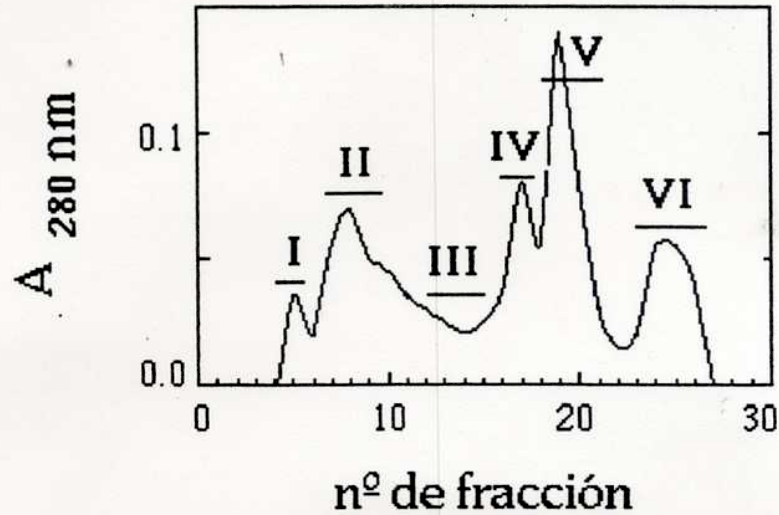
La separación se realizó en presencia de SDS 1%. En ausencia de detergente las proteínas tendieron a agregarse durante la corrida (ver capítulo III, 5.3 y 5.4) y no se obtuvieron fracciones puras: algunas PCP de bajo peso molecular estuvieron presentes en las fracciones enriquecidas en proteínas de alto peso molecular (no mostrado).

Tal como se esperaba, en presencia de SDS 1% las proteínas presentaron un radio de Stokes bastante mayor que el predicho a partir de sus pesos moleculares aparentes en SDS-PAGE. Las PCP fueron separadas eficientemente en presencia de detergente en Biogel A-1.5m, cuyo rango es 10-1500 kD y en Superosa 6 (rango 300-3000 kD), pero no en Sephadex G-200 (rango: 5-600 kD). (Es de hacer notar que la PCP de mayor peso molecular observada en geles desnaturalizantes fue de 100 kD). Este fenómeno ha sido descrito anteriormente (Tanford et al., 1974; Schreurs et al., 1982; Mascher y Lundahl, 1986; Eriksson, 1985) y es atribuido a la formación de micelas de forma más bien cilíndrica, en donde las moléculas de SDS se disponen dentro de una hélice formada por la cadena polipeptídica (Lundahl et al., 1986).

La figura VII.3 muestra el perfil de elución de una preparación de proteínas cuticulares de pupas de 4 días separadas por FPLC en Superosa 6. La composición de cada fracción fue determinada por análisis en mini-PAGE-SDS (figura VII.3 B). No se detectó proteína en el pico I

(ver también tabla VII.1). Se eluyó una fracción muy enriquecida en PCG-100 (pico II), en tanto que las PCP de menor peso molecular fueron obtenidas con menor pureza (ver figura VII.3 B y tabla VII.1)

A



B



Figura VII.3: Cromatografía líquida (FPLC) de PCPs de moscas de cuatro días en Supersosa 6. **A:** Se eliminaron los lípidos precipitando las proteínas en cloroformo/metanol (1:2). Estas se redisolieron en buffer Tris 50 mM pH 7.5, SDS 1% y se separaron en Supersosa 6 en el mismo buffer. **B:** se analizaron en mini-PAGE-SDS 12.5% alícuotas de las fracciones indicadas. **m:** una alícuota de la preparación masiva que fue pasada por la columna.

Se determinó el contenido de hidratos de carbono en las fracciones I-VI señaladas en la figura VII.3 A por el método de fenol-ácido sulfúrico (ver Materiales y Métodos). De la relación de los contenidos de hidratos de carbono y proteína indicados en la tabla VII.1, se deduce que PCG-100 (pico II) contiene aproximadamente 8 monosacáridos por molécula, lo cual equivaldría a 1 ó 2 oligosacáridos del tipo "alta manosa" por molécula de proteína. Esto concordaría con su reacción fuertemente positiva a la Con A y la ausencia de tinción con PAS.

Las otras proteínas presentaron un grado glicosilación similar, aunque no pudo calcularse individualmente por la dificultad de separarlas bien en la cromatografía.

FRACCION	Prot (μ g)*	Azúcar (μ mol manosa)#	Proteínas presentes.++
I	0	0.05	—
II	180	0.014	PCG-100 principalmente
III	0	0	PCG-94, PCG-87, PCG-59
IV	420	0.042	PCG-32, PCP-29, PCP-26
V	0	0.02	PCG-17, PCG-16, PCP-15
VI	0	0	—

Tabla VII.1: Determinación de azúcares en PCP separadas por FPLC (ver figura VII.3)

* La cantidad de proteína fue determinada por el método de Bradford modificado, desarrollado en el transcurso de esta tesis (ver Materiales y Métodos).

Se precipitaron las proteínas en cloroformo metanol (1:2) con el agregado de 250 μ g de BSA como "carrier". Se resuspendió en 100 μ l de agua y se determinó el contenido de hidratos de carbono como se describe en Materiales y Métodos, usando manosa como estándar; blanco: 250 μ g de BSA.

++ La composición proteica de cada pico fue determinada en mini-PAGE-SDS.

Es de destacar que la fracción I, de muy bajo contenido en proteína, presentó aparentemente gran cantidad de hidratos de carbono (ver tabla VII.1). La abundancia de este material resultó variable en distintas preparaciones, pareciendo depender de la edad de las pupas utilizadas. Parece poco probable que se trate de lípidos, pues éstos fueron extraídos en su mayoría previamente, dado que tanto antes como después de la separación en Superosa 6, las proteínas fueron precipitadas en cloroformo/metanol (1:2) (ver Materiales y Métodos).

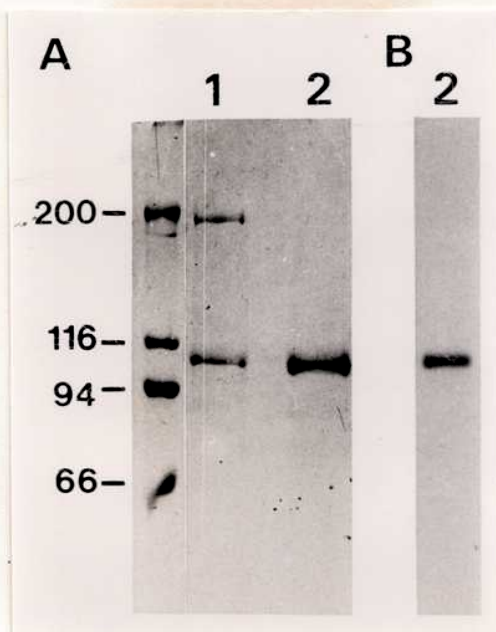
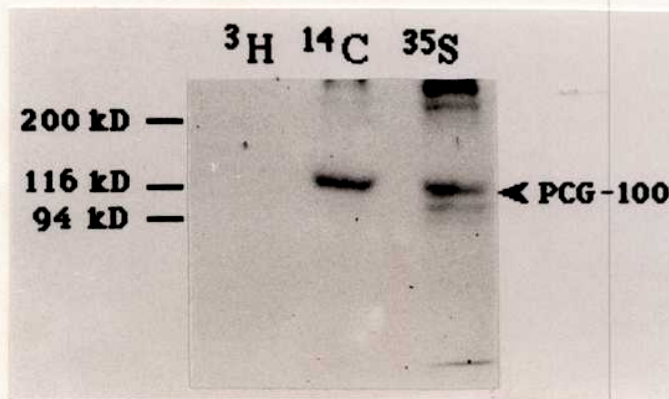
Dado que se trata de material de alto peso molecular, parece probable que se trate de polisacáridos o más probablemente cadenas de quitina unidas a proteína. La existencia de quitino-proteínas (ver Introducción) fue inferida anteriormente en *Triatoma infestans* (Quesada-Allué, 1982) y descriptas en cultivos de una línea celular y discos imaginales de *Drosophila melanogaster* (Mukha et al., 1987).

4. Estudios por radiomarcación *in vivo*.

4.1 Incorporación de azúcares a PCP.

Se radiomarcaron pupas de 48 horas de edad por microinyección con 2[³H]-manosa, [¹⁴C]-glucosa o [³⁵S]-metionina y se analizaron en SDS-PAGE las PCP radiomarcadas (ver figura VII.4). Se observó la incorporación de ¹⁴C a partir de [¹⁴C]-glucosa a varias PCP, destacándose una banda cuya movilidad coincidió con la de PCG-100. El hecho de que algunas proteínas incorporaron ³⁵S pero no ¹⁴C confirma que la incorporación de ¹⁴C se debió a azúcares y no a aminoácidos radiomarcados sintetizados a partir de [¹⁴C]-glucosa durante el tiempo de incubación. No se espera que exista interconversión en incubaciones menores de 6 hs (Quesada-Allué, 1978).

En estas condiciones fue muy difícil detectar la radiomarca de manosa incorporada a PCP (ver figura VII.4). No obstante, se confirmó la incorporación de este azúcar a PCG-100 mediante radiomarcación *in vivo* durante 24 hs con 50 μ Ci de 2[³H]-manosa seguida de inmunoprecipitación (figura VII.5). Se comprobó que durante el período de radiomarcación la cantidad de PCG-100 en cutícula se incrementó notablemente (figura VII.5. A, carriles 1 y 2). Se ve en la figura VII.5 B que aún después de 30 días de exposición, PCG-100 fue la única proteína radiomarcada aislada por inmunoprecipitación con suero específico.



4.2 Azúcares presentes en PCG-100.

Para determinar los monosacáridos presentes en PCG-100, ésta fue radiomarcada *in vivo* con [^{14}C]-glucosa y purificada por inmunoprecipitación con suero específico anti-PCG-100 como se indica en Materiales y Métodos. La pureza de la proteína radiomarcada obtenida fue evaluada analizando una alícuota en SDS-PAGE (ver figura VII.6). Como se comprobó en el caso de marcación con 2[^3H]-manosa, el antisuero resultó específico, ya que PCG-100 fue la única banda observada.

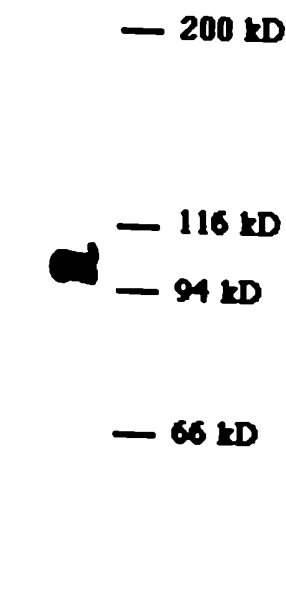


Figura VII.6: Se radiomarcaron durante 4 hs pupas de 48 hs con 10 μCi de [^{14}C]-glucosa, se disecaron las cutículas, se extrajeron las proteínas y se aisló PCG-100 por inmunoprecipitación con suero anti PCG-100 como se indica en Materiales y Métodos. Una alícuota de la preparación fue analizada en SDS-PAGE 10% seguido de fluorografía.

La proteína radiomarcada purificada por inmunoprecipitación fue digerida con proteasa (pronasa) y los glicopéptidos obtenidos fueron sometidos a hidrólisis ácida total como se indica en Materiales y Métodos. Se analizaron los monosacáridos resultantes por cromatografía en papel (ver figura VII.8 A y B). Sorprendentemente, en los distintos sistemas cromatográficos empleados, se detectó fundamentalmente radioactividad con movilidad correspondiente a pentosas, muy probablemente fucosa, y la incorporación de hexosas no pudo ser resuelta claramente, ya que la radioactividad incorporada a estas últimas fue bastante menor.

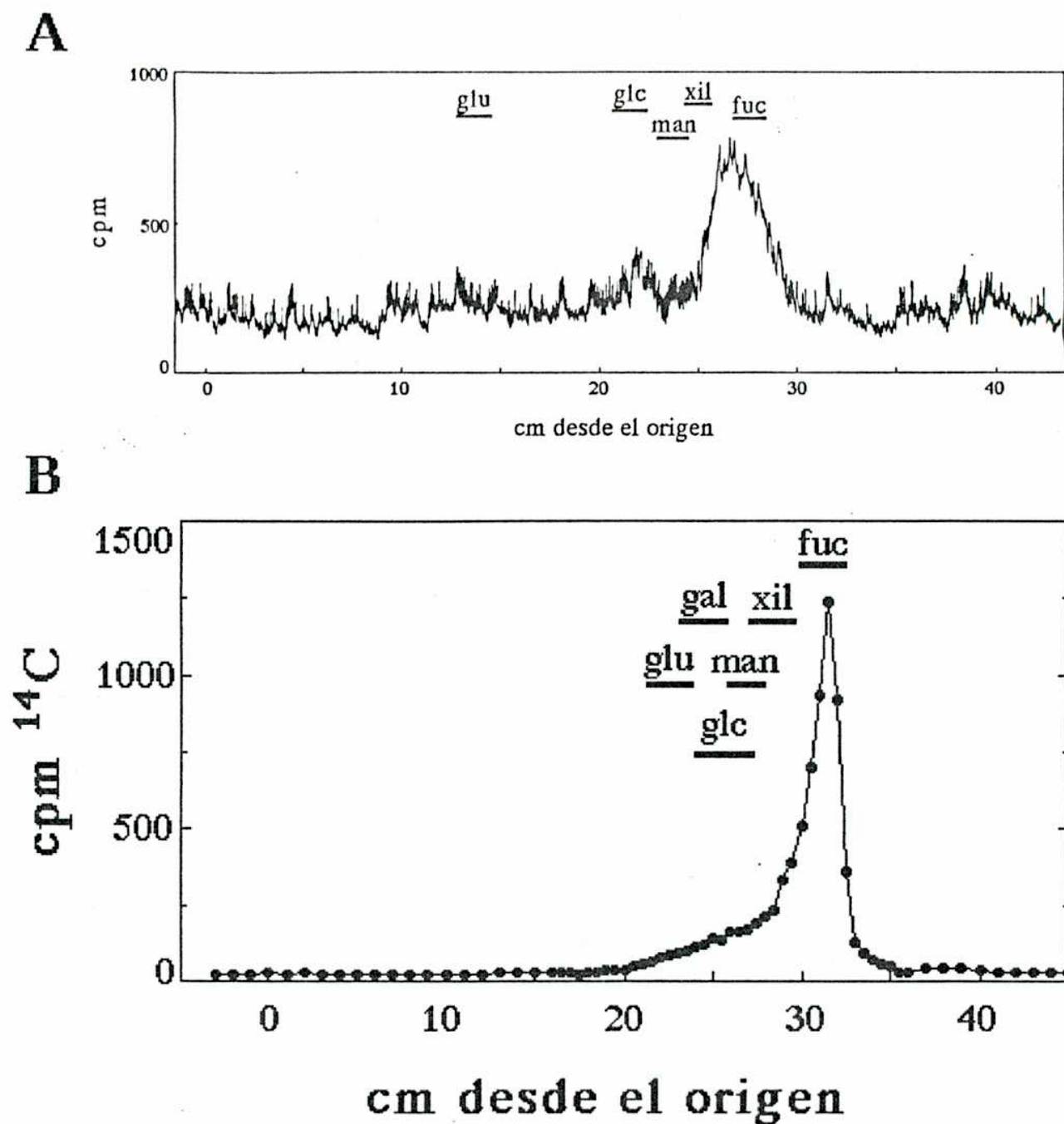


Figura VII.7: Se obtuvieron monosacáridos de PCG-100 radiomarcada *in vivo* con [^{14}C]-glucosa como se detalla en Materiales y Métodos y se analizaron por cromatografía en papel utilizando como solventes de desarrollo OI-38 (A) o ISACH (27:4:9) (B) (ver Materiales y Métodos). La radioactividad fue detectada en un "scanner" (A) o contando en un centelleador (B) como se indica en Materiales y Métodos. glu: ácido glucurónico; gal: galactosa; glc: glucosa; man: manosa; xil: xilosa y fuc: fucosa.

4.3 Presencia de fucosa en PCG-100.

La presencia de fucosa en PCG-100 fue confirmada analizando los monosacáridos marcados mediante microinyección con 2[^3H]-manosa. Como se ve en la figura VII.8 se detectó radioactividad en las posiciones correspondientes a manosa y fucosa, en cantidades aproximadamente equivalentes.

Dado que la marca de ^3H en el carbono 2 de la manosa se pierde al metabolizarse (siguiendo la vía manosa 1-fosfato — manosa 6-fosfato — fructosa 6-fosfato) excepto que la conversión sea manosa 1-fosfato — GDP-manosa — GDP-fucosa, puede asegurarse que el monosacárido radiomarcado que migra como fucosa en este sistema cromatográfico es fucosa sin lugar a dudas.

