



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Participación de la ruta p38 MAPK en la respuesta a  
Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* en *Anopheles gambiae*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

**ROBERTO VILLASEÑOR SOLORIO**



TUTORA:  
DRA. MARÍA ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Al azar y la necesidad;  
El azar de estar rodeado de gente excepcional  
Y la necesidad de su apoyo para alcanzar mis metas**

## **Agradezco:**

A la Dra. Luisa Fernández y a la M. en C. Nuria Jiménez por donar generosamente cristales, sus consejos y apoyo para trabajar con las toxinas.

A la Dra. Liliana Pardo y al Dr. Juan Miranda por toda su ayuda y paciencia para la clonación del gen *sek*.

A mis compañeros de laboratorio Ivan Arenas, Claudia Pérez, Jorge Sánchez, Lizbeth Cabrera y Graciela Domínguez por su colaboración, ayuda, consejos, sugerencias, quejas y regaños durante este año.

A la M. en C. Angeles Cancino por sus aportaciones, discusiones y sano buen humor en los momentos más duros. Todos sus comentarios dieron forma a este proyecto.

A la Dra. Isabel Gómez, pues sin su enorme ayuda todo el trabajo hubiera sido más arduo. Su paciencia, dedicación, motivación y esfuerzo fueron un gran ejemplo durante toda la tesis.

A los integrantes de la comisión revisora de la tesis: Dra. Alejandra Bravo, Dr. Mario Soberón, Dr. Jose Luis Puente, Dra. Yvonne Rosenstein y M. en C. Angeles Cancino por sus críticas, observaciones y comentarios.

A la Dra. Alejandra Bravo, quien logró contagiarme su emoción por este proyecto y me permitió formar parte de su grupo.

A mis padres, hermanos y familia cercana quienes con su apoyo incondicional estuvieron conmigo durante todo este año.

## **Contenido**

### **Resumen**

### **Lista de abreviaturas**

### **Introducción**

Estrategias para el control del vector <i>Anopheles gambiae</i>	1
Toxinas formadoras de poro: clasificación y mecanismo de acción	2
Toxinas Cry	3
Mecanismo de acción: Modelo Bravo	4
Mecanismo de acción: Modelo Bulla	5
Comparación entre ambos modelos	6
Mecanismo de acción en mosquitos	7
Mecanismo de muerte del insecto completo	7

### **Antecedentes** 8

### **Objetivos** 16

### **Materiales y métodos**

Cultivo de línea celular	17
Solubilización y activación de toxinas	17
Ensayo de toxicidad	18
Inhibición química en ensayos de toxicidad	19
Medición de la actividad de p38	20
Extracción de RNA	21
Síntesis de cDNA	22
Amplificación de componentes de la vía MAPK p38	23
Clonación de <i>sek</i> a pJET1	25
Subclonación de <i>sek</i> en pLITMUS 28i	27
Síntesis de dsRNA	29

### **Resultados**

Estandarización y validación del ensayo de toxicidad	31
------------------------------------------------------	----

Selección de la línea celular	33
Efecto de distintas toxinas sobre la línea 4A3A	35
Activación de p38 en respuesta a Cry11Aa	37
Inhibición química de p38	39
Amplificación y clonación de componentes de la ruta MAPK p38	41
<b>Discusión</b>	47
<b>Conclusiones</b>	50
<b>Perspectivas</b>	51
<b>Referencias</b>	53

## Lista de abreviaturas

<b>DDT</b>	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>Bti</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> variedad <i>israelensis</i>
<b>TFP</b>	Toxinas formadoras de poro
<b>MG</b>	Molten-globule
<b>APN</b>	Aminopeptidasa N
<b>PKA</b>	Protein kinase A
<b>SREBP-2</b>	Sterol responsive element binding protein 2
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>JNK</b>	Jun N-terminal kinase
<b>TLR4</b>	Toll-like receptor 4
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>ASK1</b>	Apoptosis-signal regulated kinase 1
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonyl fluoride
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>ATF2</b>	Activating transcription factor 2

## Introducción

### Estrategias para el control del vector *Anopheles gambiae*

El estudio de la transmisión de la malaria ha cobrado recientemente gran importancia por dos factores principales: el incremento en los brotes de malaria resistente al tratamiento farmacológico y el incremento en la frecuencia de epidemias. La malaria (o paludismo) se transmite por mosquitos del género *Anopheles*; en América Latina, los vectores de malaria más importantes son *A. darlingi*, *A. albitarsis*, *A. aquasalis*, *A. nuneztovari*, *A. pseudopunctipennis* y *A. albimanus*. Históricamente, el método más importante para el control del insecto vector de la malaria ha sido el uso extensivo de insecticidas como el DDT. Sin embargo, la aparición de insectos resistentes y las consecuencias ambientales que tiene el uso indiscriminado de insecticidas químicos exige la búsqueda de nuevas estrategias (20).

El uso de insecticidas elaborados a partir de *Bacillus thuringiensis* (Bt) comenzó hace 40 años. Entre los beneficios derivados por su aplicación se encuentran la reducción en el uso de insecticidas químicos y el aumento en la productividad de cultivos. Estas características han convertido a Bt en una excelente herramienta en el control biológico de plagas en el medio agrícola (19). En los últimos años, diversos trabajos han demostrado que cepas de *B. thuringiensis* subsp *israelensis* (Bti) son las más efectivas contra dípteros, particularmente mosquitos del género *Aedes*, *Culex* y *Anopheles* (2, 3). Actualmente, se sabe que las propiedades insecticidas de Bti se deben principalmente a la presencia de cuatro toxinas: Cry11Aa, Cry4B, Cry4A y Cyt1Aa (38). Por lo tanto, el uso de estas toxinas puede ser la base para una eficiente estrategia para el control biológico de estos mosquitos. Sin embargo, el control efectivo de estos vectores depende del conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en el reconocimiento, acción y respuesta de la toxina y la célula blanco.

## Toxinas formadoras de poro: clasificación y mecanismo de acción

Numerosas bacterias son capaces de sintetizar toxinas citolíticas. De éstas últimas, aproximadamente un tercio actúan modificando la permeabilidad de la membrana, a lo que deben el nombre de proteínas formadoras de poro (TFPs). Aproximadamente el 25% de las toxinas bacterianas son TFPs. Generalmente estas toxinas funcionan como factores de virulencia en *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium septicum* y *Vibrio cholerae*, todos ellos patógenos importantes para el ser humano (16). Por lo tanto, el estudio del modo de acción de estas toxinas ha cobrado mucha importancia en los últimos años.

Las TFP pueden clasificarse de acuerdo a la estructura hipotética que adoptan al insertarse en la membrana. Las  $\alpha$ -TFP forman un poro a partir de  $\alpha$ -hélices, mientras que las  $\beta$ -TFP lo hacen a partir de un barril- $\beta$ . A pesar de las grandes diferencias funcionales y estructurales entre miembros de una misma familia, existen mecanismos conservados. En la mayoría de  $\alpha$ -TFPs, la unión a receptor y el mecanismo de inserción-traslocación están asociados a distintos dominios estructurales. La interacción inicial entre estas toxinas y la membrana provoca un rearrreglo estructural que coloca residuos hidrofóbicos de las hélices en contacto cercano con la superficie lipídica. Diversos estudios estructurales indican que estas toxinas adquieren una conformación de “molten-globule” (MG) antes de la inserción en la membrana. El estado MG ha sido descrito como un conjunto de estados intermedios durante el plegamiento proteínico, en donde se presenta una estructura más relajada sin perder la estructura secundaria, particularmente en condiciones de pH ácido (18). Se cree que, energéticamente, esta conformación facilita los rearrreglos estructurales necesarios para lograr la inserción en membrana. Entre la familia de  $\alpha$ -TFP se encuentran la toxina de diphtheria, la hemolisina E y la exotoxina A (1). Por otro lado, los miembros de la familia  $\beta$ -TFP tienen en común la ausencia de regiones continuas de residuos hidrofóbicos en la secuencia primaria, y la formación de complejos oligoméricos de alto peso molecular. Un modelo sugiere que la formación de estos complejos es necesaria para formar grandes regiones hidrofóbicas ausentes en cada monómero y facilitar así la inserción en la membrana. Se propone que cada monómero participa con un asa de láminas  $\beta$  que se

inserta formando un barril- $\beta$ . La estructura de los oligómeros de algunas de estas toxinas se han analizado por cristalografía o microscopía de fuerza atómica. Algunos miembros de la familia  $\beta$ -TFP son la aerolisina, la toxina PA de ántrax, hemolisina y las citolisinas dependientes de colesterol (1).

El mecanismo general para la formación del poro de las TFP consiste en la secreción de la toxina en forma soluble, reconocimiento de receptores en la membrana de la célula blanco, procesamiento proteolítico, oligomerización y reorganización estructural e inserción en la membrana por exposición de residuos hidrofóbicos (1). El primer reporte de la actividad de las TFPs fue realizado con la  $\alpha$ -toxina de *S. aureus*, donde se observó la muerte de eritrocitos por lisis osmótica (36). Esta observación condujo a la generalización de que todas estas toxinas matan por la formación de un poro que destruye la integridad de la membrana (16).

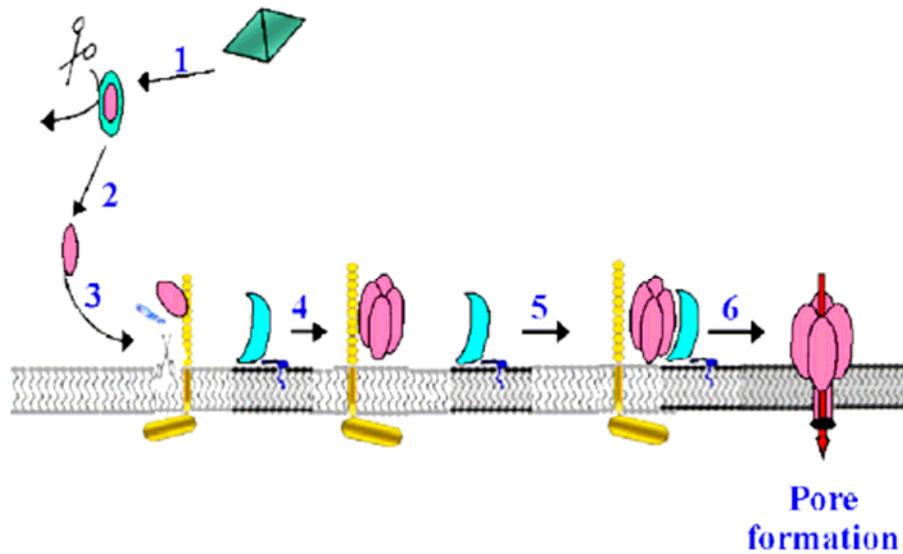
### Toxinas Cry

La familia de toxinas Cry está formada por TFPs sintetizadas por la bacteria *B. thuringiensis* durante la esporulación, las cuales se acumulan en la célula madre en forma de cristales. Dependiendo de la cepa particular de la que provenga el cristal, éste puede contener toxinas específicas contra insectos pertenecientes a los órdenes Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Hymenóptera, Orthóptera y Mallóphaga, así como nemátodos y algunos protozoarios (2).

Las toxinas Cry están formadas por tres dominios funcionales: el dominio I, formado por  $\alpha$ -hélices involucrado en la formación del poro, y los dominios II y III formados por hojas  $\beta$ , involucrados en el reconocimiento por receptores (2). El cristal es solubilizado en el jugo gástrico del insecto, donde proteasas cortan la protoxina para formar monómeros de aproximadamente 60 kDa (4). Existen dos modelos que describen el mecanismo de acción de las toxinas Cry sobre la célula blanco.

## Mecanismo de acción: Modelo Bravo

El modelo de Bravo y colaboradores (5) propone que la interacción del monómero de toxina Cry con un receptor tipo caderina favorece el corte proteolítico de la hélice  $\alpha 1$ . Este corte expone regiones hidrofóbicas del interior del dominio I, que induce cambios estructurales que desembocan en la formación de un complejo oligomérico. Debido al peso de 250 kDa observado en geles SDS-PAGE, se propone que el oligómero está formado por cuatro subunidades. El oligómero presenta una alta afinidad por el receptor aminopeptidasa N (APN), que une a la toxina y la transporta hacia microdominios de membrana resistentes a solubilización por detergente (balsas lipídicas). Una vez que la toxina se localiza en estos dominios ocurre la inserción a membrana y formación de poro por cambios estructurales en el dominio I (6). En este modelo se contempla una unión secuencial de la toxina con dos tipos de receptores diferentes, caderina y APN, y la interacción con ambos es fundamental para la toxicidad final. Este modelo predice que la muerte celular es producto de la lisis ocasionada por choque osmótico, posterior a la inserción del poro (fig. 1).

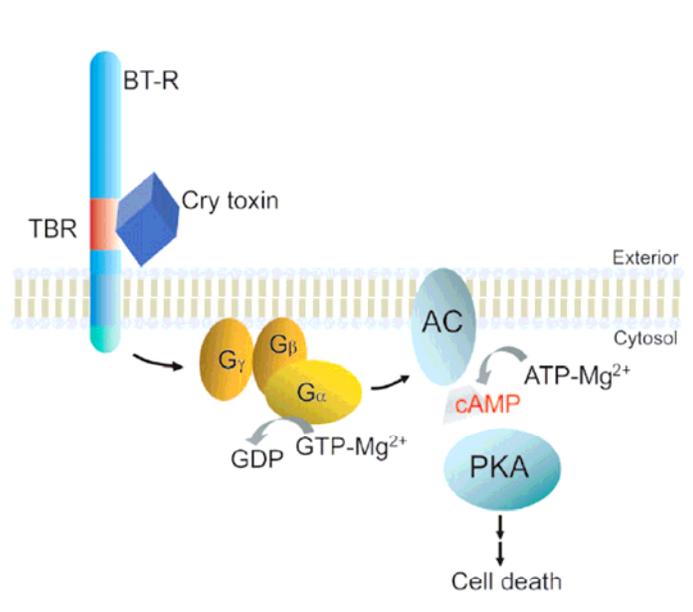


**Figura 1. Modelo de Bravo et al. para la formación de poro y muerte del insecto en *Manduca sexta*. 1. Solubilización del cristal. 2. Activación proteolítica de la protoxina. 3. Unión al receptor tipo cadherina y corte de la hélice  $\alpha 1$ . 4. Formación del oligómero. 5 Unión a APN y movilización a balsas lipídicas. 6. Formación de poro. Tomado de Bravo, et al. 2004 (5).**

#### Mecanismo de acción: Modelo Bulla

Por otro lado, el grupo de Bulla (7) ha propuesto un modelo alternativo. Utilizando quelantes, los autores determinaron la dependencia de la toxicidad de Cry1Ab por  $Mg^{2+}$  utilizando líneas celulares que expresan el receptor de *Manduca sexta*. Observaron también que el uso de moléculas que contrarrestan el choque osmótico, como la rafinosa, no previenen la muerte de las células, cuestionando el modelo de muerte por formación de poro. Posteriormente, utilizando inhibidores químicos determinaron la identidad molecular de los factores involucrados en la muerte celular: sólo los inhibidores de proteínas G y PKA disminuyeron la toxicidad, no así inhibidores de apoptosis. Sus resultados sugieren que la interacción entre el monómero y el receptor de caderina activa una vía de señalización no apoptótica dependiente de proteína G y PKA (fig. 2). Este modelo predice que la muerte celular ocurre por alteraciones en vías de señalización dependientes de proteína G y PKA y

no depende de la formación de un complejo oligomérico que forme poros en la membrana. Es importante señalar que este modelo se basa en efectos de toxina Cry1Ab en líneas celulares que expresan un receptor no endógeno.



