

SINTESIS DE PROTEINAS EN EL CUERPO GRASO DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: Noctuidae)

Felipe Garcia V.
Marcial Morante T.
Departamento de Biología
Universidad del Valle

Abstract

As an objective to study the protein synthesis in pupa and adult *S. frugiperda* fat bodies, in vitro ^3H Leucine labeling experiments were carried out. The analysis of ^3H Leucine incorporation Kinetics in female pupa of six day, showed a maximum incorporation time of 30 minutes. Using the same methodology applied to observe the protein synthesis along the pupal development, permitted to state a maximum at sixth day in female pupae. The values of specific activity calculated from the synthesized polypeptides revealed an intense biosynthetic activity at 4, 5 and 6 pupal days. By means of PAGE SDS could be identified the polypeptide fractions synthesized exclusively in a predetermined day of adult period, those were nominated as P^4 (200 Kd), P^5 (125 Kd), P^6 (105 Kd) and P^7 (88 Kd) which were characteristics in the fat body of 2 days adult. By first time results about of metabolic biosynthetic activity in the fat body, were obtained. On the other hand the striking coincidence between the detection of P^4 (200 Kd) and the store of vitelinas in the oocytes of vitelogenic females of *S. frugiperda* were made evident.

Resumen

Con el objetivo de estudiar la síntesis de proteínas del cuerpo graso de *S. frugiperda* realizamos experiencias de incorporación in vitro con Leucina ^3H en cuerpos grasos de pupas y hembras adultas. El análisis de las cinéticas de

incorporación del precursor radioactivo en el tejido de pupas hembras en el día 6, demostró que el tiempo de máxima incorporación era a los 30 minutos; empleando la misma metodología, fue posible observar un pico de máxima actividad de síntesis protéica en este día. El cálculo de los valores de actividad específica de los polipéptidos sintetizados, evidenció una intensa actividad en los días 4,5 y 6 de la fase pupal. Utilizando electroforesis en PAGE-SDS, se identificaron polipéptidos que sólo son sintetizados en un día determinado del adulto, y que no son comunes a los otros estadios. Los hemos denominado, P^* (200 Kd), P^5 (125 Kd), P^6 (105 Kd) y P^7 (88 Kd) los cuales son característicos a partir del día 2 de la etapa adulta. Por primera vez en *S. fragiperda* se han obtenido resultados con respecto a la actividad metabólica del cuerpo graso: así como también la coincidencia de la síntesis de P^* (200 Kd) con la acumulación de las vitelinas en los ocitos de hembras vitelogénicas.

INTRODUCCION

En insectos el cuerpo graso es un tejido importante para el estudio de la regulación de la diferenciación celular y la expresión génica a lo largo del desarrollo. Este se encuentra irrigado por la hemolinfa y sus células están acopladas eléctricamente a las vecinas. De esta forma las células del cuerpo graso toman información de su entorno, estimulándolas a sintetizar y/o almacenar macromoléculas (1).

Empleando métodos de fraccionamiento celular, de incorporación de precursores marcados radioactivamente y electroforesis en geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturalizantes, ha sido posible caracterizar algunas proteínas del cuerpo graso y hemolinfa en varias especies de Dípteros (1). Una de ellas es la californina, obtenida en extractos protéicos de varias especies de *Caliphora*, esta proteína posee un peso molecular de 530 Kd.; en su forma nativa es un hexámero compuesto de subunidades idénticas con peso molecular de 87 Kd., el análisis del contenido de aminoácidos demostró que es rica en fenilalanina y tirosina. Una posible función de esta proteína es la de participar en la formación de la cutícula en el adulto (2). Se han caracterizado proteínas similares a la californina en *Drosophila melanogaster*. Dos de las más importantes, son las LSP_s (proteínas larvales del suero) LSP₁ y LSP₂. Dichas proteínas se encuentran en altas concentraciones en la hemolinfa de larvas en el tercer instar (3).