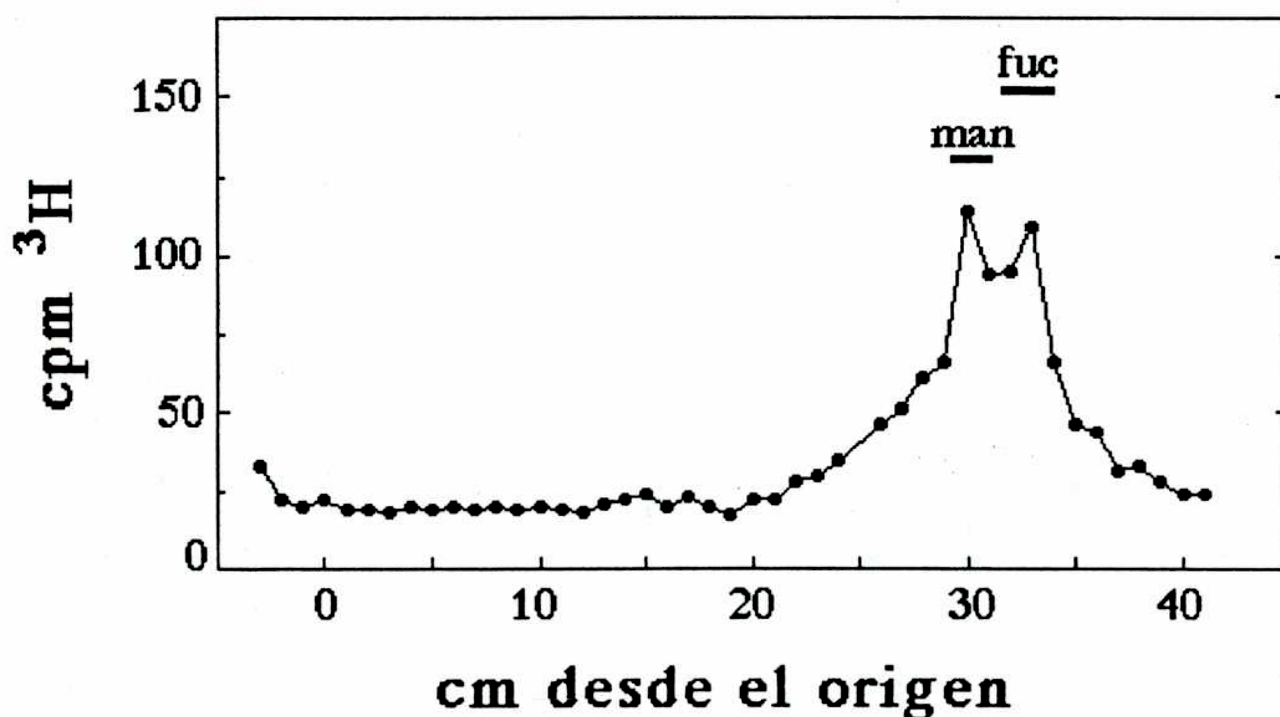


Figura VII.8: Se obtuvieron monosacáridos de PCG-100 radiomarcada *in vivo* con 2[^3H]-manosa (A) como se detalla en Materiales y Métodos y se analizaron por cromatografía en papel utilizando ISACH (27:4:9) como solvente de desarrollo. La radioactividad fue medida cortando el papel y contando en un centelleador como se indica en Materiales y Métodos. *man*: manosa y *fuc*: fucosa.

5. Síntesis, procesamiento y deposición de PCG-100 en la cutícula.

5.1 Cinética.

Se estudió el proceso de síntesis, procesamiento y deposición en cutícula de PCG-100 mediante experimentos de radiomarcación con [^{35}S]-metionina y "seguimiento" de la marca (pulso y "chase"). Se radiomarcaron pupas a la edad en que la incorporación de [^{35}S]-metionina a esta proteína es máxima (48-64 hs) y se realizó "chase" *in vitro* en presencia de metionina fría en exceso, como se describe en Materiales y Métodos. Se analizaron por SDS-PAGE las proteínas extraídas de cutícula. La figura VII.9 A y B corresponde a un experimento de 20 minutos de marcación seguida de "chase" de distintos tiempos. La figura VII.9 A muestra que después de los 20 minutos de pulso se detectó PCG-100 radiomarcada depositada en cutícula. Durante el período de "chase", la cantidad de PCG-100 en cutícula continuó aumentando y alcanzó valores constantes a los 30 minutos (ver figura VII.9 B). Esto indica que PCG-100 sería exportada en menos de 20 minutos y que 30 minutos después de su síntesis, la deposición en la cutícula se habría completado.

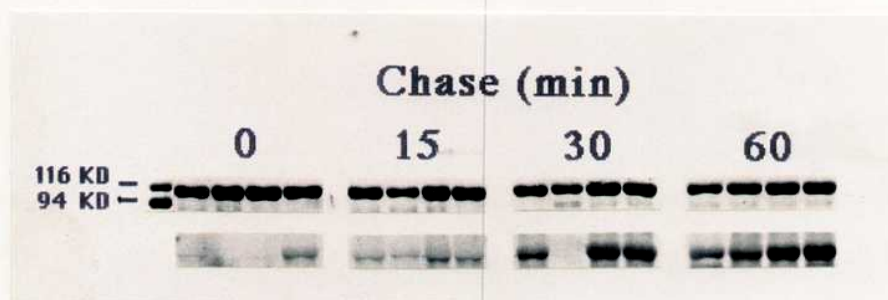
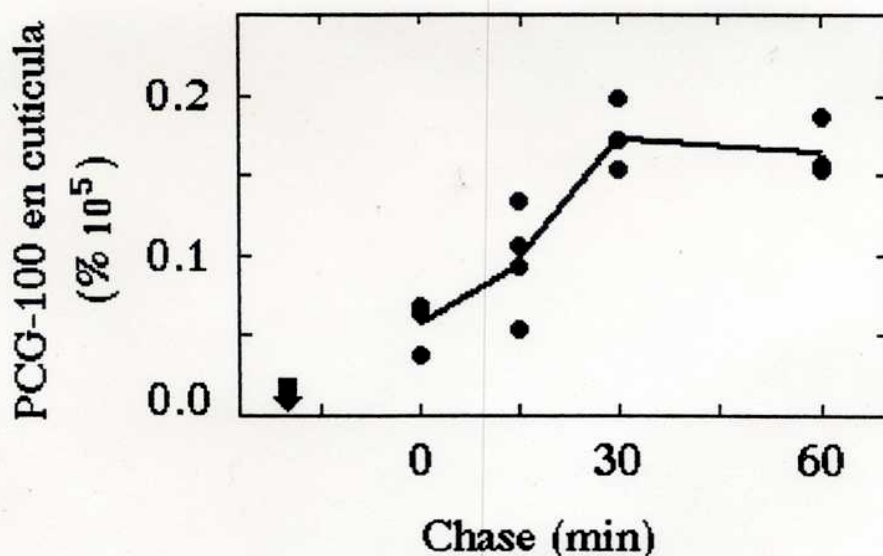
A**B**

Figura VII.9: Se microinyectaron pupas de 54 hs con 0.2 μ Ci de [³⁵S]-metionina. Después de 20 minutos, se lavaron con abundante agua, se cortaron longitudinalmente e inmediatamente se sumergieron en 200 μ l de medio de Grace conteniendo 10 mg/ml de metionina "fría". A distintos tiempos, los insectos fueron congelados en grupos de cuatro. Después de una homogeneización suave se recuperaron las cutículas, se extrajeron las proteínas y se analizaron en SDS-PAGE 10%. **A:** Paneles superiores: tinción para proteínas (CBBG). Paneles inferiores: correspondiente fluorografía. **B:** La radioactividad en PCG-100 en el gel A fue cuantificada como se describe en Materiales y métodos. Cada punto representa un animal. La flecha indica el momento en que se aplicó la inyección.

5.2 Especies moleculares de PCG-100 antes de su deposición.

Nos propusimos identificar por inmunoprecipitación la(s) especie(s) de PCG-100 durante su procesamiento, exportación y deposición en cutícula. Para ésto se realizaron experimentos de pulso y "chase" similares al anterior, reduciendo la duración del pulso a 10 minutos y aumentando la cantidad de metionina no radioactiva (relación final metionina/[^{35}S]-metionina: 5×10^5). De este modo la incorporación total de marca se mantuvo constante durante todo el tiempo de "chase". La radioactividad incorporada en PCG-100 también permaneció constante (tabla VII.2).

En la figura VII.10 se observa que la PCG-100 sintetizada durante un pulso de 10 minutos fue detectada en cutícula 10 minutos más tarde. La deposición en cutícula de la proteína radiomarcada continuó hasta unos 40 minutos después de iniciado el "chase".

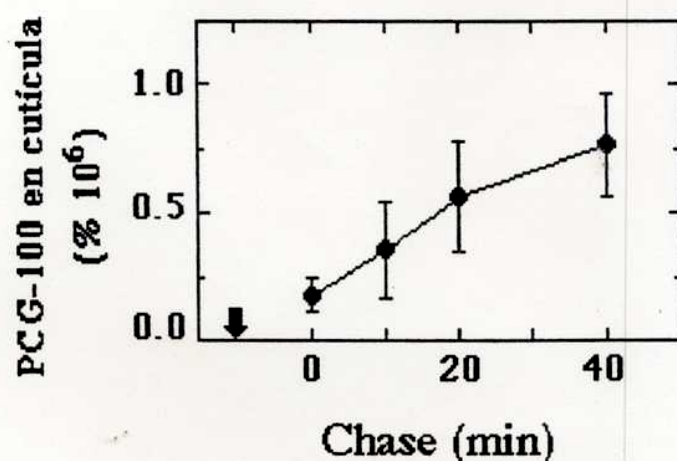


Figura VII.10: Se microinyectaron pupas de 52 horas con $0.7 \mu\text{l}$ de [^{35}S]-metionina. Después de 10 min de marcación se realizó el "chase" en $500 \mu\text{l}$ de medio de Grace conteniendo 25 mg/ml de metionina no radioactiva. Se utilizaron cuatro individuos por punto para determinar la radioactividad incorporada en PCG-100 extraída de cutícula como en la figura VII.9. La flecha indica el momento de la microinyección.

Teniendo en cuenta estos resultados, se esperaba que fuera posible detectar por inmunoprecipitación la(s) forma(s) intracelular(es) de PCG-100 a los 0 minutos de "chase" (ver figura VII.10). A los 10 y 20 minutos se esperaba detectar tanto las especies intracelulares como la extracelular depositada en cutícula; y fundamentalmente esta última a los 40 minutos de "chase". Efectivamente, la movilidad en SDS-PAGE de la proteína inmunoprecipitada a 40' de "chase" coincidió con la de PCG-100 extraída de cutícula analizada en el mismo gel (no mostrado).

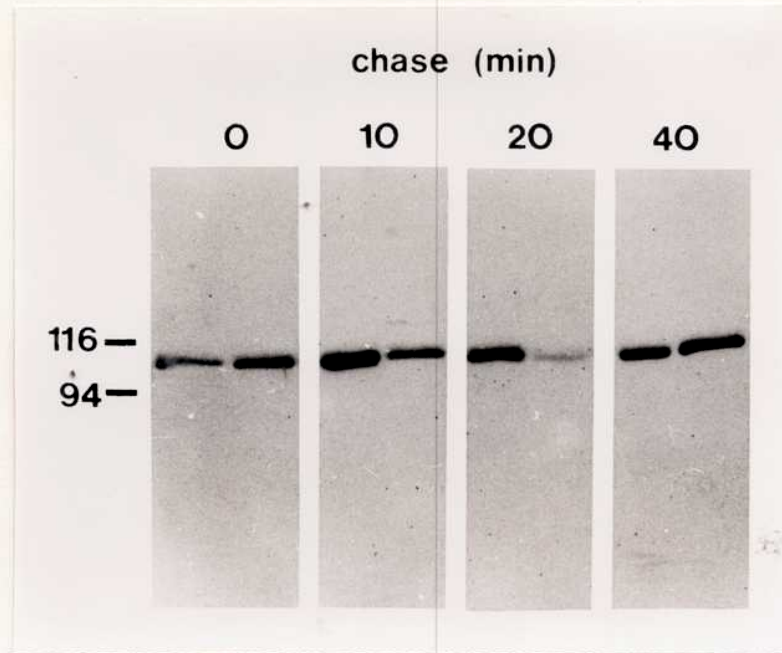


Figura VII.11: En el mismo experimento de pulso y "chase" de la figura VII.10, dos individuos por punto fueron empleados para inmunoprecipitar con antisuero específico anti-PCG-100. Los inmunoprecipitados fueron analizados en SDS-PAGE 7.5% seguido de fluorografía.

Tiempo de "chase":	0'	10'	20'	40'
cpm PCG-100/cpm incorp.	0.37	0.49	0.48	0.44
(% x 10 ⁵):	0.43	0.89	0.65	0.58

Tabla VII.2: Se cuantificó la radioactividad de PCG-100 inmunoprecipitada cortando y contando la banda correspondiente en el gel de la figura VII.11. Los resultados se expresan como porcentaje de la radioactividad total incorporada.

Como se ve en la figura VII.11, a todo tiempo de “chase” se detectó en SDS-PAGE una única banda cuya movilidad pareció coincidir con la de la forma madura depositada en cutícula. Es decir que por este método no se detectaron cambios de peso molecular en PCG-100 a lo largo del proceso de síntesis, glicosilación, procesamiento, exportación y deposición en cutícula (ver Discusión).

Discusión.

1. Modificaciones post-traduccionales.

Es común la presencia de oligosacáridos en las proteínas de estructuras extracelulares. Ejemplo de esto son las glicoproteínas y proteoglicanos de la pared celular de las plantas y hongos, los proteoglicanos de la matriz extracelular de los vertebrados (ver Introducción). Hemos encontrado que algunas de las proteínas cuticulares de *Ceratitis capitata* están glicosiladas. Se detectaron glicoproteínas en las LCP y PCP por tinción con ácido peryódico-reactivo de Schiff. Algunas PCP mostraron afinidad por concanavalina A (ver figura VII.1). En cambio, con ninguno de los dos métodos hemos detectado glicoproteínas entre las ACP.

En *Lucilia* (Skelly y Howells, 1987) y en *Drosophila* (Silvert et al, 1984) las LCP presentan escaso o nulo contenido en azúcares. Por el contrario, las PCP de alto peso molecular de *Drosophila* contienen entre 3 y 7% de hidratos de carbono (Silvert et al, 1984). Las PCG de *Ceratitis capitata* presentaron un promedio de 1.4-1.8% de azúcares (ver tabla VII.1).

Willis (1987) sugiere que las proteínas de cutículas blandas presentan mayor grado de glicosilación que las que provienen de cutículas duras. Esto no parece aplicable a los dípteros. El estadio adulto de estos insectos presenta muchas estructuras cuticulares rígidas, lo cual podría explicar la ausencia de oligosacáridos en las ACP provenientes de dichas estructuras. En la cutícula abdominal del adulto y en la cutícula larval, no esclerotizadas, podría esperarse -de acuerdo a lo postulado por Willis (1987)- la existencia de polipéptidos glicosilados. Este no parece ser el caso de *Lucilia* (Skelly y Howells, 1987), *Drosophila* (Silvert et al, 1984) y *Ceratitis* (esta tesis).

Por radiomarcación in vivo con [³²P]-fosfato no se detectaron proteínas fosforiladas entre las PCP mayoritarias de *Ceratitis capitata*. En *Hyalophora cecropia*, tampoco se vió fosforilación de las proteínas cuticulares de larva pupa o adulto por tinción con verde de metilo (Cox y Willis, 1987b).

2. Glicosilación y procesamiento de PCG-100.

Hemos encontrado que PCG-100 une con A específicamente, lo cual indica la presencia de manosas del tipo encontrado comunmente en oligosacáridos N-unidos de alta manosa (M₅-M₉) (I y II en la figura VII.12) y también en estructuras denominadas híbridas (III y IV en la figura VII.12).

El contenido en azúcares fue de aproximadamente 8 monosacáridos por molécula, lo cual sugiere que no existirían más de 1-2 oligosacáridos por molécula de glicoproteína. La presencia de manosa en PCG-100 fue confirmada por radiomarcación *in vivo* con 2[³H]-manosa y análisis cromatográfico (ver figuras VII.5 y VII.8). En esos experimentos se detectó también la incorporación de fucosa a PCG-100.

Con la intención de determinar los azúcares presentes en PCG-100, se realizaron experimentos de radiomarcación *in vivo* con [¹⁴C]-glucosa y posterior análisis cromatográfico de los monosacáridos radiomarcados. Fucosa resultó ser el monosacárido radiomarcado mayoritario. La radiomarca incorporada a hexosas fue bastante menor, para lo cual existen varias explicaciones posibles:

i) Si el proceso de glicosilación, procesamiento, secreción y deposición en cutícula fuera lo suficientemente lento, es posible que sólo sean detectadas las últimas modificaciones que ocurren en la molécula de PCG-100. Es decir, aparecerían radiomarcadas sólo los últimos azúcares que se agregan al oligosacárido. En este caso, sería la fucosa agregada en el Golgi medio, vía GDP-fucosa. Este no parece ser el caso, pues los experimentos de pulso y "chase" indicaron que la síntesis, procesamiento y deposición de PCG-100 en la cutícula tendría lugar en unos 10 minutos, lo cual es bastante menos tiempo que el lapso de 4 hs en que se llevó a cabo el experimento de radiomarcación con [¹⁴C]-glucosa.

ii) Parece más probable que el factor limitante sea la disponibilidad de dadores de azúcares (nucleótido-azúcar y lípido-azúcar) radiomarcados formados por conversión de la glucosa-6-fosfato. Es posible que la conversión a nucleótido-azúcares ocurra rápidamente y que la formación de dolicol-PP-oligosacárido (NAcGlc₂Man₉Glc₃) sea mas lenta. Esto podría explicar que no se detecte la incorporación de manosa o N-acetilglucosamina, las cuales serían transferidas en bloque vía

dolicol-PP-NAcGlc₂Man₉Glc₃. El hecho de que se observe la incorporación de fucosa radiomarcada (la cual entraría directamente vía GDP-fucosa) sugiere que probablemente sea el principal azúcar transferido al oligosacárido durante el procesamiento en el aparato de Golgi. Se trataría de un oligosacárido poco sustituido, con manosas expuestas, lo cual concordaría con la afinidad por Con A observada.

iii) No puede descartarse que la concentración endógena de ciertos azúcares sea tal que se diluya notablemente la actividad específica de los correspondientes compuestos radiomarcados formados por conversión de la glucosa-1-fosfato.

La presencia de fucosa ha sido descripta en oligosacáridos O-unidos y N-unidos, ya sea del tipo "complejo" o "híbrido" (Kornfeld y Kornfeld, 1985; Montreuil et al., 1986) (ver figura VII.12). En los oligosacáridos N-unidos del tipo complejo, la fucosa se encuentra comunmente unida a la N-acetilglucosamina proximal, mediante enlace α -1,6 en mamíferos y α -1,3 en plantas (Faye et al., 1989).

