



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES EN EL  
INTESTINO DE *Aedes aegypti* DURANTE LA INTOXICACIÓN CON CRY11Aa de  
*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis***

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

**M. en C. PABLO EMILIANO CANTÓN OJEDA**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Alejandra Bravo de la Parra - Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jesús Martínez Barnetche - Instituto Nacional de Salud Pública

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez - Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Agosto, 2016



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.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, y con el financiamiento de la beca CONACyT 332743, el apoyo CONACyT 0221200 y el proyecto N.I.H. 2R01 AI066014.

## Agradecimientos

Una tesis doctoral puede ser el resultado del trabajo de investigación de un solo estudiante, pero detrás de esa persona hay una multitud de individuos, no todos académicos, que contribuyen de maneras grandes y pequeñas a llevar al proyecto a término. A todos ellos les debo muchísimo por su ayuda por estos años y las páginas que siguen fueron creadas de todas sus contribuciones.

Agradezco a mis padres, **Miguel** y **Elsie**, por echarme porras siempre, aún cuando no logran comprender por completo qué es lo que hago tantas horas y tantos días en el laboratorio pero que invariablemente saben cómo aligerarme los contratiempos. Su cariño, esfuerzos, y apoyo durante este proceso son invaluableles y me faltan palabras para expresar cuan importantes son para mí. Gracias por el hogar y la familia que han construido y que he podido disfrutar, que me ha permitido seguir mis deseos y sueños sin reparos ni obstáculos. Agradezco a mi hermano **Miguel**, a quien extraño una inmensidad, que logró instaurar la semilla del anhelo por una carrera científica, y a quien siempre recuerdo por sus palabras de aliento, su fe en mi habilidad, y por su sonrisa orgullosa.

Por supuesto, agradezco enormemente y con mucha orgullo a la **Dra. Alejandra Bravo**. Gracias por tener la confianza en mí para realizar este trabajo, con la certeza que tenía las habilidades y tenacidad para proponer y tomar la iniciativa de un proyecto. Esa confianza es fundamental en un líder, y debido a ello me ha hecho crecer y mejorar mi perfil como persona y como científico. Sus consejos, paciencia y orientación las llevaré de ahora en adelante, así como estaré contagiado de ese ánimo y energía características. No podría dejar de agradecer también al **Dr. Mario Soberón**, mi otro mentor académico, por sus siempre atinadas observaciones y sugerencias para mejorar el proyecto y los análisis, por su interés en mi desarrollo aún no siendo mi tutor directo. A ambos, les agradezco haberme recibido todo este tiempo en el laboratorio. Es un lugar donde siempre me sentí apoyado para mi proyección académica, pero también para mi crecimiento humano y personal. Ha sido un privilegio colaborar con ustedes y es un estandarte que portaré con honor.

A **Jorge González**, por caminar conmigo estos años. Gracias por compartir este aprendizaje y este desarrollo, levantándose cuando quería tirar la toalla y por enseñarme a apreciar los éxitos. Ha sido un gozo y una fortuna contar contigo en las buenas y en las malas, por ser un

pilar para descansar cuando los ánimos fallan y una indispensable compañía cuando todo marcha bien. Tus palabras, tu calidez, tu sabiduría permean esta tesis. Dicen que cuando estás feliz el tiempo pasa más rápido. Pues gracias por hacer parecer que en un parpadeo se completó este trabajo.

A mis compañeros de trabajo, el grupo Soberón-Bravo, que son mi familia extendida. Ya son muchos los que tengo que añadir a esta lista, pero empezaré por **Josué y Leivi**, con quienes he convivido paso a paso en mi formación científica, y con quienes he compartido éxitos y frustraciones. Gracias por la amistad y las incontables anécdotas. A **Meztli, las Danielas, Mari, Vianca, Carlos, Arlen, Jazmín, Diana, Sabino, Fernando, Alan, Blanca, Janette**, y un largo etcétera de compañeros de laboratorio pero también de vida, que son la energía del laboratorio y que más que colegas siempre serán personas valiosas para mí. A mi grupo de apoyo de ex-alumnas: **Nuria, Claudita, Biviana y Ángeles**, que siempre supieran qué decir y que consejos decirme, aún a la distancia, y cuyas experiencias han y seguirán siendo una fuente de inspiración. No podría no agradecer al inigualable **Jorge Sánchez** por ser un fantástico compañero de mesa, pero además un auxilio magnífico para todos los experimentos. De **Isa Gómez** he recibido muchísimo aprendizaje y grandes ayudas que pulieron e hicieron sobresalir mi trabajo. A **Liz Cabrera**, por ser, además de la cuidadora de mis bichos, una amiga entrañable e infalible, y que siempre ha tenido su oído abierto a mis pláticas y dudas. A **Sergio Blancas, Graciela Domínguez, y Alejandro Uribe**, que nos mantienen funcionando en todo nuestro relajo y complicaciones experimentales, y que mantienen cuerdo al grupo. Definitivamente, sin ustedes, este trabajo no se hubiera materializado.

Agradezco profundamente a los miembros de mi comité tutor, los doctores **Enrique Morett y Jesús Martínez**. En todo momento dieron sus mejores opiniones, críticas y observaciones. Debido a su guía y consejos es que este proyecto se enriqueció tanto y se mantuvo en curso. Estoy en deuda por evitar que me perdiera en mis resultados.

A **José Luis Reyes, Víctor Bustamante, Rosa Gutiérrez, Esperanza Martínez, y Alejandro Sánchez** por revisar este extenso documento y darme todas las observaciones para mejorar y hacer más entendibles mis ideas y mis resultados, corrigiendo desde errores tipográficos hasta nociones conceptuales. Gracias por ayudar a consolidar esta tesis en un trabajo sólido.

Mis múltiples amigos del instituto han hecho de mi estancia grata y una etapa increíble. Sobre todo agradezco a **Zayas, Adriana, Leidy, Alberto, Violeta, Gustavo, Karina y Esteban** por compartir conmigo sus hogares, eventos importantes, y permitirme formar parte de sus vidas, siempre con su corazón abierto.

También agradezco a la gente fuera de la comunidad científica: a **Toño, Orly, Danita, Rich, Mariana, Beltrán, Marco, Krystin, .....** y todos los demás amigos que a pesar de la distancia y las constantes cancelaciones y postergaciones por "ese doctorado" siempre estuvieron apoyándome y enviando su cariño.

Quisiera también resaltar el apoyo de las unidades del instituto, sin las cuáles nada de este trabajo hubiera sido concluido: a **Véronica Jiménez, Jérôme Verlayen y Ricardo Grande** de la unidad de secuencia masiva y bioinformática por su crítico y fundamental papel en la generación y análisis de los datos que dan cuerpo a este proyecto; a **Paul Gaytán, Eugenio López y Jorge Yáñez** en la unidad de secuenciación y síntesis por su indiscutible dedicación y esfuerzo con su trabajo de calidad; finalmente, a los ángeles de la guarda de la unidad de docencia que me sacaron de dudas, crisis y apuros en demasiadas ocasiones y siempre con amabilidad y calidez. Muchísimas gracias **Antonio Guillén, Gloria Villa y Jalil Saab**. Agradezco en especial a la **Dra. Claudia Treviño**, coordinadora del programa, por ser mi gurú, orientadora vacacional, amiga, un poco de psicóloga, y un modelo a seguir. Estoy en deuda contigo.

Agradezco al Programa de Apoyos de Estudios de Posgrado (**PAEP**) por los recursos que permitieron presentar este trabajo en los siguientes congresos:

- *7th Annual Arthropod Genomics Symposium*. University of Notre Dame. Indiana, Estados Unidos de América, 2013.
- *XXX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*. Guadalajara, Jalisco, 2014.
- *Entomological Society of America's 63rd Annual Meeting*. Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos de América, 2015.

# Índice General

Índice de Figuras .....	1
Índice de Tablas .....	2
Abreviaturas .....	3
1. Resumen.....	4
2. Abstract .....	6
3. Introducción .....	8
3.1 Los mosquitos como vectores de enfermedades .....	8
3.2 Ciclo de vida del mosquito.....	12
3.3. Métodos de control de poblaciones de mosquitos.....	16
3.4 Las toxinas insecticidas de la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	20
3.5 Respuestas a toxinas formadoras de poro .....	24
3.6 Técnicas de análisis de niveles de expresión de un gen .....	27
4. Hipótesis .....	32
5. Objetivos y metas .....	33
5.1 Objetivo general .....	33
5.2 Objetivos específicos .....	33
6. Materiales y Métodos .....	34
6.1 Crecimiento de <i>Aedes aegypti</i> .....	34
6.2 Producción y purificación de cristales de Cry11Aa .....	34
6.3 Determinación de LC <sub>50</sub> de Cry11Aa.....	35
6.4 Curvas de intoxicación de <i>A. aegypti</i> con Cry11Aa y disección.....	36
6.5 Extracción de proteína intestinal de <i>A. aegypti</i> y Western blot .....	36
6.6 Extracción y purificación de ARN total.....	37
6.7 Síntesis de ADNc .....	38
6.8 Diseño y purificación de oligonucleótidos .....	38
6.9 Evaluación de eficiencia de amplificación de oligonucleótidos.....	39
6.10 Determinación de expresión relativa por RT-qPCR.....	39
6.11 Secuenciación de ARNm y verificación de calidad .....	40
6.12 Alineamiento de secuencias y conteo por unidad transcripcional .....	41
6.13 Determinación de expresión diferencial y obtención de genes comunes .....	42

6.14 Enriquecimiento de categorías de anotación GO .....	43
6.15 "Clustering" de genes.....	44
6.16 Búsqueda de dominios funcionales y homología .....	44
6.17 Verificación de robustez de genes diferencialmente expresados .....	45
7. Resultados.....	46
7.1 Obtención de cristales purificados de Cry11Aa.....	46
7.2 Curvas de intoxicación de Cry11Aa.....	48
7.3 Secuenciación, alineamiento y conteo .....	50
7.4 Determinación de genes con expresión diferencial.....	52
7.5 Análisis de procesos celulares con cambios transcripcionales.....	56
7.6 Análisis de funciones moleculares con cambios transcripcionales.....	62
7.7. Selección de genes blanco y prueba de oligonucleótidos .....	70
7.8. Determinación de niveles de expresión por RT-qPCR de larvas intoxicadas .....	73
7.9 Corroboración de niveles de ARNm con niveles de proteína.....	76
8. Discusión .....	78
9. Conclusiones .....	87
10. Perspectivas .....	89
11. Bibliografía.....	91
Apéndice I: Tablas y figuras adicionales de resultados.....	96
Apéndice II: Artículo original derivado del proyecto.....	106



## Índice de Figuras

Figura 1.1. Casos confirmados de fiebre de dengue en México 1941-2015. ....	11
Figura 1.2. Mapa del rango de hábitat de <i>A. aegypti</i> en 2011.....	12
Figura 1.3. Anatomía de una larva de mosquito.....	14
Figura 1.3. Estructuras cristalográficas de toxinas Cry de Bt. ....	22
Figura 1.4. Modelo de acción de las toxinas Cry de Bt. ....	23
Figura 7.1. Purificación por gradiente de sacarosa de Cry11Aa.....	46
Figura 7.2. Curva dosis-respuesta de Cry11Aa en larvas de <i>A. aegypti</i> .....	47
Figura 7.3. Análisis de integridad por Bioanalyzer 2100 .....	49
Figura 7.4. Análisis de calidad de secuenciación.....	50
Figura 7.5. Enriquecimiento de términos GO de "Biological Process" para los genes diferencialmente expresados ante Cry11Aa. ....	58
Figura 7.6. Grupos de genes con perfiles de expresión compartida a lo largo de la curva de intoxicación con Cry11Aa.....	61
Figura 7.7. Enriquecimiento de términos GO para "Molecular Function" de los DEG en los distintos tiempo de intoxicación.....	63
Figura 7.8. Rango dinámico de amplificación por RT-qPCR para dos genes de <i>A. aegypti</i> .....	71
Figura 7.9. Amplificación por RT-qPCR desde ARN total de <i>A. aegypti</i> con y sin transcriptasa reversa.....	72
Figura 7.10. Correlación en niveles de expresión de genes entre RNAseq y RT-qPCR .....	76
Figura 7.11. Efecto de la toxina Cry11Aa en el nivel de proteína de JNK.....	77
Figura 8.1. Esquema de algunos de los procesos celulares más destacados inducidos en respuesta a Cry11Aa. ....	83
Figura A.1 Valores de expresión log2 de RT-qPCR.....	102

## Índice de Tablas

Tabla 7.1. Mortalidad a las 24 h con cristales purificados de Cry11Aa en larvas de 4 <sup>to</sup> instar A. aegypti.....	47
Tabla 7.2. Porcentaje de sobrevivencia de larvas. ....	48
Tabla 7.3. Eficiencia de alineamiento por TopHat 2.....	52
Tabla 7.4. Comparación del número de genes diferencialmente expresados determinados por el modelo básico o el modelo general lineal de DESeq2 o EdgeR.....	53
Tabla 7.5. Número de genes determinados como diferencialmente expresados.....	55
Tabla 7.6. Genes diferencialmente expresados en larvas control a las 12 h sin toxina.....	56
Tabla 7.8. Dominios proteicos Interpro representativos en alta frecuencia en genes DEG sin anotación de proceso biológico. ....	65
Tabla 7.9. Número de genes sin términos GO de "Biological Process" o dominios Interpro asociados. "Up" se refiere a genes inducidos y "down" a genes reprimidos .....	65
Tabla 7.10. Homólogos detectados por pBLAST.....	66
Tabla 7.11. Genes comunes entre la búsqueda de DEG con tres o cuatro réplicas. ....	69
Tablas 7.12. Categorías de procesos biológicos enriquecidos en genes robustos a las 12 h.....	69
Tablas 7.11. Eficiencias de amplificación en RT-qPCR de los oligonucleótidos de genes de validación.....	74
Tabla A.1. Términos enriquecidos en los grupos de genes de perfil similar .....	97
Tabla A.2 Listado completo de dominios Interpro y su frecuencia .....	99
Tabla A.3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en RT-qPCR.....	100

## Abreviaturas

ABC: ATP binding cassette (cassette de unión a adenosín trifosfato)  
ADN: ácido desoxiribonucleico  
ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario  
ALP: Alcalino fosfatasa  
APN: aminopeptidasa N  
ARF: Factor de ribosilación con adenosín trifosfato  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
Bt: *Bacillus thuringiensis*  
Bti: *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*  
CAD: proteína tipo caderina.  
CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfato  
Cq: ciclo de amplificación de cruce de umbral.  
CRISPR: repeticiones cortas palindrómicas en grupo regularmente espaciadas  
DEG: genes diferencialmente expresados  
DEPC: dietil pirocarbonato  
dNTPS: desoxiribonucleótidos trifosfatados  
EDTA: ácido etilendiamintetra-acético  
FDR: tasa de falsos descubrimientos  
GO: ontología de genes  
GLM: modelo lineal generalizado  
GTPasa: cinasa de unión a guanosín trifosfato  
H<sub>2</sub>O: agua  
JNK: cinasa N-terminal de Janus  
kDa: kilo daltones  
LB: Luria Bertani  
LC<sub>50</sub>: dosis letal para el 50% de la población  
NaCl: cloruro de sodio  
Nr: No redundante  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
MAPK: cinasa de proteínas activada por mitógenos.  
p<sub>adj</sub>: valor p ajustado  
pb: pares de bases nucleotídicas  
pBLAST: herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales de proteínas  
PBS: solución salina con tampón de fosfatos  
PIP<sub>3</sub>: Fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato  
PKA: cinasa A de proteínas  
PKC: cinasa C de proteínas  
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
RNAseq: secuenciación masiva de ácido ribonucleico  
RT-qPCR: reacción cuantitativa en cadena de polimerasa con retro-transcriptasa.  
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio  
TTN: Tritón/Tris/Cloruro de sodio  
UPR: respuesta a proteínas malplegadas

# 1. Resumen

El mosquito *Aedes aegypti* es vector de múltiples enfermedades infecciosas, incluyendo fiebre amarilla, dengue, chikungunya y zika. El control de las poblaciones de este insecto es un componente clave para limitar el esparcimiento de las enfermedades que transmite a la población humana. El uso de insecticidas químicos presenta problemas por su inespecificidad, contaminación ambiental y la aparición de poblaciones resistentes. Una alternativa es el uso de las toxinas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*). Aunque se conoce mucho acerca del mecanismo de acción de las toxinas de *Bti* debido a estudios en otros insectos, aún se desconoce mucho acerca de la respuesta intracelular en el tejido intestinal del insecto desencadenada por el daño realizado por estas toxinas. El conocimiento de este tipo de respuestas permitirá un mejor manejo de este insecticida biológico así como descubrir posibles blancos adicionales para incrementar la potencia de las toxinas.