Un grupo de proteínas bastante estudiadas sintetizadas en el cuerpo graso de los insectos, son las vitelogeninas. Estas se definen como las proteínas del vitelo, siendo sintetizadas extraovario y capturadas por los

ovocitos en desarrollo en contra de un gradiente de concentración (4). Telfer (1954) (5), estudiando las hembras de *Hyalophora cecropia* encontró en la hemolinfa una proteína que era predominante en los huevos, asignándole el nombre de proteína hemolinfática característica de hembras. Esta proteína fue llamada más tarde vitelogenina, el término se deriva de vitelogenésis, proceso de diferenciación y crecimiento de los ocitos. Durante la vitelogenésis ocurre un acúmulo de proteínas en forma de gránulos que servirán de alimento al embrión (5), (6).

Spodoptera frugiperda es una especie de la familia Noctuidae que se caracteriza por ser una plaga de varios cultivos de importancia económica en el mundo (7). Las larvas de esta especie, atacan con mayor intensidad al algodón, maíz y varias especies de frutales, ocasionando bajas en el rendimiento de estos cultivos (7).

Hemos reportado resultados iniciales sobre algunos aspectos bioquímicos de las proteínas que hacen parte del vitelo en los ovocitos de hembras vitelogénicas de esta especie. Utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, fueron caracterizadas cuatro fracciones polipeptídicas en ovarios de hembras adultas de diferentes edades. Los pesos moleculares asignados a cada una de las proteínas fueron los siguientes: Vt₁ (160 Kd), Vt₂ (140 Kd), Vt₃ (72 Kd) y Vt₄ (25 Kd) (8).

Existen pocos resultados que demuestran el papel de los polipéptidos sintetizados en el cuerpo graso de Lepidópteros. En este trabajo presentamos por primera vez la caracterización bioquímica de fracciones protéicas que son sintetizadas en el cuerpo graso de hembras (pupas y adultos) de *S. frugiperda*.

METODOLOGIA

Animales

Se emplearon pupas y adultos hembras de *Spodoptera frugiperda* criados en nuestro laboratorio según la metodología desarrollada por García *et al* (Datos no publicados). En una caja de plástico o en un frasco de vidrio se colocaron 20 o 30 larvas. Estas fueron alimentadas con hojas de higuera, siendo mantenidas en oscuridad sobre condiciones de humedad y temperatura constantes. Diariamente se limpió el recipiente colocando nuevo alimento. Al pasar a la fase de prepupa se les suspendió la higuera colocándolas sobre una capa de aserrín fino. Se procedió al sexaje y a la caracterización del tiempo de duración de la fase pupal de acuerdo a lo descrito por Alvarez y Sánchez (1982) (7). Los adultos eran mantenidos

en recipientes de vidrio alimentándolos con una solución de miel de abejas al 5%, a temperatura y humedad constantes (80% de humedad relativa y 25°C). Se procedió a la disección de las pupas y adultos empleando una microtijera y el cuerpo graso fue desprendido de la pared abdominal con la ayuda de una aguja de vidrio. El tejido se colectó mediante aspiración con un capilar.

Administración de Leucina ^3H in vitro

En todos los experimentos se utilizó Leucina ^3H (marca Amersham, actividad específica 159 Ci/mmol.). Volúmenes de 2 μl del aminoácido se secaban sobre una lámina siliconizada y el residuo era disuelto en 50 μl de medio de incubación (DIFCO medio mínimo de sales); después de 15 minutos, tiempo necesario para una disolución completa del aminoácido, se colocaba en cada gota el cuerpo graso dejándolo por 30 minutos o por tiempos variables dependiendo de la experiencia (9).