En el reino animal, existen escasos datos acerca de la presencia de fucosa en oligosacáridos de alta manosa. En la hemocianina de *Helix pomatia* (caracol de agua dulce), se describió la presencia de estructuras similares a la IV (ver figura VII.12) (van Kuik et al., 1985). En este caso la fucosa está unida mediante enlace α -1,6. En insectos, trabajos recientemente realizados en el IIB indican la existencia de residuos de fucosa en oligosacáridos de alta manosa provenientes de proteínas totales de estadio pre-pupal de *Ceratitis capitata* (Guillén et al., 1989). Hasta nuestro conocimiento, éste y el caso de PCG-100 son los únicos casos que demuestran directamente la presencia de residuos de fucosa en glicoproteínas de alta manosa de artrópodos. En *Drosophila melanogaster* se analizó la composición en hidratos de carbono de las distintas PCP encontrándose que los principales azúcares presentes son glucosamina, galactosamina y manosa, en menor medida galactosa y glucosa y, probablemente, trazas de fucosa (Silvert et al., 1984). En *Hyalophora cecropia*, se detectó la presencia de α -L-fucosa en proteínas cuticulares de larva, pupa y adulto por unión de lectina de *Ulex europaeus* L. Aparentemente, esas proteínas mostraron además afinidad por Con A (Cox y Willis, 1987b).

En plantas, es común la existencia de oligosacáridos con manosa, fucosa y xilosa, cuya estructura se esquematiza en III y IV (figura VII.12) (Faye et al., 1989).

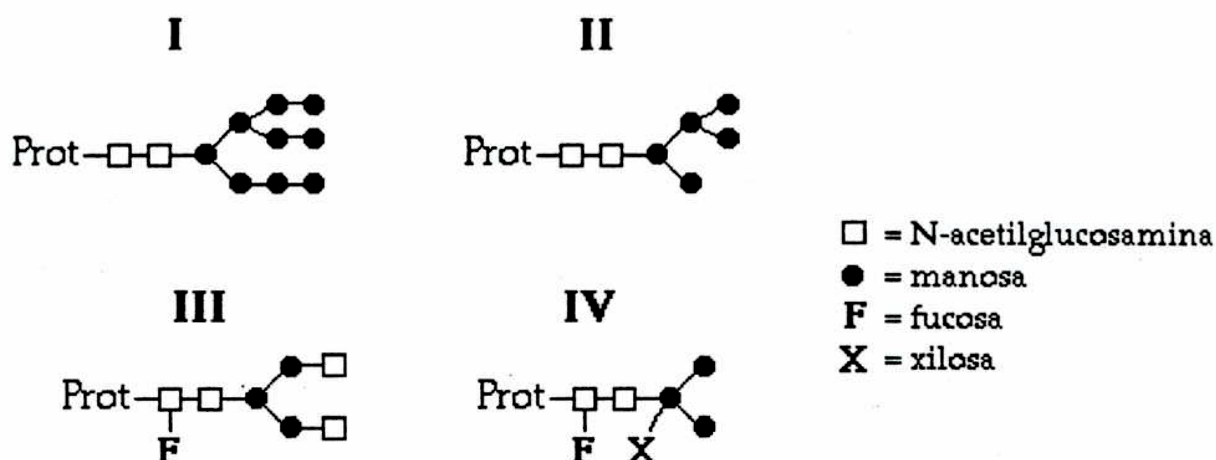


Figura VII.12: Algunas de las estructuras de oligosacáridos unidos a asparagina (ver texto). La estructura IV fue descrita en moluscos por van Kuik et al. (1985) y en plantas por Faye et al. (1989).

Las estructuras de los oligosacáridos presentes en glicoproteínas de insectos han sido poco estudiadas. En lo que respecta a glicoproteínas cuticulares, se han realizado análisis de la composición en hidratos de carbono (Silvert et al., 1984) y estudios mediante el reconocimiento por lectinas (Cox y Willis, 1987b) pero no se describieron con mayor detalle los tipos de oligosacáridos presentes (ver tabla VII.3). La proteína cuticular pupal de *Drosophila melanogaster*, PCP-82, contiene N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y manosa como monosacáridos principales y trazas de fucosa. En *Hyalophora cecropia* se encontró que ciertas proteínas cuticulares minoritarias son capaces de unir concanavalina A, lectina de *Ulex europaeus* I y aglutinina de soja, lo cual indica la presencia de manosa, fucosa y N-acetilgalactosamina, respectivamente (ver tabla VII.3). Ninguna proteína mostró afinidad por lectina de *Limulus polyphemus* lo cual descartaría la presencia de ácido siálico.

Proteína	Monosacáridos
PCP-82, PCP-56 (<i>Drosophila melanogaster</i>) ¹	GlcNAc; GalNAc y Man principalmente. Gal; Glc. Trazas de Fuc.
LDA; AMS (<i>H. cecropia</i>) ² .	β -GalNAc; L-Fuc; D-Man; β -(1,4)GlcNAc.
PSC (<i>H. cecropia</i>) ² .	β -GalNAc; L-Fuc; D-Man.

Tabla VII.3: Presencia de hidratos de carbono en proteínas cuticulares de *Drosophila melanogaster* y *Hyalophora cecropia*. (1) Los azúcares fueron determinados por hidrólisis ácida y análisis cromatográfico (Silvert et al., 1984). (2) LDA: abdomen dorsal de larva; AMS: esclerito medio de adulto; PSC: esclerito pupal. La presencia de monosacáridos fueron inferidos a partir de la unión de lectinas: D-Man: concanavalina A; L-Fuc: lectina de *Ulex europaeus* I; β -GalNAc: aglutinina de soja; β -(1,4)GlcNAc: aglutinina de germen de trigo (Cox y Willis, 1987b).

Estos datos sugieren que tal vez se trate -al igual que en la PCG-100 de *Ceratitis*- de oligosacáridos unidos a asparagina, más bien poco sustituidos. Esto concordaría con la ausencia de ácido siálico en invertebrados descrita por Hughes, 1976 (citado en Cox y Willis, 1987a) y con el hecho de que no se detecte la formación de oligosacáridos del tipo complejo en una línea celular de mosquito (Kornfeld y Kornfeld, 1985).

La estructura del (los) oligosacárido(s) de PCG-100 no ha sido totalmente elucidada. Los resultados obtenidos indican oligosacáridos pequeños (8 monosacáridos/molécula de proteína) con manosas expuestas (fuerte afinidad por con A) con -por lo menos- un residuo de fucosa. Esto sugiere la existencia de estructuras similares a la indicada en la figura VII.12.

3. Deposición de PCG-100 en la cutícula.

Desde que se sintetiza hasta que llega a destino, una proteína cuticular debe recorrer varios compartimentos (ver figura VII.13): dentro de la célula, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y las vesículas secretorias; la zona de "autoensamblado" o zona de deposición (espacio entre la cutícula y la epidermis) (ver Introducción).

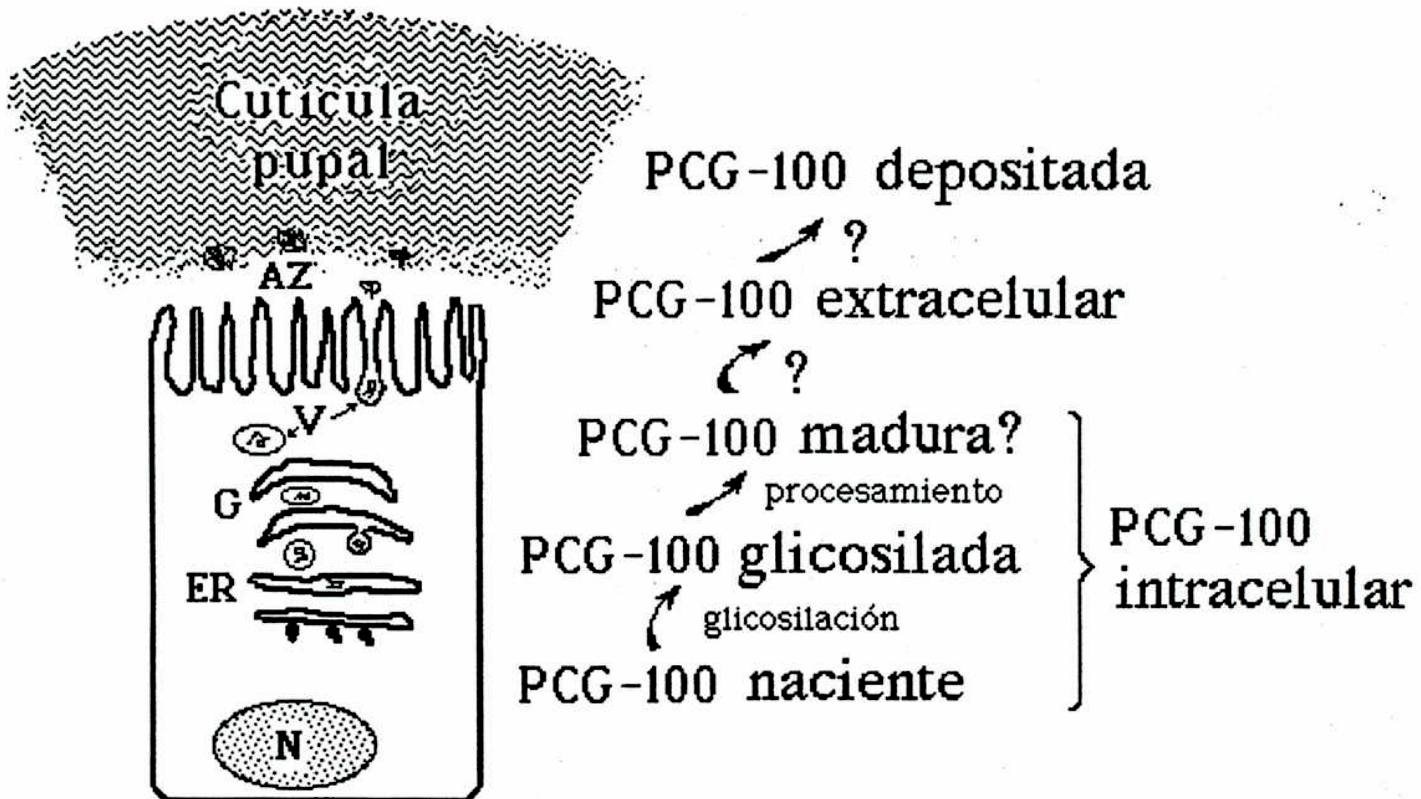


Figura VII.13: Esquema de una célula epitelial de *Ceratitidis capitata* en el momento de síntesis de cutícula pupal. N: núcleo; ER: retículo endoplásmico; G: aparato de Golgi; V: vesícula secretoria; AZ: zona de "autoensamblado".

El proceso de síntesis y procesamiento dentro de la célula epitelial es sólo parcialmente conocido para el caso de las LCP (ver Introducción). Hasta donde sabemos, el proceso de secreción y ensamblado no ha sido estudiado en detalle en ningún insecto. Se acepta en general que las

proteínas cuticulares serían secretadas mediante vesículas exocíticas en la base de las microvellosidades de la cara apical de las células epiteliales (Locke, 1976; Wolfgang et al., 1986), pero se desconoce si estas moléculas sufren algún tipo de modificación durante este proceso o en el paso siguiente de deposición en la cutícula.

En *Ceratitis capitata*, mediante experimentos de pulso y "chase" hemos visto claramente que la aparición de PCG-100 en la cutícula ocurrió 10 minutos después de su síntesis. Esto es coherente con el hecho de que PCG-100 es de origen epitelial (ver capítulo IV, 3.2). De este modo, el transporte desde su lugar de síntesis hasta su destino final, la cutícula en formación en contacto con la epidermis, tendría lugar rápidamente. En *Drosophila melanogaster*, la deposición en cutícula parece ser también un proceso rápido: las PCP son inmunodetectadas en vacuolas secretorias y en la cutícula en formación, pero no en la zona de ensamblado (AZ en la figura VII.13) (Wolfgang et al., 1986), lo cual sugiere que el tránsito por esta zona ocurriría rápidamente.

El análisis por SDS-PAGE no reveló diferencias perceptibles de peso molecular durante la síntesis, glicosilación, procesamiento y deposición de PCG-100 en cutícula. Las especies inmunoprecipitadas presentaron la movilidad de la forma madura extraída de la cutícula.

Teniendo en cuenta el relativamente bajo grado de glicosilación de PCG-100 (aprox 1.4%) es probable que los cambios en el peso molecular debido a la glicosilación y el aparentemente escaso procesamiento del oligosacárido(s) no sean detectados por análisis en SDS-PAGE, en nuestras condiciones.

También es probable que la especie detectada a los 0 min de "chase" sea la forma intracelular madura, ya procesada, hipotéticamente localizada en vacuolas poco antes de su secreción. Si durante la exportación y deposición en cutícula ocurriera algún tipo de procesamiento que implique sólo ligeras variaciones en el peso molecular, es probable que éstas no sean detectadas en SDS-PAGE, dado que se trata de una proteína de peso molecular elevado (Mr: 100 KD). Se ha descrito la presencia de enzimas proteolíticas en la cutícula. Andersen (1979) sugiere que las proteínas cuticulares podrían ser modificadas por proteólisis limitada después de la secreción. Este no parece ser el caso de PCG-100 de *Ceratitis capitata*.

VIII. Proteínas de pupario de *Ceratitis capitata*.

La biología se parece más a la historia que a la física.
No existe todavía una teoría predictiva de la biología,
como tampoco hay una teoría predictiva de la historia.
Los motivos son los mismos:
ambas materias son todavía
demasiado complicadas para nosotros.

Carl Sagan. *Cosmos* , 1980.

En esta sección se describen las proteínas extraídas de la cutícula larval durante y después de su transformación en pupario.

A diferencia de lo descrito en otros dípteros, hemos detectado la incorporación de proteínas distintas de las proteínas cuticulares larvales en el pupario de *Ceratitis capitata*, lo cual plantea la incógnita sobre su origen y función. Hemos estudiado la síntesis de estas “proteínas de pupario” mediante radiomarcación con [³⁵S]-metionina.

Resultados.

Parte de estos estudios ha sido realizada en colaboración con Pablo Wappner. Los resultados experimentales que se muestran aquí fueron realizados exclusivamente por la autora de esta tesis.

1. Proteínas de pupario de *Ceratitis capitata*.

Como se mencionó en la Introducción, en dípteros ciclorrafos la metamorfosis tiene lugar dentro de una cápsula formada por la ex-cutícula larval esclerotizada y tanificada: el pupario. En general, se acepta que durante el proceso de pupariación las LCP se entrecruzan con otros componentes cuticulares, haciéndose insolubles (ver Introducción).

Se analizaron las proteínas extraídas de cutículas larvales de *Ceratitis capitata* durante la pupariación (0-48 hs). La figura VIII.1 muestra que las LCP tendieron a “desaparecer” del perfil electroforético (comparar 36 y 40 hs en la figura VIII.1). A las 52hs se observó la aparición de nuevas bandas en el perfil electroforético de pesos moleculares aparentes 26, 20 y 14 kD, siendo la primera la más abundante. Teniendo en cuenta sus pesos moleculares y su abundancia relativa, estas proteínas fueron denominadas PMP-26 (Proteína Mayoritaria de Pupario, de 26 kD), PP-20 (Proteína de Pupario de 20 kD) y PP-14 (Proteína de Pupario de 14 kD). Es de hacer notar que estas proteínas dieron por tinción de CBB una coloración violácea característica (ver figura VIII.1). Este fenómeno de metacromasia se produce, con cierta frecuencia en el caso de proteínas con secuencias ricas en prolina, como el colágeno, (Duhamel et al.,1980) y también en ciertas glicoproteínas y lipoproteínas (Quesada-Allué, com. pers.). En todos los casos analizados (ver más adelante) la aparición de estas proteínas coincidió con la desaparición de las LCP del perfil electroforético y ambos fenómenos ocurrieron subitamente a las 46-48 hs. Hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que se describe la incorporación de proteínas en la cutícula larval durante la pupariación y por lo tanto este hallazgo fue de gran interés.

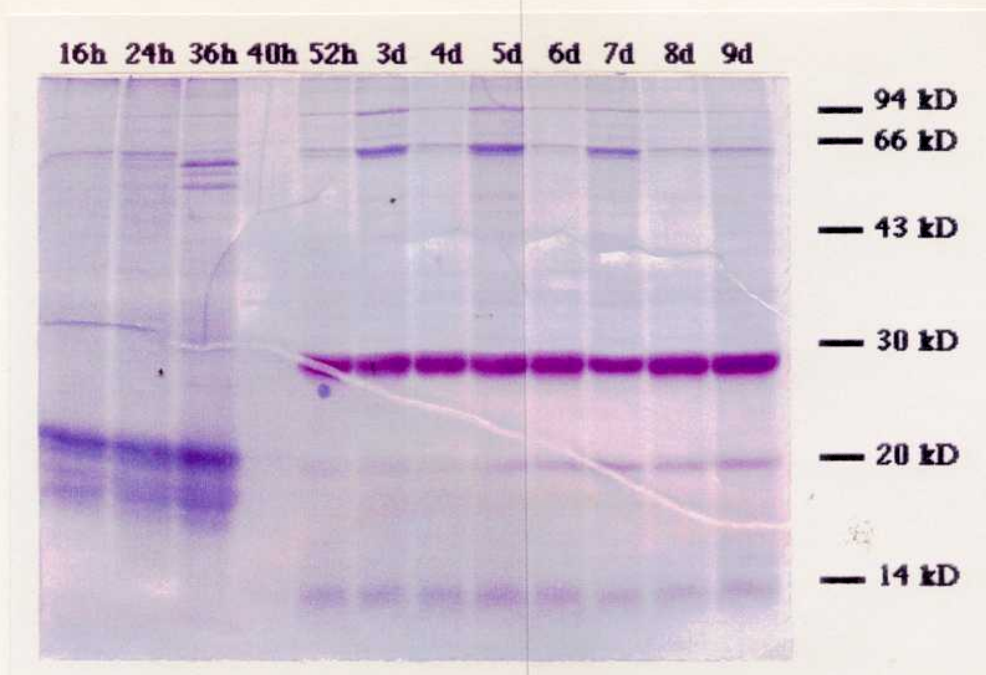


Figura VII.1: Se disecaron puparios de distintas edades como se describe en Materiales y Métodos. Se extrajeron las proteínas en SDS 1% a temperatura ambiente durante 16 hs y se analizaron en SDS-PAGE 15 % (cuatro puparios por carril).