En este trabajo se analizaron los cambios en expresión genética durante los tiempos iniciales de exposición a la toxina Cry11Aa. Se obtuvo tejido intestinal de larvas de 4to instar de *Aedes aegypti* intoxicadas con una dosis  $LC_{50}$  de Cry11Aa purificada. Este tejido fue procesado para obtener bibliotecas de ARNm, el cual fue analizado mediante secuenciación masiva de ADN en una plataforma Illumina. Las secuencias obtenidas de las bibliotecas fueron analizadas por un "pipeline" bioinformático para determinar genes con expresión diferencial entre las larvas intoxicadas a diferentes tiempos y aquellas larvas no expuestas a la toxina; asimismo, para conocer qué funciones desempeñan estos genes. Se identificaron algunas vías metabólicas que se ven enriquecidas en genes diferencialmente expresados a medida que procede la intoxicación. Desde las 6 h, pero de forma más marcada a las 9 y 12 h de intoxicación, hay una inducción de vías de señalización, entre las que destacan aquellas mediadas por MAP cinasas,  $PIP_3$ , y proteínas de la familia de las GTPsas pequeñas (Rho y Rab, por ejemplo). Hay también una progresiva activación de procesos de transporte intracelular, endocitosis, así como genes involucrados con metabolismo de fosfolípidos, carboxilesterasas, mantenimiento de uniones estrechas y modificación del citoesqueleto. Por otra parte, el metabolismo central, procesamiento de carbohidratos y aminoácidos y transporte transmembranal muestran una progresiva represión transcripcional. También hay una represión de procesos asociados a la destoxificación celular como genes de transportadores

ABC y citocromos P450. Se encontró una represión inicial de replicación celular y respuesta inmune innata, aunque a las 12 h comienza a haber inducción de genes de estos procesos. Proponemos que varias de las vías descritas podrían interactuar entre sí, por ejemplo, la señalización mediada por Rho GTPasas podría convergir sobre las MAP cinasas y señalización por PIP<sub>3</sub>. Estas vías podrían modular la reparación de membrana dañada por poros de Cry11Aa al regular el reciclado mediante endocitosis y el reforzamiento de los contactos entre células del epitelio intestinal. La notoria activación de genes de fosfolipasas A2 indica un posible papel de la señalización mediante ácido araquidónico en el proceso de defensa. A su vez, la célula parece economizar energía al reprimir procesos costosos como el transporte transmembranal y la replicación celular durante la duración de la intoxicación. Existe similitud en los perfiles de expresión que encontramos y aquellos observados en otros organismos en respuesta a toxinas Cry, por ejemplo, el coleóptero *Tenebrio molitor*, el lepidóptero *Ostrinia nubilalis* y el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. También observamos coincidencias con los niveles de expresión existentes en larvas de *A. aegypti* tolerantes a *Bti*. Esto apunta a una conservación del proceso de defensa en diferentes invertebrados y en el proceso de adaptación o tolerancia a la toxina, permitiendo tener mejor idea de qué modificaciones al metabolismo reducen la efectividad del control biológico con toxinas Cry.

Por otro lado, se validaron 14 genes diferencialmente expresados mediante análisis con RT-qPCR a todos los tiempos utilizados en las bibliotecas secuenciadas. Además se analizaron los niveles de expresión de esos 14 genes en larvas no expuestas a toxina y expuestas a mutantes no tóxicas de Cry11Aa. En estos casos la correlación con los niveles de expresión de la secuenciación fue mucho menor que aquella observada cuando se utiliza toxina silvestre. Esto nos indica que la mayoría de los cambios observados sí son debidos a un proceso de formación de poro y no simplemente a la presencia y unión de la toxina a la células del intestino.

La información en conjunto nos ha ayudado a comprender los procesos iniciados por las células del epitelio intestinal del mosquito para contender con la formación de poros de Cry11Aa. Adicionalmente, tenemos mejor base para predecir que rasgos metabólicos podrían surgir en las poblaciones silvestres de mosquitos al utilizar de manera masiva *Bti* en el control biológico. También nos da información de blancos adicionales que se podrían atacar para limitar la defensa a estas toxinas y potenciar el efecto de las preparaciones en campo.

## 2. Abstract

The mosquito *Aedes aegypti* is a vector for multiple infectious diseases including yellow, dengue, chikungunya and zika fevers. The control of this insect is a key component to limit spread of these diseases to human populations. The use of chemical insecticides presents several inconveniences, such as lack of specificity, environmental pollution, and the development of resistance. An alternative for the control of *Aedes aegypti* is the use of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*). Although much is known about *Bti* toxin's mode of action mainly due to studies in other insects, we still do not possess many details of the intracellular responses triggered in the intestinal tissue due of the toxin's damage. The knowledge of these responses would allow better management of this biological insecticide as well as to discover additional targets to increase the toxin's potency.

In this work we analyzed the changes in genetic expression during the initial period of exposure to Cry11Aa toxin. We obtain intestinal tissue of 4th instar larvae of *Aedes aegypti* exposed to an LC<sub>50</sub> of purified Cry11Aa. This tissue was processed to obtain mRNA, which was then run through DNA mass sequencing on an Illumina platform. The reads obtained from the sequencing libraries were analyzed by a bioinformatic pipeline to determine genes with differential expression between larvae intoxicated for different times and those not exposed to toxin, and also to know what functions are carried out by these genes. We identified some metabolic pathways enriched in differentially expressed genes as the intoxication proceeded. Starting at 6 h, but more markedly at 9 and 12 h of intoxication, there is an induction of signaling pathways, among them we can mention MAP kinases, PIP<sub>3</sub>, and proteins from the small GTPases families (Rho and Rab, for example). There is also a progressive activation of intracellular transport processes, endocytosis and genes involved in phospholipid metabolism, carboxylesterases, maintenance of tight junctions, and cytoskeleton modifications. On the other hand, central metabolism, amino acid and carbohydrate processing, and transmembrane transport show progressive transcriptional repression. There is also repression of detoxification processes such as genes of ABC transporters and P450 cytochromes. We also found an initial repression of cell replication and innate immune response, although at 12 h there is an induction of these processes. We propose that several of these pathways could interact among them, for example, signaling through Rho GTPase could

converge with MAPK and PIP<sub>3</sub> mediated signaling. These pathways could modulate the repair of membrane damaged by Cry11Aa by regulating the recycling by endocytosis and the reinforcement of junctions between cells of the intestinal epithelium. The notorious activation of phospholipase A2 genes indicates a possible role of signaling through arachidonic acid in the induced defense. The cell appears to reduce energy consumption by repressing energy costly processes like transmembrane transport and cell division during intoxication. There are common elements between the expression profiles that we found and those reported in other organisms in response to Cry toxins, for example for the coleopteran *Tenebrio molitor*, the lepidopteran *Ostrinia nubilalis*, and the nematode *Caenorhabditis elegans*. We also observed likeness to the levels of expression in *A. aegypti* larvae tolerant to *Bti*. These data suggest conservation of the defense response among different invertebrate lineages and adaptation process, allowing us to better understand the changes to the metabolism that could reduce the efficiency of the biological control with Cry toxins.

We also validated 14 differentially expressed genes by RT-qPCR analysis at all times used for the sequenced libraries. As controls we determined the expression levels of these 14 genes in non-exposed larvae and in those exposed to non-toxic mutants of Cry11Aa. In these later cases, correlation of expression levels to those obtained through sequencing was much lower than correlation observed when we used a wild-type toxin. These data indicate that most of the observed changes are indeed caused by pore formation and are not simply due to binding of a Cry toxin to intestinal cells.

As a whole, this information has helped us comprehend the process started by the cells in the mosquito's gut epithelium to contend with the formation of pores by Cry11Aa. Additionally we now have better grounds to predict metabolic traits that could be generated in *A. aegypti* populations through the extensive use of *Bti* in biological control. It has allowed us to identify possible targets to limit defense response to these toxins and improve their effect for field applications.

## 3. Introducción

### 3.1 Los mosquitos como vectores de enfermedades

Diariamente, un individuo cualquiera está en exposición constante a un número alto de agentes causantes de enfermedades. Estos pueden llegar en el agua que bebemos, los alimentos que ingerimos, el aire que respiramos, las superficies que tocamos, la gente con quien interactuamos, pero también con los animales con los que entramos en contacto. Entre los animales responsables de la mayor cantidad de muertes de personas en el mundo destaca por mucho el mosquito. Diferentes especies de mosquito son portadoras de microorganismos y virus que causan inmenso daño a las comunidades. La mayoría de estas enfermedades persisten dentro de poblaciones silvestres de animales como aves migratorias, murciélagos, y otros mamíferos, y pudieran causar brotes epidémicos[1]. En el momento que las hembras adultas de los mosquitos se alimentan de sangre infectada con el patógeno, éstas lo incuban y favorecen su proliferación, y después introducen el patógeno al humano a través de su saliva durante la alimentación. Además de desarrollar los síntomas de la enfermedad, la persona se convierte a su vez en reservorio del patógeno que se reproduce en su cuerpo y lo transmitirá a cualquier otro mosquito que lo pique. Este ciclo es el origen de focos epidemiológicos, especialmente en regiones con numerosos mosquitos y gran cantidad de personas, ambos factores incrementan la probabilidad de transmisión del patógeno. En conjunto, se estima que varios millones de personas mueren al año por enfermedades transmitidas por mosquitos, y cientos de millones son afectadas por estas enfermedades [2].

Los agentes patogénicos transmitidos por los mosquitos pueden ser parásitos, bacterias y virus. Cada patógeno tiene como vector un cierto número de especies de mosquito. Es decir, no todos los mosquitos transmiten todos los posibles agentes patogénicos. Sin embargo, dentro de especies cercanas es posible que ciertas mutaciones en los patógenos le permiten infectar y proliferar en nuevos vectores [3], lo que abre la posibilidad de que una enfermedad se extienda a nuevas regiones si los hábitats de dos mosquitos se superponen.

Los mosquitos del género *Anopheles* son los principales vectores de parásitos del género *Plasmodium*, agentes causantes de la malaria. A nivel mundial se estima que anualmente se

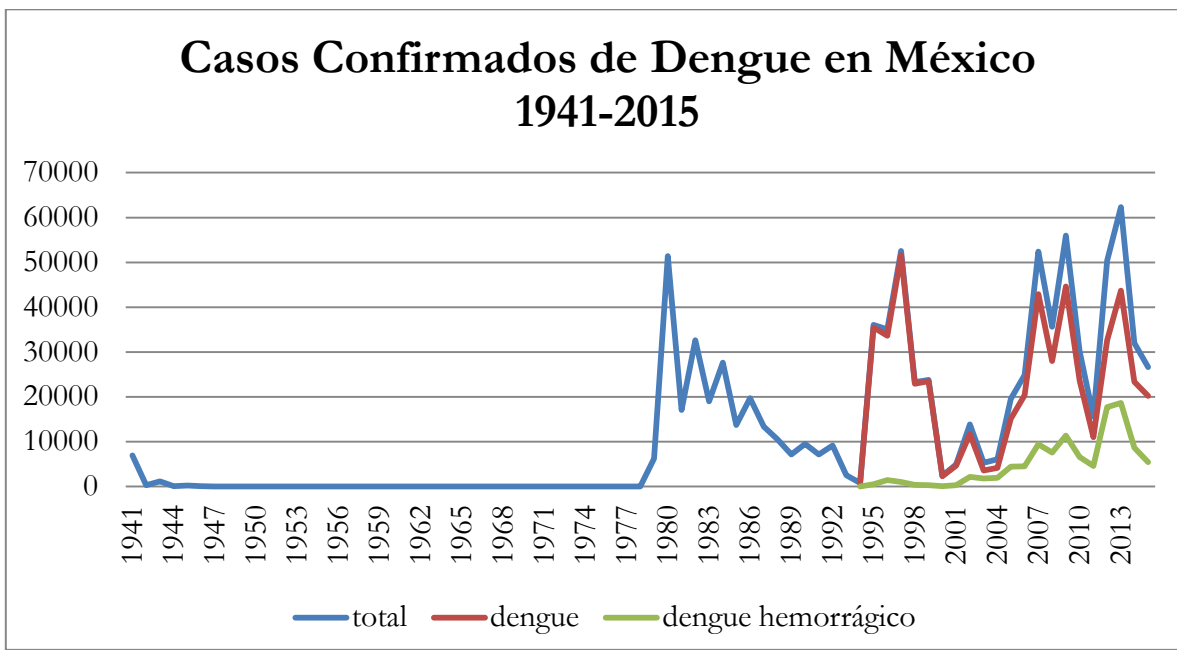


registran cerca de 500 millones casos de malaria, donde aproximadamente 2.7 millones son fatales[4]. Estas muertes ocurren mayormente en el continente africano donde el parásito más extendido es *Plasmodium falciparum*. Aunque existen medicamentos para combatir la malaria como la quinina, cloroquina, y artemisina, éstos han reducido su efectividad o han sido retirados por completo debido al surgimiento de parásitos resistentes a ellos [5]. La principal especie transmisora de malaria en África es *Anopheles gambiae*, pero existen otros vectores de malaria. Por ejemplo, *Anopheles albimanus* es transmisor de *Plasmodium vivax* en América Central y del Sur [6] y *Anopheles stephensi* es el principal transmisor de *P. falciparum* en India. A lo largo del tiempo se ha intentado desarrollar una vacuna contra estos parásitos, pero los resultados han sido limitados. Actualmente sólo se tiene la vacuna RTS,S/AS01 desarrollada contra *P. falciparum* en fase tres[7], pero su utilización a gran escala aún no se ha aprobado, además de que el nivel de protección es moderado.

Los mosquitos del género *Culex* también son vectores para diversas enfermedades como el virus del oeste del Nilo, el virus de la encefalitis japonesa o el de la encefalitis equina. El virus del oeste del Nilo cobró notoriedad a principios del siglo XXI por su introducción en Nueva York en 1999 y su rápida diseminación por Norte América y más al sur hacia el Caribe y América Latina, teniendo brotes epidémicos importantes en diferentes regiones como en Texas en 2012 [8]. La filariasis linfática es una enfermedad causada mayormente por el nemátodo *Wuchereria bancrofti*, pero también por *Brugia malayi* y *Brugia timori* [9]. Los síntomas de esta enfermedad, también conocida como elefantiasis, incluyen graves deformaciones corporales y dolor que pueden llegar a generar discapacidades permanentes. En muchos casos la enfermedad sólo puede ser controlada a través de quimioterapia. Esta enfermedad afecta a cerca de 120 millones de personas en el mundo. El mosquito *Culex quinquefasciatus* es el principal vector en la India, pero también puede ser transmitida por las especies *Culex pipiens* y *Culex sitiens*. El genoma del mosquito *Culex quinquefasciatus* fue secuenciado en el año 2010; la información que se pueda extraer del análisis de su genoma será importante para controlar esta especie y su transmisión de enfermedades.

En el caso de los mosquitos del género *Aedes* éstos representan una creciente amenaza a la salud mundial. Los mosquitos de este género son muy adaptables a los ambientes urbanos. La creciente expansión de zonas habitadas así como de un cambio climático han favorecido la

rápida extensión del rango de hábitat de estos insectos. Los mosquitos *Aedes* son transmisores de varios virus importantes, de los cuales destacan la fiebre amarilla, el dengue, el chikungunya y el zika. En el caso de la fiebre amarilla existe ya una vacuna altamente efectiva [10] aunque de alto costo, pero para las otras enfermedades no existen ni vacunas ni tratamientos dirigidos, por lo que un paciente que presenta la infección sólo puede ser tratado para contener los síntomas durante el cuadro clínico. La fiebre del dengue es causada por cualquiera de 4 virus cercanos pero con diferente serotipo, nombrados DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. Dependiendo de las variables consideradas, se estima la existencia de 100 a 300 millones de casos de dengue al año. Un pequeño porcentaje de ellos son cuadros graves o letales de dengue hemorrágico. La enfermedad genera inmunidad contra el serotipo de la infección, pero la reinfección con otro serotipo es una de las principales agravantes para el desarrollo de un cuadro de dengue hemorrágico. A medida que las poblaciones humanas han incrementando los viajes entre países y continentes, la introducción de nuevos serotipos en regiones afectadas por dengue puede ser una causal del incremento en casos severos de dengue hemorrágico. Mientras que en 1970 sólo se habían reportado brotes epidémicos de dengue en 9 países, actualmente la enfermedad es endémica en más de 100 países [2]. El impacto de la morbilidad sobre los sistemas de salud y la economía de los países afectados es grande, pero muchas veces difícil de calcular. Tan sólo en sudeste asiático, el impacto económico del dengue se estima en alrededor de 950 millones de dólares al año [11]. En México, el número de casos de dengue se ha incrementado notoriamente en décadas recientes. A mediados del siglo XX se hicieron importantes esfuerzos panamericanos para la erradicación de *A. aegypti* como medida de control de la fiebre amarilla. Sin embargo, varios de los insecticidas químicos utilizados en estos programas, como el DDT, fueron descontinuados al descubrir sus efectos tóxicos sobre la población humana [12]. Al mismo tiempo, los mosquitos tratados con este insecticida desarrollaron altos niveles de resistencia. En la figura 1.1 se muestran el número de casos de dengue reportados por la Secretaría de Salud en México desde 1941 hasta 2015. Además de los brotes epidémicos identificados por los picos en número de casos, una tendencia alarmante es el incremento en la proporción de casos diagnosticados dengue hemorrágico.