Al cabo de este tiempo de incorporación se colectaron los cuerpos grasos en tubos eppendorf que contenían 100 μl de tampón desnaturante de Laemli (10). Las preparaciones eran sometidas a incubación durante 1 hora a 55°C, y posteriormente almacenadas a -20°C hasta su uso.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para la preparación de las diferentes fracciones protéicas utilizamos el método desarrollado por Laemli (1970) (10), con algunas modificaciones: la concentración del gel de separación fue del 8%, la longitud del gel de corrida fue de 12 cm., el gel de empilamiento fue del 3% y el tampón del electrodo era Tris-HCl 0.025 M pH 6.8, Glicina 0.192 M y SDS al 0.1%.

La electroforesis se realizó bajo una corriente de 120 mA hasta que el colorante alcanzó el extremo inferior del gel. Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas obtenidas del cuerpo graso de *S. frugiperda*, empleamos el método descrito por Shapiro *et al* (1967) (11). Usando como patrones de referencia proteínas de peso moleculares conocidos.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se hizo utilizando el método de Lowry *et al* (1951) (12), con las modificaciones de Oyama & Eagle (1956) (13).

Determinación de radioactividad

Se determinó la actividad específica de las proteínas sintetizadas precipitando 5 μ l de cada una de las preparaciones incorporadas con TCA 5%. La fracción ácido precipitable fue colocada en 5 ml. de líquido de centelleo, y la radioactividad presente se contó en un contador de centelleo marca Beckman modelo LS 5000 con una eficiencia del 40%. La actividad específica fue calculada en función de la cantidad de cuentas por minuto por mg. de proteína presente en el cuerpo graso (9).

RESULTADOS

Síntesis de proteínas en cuerpo graso de pupas hembras

Fue monitoreada la actividad de síntesis en el cuerpo graso mediante la cuantificación de la incorporación de Leucina marcada radioactivamente. Inicialmente realizamos varias cinéticas de incorporación de Leu-³H durante tiempos variables. Los resultados obtenidos de éstas mostraron que la mayor actividad de síntesis protéica en pupas del día 6 se detectó a los 30 minutos de incorporación *in vitro* (Tabla 1).

Tiempo/minutos	Cpm $\times 10^4$ totales
5	1.1765
20	12.766625
30	40.28666
60	0.3490

Tabla 1: Cinética de incorporación de Leucina ³H en cuerpo graso de pupas hembras de *S. frugiperda* en función del tiempo de incubación *in vitro*.

Nuestro objetivo era el poder estimar la actividad metabólica del cuerpo graso en hembras de esta especie. En este sentido la cuantificación del contenido de proteínas totales en diferentes días de la fase pupal, mostró que la concentración de proteínas del cuerpo graso en pupas hembras permanecía constante del segundo al quinto día. Sin embargo, se observó una pequeña disminución del contenido protéico en pupas del sexto día. De acuerdo con los valores obtenidos se evidenció un incremento en pupas del día 7; ya en el día 8 la concentración de proteínas es menor cuando se comparó con pupas jóvenes (Tabla 2)

Pupa/día	Peso de cuerpo graso (mg)	Cpm/mg.prot	Cpm/mgprot/mgC.G.
1	7.12	662.505	93.048
2	7.41	598.214	80.730
3	7.44	779.556	104.709
4	8.13	843.407	103.740
5	7.82	988.760	126.439
6	2.51	1016.783	405.092
7	3.42	241.762	70.691
8	8.51	817.962	96.117

Tabla 2: Actividad específica de proteínas sintetizadas en el cuerpo graso de *S. frugiperda* por mg. de cuerpo graso de pupas hembras en los diferentes días de desarrollo.

Cuando examinamos los valores de incorporación del aminoácido marcado, observamos variaciones importantes. Así el estadio de prepupas, la actividad específica es baja con relación a aquellos valores obtenidos en estadios más avanzados (Figura 1). De acuerdo a los valores consignados en la Tabla 2, es posible ver que se produce un incremento en la actividad específica de las proteínas sintetizadas durante los días 4, 5 y 6 del desarrollo. El pico de máxima incorporación ocurrió en el día 6 (1.016.783 cpm/mg de proteína); después de este día la actividad sintética baja, esto es coincidente con la proximidad a la etapa de adulto.