2. Propiedades de solubilidad.

Se analizaron las condiciones requeridas para la solubilización de estas proteínas. Las proteínas de pupario no pudieron ser extraídas en agua o en soluciones salinas (no mostrado), ni con el detergente no iónico Tritón X-100 (ver figura VIII.2). La proteína mayoritaria de pupario (PMP-26) no fue extraída con los detergentes aniónicos SDS o deoxicolato (DOC), este último con menor eficiencia, y no fue solubilizada con urea 7M (ver figura VIII.2). Este desnaturalizante es un buen medio para la extracción de proteínas cuticulares en general (ver capítulo III). La PP-20 pareció ser extraída en mayor medida con urea 7M que con SDS 1%, mientras que el deoxicolato no fue capaz de solubilizarla. Las de menor peso molecular fueron extraídas en igual cantidad por los tres agentes solubilizantes (ver figura VIII.2). En ningún caso se observaron diferencias cuali o cuantitativas significativas en las extracciones realizadas a temperatura ambiente o a 60 °C (ver figura VIII.2).

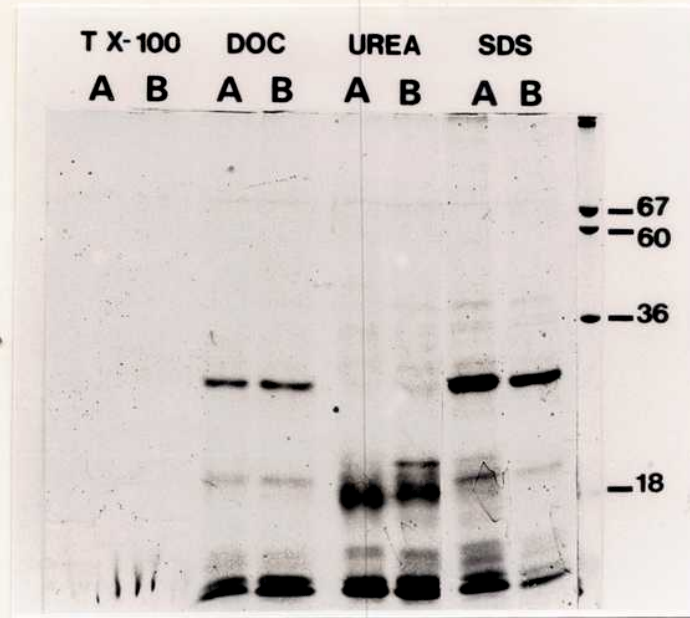


Figura VIII.2: Se extrajeron puparios en Tritón X-100 (TX-100), Deoxicolato 5% (DOC), urea 7M o SDS 1% durante 16 hs a 25 °C (A) o una hora a 60 °C (B). Las proteínas fueron separadas en PAGE-SDS 17.5% (Cuatro puparios por carril).

Se comprobó que la urea presente en los extractos no alteró la movilidad de estas proteínas en geles de poliacrilamida, extrayéndolas en SDS 1% y agregando urea antes de la electroforesis (Wappner, com. pers.)

3. Proteínas en mutantes de color de pupario.

Se conoce relativamente poco acerca de las proteínas cuticulares involucradas en los procesos de esclerotización y tanificación del pupario. Se pensó que algunas de las proteínas extraídas de pupario podrían estar relacionadas con estos fenómenos. Por lo tanto, resultó de interés analizar las mismas en mutantes con alteraciones en los procesos de esclerotización y/o tanificación. Se utilizaron tres líneas de mutantes de color de pupario (ver Materiales y Métodos): *Black pupa*, *niger* y *White pupa*. La primera y la segunda presentan puparios oscuros. Los puparios de la cepa *White pupa* son incoloros (ver Materiales y Métodos). Las alteraciones bioquímicas responsables del fenotipo mutante han sido estudiadas en detalle en nuestro laboratorio (Wappner, 1989; Wappner et al., 1991).

La figura VIII.3 muestra las proteínas extraídas a 60 °C en “cracking buffer” de Laemmli de puparios *niger* y *Black pupa* de distintas edades. A excepción de pequeñas diferencias, el perfil electroforético obtenido resultó el mismo que en la cepa salvaje (ver figura VIII.1). En las dos líneas mutantes se observó a las 48 hs la aparición de las bandas de 26 y 20 kD, correspondientes a las PMP-26 y PP-20 mencionadas anteriormente. En los puparios *niger*, la banda correspondiente a PMP-26 presentó un rango de peso molecular mayor que en los individuos “cepa salvaje”. En algunos casos se observó en los puparios *Black pupa* la presencia de más de una banda con movilidad cercana a la de PMP-26 (ver carriles P₂, P₇ y PA en la figura VIII.3). El análisis de puparios individuales pareció indicar que ésto podría deberse a la existencia de polimorfismos (Wappner, com. per.). En estas condiciones de extracción, las LCP fueron solubilizadas todo a lo largo del estadio pupal. Lo mismo ocurrió tanto en puparios de individuos salvajes como *white pupa*, extraídos en las mismas condiciones (no mostrado).

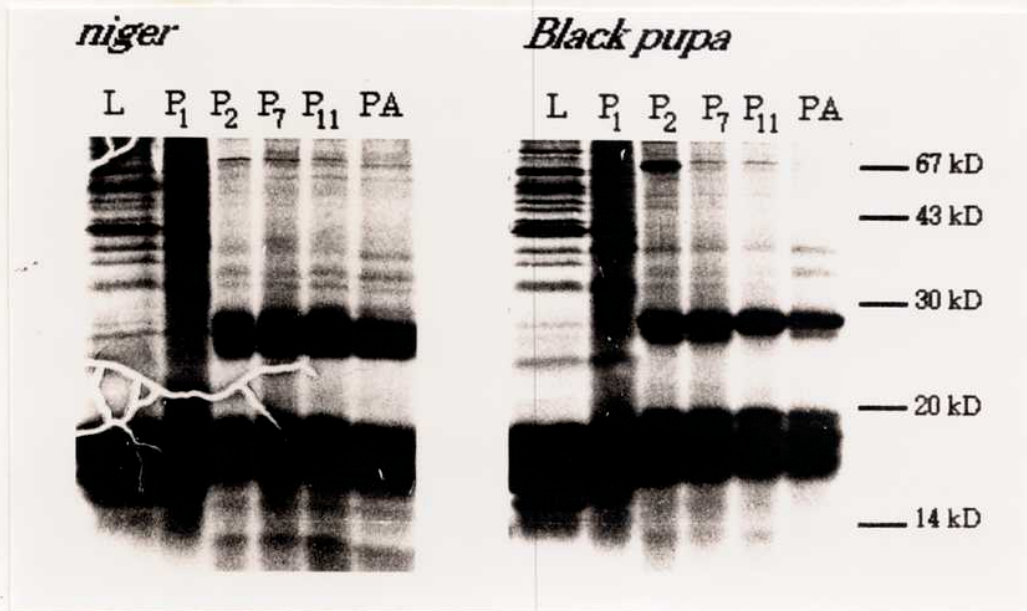


Figura VIII.3: Se disecaron cutículas larvales y puparios de individuos de distintas edades pertenecientes a las líneas *Black pupa* y *niger*. Se extrajo durante 16 hs a 60°C en “cracking buffer” y se analizaron las proteínas en SDS-PAGE 15 %. (Cuatro individuos por carril). L: larva “de salto”; P₁-11: puparios de 1-11 días; PA: puparios después de la emergencia del adulto.

4. Síntesis *in vivo* de proteínas de pupario.

4.1 Radiomarcación *in vivo* con [^{35}S]-metionina.

La aparición de estas proteínas en el pupario coincidió con la desaparición de las LCP del perfil electroforético. No se podía descartar que la PMP-26 y las otras proteínas fueran producto de las modificaciones que las LCP presentes en la ex-cutícula larval sufrirían durante la esclerotización y tanificación. Por lo tanto, se investigó si las proteínas de pupario eran capaces de incorporar [^{35}S]-metionina, lo cual indicaría que serían sintetizadas *de novo* y que, por lo tanto, no provendrían de modificaciones de proteínas ya depositadas.

Se microinyectaron larvas inmovilizadas (0 hs) con [^{35}S]-metionina y a los cuatro días se extrajeron las proteínas de pupario. Como se ve en la figura VIII.4, la PMP-26 y las bandas de 14 y 15 kD incorporaron [^{35}S]-metionina durante la radiomarcación. Esto sugiere que estas proteínas se sintetizarían en algún momento durante el período pre-pupal (0-40 hs).

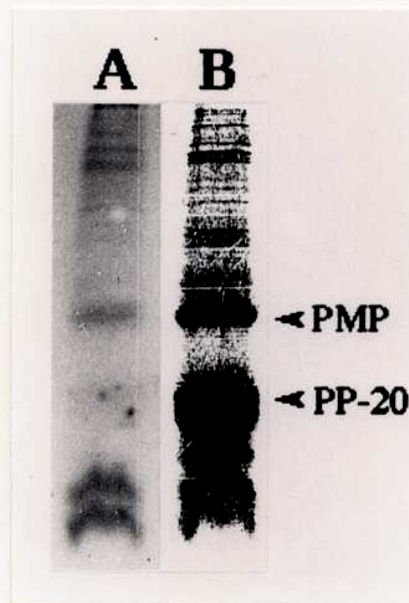


Figura VIII.4: Se microinyectaron seis pre-pupas de 0 hs de edad con 1 μCi de [^{35}S]-Metionina. Después de 4 días se disecaron los puparios y se extrajeron las proteínas. A: Se analizaron en SDS-PAGE 15 % seguido de autorradiografía. B: tinción para proteínas.

4.2 Síntesis *in vivo* durante la pupariación.

Para determinar con mayor precisión en qué momento durante la metamorfosis se sintetizan estas proteínas, se microinyectaron con [^{35}S]-metionina animales entre 0 y 73 hs. Después de cuatro horas de "incubación" *in vivo* se disecaron los puparios y se analizaron las proteínas extraídas en SDS-PAGE (ver figura VIII.5).

No se detectó radioactividad en estas proteínas en el momento en que se observó su aparición en el pupario (40 y 48 hs en la figura VIII.5 A y B). El experimento de radiomarcación descrito más arriba muestra claramente que la PMP-26 y las proteínas de bajo peso molecular fueron capaces de incorporar [^{35}S]-metionina, lo cual descarta la posibilidad de que la ausencia de radiomarca se deba a la falta de este aminoácido en las proteínas estudiadas. Por otra parte, la incorporación de [^{35}S]-metionina en proteínas totales fue similar en todos los insectos analizados.

Se observó incorporación de radiomarca a proteínas extraídas de pupario en animales inyectados a las 16 ó 24 hs, no detectándose bandas radioactivas cuando la inyección fue aplicada a 0 ó 7 hs, ni después de las 32 hs de edad. Las bandas radiomarcadas presentaron movilidad similar a la de PMP-26 y PP-20, aunque a la edad en que se observaron (16-24 hs), no se detectó en el pupario la presencia de PMP-26 y PP-20 por tinción de Coomassie (ver panel A en la figura VIII.5 y también ver figura VIII.1).

Este tipo de análisis fue realizado por cuadruplicado en el experimento mostrado en la figura VIII.5 y repetido varias veces. En ningún caso se obtuvo incorporación de [^{35}S]-metionina a proteínas de pupario en animales inyectados antes de las 7 hs o después de las 30 hs.

Estos resultados muestran que las proteínas de pupario no serían sintetizadas a la misma edad en que se produce su aparición en el pupario (40-48 hs). Aparentemente, la síntesis ocurriría bastante antes. Con sólo estos datos, no puede asegurarse fehacientemente que las bandas radiomarcadas observadas a las 16-24 hs en la figura VIII.5 B correspondan a PMP-26 y PP-20.

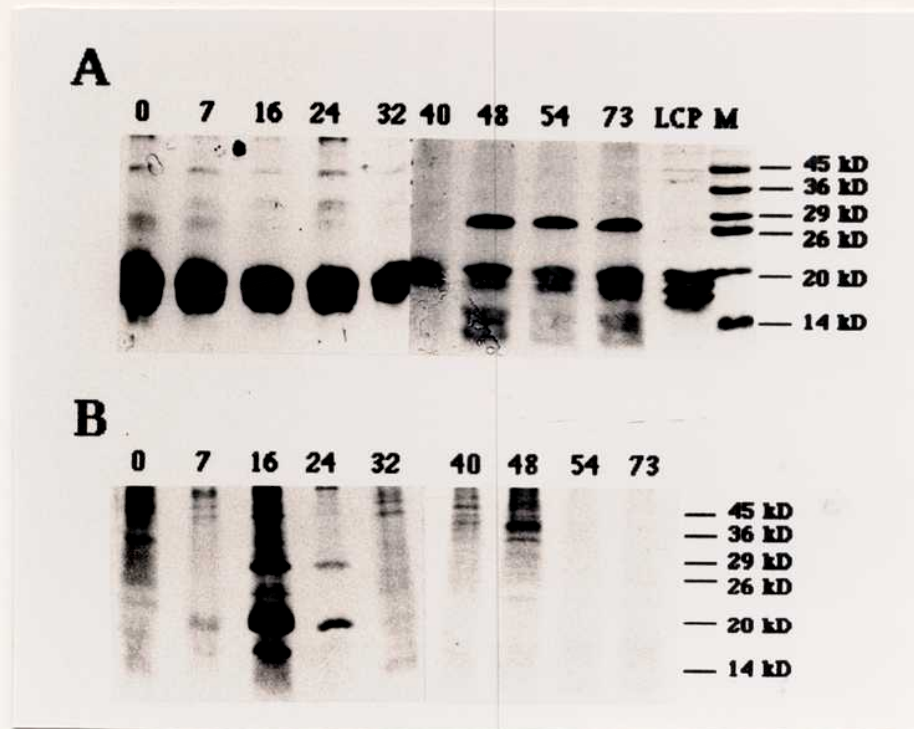


Figura VIII.5: Se microinyectaron pre-pupas y pupas entre 0 y 73 hs de edad con 0.5 μ Ci de [35 S]-metionina. Después de 4 hs se disecaron los puparios, se extrajeron las proteínas en SDS 1% y se analizaron en mini-PAGE-SDS 15 % (A) seguido de fluorografía (B). LCP: Proteínas cuticulares larvales; M: marcadores de peso molecular.

Para confirmar o descartar estos resultados, se realizó un experimento de radiomarcación en el cual se inyectaron pre-pupas de distintas edades y se sacrificaron todas a las 72 hs de edad. En este momento las proteínas de pupario ya están depositadas, por lo que pudieron ser identificadas sin ambigüedad en SDS-PAGE (ver figura VIII.6 B). La figura VIII.6 A muestra que sólo se detectó radioactividad en la PMP-26 (flecha), en animales inyectados antes de las 40 hs; siendo máxima cuando la inyección se aplicó entre las 16 y 30 horas. Cuando la inyección se realizó a las 46 horas, momento en que se produjo la aparición de estas proteínas en el pupario, no se detectó radioactividad en la PMP-26 (ver figura VIII.6).

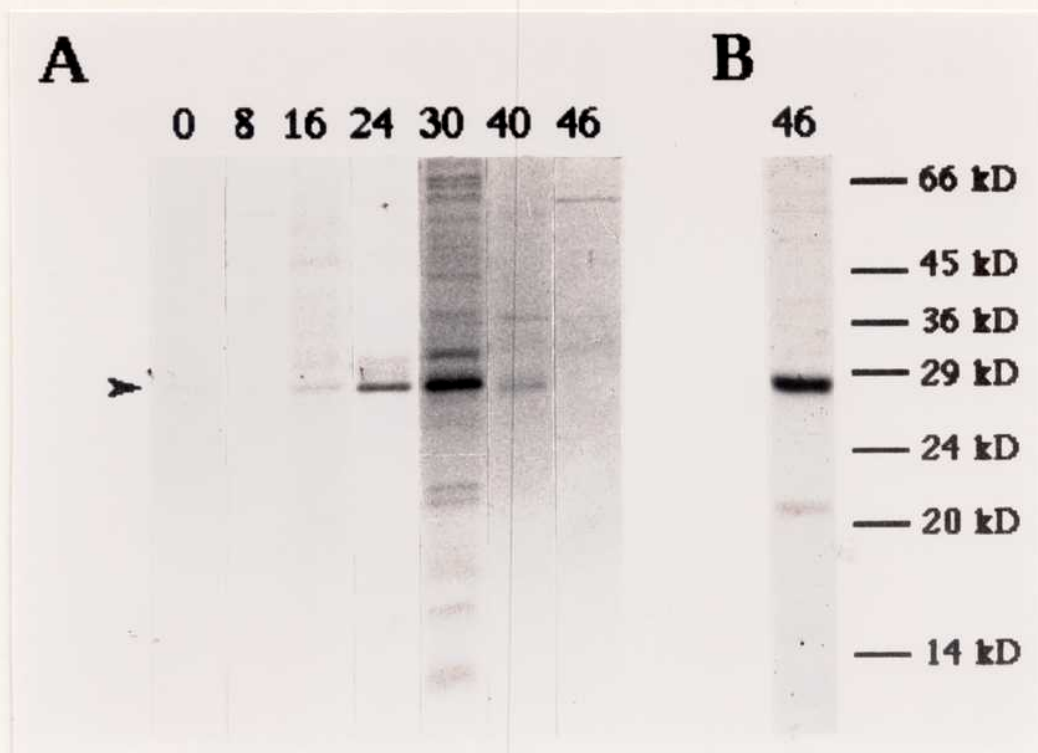


Figura VIII.6: Se microinyectaron pre-pupas de distintas edades (0-46 hs después de la inmovilización) con 0.5 μ Ci de [35 S]-metionina. Los animales se sacrificaron a la edad de 3 días. Se disecaron los puparios, se extrajeron las proteínas y se separaron en SDS-PAGE 15 %. A: autoradiografía. B: tinción para proteínas (CBBG).

Se comprobó para todos los insectos analizados en la figura VIII.6 que la morfología en el momento de la disección fuera la correspondiente a la de pupa de 72 hs. Este análisis morfológico fue necesario debido a los largos tiempos de radiomarcación empleados (ver VI.1).

En este tipo de experimentos, la [35 S]-metionina inyectada se “consumió” en aproximadamente 6 horas (ver figura VI.2). A mayores tiempos de incubación, se espera que la [35 S]-metionina disponible sería sólo la liberada por la degradación de moléculas sintetizadas anteriormente. Por lo tanto, es de esperar que aparezcan fuertemente radiomarcadas sólo las proteínas sintetizadas en las primeras horas después de la microinyección y que permanezcan sin degradarse hasta el momento de la disección. Por el contrario, la incorporación de radiomarca a proteínas sintetizadas después de las 6 horas desde la inyección debería ser muy baja.