**Figura 2. Modelo de Bulla et al. de muerte celular a partir de interacción del monómero de toxina con receptor extracelular. Tomado de Zhang, et al. 2006 (7).**

### Comparación entre ambos modelos

En ambos modelos, el receptor tipo caderina tiene una participación fundamental en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, ya sea para favorecer la formación de poro o para iniciar la cascada de señalización. Esta observación coincide con reportes en los que la alteración en la interacción toxina-receptor está correlacionada con la resistencia del insecto a la toxina (32, 39).

Recientemente, el grupo de Bravo (40) ha demostrado que mutantes que afectan la oligomerización pierden la toxicidad aun cuando la unión al receptor tipo caderina no fue modificada. Por otro lado, mutantes carentes de la hélice  $\alpha 1$  son capaces de formar oligómeros sin la necesidad del receptor tipo caderina. Se ha demostrado que estas

mutantes son tóxicas para insectos con resistencia debida a deleciones en el gen de caderina (datos no publicados). Estos datos apoyan fuertemente el modelo de formación de poro de las toxinas Cry.

#### Mecanismo de acción en mosquitos

Aunque el modelo de acción de toxinas Cry por unión secuencial descrito anteriormente fue propuesto a partir de observaciones en el lepidóptero *M. sexta*, diversos trabajos han puesto en evidencia que el mecanismo puede estar conservado en dípteros, particularmente en mosquitos. En ambos casos, las toxinas son solubilizadas en el ambiente alcalino del intestino y procesadas por activación proteolítica. La toxina Cry11Aa de 70 kDa es digerida en dos fragmentos de 34 y 32 kDa que permanecen unidos por interacciones hidrofóbicas, formando una protoxina de aproximadamente 65 kDa (22). Utilizando ensayos de unión a toxina Cry11Aa se identificaron receptores presentes en el intestino de la larva del mosquito *Aedes aegypti*: una fosfatasa alcalina anclada a GPI de 65 kDa y una proteína transmembranal de 200 kDa (21). Estos datos sugieren la existencia de múltiples receptores funcionales a las toxinas Cry en mosquitos. Recientemente, se ha demostrado también que la toxina Cyt1Aa presente en el cristal producido por Bti opera como un receptor funcional a Cry11Aa, aumentando considerablemente su toxicidad (23). Además, puesto que la resistencia a toxinas Cry involucra principalmente mutaciones en los receptores del insecto, la toxina Cyt1Aa impide la aparición de mosquitos resistentes al cristal de Bti (37).

#### Mecanismo de muerte del insecto completo

A pesar de los avances en la descripción y caracterización de los mecanismos moleculares involucrados en el procesamiento y reconocimiento de toxinas Cry que llevan a su inserción, todavía se desconocen los procesos que se desencadenan intracelularmente tras la interacción con la toxina y/o la formación del poro. Independientemente del mecanismo predominante a nivel celular (lisis por formación de poro o activación de ruta

de muerte) se propone que la muerte del insecto ocurre por inanición o por septicemia por invasión de Bt, ambos ocasionados por daños irreparables en las células epiteliales del intestino (24). Sin embargo, Broderick y colaboradores (24) han cuestionado la validez de estos modelos. Utilizando antibióticos para matar bacterias intestinales nativas del lepidóptero *Lymantria dispar* lograron disminuir considerablemente la mortalidad ocasionada por toxinas de Bt. Por otro lado, al restaurar la flora intestinal con *Enterobacter*, recuperaron la toxicidad inicial. Por lo tanto, la presencia de bacterias nativas parece ser una condición necesaria para la toxicidad de las toxinas Cry, sugiriendo que la muerte es ocasionada por la invasión y proliferación desmedida de la flora nativa después del daño epitelial y no por septicemia causada por Bt. Este resultado pone de manifiesto que la exposición a las toxinas Cry ocasiona complejas interacciones de procesos que ocurren a nivel molecular, celular y del organismo. La correcta aplicación de las toxinas Cry como agente para control biológico requiere del conocimiento de los factores que determinan la supervivencia o muerte del insecto y, por lo tanto, exige el estudio de los procesos involucrados en cada escala.

## **Antecedentes**

El modelo general de acción de las TFPs sugería que la célula blanco se encontraba en un estado pasivo ante la formación poros en la membrana. Sin embargo, se sabe que cualquier célula está sometida a distintos estímulos ambientales que actúan sobre una compleja red de vías de señalización para generar la respuesta adecuada al estímulo recibido. Por lo tanto, es de esperarse que las TFPs sean parte de los estímulos que activen rutas específicas de esta red. En los últimos años, numerosos trabajos han revelado la gran diversidad de cambios intracelulares ocasionados por la toxina. A su vez, estas observaciones han permitido empezar a conocer la amplia gama de sistemas de defensa generales y particulares que la célula posee.

En un trabajo reciente, Gurcel y colaboradores identificaron genes con expresión diferencial en células CHO expuestas a concentraciones subletales de aerolisina (25). A

partir de este análisis, identificaron la activación de SREBP-2, activador transcripcional que participa en la biogénesis de membrana. Al utilizar mutantes de la toxina incapaces de formar poro, además de la incubación con quelantes a cationes divalentes y la incubación en medio con distintas concentraciones de potasio, demostraron que la formación del poro y el flujo de potasio son factores indispensables para la activación de SREBP-2. Posteriormente, usando inhibidores específicos y silenciamiento por RNAi se demostró que la activación de SREBP-2 es uno de los pasos finales de una ruta de señalización activada por caspasa-1, enzima que participa en la activación de la respuesta inflamatoria. La inhibición de cualquiera de estos dos componentes provoca el aumento en la muerte celular ocasionado por la exposición a aerolisina. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de defensa iniciado por una ruta de señalización dependiente de caspasa-1. Dada la participación de SREBP-2 en el metabolismo de lípidos, este mecanismo probablemente involucre la reparación del daño a la membrana ocasionados por la formación de poros.

Por otro lado, puesto que la formación de poro en la membrana provoca un choque osmótico repentino, pueden esperarse cambios en rutas involucradas en respuesta a estrés. La cascada de señalización de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) es una vía de respuesta a estrés altamente conservada en organismos eucariontes (9). Esta cascada tiene tres componentes MAPK, MAPK cinasas (MAPKK) y MAPKK cinasas (MAPKKK) y se divide en tres rutas canónicas principales: ERK, JNK y p38 MAPKs. Se ha demostrado en *Drosophila* que la ruta de p38 es indispensable para generar respuestas a estrés ambiental, incluyendo choque osmótico, choque térmico, estrés oxidativo, activación de sistema inmune y radiación UV (10). En los últimos años se han demostrado experimentalmente cambios en los patrones de fosforilación de miembros de la ruta p38 en diversos organismos expuestos a TFPs.

Durante la infección por *Streptococcus pneumoniae*, se ha observado que las células epiteliales mueren por apoptosis (26). N'Guessan y colaboradores probaron que durante este proceso hay cambios en la fosforilación de dos rutas MAPK: p38 y JNK. En ambos casos la fosforilación es una respuesta transitoria, empezando a partir de 30' después de la exposición con el patógeno y dejándola de observar después de 2 horas. Para analizar la

participación de ambos componentes en la muerte apoptótica se usaron inhibidores químicos específicos y se midieron cambios en la activación de las caspasas 6 y 9. La inhibición de uno u otro componente resultó en la disminución tanto de la activación de ambas caspasas como en el número de células apoptóticas. Con estos datos se propuso un modelo en el p38 y JNK median la activación de las caspasas 6 y 9 y la subsecuente muerte celular por apoptosis. Es importante señalar que el análisis de N'Guessan se basa en el efecto de la exposición a la bacteria completa y no identifica directamente el papel que tiene la pneumolisina (TFP producida por *S. pneumoniae*) en este proceso.

Por su parte, Stringaris y colaboradores han analizado la relación entre la pneumolisina, su toxicidad y la activación de p38 (27). En este trabajo, se observó un aumento en la fosforilación de p38 en cultivo de células neuronales después de la exposición a pneumolisina purificada. El uso de inhibidores tanto para p38 como para efectores de muerte apoptótica redujeron significativamente la muerte celular. Estos datos corroboran la participación de la pneumolisina en la activación de p38 que desencadena la muerte apoptótica dependiente de caspasas. Por otro lado, observaron que la muerte celular depende del flujo de  $Ca^{2+}$  después de la adición de la toxina. Sin embargo, en este trabajo no fue posible caracterizar la relación entre el flujo de cationes divalentes y la activación de p38.

A pesar de que los trabajos antes descritos apoyan un modelo en que p38 participa en la muerte celular, también hay evidencia de la existencia de un mecanismo de protección-supervivencia celular mediado por el mismo p38. Ratner y colaboradores observaron que la fosforilación de p38 aumenta en cultivos de células epiteliales humanas (A549, HEK, Detroit 562) expuestas a pneumolisina, estreptolisina o antrolisina en comparación a células no tratadas con estas toxinas (15). Previamente, otro grupo (41) ha reportado la activación de la respuesta inflamatoria a partir de la interacción entre pneumolisina y TLR4, por lo que la activación de p38 pudiera ser resultado de la interacción con el receptor y no por la formación del poro. Sin embargo, utilizando una mutante de pneumolisina capaz de reconocer a TL4 pero incapaz de formar poro no detectaron cambios en la fosforilación de p38. Este resultado demuestra que la ruta p38 MAPK se activa a partir de la formación del poro lítico y no por la interacción con algún

receptor. El aumento en fosforilación observado es dependiente de cationes divalentes y es abrogado por el uso de protectores osmóticos. No obstante, al utilizar BAPTA/AM, quelante intracelular de calcio, no se observaron cambios en la fosforilación de p38 mediados por la acción de la toxina. Por lo tanto, a diferencia del modelo propuesto por Bulla para toxinas Cry, se demostró que el calcio no participa en el mecanismo de señalización, sino probablemente en la formación del poro de la pneumolisina. La fosforilación de p38 en la línea celular empleada provoca la liberación de interleucina-8, potente atractor de neutrófilos. Por lo tanto, los resultados de este grupo sugieren que la exposición de células a la toxina a concentraciones sublétricas inician una vía de señalización que permiten la activación del sistema inmune y la defensa del organismo frente a la posible infección del agente patógeno.

Tratando de ampliar estas observaciones, Husmann y colaboradores analizaron la respuesta de p38 en células HaCaT (queratinocito humano) al ser expuestas tanto a  $\alpha$ -toxina como a esfingolisina O (SLO) (28). En concordancia con los resultados anteriores, observaron la activación transiente de p38 después de la exposición con cada una de las toxinas. Además, proporcionaron nueva evidencia de que la fosforilación de p38 no depende del reconocimiento por receptores, en particular del receptor de la familia Toll TLR4. Dado que este receptor activa p38 a partir de la formación de radicales libres de oxígeno (ROS) a través de ASK1, una MAPKKK, se analizaron los cambios en estos dos componentes durante la exposición a las toxinas. En ningún caso pudo detectarse la producción de ROS. Más aún, el uso de compuestos que disminuyen la concentración intracelular de ROS no impidió la activación de p38. Finalmente, el silenciamiento de ASK1 tampoco bloqueó la fosforilación de p38 después de la incubación con  $\alpha$ -toxina. Por otro lado, el uso del inhibidor específico a p38 SB203580 impidió la recuperación celular después de la exposición a  $\alpha$ -toxina. Cabe destacar que el inhibidor no ocasionó cambios observables en la recuperación celular después de la exposición a SLO. Estos resultados demuestran que aún cuando se active la ruta de p38 en respuesta a diferentes toxinas, el mecanismo finalmente activado en una misma línea celular depende de la identidad particular de la toxina empleada.

En el caso de las toxinas Cry también se han reportado cambios intracelulares en diferentes organismos. Entre las respuestas reportadas está el aumento de cAMP, importante mensajero intracelular, tanto en línea celular H5 de *Trichoplusia ni* que expresa receptor tipo caderina utilizado por el grupo de Bulla (7), como en línea celular de *Mamestra brassicae* (8). En otro trabajo, utilizando microarreglos de DNA, Huffman (11) detectó cambios significativos en la expresión de los genes *sek-1*, *pmk-1* y *nsy-1* en nemátodos *C. elegans* expuestos a toxina Cry5B. Estos genes corresponden, respectivamente, a los tres componentes de la ruta p38 MAPK. Posteriormente comprobó su papel funcional al obtener fenotipos hipersensibles a la toxina, tanto en organismos silenciados por dsRNA específico contra *pmk-1* como en líneas mutantes en *sek-1*. Este trabajo también demostró que esta respuesta es altamente específica a la toxina Cry: organismos silenciados en *pmk-1* o mutantes en *sek-1* expuestos a cadmio, que es un inductor de estrés general, no resultan hipersensibles al metal pesado. Por otro lado, organismos silenciados en otro gen de la ruta p38, *pmk-3*, expuestos a Cry5B no son hipersensibles. Estos resultados sugieren la participación de la ruta p38 MAPK en la protección y defensa del organismo frente al reto con toxinas Cry en un intervalo de concentración.

El papel protector de p38 en la respuestas a TFPs quedó demostrado también en células de riñón de hamster retadas con la toxina proaerolisina (producida por *Aeromonas hydrophila*.) En este caso se utilizó el inhibidor específico de p38 SB203580 y se observó un fenotipo de hipersensibilidad a proaerolisina cuando p38 está inhibido (11). En la tabla 1 se resumen distintos trabajos en los que se ha observado la modulación de diferentes rutas de señalización en respuesta a TFPs.

**Tabla 1. Efecto de distintas toxinas en cascadas de señalización intracelular.**

Toxina	Organismo	Respuesta	Autor
Aerolisina	Células CHO, hámster	Activación de caspasa-1, SREBP-2 y metabolismo lipídico	Gurcel, et al. 2006
Pneumolisina	Células de neuroblastoma humano	Flujo de calcio, fosforilación de p38, activación de caspasas 3 y 9, apoptosis.	Stringaris, et al. 2002
Pneumolisina, $\alpha$ -hemolisina, SLO, antrolisina	Células epiteliales humanas	Fosforilación p38, producción de IL-8	Ratner, et al. 2006
$\alpha$ -toxina, SLO	Células HaCaT de queratinocito humano	Fosforilación p38, recuperación celular	Hussman, et al. 2006
Cry1Ab	Células H5 de <i>T. ni</i> expresando receptor tipo cadherina	Activación PKA, muerte celular	Zhang, et al. 2006
Cry5B	Nemátodo	Activación p38, regulación de transporte iónico.	Huffman, et al. 2004

Los trabajos anteriormente descritos sugieren que la modulación de mecanismos de señalización en respuesta a la exposición a TFPs es un mecanismo generalizado. También reflejan que la ruta p38 MAPK puede ser un elemento central en la regulación del comportamiento celular frente a estas toxinas. Sin embargo, también ponen en evidencia la complejidad de la respuesta celular, que puede variar dependiendo del tipo celular, la toxina empleada y la concentración de toxina a la que la célula es expuesta.