En resumen podemos ver que la actividad de síntesis protéica del cuerpo graso es variable, y presenta la máxima actividad en el día 6 de esta fase.

Para obtener una estimación semicuantitativa de la actividad metabólica de los cuerpos grasos, consideramos el peso húmedo del tejido que se utilizó para realizar la incorporación. Los resultados obtenidos, teniendo en cuenta esta variable, nos mostraron que la actividad sintética de los cuerpos grasos es alta en los días 3 al 6 (tabla 2).

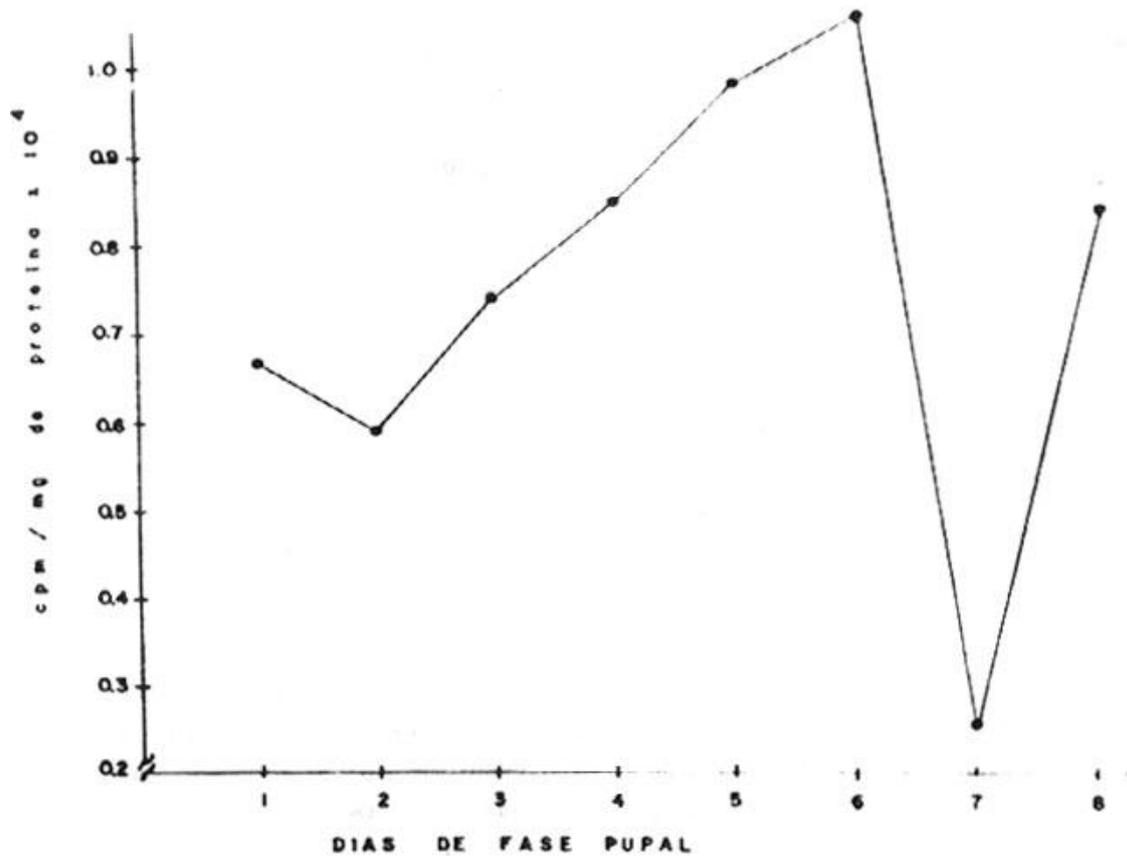


Figura 1. Perfil de actividad específica de proteínas sintetizadas por el cuerpo graso de hembras de *S. frugiperda* durante la fase pupal. Los valores consignados se refieren a la cantidad de cuentas por minuto (c.p.m) de Leucina ³H incorporada por miligramo (µg) de proteína.