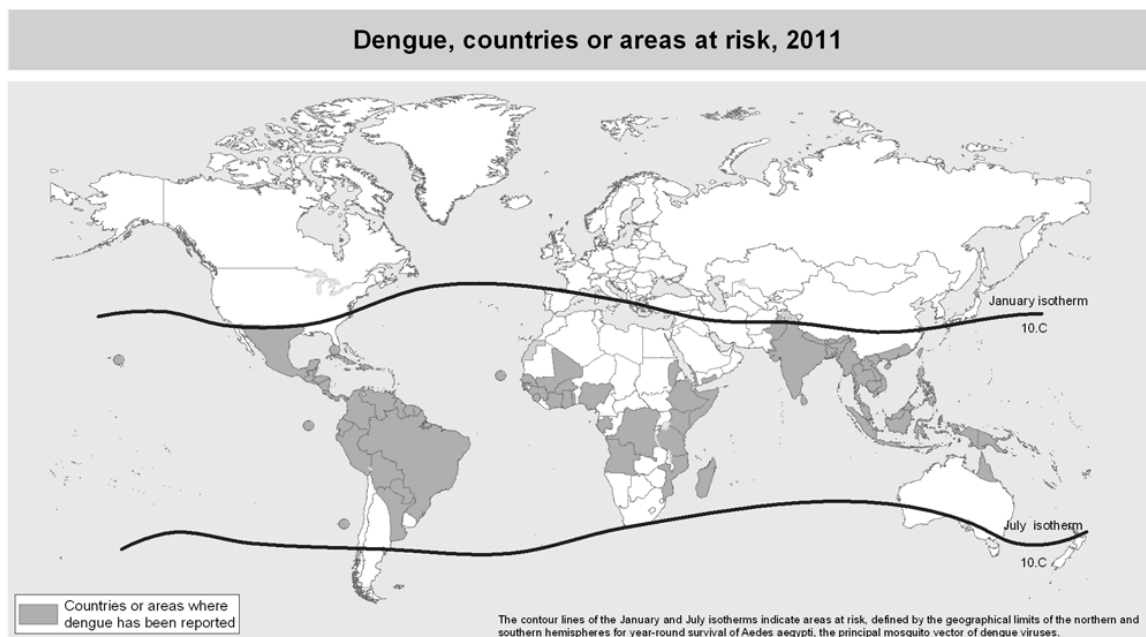


**Figura 1.1. Casos confirmados de fiebre de dengue en México 1941-2015.** Adaptado de datos de la Secretaría de Salud y de "El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México" [13].

La fiebre de chikungunya y la fiebre de zika son dos enfermedades emergentes recientes transmitidas por mosquitos del género *Aedes*. El chikungunya era hasta hace poco una enfermedad con un rango limitado de brotes epidémicos. Sin embargo, su introducción en países ya colonizados por el vector *A. aegypti* ha favorecido su expansión; es considerada ya una enfermedad emergente, causando millones de casos anuales [14]. La enfermedad se ha extendido incluso en países no tropicales como algunas zonas de la costa de Europa en el mediterráneo debido a que existe una variedad del virus que infecta eficazmente a *A. albopictus* [3], el cual puede habitar climas más templados que *A. aegypti*.

El virus de zika se identificó originalmente en 1947. En tiempos recientes la infección causada por el virus de zika a cobrado una importancia a nivel mundial. Aunque el cuadro clínico de esta enfermedad es moderado, y un porcentaje relativamente bajo de las personas infectadas desarrollarán síntomas, una complicación preocupante ha surgido por su relación con el incremento en casos de microcefalia y síndrome Guillain-Barré en bebés recién nacidos de zonas de brotes epidémicos de zika, cuando las madres fueron infectadas con zika [15]. Esto agrega una dimensión preocupante a la transmisión de esta enfermedad a las mujeres

embarazadas por los mosquitos, sobretodo en vista de la ausencia de tratamientos o vacunas contra el virus. Para todas estas enfermedades existe una subestimación del número de casos, tanto porque los individuos no reportan su enfermedad o por un diagnóstico incorrecto del cuadro clínico debido a la similitud de síntomas con otras enfermedades. En cualquier caso, aproximadamente 40% de la población humana actualmente habita en zonas de riesgo de contagio, como se muestra en la figura 1.2, por lo que el control de mosquitos vectores de enfermedades se ha vuelto un punto crucial en la agenda de salud mundial.



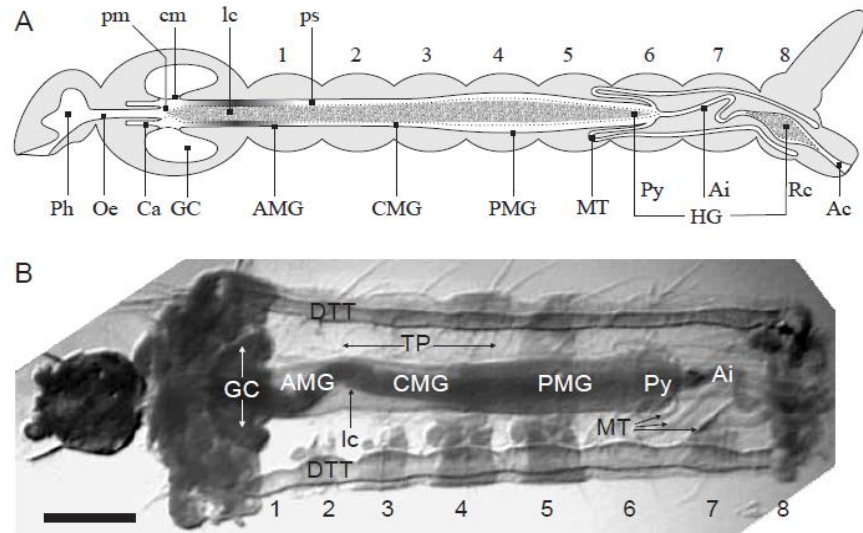
*Figura 1.2. Mapa del rango de hábitat de A. aegypti en 2011.* Tomado de la Organización Mundial de la Salud [2].

### 3.2 Ciclo de vida del mosquito

Al igual que otros insectos, los mosquitos tienen un ciclo de vida que contempla varias etapas de desarrollo. En principio, al eclosionar de los huevos el insecto pasa por el crecimiento larvario. Aquí, el individuo se desarrolla con un incremento rápido de tamaño y la acumulación de recursos a través de la alimentación. Después se procede a la formación de una pupa donde ocurre la metamorfosis: un cambio drástico de la morfología y fisiología del insecto. De esta pupa emerge el insecto adulto.

Los mosquitos pasan por una etapa larvaria y de pupa en un ambiente acuático. Inicialmente una hembra de mosquito deposita entre 50 y 500 huevos de manera individual o en grupos en las paredes de los contenedores de agua, cerca de la superficie del cuerpo de agua, o en conjuntos tipo balsas directamente sobre la superficie del agua tal como lo hace el mosquito *Culex*. Algunas especies de mosquito requieren de la desecación y rehidratación de los huevos como señales ambientales para la eclosión de huevo. Esto sucede, por ejemplo, con especies de los géneros *Aedes* y *Ochleratus*, quienes coordinan el nacimiento de las larvas con las inundaciones de temporadas de lluvias o el deshielo, respectivamente. Dos señales biofísicas claves en la eclosión del huevo son la cantidad de oxígeno disuelto en el agua y la temperatura de ésta. La sincronización con ciclos ambientales es crucial para el éxito reproductivo de la población. [16]

La larva que emerge del huevo carece de patas y lleva una vida estrictamente acuática, durante la cual se alimenta por filtración de microorganismos y partículas disueltas en el agua. La anatomía de una larva de mosquito se puede dividir en tres secciones: la cabeza, un sección más ancha correspondiente al tórax, y un abdomen compuesto de siete segmentos casi idénticos y tres segmentos posteriores modificados. El segmento 8 corresponde a los órganos de respiración, el sifón en especies culicidae o lóbulos espiraculares en mosquitos anofelinos [16]. Al interior de los segmentos del abdomen encontramos el tracto digestivo de la larva, que se puede dividir en el intestino anterior, medio y posterior, así como los túbulos de Malpighian, una estructura con función análoga a los riñones, unidos a la parte posterior. Unida a la parte anterior del intestino, dentro del tórax, se encuentra la caeca gástrica, una estructura formada por una serie de sacos necesaria para la digestión [17]. El epitelio del intestino de la larva está conformado principalmente por una monocapa de células columnares, así como las células regenerativas cerca de la membrana basal [18]. El intestino sufre una retracción y remodelación extensa al final del periodo larvario. El crecimiento de las larvas del mosquito requiere de mudas de la cutícula para permitir un aumento de tamaño. En *Aedes aegypti* se tienen 4 mudas, conocidas como instar larvario. El periodo de crecimiento larvario varía de especie a especie, y es dependiente de condiciones ambientales como disponibilidad de nutrientes y temperatura del agua, pero en circunstancias óptimas va de 6 a 8 días donde se cubren los cuatro instar larvarios.



**Figura 1.3. Anatomía de una larva de mosquito.** El panel A es una esquematización de la histología del panel B. Las siglas corresponden a lo siguiente: Ph, faringe; Oe, esófago; Ca, cardia; GC, caeca gástrica; AMG, intestino medio anterior; CMG, intestino medio central; PMG, intestino medio posterior; MT, túbulos de Malphigian; HG, intestino posterior; Py, píloro; Ai, intestino anterior ; Rc, recto ; Ac, canal anal ; pm, membrana peritrófica ; cm, membrana caecal ; lc, contenido del lumen ; ps, espacio peritrófico; DTT, tronco traqueal dorsal; TP, plexo traqueal. Imagen tomada de [18].

Para la metamorfosis, las larvas de mosquitos desarrollan la pupa, donde la alimentación cesa y la formación de las estructuras adultas se inicia a partir de los discos imaginales de las larvas. A diferencia de las pupas de insectos como los lepidópteros y coleópteros, las pupas de los mosquitos se mantienen muy móviles durante esta etapa. En condiciones óptimas un mosquito puede permanecer en etapa de pupa durante unos dos días, después de los cuáles la pupa flota hacia la superficie del agua y se abre longitudinalmente. Del interior emerge un mosquito adulto e inicia la etapa aérea/terrestre del ciclo de vida.

Los adultos de los mosquitos viven entre 12 y 20 días. Durante esta etapa tanto los machos como hembras de la especie se alimentarán de fuentes ricas de carbohidratos como néctar de plantas para su supervivencia. Sólo las hembras de los mosquitos requerirán alimentarse de sangre para llevar a cabo la maduración de los huevos. La proteínas obtenidas de la sangre

promueven una serie de cascadas hormonales que inducen la producción de vitogelina, una proteína necesaria para el desarrollo adecuado de los huevos y posteriormente de los embriones en su interior [19]. Las hembras de los géneros *Culex* y *Aedes* son capaces de llevar a cabo más de un apareamiento con los machos durante su vida adulta, mientras que las hembras del género *Anopheles* sólo llevan a cabo un evento de apareamiento. En él, los machos transfieren un tapón compuesto de esperma, proteínas y hormonas, que la hembra almacena en la espermateca, pero que también impide un apareamiento adicional por impedimento físico y por cambios conductuales de la hembra [20]. La búsqueda de fuente de sangre por parte de las hembras cambia de especie a especie. Algunas diferencias son la distancia que puede volar para encontrar un blanco, las horas del día en que muerden a su blanco, y la preferencia de blanco. La localización de un blanco está guiada por múltiples factores entre los que se encuentran señales olfativas, de temperatura y la producción de CO<sub>2</sub> por el animal [16]. Esta multitud de estímulos contribuyen a una fuerte atracción e identificación de una fuente apropiada de sangre por parte de las hembras.

Una hembra puede ingerir hasta tres veces su peso en sangre, pero para hacerlo debe mantener líquida la sangre para succionarla a través de las estructuras especializadas de su boca. Para esto inyecta su saliva; es esta acción la principal razón de transmisión de agentes patógenos a un hospedero, ya que los virus y parásitos son capaces de replicarse en las células de las glándulas salivales [21]. Durante el tiempo de vida adulta de una hembra de mosquitos ésta puede llevar a cabo más de una alimentación de sangre para la maduración completa de sus huevos. En este periodo entre alimentaciones es que se da el paso del agente patogénico a través de la barrera intestinal hacia la hemolinfa del insecto, y de ahí a su eventual arribo a las glándulas salivales. En la mayoría de los casos la respuesta inmune del mosquito es capaz de detener la infección, pero en algunos casos el patógeno sobrepasará las medidas de defensa y será capaz de completar su ciclo de reproducción. Para el virus del dengue este proceso puede tomar unos 7 días. Por esta razón es que las hembras de mayor edad son aquellas con mayor probabilidad de fungir como transmisoras de enfermedades [22]. Finalmente, una hembra apareada buscará un sitio apropiado para la ovoposición de los huevos fecundados, iniciado de nueva cuenta el crecimiento de la población de mosquitos.

### 3.3. Métodos de control de poblaciones de mosquitos

Las poblaciones de mosquitos pueden ser controladas de diversas formas y de hecho las probabilidades de éxito dependen de utilizar más de una. Algunas involucran al individuo afectado y otras son aplicadas por entidades gubernamentales. Las nebulizaciones de insecticidas químicos son las más utilizadas. El control de larvas de mosquito se realizan en las zonas donde las hembras depositan huevos cerca de poblaciones humanas, como piletas o tanques para acumulación de agua potable, drenajes, basureros, e incluso macetas en los hogares y cementerios. El control de una población de mosquitos requiere de monitoreo constantes de los potenciales sitios de crianza y albergue de mosquitos adultos.

Los individuos pueden establecer barreras de protección personalizada a través del uso de repelentes. Esto resulta un buen complemento a los métodos de abatimiento poblacional que se describirán más adelante. La mayoría de los repelentes están basados en compuestos químicos sintéticos y uno de los más conocidos es el DEET (N,N-dietilmetil-3-metilbenzamida). Son una solución portable cuando otros métodos no son sencillos de utilizar y con capacidad de re-aplicación. Muchos repelentes también se comercializan como vaporizadores o dispositivos que se conectan a la corriente eléctrica [23]. La protección personal con repelentes se puede complementar con el uso de vestimentas que cubran la piel. Otros métodos que las personas pueden realizar en sus hogares son el monitoreo de recipientes o ubicaciones que pueden acumular agua, desechando aquellos que sea posible o secando y lavando aquellos que se necesario retener. A su vez, la protección de ventanas y puertas con mosquiteros, o el uso de redes sobre las camas de las personas, son estrategias de implementación directa que reducen el número de picaduras en un hogar sin la necesidad del uso de insecticidas o repelentes y tienen un tiempo de utilidad mayor.

Existen también el control de poblaciones de mosquitos mediante medio físicos o mecánicos. Un estrategia probada es la utilización de perlas de poliestireno que flotan en la superficie del agua, dificultado la ovoposición y la penetración de la superficie por las larvas para poder respirar . Estas perlas requieren pocas aplicaciones, no se degradan en el entorno y puede tener un efecto duradero en el control de especies como *C. quinquefasciatus* [24]. Otras formas de



modificar el superficie acuática es mediante la aplicación de aceites de parafina, el Liparol y las películas monomoleculares como Arosurf [25]. Con estos agentes la tensión superficial del agua se disminuye, provocando dificultades en la respiración y en la ovoposición de las hembras de los mosquitos. Aunque son efectivas en el control de mosquitos, una preocupación con estos métodos físicos es el impacto sobre la flora y fauna nativa que no son objetivo del control. Esto podría limitar la utilización de estos métodos a cuerpos de agua artificiales.