Las líneas celulares se utilizan frecuentemente como modelo para el estudio de transducción de señales, diferenciación celular y fisiología del organismo completo (13). Existen actualmente diversas líneas celulares para diferentes especies de mosquitos. Éstas se han generado a partir de tejidos larvarios, ovarios adultos y tejidos embrionarios (14). Los cultivos de los que se han generado las líneas contienen varios tipos celulares, por lo tanto la identidad del tejido específico del que se originaron no se conoce con precisión. En *A. gambiae* las líneas 4A3A y 4A3B se derivaron a partir de la cepa 4a r/r y se han caracterizado por los factores inmunes que secretan, principalmente GNBP, Defensina y Cecropina (14). Éstos factores son péptidos específicos contra hongos, bacterias gram-positivas o bacterias gram-negativas que alteran la permeabilidad de la membrana (42). Hasta ahora, se sabe que ambas líneas se diferencian por la expresión de los genes de la profenoloxidasa: la línea 4A3B los expresa constitutivamente; la línea 4A3A, no (29). Por otro lado, la línea Sua1B se derivó a partir de la cepa Suakoko y se caracterizó por la secreción de GNBP, ISPL5 e IGALE20 (30). En este trabajo proponemos analizar la respuesta intracelular de estas líneas celulares al contacto con la toxina Cry11Aa. La reciente secuenciación y anotación del genoma de *Anopheles gambiae* (20) facilita enormemente la búsqueda e identificación de proteínas involucradas en esta respuesta.

Así mismo, el silenciamiento de genes específicos por RNA de doble cadena, dsRNA, es una técnica poderosa utilizada en estudios de genética funcional. El silenciamiento depende de la activación de la ruta altamente conservada de RNA de interferencia (RNAi). Cuando el dsRNA entra a la célula, es procesado por una enzima ribonucleasa III, Dicer, produciendo cadenas pequeñas de dsRNA de 22 residuos llamadas siRNA. Éstas provocan la degradación de secuencias homólogas de mRNA por el complejo protéico RISC (12). Este proceso tiene como resultado la disminución significativa de transcritos de manera altamente específica. Recientemente, se ha caracterizado el mecanismo de RNAi en la línea Sua1B de *Anopheles gambiae* (31). Se observó que hay disminución en la expresión y cantidad de proteína del gen silenciado a partir de 6 µg de dsRNA en aproximadamente  $10^5$  células. Aprovechando la técnica de silenciamiento, se determinó que en esta línea celular los componentes principales de la maquinaria de RNAi son dicer-2, ago-2 y ago-3, ambos miembros del complejo RISC.

Además, dado que numerosas líneas celulares de insectos pueden incorporar espontáneamente dsRNA presente en el medio, éstas se han convertido en sistemas excelentes para la aplicación de la técnica (13). De esta manera, es posible identificar proteínas particulares que participen en la respuesta intracelular de líneas celulares de *Anopheles gambiae* expuestas a toxinas Cry.

## **Objetivo General**

Analizar el papel de la ruta p38 MAPK en líneas celulares de *Anopheles gambiae* durante la respuesta a la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis*.

## Objetivos particulares

1. Determinar la toxicidad de Cry11Aa sobre las líneas celulares seleccionadas.
2. Evaluar la participación de p38 en los efectos tóxicos de la toxina Cry11Aa:
  - Midiendo la actividad de p38 en células expuestas a la toxina Cry11Aa.
  - Inhibiendo químicamente p38, para evaluar su efecto en la toxicidad de Cry11Aa.
  - Silenciando componentes de la vía MAPK p38 y evaluar su efecto en la toxicidad de Cry11Aa.

## Método

### Cultivo de línea celular

Las líneas celulares 4A3A, 4A3B y SuA5.1 de *Anopheles gambiae* se cultivaron en 5 ml de medio Schneider (GIBCO, Invitrogen) con suero fetal bovino al 10% en cajas de 25 cm<sup>2</sup>. Se realizó una dilución 1:10 del cultivo con azul de tripán al 20% en PBS que fue utilizada para conteo y estimación de la viabilidad celular de cada caja antes de cada resiembra. Las cajas se inocularon a una densidad final de 600 000 células/ml. Los cultivos crecieron a 27°C de 3 a 4 días hasta alcanzar la confluencia, con densidades entre 3 000 000 a 5 000 000 células/ml.

### Solubilización y activación de toxinas.

Para la solubilización y activación de Cry11Aa se centrifugaron 500 µl de la solución de cristales durante 10' a 10000 rpm. Se resuspendió la pastilla en 500 µl de NaOH a 100 mM y se incubó durante 1 hora a 4°C. Esta mezcla se centrifugó de nuevo durante 10' a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se ajustó el pH entre 8.6 y 9 con Tris-HCl 1 M pH 8. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford, y se activó posteriormente con tripsina a una relación 1:50 tripsina:proteína durante 2 horas a 25°C. La reacción se detuvo con PMSF a una concentración final de 1mM y se centrifugó durante 10' a 10000 rpm para recuperar el sobrenadante. Finalmente se determinó la concentración por el método de Bradford utilizando albúmina bovina para realizar la curva estándar y se cargó la mezcla en un gel desnaturante de acrilamida-SDS al 12%.

Para la solubilización y activación de Cry1Ab se centrifugaron 500 µl de cristales durante 10' a 10000 rpm. Se resuspendió la pastilla en 500 µl de amortiguador de carbonatos pH 10.5 + 2-mercaptoetanol 0.05% y se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación suave. Posteriormente se centrifugó la reacción durante 10' a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Se midió la concentración de proteína por el método de Bradford.

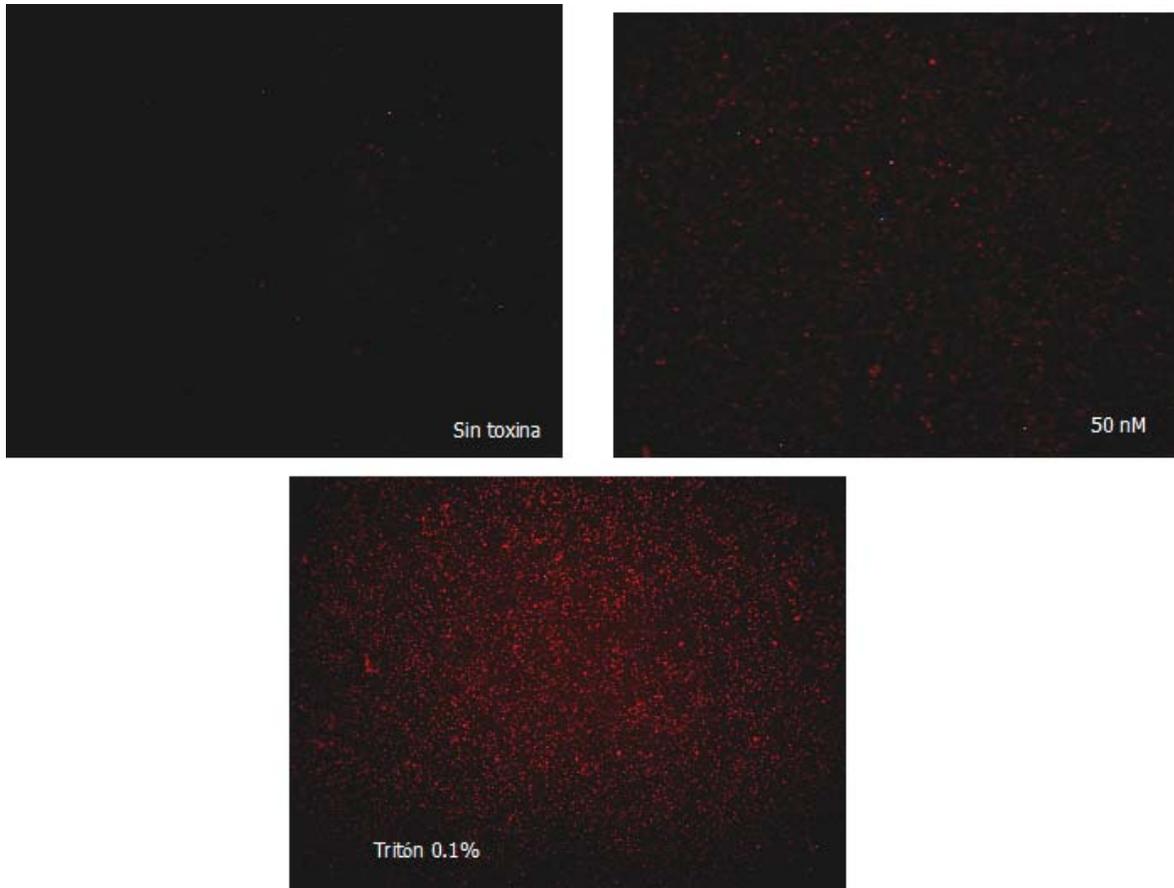
Para la activación de la toxina se utilizó una relación tripsina:proteína 1:20, la cual se incubó durante 30' a 37°C.

### Ensayo de toxicidad

Se diseñó un ensayo de citotoxicidad utilizando el kit LIVE/DEAD (Molecular Probes, Invitrogen). Este kit utiliza el homodímero de etidio EthD como indicador de muerte celular. El EthD es un marcador fluorescente con picos de absorción y emisión a 528 y 617 nm, respectivamente, que sólo penetra en células cuya membrana ha sido dañada y se une con alta afinidad a ácidos nucleicos. Una vez unido, incrementa la intensidad de emisión 40 veces. Por lo tanto, es posible estimar el número de células muertas midiendo la intensidad de emisión al excitar selectivamente el EthD-1.

Se inocularon células de cada línea celular en una caja de 96 pozos de fondo plano a una densidad de 250 000 células/ml en medio Schneider para *Drosophila* en un volumen de 190 µl por triplicado, por condición. Se permitió la adherencia celular incubando una hora a 27°C antes de agregar el colorante y la toxina. En un volumen de 10 µl por pozo se agregó toxina activada para tener concentraciones finales de 5, 20, 30, 40 y 50 nM y una concentración final de EthD. Como control negativo se agregó un volumen equivalente de medio; como control positivo se usó Tritón al 0.1%.

La toxina y el colorante actuaron sobre las células durante 30' antes de adquirir las imágenes. Se tomaron fotos de cada pozo con un microscopio invertido a 10X en campo claro y fluorescencia (canal rojo) 30' después de haber agregado la toxina y el colorante. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Nikon Coolpix 4500 con apertura 3.1 y exposición de 0.5 s. Las imágenes obtenidas en el canal rojo se analizaron con el programa ImageJ (NIH). Se generó una secuencia de comandos que convierte cada imagen en escala de grises y calcula la media de la intensidad por pixel de toda la imagen. Posteriormente se promediaron estos valores entre los triplicados por cada condición para obtener una curva de dosis respuesta en unidades arbitrarias de fluorescencia. Todos los datos se estandarizaron con respecto a la intensidad media del control negativo y al control positivo para obtener una curva expresada en porcentaje de células muertas.



**Figura 3. Campos representativos de tres condiciones en un ensayo de toxicidad.**

### Inhibición química en ensayos de toxicidad

Se sembraron células de acuerdo al protocolo estándar para los ensayos de toxicidad. Se incubaron las células en cada pozo durante 30 min con EDTA 5mM o el inhibidor específico SB203580 10  $\mu$ M. Dado que el inhibidor SB203580 está solubilizado en DMSO, como control se utilizaron células incubadas con un volumen equivalente del solvente que equivale a una concentración final de 0.1% de DMSO. En cada caso, los datos de fluorescencia se estandarizaron con respecto al control con inhibidor o DMSO sin

toxina. Después del tiempo de incubación se continuó con el protocolo estándar para los ensayos de toxicidad.

#### Medición de la actividad de p38

Se utilizó el kit de ensayo de actividad de p38 MAPK (Sigma) para medir la actividad de p38 en respuesta al reto con toxina Cry11Aa. Se usaron cajas de 25 cm<sup>2</sup> a una densidad aproximada de 5x10<sup>6</sup> células/ml. Se agregó toxina Cry11Aa a una concentración final de 20 nM, y se dejó incubar durante 30'. Puesto que se ha reportado que p38 se fosforila en presencia de NaCl desde los primeros 5' de exposición en células S2 de *Drosophila* (17), se usó NaCl 200 mM durante 5' como control positivo. Como control negativo se agregó un volumen equivalente del amortiguador en el que la toxina está solubilizada. Para la extracción de proteínas se preparó un amortiguador que provoca la lisis celular y minimiza la actividad de proteasas y fosfatasas para mantener el estado de fosforilación nativo de las proteínas de interés.

#### Amortiguador de lisis:

Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 100 mM	20 µl
Na F 1M	1 µl
Mezcla de inhibidores de proteasas 50X	20 µl
CellLytic M (Sigma)	959 µl
<b>Total</b>	<b>1 ml</b>

Se agregó 1 ml a cada caja de cultivo y incubaron durante 15' en agitación suave a temperatura ambiente. Las células lisadas se centrifugaron durante 15' a 14000 rpm para eliminar los restos celulares. Se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Se inmunoprecipitó p38 en cada condición siguiendo las instrucciones del kit a partir de 500 µg de proteína total, utilizando el anticuerpo anti-p38 MAPK (Sigma) junto

con las perlas Ezview Red Protein A affinity Gel (Sigma) y se incubó durante 12 horas. Al finalizar la incubación se centrifugaron las muestras a 8000 rpm durante 30'' para colectar todas las perlas al fondo del tubo. Posteriormente se realizaron tres lavados con el buffer de lavado presente en el kit (Sigma). Una vez agregado el volumen de buffer se agitó vigorosamente cada tubo y todos se incubaron durante 1' en hielo. Después de la incubación los tubos se centrifugaron a 8000 rpm durante 30'' y se retiró el sobrenadante. Al concluir el último lavado se llevó a cabo la reacción de fosforilación agregando el sustrato ATF2, terminando la reacción después de 30' con mezcla lítica 4X. Se cargaron 15 µl de cada muestra en un gel desnaturizante de acrilamida-SDS al 10%.

El gel se transfirió a una membrana de PVDF y fue bloqueado con PBS tween 0.1% y leche al 5% durante 1 hora. Se incubó la membrana con el anticuerpo anti-fosfo-ATF2 acoplado a peroxidasa a una dilución 1:1000 durante 12 horas. Se lavó la membrana 6 veces con PBS tween 0.1% antes de revelar la membrana utilizando el sustrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce, Perbio).

Para comparar el estado de fosforilación de p38 entre las condiciones elegidas se cargaron 7 µg de proteína total en un gel desnaturizante de acrilamida-SDS al 10%. Se realizó un Western blot siguiendo el protocolo descrito para la medición de la actividad de p38. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-fosfo-p38 (Sigma) a una dilución 1:2000, incubando durante 3 horas. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón IgG acoplado a peroxidasa (Amersham) a una dilución 1:5000.

#### Extracción de RNA

Se crecieron células de la línea 4A3A hasta una densidad cercana a  $5 \times 10^6$  células/ml. La extracción de RNA total se realizó siguiendo el protocolo del kit Rneasy (Qiagen) para purificación de RNA de cultivos celulares. Las células se lisaron en un buffer con guanidín tiocianato para inactivar RNasas presentes en la muestra. El RNA se purificó al unirse selectivamente a la membrana de la columna, mientras que otros componentes fueron retirados con el amortiguador de lavado.

## Síntesis de cDNA

Como sustrato para la reacción de síntesis de cDNA se utilizó el RNA purificado de la línea 4A3A, mezclando los siguientes componentes:

RNA total	10 $\mu$ l
Oligo dT	1 $\mu$ l
dNTP mix	4 $\mu$ l

Esta mezcla se calentó durante 5' a 65°C y después se incubó 1' en hielo. Posteriormente se agregaron los siguientes reactivos para completar la reacción:

Buffer de reacción 5X	4 $\mu$ l
DTT 0.1 M	1 $\mu$ l
RNAse out	1 $\mu$ l
Superscript III	1 $\mu$ l

El volumen final de 22  $\mu$ l se incubó durante 60' a 50°C y 15' a 70°C para inactivar la enzima. Finalmente, el cDNA se purificó utilizando columnas para purificación de PCR (Roche). Se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de unión a la reacción, y esta mezcla se centrifugó en las columnas a 8000 rpm durante 30''. Las columnas fueron centrifugadas dos veces con 500  $\mu$ l de buffer de lavado a 8000 rpm durante 30''. El cDNA fue eluído al agregar 50  $\mu$ l de agua y centrifugar a 14000 rpm durante 1'.