Caracterización de los polipéptidos del cuerpo graso

El análisis de los patrones electroforéticos obtenidos a partir de preparaciones de proteínas de cuerpo graso, nos permitió obtener un perfil de la composición proteica de este tejido en adultos hembras de *S. frugiperda*. En la Tabla 3, se consiguan los valores de los principales polipéptidos visualizados después de coloración con azul brillante de Coomassie de los geles.

Peptido/#	R.M.	Peso Molecular (Daltons)
p^1	.086	255.000
p^2	.114	220.000
p^*	.133	200.000
p^3	.152	192.000
p^4	.260	142.000
p^5	.282	125.000
p^6	.333	105.000
p^7	.342	88.000
p^8	.370	80.000
p^9	.400	74.000
p^{10}	.420	70.000
p^{11}	.470	62.000
p^{12}	.550	51.000
p^{13}	.580	48.000
p^{14}	.650	42.000

Tabla 3: Migración relativa y pesos moleculares de los polipéptidos detectados en cuerpo graso de pupas hembras de *S. frugiperda*.

Estudiando los patrones correspondientes se observó que en adultos de 0 días es posible detectar 10 fracciones protéicas. Los polipéptidos determinados presentaron pesos moleculares que variaban de 255 Kd a 14 Kd. De éstos los más abundantes correspondieron a las bandas con pesos moleculares de 88 Kd y 74 Kd. Por otro lado, en hembras de primer día aparecen 14 polipéptidos. El análisis del patrón obtenido evidenció que las bandas diferentes se observaban en proteínas que correspondían a pesos moleculares de 70 Kd, 62 Kd, 51 Kd, 42 Kd y 14 Kd. Las fracciones más abundantes tenían los mismos RM que aquellos detectados en 0 días.

A partir del día 2 de adulto se caracterizaron 15 polipéptidos con pesos moleculares de 255 Kd a 14 Kd. Es importante resaltar la presencia de una nueva banda protéica con un peso molecular de 200 Kd. Este polipéptido lo hemos denominado con P^* . Esta proteína incrementa su concentración en el día 2 y 3 de la fase adulta. A partir de este punto se observa una disminución de su concentración (pupas de 4 y 5 días) (figura 2).

Es importante mencionar que la concentración de las principales fracciones polipeptídicas decrece en adultos de 4 y 5 días (figura 2), aunque se conserva la misma distribución de péptidos observado en los primeros días del adulto.