Las diferencias observadas en la cantidad de radiomarca incorporada a PMP-26 en individuos inyectados a distintas edades no pueden atribuirse a las distintas duraciones del pulso, sino a la intensidad de la síntesis de PMP-26 en el momento de la microinyección pues, para todos los casos, se comprobó que los valores de incorporación de [^{35}S]-metionina a proteínas totales fue de 50-60% (valores que concuerdan con los de la meseta en el gráfico de la figura VI.2).

La relativamente escasa radioactividad detectada en PMP-26 cuando la inyección se aplicó a las 0 u 8 horas (ver figura VIII.6) indicaría que la síntesis de PMP-26 fue muy baja o nula a esa edad. No puede descartarse que a esta edad la PMP-26 sea sintetizada y luego degradada, de modo que la acumulación total de marca en esta proteína al final del período de incubación resultaría muy baja. El hecho de que a las 72 hs se detectó PMP-26 fuertemente radiomarcada en el pupario de individuos que fueron inyectados a las 16 ó 30 hs sugiere fuertemente que la síntesis sería máxima a esta edad y que la PMP-26 sintetizada no se degradaría. Aparentemente, a las 40 hs la síntesis detectada fue muy baja y nula a las 46 hs (ver figura VIII.6).

4.3 Lugar de síntesis de PMP-26.

Se investigó la presencia de PMP-26 en hemolinfa por análisis en SDS-PAGE de proteínas de hemolinfa extraída de larvas en el momento del salto. No se encontró PMP-26 entre las proteínas mayoritarias (no mostrado).

Se radiomarcaron animales de distintas edades con [^{35}S]-metionina y se analizaron las proteínas en SDS-PAGE. En la figura VIII.7a se observa que no se detectaron proteínas solubles de peso molecular cercano a la PMP-26 por tinción de Coomassie durante todo el período analizado (0-63 hs). Entre las 0 y 26 hs, período en que PMP-26 es sintetizada (ver más arriba), no se observó la presencia de bandas radiomarcadas de movilidad similar a la de PMP-26 (figura VIII.7a, panel B).

Entre las proteínas solubles se destacan bandas de aproximadamente 85 kD, correspondientes a proteínas mayoritarias de hemolinfa. En concordancia con lo descrito anteriormente por otros autores (Schenkel y Scheller, 1986; Chrysanthis et al., 1981), éstas incorporaron [^{35}S]-metionina a la 0h de edad; a edades mayores no se detectó síntesis de estas proteínas.

Tampoco se detectó PMP-26 radiomarcada entre las proteínas extraídas en SDS 1% (ver figura VIII.7b). Sin duda, la no detección de PMP-26 por Coomassie o por radioactividad entre las proteínas totales o de hemolinfa se debe a que no es suficientemente abundante como para ser detectada por estos métodos.

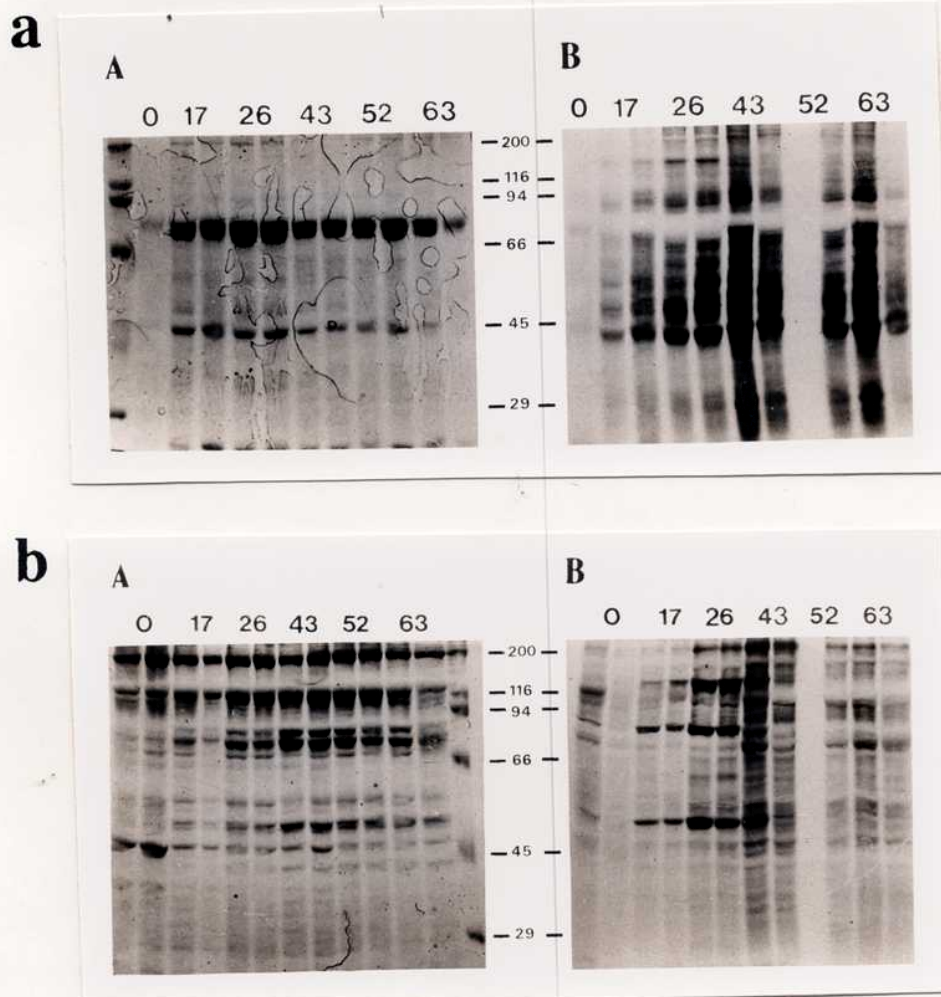


Figura VIII.7: Pre-pupas y pupas de distintas edades (0-63 hs después de la inmovilización) fueron radiomarcadas por microinyección durante una hora. Se homogeneizaron individualmente en solución de Ringer, se centrifugó y se separaron los sobrenadantes. Se extrajeron los precipitados en SDS 1 % a 4 °C. Se separaron en SDS-PAGE 15 % alícuotas de igual contenido en proteína y se reveló por fluorografía. Cada carril corresponde a un animal. **A:** tinción para proteínas. **B:** fluorografía. **a:** proteínas solubles, **b:** proteínas extraídas en SDS 1%.

4.4 Exportación e incorporación al pupario.

Los resultados descriptos más arriba sugieren que la PMP-26 sería sintetizada entre las 16-30 hs de edad, y que su aparición en el pupario ocurriría unas 12 hs después de la síntesis, a las 46-48 hs.

El estudio de la exportación de PMP-26 por experimentos de radiomarcación *in vivo* seguida de "chase" *in vitro* resultó impracticable, debido a que se requerirían largos tiempos de incubación *in vitro*, durante los cuales el sistema decae biológicamente.

Para estudiar el proceso de exportación e incorporación al pupario, se realizó el siguiente experimento: se radiomarcaron pupas a las 24 hs (edad a la cual la síntesis de PMP-26 sería máxima) y se analizaron las proteínas depositadas en el pupario a distintos tiempos (figura VIII.8).

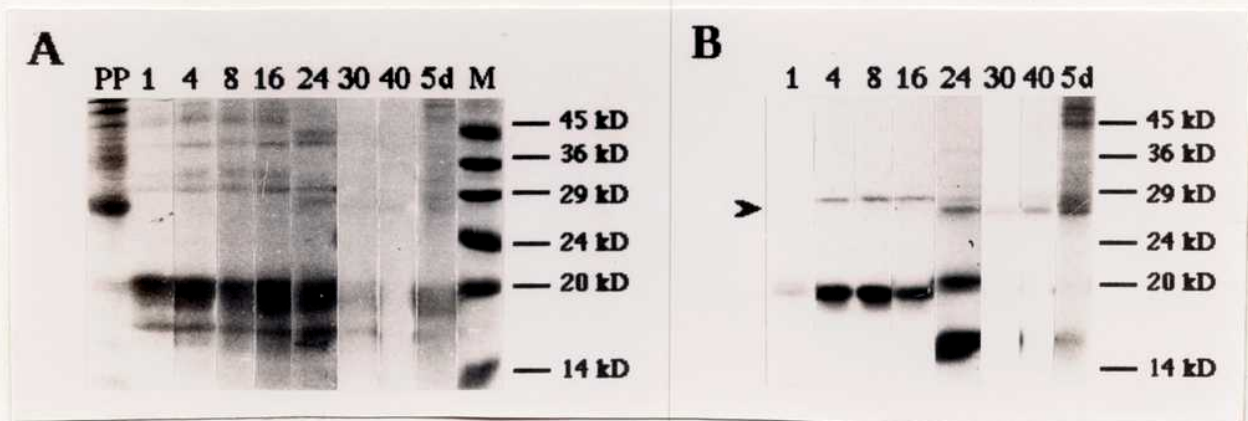


Figura VIII.8: Se microinyectaron pre-pupas de 24 hs de edad con 0,5 μ Ci de [35 S]-metionina. A distintos tiempos (1h-5días) se disecaron los puparios, se extrajeron las proteínas y se analizaron en SDS-PAGE 15 % (A) seguido de autorradiografía (B). PP: preparación masiva de proteínas de pupario. M: marcadores de peso molecular.

Se ve en la figura VIII.8 que no se detectó PMP-26 en el pupario en los individuos sacrificados antes de las 24 hs de incubación (24-40 hs de edad). En éstos se observó una banda radiomarcada de mayor peso molecular aparente, que desapareció del perfil electroforético a las 48 hs de edad. (Sin duda se trata de la misma banda de 29 kD observada en la figura VIII.5 a las 16 y 24 hs). En este momento, 24 hs después de la inyección, se detectó PMP-26 radiomarcada en el pupario.

Como se muestra en la tabla VIII.1, en las primeras 8 hs de incubación, prácticamente toda la [^{35}S]-metionina se consumió; de modo que la aparición de PMP-26 radiomarcada en el pupario después de las 16 hs desde la inyección se debería a la exportación de moléculas sintetizadas anteriormente.

Como en el caso anterior, se comprobó que en todos los individuos analizados en la figura VIII.8, la morfología fue la correspondiente a la edad.

Pulso (hs):	1	4	8	16	24	30	40	48	5 d
Edad (hs)	25	28	32	40	48	54	64	72	6 d
Incorporación por individuo	4%	33%	30%	39%	47%	55%	12%	54%	41%
	16%	44%	39%	45%	52%	60%	54%	64%	43%
	17%	45%	39%	56%	60%	60%	79%	69%	70%
	19%	62%	61%	62%	60%	62%	82%	71%	70%
Incorporación promedio	12%	46%	42%	50%	55%	59%	57%	64%	56%

Tabla VIII.1: En el mismo experimento de radiomarcación de la figura VIII.8, a distintos tiempos se congelaron insectos en grupos de cuatro. Se separaron los puparios por disección (ver figura VIII.8) y se homogeneizaron los tejidos remanentes en solución de Ringer. Se determinó la radioactividad total y la precipitada con TCA 10 % en los homogenatos y se calculó el porcentaje de incorporación.

Discusión.

1. Cambios en la composición proteica de la cutícula larval durante la pupariación.

El perfil electroforético de proteínas extraídas de la cutícula larval durante la pupariación de *Ceratitis capitata* mostró un cambio a las 46-48 hs. Las principales observaciones fueron: a) "desaparición" de las LCP de la fracción extraída en SDS 1%, y b) "aparición" de nuevas proteínas de 26; 20; 15 y 14 kD; siendo la mayoritaria la de 26 kD (PMP-26, Proteína Mayoritaria de Pupario).

Hemos visto anteriormente (capítulo III 5.2) que durante el estadio larval, las LCP de *Ceratitis capitata* resultaron solubles, aún en ausencia de agentes desnaturalizantes, liberándose de la cutícula con soluciones salinas (solución de Ringer o NaCl 0.5M). Después de la pupariación estas proteínas se hicieron resistentes a la extracción, inclusive en SDS 1%. Se requirió la presencia de detergente, elevada temperatura y tiempos de extracción prolongados para su solubilización (ver figura VIII.2).

En *Lucilia cuprina* ocurre algo similar a lo observado por nosotros en *Ceratitis*: las LCP extraíbles en urea 7M se tornan insolubles (Skelly y Howells, 1988); aunque este fenómeno parece ocurrir paulatinamente y no abruptamente como en *Ceratitis*, en la cual hemos observado que las LCP desaparecen del perfil electroforético entre las 40 y 48 hs. En *Sarcophaga bullata*, se observa un ligero cambio en el perfil electroforético de las proteínas extraídas de la cutícula larval durante la pupariación (Willis et al., 1981). Algunas de las proteínas extraídas con cloruro de guanidina 8M desaparecen del perfil electroforético durante la primera hora desde el inicio de la pupariación.

Las razones por las cuales las proteínas cuticulares larvales dejarían de ser extraíbles pueden ser varias: a) durante la pupariación ocurren fenómenos de esclerotización, es decir de entrecruzamiento de moléculas de proteínas con otras proteínas y también con quitina (ver Introducción).

b) la pérdida de agua de la cutícula, provocada por la aparición de compuestos polifenólicos podría favorecer la insolubilización de las LCP (Hillerton y Vincent, 1983; Hackman, 1984).

Se ha demostrado el entrecruzamiento de las proteínas larvales en *Sarcophaga bullata* (Lipke et al., 1981). En *Calliphora vomitoria*, se postula que los cambios en las propiedades mecánicas durante la pupariación se deben más a la modificación de la conformación y estructura secundaria de las proteínas debida a la deshidratación de la cutícula que a las eventuales uniones covalentes (Hillerton y Vincent, 1983). En *Ceratitis capitata*, mediante la acción de agentes desnaturalizantes, hemos extraído las LCP de puparios ya esclerotizados y tanificados, lo cual indicaría que por lo menos algunas moléculas de proteína no se han unido covalentemente a otros componentes cuticulares, por lo que no puede descartarse que la causa de su insolubilización parcial sea la deshidratación de la cutícula.

En cutículas que se esclerotizan inmediatamente después de la muda, aparentemente no todas las proteínas presentan el mismo grado de esclerotización. En *Hyalophora cecropia*, el perfil electroforético difiere según se trate de proteínas extraídas de cutículas endurecidas o no endurecidas (Willis, 1987). En *Ceratitis capitata*, las proteínas cuticulares del adulto mostraron solubilidad decreciente con el tiempo transcurrido desde la emergencia, siendo algunas más insolubles que otras, lo cual es indicativo de que ciertas proteínas se esclerotizarían preferencialmente (Di Paola, Boccaccio y Quesada, com. pers.). Por el contrario, durante la pupariación en *Ceratitis capitata*, todas las LCP mostraron simultáneamente los mismos cambios en solubilidad, lo cual significaría que no existirían diferencias en su esclerotización.

El análisis por SDS-PAGE de proteínas extraídas de puparios de las mutantes *niger*, *Black pupa* y *White pupa* reveló que no habría diferencias significativas con el perfil electroforético de individuos cepa salvaje. Lo cual sugiere que las mutantes de tanificación analizadas no son diferentes en cuanto al tipo de proteínas involucradas en este proceso.

2. ¿Un nuevo tipo de proteínas cuticulares exclusivas de pupario?

Es la primera vez que se describe la incorporación de proteínas al pupario con las características descritas aquí, por lo que este hallazgo revistió para nosotros un interés particular. En *Sarcophaga bullata* se estudiaron las proteínas extraídas con cloruro de guanidina 8M y no se observó la aparición de nuevas bandas en el perfil electroforético (Willis et al., 1981). En *Lucilia cuprina* (Skelly y Howells, 1988) se analizaron las proteínas extraídas con urea 7M y no se detectó la existencia de proteínas no larvales. Nosotros hemos demostrado que la PMP-26 de *Ceratitis* no es extraída en esas condiciones. En *D. melanogaster*, no hemos podido detectar la presencia de proteínas con características similares a las observadas en *Ceratitis capitata*.

Un dato indirecto que refuerza nuestros resultados es lo descrito en *Musca fergusonii* y *Lucilia cuprina*: la composición de aminoácidos de las cutículas larvales y de los puparios son ligeramente distintas (Hackman y Goldberg, 1976). Se ha sugerido que esta diferencia pudiera deberse a la incorporación de proteínas durante la pupariación (Hillerton y Vincent, 1983). Sin embargo esas hipotéticas proteínas no han sido identificadas y, por otra parte, no puede descartarse que las diferencias de composición aminoacídica observadas sean debidas a que ciertas proteínas larvales sufran fenómenos de esclerotización o degradación preferencialmente con respecto a otras.

Estas proteínas de pupario halladas en *Ceratitis capitata* presentaron propiedades de solubilidad que las diferenciaron de la mayoría de las proteínas cuticulares descritas (ver III.5.1 y III.5.2).