## Amplificación de componentes de la vía MAPK p38

Se utilizaron oligonucleótidos diseñados por la Dra. Alejandra Bravo a partir de secuencias de transcritos identificados en el genoma de *Anopheles gambiae* por su semejanza a la secuencia de los genes de la vía p38 MAPK identificados y descritos en *Drosophila* y *C. elegans*.

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los componentes de la ruta p38 MAPK. Se muestra subrayado el sitio de restricción para EcoRI.**

Nombre	Secuencia (5'-3')	TM (°C)	Posición en el gen	Producto esperado (pb)
NSY-R	ACAGACGTCGACCGTGTTTCAGC	55	2747 pb	525 pb
NSY-D	GACAGGATGGTGATGCCCCGC	55	3252 pb	
P38-R	GCCCATTCAGTCAGCCG	52	167 pb	529 pb
P38-D	CTGGTGAATGTGGTCCGTGCCG	52	674 pb	
SEK-R	CGTGGTAAACTGCGTGATACC	51	958 pb	635 pb
SEK-D	CAAGTTCTACAAGTTTATCTGCG	51	344 pb	
SEKECO-R	<u>GGAATTC</u> CGTGGTAAACTGCGTGATACC	51	961 pb	653 pb
SEKECO-D	<u>GGAATTC</u> CAAGTTCTACAAGTTTATCTCG	51	337 pb	

Para amplificar las tres cinasas de la vía MAPK p38 se utilizaron las siguientes condiciones:

CDNA	7 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	2 $\mu$ l
Oligo D (10 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Oligo R (10 pmol/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Buffer 10X	2 $\mu$ l
Taq	1 $\mu$ l
Agua	4 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Programa de PCR:

95°C	5'	}	30X
95 °C	30''		
51°C ( <i>sek</i> ), 52°C ( <i>pmk</i> ), 55°C ( <i>nsy</i> )	30''		
72°C	50''		
72°C	4'		
4°C	$\infty$		

Los productos de la reacción de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1%.

## Clonación de *sek* a pJET1.

El producto de PCR correspondiente a *sek* fue purificado a partir de la banda observada en un gel de agarosa al 1% siguiendo el protocolo de extracción por gel de Qiagen. El DNA resultante se ligó al plásmido pJET1 (Fermentas) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Este plásmido es un vector linealizado con extremos rasurados que permite la ligación de cualquier producto de PCR.

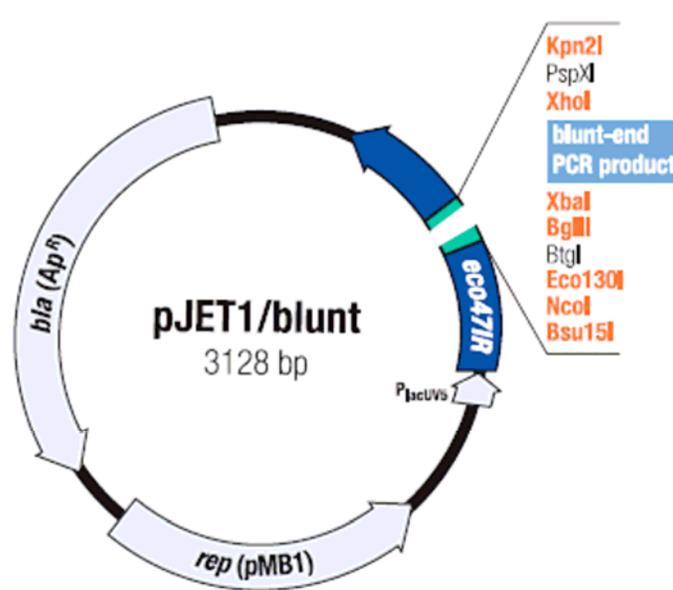


Figura 4. Mapa del vector de clonación pJET1

Reacción de ligación para productos obtenidos por *Taq* polimerasa:

Buffer de reacción 2X	10 $\mu$ l
Producto de PCR (sin purificar)	2 $\mu$ l
Agua	6 $\mu$ l
Enzima para generar extremos rasurados	1 $\mu$ l

Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5' para eliminar el extremo 3'-dA generado por la *Taq* polimerasa. Después del tiempo de incubación se agregaron los componentes faltantes para llevar a cabo la ligación:

pJET1 (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Ligasa T4	1 $\mu$ l
<b>Total</b>	20 $\mu$ l

La mezcla de ligación se incubó durante 30' a temperatura ambiente y después se purificó ante de llevar a cabo la transformación a células competentes de *E. coli* XL1-blue. La purificación se llevó a cabo agregando 100  $\mu$ l de butanol y centrifugando 10' a 14000 rpm. El DNA se resuspendió en un volumen final de 10  $\mu$ l de agua.

Las transformación se realizó utilizando 40  $\mu$ l de células y agregando 2  $\mu$ l de DNA en celdas de 0.1 cm a 200 Ohms, 2.5 V y 25  $\mu$ F. Las células electroporadas fueron incubadas durante 1 hr en medio SOC para después ser plateadas en medio LB con ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml. El vector pJET1 contiene el gen *eco47IR*, que codifica para una endonucleasa de restricción letal para *E. coli*. En plásmidos recombinantes se impide la transcripción de este gen por la disrupción del promotor. Por lo tanto, sólo se propagarán las células que contengan plásmido recombinante.

Se seleccionaron tres colonias de las cajas plateadas para corroborar la inserción de la secuencia *sek*. Se realizó un PCR de colonia siguiendo el mismo protocolo para la amplificación a partir de cDNA, utilizando como templado una dilución con las colonias seleccionadas, permeabilizándolas previamente por ebullición. De las mismas colonias se extrajo el plásmido pJETsek utilizando el protocolo Miniprep de Qiagen. Se llevó a cabo un análisis de restricción con la siguiente reacción:

Agua	9 $\mu$ l
Buffer 2 (New England Biolabs)	2 $\mu$ l
BSA 10X	2 $\mu$ l
<i>Xba</i> I	1 $\mu$ l
<i>Xho</i> I	1 $\mu$ l
DNA	5 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

El producto de las reacciones de restricción fue analizado en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Como indicador de peso molecular se utilizó el marcador O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Finalmente se secuenciaron los insertos obtenidos en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM para compararlas con la secuencia reportada en la base de datos *Vectorbase*.

#### Subclonación de *sek* en pLITMUS 28i

Se digirieron los plásmidos pJET1sek y pLITMUS 28i con las enzimas *Xho*I y *Xba*I siguiendo el protocolo utilizado para el análisis de restricción de pJET1sek; se escaló la reacción a un volumen final de 50  $\mu$ l. Después de corroborar la excisión del fragmento del plásmido pJET1sek con el peso esperado en un gel de agarosa al 1%, se purificó la banda siguiendo el protocolo de extracción por gel de Qiagen.

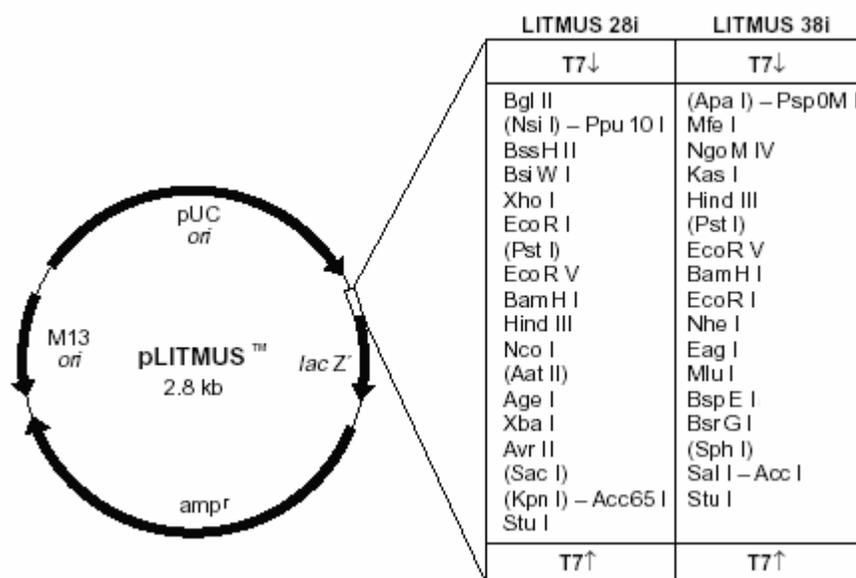


Figura 5. Mapa del vector pLITMUS para la síntesis de dsRNA

Tanto la banda purificada como el vector pLITMUS 28i digerido se agregaron a una reacción de ligación. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 18 horas.

Reacción de ligación:

<i>sek</i>	3 $\mu$ l
pLITMUS 28i	1 $\mu$ l
Buffer de ligación 10X	2 $\mu$ l
Ligasa T4	1 $\mu$ l
Agua	13 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Para transformar el producto de la ligación se siguió el mismo método utilizado para la transformación de pJETsek1.

La selección de células con plásmidos recombinantes se basa en la interrupción del gen *lacZ*. Por lo tanto, las células fueron plateadas en medio LB con ampicilina, X-gal e

IPTG a concentraciones finales de 100 µg/ml, 40 mg/ml y 100 mM, respectivamente. Se seleccionaron 5 colonias de color blanco para extraer plásmido siguiendo el protocolo de Miniprep de Qiagen. Se utilizaron los oligos específicos para *sek* en una reacción de PCR para corroborar la inserción del fragmento.

### Síntesis de dsRNA

Para la obtención de dsRNA requerido para el silenciamiento se empleó el kit HiScribe RNAi transcription (New England Biolabs). Para la obtención del templado llevamos a cabo una reacción de PCR con las siguientes condiciones:

pLITMUSsek 28i	4 µl
Buffer 10X	5 µl
dNTPs 2.5 mM	5 µl
Oligo mínimo T7 (10 pmol/ µl)	2 µl
<i>Taq</i> polimerasa	2.5 µl
Agua	31.5 µl
<b>Total</b>	<b>50 µl</b>

### Programa de PCR

94°C	3'	} 25X
94 °C	30''	
50°C	30''	
72°C	50''	
72°C	5'	
4°C	∞	

Una vez amplificado *sek* junto con la secuencia de los promotores T7 se llevó a cabo la síntesis *in vitro* de dsRNA:

Agua libre de RNasas	19 $\mu$ l
Buffer de transcripción 10X	3 $\mu$ l
NTPs 10X	3 $\mu$ l
Templado <i>sek</i>	3 $\mu$ l
Mezcla HMW 30X	1 $\mu$ l
T7 RNA polimerasa	1 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>30 <math>\mu</math>l</b>

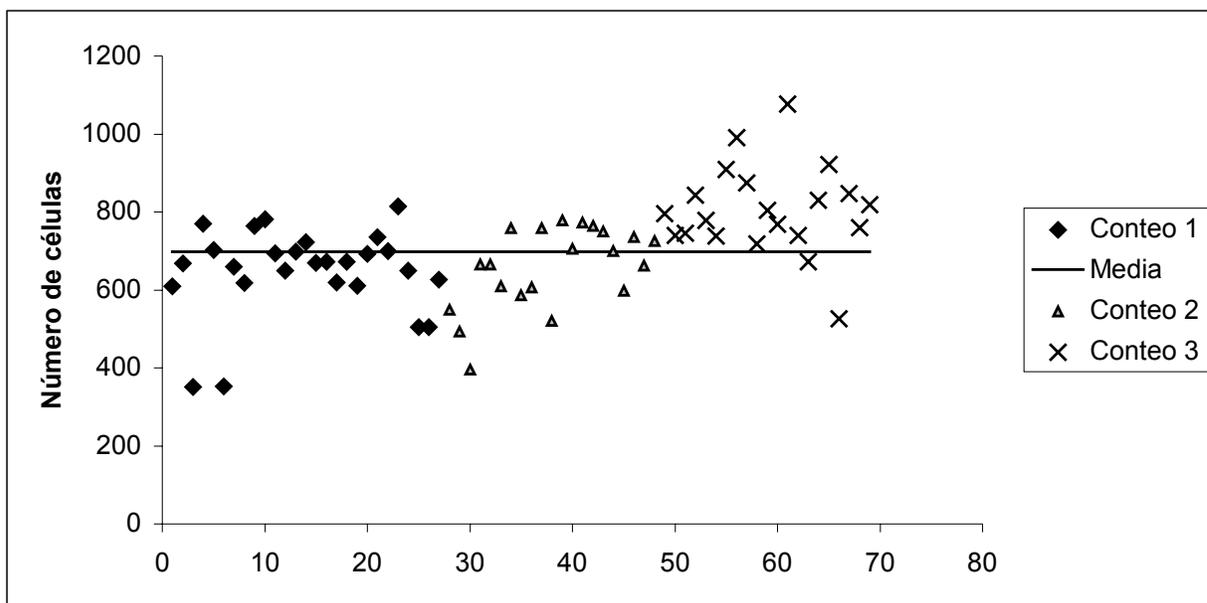
Esta mezcla se incubó a 42°C durante 180'. Para cuantificar el dsRNA se cargó 1  $\mu$ l de la reacción en un gel de agarosa al 1% y se corroboró su peso molecular con el marcador 2-Log DNA ladder (New England Biolabs).

## Resultados

Estandarización y validación del ensayo de toxicidad.

La evaluación del efecto de la toxina Cry11Aa sobre líneas celulares de *A. gambiae* requiere de la cuantificación de la viabilidad celular después de que las células estuvieron en contacto con diferentes concentraciones de toxina por un tiempo determinado. Para este propósito existen numerosas técnicas que permiten estimar el número de células vivas y/o muertas en cada condición. El EthD permite la visualización y el conteo directo de células muertas para poder obtener después el porcentaje de células muertas por condición. Decidimos trabajar con este colorante con un aumento de 10X para aumentar el número de células por campo y minimizar así posibles errores de muestreo en cada imagen. Sin embargo, con estas condiciones, el conteo directo de células resulta complicado, laborioso y arroja resultados poco reproducibles. La presencia de agregados celulares, la superposición de células en varios planos y la imposibilidad de distinguir o definir núcleos teñidos son algunas de las causas que modifican el conteo y, por lo tanto, el porcentaje estimado de células muertas.

Para solucionar el problema decidimos estimar la muerte celular en cada condición a partir de la fluorescencia total de cada imagen. Dado que cada punto rojo en una imagen corresponde a una célula muerta, la intensidad de fluorescencia total debe ser proporcional al número total de células muertas en el campo. Estandarizando cada medición respecto a condiciones en las que se espera 0 y 100% de mortalidad, agregando medio y tritón al 0.1%, respectivamente, es posible obtener un estimado del porcentaje de mortalidad por cada condición. No obstante, esta estimación puede ser artificial y no representar el parámetro biológico que quiere medirse. Puesto que en este método no se cuenta directamente el número total de células, es posible que los resultados se vean considerablemente afectados por la variación de células en cada campo. Por lo tanto, decidimos comparar en un mismo experimento la estimación automática contra el conteo manual.