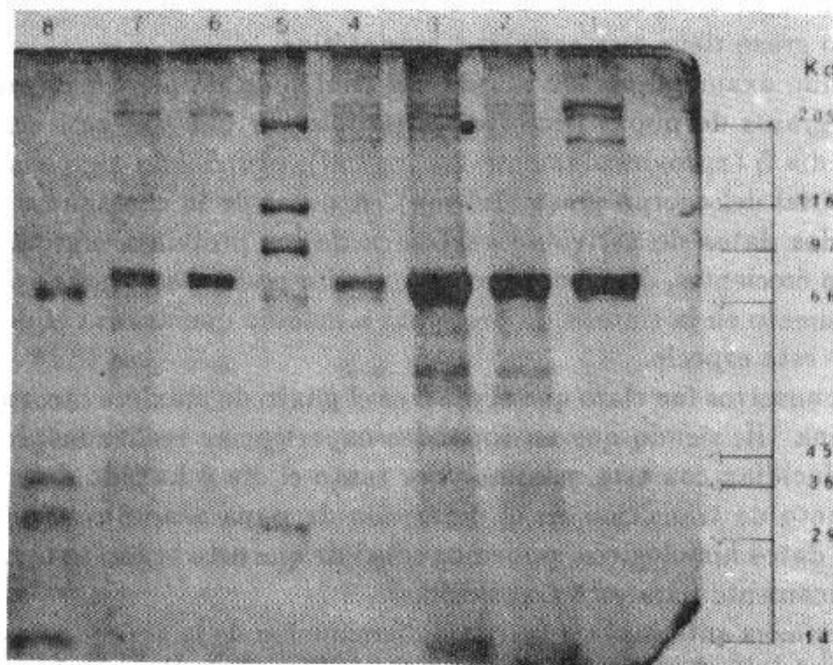


Figura 2. Patrón electroforético de proteínas extraídas de cuerpo graso de adultos hembras de *S. frugiperda*.

Muestras de proteínas extraídas de cuerpo graso de adultos, hembras en diferentes días del desarrollo, fueron sometidas a electroforésis en gel de poliacrilamida SDS 8% y coloreadas con Comassie Blue R. 250. (1) Cuerpo graso adulto 0 días. (2) Cuerpo graso adulto 1 día. (3) Cuerpo graso adulto 2 días. (4) Cuerpo graso adulto 3 días. (5) Marcador de alto peso molecular. (6) Cuerpo graso de adulto 4 días. (7) Cuerpo graso de adulto 5 días. (8) Marcador de bajo peso molecular.

DISCUSION

En este trabajo se presentan por primera vez resultados relacionados con la actividad metabólica del cuerpo graso de un Lepidóptero de importancia económica. Estudios sobre la síntesis de proteínas en el cuerpo graso de otros lepidópteros, apuntan a la alta tasa de incorporación de precursores de proteínas. Nuestros resultados son confirmatorios de la función de este órgano en el metabolismo biosintético de los insectos (1).

En larvas y pupas de *Hyalophora cecropia*, medidas de la actividad específica de los polipéptidos sintetizados en diferentes estadios del desarrollo, demuestran que el cuerpo graso en esta especie es un tejido de alta actividad (2). Los resultados obtenidos en *S. frugiperda* son similares a los observados en *Hyalophora*; siendo así podemos concluir que en *Spodoptera*,

el cuerpo graso tiene una actividad biosintética.

Cuando examinamos los valores del contenido de proteínas totales en cuerpos grasos de pupas hembras, es posible ver que son casi constantes hasta el día 5 (aproximadamente 2.5 mg/ml); ocurriendo algo similar con el peso total del cuerpo graso (7.5 mg). A pesar de la constancia de estos valores, los datos de actividad específica de las proteínas sintetizadas se muestran crecientes, de acuerdo con lo anterior podemos afirmar que ocurre un incremento en la síntesis de proteínas a medida que avanza el desarrollo pupal de esta especie.

Para nosotros fue claro que el día 6 es el punto de máxima incorporación de Leucina ^3H ; siendo que en todas las experiencias realizadas, los resultados coincidían con este máximo. Por tanto el día 6 ha sido determinado como punto de transición en el desarrollo de pupa a adulto. Aunque no tenemos datos histológicos, podemos concluir que este tejido se organizaría metabólicamente para esta transición.

La premisa anterior la refuerza la disminución de la actividad específica en pupas del día 7, la menor de todas las registradas. De esta forma podemos afirmar que ya en el preadulto se determinaría la actividad metabólica del futuro adulto (6). Desafortunadamente existen pocos trabajos en este sentido, por lo que se hace difícil establecer paralelos entre nuestra especie y otros lepidópteros. De cualquier forma son importantes pues se constituyen en fuentes de comparación para otros miembros del orden.

En el desarrollo de los insectos, es posible correlacionar el apareamiento de ciertas fracciones polipeptídicas con eventos cruciales del desarrollo morfológico. En este sentido se puede relacionar la presencia del polipéptido de 200 Kd, el denominado P^* , con el incremento de la concentración de las vitelinas detectadas en el vitelo de hembras vitelogénicas de 2 y 3 días (8). Dicha coincidencia es interesante pues las vitelogeninas son proteínas sintetizadas en el cuerpo graso y exportadas a la hemolinfa para posteriormente ser captadas y procesadas por los ovocitos en desarrollo (5).