Históricamente, el control de poblaciones de mosquitos se ha realizado a gran escala con el esparcimiento de insecticidas de origen químico. Las principales categorías de los insecticidas químicos son los hidrocarburos clorinados, los organofosfatos, los carbamatos, los piretroides y los reguladores de crecimiento. El modo y blanco de acción de todos ellos son diferentes. El DDT es el hidrocarburo clorinado más conocido, y como otros hidrocarburos clorinados, es un insecticida de muy amplio espectro y con costo relativamente bajo de producción. Actúa sobre el sistema nervioso del organismo intoxicado provocando una eventual parálisis. Su poca especificidad y toxicidad más allá de los mosquitos ha llevado a que su uso este descontinuado o sea prohibido en una gran cantidad de países. Sin embargo, su utilización persiste en algunas regiones a pesar de sus efectos negativos sobre el resto de los organismos del ecosistema [26]. Los organofosfatos atacan también el sistema nervioso, siendo su modo de acción la inhibición de la colinesterasa en las sinapsis neuro-musculares. Los más conocidos y utilizados a nivel mundial son el malatión y el temephos. Ya se han detectado poblaciones de mosquitos resistentes a algunos de los compuestos de esta familia, por ejemplo en Tailandia [27]. El desarrollo de derivados estables del ácido carbámico llevó a la producción de carbamatos, que al igual que los organofosfatos, actúan inhibiendo la hidrólisis de la colinesterasa pero en un modo más reversible, y se usan como alternativa a las poblaciones resistentes a organofosfatos [23]. Los piretroides son un grupo extenso de insecticidas químicos, y también son neurotóxicos. Sin embargo, presentan actividad contra insectos benéficos como las abejas. Su uso ha llevado a la aparición de resistencia y co-resistencia con productos como el DDT. Para el combate a malaria se han utilizado redes impregnadas en piretroides pero la aparición de resistencia reduce los avances hechos en control de la enfermedad [28]. El desarrollo de los reguladores de crecimiento surge del estudio de la fisiología de los insectos y se sugiere que su blanco específico reduce los efectos sobre otras especies. Se tienen por ejemplo los inhibidores

de la síntesis de quitina y análogos de la hormona juvenil. En el estado larvario los análogos de la hormona juvenil impiden los cambios metamórficos y evitan la llegada a una etapa adulta.

Además del uso de insecticidas químicos, existen medidas de control por agentes biológicos, los cuales pueden ser desde animales hasta bacterias. El uso de peces como predador es una medida efectiva de control de larvas de mosquito. Las especies más utilizadas son *Gambusia affinis* y *Poecilia reticulata* [29]. Son peces con una alta tasa de reproducción y tolerancia a un rango amplio de condiciones ambientales. Sin embargo, la introducción de una especie nueva a un ecosistema puede afectar a la fauna nativa por lo que su utilidad permanece en cuerpos controlados de agua, como campos de cultivo o estanques artificiales. El impacto de otros vertebrados en la reducción de población de mosquitos se ha estudiado, como el caso de anfibios, murciélagos y aves. La evidencia de su efectividad aún no es contundente, en muchos casos porque los mosquitos no constituyen una fuente primordial de la dieta de estas especies o sus hábitos de actividad no se superponen. Otros organismos invertebrados que podrían funcionar como predadores de mosquitos son las hidras, gusanos planos, arañas, crustáceos y otros insectos. Son organismos voraces hacia larvas de mosquitos pero su adición en medidas integrales de control de vectores es difícil debido al costo y problemas en su producción a gran escala. En sus hábitats naturales estos organismos no se reproducen a niveles suficientemente grandes como para funcionar como una medida de abatimiento de las poblaciones de mosquitos.[29]

Recientemente se ha retomado la motivación para el control de enfermedades transmitidas por mosquitos mediante el control genético de las poblaciones. Existen dos vertientes principales: el reemplazo de la población silvestre por mosquitos genéticamente refractarios a la infección por los agentes patogénicos y la supresión de poblaciones con la introducción de alelos que reduzcan la fertilidad [30]. La primer vertiente requiere identificar algún gen o alelo que haga a una especie de mosquito resistente a la infección por un parásito o un virus, por ejemplo, mejorando la respuesta inmune. Por técnicas de ingeniería molecular este gen o alelo se introduciría en colonias de mosquito de laboratorio. Después, estos mosquitos de laboratorio serían liberados en la población silvestre. Gracias al encuentro de los machos y hembras para el apareamiento, los genes modificados serían heredados a las siguientes generaciones. Esto eventualmente haría a la población en general más resistente a la proliferación del agente

patogénico y consecuentemente su transmisión a los humanos. La desventaja de esta técnica es que se requieren muchas generaciones para obtener el efecto deseado; incluso los alelos introducidos podrían no ser transmitidos con la frecuencia deseada. Una estrategia alternativa es la permitida por los llamados "gene drives". Los "gene drives" comprenden sistemas de ingeniería genética que además de introducir un alelo deseado en el organismo también introducen una serie de enzimas o elementos genómicos que favorecen la herencia del gen deseado muy por encima de las frecuencias mendelianas esperadas por un cruce normal. Hay varios sistemas genéticos que se prestan a estas estrategias, como transposones, aunque el sistema basado en CRISPR/Cas9 es el sistema más prometedor por la rapidez y especificidad de modificación genética [31, 32]. El uso de un "gene drive" también puede ser usado para introducir alelos que produzcan infertilidad en la población de mosquitos, y la rápida diseminación por los mecanismos de herencia propios de esta estrategia podrían abatir poblaciones en tiempos cortos. Otra forma de abatimiento de población es mediante la liberación masiva de machos infértiles, normalmente irradiados, que compitan con los machos silvestres por las hembras. Esta estrategia es más efectiva con mosquitos del género *Anopheles*, donde la hembra sólo tiene un apareamiento, pero ya se han puesto a prueba por compañías privadas en Brasil ante el brote epidémico de zika [33]. Finalmente, una estrategia más que se está probando para el control de *A. aegypti* es la liberación de mosquitos modificados que portan el endosimbionte *Wolbachia*. *Wolbachia* es una bacteria endosimbionte estricta que se encuentra en un gran porcentaje de insectos. Sin embargo, *A. aegypti* no posee esta bacteria. Su introducción altera y reduce la capacidad de replicación del dengue [34]. Todas estas estrategias requieren de estricto monitoreo y pruebas de impacto ambiental, además de que se enfrentan a oposición de las comunidades a la introducción de organismos transgénicos o modificados en laboratorio. Sin embargo, prometen convertirse en una herramienta importante en el control de vectores.

El control biológico también se ha extendido a la utilización de microorganismos naturalmente patógenos de insectos; dentro de ellos los más exitosos por facilidad de producción, sencillez de manejo y efectividad son las bacterias entomopatógenas. Las dos especies más utilizadas para el control de larvas hasta el momento son *Bacillus sphaericus*, ahora conocido como *Lysinibacillus sphaericus*, y *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). La producción en gran escala de estas bacterias no requiere infraestructura demasiado especializada, y los costos de crecimiento y preparación

de formulaciones se encuentran por debajo de los insecticidas químicos y la producción de mosquitos transgénicos [29], además de tener menos regulaciones asociadas. La toxicidad de estas bacterias es altamente específica lo que reduce la necesidad de medidas de seguridad y manejo de las formulaciones utilizadas. De hecho, la toxicidad ni siquiera es similar entre diferentes géneros de mosquitos. Las especies de *Culex* y *Anopheles* son más sensibles a *L. sphaericus* que los mosquitos *Aedes*, mientras que inversamente *Aedes* es más sensible a las preparaciones de *Bt*. Los cultivos de estas bacterias pueden aplicarse en diferentes presentaciones y existen tanto productos líquidos, polvos dispersables en agua, atomizables o granulados. Hay que mencionar que la sensibilidad de las larvas de los mosquitos disminuye a medida que avanzan en su desarrollo; los adultos son insensibles a las toxinas producidas por estas bacterias. Por esta razón, un manejo integral de vectores que incorpore el uso de bacterias entomopatógenas también debe tener contemplada alguna estrategia para el control de los mosquitos adultos, o la protección personal para limitar las mordidas a las personas. Desafortunadamente, ya se han encontrado poblaciones de *Culex* resistentes a las preparaciones de *L. sphaericus* [35], más no así a *Bt*. Esto refuerza la importancia de este último como una herramienta indispensable para el control de mosquitos. A continuación detallaremos más sobre esta bacteria.

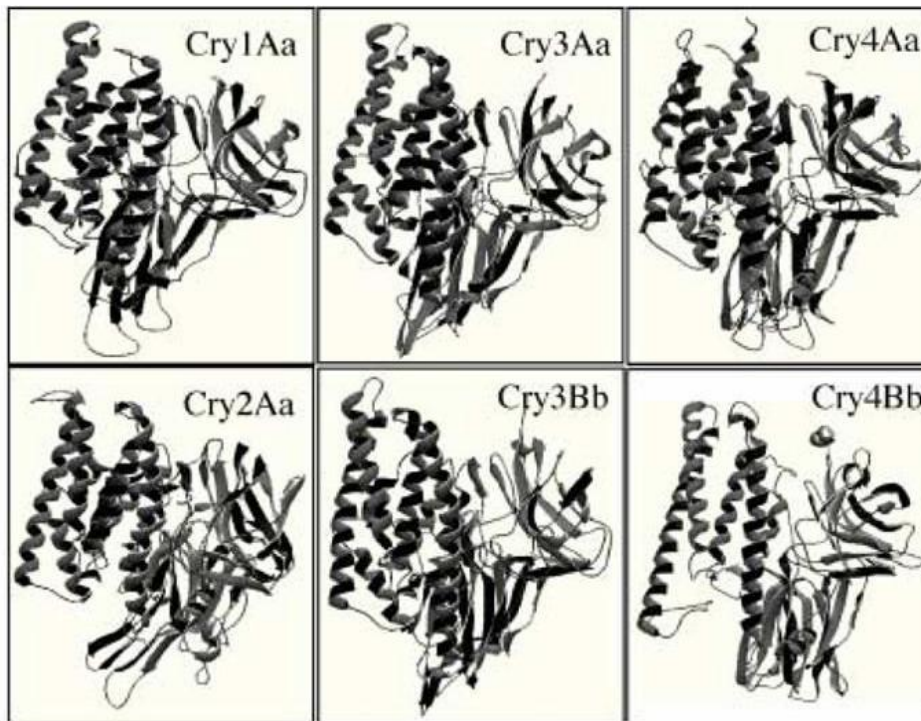
### **3.4 Las toxinas insecticidas de la bacteria *Bacillus thuringiensis***

La bacteria insecticida *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) fue descrita por primera vez a principios del siglo XX. *Bt* es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta, que se puede encontrar distribuida ampliamente en los suelos de distintos ambientes [36]. Es una bacteria de vida libre que al encontrarse en una situación de estrés, como la limitación de nutrientes, inicia un programa de diferenciación hacia espora. Durante el proceso de esporulación también se inicia la producción de proteínas que se acumulan en estructuras paraesporales. La clase mayoritaria de estas proteínas son las denominadas toxinas Cry, debido a su agregación en cuerpos cristalinos visibles en microscopio óptico, y que presentan actividad insecticida. La cepa *B. thuringiensis ssp israelensis* (*Bti*) fue aislada por primera vez en el desierto del Negev en Israel en 1976 y es la cepa con actividad en contra de mosquitos más utilizada. Existen muchas otras cepas con actividad contra mosquitos como por ejemplo *Bt medellín* ó *Bt jegathesan*. Las subespecies de *Bt* con actividad en contra de dípteros como los mosquitos producen una toxina diferente

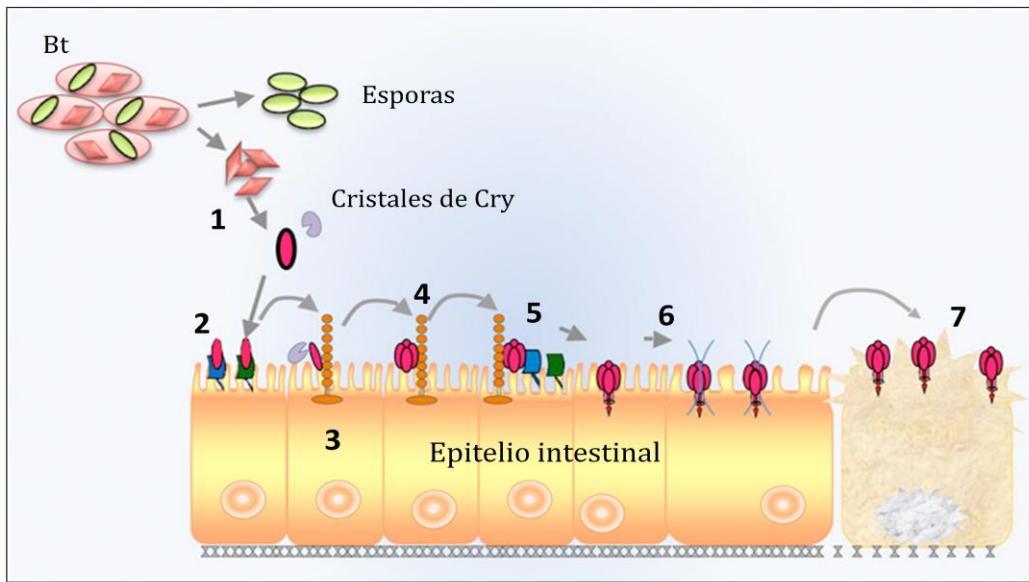
perteneciente a la familia Cyt (del inglés "cytolytic"). En particular, *Bti* produce las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa [37]. Existen preparaciones comerciales de *Bti* que se han utilizado durante décadas para el control de mosquitos en Alemania sin el surgimiento de poblaciones resistentes [38]. Esto se atribuye a la presencia de la toxina Cyt1Aa, quien puede abatir la resistencia en líneas de insectos de laboratorio expuestos por generaciones a una de las toxinas Cry [39], asimismo puede potenciar su toxicidad y la de toxinas Cry en un efecto sinérgico a través de interacciones moleculares específicas [40, 41]. Este efecto sinérgico le confiere a *Bti* una ventaja importante como agente de control biológico. Ésta es una diferencia importante con *L. sphaericus*, quien produce principalmente sólo una toxina, la toxina Bin. La presencia de múltiples toxinas con mecanismos de acción distintos reduce la probabilidad del surgimiento de rasgos resistentes simultáneos.

Las toxinas de Cry de *Bt* conforman una familia de más de 200 proteínas [42]. Una de las características importantes de las toxinas Cry es la especificidad de orden de insecto donde actúan. A pesar de ser tóxicas contra distintos órdenes de insectos y presentar diferencias importantes en su secuencia de aminoácidos, en las toxinas Cry se observa una notable conservación de su estructura tridimensional [43]. Las toxinas Cry se sintetizan como protoxinas; la forma activada de la toxina presenta tres dominios: el dominio I, conformado por un ramillete de 7  $\alpha$  hélices, y los dominios II y III, conformados por láminas  $\beta$  en conformación sándwich y prisma, respectivamente. La figura 1.3 muestra la estructura cristalográfica obtenida de diferentes toxinas Cry. Los estudios bioquímicos en diferentes insectos también muestran que las toxinas Cry comparten el tipo de proteínas que funcionan como receptores en las células de la microvellosidad intestinal, lo que indica una conservación en el mecanismo de acción aún en diferentes organismos [44]. En la literatura científica, las toxinas más estudiadas son aquellas tóxicas para lepidópteros, sobre todo en aquellos que son plagas de cultivos. Es en estas toxinas en donde se han determinado los diferentes pasos necesarios para que las toxinas Cry dañen el tejido, como se observa en la figura 1.4. En primer lugar, las larvas de los insectos susceptibles ingieren los cristales de las protoxinas, los cuáles son solubilizados a monómeros de protoxina gracias a las condiciones redox y de pH en el ambiente intestinal. Estos monómeros pueden procesarse a toxina activada gracias a las proteasas intestinales. Tanto como protoxina o toxina, las proteínas Cry se unen a receptores presentes en la membrana apical de las células columnares del intestino larvario. La toxina

activada se une con relativamente baja afinidad a proteínas de la familia de aminopeptidasas (APN) o fosfatasas alcalinas (ALP). Esta interacción se realiza en regiones discretas de los dominios II y III de las toxinas Cry, como lo son las asas expuestas del dominio II. Esta primera interacción ayuda a concentrar a la toxina en la membrana y favorece una interacción con alta afinidad a receptores del tipo caderina (CAD), que a su vez promueve un procesamiento adicional de las proteínas Cry que resulta en la remoción del extremo amino-terminal. La toxina así procesada sufre cambios estructurales que permiten la formación de una estructura oligomérica, que se une de nuevo a los receptores APN o ALP pero ahora con una afinidad mucho mayor. Esta interacción es importante para que la estructura oligomérica penetre en la membrana de la célula insertando un par de hélices del dominio I y abra un poro no selectivo que lleva a un desbalance osmótico celular y su eventual muerte [45]. El daño al tejido epitelial se ha sugerido que facilita la liberación de nutrientes para la germinación de las esporas de *Bt* así como su paso a otros tejidos del organismo, lo cual lleva a un estado de infección sistémica.



*Figura 1.3. Estructuras cristalográficas de toxinas Cry de Bt. Tomada de [43].*



**Figura 1.4. Modelo de acción de las toxinas Cry de Bt.** 1: Solubilización y activación, 2: Unión a receptores con ancla GPI, 3: unión a caderina y procesamiento  $\alpha 1$ , 4: oligomerización, 5: unión de oligómero a receptores con ancla de GPI, 6: inserción en membrana y formación de poro, 7: lisis celular. Proporcionada por Pacheco, S.