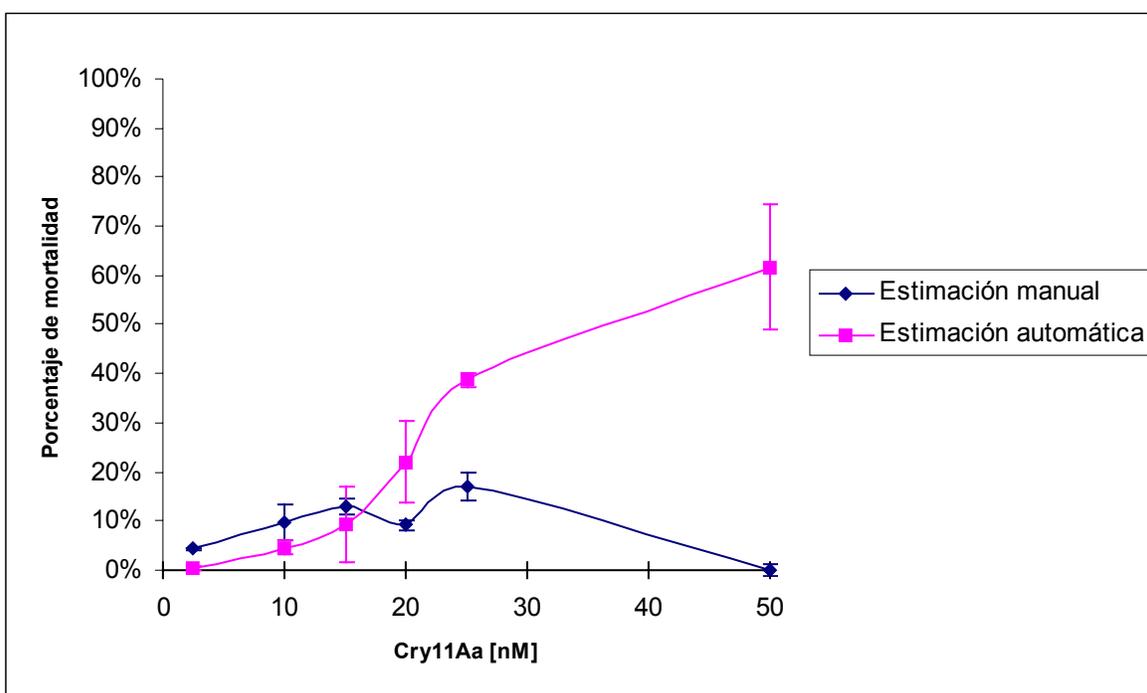


**Figura 6. Conteo celular manual.** Se contaron todas las poblaciones celulares en campo claro a un aumento de 10x en tres experimentos independientes. La línea continua muestra el promedio de los tres experimentos.

Decidimos realizar conteos manuales en tres experimentos independientes. Nuestra primera observación fue que para cada experimento, la mayoría de los datos se encuentran alrededor de un valor promedio (figura 6). En experimentos independientes, el valor promedio puede ser diferente (conteo 3, figura 6). Sin embargo, como cada experimento se normaliza con respecto a la intensidad de fluorescencia medida en el control positivo de tritón, tomada como el 100%, es posible realizar comparaciones entre experimentos. Además, este resultado nos permite asumir que el número de células en todos los campos para un mismo experimento es aproximadamente constante, por lo que podemos evitar el conteo directo de células para obtener el porcentaje de mortalidad.

Posteriormente, proseguimos a comparar los resultados obtenidos utilizando el conteo manual y la estimación automática en experimentos utilizando distintas líneas celulares y toxinas. Como se observa en la figura 7, a concentraciones bajas de toxina, cuando se espera la menor mortalidad, ambos métodos coinciden en sus resultados, reflejando un aumento lineal en la mortalidad de las células con respecto a la concentración de toxina. Sin embargo, a concentraciones más elevadas el método manual no es

consistente con esta tendencia. La cantidad de puntos rojos en un campo es tan abundante que distinguir dos puntos distintos resulta complicado, teniendo como consecuencia la disminución del número de células muertas contado y, por lo tanto, en el porcentaje total de células muertas. Este efecto es mucho más evidente en la mayor concentración utilizada (50 nM), donde ya no es posible distinguir puntos individuales. Los mismos resultados se obtuvieron al realizar las comparaciones utilizando distintas líneas celulares y distintas toxinas (datos no mostrados).



**Figura 7. Comparación entre la estimación automática y el conteo manual. Figura representativa de comparación entre métodos para un solo experimento utilizando la línea celular 4A3A. Los puntos representan la media de un experimento junto con su desviación estándar. La comparación se realizó en tres experimentos independientes con líneas celulares diferentes.**

### Selección de línea celular

Diversos estudios reportan que Bti es una cepa tóxica contra *A. gambiae* (2,3). Sin embargo, para los propósitos de este trabajo era necesario conocer el efecto de la toxina

Cry11Aa sobre esta especie sin la presencia de otras toxinas. Por otro lado, dado que distintas líneas celulares provienen de diferentes mezclas de tejidos, no todas ellas deben necesariamente tener la misma susceptibilidad a la toxina que el organismo completo. Por lo tanto, se retaron tres líneas celulares: 4A3A, 4A3B y SuA5.1 de *A. gambiae* con la toxina Cry11Aa. Al realizar los ensayos con la línea SuA5.1 obtuvimos en repetidas ocasiones valores negativos en el porcentaje de células muertas. Estos datos reflejan que había más células muertas en el control sin toxina que en éstas concentraciones de toxina, por lo decidió igualarlos a 0%. De acuerdo a nuestras observaciones, la línea Sua5.1 no es susceptible a la toxina Cry11Aa (figura 8).

La línea 4A3B sí mostró un aumento en la proporción de células muertas proporcional a la concentración empleada de toxina en un intervalo pequeño de concentraciones, entre 0.05 y 2.5 nM. Observamos más del 50% de células muertas a concentraciones de toxina picomolares. Si bien este dato reflejaría la hipersensibilidad de la línea a la toxina Cry11Aa, la variabilidad en las representada en el error estándar de experimentos independientes, fue mayor que en cualquier otra de las líneas empleadas. Por otro lado, el crecimiento de la línea 4A3B fue mucho más lento, sin alcanzar las densidades celulares que se obtenían con las líneas 4A3A o SuA5.1. Esto nos llevó a suponer que la proporción de células muertas observada no fue ocasionada por la toxina, si no por una alta mortalidad ocasionada quizá por la baja densidad a la que fueron inicialmente cultivadas las células. Dado que encontramos otra línea con una respuesta que cubría nuestros objetivos, decidimos no seguir empleando las células 4A3B.

La línea 4A3A fue la única que mostró una respuesta reproducible en todos las repeticiones realizadas. A concentraciones subnanomolares la toxina no aumentó la proporción de células muertas respecto al control. En concentraciones cercanas a 25 nM empezamos a observar cambios en la viabilidad celular. La mayor parte del intervalo de concentraciones seleccionado no ocasionó cambio significativo en la proporción de células muertas. Con estos datos no fue posible determinar si este aumento en la mortalidad seguía un incremento lineal o era un artefacto ocasionado por la solución en el que la toxina está disuelta. Sin embargo, a partir de esta observación decidimos utilizar únicamente la línea

4A3A para continuar con el proyecto. Para obtener la curva de dosis respuesta decidimos medir más concentraciones en un intervalo más amplio, entre 5 y 100 nM.

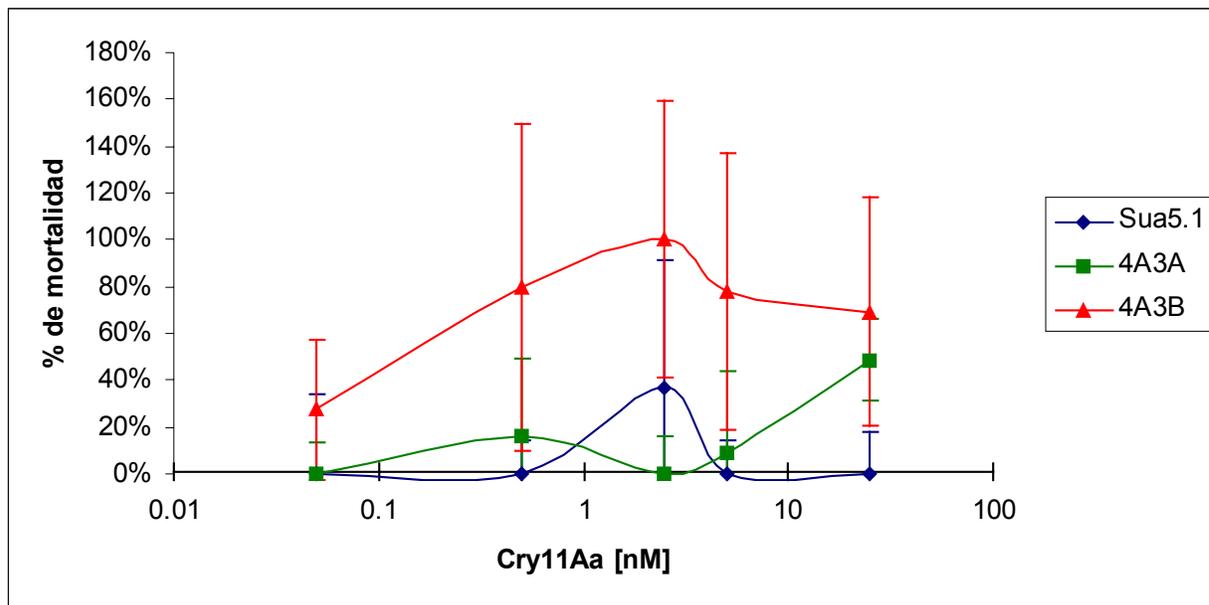


Figura 8. Efecto de Cry11Aa sobre distintas líneas celulares. Cada punto representa la media de por lo menos tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar.

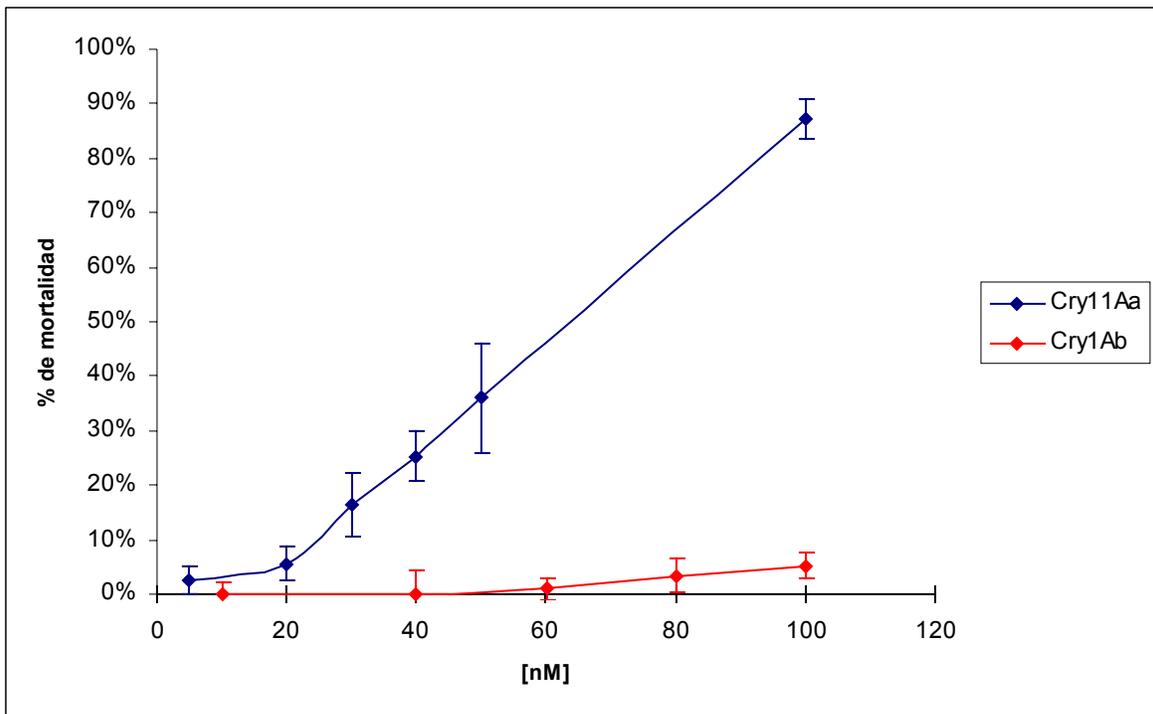
#### Efecto de distintas toxinas sobre la línea 4A3A

En el nuevo intervalo de concentraciones seleccionado se pudo observar claramente un aumento en la muerte celular en función de la concentración de Cry11Aa (figura 9). De acuerdo a los resultados obtenidos en las condiciones empleadas, la toxina provoca la muerte celular a partir de concentraciones cercanas a 20 nM. En el intervalo de concentraciones usado, el máximo porcentaje de muerte ocurrió a concentraciones cercanas a 100 nM, lo que correspondió a más del 80% de células muertas con respecto a células incubadas con tritón al 0.1%. Dado que el incremento es aproximadamente lineal, contamos ahora con un intervalo adecuado para identificar componentes celulares que participen tanto en la defensa contra la toxina o en procesos de muerte activados por la toxina. A partir de esta curva podemos analizar el efecto del silenciamiento o inhibición de dichos componentes. La forma de la curva dosis-respuesta cambiará dependiendo del

componente bloqueado. Si éste participa en la defensa contra la toxina, se espera que su inhibición o disminución por silenciamiento provoque que la curva se levante debido a la muerte de mayor número de células a concentraciones menores con respecto a la curva estándar. Por el contrario, si juega un papel en la actividad tóxica, la curva se retardará y se levantará a concentraciones mayores de toxina. Finalmente, si el componente celular silenciado o inhibido no participa ni en la toxicidad de Cry ni en la defensa celular, no habrá modificaciones con respecto a la curva estándar. Con este resultado se tiene la base de un ensayo rápido, sencillo y confiable para identificar la participación de componentes arbitrarios en la respuesta a cualquier toxina Cry. En este trabajo nos interesa de manera particular, la relación entre p38 y Cry11Aa.

Se sabe que la toxina Cry1Ab es específica contra lepidópteros (2), por lo que se supone que su toxicidad sobre *A. gambiae* es mínima. Luego, se seleccionó esta toxina como control negativo. De acuerdo a lo esperado, se encontró que Cry1Ab no mata células en el intervalo de concentraciones seleccionado, mostrando diferencias significativas con la curva para Cry11Aa a partir de 20 nM, concentración en la que suponemos empieza la muerte por efecto de la toxina (figura 9), validando así la especificidad de Cry11Aa en la línea 4A3A.

Estas observaciones validan nuestro procedimiento como un método adecuado para la estimación de muerte celular inducida por toxinas Cry, con suficiente sensibilidad para discriminar entre toxinas hacia las cuales las células presentan mayor o menor susceptibilidad. Al mismo tiempo confirma que la curva obtenida por acción de Cry11Aa es ocasionada por la toxina en sí y no por efecto de la solución en la que la toxina se encuentra o por interacciones inespecíficas entre medio y EthD. Finalmente, corroboran que la línea celular 4A3A es un buen modelo del organismo completo en cuanto que conserva la sensibilidad a las mismas toxinas. Entonces, podemos suponer que también pudiera representar un modelo fidedigno de la respuesta y defensa celular ante el reto por Cry11Aa. Por lo tanto, es posible analizar el efecto específico de la inhibición de la ruta p38 MAPK ante la toxicidad de Cry11Aa en *A. gambiae*, a partir de las observaciones en la línea celular 4A3A, utilizando como control negativo la toxina Cry1Ab.