En el cuerpo graso de varias especies de insectos se han podido caracterizar proteínas importantes las cuales juegan un papel clave en la fisiología del organismo. Siendo, que tanto la californina como las vitelogeninas son proteínas sintetizadas en el cuerpo graso de insectos; la proteína P^* , es una fuerte candidata, por sus condiciones, a ser la vitelogenina de *S. frugiperda*. Sin embargo, nuestros resultados son insuficientes para permitirnos afirmar tal premisa.

De acuerdo con los datos obtenidos por Angulo & García (1986) (8), la acumulación de las vitelinas en el ovario de hembras vitelogénicas ocurre en el día 2 del adulto; por esta razón, podemos decir que la aparición de este

polipéptido es un evento de síntesis de proteínas programado, específicas en este tejido

AGRADECIMIENTOS

A la Bióloga Martha Cecilia Domínguez por la ayuda en la realización de las electroforesis de proteínas. A Mario Germán Domínguez y Marcela Díaz por la asistencia técnica y al Biólogo Walter Angulo por la discusión de algunos aspectos del trabajo.

Este trabajo fue patrocinado por el fondo de investigaciones de la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle. Proyecto No. 7152.

Bibliografía

1. LOCKE, M. *The cell biology of fat body development. Insect Biology in the future "VBW 80"*. Ed. by M. Locke D.S. Smith. pp.227-230 (1980)
2. MUNN, E.A., FEINSTEIN, & GREVILLE, G.D. *The isolation and properties of protein calliphorin*. Biochem, J. 124: 367-374 (1971)
3. ROBERTS, D.B. WOLFE, J. & AKAM, M.E. *The developmental profiles of two major haemolymph protein from Drosophila melanogaster*. J. Insect. Physiol. 23: 871-878 (1977)
4. PAN, M.L. BELL, W.J. & TELFER, E.H. *Vitellogenin blood proteins synthesis by insect fat body*. Science 165: 393-394 (1969)
5. TELFER, W.H. *Inmunological studies of insect metamorphosis. II. The role of a sex-limited blood protein in egg formation by the cecropia silkworm*. J. Gen. Physiol., 37: 539-558 (1954)
6. TELFER, W.H. & Anderson, L.M. *functional transformation accompanying the initiation of a terminal growth phase in the cecropia moth oocyte*. Devl. Biol., 17: 512-535 (1968)
7. ALVAREZ, J.A. & SANCHEZ, G. *Spodoptera frugiperda (J.E. Smith): oviposición sobre maíz y sorgo*. En IX Congreso Socolen. pp.59 (1982)
8. ANGULO, W., GARCIA, F. *Caracterización bioquímica de las proteínas del vitelo de hembras vitelogénicas de Spodoptera frugiperda*. XIII Congreso Socolen. pp.71 (1986)

9. DOMINGUEZ, M.C. *Algunos aspectos citológicos de síntesis de proteínas y ácidos ribonucleicos de las glándulas salivares de Rynchosciara millery DIPTERA, Sciaridae*. Trabajo de Grado. Departamento de Biología, Universidad del Valle. pp.93 (1985)
10. LAEMLI, U.K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227: 660-685 (1970)
11. SHAPIRO, A.L., VIÑUELA, E. MAIZEL. *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-Polyacrilamide gels*. Biochem. Biophys. Commun. 28: 815-829 (1967)
12. LOWRY, H., ROSEBROUGH, N., FARR, A., RANDALL, R. *Protein in measurement with the folin phenol reagents*. J. Biochem. 193: 265-275 (1951)
13. OYAMA, V.I. & EAGLE, H. *Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin Ciocalteau)*. Proc. Soc. Exp. Biol., 91: 305-307. 1956.