La aplicación en campo de preparaciones de *Bt* se ha hecho por medio de formulaciones de cultivos bacterianos, pero en el caso de las toxinas activas contra plagas de cultivo también se han desarrollado variedades de plantas transgénicas que expresan la toxina insecticida en todos los tejidos de la planta. De esta forma, larvas de insectos que se alimentan de raíces de los cultivos y que serían inaccesibles a la aplicación de una formulación rociada sobre la planta pueden ser controladas. La utilización de formulaciones y cultivos transgénicos de *Bt* ha propiciado la aparición de poblaciones resistentes a estas toxinas. De acuerdo al modelo de mecanismo de acción descrito anteriormente, una mutación que impida la liberación de monómeros, la correcta activación de la protoxina, o la unión a los receptores de membrana no llevarían a la formación de un poro en las células intestinales. Aunque fenotipos de todos estos tipos se han detectado, las mutaciones más frecuentes suceden en los genes de las proteínas receptoras. Las mutaciones pueden cambiar la expresión de estas proteínas, pero también introducir sustituciones en las regiones de contacto, o incluso producir proteínas truncadas. Modificaciones genéticas de este tipo se han descrito para ALP en *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, y *Spodoptera frugiperda*. Para APN se han encontrado mutaciones en *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Helicoverpa armigera* y *Trichoplusia ni*. En la proteína tipo caderina también se

han detectado modificaciones en *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera*, *Diatrea saccharalis* y *Pectiniphora gossypiella* [45].

Como puede apreciarse de los párrafos anteriores, conocemos muchos detalles de los pasos de interacción y procesamiento de las toxinas Cry. A su vez, las células tienen mecanismos que pueden detectar interacciones con proteínas de membrana y alteraciones a la integridad membranal. Los cambios celulares producidos por estos mecanismos centinelas podrían dar lugar a fenotipos de resistencia que no estén asociados a mutaciones que afecten la interacción directa de las toxinas con sus receptores. El conocimiento existente sobre respuestas a otras toxinas formadoras de poro nos ayuda a predecir el tipo de mecanismos de defensa que se podrían encontrar en insectos resistentes a toxinas Cry.

### **3.5 Respuestas a toxinas formadoras de poro**

Las proteínas Cry y Cyt de *Bt* se agrupan con otras proteínas de origen bacteriano denominadas toxinas formadoras de poro o PFTs, las cuales son del tipo  $\delta$ -endotoxina. Las PFTs se utilizan como factores de virulencia para debilitar o penetrar las células blanco de su hospedero. La perforación de la membrana aparentemente es un mecanismo de ataque muy antiguo debido a su presencia en organismos muy lejanos en el árbol de la vida, tanto en bacterias como en hongos [47], veneno de serpientes [48] e incluso como parte del sistema inmune innato del humano [49]. Las toxinas bacterianas formadoras de poro tienen un mecanismo de acción global similar al de las toxinas Cry, donde un monómero de la toxina reconoce una molécula en la membrana blanco que le permite unirse, formar una estructura oligomérica, y perforar la bicapa lipídica abriendo un túnel delimitado por una región discreta en cada una de las unidades del oligómero [50]. La perforación puede suceder en la membrana plasmática o en alguna membrana intracelular de la célula blanco. El tamaño del poro formado por el oligómero puede ser de apenas algunos nm y requerir un número pequeño de unidades, o tener un diámetro de decenas de nm por donde puede atravesar incluso proteínas completas y que involucran un número grande de monómeros. La formación del poro puede provocar la desestabilización osmótica de la célula como con las toxinas de *Bt*, pero también puede ser necesario para el escape de la bacteria de un compartimento citoplásmico o la translocación de



otro factor de virulencia al citoplasma celular, como el caso del factor edema y el factor letal de la toxina ántrax de *Bacillus anthracis*.

La forma en que las células detectan la apertura de la membrana no es claro en la mayoría de los casos. Este cambio en la integridad membranal es, sin embargo, una situación peligrosa para la célula e implica la necesidad de activar una respuesta. La célula puede iniciar procesos de muerte o supervivencia, dependiendo de varios factores como son la dosis de toxina, el tiempo de exposición y el tipo celular. Entre los mecanismos de muerte podemos contemplar la piroptosis, necrosis y apoptosis. Cada uno de estos mecanismos tiene ciertos marcadores que los permiten distinguirse. La apoptosis se caracteriza por el empaquetamiento de componentes celulares y fragmentación del ADN sin la producción de una respuesta inflamatoria. Está caracterizada por la activación de las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10. Este tipo de respuesta se observa con la enterotoxina de *Clostridium perfringens* en células CaCo-2 [51], con la aerolisina de *Aeromonas hydrophila* en linfocitos T [52], la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* en neuroblastomas [53], o la toxina hemolisina A de *Vibrio cholerae* en neutrófilos [54]. La piroptosis es mediada por la activación del caspasa-1 y tiene asociada la secreción de múltiples citocinas e interleucinas inflamatorias. Esta respuesta se ha visto en macrófagos en respuesta a estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*[55] o en respuesta al factor LT de *B. anthracis* [56]. La necrosis también produce inflamación y se ha observado en leucocitos en respuesta a la aerolisina [54]. Los estudios listados no abarcan la totalidad de literatura sobre el tema, pero ejemplifican las diversas formas en que las células pueden morir ante una PFTs.

No todas las células mueren ante la acción de las PFTs. En ciertas dosis y tiempos de exposición las células pueden iniciar procesos para librarse de la toxina y reconstituir las membranas dañadas. Uno de estos mecanismos es el "shedding" donde la célula libera proteínas de su membrana hacia el medio por medio de proteólisis, como se observa en células epiteliales ante factores hemolíticos de *B. anthracis* [57]. Las membranas de las células también pueden formar pequeñas ampollas que se desprenden como cuerpos vesiculares hacia el exterior celular, conocido como ectocitosis o "blebbing", y que al menos se ha observado para la estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes* en células HeLa [58]. Hacia el interior de la célula, un mecanismo que se ha visto involucrado en retirar membranas con toxina es un proceso de endocitosis-exocitosis. Algunas de las PFTs donde se ha reportado este fenómeno es la,

estreptolisina-O [59, 60],  $\alpha$ -toxina de *Staphylococcus aureus* [61], y Cry5B de *Bt* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* [62]. Otro mecanismo que una célula puede invocar para retirar y reciclar la membrana dañada es la autofagia. La autofagia es un proceso celular por el cual se descomponen organelos dañados o que también puede englobar patógenos en el citoplasma, sirviendo como un mecanismo de inmunidad innata. Las vesículas de doble membrana se fusionan finalmente con lisosoma para su degradación. En cuanto a PFT, se ha observado la activación de autofagia para  $\alpha$ -toxina de *S. aureus*, hemolisina de *Escherichia coli* [63], citolisina de *V. cholerae* [64] así como listerolisina-O de *L. monocytogenes* [65]. Otra forma de defensa que no está relacionada a formación de vesículas es la activación del mecanismo de supervivencia conocido como inflamosoma, mediado por NLRP3 y detectado por flujo atípico de iones potasio. NLRP3 es parte de las proteínas sensoras intracelulares del sistema inmune innato. La respuesta intracelular del inflamosoma provoca una serie de cambios celulares incluyendo la secreción de interleucinas y la activación de caspasa-1, que a su vez puede activar síntesis de lípidos en la cascada de los factores SREBP. Esto último es relevante para la reparación de membrana y se ha observado para la aerolisina [66].

En muchos de los estudios de respuesta a PFTs se ha analizado la participación de las MAP cinasas. Las MAPK son parte de un módulo conservado de respuesta celular y transducción de señales. El módulo consta de tres niveles de cinasas, empezando por las MAPKKK, que fosforilan a las MAPKK, que a su vez fosforilan a las MAPK, y que éstas entonces fosforilan una diversidad de blancos en la célula, incluyendo proteínas citoplásmicas o nucleares. Este sistema en tres niveles permite la amplificación de una señal recibida en el nivel superior [67]. Los organismos poseen un diferente número y repertorio de cinasas en los diferentes niveles que les permite integrar distintas señales y estímulos. Aunque existen motivos de unión y proteínas de andamiaje que le dan especificidad a estas cinasas, existe un cierto nivel de activación cruzada entre las diferentes cascadas de las MAPK. Las MAPK más estudiadas con relación a las PFT son ERK 1/2, JNK y p38. Por ejemplo, la vía de JNK se activa en respuesta a estreptolisina-O [68] y Cry5B [69]. ERK 1/2 es fosforilada en respuesta a antralisina-O de *B. anthracis* [57]. Por su parte, p38 es fosforilada en respuesta a las toxinas antralisina-O [57], estreptolisina-O [68],  $\alpha$ -toxina [70],  $\alpha$ -hemolisina [71], pneumolisina [53] y  $\beta$ -toxina [72]. En relación a las toxinas Cry de *B. thuringiensis*, la intoxicación por Cry5B en *C. elegans* conlleva la activación de la vía de transducción de p38 y JNK [73]. En ambos casos,

mutantes que pierden función de estas cinasas o en la cinasa que las fosforila se vuelven hipersensibles al ataque por la toxina Cry5B. La fosforilación de p38 también se ha observado en respuesta a Cry11Aa en *A. aegypti* y Cry1Ab en *Manduca sexta*; el silenciamiento de p38 también provoca hipersensibilidad [74]. En varios casos se observa que la formación de poro y flujo de iones son señales necesarias para llevar a la activación de las MAPK, ya que mutantes afectadas en formación de poro no inducen esta respuesta. JNK y p38 son translocadas al núcleo una vez que son fosforiladas. Ahí, estas MAPK tienen como blancos proteínas celulares o factores transcripcionales, que a su vez modifican el perfil de proteínas que serán sintetizadas. Entre los factores transcripcionales que son regulados por JNK destaca c-Jun, proteína que da el nombre a esta MAPK ("Janus N-terminal Kinase"), pero también ATF2, Elk1, c-Myc, NFAT2, FOXO4, STAT1, STAT3, Pax2, y varios más [75]. MAPK p38 también puede fosforilar a otros factores transcripcionales como MEDF2D, ATF1, NK- $\kappa$ B, CREB, SRF y C/EBP $\alpha$ , y compartir otros con JNK, como el caso de Elk1 [76].

Como se puede apreciar, la diversidad de mecanismos de respuesta que pueden ocurrir al interior de una célula que sufre el daño de PFT es amplia. No todas las respuestas ocurren en las mismas células al mismo tiempo. Aunque comenzamos a tener idea de aquellos procesos que podrían suceder ante la acción de las toxinas Cry, aún no tenemos suficiente información para incluir de forma concluyente algunas de estas respuestas en el modelo existente del mecanismo de acción. Para esto es necesario estudiar de manera directa ciertas vías de respuesta, así como los cambios globales por técnicas proteómicas, metabolómicas o transcriptómicas.

### **3.6 Técnicas de análisis de niveles de expresión de un gen**

Las células de un organismo modifican su metabolismo y fisiología en respuesta a una multitud de estímulos externos e internos. Las células alternan entre los genes que mantienen inactivos y aquellos que expresan ante un estímulo específico. La información que se puede vislumbrar a través del estudio de estos cambios es importante para entender el panorama general celular en un momento dado. En organismos procariontes la transcripción y traducción están acopladas. por lo que los niveles de expresión de un gen y la cantidad de proteína presentan una relación

relativamente proporcional. En organismos eucariontes puede haber mayor discrepancia debido a que existen procesos de transporte y maduración posteriores a la transcripción de un gen que pueden influir sobre la cantidad de proteína producida a partir de un ARNm. Aún así, es posible relacionar los cambios en abundancia del ARNm de un gen a su importancia y papel en un estado celular determinado.

A lo largo de los años se han desarrollado diversas técnicas para poder determinar la abundancia del ARNm de un gen en una célula. La reacción en cadena con polimerasa, o PCR, es la técnica clásica por la cual se puede determinar la presencia de una secuencia de ADN de interés. En ella, la polimerasa realiza una copia del ADN en la muestra partiendo de un par de cebadores de ADN que denominamos primers u oligonucleótidos. Al estar realizando copias de las dos hebras del ADN, en cada ciclo se duplica el número de copias de un fragmento de ADN. Después de muchos ciclos de amplificación se puede comparar la cantidad de copias acumulada entre reacciones de amplificación independientes. Este método de analizar el punto final de la reacción de amplificación tiene la desventaja de que no es cuantitativo. Hacia los ciclos finales de la reacción la duplicación se reduce, por ejemplo, debido al agotamiento de cebadores o nucleótidos. Las diferencias en cantidad inicial de ADN de reacciones de amplificación independientes podrían ser enmascaradas si se analizan en este punto de saturación; de tal forma, se estiman incorrectamente los cambios en expresión. La variante cuantitativa (qPCR) incorpora un reactivo que se intercala en el ADN de doble cadena, como SYBR-Green, que emite una señal que se mide en cada ciclo. Se puede tener un perfil del incremento en abundancia del ADN a lo largo de todos los puntos de la reacción. De esta manera se sabe en qué momento la reacción no está saturada y cuál es el rango en el que las comparaciones entre distintas muestras son más precisas. La reacción de PCR ocurre sobre ADN, por lo que para cuantificar ARNm éste primero se copia a ADN utilizando una enzima retrotranscriptasa (RT), que produce el ADN complementario (ADNc). El RT-qPCR sigue siendo una referencia para la cuantificación de ácidos nucleicos por su precisión y sensibilidad; se ha buscado estandarizar los controles y parámetros del método para incrementar reproducibilidad [77]. La comparación de abundancia de ADN se basa en la comparación del ciclo de amplificación en que la reacción supera un umbral determinado. La superación de este umbral en un ciclo más tardío implica una menor cantidad de ADN inicial en la reacción, y que se atribuye una menor cantidad de ARNm en la muestra que dio origen al ADN utilizado en la

reacción. La cuantificación se puede hacer normalizando contra uno o varios genes cuya expresión es constante, o contra una curva de concentraciones conocidas de ADN.

Una limitante del RT-qPCR es que es necesario diseñar y evaluar oligonucleótidos cebadores para cada gen de interés. Esto es viable cuando se analiza un número reducido de genes, pero para analizar los cambios de expresión en todos los genes de un organismo esto se vuelve inviable en tiempo y costo de los reactivos [78]. El estudio global simultáneo de niveles de expresión de genes se instauró en gran medida con los microarreglos de ADN. En ellos, miles de cadenas de ADN complementarias a las secuencias de los genes se sintetizan y fijan a un chip. Al ADNc de cada muestra de interés se marca con fluoróforos. A estas muestras se les permite interactuar con las cadenas fijadas al chip y se deja que se hibriden con su complemento. La intensidad de la señal fluorescente proveniente desde las secuencias fijadas al chip se asume es un reflejo de las cantidad de copias de ADNc de un gen en la muestra analizada y por lo tanto una medida del ARNm en la muestra original. Para todos los genes de un organismo, los niveles de abundancia relativa entre diferentes condiciones se pueden obtener comparando la intensidad de las señales fluorescentes generadas al interactuar con el chip. Para el análisis y comparaciones de señales de los microarreglos se desarrollaron múltiples herramientas bioinformáticas y protocolos.

Por muchos años el uso de microarreglos fue la técnica preferida para determinar la expresión relativa global de los genes de un organismo. Sin embargo, hay algunas limitantes que hacen que su uso no sea aplicable a todos los experimentos. Una limitante es que es necesario tener conocimiento de las secuencias que se sintetizarán y fijarán al chip y que servirán de ancla para el ADNc de las muestras, cuyo diseño puede sesgar o limitar la información recuperable. En esencia, sólo se puede obtener información sobre las secuencias seleccionadas previamente. En organismos modelo existen bases de datos e incluso chips comerciales que facilitan su utilización. Para organismos no modelo, donde no se tiene secuencia del genoma, y en algunos casos ni siquiera bases de datos de algunos genes expresados, no es viable la síntesis de un microarreglo. Otro inconveniente es que la abundancia se estima a partir de la señal del fluoróforo. Los dispositivos que miden las señales fluorescentes tienen un rango de sensibilidad por debajo del cual no se puede detectar. También existe un nivel de saturación de los sensores de los dispositivos. Todas las diferencias en intensidad de señal por encima de esa

saturación se perderán. Estos umbrales, conocidos como el rango dinámico, son un obstáculo si existen grandes variaciones en la señal entre diferentes muestras o diferentes arreglos. Una limitante adicional es que para integrar la información de muchas comparaciones frecuentemente se necesitan diseños experimentales complejos y una serie de controles internos en cada experimento de hibridación [79].