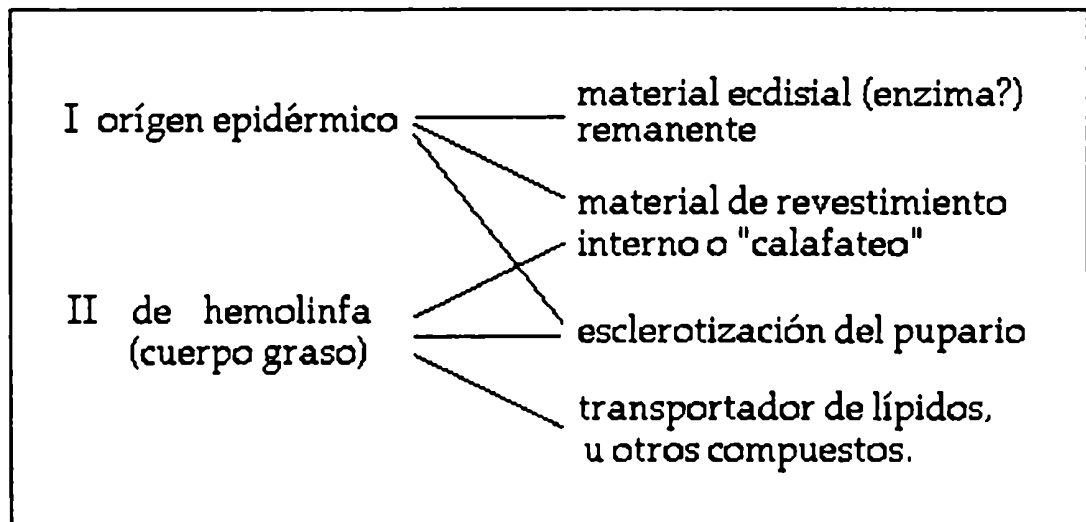
La eficiencia para extraer la PMP-26 decreció en el orden SDS > DOC >> urea. Es decir que no bastó la acción de un poderoso agente desnaturalizante como la urea, sino que se requirió la presencia de detergentes aniónicos para extraer esta proteína. La PP-20, por el contrario, presentó solubilidad decreciente en el orden urea >> SDS >> DOC, lo cual indica que para la extracción de esta proteína parece ser más importante la ruptura de puentes hidrógeno que la acción detergente, es decir la capacidad de formar micelas. Sin duda, ésto está relacionado con la

hidrofobicidad de las proteínas y también con las interacciones que presentan con otros componentes cuticulares. Ninguna de estas proteínas pareció ser extraída en soluciones alcalinas (Wappner, com. pers.) lo cual sugiere que no existirían enlaces covalentes con otros componentes cuticulares (ver Introducción).

3. Síntesis *in vivo* de proteínas de pupario.

Los diversos experimentos de radiomarcación *in vivo* realizados indican que el período de síntesis de PMP-26 (16-30 hs) se extendería aproximadamente entre la apólis (20,5 hs) y el comienzo de la pupación *sensu stricto* (36-40hs). Su aparición en el pupario ocurriría poco antes de que se produzca la eversión de la cabeza (44-48 hs, pupa criptocefálica).

La existencia de esta proteína en el pupario plantea dos preguntas: a) en qué tejido tiene lugar su biosíntesis y b) cuál es su función?. Como se indica en el esquema, si fuera de origen epitelial (caso I), es probable que se trate de una enzima u otro componente del fluido ecdisial (ver Introducción), o que tenga alguna otra función desconocida. También pudiera ser que no fuera de origen epitelial, sino que fuera sintetizada en cuerpo graso (caso II), pasando luego a la hemolinfa y depositándose finalmente en la cutícula.



En *Calliphora vicina*, ha sido descrita la incorporación de proteínas de hemolinfa a cutícula larval, pupal y pupario (König et al., 1986). En general la síntesis de proteínas de hemolinfa ocurre antes de la inmovilización y decae durante la pupariación (ver 4.3, Schenkel y Scheller, 1986; Chrysanthis et al., 1981). Por el contrario, la síntesis de PMP-26 pareció ocurrir después de la pupariación.

Por otra parte, las proteínas de hemolinfa presentan en general un peso molecular mayor que el de la PMP-26: 82 kD en *Calpodes ethlius* (Palli y Locke, 1988); 83 y 89 kD en *Musca domestica* (Marinotti y Bianchi, 1986); 80 kD en *Calliphora vicina* (König et al., 1986), 81-87 kD en *Ceratitis capitata*. (ver figura VIII.7a; Mintzas y Reboutsicas, 1984). Sin embargo, se ha descrito recientemente en *Musca domestica* (Bianchi y Capurro, 1991) la existencia de proteínas de hemolinfa de 21,8-48 Kd, además de las de alto peso molecular. Estas proteínas de bajo peso molecular se detectan durante el estadio larval, en forma de lipoproteína (LLP) y parecen desaparecer de la hemolinfa después del primer día del estadio pupal.

No hemos determinado todavía si las proteínas de pupario de *Ceratitis capitata* son o no de origen epitelial. Esto se vería facilitado con el uso de antisueros específicos. Aunque se intentaron reiteradamente distintos protocolos de inmunización, la PMP-26 resultó de bajo poder inmunogénico, por lo que los sueros obtenidos resultaron de muy bajo título y altamente inespecíficos, reconociendo varias bandas en análisis de "Western blot", todas de muy baja intensidad. En ensayos de inmunoprecipitación, no hemos podido detectar proteínas radiomarcadas después de inyectar [35 S]-metionina a pre-pupas de 16 hs e inmunoprecipitar con los sueros preparados contra PMP-26.

Aunque no la hemos detectado en hemolinfa por tinción de Coomassie o por incorporación de [35 S]-metionina (ver 4.3), no puede descartarse definitivamente que la PMP-26 de *Ceratitis* se encuentre en la hemolinfa durante la etapa pre-pupal y que se deposite luego en el pupario. La figura VIII.9 A ilustra esta hipótesis.

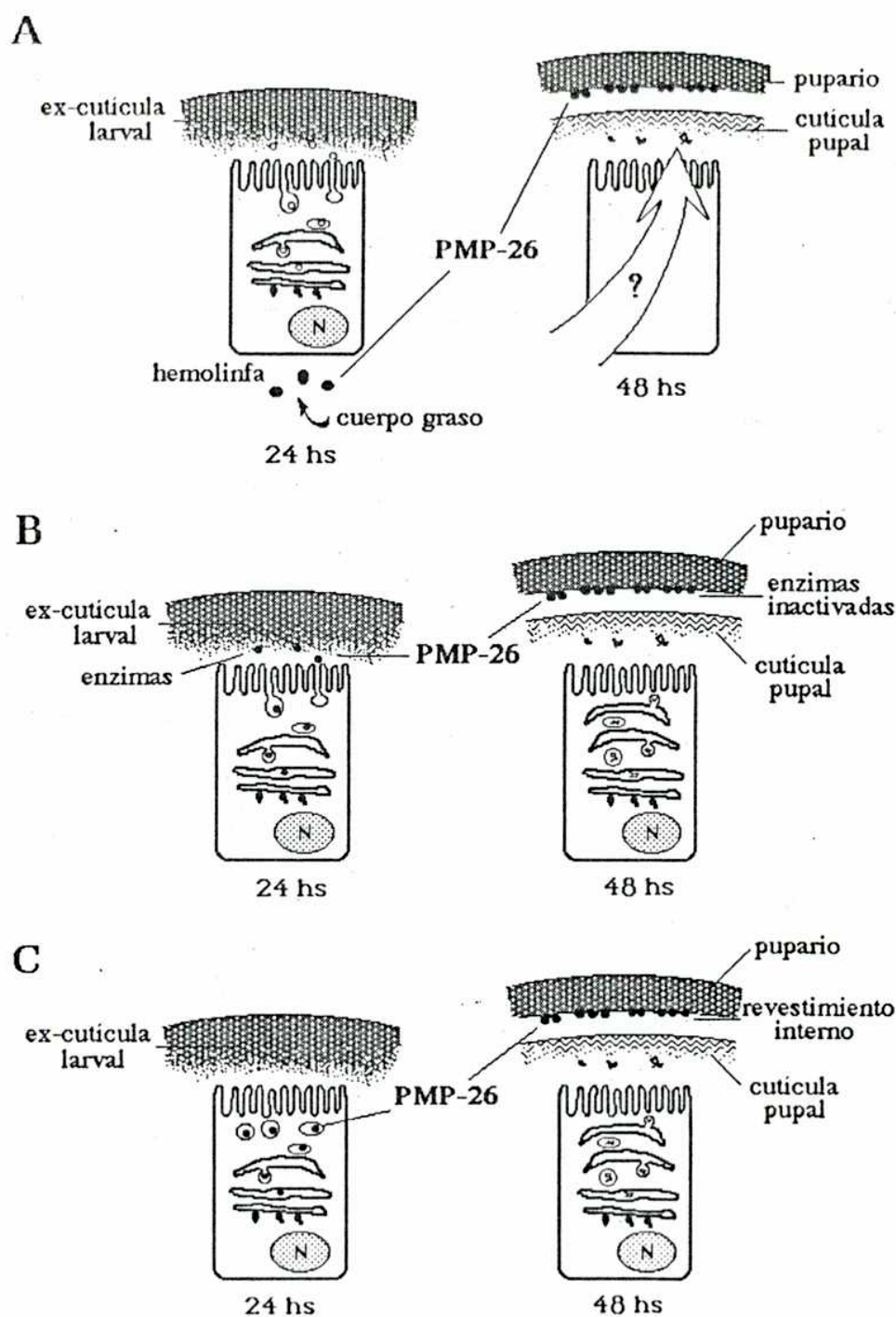


Figura VIII.9: Esquema de célula epitelial en el momento de síntesis de PMP-26 (24 hs) y en el momento de su aparición en pupario (48 hs). A, B y C representan las tres posibilidades discutidas en el texto.

Como se mencionó más arriba, podría ser que la PMP-26 y las otras proteínas minoritarias de pupario sean sintetizadas por el epitelio. En este caso, pudiera ser que fueran componentes -probablemente enzimas- del fluido ecdisial. Una vez concluida la digestión de las capas internas de la cutícula larval, las enzimas serían eventualmente inactivadas podrían depositarse en el pupario. En apoyo de esta hipótesis, esquematizada en la figura VIII.9 B, hemos encontrado que el momento de síntesis de esta proteína coincide aproximadamente con la apólisis (20.5 hs), mientras que el momento de su aparición en el pupario coincide con la pupación (40 hs).

También podría ser que la presencia de este material en la ex-cutícula larval no fuera simple "residuo" de la actividad enzimática ecdisial, sino -por el contrario- ser sintetizado con la función de revestir internamente al pupario, formando una capa que le confiera propiedades particulares de impermeabilización o aislamiento que impidan la deshidratación durante el desarrollo de la pupa. Al formarse este revestimiento o "calafateo", las capas internas de la ex-cutícula larval quedarían recubiertas y esto podría explicar que las LCP dejen de ser extraíbles en el momento en que PMP-26 aparece en el pupario (ver figura VIII.1).

El hecho de que la aparición en el pupario se produce bastante tiempo después de la síntesis, implicaría que se encuentra "almacenada" (posiblemente en vacuolas) hasta el momento en que, justo antes de la pupación, se secreta masivamente para revestir internamente al pupario. Es decir, existiría sobre esta proteína un doble control: a nivel síntesis (control transcripcional o traduccional) y a nivel exportación. La figura VIII.9 C ilustra esta hipótesis.

Podría ser que PMP-26 y las otras proteínas participen en fenómenos de esclerotización -tanto en el caso de síntesis epidérmica como no-. En *Calliphora vicina*, se cree que la incorporación de proteínas de hemolinfa al pupario estaría involucrada en procesos de esclerotización (König et al., 1986).

También podría tratarse de una proteína de hemolinfa involucrada en transporte de lípidos u otros compuestos. La LLP de *Musca domestica* anteriormente mencionada, aparentemente transportaría hidrocarburos a la cutícula (Bianchi y Capurro, 1991). No hay datos en la bibliografía de que proteínas sintetizadas en la epidermis participen en estos procesos.

El proceso de "revestimiento interno" o "calafateo" descrito más arriba sería una importante adquisición evolutiva en dípteros que se desarrollen en un medio ambiente similar al de *Ceratitis*. Se trata de un ambiente mas bien cálido (clima mediterráneo) y seco (lejos de los frutos que sirvieron como alimento a las larvas). Por lo tanto, podría esperarse que este fenómeno ocurra también en otros géneros cercanos como *Dacus* y *Rhagoletis*. Sin embargo, no hemos detectado en la literatura suficientes datos que confirmen o descarten esta hipótesis.

Se han descrito casos en que la pupariación involucra otras modificaciones de la cutícula larval, además de la tanificación y esclerotización de los componentes ya depositados. Ha sido descrita la incorporación de sales calcio en la cara interna del pupario de ciertos dípteros (Richards, 1978; Hackman 1984). En *Musca autumnalis* se deposita carbonato de calcio, bajo el control de la β -ecdisona (Hackman, 1984). En *Musca fergusonii*, fosfatos y carbonatos de calcio y magnesio contribuyen al endurecimiento del pupario (Richards, 1978; Hackman, 1984). En *Rhagoletis cerasi*, se observa antes de la apólisis, una secreción de gránulos de carbonato de calcio que luego se incorporará al pupario.

En *Ceratitis capitata*, no se ha detectado la acumulación de calcio en la cutícula durante la pupariación (Wappner, com. pers.). Aparentemente, existirían varios procesos que participan en la formación del pupario, y no todos tendrían lugar en distintos dípteros. El hipotético fenómeno de "calafateo" observado en *Ceratitis capitata* sería una nueva modificación de la cutícula larval durante la pupariación. Este material de calafateo podría ser de origen epitelial o ser proveniente de hemolinfa (ver esquema).

IX. Resumen de los resultados obtenidos, conclusión y perspectivas.

1. Resumen.

Durante el desarrollo de la presente tesis se han estudiado los eventos moleculares que ocurren en la cutícula pupal y en el pupario en las primeras etapas de la metamorfosis. Estos fenómenos se correlacionaron con eventos morfológicos estudiados simultáneamente por otros miembros del laboratorio (Rabossi et al., 1991; Rabossi 1991). De nuestros resultados se concluye que *Ceratitis* es un buen modelo experimental para el estudio de la expresión génica durante el desarrollo de los dípteros. Hasta la fecha, el animal experimental más frecuentemente utilizado es *Drosophila melanogaster*.

Además de presentar interés por tratarse de una plaga cuya biología, bioquímica y genética han sido poco estudiadas (ver Introducción), *Ceratitis* presenta ciertas ventajas específicas respecto de otros modelos de laboratorio. El ciclo de vida de esta mosca presenta una duración mayor que el de *Drosophila*. A 23 °C, entre el inicio de la pupariación y la emergencia, transcurren 4-4.5 días en *Drosophila* (Ashburner, 1989) y 12 días en *Ceratitis* (ver capítulo III, páginas 49-51). Los eventos morfológicos y de diferenciación bioquímica que tienen lugar durante la metamorfosis ocurren más lentamente en esta última, lo cual facilita su estudio. Tratándose además de animales de mayor tamaño (4 y 1.5 mm, respectivamente), resulta ideal para el empleo de ciertas técnicas tales como microinyección y disección.

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados, o están en vías de publicación, en los siguientes trabajos: Boccaccio y Quesada, 1989a; 1989b; Rabossi et al., 1991; Boccaccio y Quesada, 1991; Boccaccio y Quesada, manuscrito en preparación. Se resumen a continuación los resultados alcanzados:

a. Hemos demostrado la existencia de grupos diferentes de proteínas cuticulares en los diferentes estadios del desarrollo de *Ceratitis capitata*. Estos grupos de proteínas son: las de primer y segundo estadio larval, las de tercer estadio larval (LCP); las pupales (PCP) y las de adulto (ACP) (ver figuras III.6 y III.7). Nuestros estudios en *Ceratitis capitata* (Boccaccio y Quesada, 1989a) y los realizados por otros autores en otros dípteros (Chihara et al., 1982; Skelly y Howells, 1988; Souliotis et al., 1988a) demuestran que en estos insectos las proteínas cuticulares son específicas de estadio.

b. Contrariamente a lo descrito en otros insectos, hemos encontrado que la fracción proteica de la cutícula pupal de *Ceratitis* está constituida casi exclusivamente por un único polipéptido: PCG-100. En los otros estadios estudiados, se encontró una mezcla de distintas proteínas (ver capítulo III).

c. Se prepararon antisueros en conejos contra proteínas cuticulares. Se obtuvieron antisueros monoespecíficos anti-PCG-100, con los cuales se demostró que esta proteína es específica de estadio pupal y específica de tegumento (ver capítulo IV; Boccaccio y Quesada, manuscrito en preparación).

d. Los estudios inmunológicos indicaron que la PCG-100 de *Ceratitis* no comparte epítopes con otras proteínas cuticulares de ese insecto pero sí estaría emparentada con la PCP-82 de *Drosophila melanogaster*. Esta última es la proteína cuticular pupal de mayor peso molecular de *Drosophila*, es específica de estadio y también está glicosilada (Chihara et al., 1982; Silvert et al., 1984).

e. Hemos estudiado el grado de glicosilación de las proteínas cuticulares de distintos estadios de *Ceratitis*, encontrando que, análogamente a lo descrito para *Drosophila melanogaster*, las LCP están poco glicosiladas, en tanto que se detectaron glicoproteínas entre las PCP (ver capítulo VII; Boccaccio y Quesada, 1989a).

f. Se demostró la presencia de fucosa y manosa en la proteína cuticular pupal mayoritaria, PCG-100 por radiomarcación *in vivo* con 2[³H]-manosa y [¹⁴C]-glucosa (ver capítulo VII). Hasta donde sabemos, sólo recientemente se demostró la presencia de fucosa en oligosacáridos de alta manosa en insectos (Guillén et al., 1989); pero el caso de PCG-100 es el primero en que se describe una glicoproteína individual de insecto del tipo de alta manosa que, además, contiene fucosa. Algo similar ha sido descrito anteriormente en moluscos y plantas (van Kuik et al., 1985; Faye et al. 1989).

g. Se estudió la biosíntesis de las proteínas cuticulares durante el estadio pupal de *Ceratitis capitata* mediante microinyección de [³⁵S]-metionina. Es la primera vez que se realiza *in vivo*, en condiciones estrictamente fisiológicas, el estudio de la síntesis de proteínas cuticulares de insecto (Boccaccio y Quesada, 1989a). Las proteínas cuticulares pupales mostraron un período de síntesis breve y preciso, al comienzo del estadio pupal (ver capítulo VI).

h. Se analizó la síntesis de la proteína cuticular pupal mayoritaria, PCG-100, y su presencia en la cutícula (páginas 124-131). Encontramos que esta proteína se sintetiza principalmente entre las 48 y 64 horas desde el comienzo de la pupariación y está presente durante todo el estadio pupal (hasta el sexto día) (Boccaccio y Quesada, 1989a; Boccaccio y Quesada, manuscrito en preparación). Como se discute en los capítulos III y VI, la “desaparición” de esta proteína puede deberse a que se degrada o se esclerotiza.

i. También por radiomarcación *in vivo*, seguida de “chase” *in vitro* (capítulo VII) se estudió el proceso de síntesis, glicosilación, procesamiento, exportación y deposición en cutícula de PCG-100. Hasta donde sabemos, es la primera vez que se realiza este tipo de estudio para el caso de una proteína cuticular.