**Figura 9. Efecto de diferentes toxinas en la viabilidad de 4A3A. Cada punto representa la media de por lo menos tres experimentos independientes (n=3). Las barras representan el error estándar.**

#### Activación de p38 en respuesta a Cry11Aa

Existen numerosos reportes de la activación de la cascada de señalización MAPK p38 en respuesta a toxinas formadoras de poro en distintos organismos (ver tabla 1). En la mayoría de estos trabajos se comienza a detectar un aumento en la activación de p38 a partir de los 30' de exposición a la toxina. Por lo tanto se decidió analizar la activación en este modelo midiendo la fosforilación de p38 en células 4A3A retadas con toxina Cry11Aa después de 30'. A partir de las observaciones de toxicidad realizadas en la línea 4A3A, se seleccionó la concentración de 20 nM para la inducción de p38. Puesto que a esta concentración muere aproximadamente el 10% de la población, se espera que la activación de rutas de señalización ocurra principalmente por acción de la toxina y no por la liberación de componentes citoplásmicos de las células muertas. Por lo tanto, independientemente del papel que juegue p38 en la acción de la toxina, si la ruta de señalización está involucrada en

la respuesta a Cry11Aa, esperamos que su actividad sea mayor respecto a células control no expuestas a toxina.

La medición de la actividad de p38 se realizó a partir de un ensayo tipo Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra la forma fosforilada de ATF2, sustrato de p38. Se utilizó NaCl como control positivo pues está reportado que en líneas celulares de *Drosophila* la concentración empleada es suficiente para aumentar la fosforilación de p38 (17). De acuerdo a lo esperado, la fosforilación de ATF2 observada en células expuestas a la toxina Cry11Aa fue mayor que la observada en ambos controles (figura 10).

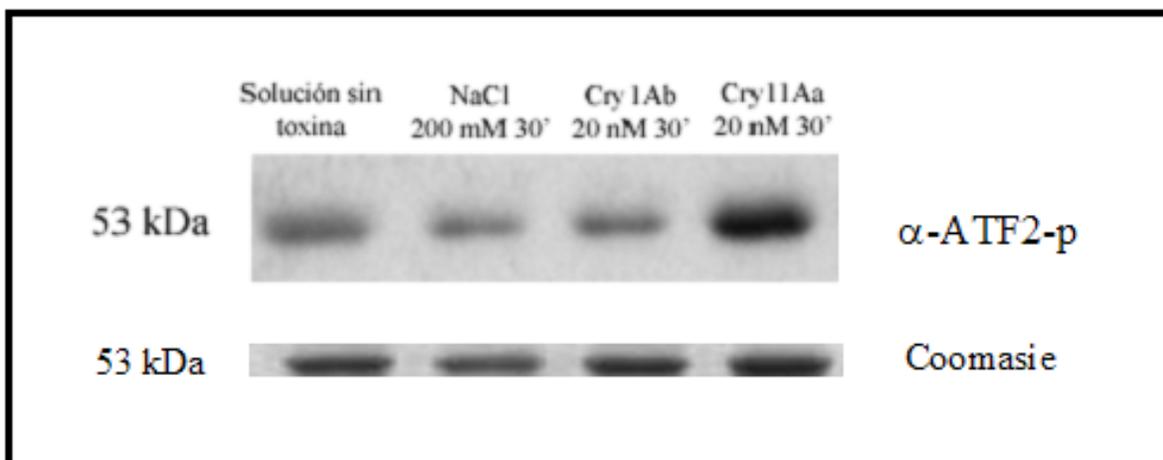


Figura 10. Activación de p38 en respuesta a Cry11Aa. Ensayo tipo Western blot con anticuerpos monoclonales contra el sustrato ATF2 fosforilado. Como control de carga se muestra un gel realizado bajo las mismas condiciones teñido con azul Coomassie.

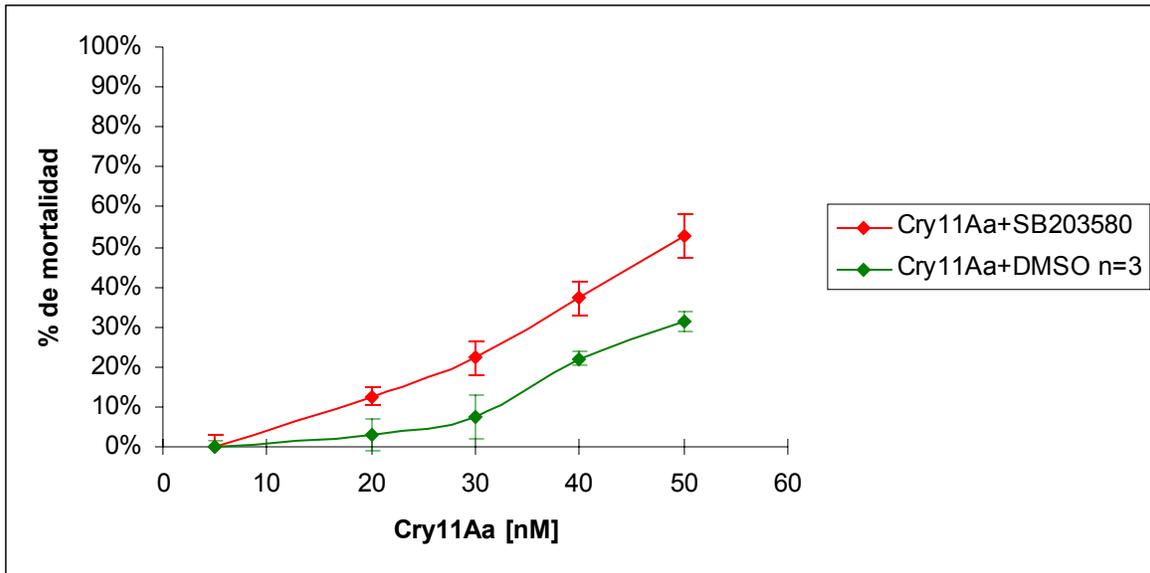
Para evaluar si el aumento en actividad de p38 es específico a Cry11Aa, se decidió analizar también el efecto de Cry1Ab. Se observó que la actividad aumentó cuando las células fueron expuestas a Cry11Aa, mientras que la actividad en respuesta a Cry1Ab fue semejante a la observada cuando las células se expusieron a solución sin toxina.

Estos datos sugieren que la toxina activa una vía de señalización en la que participa p38. Además, es posible que la activación de esta ruta sea específica a Cry11Aa puesto que

no responde a estrés general (NaCl) ni a toxinas que no tienen efecto en la viabilidad de la línea celular 4A3A (Cry1Ab). A partir de estas observaciones es imposible determinar si p38 participa en la protección ante el efecto de la toxina o participa en el efecto tóxico inducido por la toxina en el ataque hacia la células. Para ello es necesario inhibir la actividad de p38 y analizar el fenotipo resultante.

### Inhibición química de p38

Los inhibidores químicos han sido una potente herramienta para el estudio y caracterización de numerosas vías de señalización. Después de haber inhibido la molécula blanco, es posible inferir su participación en el proceso estudiado a partir de la respuesta celular observada. En este proyecto, nos interesa la respuesta de células expuestas a Cry11Aa cuando se bloquea la activación de p38. Con este propósito se utilizó el compuesto SB203580, el cual es un inhibidor específico de p38 que actúa mediante la inhibición competitiva de la unión de ATP. Dado que este compuesto está solubilizado en DMSO, se agregó un volumen equivalente de DMSO como control negativo. En ambos casos, para verificar que el aumento en la mortalidad no se debe a efectos tóxicos del inhibidor o del DMSO todos los datos se estandarizaron con respecto a células sin toxina incubadas con SB203580 o DMSO durante 30'.



**Figura 11.** Efecto de la inhibición de p38 en la viabilidad celular. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes. Las barras representan el error estándar.

Como puede observarse en la figura 11, hay diferencias significativas en el porcentaje de células muertas por Cry11Aa entre las células con inhibidor y células no inhibidas. A partir de una concentración de 20 nM de toxina, la mortalidad es mayor en células incubadas con SB203580. Este aumento no es ocasionado por el DMSO, puesto que no se observa un incremento similar en células incubadas únicamente con este solvente. La observación de que las células mueren a concentraciones más bajas de toxina cuando p38 es inhibido sugiere que p38 pudiera ser requerido para el inicio de mecanismos de protección contra la acción de la toxina. Es decir, este resultado apoya el modelo de un sistema de defensa dependiente de p38 que se activa cuando la célula se enfrenta con toxina y no un mecanismo de muerte inducido por la toxina dependiente de p38.

A pesar de que los inhibidores químicos son altamente específicos, se sabe que su presencia en la célula ocasiona numerosos cambios en moléculas de manera inespecífica. Estos cambios a su vez alteran procesos que pueden tener relevancia en el proceso bajo estudio. Por lo tanto es deseable utilizar otra estrategia que minimice las alteraciones

inespecíficas. Para continuar el análisis, se escogió el silenciamiento por RNAi para solucionar este problema.

### Amplificación y clonación de componentes de la ruta MAPK p38

Utilizando oligonucleótidos específicos se intentó amplificar los tres niveles de la cascada de señalización MAPK-p38: *nsy*, *sek* y *pmk*. Estos tres genes se transcriben como mRNAs de 3330, 1289 y 1372 bases de longitud, respectivamente. La búsqueda en la base de datos del genoma completo de *A. gambiae* reveló que los tres genes tienen intrones en su secuencia. Para amplificar secuencias presentes únicamente en el transcrito maduro, se diseñaron oligonucleótidos utilizando únicamente en las secuencias exónicas predichas. Los oligonucleótidos finalmente seleccionados amplifican un fragmento de los genes *nsy*, *sek* y *pmk* que constituyen regiones internas de 525, 529 y 635 bases de longitud en el transcrito maduro. Este diseño impidió la amplificación de los genes a partir de DNA genómico. Por lo tanto, se sintetizó cDNA a partir del RNA total de la línea celular 4A3A para utilizarlo como templado.

Tanto en el caso de *nsy* como en el caso de *pmk* se obtuvieron bandas múltiples a distintos pesos. Entre ellas, las más abundantes se situaron por encima del peso molecular esperado. No logramos mejorar los resultados obtenidos al utilizar temperaturas de alineamiento más estrictas. Al realizar nuevamente una búsqueda en el genoma de *A. gambiae* de las secuencias que hibridan con los oligos sintetizados, encontramos que para el caso de estos dos genes existen varias secuencias con un elevado número de identidades nucleotídicas. Además, el alineamiento con las secuencias homólogas de *nsy* y *pmk* en *Drosophila* arroja varios transcritos predichos dentro del genoma de *A. gambiae*. Por lo tanto, este problema podría resolverse al diseñar y sintetizar nuevamente oligonucleótidos específicos contra los transcritos de *nsy* y *pmk*.

El único caso en el que logramos obtener una banda única en el peso esperado fue para el gen *sek* (figura 12A). Dado que *sek* codifica para una proteína que corresponde al nivel MAPKK en la ruta p38, silenciando únicamente este gen se espera obtener un fenotipo similar al observado en la inhibición de p38. Por lo tanto, decidimos continuar

con el proceso de clonación previo al silenciamiento por dsRNA únicamente con *sek*. La introducción al plásmido pLITMUS requiere la digestión con enzimas de restricción. Luego, la primera estrategia utilizada fue el uso de sitios de restricción compatibles con los del vector incluídos en los oligonucleótidos. Sin embargo, no pudimos amplificar *sek* utilizando oligonucleótidos a los que agregamos sitios de restricción para EcoRI (figura 12A, carril 2). Por lo tanto, decidimos clonar el fragmento en el vector pJET. Este plásmido permite la excisión de los insertos con distintas enzimas de restricción, generando un inserto con los sitios de restricción deseados.

Una vez que clonamos el fragmento *sek* en pJET y transformamos células competentes de *E. coli*, seleccionamos las colonias transformantes por su crecimiento en medio LB+amp. Todas ellas fueron analizadas para la presencia del inserto *sek* a partir del patrón de restricción observado (figura 12B) y por amplificación por PCR (figura 11C). Se utilizaron 4 colonias para hacer PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos específicos contra *sek* y las condiciones empleadas para amplificar el fragmento a partir de cDNA de *A. gambiae*. Las colonias 1 y 3 mostraron una banda cercana a 600 pb, por lo que se les extrajo el plásmido y proseguimos a realizar el análisis de restricción. Se utilizaron las enzimas *XhoI* y *XbaI* puesto que son compatibles con los sitios de corte presentes en pLITMUS. La doble digestión con estas enzimas arrojó un fragmento cercano a 600 pb, correspondiente a la banda de *sek* esperada. Ambos datos corroboran la presencia de la secuencia de *sek* en el vector pJET.

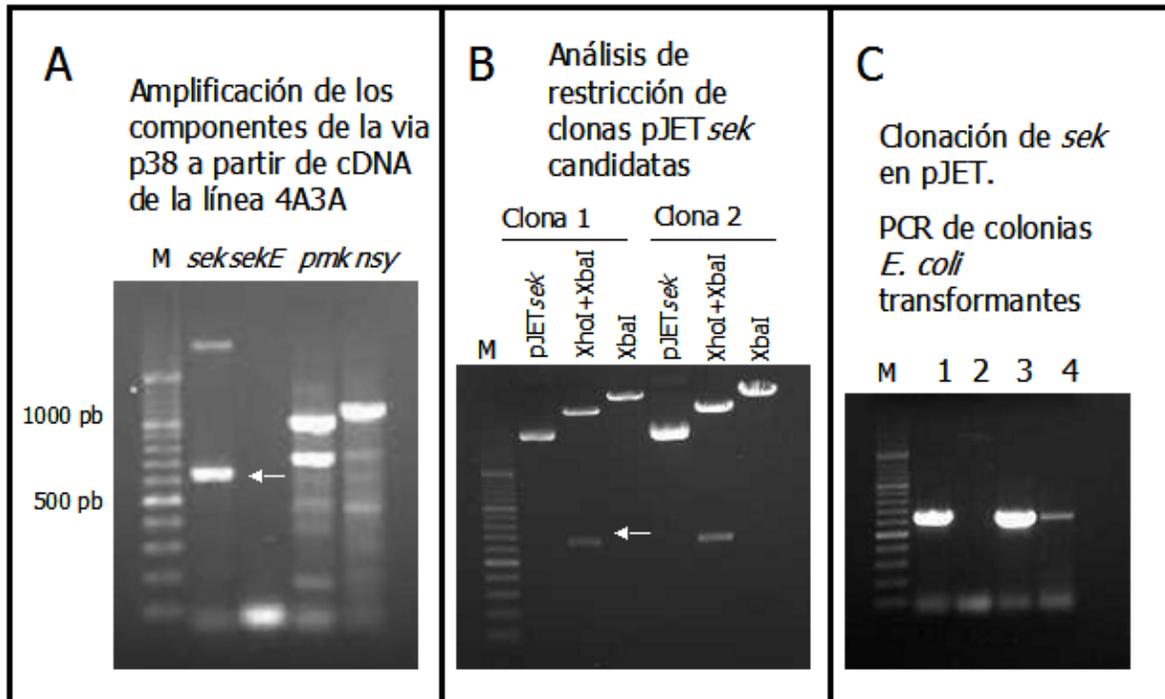


Figura 12. Construcción del plásmido pJET*sek*. (A) Amplificación de componentes de la ruta MAPK p38. (B) Análisis de restricción del plásmido pJET*sek*. (C) PCR de colonia para corroborar la presencia del inserto *sek*.

Después de secuenciar pJET*sek* en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM, alineamos la secuencia del inserto en el plásmido pJET*sek* contra la reportada en la base de datos. La comparación de ambas secuencias demuestra que clonamos exitosamente el gen *sek* en el vector pJET. Con esta construcción fue posible continuar con la inserción de *sek* al vector pLITMUS.