Las tecnologías de secuenciación masiva se desarrollaron con el objetivo de acelerar y abaratar la obtención de información genómica de los organismos. Con estas tecnologías se evitan varios pasos complicados de la secuenciación de Sanger, en especial la clonación de ADN en plásmidos. En vez de eso, en paralelo se obtienen las secuencias de millones de fragmentos de ADN generados directamente desde la muestra. Cada plataforma tiene rendimientos, químicas de procesos, y longitudes de secuencias distintos. Por ejemplo, la pirosecuenciación mediante dispositivos Roche 454 fue la primera en producir secuencias largas, las cuales facilitan la reconstrucción de genomas y transcritos largos, pero con la desventaja de un costo de preparación de muestras alto y un rendimiento menor que otras tecnologías [80]. La plataforma de Illumina se basa en la unión a los fragmentos de ADN de adaptadores que permiten fijarlos en un chip con secuencias complementarias a los adaptadores. Sobre el chip se multiplica cada fragmento fijado y después se secuencia mediante la integración progresiva de nucleótidos terminadores reversibles marcados. La señal obtenida de estos nucleótidos permite al aparato determinar en cada punto del chip qué nucleótido fue incorporado y al final del proceso tener una secuencia para cada fragmento en el chip. La plataforma de Illumina permite la generación de un número mucho más alto de secuencias individuales en un tiempo relativamente corto, pero con la desventaja de que éstas son en general más cortas y esto aumenta la complejidad para reconstruir la región del genoma o determinar con precisión de qué transcrito provienen. La tecnología de secuenciación basada en cambios de pH, introducida por la plataforma IonTorrent, reduce el tiempo de corrida con respecto a otras plataformas. Las secuencias son en promedio más largas que Illumina, pero con menor rendimiento en número de secuencias [80]. Se ha innovado con metodologías de secuenciación directa de ADN que eliminan los pasos de amplificación por PCR y los sesgos que este proceso puede introducir en la secuenciación. Las plataformas de PacBio y Nanopore corresponden a esta nueva generación pero aún no tienen la penetración de la generación previa, además que aún presentan una mayor tasa de errores en secuenciación [81]. Para el estudio del transcriptoma de un organismo

como *A. aegypti*, para el cual existe un genoma de referencia la plataforma de Illumina presenta un relación costo-beneficio adecuada, ya que el gran número de secuencias se pueden asignar con mayor confianza a un gen específico aún con una menor longitud de lecturas. El número de secuencias da mayor profundidad y mejor estimación de los niveles de expresión, además que permite identificar genes con bajos niveles de expresión.

El avance de las tecnologías de secuenciación masiva de ADN ha permitido implementar experimentos que subsanan las limitantes mencionadas de los microarreglos. Para determinar el nivel de abundancia de transcrito se considera el número de fragmentos secuenciados correspondientes a ese transcrito y en principio al ser un dato digital no tiene teóricamente un nivel de saturación. No es necesario generar sondas específicas dirigidas a los ARNm ya que las secuencias se obtienen directamente de la muestra, sin un conocimiento previo de secuencias. Tampoco se requiere contar con un genoma de referencia. Finalmente, las comparaciones entre diferentes condiciones se realizan todas por métodos bioinformáticos, por lo que se pueden incorporar más réplicas y condiciones a medida que se requiera sin necesidad de rehacer comparaciones experimentales.

El análisis de las secuencias generadas por cualquiera de estas tecnologías para estimar el nivel de expresión de un gen implica el uso de una batería de herramientas bioinformáticas. Se requiere poder alinear y asignar las secuencias a un transcrito en particular. También es necesario poder estimar el nivel de abundancia que representa el número de secuencias asignadas a un gen. Para eso se requiere determinar parámetros de normalización entre distintos genes y diferentes muestras secuenciadas. Un siguiente paso bioinformático es la comparación de la abundancia de los ARNm entre diferentes condiciones para establecer niveles de expresión relativas. Se han desarrollado decenas de programas y paquetes para cada uno de estos pasos, incorporando distintos algoritmos y modelos estadísticos. El área se encuentra en evolución constante, aunque algunos modelos se han dejado de utilizar. Por ejemplo, inicialmente se utilizó una distribución de Poisson para modelar la variación en niveles de expresión de los genes. Sin embargo, se ha determinado que esta aproximación subestima la dispersión que se ha observado en los datos; paquetes de análisis como DESeq2 y EdgeR utilizan un modelo binomial negativo que se ha visto se aproxima mejor a la información experimental [82]. A medida que se acumulan datos de transcriptómica de muchos

organismos y la verificación por otras metodologías de los niveles de expresión predichos por estos algoritmos será más fácil evaluar la sensibilidad y precisión de cada herramienta.

Las técnicas descritas anteriormente se han utilizado para indagar sobre los cambios transcripcionales en diferentes invertebrados ante la intoxicación con toxinas Cry [69, 83-85], A excepción de *C. elegans*, los organismos estudiados no tienen genoma secuenciado y la información genómica de genes es escasa. Algunos de estos esfuerzos para identificar genes con expresión diferencial se han basado en el método de hibridación diferencial substractiva [85-87] aunque las limitaciones mismas de la técnica acotaron la información extraída. Es hasta la adopción de técnicas de secuenciación masiva que han empezado a surgir estudios de amplia envergadura en este campo. Con respecto a *A. aegypti* existen diversos estudios que utilizan la secuenciación masiva de ARNm que investigaron, por ejemplo, los cambios durante el desarrollo de larva a adulto [88], en etapas posteriores a la ingesta de sangre por las hembras adultas [89], o en respuesta a infección por dengue [90] o ante la acción de insecticidas químicos [91]. Sólo recientemente, incluyendo este trabajo, que se ha investigado la respuesta de este mosquito durante una intoxicación con toxinas de *Bt* [92-94].

En la presentación de los resultados y la discusión de este trabajo se comentarán los resultados de los cambios transcripcionales observados en otros organismos ante la intoxicación con proteínas Cry.

## 4. Hipótesis

Las células del epitelio intestinal de *A. aegypti* activan mecanismos de defensa ante el daño membranal ocasionado por la toxina Cry11Aa. Estos mecanismos incluyen cambios en los niveles de transcripción de diferentes genes asociados a procesos que permiten la reparación y protección de las células, los cuales incluyen una activación de cascadas proteolíticas, compensación de la disrupción del gradiente iónico celular, así como síntesis y restitución membranal. La regulación de estos procesos celulares involucra vías de señalización de las MAP cinasas pero también de otras vías aún no identificadas.



## 5. Objetivos y metas

### 5.1 Objetivo general

Analizar los cambios transcripcionales globales del intestino de *A. aegypti* ante la intoxicación por Cry11Aa e identificar genes de interés para evaluar su papel en la respuesta a la toxina.

### 5.2 Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general se plantearon tres metas específicas:

1. Obtener perfiles de expresión transcriptómica de larvas de *A. aegypti* ante la intoxicación de Cry11Aa y determinar niveles de expresión diferencial.
2. Identificar procesos metabólicos relevantes en la respuesta a la intoxicación y buscar genes con dinámicas compartidas durante la cinética de intoxicación con Cry11Aa.
3. Validar los datos de expresión obtenidos por medio de análisis bioinformático mediante técnicas experimentales.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Crecimiento de *Aedes aegypti*

Las larvas de *A. aegypti* fueron crecidas en agua complementada con dieta de levadura y alimento de gato triturado en un cuarto con temperatura controlada a 27 °C y 70 % de humedad controlada, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. El agua se cambió cada 2-3 días, o después de cada muda. Los adultos de *A. aegypti* fueron mantenidos en jaulas y alimentados con algodón remojado en néctar *ad libitum*. Las hembras adultas fueron alimentadas con sangre de res tibia a través de una membrana parafilm durante 60 min, dos veces por semana.

### 6.2 Producción y purificación de cristales de Cry11Aa

Se utilizaron las siguientes cepas de *Bt* para la producción de toxinas Cry11Aa: Bt CG6 con el plásmido pWF26 para Cry11Aa silvestre y Bt 4Q7 con el plásmido pCG6-E97A para Cry11Aa E97A y pCG6-142 para Cry11Aa V142D.

Las cepas de *Bt* fueron activada en cajas de medio LB con 25 µg/ml de Eritromicina e incubada 1 día a 37 °C. Después se estrió en cajas de medio HCT con 25 µg/ml de Eritromicina e incubada a 30 °C hasta que el cultivo alcanzara cerca de un 90% de esporulación, comprobado mediante observación al microscopio. Para las proteínas mutantes de Cry11Aa, los inóculos fueron primero calentados a 80% durante 10 min. Las cepas calentadas fueron estriadas en cajas HCT con 25 µg/ml de Eritromicina para sincronizar cultivo, después de lo cual se inocularon cajas de producción. Para todas las toxinas Cry11Aa se estriaron cajas de medio HCT 25 µg/ml y se incubaron durante 3 días a 30 °C o hasta que el cultivo estuviera 90% esporulado.

Los cultivos de *Bt* se recuperaron en 30 ml de solución de lavado: 0.3 M NaCl/ 0.01 M EDTA pH 8. Para deshacer esporangios remanentes, se sonicó el cultivo con 3 pulsos de 1 minuto

con 1 minuto en hielo. Después se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados de la siguiente forma: La pastilla se resuspendió en 30 ml de solución de lavado y se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm a 4 °C. Después se realizaron otros tres lavados ahora ocupando H<sub>2</sub>O bidestilada con 1 mM de PMSF. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 5 ml de solución TTN: 20 mM Tris pH 7.2, 300 mM NaCl, 0.1% tritón x-100, y se mantuvo a 4 °C hasta su purificación.

Los cristales lavados se purificaron mediante gradiente discontinuo de sacarosa de la siguiente forma. Se prepararon soluciones de gradiente: 84 % (33.6 g sacarosa + 12 ml H<sub>2</sub>O), 79 % (31.6 g sacarosa + 14 ml H<sub>2</sub>O), 72 % (28.8 g sacarosa + 17 ml H<sub>2</sub>O) y 68 % (26.8 g sacarosa + 19 ml H<sub>2</sub>O). Se calentaron soluciones para disolver sacarosa. Una vez frías se complementaron para obtener las siguientes concentraciones: 0.01 % Tritón x-100, 50 mM Tris-HCl pH 8, y 10 mM NaCl en el volumen final de 40 ml. Se repartieron en 6 tubos de centrifuga, en cada uno primero 6 ml de solución al 84 %, después 6 ml 79 %, después 6 ml 72 % y finalmente 6 ml al 68 %. Se sonicaron cristales de Cry11Aa con 3 pulsos de 1 min con descanso de 1 min en hielo y se llevó la preparación a 12 ml con solución TTN. Se repartieron 2 ml de cristales lavados por tubo de gradiente y se equilibraron tubos con solución TTN. Se centrifugó 30 minutos a 23 000 rpm a 15 °C, con aceleración y freno lentos. Se separaron las fases 1 y 2 de cristales en tubos de centrifuga separados, descartando fase superior transparente. Para lavar la sacarosa, se llevaron fracciones a 30 ml con H<sub>2</sub>O MiliQ 0.01% tritón x-100 y se centrifugó 10 min a 10,000 rpm, 4 °C. Este lavado se repitió 3 veces. Para finalizar, se resuspendieron las pastillas en aproximadamente 1.5 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 8.0, PMSF 1 mM.

### **6.3 Determinación de LC<sub>50</sub> de Cry11Aa**

Los cristales purificados de Cry11Aa y sus mutantes fueron cuantificados por método de Bradford utilizando una curva estándar de concentraciones de BSA como referencia. Los ensayos de toxicidad se realizaron en vasos con 100 ml de agua donde se colocaron 10 larvas de 4to instar de *A. aegypti*. En un tubo eppendorf se prepararon las dosis de cristales de toxina en 1 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ y se sonicaron 30 segundos. Después se retiró 1 ml de los vasos con larvas y se agregó el ml preparado con la dosis deseada. Para la curva dosis respuesta de Cry11Aa silvestre se utilizaron 8 dosis por triplicado abarcando de 50 ng/ml hasta 3000 ng/ml.

Se contabilizaron las larvas muertas a las 24 h. La concentración letal media ( $LC_{50}$ ) se determinó por análisis de ProBit a través del Software POLO-Plus (LeOra Software).

#### **6.4 Curvas de intoxicación de *A. aegypti* con Cry11Aa y disección**

Para las curvas de intoxicación se utilizó una dosis  $LC_{50}$  de cristales purificados de Cry11Aa. Todas las dosis administradas a las larvas de 4to instar de *A. aegypti* se prepararon de manera conjunta para reducir variación de concentración entre vasos, y se realizó como las preparaciones para determinación de  $LC_{50}$ . Cada tiempo de la curva de intoxicación se efectuó en 100 ml de  $H_2O$  con 10 larvas por triplicado. Para tener mayor precisión de tiempo de exposición a la toxina, la administración de dosis a los vasos del triplicado se realizó de forma escalonada contemplando el tiempo de procesamiento de las larvas del vaso anterior. Cada réplica experimental de la curva se inició en el mismo horario. Se diseccionaron larvas al inicio del experimento, así como a las 3, 6 y 9 h de exposición a Cry11Aa. En la disección se retiró cabeza y segmentos terminales junto con el sifón. Se extrajo intestino y caeca y se separó de la cutícula. Se retiró el alimento del interior del intestinos y se eliminaron los túbulos de Malpighian asociados al extremo posterior del intestino. Los intestinos diseccionados se enjuagaron brevemente y depositaron en la solución correspondiente dependiendo si se aislaría ARN o proteína total. Para ARN se utilizaron 250  $\mu$ l RNAlater (Qiagen) por cada triplicado y para proteína total cada 50 intestinos se depositaron en 100  $\mu$ l de buffer de rehidratación (Urea 7 M, Thiourea 2 M, CHAPS 4%, ditriitol 40 mM, 0.5% pharmalyte) complementado con inhibidor de proteasas (Complete, Roche Diagnostics). Los intestinos diseccionados se almacenaron a  $-70$  °C hasta su procesamiento.

#### **6.5 Extracción de proteína intestinal de *A. aegypti* y Western blot**

Los intestinos diseccionados para extraer proteína fueron procesados con un homogenizador motorizado (Sigma-Aldrich Z359971.1EA) en hielo y solubilizados en el buffer de rehidratación utilizado en la disección. Los lisados celulares fueron cuantificados mediante el método de Bradford utilizando BSA como referencia. Para cada muestra, 10  $\mu$ g de proteína total fueron separados mediante SDS-PAGE en un gel al 10%. Para western blot, las proteínas fueron transferidas mediante electroforesis a una membrana de nitrocelulosa.

Para detectar la proteína JNK, primero la membrana fue bloqueada durante 1 h en agitación con en PBS con 5% Tween-20. Después se lavó brevemente dos veces con PBS-Tween 0.1% . Se agregó el anticuerpo policlonal anti-JNK ( 1/5,000; JNK2 N-18: sc-827 Santacruz Biotech. Inc) durante 1 h en PBS-Tween 20 1%. Se lavó la membrana como anteriormente. Para visualización se incubó durante 1 h con anticuerpo secundario (anti IgG ratón producido en cabra) acoplado a peroxidasa de rábano (Amersham, 1/10000) seguido del sustrato Super Signal chemiluminiscence Luminol (Pierce). Las señal fue capturada en una placa de papel fotográfico, fijada y revelada.

## **6.6 Extracción y purificación de ARN total**

Para extraer ARN total de los intestinos, primero se retiró por completo la solución RNAlater y se agregaron 600  $\mu$ l de Trizol (Ambion, Life Technologies). Después se homogenizaron los intestinos mediante el paso por una jeringa 27G. El homogenado fue centrifugado durante 10 min a 13000 g a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se procedió de acuerdo a las instrucciones del proveedor, ajustando volúmenes para 600  $\mu$ l de reactivo. La pastilla final fue lavada con 600  $\mu$ l de etanol al 70% en H<sub>2</sub>O- DEPC y se centrifugó por 5 min a 7800 g, a 4 °C. Se retiró sobrenadante y se secó pastilla. Se resuspendió en 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC y se cuantificó mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para eliminar posible contaminación de ADN genómico, el ARN total fue tratado con DNAsa I (Thermo Scientific) utilizando 1 unidad de enzima por cada 10  $\mu$ g de ARN. Se incubó 30 min a 37 °C. Para inactivar enzima se adicionó 20 mM de EDTA a la reacción y se incubó 5 min a 65 °C. Las reacciones se llevaron a 100  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O-DEPC y se limpió la reacción utilizando las columnas RNeasy (Qiagen) de acuerdo al protocolo. Para mayor recuperación de ARN total, las muestras se eluyeron una primera vez con 20  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O-DEPC y en una segunda centrifugación de la columna con 15  $\mu$ l H<sub>2</sub>O-DEPC. El ARN total eluido se cuantificó por Nanodrop 2000.

La integridad de el ARN total se verificó mediante geles de agarosa al 1% con tiocianato de guanidino y en Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

## 6.7 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN total se utilizó el kit de Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Brevemente, una cantidad determinada de ARN total se llevó a 8  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O-DEPC. Se adicionaron 4  $\mu$ l de dNTPs 10X (Thermo Scientific) y 1  $\mu$ l de Oligo dT 50  $\mu$ M. Se incubó por 5 min a 65 °C y luego 1 min en hielo. Se agregó 4  $\mu$ l de Buffer FS, 1  $\mu$ l de DTT 1M, 1  $\mu$ l de inhibidor RNaseOut (Invitrogen) y 1  $\mu$ l de Superscript III. Se mezcló e incubó 1 h a 50 °C, seguido de una incubación de 15 min a 70 °C. Cuando se sintetizaron varios ADNc al mismo tiempo, se mezclaron reactivos para todas las reacciones primero, añadiendo 5  $\mu$ l de Oligo dT/dNTPs al ARN total y después 7  $\mu$ l de mezcla con Superscript III.