Hemos encontrado que el proceso completo ocurre rápidamente, en unos 10 minutos. No hemos detectado diferencias en el peso molecular aparente de PCG-100 durante el pasaje por el retículo, y aparato de Golgi. Esto sería indicativo de que no se agregan a PCG-100 largas cadenas oligosacáridicas, en concordancia con los experimentos que realizamos para caracterizar los oligosacáridos unidos a esta proteína. Tampoco encontramos diferencias significativas de peso molecular entre la(s) especie(s) intracelular(es) de esta proteína y la depositada en cutícula.

j. Hemos detectado la existencia de proteínas que aparentemente se incorporarían al pupario durante su formación. Estos estudios se hicieron en colaboración con Pablo Wappner (Rabossi et al., 1991). Es la primera vez que se describe este fenómeno, para el cual existen varias posibles explicaciones (ver capítulo VIII).

k. Hemos estudiado la síntesis de la más abundante de estas proteínas, la PMP-26, por radiomarcación *in vivo* con [³⁵S]-metionina. Aparentemente, se sintetizaría durante la etapa pre-pupal (16-30 horas) y se depositaría en el pupario bastante después, hacia las 46-48 horas. El hecho de que su incorporación al pupario se produce masivamente y bastante después de su síntesis, sugiere que debe existir un mecanismo de acumulación (vesículas?) y que la exportación y/o deposición estarían estrictamente controladas en el tiempo.

l. Se han realizado estudios comparados a nivel de ácidos nucleicos, intentando detectar secuencias homólogas entre genes de proteínas cuticulares de *Drosophila melanogaster* y de *Ceratitis capitata*. Se iniciaron pasos experimentales que posibilitarán el clonado del gen codificante para PCG-100.

2. Conclusión y perspectivas.

Nuestros resultados apoyan la idea que postula que durante el desarrollo de los insectos holometábolos se "disparan" secuencialmente distintos programas que dirigen la morfogénesis y diferenciación. En la epidermis, el programa de construcción del exoesqueleto es activado varias veces durante la vida del animal. Hemos demostrado que la expresión de proteínas cuticulares constituye un buen modelo de regulación genómica durante el desarrollo. En los díperos, se activarían en los distintos estadios, grupos de distintos genes codificantes para proteínas cuticulares.

En *Ceratitis capitata*, mediante estudios *in vivo*, hemos determinado con precisión el momento de síntesis de PCG-100, proteína cuticular pupal mayoritaria (ver capítulo VI). Esta proteína presentó un período de síntesis breve y preciso durante el desarrollo. Se expresa sólo durante las 24 horas siguientes a la eversión de la cabeza de la pupa. Es decir, el gen correspondiente estaría inactivo la mayor parte del tiempo de vida del insecto y se activaría específicamente en el momento en que existe una activa maquinaria de síntesis de cutícula: entre las 48 y 64 horas se acumula en la cutícula pupal la mayor parte del material proteico que la constituye.

La regulación de la síntesis de esta proteína estaría a cargo de la hormona de la muda (β -ecdisona), la cual directa e indirectamente (Ashburner, 1990) es capaz de ejercer el control de la expresión genética a nivel transcripcional. En *Drosophila*, no se conoce en detalle el mecanismo por el cual la hormona de la muda controla la expresión de los genes que codifican para proteínas cuticulares (Fristrom et al., 1982; Doctor et al., 1985). Aparentemente, sería más complejo que la simple unión de un complejo hormona esteroide-receptor a secuencias del DNA. En el caso de otras proteínas de expresión variable a lo largo del desarrollo, como las proteínas de hemolinfa, la β -ecdisona parece ejercer un doble control: a nivel transcripcional y traduccional (Mintzas et al., 1983; Schenkel y Scheller, 1986).

Hemos iniciado en colaboración con otros grupos el estudio de los niveles de β -ecdisona durante el estadio pre-pupal y pupal temprano. Los resultados no han sido mostrados aquí dado que, hasta la fecha han sido poco concluyentes ya que los valores de dosaje de hormona para un momento dado presentan una gran dispersión.

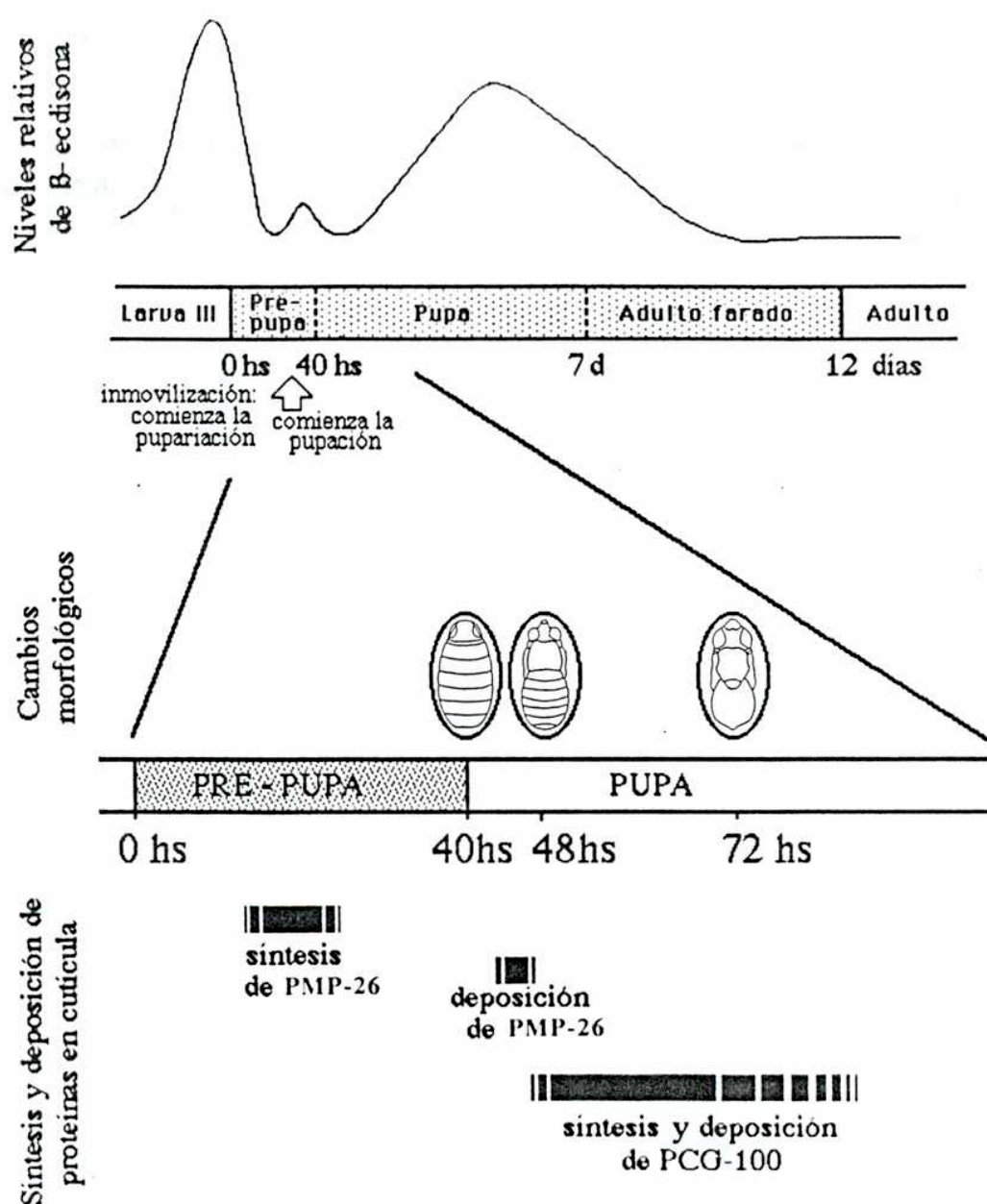


Figura IX.1: Correlación de los cambios morfológicos, síntesis de proteínas cuticulares y niveles de hormona de la muda durante el desarrollo de *Ceratitis capitata*. Los cambios morfológicos fueron descritos por Rabossi et al (1991) y Rabossi et al.(manuscrito en prep.) (ver capítulo III). La biosíntesis de las proteínas cuticulares fue estudiada en esta tesis y los niveles hormonales fueron estimados por comparación de los cambios morfológicos y bioquímicos con los descritos para otros dípteros (Handler, 1982; Bainbridge y Bownes, 1988; Fristrom et al., 1986).

No obstante, por correlación de las observaciones morfológicas descritas en otros dípteros (Handler, 1982; Bainbridge y Bownes, 1988; Fristrom et al., 1986) con las realizadas en nuestro laboratorio en *Ceratitis capitata* (Rabossi et al., 1991; Rabossi et al., manuscrito en prep.) hemos estimado la variación de los niveles de esta hormona durante la metamorfosis (ver figura IX.1).

La síntesis de la proteína mayoritaria de pupario, PMP-26, pareció estar restringida al período que se extiende entre las 16 y 30 horas del estadio pre-pupal (capítulo VIII), en tanto que -como ya se señaló- la PCG-100 se expresa más tarde, durante el estadio pupal temprano. Coincidente con el fin del estadio pre-pupal y la aparición de la morfología de la pupa temprana, entre las 26 y 43 horas se observó un cambio en el patrón de síntesis de proteínas totales (figura VIII.7). Por lo tanto, puede decirse que la PCG-100 y la PMP-26 corresponden a distintos "programas" genómicos que se activarían secuencialmente bajo condiciones hormonales distintas (ver figura IX.1). La síntesis de PMP-26 ocurriría durante el primer máximo de hormona que se observa durante la pupariación. La síntesis de PCG-100 parece ocurrir después de que el segundo incremento en los niveles de ecdiesteroides tuvo lugar. En ese momento ya se han evertido la cabeza y los apéndices (ver figura IX.1).

Para conocer la acción hormonal en la regulación de la expresión de los genes de proteínas cuticulares, sería necesario estudiar tanto el proceso transcripcional como el traduccional.

Nuestros estudios mediante experimentos de pulso y "chase" constituyen un avance en un área de la bioquímica de proteínas cuticulares muy poco estudiada: las modificaciones post-traduccionales. Se sabe que las LCP de *Drosophila melanogaster*, aunque no están glicosiladas ni presentan secuencias consenso de glicosilación, sufren un procesamiento proteolítico correspondiente al pasaje por el retículo endoplásmico (ver Introducción). Menos es conocido sobre el procesamiento que sufren las proteínas cuticulares que son glicosiladas. Ejemplos de éstas son las PCP de *Drosophila melanogaster* (Silver et al., 1984) y de *Ceratitis capitata* (esta tesis). El sistema de pulso y "chase" desarrollado permitió distinguir el compartimento intracelular del extracelular, y por lo tanto será muy útil para el estudio posterior del proceso de deposición de proteínas cuticulares.

X. Bibliografía.

Bibliografía.

- Agrell, I. P. S. y Lundquist, A. M. (1973) en *The Physiology of insecta*. (Rockstein, M. ed. Academic Press., New York.) pp:159-248.
- Andersen, S. O. (1979) Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.*, 24:29-61.
- Andersen, S. O. (1985) en *Comprehensive Insect Pysiology Biochemistry and Pharmacology*. (Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I., eds. Pergamon Press., Oxford.) pp:59-74..
- Andersen, S. O. (1988) Comparison between cuticular proteins from two locust species, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Insec Biochem.*, 18:751-760.
- Andersen, S. O. (1989) Enzymatic activities involved in incorporation of N-acetyl-dopamine into insect cuticle during sclerotization. *Insect Biochem.*, 19:375-382.
- Andersen, S. O. y Højrup, P. (1987) Extractable proteins from abdominal cuticle of sexually mature locusts, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 17:45-51.
- Andersen, S. O., Højrup, P. y Roepstorff, P. (1986) Characterization of cuticular proteins from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, 16:441-447.
- Ashburner, M. (1989) *Drosophila. A laboratory handbook*. (Cold Spring Harbor Lab. Press, N. Y.).
- Ashburner, M. (1990) Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell.*, 61:1-3.
- Bainbridge, S. P. y Bownes, M. (1988) Ecdysteroid titers during *Drosophila* metamorphosis. *Insect Biochem.*, 18:185-197.
- Ball, E. H. (1986) Quantitation of proteins by elution of Coomassie Brilliant Blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 155:23-27.
- Bianchi, A. G. y Capurro, M. d. L. (1991) *Musca domestica* larval lipoprotein. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 17:15-27.
- Bird, A. F. (1984) en *Biology of the Integument*. (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S. ,eds. Springer-Verlag., Berlin.) pp:212-233.
- Blomquist, G. J., Nelson, D. R. y de Renobales, M. (1987) Chemistry, biochemistry and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 6:227-265.

- Boccaccio, G. L. y Quesada-Allué, L. A. (1989a) In vivo biosynthesis of a stage-specific cuticle protein during early metamorphosis of the medfly *Ceratitis capitata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**:251-258.
- Boccaccio, G. L. y Quesada-Allué, L. A. (1989b) Interference of sodium dodecyl sulfate in the Bradford assay for protein quantitation. *An. Asoc. Quím. Argent.*, **77**:79-88.
- Boccaccio, G. L. y Quesada-Allué, L. A. (1991) A convenient micromethod for protein and lipid extraction from *Drosophila* and *Ceratitis* tissues. *Dros. Inf. Service.*, **70** (en prensa).
- Boccaccio, G. L. y Quesada, L. A. Synthesis and deposition of PCG-100, the main pupal cuticle glycoprotein of the Medfly *Ceratitis capitata* (manuscrito en preparación).
- Bonner, W. M. y Laskey, R. A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.*, **46**:83-88.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.
- Brookhart, G. L. y Kramer, K. J. (1990) Proteinases in molting fluid of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect. Biochem.*, **20**:467-477.
- Callaini, G. y Dallai, R. (1987) Cuticle formation during the embryonic development of the dipteran *Ceratitis capitata* Wied. *Boll. Zool.*, **54**:221-227.
- Compton, S. J. y Jones, C. G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.*, **151**:369-374.
- Coudron, T. A., Law, J. H. y Koeppe, J. K. (1981) Insect hormones. *Trends Biochem. Sci.*, **6**:248-251.
- Cox, D. L. (1987) Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with polyclonal antibodies. *Insect Biochem.*, **17**:485-492.
- Cox, D. L. y Willis, J. H. (1987a) Analysis of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* with two dimensional electrophoresis. *Insect Biochem.*, **17**:457-468.
- Cox, D. L. y Willis, J. H. (1987b) Post-translational modifications of the cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* from different anatomical regions and metamorphic stages. *Insect Biochem.*, **17**:469-484.
- Chamberlain, J. P. (1979) Fluorographic detection of radioactivity in polyacrilamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. *Anal. Biochem.*, **98**:132-135.

- Chen, D. (1968) en *Experiments in physiology and Biochemistry*. (Kerkut ed. Academic Press.) pp:201-208.
- Chen, A. C. (1987) Chitin metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **6**:267-277.
- Chihara, C. J., Silvert, D. J. y Fristrom, J. W. (1982) The cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*: stage specificity. *Dev. Biol.*, **89**:379-388.
- Christenson, L. D. y Foote, R. H. (1960) Biology of the fruit flies. *Ann. Rev. Ent.*, **5**:171-192.
- Chrysanthis, G., Marmaras, V. J. y Christodoulou, C. (1981) Major haemolymph protein in *Ceratitis capitata*: Biosynthesis and secretion during development. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **190**:33-39.
- Doctor, J., Fristrom, D. y Fristrom, J. W. (1985) The pupal cuticle of *Drosophila*: biphasic synthesis of pupal cuticle proteins *in vivo* and *in vitro* in response to 20-hydroxyecdysone. *J. Cell Biol.*, **101**:189-200.
- Dubois, M., Gilles, H., Hamilton, S., Rebers, R. y Smith, S. (1956) *Anal. Chem.*, **28**:350-354.
- Duhamel, R. C., Meezan, E. y Brendel, K. (1980) Metachromatic staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 of the proline-rich calf thymus histone, H1. *Biochim. Biophys. Acta*, **629**:432-442.
- Eriksson, K. (1985) Estimation of protein molecular weights by high performance molecular-sieve chromatography on agarose columns in sodium dodecyl sulphate solution. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **11**:145-152.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. y Wallach, D. F. H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.*, **10**:2606-2617.
- Faye, L. y Chrispeels, M. J. (1985) Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A- peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal. Biochem.*, **149**:218-224.
- Faye, L., Johnson, K. D., Sturm, A. y Chrispeels, M. J. (1989) Structure, biosynthesis and function of asparagine-linked glycans on plant glycoproteins. *Physiol. Plant.*, **75**:309-314.
- Firtel, R. A. (1981) Multigene families encoding actin. *Cell*, **24**:6-7.
- Fominaya, J. M., García-Segura, J. M. y Gavilanes, J. G. (1984) Polyadenylated-RNA during the development of *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem.*, **14**:307-311.

- Franz, G. y Blaschek, W. (1990) en *Methods in plant biochemistry*. (Dey, P.M., ed. Academic Press Inc., San Diego.) pp:291-322.
- Fristrom, J. W., Alexander, S., Brown, E., Doctor, J., Fechtel, K., Fristrom, D., Kimbrell, D., King, D. y Wolfgang, W. (1986) Ecdysone regulation of cuticle protein gene expression in *Drosophila*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 119-132.
- Fristrom, J. W., Doctor, J., Fristrom, D., Logan, R. y Silvert, D. J. (1982) The formation of the pupal cuticle by *Drosophila* imaginal disc *in vitro*. *Dev. Biol.*, 91:337-350.
- Fristrom, J. W., Hill, R. J. y Watt, F. (1978) The procuticle of *Drosophila*: heterogeneity of urea-soluble proteins. *Biochemistry*, 17:3917-3924.
- Fukamizo, T. y Kramer, K. J. (1985) Mechanism of chitin hydrolisis by the binary chitinase system in insect molting fluid. *Insect Biochem.*, 15:141-145.
- Garrels, J. I. y Gibson, W. (1976) Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell*, 9:793-805.
- Gnatzy, W. y Romer, F. (1984) en *Biology of the Integument*. (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S., eds. Springer-Verlag, Berlin.) pp:638-684.
- Grace, T. C. C. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, 195:788-789.
- Greene, C. T. (1929) Characters of larvae and pupae of fruit flies. *J. Agricul. Res.* 38:489-504.
- Guillén, E., Wappner, P., Quesada-Allué, L. A. y Couso, R. O. (1989) Estudio de las glicoproteínas de *Ceratitis capitata*. Presencia de residuos de fucosa en oligosacáridos de alta manosa. *An. Asoc. Quím. Argent.*, 77:151-158.
- Hackman, R. H. (1976) en *The insect integument*. (Hepburn, H.R., ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam) pp:107-118.
- Hackman, R. H. (1984) en *Biology of the integument*. (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S., eds. Springer-Verlag, Berlin.) pp:583-597.
- Hackman, R. H. (1986) The chemical nature of the outer epicuticle from *Lucilia cuprina* larvae. *Insect Biochem.*, 16:911-916.
- Hackman, R. H. y Goldberg, M. (1976) Comparative chemistry of arthropod cuticular proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 55B:201-206.
- Hall, N. A. (1988) Peptidases in *Drosophila melanogaster* -III. The regulation of leucine aminopeptidase P and leucine aminopeptidase G. *Insect Biochem.*, 18:157-161.