El primer paso consistió en la linearización del plásmido pLITMUS 28i utilizando las enzimas XhoI y XbaI. Nuevamente, se extrajo la banda de 600 pb de pJET*sek* con las mismas enzimas. Ésta se purificó a partir de un gel de agarosa al 1% y se ligó al plásmido linearizado pLITMUS 28i (figura 12A). El producto de la ligación fue transformado a células competentes de *E. coli*. Las colonias transformantes se identificaron por su crecimiento en medio LB+amp y la interrupción del gen *lacZ*<sup>+</sup>. Se seleccionaron cinco colonias, con todas ellas se realizó la extracción del plásmido y se verificó la presencia del inserto a partir de la amplificación de *sek* por PCR utilizando los oligonucleótidos *sek*-R y

*sek*-D. En los cinco plásmidos elegidos se observó una banda cercana a los 600 pb, correspondiente al tamaño esperado de *sek* (figura 12B). Por lo tanto se escogió uno de ellos para continuar con la reacción de síntesis de dsRNA.

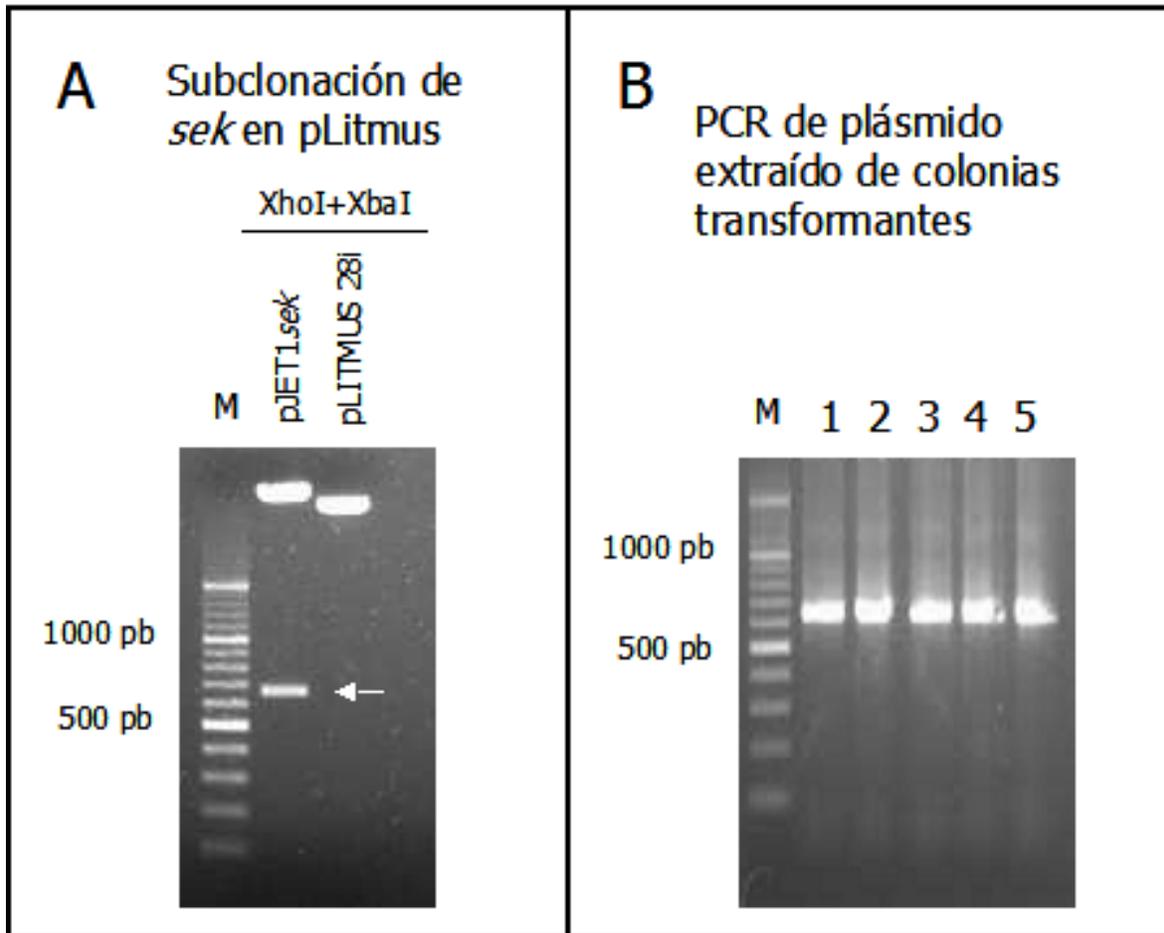


Figura 13. Subclonación de *sek* a pLITMUS 28i. (A) Digestión de los vectores pJET*sek* y pLITMUS 28i previa a la ligación. (B) PCR de plásmido pLITMUS*sek* 28i usando oligonucleótidos específicos para corroborar la presencia del inserto.

El siguiente paso consistió en obtener el templado para la reacción de síntesis *in vitro* de dsRNA. Decidimos ocupar el protocolo de amplificación por PCR utilizando el oligonucleótido mínimo para T7. Puesto que nuestro inserto está flanqueado por las dos promotores para T7, el resultado de la reacción es un fragmento que incluye la secuencia de *sek* junto con la secuencia de promotores T7 necesarios para la síntesis de dsRNA. Por lo

tanto, se espera una banda con un tamaño adicional de 110 pb aproximadamente. Al analizar el producto de la reacción en un gel de agarosa al 1%, encontramos una banda cercana a los 700 pb, conforme a lo esperado (figura 14A).

El producto obtenido a partir de la reacción de PCR con oligo mínimo T7 se utilizó como templado para la reacción de síntesis *in vitro* de dsRNA. El protocolo que seguimos sintetiza en una sola reacción ambas cadenas del dsRNA, por lo que no es necesario llevar a cabo una reacción extra de hibridación. Como el dsRNA migra electroforéticamente de manera similar al DNA, el producto obtenido debe aparecer cercano a 700 pb. Al analizar el producto en un gel de agarosa al 1% observamos una banda del peso esperado, correspondiente a la secuencia de *sek*. Al comparar la intensidad de las bandas (figura 14B) con un marcador con referencia de masas, estimamos una concentración de 45 ng/ $\mu$ l. De acuerdo a las instrucciones del fabricante del protocolo empleado, el rendimiento de la reacción está entre 0.5 y 1  $\mu$ g/ml. La eficiencia de la reacción fue considerablemente menor al esperado. Probablemente esto se debió a la concentración inicial de templado utilizado. En futuras reacciones aumentaremos la concentración de templado hasta 0.5  $\mu$ g/ml. Por otro lado, la baja concentración observada en el gel de agarosa puede deberse a contaminación por RNAsas durante la electroforesis. Por lo tanto, confirmaremos la concentración a partir de la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro. Para ello será necesario purificar futuras reacciones por el método de fenol:cloroformo para evitar impurezas y artificios en la medición de la absorbancia.

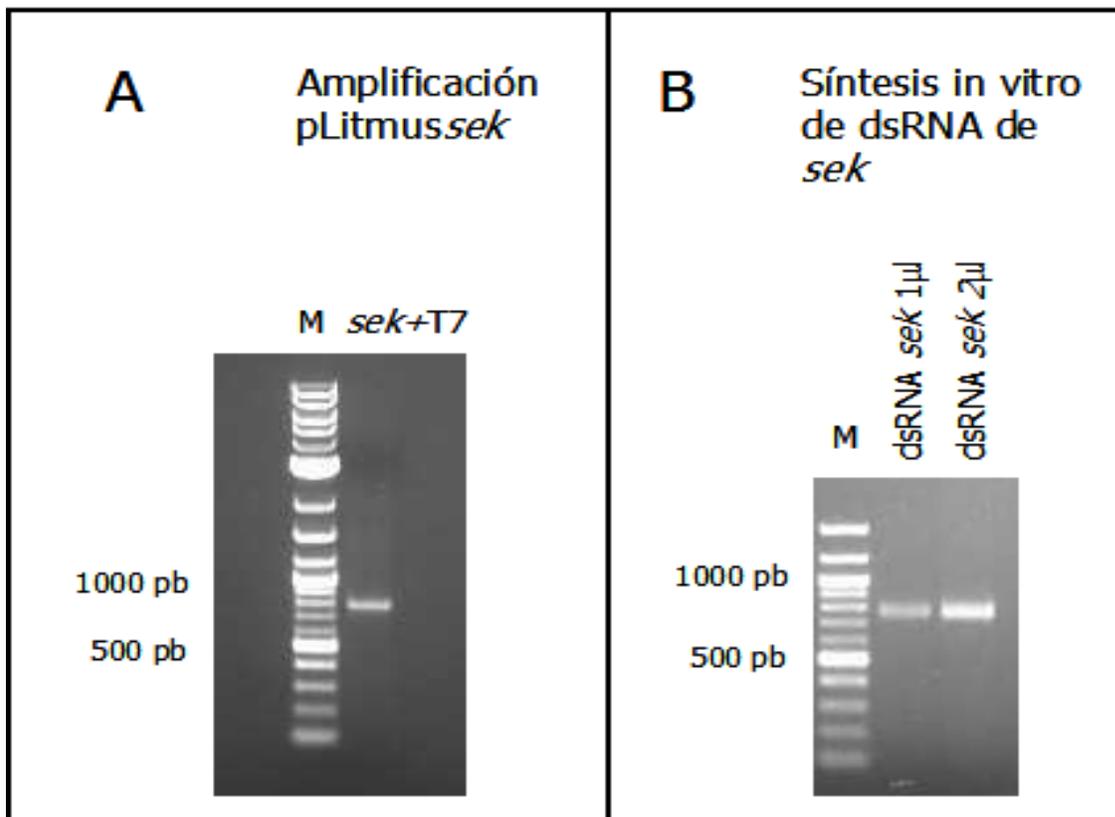


Figura 14. Síntesis *in vitro* de dsRNA. (A) Amplificación de *sek* a partir de pLITMUSsek 28i utilizando el oligonucleótido T7 mínimo. (B) Producto de la síntesis *in vitro* de dsRNA a partir del producto obtenido en (A).

Puesto que en insectos el mecanismo del silenciamiento es facilitado usando fragmentos de varios cientos de pares de bases y éstas son incorporadas espontáneamente por líneas celulares, el dsRNA obtenido puede añadirse directamente al medio en que las células crecen para llevar a cabo el silenciamiento. Se ha reportado que el silenciamiento exitoso de líneas celulares de *A. gambiae* ocurre a partir de la incubación con 6 µg por cada  $10^6$  células por mililitro (31). Dadas las condiciones que utilizamos para el cultivo celular, la concentración obtenida de dsRNA no basta para llevar a cabo el silenciamiento. Para solucionar el problema, además de trabajar en mejorar el rendimiento de la reacción, se modificarán las condiciones de cultivo, utilizando volúmenes más pequeños para el crecimiento de la línea celular.

## Discusión

En este trabajo observamos que distintas líneas celulares tienen diferente susceptibilidad a determinadas toxinas. En las líneas 4A3A y 4A3B observamos un aumento de mortalidad ocasionado por la toxina Cry11Aa. Por otro lado, la línea Sua5.1 no presentó cambios en su viabilidad al ser expuesta a esta misma toxina. Esta diferencia quizá puede deberse al origen distinto de los dos grupos de líneas celulares. Las líneas susceptibles fueron establecidas a partir de la cepa 4a r/r, mientras que la línea no susceptible fue derivada de la cepa Suakoko (29). Las diferencias en la susceptibilidad observadas en líneas celulares provientes de cepas distintas pueden deberse a que las larvas pertenecientes a cada una de las cepas también exhiban diferencias en la viabilidad al ser expuestas a toxina Cry11Aa. Sin embargo, también es posible que las diferencias observadas no dependan de la cepa madre, sino del tejido principal del que la línea fue derivada. Para distinguir entre ambas posibilidades sería deseable retar larvas de ambas cepas con distintas concentraciones de toxina Cry11Aa purificada y obtener las curvas de mortalidad correspondientes. Cabe mencionar que las diferencias entre los ensayos utilizando líneas celulares y organismos completos no pueden ser obviadas. En nuestros resultados sólo hemos mostrado que la línea Sua5.1 no muere en un intervalo reducido de concentraciones después de 30' de exposición a la toxina. Es posible que estas condiciones no se cumplan en el organismo entero.

La razón por la que una línea celular es más susceptible a la exposición a Cry11Aa que otra no es clara. De acuerdo al modelo aceptado, la resistencia a las toxinas Cry se debe, entre otras cosas, a cambios en los receptores celulares a la toxina (32). La búsqueda de los receptores descritos en las líneas utilizadas por inmunodetección con anticuerpos específicos puede ser un primer paso hacia el entendimiento en la viabilidad diferencial de las distintas líneas analizadas. Puesto que utilizamos toxina purificada y activada en nuestro bioensayo, los modelos alternativos de modificación en la solubilización del cristal y la activación de la toxina no son válidos en este contexto. No obstante, no podemos excluir la posibilidad de que existan diferencias en posibles mecanismos de defensa entre las líneas celulares estudiadas que confieran resistencia frente el reto con toxina Cry11Aa.

Una vez que seleccionamos la línea celular a emplear (4A3A) se comparó el efecto de dos toxinas, Cry11Aa y Cry1Ab en la viabilidad celular. Las curvas de mortalidad obtenidas difieren significativamente a partir de una concentración de toxinas de 20 nM. Con este resultado hemos demostrado que esta línea en particular reproduce las observaciones de toxicidad realizadas en larvas de *A. gambiae*. Para extender estos resultados se deberían emplear también otras toxinas cuyo efecto ha sido analizado en larvas, por ejemplo Cry4B y Cyt1Aa (3) y evaluar la toxicidad en la línea 4A3A. Nuevamente vale la pena recordar que las observaciones de mortalidad en las condiciones analizadas no pueden extrapolarse al organismo entero. Por el contrario, con distintas toxinas se han reportado mecanismos de reparación de tejidos activados por el contacto con TFPs (28), retardando o impidiendo por completo la muerte del insecto. Sin embargo, estas observaciones probablemente sí nos dan una buena aproximación acerca de los procesos que ocurren en el organismo entero a nivel celular después de la exposición a la toxina.

La respuesta celular que decidimos analizar fue la activación de la ruta p38 MAPK. Observamos que la fosforilación de p38 ocurre después de la exposición a la toxina Cry11Aa. Este resultado coincide con los numerosos reportes de la activación de esta ruta, empezando desde los 30' después de la incubación con diferentes TFPs. Sin embargo, en este trabajo no se realizó una cinética de la activación de p38. Por lo tanto, no pudimos establecer cuál es la ventana temporal en la que p38 actúa. A su vez, no podemos determinar si la activación de esta ruta es un evento temprano o tardío en respuesta a Cry11Aa. Por otro lado, se observó que la toxina Cry1Ab no provocó cambios en la actividad de p38. Por los ensayos de viabilidad realizados, se sabe que Cry1Ab no es tóxica para la línea celular de 4A3A. En conjunto, estos datos sugieren que la activación de la ruta p38 por TFPs depende de la capacidad de la toxina para matar al insecto y no de algún mecanismo de reconocimiento de componentes estructurales comunes a las toxinas Cry.