## 6.8 Diseño y purificación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este proyecto fueron diseñados utilizando el software Oligo 7 (Molecular Biology Insights Inc.) Se buscó que los fragmentos amplificados para RT-qPCR fueran de entre 100 y 200 pares de bases (pb), que se tuviera una T<sub>m</sub> de PCR cercana a los 60 °C. Los oligonucleótidos se buscó que fueran entre 19 y 22 nts, idealmente con un contenido de GC del 50%, así como ausencia de estructuras secundarias y dímeros estables, y una diferencia de T<sub>m</sub> menor a 2 °C entre los oligonucleótidos de la pareja. Para reducir posibilidad de amplificación de blancos adicionales, para cada pareja se hicieron búsquedas de homología por BLAST en la base de datos Nr y se descartaron si ambos coincidían con un gen diferente al blanco.

Algunos oligonucleótidos fueron purificados mediante geles de acrilamida. Se prepararon geles SDS-PAGE de 15% acrilamida y 7M Urea de 12 cm de largo y 1.5 mm de grosor. Las muestras de oligonucleótidos se cargaron con buffer de carga 10X y se separaron a 350 V en buffer TBE hasta que el frente de corrida quedara a 0.5 cm del borde inferior del gel. Las bandas de oligonucleótidos se visualizaron con luz UV de 254 nm y se cortaron con bisturí. Para eluir oligonucleótidos, las rebanadas de acrilamida fueron puestas en 1 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ, agitando durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, se transfirió sobrenadante a un tubo limpio y se

redujo volumen mediante Savant hasta llegar a aproximadamente 200  $\mu$ l. Se añadió 1 ml de butanol y se agitó en vórtex durante 30 segundos. Se centrifugó por 3 min a 14 000 rpm. Se retiró la fase superior y agregó 1 ml de butanol, repitiendo proceso. Después se agregó 1 ml de etanol absoluto y se centrifugó durante 3 min. Se decantó sobrenadante y se secó pastilla por Savant por 5 min. El pellet se resuspendió en H<sub>2</sub>O MiliQ y se cuantificó por Nanodrop.

## **6.9 Evaluación de eficiencia de amplificación de oligonucleótidos**

La eficiencia de amplificación para cada pareja de oligonucleótidos se realizó con el equipo Eco (Illumina). Se prepararon diluciones seriadas de ADNc en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas, así como un control sin ADNc. Para cada pareja a evaluar se preparó una mezcla de 0.3  $\mu$ l de oligo Fwd 10  $\mu$ M, 0.3  $\mu$ l oligo Rev 10  $\mu$ M, 10  $\mu$ l de reactivo SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) y 8.4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas por cada pozo donde se evaluaría el gen. En una placa de 48 pozos se repartió la mezcla de oligos/SYBR Green y se añadió 1  $\mu$ l de ADNc correspondiente. Cada ensayo se realizó por triplicado. La señal de cada reacción se normalizó con ROX. Los parámetros del programa de dispositivo RT-qPCR fueron:

- 10 min a 95 °C, activación polimerasa
- 40 ciclos de 30 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C, capturando señal al final del ciclo
- Curva de desnaturalización de ADN, con captura continua de señal
- 15 seg a 95 °C

La eficiencia de las parejas de oligonucleótidos se obtuvo mediante el programa EcoStudy (Illumina), realizando una regresión lineal de los C<sub>q</sub> de cada dilución. Se consideró buena la curva con una R<sup>2</sup> mayor a 0.985 y con desviación estándar de triplicados menor a 0.1 .

## **6.10 Determinación de expresión relativa por RT-qPCR**

En los ensayos de expresión relativa de los diferentes genes se utilizaron diluciones 1:10 v/v de ADNc:H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Las preparaciones de SYBR Green se realizaron como aquellas de las curvas de eficiencia. En placas de 96 pozos se añadieron 19  $\mu$ l de mezcla de reactivo y 1

μl de ADNc 1:10. Las placas se utilizaron en un dispositivo Light Cycler 480 (Roche), cada ensayo por triplicado, con los siguientes parámetros de operación:

- Calentamiento: 10 min a 95 °C, con calentamiento de 3 °C por seg
- Ciclos: 40 repeticiones de 30 seg a 95 °C con calentamiento de 3 °C por seg y 1 min de 60 °C con calentamiento de 2.2 °C por seg, y captura de señal a final de ciclo.
- Desnaturalización: Calentamiento hasta 95 °C con calentamiento de 0.11 °C por seg con adquisición continua de señal
- Enfriamiento: Hasta 40 °C en 30 segundos.

Los valores de amplificación se analizaron en el software del dispositivo Light Cycler 480 (Roche). Se utilizó como gen de referencia al que codifica para la proteína ribosomal S3, como condición de referencia el inicio de la curva de intoxicación, y se normalizó señal mediante ROX. Los valores de expresión relativa se obtuvieron con el método  $\Delta\Delta C_q$  [95] con la segunda derivada, incluyendo la corrección de la eficiencia de amplificación determinada para cada pareja de oligonucleótidos.

### **6.11 Secuenciación de ARNm y verificación de calidad**

A partir de 2 μg de ARN total se preparó una biblioteca de secuenciación de ARNm utilizando el kit TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina), utilizando los protocolos del proveedor. De forma general, los ARNm fueron capturados utilizando perlas con poli-T, y a partir de ellos se sintetizó ADNc. El ADNc fue fragmentado y se retuvieron las secuencias de ~300 pb. Se ligaron adaptadores para unión a los chips de Illumina.

Las bibliotecas de ARNm se secuenciaron mediante la plataforma Illumina a través Unidad de Secuenciación Masiva y Bioinformática en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en equipos Genome Analyzer IIx y HiSeq 2000 (en formato multiplex), en formato pareado y con una longitud de 72 y 101 pb (respectivamente). La calidad de las secuencias obtenidas fue determinada con la herramienta FastQC (Brabraham Institute).



## 6.12 Alineamiento de secuencias y conteo por unidad transcripcional

Las lecturas obtenidas de la secuenciación de ARNm de *A. aegypti* se alinearon con el transcriptoma o genoma depositado en la base de datos Vectorbase [96] en su versión 3.2. El alineamiento se realizó en el clúster de cómputo del Instituto de Biotecnología UNAM, utilizando la herramienta Tophat 2 v 2.0.12 [97]. Para esto, primero se crearon índices con los archivos de genoma o transcriptoma de *A. aegypti*.

- Para genoma: `bowtie2-build [FASTA de genoma] [nombre índice genoma]`
- Para transcriptoma: `tophat -G [archivo GTF de anotación de A. aegypti] --transcriptome-index=[directorio de índice/nombre de índice] [nombre índice genoma]`

Una vez que se tuvo el índice, se corrió el siguiente comando para cada muestra

- Para alineamiento con genoma: `tophat -N 2 -p 12 -r 150 -o [directorio de salida] --mate-std-dev 50 [directorio índice/nombre de índice] [lecturas extremo 1] [lecturas extremo 2]`
- Para alineamiento con transcriptoma: `tophat -N 2 -p 12 -r 150 -o [directorio de salida] -T --mate-std-dev 50 --transcriptome-index=[directorio de índice/nombre índice] [directorio índice genoma/nombre índice genoma] [lecturas extremo 1] [lecturas extremo 2]`

Donde N es el número de errores permitidos en la semilla de alineamiento con el genoma referencia (ya que la línea secuenciada, Liverpool, es diferente a la utilizada en el laboratorio), p es el número de procesos paralelos utilizados por el alineador, r es el tamaño esperado de pares de bases entre las lecturas secuenciadas, y --mate-std-dev la variación esperada de ese número de bases. El parámetro T indica al programa ejecutarse en modo de alineamiento a transcriptoma

En el caso de las lecturas de 101 pares de bases, éstas fueron recortadas a 72 pb antes de alinear, eliminando las primeras 9 bases y las últimas 20, que mostraban menor calidad que las

72 intermedias. Se utilizó el programa FastX-Trimmer del paquete FastX-ToolKit 0.0.13.1 (Hannon Lab).

El número de lecturas alineadas a cada gen se obtuvo utilizando la herramienta HSeq-Count v 0.5.4p5 [98]. Primero, el archivo GTF de *A. aegypti* debió ser editado para remover las líneas con anotación de "contig" para que el programa corriera sin problemas. Para convertir los archivos de alineamiento en los necesarios para el programa se utilizaron comandos de samtools[99].

- Para ordenar: `samtools -sort -n accepted_hits-[nombre alineamiento].bam sorted`
- Para contar: `samtools view sorted.bam | htseq-count -m intersection-nonempty -s no -t gene -i gene_id - [directorio archivo GTF modificado de A. aegypti] > [archivo de salida]`

El modo "intersection-nonempty" permite asignar una lectura a un gen a menos que se encuentre contenida por completo en dos genes sobrelapados. Dado que nuestra secuenciación no retuvo información de hebra de origen, se utilizó -s no. Se asignaron lecturas por unidad de gen con identificador único.

### 6.13 Determinación de expresión diferencial y obtención de genes comunes

Los resultados de lecturas por gen se unieron en una única tabla de cuentas y se creó un archivo con información de réplica de origen, hora y formato de secuenciación de las 20 muestras. Con estos dos archivos se procedió a utilizar dos paquetes EdgeR v 3.6.8 [100] y DESeq2 v 1.4.5 [101] de Bioconductor. En cada caso se escribió un programa ejecución en R: `deseq.R` y `edgeR.R`. En el script se ejecutan los siguientes pasos descritos por los manuales de cada paquete

- cargar los datos de la tabla de conteos y la información de muestras
- normalización de cuentas por muestra,
- estimación de dispersión de los niveles de expresión
- evaluación comparativa pareada con muestras de 0 h de intoxicación

- recuperar los genes con valor estadístico significativo

Se obtuvieron listas de genes y sus valores de expresión y estadísticos para comparaciones de 0 vs 3, 0 vs 6, 0 vs 9 y 0 vs 12 h de intoxicación con Cry11Aa. Estas listas también se separaron en conjuntos de genes con valores de expresión  $\log_2$  negativos (reprimidos) y positivos (inducidos). Los scripts están escritos para poder ejecutar las funciones necesarias si se operan los programas en modo básico o en modo de modelo lineal general. En este último se considera la información de réplica de origen y tiempo de exposición a Cry11Aa al ejecutar la función de creación de modelo estadístico respectiva a cada uno de los paquetes.

El script `exp-merge.R` se utilizó para determinar los genes compartidos entre DESeq2 y EdgeR para estos tres tipos de lista, y al mismo tiempo consultar la base de datos Vectorbase para recuperar información de descripción de los genes, si se tiene. El script requiere recibir las dos tablas de genes y determina la intersección de una columna designada `gene_id` para encontrar genes comunes. También requiere un nombre de archivo de salida para verter la información común y aquella consultada en la base de datos.

#### 6.14 Enriquecimiento de categorías de anotación GO

Se obtuvieron las anotaciones de términos Gene Ontology (GO) de todos los genes de *A. aegypti* para los dominios de "biological process" y "molecular function" desde la base de datos Vectorbase. Con el script `GO_trans.pl`, estas listas de anotaciones fueron formateadas para que pudieran ser utilizadas por el paquete TopGO v 2.16.0 de Bioconductor [102]. Se escribió un script `GOenrich.R` que utiliza las anotaciones GO y una lista de genes de interés para evaluar el enriquecimiento de términos GO en un conjunto de genes en comparación a la anotación global. Se utilizó el modo "weight" de TopGO [103] para analizar la jerarquía de términos desde aquellos más particulares y obtener resultados más informativos. Adicionalmente, se incluyó en la función "new" de TopGO el parámetro `nodeSize=5` para ignorar aquellos términos con menos de 5 genes asociados a esa anotación. Esto se hizo para reducir el número de falsos positivos asociados a categorías poco estudiadas y donde un sólo gen con esa anotación se marcaría como significativo estadísticamente. El script recupera los primeros 300

términos, y posteriormente éstos fueron filtrados para obtener sólo aquellos con p-value menor 0.1.

### **6.15 "Clustering" de genes**

Con DESeq2 también se obtuvo la matriz de varianza estabilizada a partir de los datos de expresión de todas las muestras utilizando las funciones `varianceStabilizingTransformation( [matriz de valores de expresión] )` y `assay( [arreglo estabilizado] )`. Esta tabla fue reducida para incluir sólo aquellos genes que fueron determinados como diferencialmente expresados en al menos un tiempo de la curva de intoxicación y que pertenecieran a los genes comunes entre DESeq2 y EdgeR. Los datos para cada gen en cada uno de los cinco tiempos de la curva fueron resumidos con la media de los 4 datos por condición.

Para obtener grupos de genes con perfiles de expresión similares se utilizó el programa Cluster 3.0 (Stanford University). Para la generación del árbol jerárquico se usaron los siguientes parámetros: en cada gen se centraron los valores de acuerdo a su media, como métrica de similitud se utilizó la distancia euclidiana, y se utilizó el método de vínculo promedio ("average linkage"). El programa Java Treeview v 1.1.6r4 [104] se utilizó para visualizar los grupos de genes, así como para extraer los identificadores de genes por grupo.

### **6.16 Búsqueda de dominios funcionales y homología**

Los identificadores de dominios proteicos Uniprot fueron obtenidos de Vectorbase para todos los genes sin anotación de términos GO para la ontología "Biological Process". Por medio de un script en Perl se obtuvo la frecuencia de detección y percentil para cada uno de esos dominios entre los genes con al menos un dominio identificado. Se consideraron relevantes aquellos dominios ubicados en el percentil 90 o superior.

Con aquellos genes para quienes no se identificó algún dominio funcional Uniprot se obtuvo la secuencia de aminoácidos desde Vectorbase. Con estas secuencias se realizó un para cada una consulta pBLAST con la base de datos Nr. Aquellos alineamientos que cubrieron más del 60%

de la proteína, que tuvieron un alto grado de identidad y cuyo E-value fuera menor a  $10^{-8}$  fueron determinados como homólogos de interés.

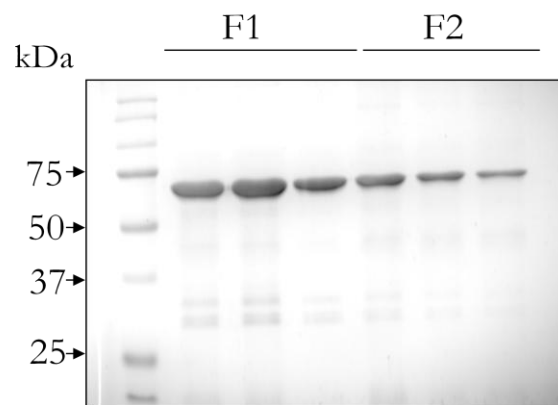
### **6.17 Verificación de robustez de genes diferencialmente expresados**

Las 4 réplicas de secuenciación de la curva de intoxicación fueron analizadas para determinar los genes con expresión diferencial por medio de tercias, dejando fuera del análisis una a la vez. Para cada tercia, se obtuvieron las listas de genes diferencialmente expresados por DESeq2 y EdgeR y se obtuvieron los genes comunes para tiempo de la curva de intoxicación. Con el script de common.R se determinó, para cada condición, si los identificadores de los genes aparecían tanto en alguna de las listas de las tercias como en la lista utilizando la información de las 4 réplicas.

## 7. Resultados

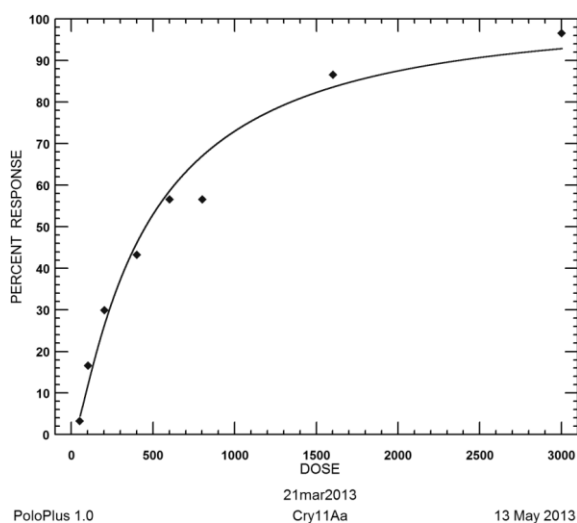
### 7.1 Obtención de cristales purificados de Cry11Aa

El objetivo de este trabajo era determinar la respuesta en defensa a la toxina Cry11Aa montada por las células del epitelio intestinal de *A. aegypti*. Para esto se requería contar con toxina en alto grado de pureza. En el laboratorio la producción de las toxinas Cry11Aa se hace a partir de cultivos de la bacteria *B. thuringiensis* modificada para sólo producir esta toxina y no todas las toxinas insecticidas provenientes de la cepa *Bt israelensis*. Los residuos de las células bacterianas pueden por sí mismas desencadenar respuestas celulares del sistema inmune innato [105], lo que enmascararía o confundiría los resultados derivados de la acción de la toxina. Para evitar esto, los cultivos esporulados de *Bt* fueron lavados extensivamente y posteriormente se purificó el cristal paraesporal por un gradiente discontinuo de sacarosa, como se describe en la sección de métodos. Este último paso permite separar las esporas de *Bt* de los cristales de Cry11Aa. Las fracciones 1 y 2 de esta separación es donde se acumulan los cristales. Se recuperaron y lavaron. La figura 7.1 muestra un gel SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie de estas fracciones. Se observa una banda fuerte de la protoxina de Cry11Aa con un peso de aproximadamente 70 kDa, con mayor concentración en la fracción 1 del gradiente.