- Hancock, K. y Tsang, V. C. W. (1983) India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.*, **133**:157-162.
- Handler, A. M. (1982) Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, **93**:73-82.
- Henikoff, S., Keene, M. A., Fachtel, K. y Fristrom, J. W. (1986) Gene within a gene: nested *Drosophila* genes encode unrelated proteins on opposite DNA strands. *Cell*, **44**:33-42.
- Henry, J. M., Raina, A. K. y Ridgway, R. L. (1990) Isolation of high-molecular weight DNA from insects. *Anal. Biochem.*, **185**:147-150.
- Henzel, W. J., Mole, J. E., Mulligan, K. y Lipke, H. (1985) Sarcophagid larval proteins: partial sequence homologies among three cuticle proteins and related structures of Drosophilids. *J. Mol. Evol.*, **22**:39-45.
- Hepburn, H. R. (1985) en *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. (Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. eds. Pergamon Press., Oxford.) pp:2-58.
- Hillerton, J. E. y Vincent, J. F. V. (1983) Consideration of the importance of hydrophobic interactions in stabilizing insect cuticle. *Int. J. Biol. Macromol.*, **5**:163-166.
- Horodyski, F. M. y Riddiford, L. M. (1989) Expression and hormonal control of a new larval cuticle multigene family at the onset of metamorphosis of the tobacco hornworm. *Dev. Biol.*, **132**:292-303.
- Højrup, P., Andersen, S. V. y Roepstorff, P. (1986a) Isolation, characterization and N-terminal sequence studies of cuticular proteinases from the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Eur. J. Biochem.*, **154**:153-159.
- Højrup, P., Andersen, S. V. y Roepstorff, P. (1986b) Primary structure of a structural protein from the cuticle of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Biochem. J.*, **236**:713-720.
- Kambyssellis, M. P. (1984) A highly efficient method for collection of hemolymph, hemocytes or blood-borne organisms from *Drosophila* and other small insects. *Dros. Inf. Service.*, **60**:219-220.
- Kapp, O. H. y Vinogradov, S. N. (1978) Removal of Sodium Dodecyl Sulfate from proteins. *Anal. Biochem.*, **91**:230-235.
- Kimbrell, D. A., Berger, E., King, D. S., Wolfgang, W. J. y Fristrom, J. W. (1988) Cuticle protein gene expression during the third instar of *Drosophila melanogaster*. *Insect. Biochem.*, **18**:229-235.

- Kimbrell, D. A., Tojo, S. J., Alexander, S., Brown, E., Tobin, S. L. y Fristrom, J. W. (1989) Regulation of larval cuticle protein gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Gen.*, **10**:198-209.
- Korn, E. D. (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.*, **62**:672-725.
- Kornfeld, R. y Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**:631-634.
- König, M., Agrawal, O. P., Schenkel, H. y Scheller, K. (1986) Incorporation of calliphorin into the cuticle of the developing blowfly, *Calliphora vicina*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **195**:296-301.
- Kramer, K. J. y Hopkins, T. L. (1987) Tyrosine metabolism for insect cuticle tanning. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **6**:279-301.
- Kramer, K. J. y Koga, D. (1986) Insect chitin. Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.*, **16**:851-877.
- Kramer, K. J., Dziadik-Turner, C. y Koga, D. (1985) en *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. (Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. eds. Pergamon Press., Oxford.) pp:75-115.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, **227**:680-685.
- Lazarides, E. y Weber, K. (1974) Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**:2268-2272.
- Lemoine, A. y Delachambre, J. (1986) A water-soluble protein specific to the adult cuticle in *Tenebrio*. *Insect Biochem.*, **16**:483-489.
- Lemoine, A., Millot, C., Curie, G. y Delachambre, J. (1989) A monoclonal antibody against an adult-specific cuticular protein of *Tenebrio molitor* (Insecta, Coleoptera). *Dev. Biol.*, **136**:546-554.
- Lipke, H. y Strout, V. (1972) Peptidochitodextrins of sarcophagid cuticle II. Studies on the linkage region. *Israel J. Entomol.*, **7**:117-128.
- Lipke, H., Strout, K., Henzel, W. y Sugumaran, M. (1981) Structural proteins of sarcophagid larval exoskeleton. *J. Biol. Chem.*, **256**:4241-4246.
- Locke, M. (1976) en *The insect integument*. (Hepburn, H.R., ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.) pp:237-256.
- Locke, M. (1984) en *Biology of the Integument*. (Berotter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S. eds. Springer-Verlag., Berlin.) pp:502-522.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
- Lundahl, P., Greijer, E., Sandberg, M., Cardell, S. y Eriksson, K. (1986) A model for ionic and hydrophobic interactions and hydrogen-bonding in sodium dodecyl sulfate-protein complexes. *Biochem. Biophys. Acta.*, **873**:20-26.
- Macfarlane, D. E. (1989) Two dimensional Benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chloride/Sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal. Biochem.*, **176**:457-463.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Lab. Press., New York.).
- Marinotti, O. y de Bianchi, A. G. (1986) Structural properties of *Musca domestica* storage protein. *Insect Biochem.*, **16**:709-716.
- Marmaras, V. J. y Tsakas, S. (1988) Temporally regulated protein synthesis in cultured haemocytes of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* during larval and prepupal development: internalization of larval serum proteins into the haemocytes. *Dev. Biol.*, **129**:294-303.
- Mascher, E. y Lundahl, P. (1986) High performance agarose gel chromatography in sodium dodecyl sulfate of integral membrane proteins from human red cell, with special reference to the glucose transporter. *Biochem. Biophys. Acta.*, **856**:505-514.
- Mintzas, A. C. y Reboutsikas, D. (1984) Isolation, characterization and immunological properties of ceratitin-4, a major haemolymph protein of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem.*, **14**:285-291.
- Mintzas, A. C. y Rina, M. D. (1986) Isolation and characterization of three major larval serum proteins of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (diptera). *Insect Biochem.*, **16**:825-834.
- Mintzas, A. C., Chrysanthi, G., Christodoulou, C. y Marmaras, V. J. (1983) Translation of the mRNA coding for the major haemolymph proteins of *Ceratitis capitata* in cell-free system. Comparison of the translatable mRNA levels to the respective biosynthetic level of the proteins in the fat body during development. *Dev. Biol.*, **95**:492-496.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. y Strecker, G. (1986) en *Carbohydrate analysis. A practical approach*. (Chaplin, M. F. & Kennedy, J. F., eds. IRL Press Limited., Oxford.) pp:143-204.

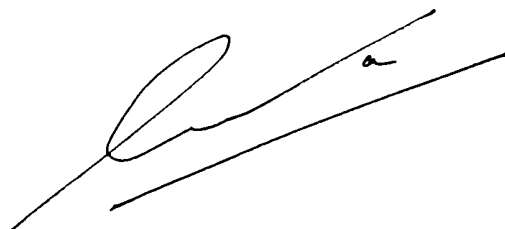
- Mukha, D. V., Kramerov, A. A. y Gvozdev, V. A. (1987) Nascent glycoproteins with a chitin-like carbohydrate component in *Drosophila melanogaster* imaginal discs. *Insect Biochem.*, **17**:919-927.
- Muzzarelli, R. A. A. (1976) en *The insect integument*. (Hepburn, H.R., ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.) pp:63-85.
- Neville, A. C. (1975) *Biology of the arthropod cuticle*. (Springer-Verlag Berlin. Heildelberg, New York.).
- Neville, A. C. (1984) en *Biology of the integument*. (Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A.G. & Richards, K.S., eds. Springer-Verlag., Berlin.) pp:611-625.
- Palli, S. R. y Locke, M. (1988) The synthesis of hemolymph proteins by the larval fat body of an insect *Calpodes ethlius* (Lepidoptera: hesperiidae). *Insect Biochem.*, **18**:405-413.
- Pollard, T. D. y Cooper, J. A. (1986) Actin and actin-binding proteins, a critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**:987-1035.
- Pont Lezica, R. y Quesada-Allué, L. A. (1990) en *Methods in Plant Biochemistry*. (Dey, P.M., ed. Academic Press Inc., San Diego.) pp:443-482.
- Psarianos, C. G., Lampropoulou, M. y Marmaras, V. J. (1987) Alkaline phosphatase in the integument of *Ceratitis capitata*. *Insect Biochem.*, **17**:619-624.
- Quesada-Allué, L. A. (1978). Derivados de dolicol en los insectos (Tesis Doctoral. UBA)
- Quesada-Allué, L. A. (1980) The biosynthesis of glucose containing insect lipid linked oligosaccharide and its possible role in glycoprotein assembly. *Mol. Cell. Biochem.*, **33**:149-155.
- Quesada-Allué, L. A. (1982) The inhibition of insect chitin synthesis by tunicamycin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **105**:312-319.
- Quesada-Allué, L. A. (1987) en *Chagas' disease vectors*. (Brenner, R.R. & Stoka, A., eds. CRC Press., Boca Ratón, Florida.) pp:77-94.
- Quesada-Allué, L. A. y Belocopitow, E. (1978) Lipid-bound oligosaccharides in insects. *Eur. J. Biochem.*, **88**:529-541.
- Quesada-Allué, L. A., Marechal, L. R. y Belocopitow, E. (1976) Biosynthesis of poliprenol phosphate sugars by *Ceratitis capitata* extracts. *FEBS Letters.*, **67**:243-247.

- Rabossi, A. (1991). Marcadores morfológicos y moleculares durante la metamorfosis de la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata*. (Seminario de Licenciatura. UBA).
- Rabossi, A., Boccaccio, G. L., Wappner, P. y Quesada-Allué, L. A. (1991) Morphogenesis and cuticular markers during the larval-pupal transformation of the medfly *Ceratitis capitata*. *Entomol. exp. appl.*, (en prensa).
- Rabossi, A., Wappner, P. y Quesada-Allué, L. A. Larva to pharate adult transformation in the Medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (manuscrito en preparación).
- Rebers, J. E. y Riddiford, L. M. (1988) Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J. Mol. Biol.*, **203**:411-423.
- Rehn, K. G. y Rolim, A. L. R. (1990) Purification and properties of a storage protein from the hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.*, **20**:195-201.
- Rhum, M. E. y Calkins, C. O. (1981) Eye-color changes in *Ceratitis capitata* pupae, a technique to determine pupal development. *Entomol. Exp. & Appl.*, **29**:237-240.
- Richards, A. G. (1978) en *Biochemistry of insects*. (Rockstein, M., ed. Academic Press Inc., New York.) pp:205-232.
- Riddiford, L. M. (1982) Changes in translatable mRNAs during the larval-pupal transformation of the epidermis of the tobacco hornworm. *Dev. Biol.*, **92**:330-342.
- Roberts, E. P. y Willis, J. H. (1980a) The cuticle proteins of *Tenebrio molitor*. I. Electrophoretic banding patterns during postembryonic development. *Dev. Biol.*, **75**:59-69.
- Roberts, E. P. y Willis, J. H. (1980b) The cuticle proteins of *Tenebrio molitor*. II. Patterns of synthesis during postembryonic development. *Dev. Biol.*, **75**:70-77.
- Rosenthal, K. S. y Koussale, F. (1983) Critical micelle concentration determination of nonionic detergents with Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Chem.*, **55**:1115-1117.
- Rudall, K. M. (1976) en *The insect integument*. (Hepburn, H.R., ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.) pp:21-40.

- Schaefer, J., Kramer, K. J., Garbow, J. R., Jacob, G. S., Stejskal, E. O., Hopkins, T. L. y Speirs, R. D. (1987) Aromatic cross-links in insect cuticle: detection by solid-state ^{13}C and ^{15}N NMR. *Science*, **235**:1200-1204.
- Schenkel, H. y Scheller, K. (1986) Stage- and tissue-specific expression of the genes encoding calliphorin, the major larval serum protein of *Calliphora vicina*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **195**:290-295.
- Schreurs, V. V. A. M., Boekholt, H. A. y Koopmanschap, R. E. (1982) Gel filtration in sodium dodecyl sulfate of hydrophobic muscle proteins on Sephacryl S-400 superfine. *J. Chromatogr.*, **254**:203-210.
- Selvendran, R. R. y Ryden, P. (1990) en *Methods in plant biochemistry*. (Dey, P.M., ed. Academic Press Inc., San Diego.) pp:549-580.
- Silvert, D. J. (1985) en *Comprehensive Insect Physiol. Biochemistry and Pharmacology*. (Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I., eds. Pergamon Press., Oxford.) pp:239-254.
- Silvert, D. J., Doctor, J., Quesada, L. y Fristrom, J. W. (1984) Pupal and larval cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry*, **23**:5767-5774.
- Skelly, P. J. y Howells, A. J. (1987) Larval cuticle proteins of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem.*, **17**:625-633.
- Skelly, P. J. y Howells, A. J. (1988) The cuticle proteins of *Lucilia cuprina*: stage specificity and immunological relatness. *Insect Biochem.*, **18**:237-247.
- Snyder, M., Hirsh, J. y Davidson, N. (1981) The cuticle genes of *Drosophila*: a developmentally regulated gene cluster. *Cell*, **25**:165-167.
- Snyder, M., Hunkapiller, M., Yuen, D., Silvert, D., Fristrom, J. y Davidson, N. (1982) Cuticle protein genes of *Drosophila*: structure, organization and evolution of four clustered genes. *Cell*, **29**:1027-1040.
- Souliotis, V., Patrinoú-Georgoula, M., Zongza, V. y Dimitriadis, G. J. (1988a) Cuticle proteins during the development of *Dacus oleae*. *Insect Biochem.*, **18**:485-492.
- Souliotis, V., Patrinoú-Georgoula, M., Zongza, V. y Dimitriadis, G. J. (1988b) Isolation and characterization of mRNAs coding for the third instar larvae cuticle proteins of *Dacus oleae*. *Insect Biochem.*, **18**:829-837.
- Souliotis, V. y Dimitriadis, G. J. (1989) Identification and molecular analysis of the cuticle protein genes of *Dacus oleae*. *Insect Biochem.*, **19**:499-507.
- Spector, T. (1978) Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation. *Anal. Biochem.*, **142**:146.

- Sridhara, S. (1983) Cuticular proteins of the silkmoth *antheraea polyphemus*. *Insect Biochem.*, **13**:665-675.
- Sridhara, S. (1985) Evidence that pupal and adult cuticular proteins are coded by different genes in the silkmoth *antheraea polyphemus*. *Insect Biochem.*, **15**:333-339.
- Stiles, B. y Leopold, R. A. (1990) Cuticle proteins from the *Anthonomus grandis* abdomen: stage specificity and immunological relatedness. *Insect Biochem.*, **20**:113-125.
- Storti, R. V., Coen, D. M. y Rich, A. (1976) Tissue-specific forms of actin in the developing chick. *Cell*, **4**:522-527.
- Strout, V., Lipke, H. y Geoghegan, T. (1976) en *The insect integument*. (Hepburn, H.R., ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.) pp:43-60.
- Tanford, C., Nozaki, Y., Reynolds, J. A. y Makino, S. (1974) Molecular characterization of proteins in detergent solutions. *Biochemistry*, **13**:2369-2376.
- Terán, H. R. (1977) Comportamiento alimentario y su correlación a la reproducción en hembras de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera, Trypetidae). *Rev. Agronom. N. O. Argent.*, **14**:1-4.
- Tojo, S. J., Germeraad, s., King, D. S. y Fristrom, J. W. (1987) Polarized secretion of an ectopic protein in *Drosophila* salivary glands *in vivo*. *EMBO J.*, **6**:2249-2254.
- van Kuik, J. A., van Halbeek, H., Kamerling, J. P. y Vliegenthart, F. G. (1985) Primary structure of the low-molecular-weight carbohydrate chains of *Helix pomatia* a-hemocyanin. *J. Biol. Chem.*, **260**:13984-13988.
- Wappner, P. (1989). Caracterización genética y bioquímica de mutantes cuticulares de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata*. (Seminario de Licenciatura. UBA).
- Wappner, P., Manso, F., Cladera, J. y Quesada-Allué, L. A. (1991) Black cuticle mutants of *Drosophila* and *Ceratitis* might be related. *Dros. Inf. Service*, **70** (en prensa).
- Willis, J. H. (1987) Cuticular proteins: the neglected component *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **6**:203-215.
- Willis, J. H. (1989) Partial amino acid sequences of cuticular proteins from *Hyalophora cecropia*. *Insect Biochem.*, **19**:41-46.

- Willis, J. H., Regier, J. C. y Debrunner, B. A. (1981) The metamorphosis of arthropodin. en *Currents Topics in Insect Endocrinology and Nutrition: Annual Meeting of the Entomological Society of America* (Bhaskaran, G.Friedman, S. &Rodriguez, J. G., eds. Plenum Pres. Denver, Colo., USA).
- Wolfgang, W. J., Fristrom, D. y Fristrom, J. W. (1986) The pupal cuticle of *Drosophila* : differential ultrastructural immunolocalization of cuticle proteins. *J. Cell Biol.*, **102**:306-311.
- Zacharuk, R. Y. (1976) en *The insect integument.* (Hepburn, H.R., ed. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam) pp:299-319.

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'S' and 'L' followed by a horizontal line.A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'R' and 'Y' followed by a horizontal line.