Al disminuir la actividad de p38 con el inhibidor SB203580 observamos un aumento en la mortalidad celular a concentraciones de toxina Cry11Aa menores. Este dato sugiere la participación de la ruta en el inicio de un mecanismo de defensa celular y, por lo tanto, concuerda con datos del efecto de Cry5B en nemátodos, en donde la proteína p38

participa en la protección del organismo y su inactivación produjo un fenotipo hipersensible (11). No obstante, el aumento en mortalidad observado (aproximadamente 10% con respecto al control) no corresponde al de un fenotipo hipersensible. Este hecho puede deberse a varias razones, entre las que destacan tres: la existencia de distintas rutas que participen en el inicio y activación del sistema de defensa frente a TFPs, la baja incorporación del inhibidor SB203580 por las células 4A3A o la ineficiencia del inhibidor para disminuir la actividad de p38 específicamente en *A. gambiae*. Para distinguir entre estas posibilidades se requiere evaluar la acción del inhibidor en la línea celular, comparando la actividad de p38 de células incubadas en presencia y ausencia del inhibidor.

La participación de la ruta p38 MAPK es un primer paso para identificar y caracterizar la respuesta celular. Dada la versatilidad de esta ruta, es difícil predecir quiénes serán los efectores finales. Existen reportes que asocian la fosforilación de p38 con la activación de la respuesta inmune en mamíferos (15). Recientemente se ha descrito un mecanismo de resistencia a toxinas Cry en los lepidópteros *H. armigera* y *E. kuehniella* (33,34) que involucra el aumento de la respuesta inmune. Ambos trabajos carecen de una explicación mecánica de los procesos que llevan al inicio de la respuesta inmune. Dado que las vías de señalización en la activación del sistema inmune innato están altamente conservadas entre vertebrados e insectos (35), es probable que la activación de p38 sea un primer paso en el inicio de la respuesta inmune. De ser este el caso, contaríamos con un primer vínculo entre la dinámica celular y los cambios que ocurren a nivel del organismo en respuesta a la toxina Cry11Aa.

Todavía se desconoce cuál es el estímulo que la ruta reconoce para activarse. Aunque la mayoría de los reportes apuntan hacia un mecanismo de activación dependiente del flujo de iones a través de los poros formados en la membrana, la identidad molecular de los intermediarios y el mecanismo de este proceso todavía se desconoce. En modelos en los que la muerte celular ocurre por señalización a partir de receptores extracelulares (7), seguramente p38 se activa por la interacción inicial con el receptor. Por otro lado, en modelos de muerte celular por poro lítico el estímulo inicial se relaciona con los cambios en la permeabilidad e integridad de la membrana celular. Sin embargo, ambos modelos pueden no ser excluyentes, ocurriendo uno u otro dependiendo de la concentración de

toxina a la que la célula estuvo expuesta (36). Generalmente, las distintas respuestas mediadas por p38 se asocian a estímulos iniciales diferentes. Por lo tanto, en este caso esperaríamos una respuesta heterogénea en la población de células expuestas a la toxina. Este fenómeno podría brindar flexibilidad al mecanismo de defensa, pudiendo cambiar cualitativamente dependiendo de la naturaleza del estímulo, en este caso la concentración a la que estuvo expuesto el organismo.

El análisis del mecanismo operante de muerte también puede sugerir posibles candidatos para los efectores de p38. Por ejemplo, la observación de que en células H5 la muerte es independiente de caspasas (7), descarta a éstas como moléculas blanco de p38. A este respecto, hemos iniciado el análisis de la inhibición de varios componentes celulares (ver perspectivas). Una estrategia fundamental para identificar tanto a los componentes del mecanismo de defensa como sus posibles interacciones de manera global, será el análisis del proteoma de organismos retados con toxina Cry11Aa.

## Conclusiones

En este trabajo hemos montado un sistema para llevar a cabo ensayos de toxicidad con líneas celulares de *Anopheles gambiae* de manera rápida, confiable y sencilla. Las curvas de mortalidad obtenidas permiten analizar la participación de distintos componentes en la toxicidad de Cry11Aa. Hemos mostrado resultados que sugieren que en la línea 4A3A la ruta p38 MAPK se activa en respuesta a la exposición con la toxina Cry11Aa. Utilizando el ensayo que desarrollamos junto con un inhibidor específico de p38, hemos observado que la ruta participa en un mecanismo de defensa, todavía desconocido, frente al reto con toxina Cry11Aa. En este trabajo se logró clonar un fragmento del gen *sek* que corresponde a la MAPKK en la ruta de p38 en *Anopheles gambiae*. Éste podrá ser utilizado en experimentos de silenciamiento de la expresión de esta proteína y analizar así el papel de la vía p38 en la respuesta a toxinas Cry. Estos resultados son un primer paso en la caracterización de los cambios intracelulares que ocurren en el insecto al ser expuestos a toxinas Cry.

## Perspectivas

Para continuar con el análisis la activación de la ruta p38 MAPK frente al reto con toxinas Cry seguiremos varias estrategias. Primeramente analizaremos los cambios en la fosforilación de p38 en células expuestas a otra toxina que altera la viabilidad de las células, Cry4B. Por otro lado, pretendemos repetir nuestros experimentos en líneas celulares del mosquito *Aedes aegypti*. El uso de esta especie tiene una ventaja adicional: es posible realizar paralelamente experimentos en larvas de mosquito y comparar las diferencias al utilizar los dos modelos.

Aprovechando el ensayo de toxicidad que hemos montado, pretendemos continuar con el análisis de los factores que son importantes en la muerte celular por exposición a toxinas Cry. Para ello hemos seleccionado inhibidores que alteran diversos componentes celulares, por ejemplo, microtúbulos, filamentos de actina, caspasas y catepsinas, entre otros. Hasta ahora hemos observado únicamente el efecto del catión divalente  $Mg^{2+}$  en la toxicidad de la toxina Cry11Aa. Como puede observarse en la figura 14, al utilizar el quelante EDTA disminuimos la mortalidad celular a las concentraciones de toxina más elevadas utilizadas en el ensayo. Este resultado puede sugerir por un lado que la toxina active rutas de señalización de muerte dependientes de  $Mg^{2+}$  (7) ó alternativamente que el  $Mg^{2+}$  sea un componente necesario para la formación del poro lítico.

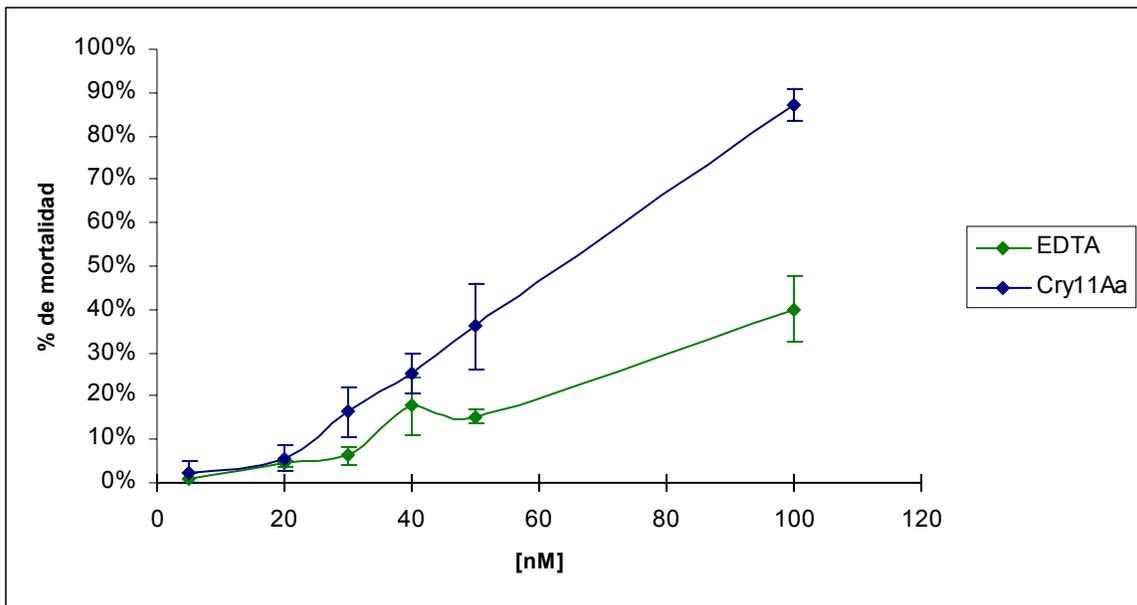


Figura 15. Efecto del quelante de  $Mg^{2+}$  sobre la toxicidad de Cry11Aa en la línea celular 4A3A de *A. gambiae*.

Este es el tipo de curvas y análisis que esperamos obtener con los distintos inhibidores que hemos seleccionado.

## Referencias

1. Parker, MW, Feil, SC. 2005. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 88: 91-142.
2. Schnepf, E, Crickmore, N, Van Rie, J, Lereclus, D, Baum, J, Feitelson, J, Zeigler, DR, Dean, DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62-3: 775-806.
3. Porter, AG, Davidson, EW, Liu, JW. 1993. Mosquitocidal Toxins of Bacilli and Their Genetic Manipulation for Effective Biological Control of Mosquitoes. *Microbiological Reviews* 57-4:838-861.
4. de Maagd, RA, Bravo, A, Berry, C, Crickmore, N, Schnepf, E. 2003. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annual Review of Genetics* 37: 409-433.
5. Bravo, A, Gómez, I, Conde, J, Muñoz-Garay, C, Sánchez, J, Miranda, R, Zhuang, M, Gill, SS, Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1667:38-46.
6. Zhuang, M, Oltean, DI, Gómez, I, Pullikuth, AK, Soberón, M, Bravo, A, Gill, SS. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca Sexta* Lipid Rafts Are Involved in Cry1A Toxin Binding to the Midgut Epithelium and Subsequent Pore Formation. *The Journal of Biological Chemistry* 277-6:13863-13872.
7. Zhang, X, Candas, M, Griko, NB, Taussig, R, Bulla LA. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *PNAS* 103-26:9897-9902.
8. Knowles, BH, Farndale, RW. 1988. Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins and melittin. *The Biochemical Journal* 253:235-241.
9. Stronach, BE, Perrimon, N. 1999. Stress signaling in *Drosophila*. *Oncogene* 18:6172-6182.

10. Craig, CR, Fink, JL, Yagi, Y, Ip, YT, Cagan, LR. 2004. A *Drosophila* p38 orthologue is required for environmental stress responses. *EMBO reports* 5-11:1058-1063.
11. Huffman, DL, Abrami, L, Sasik, R, Corbeil, J, van der Goot, FG, Aroian, RV. 2004. Mitogen-activated protein kinase pathway defend against bacterial pore-forming toxins. *PNAS* 101-30:10995-11000.
12. Tijsterman, M, Plasterk, RHA. 2004. Dicers at RISC: The Mechanism of RNAi. *Cell* 117:1-4.
13. Echeverri, CJ, Perrimon, N. 2006. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nature Reviews Genetics* 7: 373-384.
14. Fallon, AM, Sun D. 2001. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31:263-278.
15. Ratner, AJ, Hippe, KR, Aguilar, JL, Bender, MH, Nelson, AL, Weiser, JN. 2006. Epithelial Cells Are Sensitive Detectors of Bacterial Pore-forming Toxins. *Journal of Biological Chemistry* 281-18:12994-12998.
16. Aroian, R, van der Goot, FG. 2007. Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Current Opinion in Microbiology* 10:57-61.
17. Zhuang, Z, Zhou, Y, Yu, M, Silverman N, Ge, B. 2006. Regulation of *Drosophila* p38 activation by specific MAP2 kinase and MAP3 kinase in response to different stimuli. *Cellular Signalling* 18: 441-448.
18. Tcherkasskaya, O, Ptitsyn, OB. 1999. Molten globule versus variety of intermediates: influence of anions on pH-denatured apomyoglobin. *FEBS Letters* 455: 325-331.
19. Betz, FS, Hammond, BG, Fuchs, RL. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-Protected Plants to Control Insect Pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32: 156-173.
20. Touré, YT, Ayoade, MJ, Morel CM. 2004. The *Anopheles gambiae* genome: next steps for malaria vector control. *TRENDS in parasitology* 20-3: 142-149.
21. Soberón, M, Fernández, LE, Pérez, C, Gill, SS, Bravo, A. 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* 49: 597-600.

22. Bravo, A, Gill, SS, Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
23. Pérez, C, Fernández, LE, Sun, J, Folch, JL, Gill, SS, Soberón, M, Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *PNAS* 102-51: 18303-18308.
24. Broderick, NA, Raffa, KF, Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS* 103-41: 15196-15199.
25. Gurcel, L, Abrami, L, Girardin, S, Tschopp, J, van der Goot, FG. 2006. Caspase-1 Activation of Lipid Metabolic Pathways in Response to Bacterial Pore-Forming Toxins Promotes Cell Survival. *Cell* 126:1135-1145.
26. N'Guessan, PD, Schmeck, B, Ayim, A, Hocke, AC, Brell, B, Hammerschmidt, S, Rosseau, S, Suttorp, N, Hippenstiel, S. 2005. *Streptococcus pneumoniae* R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated Caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 94: 295-303.
27. Stringaris, AK, Geisenhainer, J, Bergmann, F, Balshüsemann, C, Lee, U, Zysk, G, Mitchell, TJ, Keller, BU, Kuhnt, U, Gerber, J, Spreer, A, Bähr, M, Michel, U, Nau, R. 2002. Neurotoxicity of Pneumolysin, a Major Pneumococcal Virulence Factor, Involves Calcium Influx and Depends on Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Neurobiology of Disease* 11: 355-368.
28. Husmann, M, Dersch, K, Bobkiewicz, W, Beckmann, E, Veerachato, G, Bhakdi, S. 2006. Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S. aureus*  $\alpha$ -toxin or streptolysin O. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344: 1128-1134.
29. Müller, H, Dimopoulos, G, Blass, C, Kafatos, FC. 1999. A Hemocyte-like Cell Line Established from the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Expresses Six Prophenoloxidase Genes. *The Journal of Biological Chemistry* 274-17: 11727-11735.
30. Dimopoulos, G, Richman, A, Müller, H, Kafatos, FC. 1997. Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *PNAS* 94: 11508-11513.

31. Hoa, NT, Keene, KM, Olson, KE, Zheng, L. 2003. Characterization of RNA interference in an *Anopheles gambiae* cell line. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 949-957.
32. Ferré, J, Van Rie, J. 2002. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
33. Rahman, MM, Roberts, HLS, Sarjan, M, Asgari, S, Schmidt, O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. *PNAS* 101: 2696-2699.
34. Ma, G, Roberts, H, Sarjan M, Featherstone N, Lahnstein J, Akhurst, R, Schmidt, O. 2005. Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 729-739.
35. Martín-Blanco, E. 2000. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *BioEssays* 22: 637-645.
36. Bhakdi, S, Trantum-Jensen, J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Reviews* 55-4: 733-751.
37. Wirth, MC, Georghiou, GP, Federici, BA. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *PNAS* 94: 10536-10540.
38. Federici, BA, Park H-W, Bideshi, DK, With MC, Johnson, JJ. 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *The Journal of Experimental Biology* 206. 3877-3885.
39. Pigott, CR, Ellar, DJ. 2007. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72-2: 255-281.
40. Jiménez-Juárez, N, Muñoz-Garay, C, Gómez, I, Saab-Rincon, G, Damian-Alamazo, JY, Gill, SS, Soberón, M, Bravo, A. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca Sexta* larvae. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 221222-221229.
41. Malley, R, Henneke, P, Morse, SC, Cieslewicz, MJ, Lipsitch, M, Thompson, CM, Kurt-Jones, E, Paton, JC, Wessels, MR, Golenbock, DT. 2003. Recognition of

pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *PNAS* 100-4: 1966-1971.

42. Brennan, CA, Anderson, KV. 2004. *Drosophila*: The Genetics of Innate Immune Recognition and Response. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 457-483.