**Figura 7.1. Purificación por gradiente de sacarosa de Cry11Aa.** Tinción con Azul de Coomassie de una separación por SDS-PAGE de las fracciones del gradiente.

Los cristales de Cry11Aa purificados fueron cuantificados por el método de Bradford. Con esta cuantificación se montó un bioensayo de dosis-respuesta en larvas de 4<sup>to</sup> instar de *A. aegypti* utilizando concentraciones desde 50 ng/ml hasta 3000 ng/ml por 24 h. Se utilizó el programa POLO-Plus para determinar, por análisis de Probit, la dosis letal para 50% (LC<sub>50</sub>) de la población en 24 h. Esta se estimó en 450.98 ng/ml (con un rango de 367.38- 553.78 ng/ml con 95% de confianza). La curva tuvo un buen ajuste al comportamiento esperado, como se muestra en la figura 7.2, y es comparable con aquella reportada en la literatura [40]. Esta dosis fue comprobada experimentalmente, siendo 500 ng/ml la dosis que en promedio tenía una mortalidad consistente del 50%, como se muestra en la tabla 7.1. También se purificaron las mutantes no tóxicas de Cry11Aa E97A y V142D. Se confirmó su pérdida de toxicidad utilizando la misma dosis que Cry11Aa silvestre.



*Figura 7.2. Curva dosis-respuesta de Cry11Aa en larvas de A. aegypti.*

Dosis	Mortalidad Wt	Mortalidad E97A	Mortalidad V142D
	Promedio 8 vasos	Promedio 3 vasos	promedio 3 vasos
500 ng/ml	5	0	0

*Tabla 7.1. Mortalidad a las 24 h con cristales purificados de Cry11Aa en larvas de 4<sup>to</sup> instar A. aegypti.*

## 7.2 Curvas de intoxicación de Cry11Aa

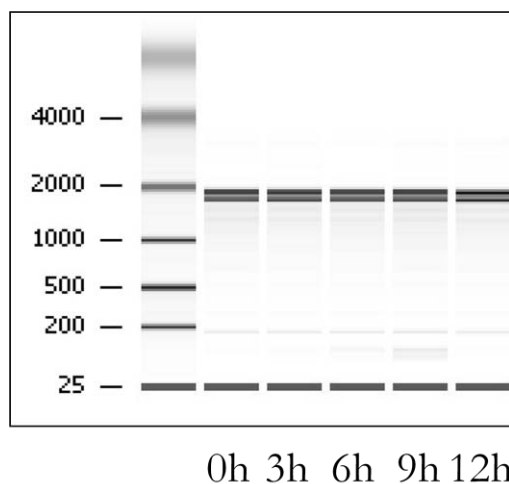
La intoxicación de larvas de *A. aegypti* se realizó con una  $LC_{50}$  de cristales purificados de Cry11Aa. En experimentos previos no publicados del laboratorio se observó que si las larvas de mosquito eran intoxicadas con muy altas dosis de Cry11Aa éstas morían incluso si se les transfería a agua limpia. Esto no sería un umbral adecuado para estudiar respuestas de defensa. Una dosis muy baja podría no ser suficiente para inducir una respuesta en un gran número de individuos. Con esto en mente, se probaron 5 tiempos de intoxicación: 0, 3, 6, 9 y 12 h de exposición a Cry11Aa. En los bioensayos con larvas de *A. aegypti* el mayor número de larvas muere antes de las 16 h de intoxicación, por lo que a tiempos más largos quizá veamos una influencia mayor de procesos no relacionados a la intoxicación como podría ser regulación circadiana o del desarrollo de las larvas de mosquito. Para cada réplica de la curva de intoxicación se tuvo el cuidado de que las horas de intoxicación correspondieran a la misma hora del día. En cada réplica, para cada tiempo se contaminaron 3 vasos, desfasándose la aplicación de la toxina contemplando el tiempo de disección, para así asegurar un tiempo similar de exposición a la toxina en cada triplicado. En la disección para extraer el intestino de las larvas no se incluyó a aquellas que mostraran signos de intoxicación severa o que hubieran muerto. El sólo analizar las larvas que se han defendido exitosamente al menos hasta el momento de disección reduciría la variación en expresión. En cada tiempo de intoxicación, de las 30 larvas, se contó el número de larvas sobrevivientes para monitorear la similitud de las réplicas. Estos datos se presentan en la tabla 7.2.

Muestra	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Rep. 7	Rep. 8
<b>Control</b>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>3 hr.</b>	93.3%	100%	96.7%	100%	100%	100%	100%	100%
<b>6 hr.</b>	93.3%	100%	96.1%	100%	100%	86.6%	96.6%	96.7%
<b>9 hr.</b>	76.6%	89.3%	80%	90%	89%0	83.3%	93.3%	90%
<b>12 hr.</b>	66.6%	78.6%	76.7%	80%	73.3%	65.5%	83.3%	73.3%

**Tabla 7.2. Porcentaje de sobrevivencia de larvas.** Se contabilizó en cada tiempo de exposición para cada una de las réplicas de la curva de intoxicación con Cry11Aa.



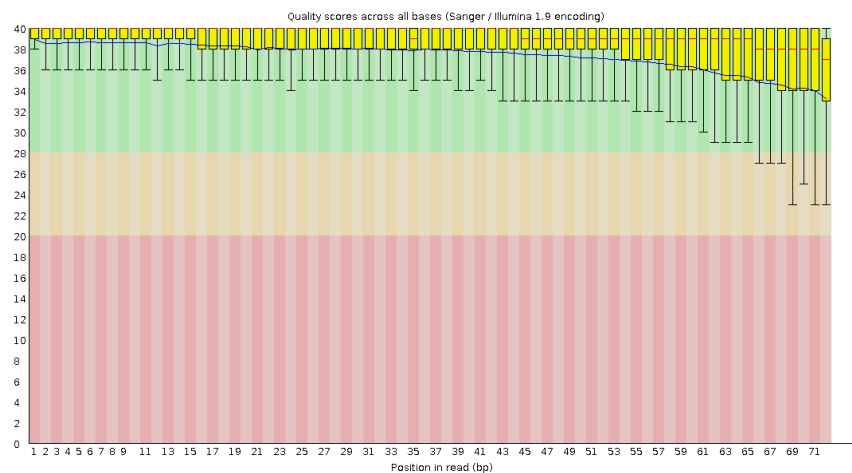
Los intestinos diseccionados se procesaron para la extracción de ARN total como se describe en los métodos. El uso de una primera extracción con TRIzol se realizó ya que mostraba mayor rendimiento a partir de menor cantidad de intestinos. El tratamiento con DNase I y la limpieza por columna se realizaron para mejorar la pureza de las preparaciones finales de ARN total. La preparación de bibliotecas de ARNm desde muestras de ARN total requería de al menos 2 µg de ARN total, en una concentración mínima de 200 ng/µl, que estuviera en alta integridad. La concentración precisa e integridad del ARN total fue determinada con un equipo Bioanalyzer 2100. Un espectro representativo para una de las réplicas de la curva de intoxicación se muestra en la figura 7.3. La unidad ribosomal 28S de muchos artrópodos presenta un corte interno, pero se mantienen ambas partes unidas por puentes de hidrógeno [106]. Estas uniones se pierden durante la purificación del ARN total de *A. aegypti*; las dos partes resultantes migran casi al mismo tamaño que el 18S. Debido a que el software del equipo Bioanalyzer utiliza, entre otros parámetros, la presencia de pico del 28S y el 18S para asignar un índice de integridad, éste no podía ser reportado adecuadamente y evaluamos la integridad de las muestras por la presencia o no de bandas de degradación por debajo del 18S.



**Figura 7.3. Análisis de integridad por Bioanalyzer 2100.** Imagen generada del espectro de ARN total extraído desde el intestino de *A. aegypti* para una curva de intoxicación de una de las réplicas.

### 7.3 Secuenciación, alineamiento y conteo

Se seleccionaron 4 réplicas de la curva de intoxicación con concentración, pureza e integridad alta para la preparación de bibliotecas de ARNm que serían secuenciadas con la plataforma Illumina. El protocolo retiene los ARNm por medio de su unión a perlas con poli-T, por lo que todas aquellas especies de ARN que carezcan de un poli-A se eliminan, incluyendo algunos ARNm como las histonas. Con estos ARNm se prepararon fragmentos de ADNc que se unieron a un chip de Illumina. Los chips se utilizaron para secuenciar los fragmentos de ~300 pb por ambos extremos. Este formato pareado permite tener un mejor alineamiento de las lecturas al proveer esencialmente dos anclas para la pareja. La calidad de secuenciación de todas las muestras fue alta, con un rendimiento de entre 33 y 60 millones de lecturas. Se utilizó la herramienta FastQC para identificar artefactos o secuencias sobre-representadas en las muestras, pero en general no se encontraron problemas que requirieran consideración o secuencias contaminantes. La figura 7.4 muestra una imagen representativa de la calidad de las lecturas de un extremo de la secuenciación.



**Figura 7.4. Análisis de calidad de secuenciación.** Resultado representativo para las lecturas obtenidas de un extremo de los fragmentos de ADNc de *A. aegypti*.

Con las lecturas obtenidas se procedió al alineamiento con el genoma de *A. aegypti*. El genoma de este mosquito se encuentra secuenciado, aunque no se encuentra ensamblado en su totalidad. Tiene un tamaño de aproximadamente 1.4 Gb, alrededor de tres veces mayor al de otros mosquitos secuenciados [107]. Esta expansión de tamaño abarca grandes regiones

repetitivas e intrones muy largos. Aún así, el número de genes estimado es similar; en *A. aegypti* actualmente se predicen 17 478 genes. Para alinear las lecturas obtenidas de nuestras muestras se utilizó el programa TopHat2. TopHat2 está implementado sobre el algoritmo de alineamiento Bowtie2. Permite buscar posibles sitios de empalme de transcritos al alinear con el genoma utilizando la información del pareado de las lecturas, lo que permite reducir el número de lecturas no alineadas. TopHat2 también posee un modo para alinear con el transcriptoma de un organismo utilizando la información de anotación de genes. Con las primeras tres réplicas secuenciadas se hizo un alineamiento con el genoma y con el transcriptoma de *A. aegypti*. De estos ensayos se obtuvo el porcentaje de lecturas que fueron exitosamente alineadas. Los datos de alineamiento con el transcriptoma fueron utilizados con la herramienta HTSeq-Count para obtener un conteo del número de lecturas por gen. En este paso, sólo las lecturas con un sitio único de alineamiento son retenidas y sólo son designadas con ambigüedad si la pareja de lecturas alinea por completo en dos unidades transcripcionales sobrelapadas. No hay aún un criterio específico para determinar a qué gen corresponde una lectura que alinea en más de un sitio, por lo que decidimos conservar sólo aquellas con un alineamiento único. La tabla 7.3 presenta el porcentaje de lecturas obtenidas para cada uno de estos procesos con respecto al número total de lecturas obtenidas para cada muestra. Una primera observación es que prácticamente el total de lecturas alineadas con el transcriptoma lo hacen en un sitio único y sin ambigüedad de gen al que pertenecen debido a que la diferencia en porcentaje entre estas dos columnas es muy pequeña. En contraste, hay un porcentaje mayor de lecturas pareadas que alinean con el genoma pero no con el transcriptoma. Hay algunas explicaciones para este fenómeno. En primer lugar, el algoritmo opera de forma distinta cuando alinea con el genoma que con el transcriptoma y esto podría dar lugar a una diferencia en la eficiencia de alineamiento. Por otro lado, al alinear con el genoma pero no con el transcriptoma, esas lecturas podrían corresponder a exones o empalmes no contenidos en la base de datos y que, sin embargo, aparentemente sí se están transcribiendo a cierto nivel. Estas consideraciones son importantes para saber cuánta información se podría estar perdiendo por un enfoque u otro, pero en ambos casos se obtiene en general un buen porcentaje de alineamiento, sobre todo con aquellos transcritos mejor definidos y anotados, los cuales son los que proveerán mayor información.

Réplica	Condición	Lecturas totales	% Global genoma	% Global transcriptoma	% Alineamiento único (transcritos)
1	0hr (s/tox)	~38 M	76.63	71.31	70.30
	3hr	~60 M	77.54	67.99	67.85
	6hr	~30 M	76.07	69.11	67.80
	9hr	~60 M	77.81	71.40	71.40
	12hr	~50 M	77.98	71.59	71.23
2	0hr (s/tox)	~40 M	77.04	70.57	69.49
	3hr	~50 M	78.57	68.72	67.66
	6hr	~54 M	79.72	66.49	65.31
	9hr	~32 M	78.94	70.98	64.54
	12hr	~33 M	78.98	70.36	65.76
3	0hr (s/tox)	~23 M	77.80	71.30	69.50
	3hr	~23 M	77.34	70.09	68.19
	6hr	~22 M	77.78	71.04	69.46
	9hr	~21 M	77.68	71.16	69.40
	12hr	~22 M	77.03	71.67	69.43
4	0hr (s/tox)	~57 M	NA	69.47	68.83
	3hr	~46 M	NA	72.71	71.85
	6hr	~57 M	NA	71.34	70.21
	9hr	~ 59 M	NA	70.83	69.75
	12hr	~ 53 M	NA	70.86	69.26

**Tabla 7.3. Eficiencia de alineamiento por TopHat 2.** Porcentajes del total las lecturas pareadas al genoma y transcriptoma de *A. aegypti* para las 4 réplicas secuenciadas.

#### 7.4 Determinación de genes con expresión diferencial

Se utilizaron dos paquetes del proyecto Bioconductor para evaluar la expresión diferencial: DESeq2 y EdgeR. El raciocinio detrás de esta elección es que los genes que sean determinados como diferencialmente expresados (DEG, por sus siglas en inglés) por más de un programa tienen mayor probabilidad de ser verdaderos positivos que aquellos que sólo son detectados como tales por sólo uno de ellos. A mayor número de réplicas también mejora el respaldo estadístico a los resultados de los programas, pero dado el aún elevado costo de la secuenciación nos limitamos a 4 réplicas. Ambos paquetes permiten definir un modelo estadístico básico que considera sólo la condición como fuente de variación entre los niveles

de expresión. Ambos paquetes también permiten definir un modelo estadístico como más de una variable como posible fuente de variación. Aún controlando el mayor número de variables experimentales, las larvas utilizadas en cada una de las réplicas proviene de una diferente generación de la colonia de mosquitos y existen diferencias ambientales que podrían influir en el metabolismo de las larvas. Por esta razón se utilizaron los paquetes con las funciones para evaluar un modelo general lineal (GLM, por su nombre en inglés) que contemplara la réplica de origen como una fuente posible de variación y que esta variación se incluyera para determinar los valores de dispersión del nivel de expresión de un gen. Se buscó determinar el mejor modelo utilizando los valores de expresión de las primeras 3 réplicas en secuenciarse. Para cada tiempo de la curva de intoxicación de Cry11Aa se comparó el nivel de expresión contra aquél de la condición de 0 h. Se consideró que un gen poseía un cambio en expresión significativo cuando su valor estadístico fuera menor a 0.05, ya sea el p-value con corrección de Benjamini-Hochberg de DESeq2 o la tasa de falsos positivos para EdgeR. Con un script de R se determinaron los genes comunes entre el modelo básico y el GLM de cada herramienta para cada tiempo. La tabla 7.4 indica el número de genes para cada comparación. Se puede observar que para ambos paquetes la utilización del GLM da lugar a un número mayor de DEG. En ambos casos, el GLM es capaz de detectar todos los genes detectados con el modelo básico. Se decidió utilizar sólo el GLM para comparaciones posteriores ya que no existía riesgo de perder información, aunque quizá sí de incluir más genes como falsos positivos.

		DESeq2			EdgeR		
		Común	Sólo No GLM	Sólo GLM	Común	Sólo No GLM	Sólo GLM
<b>6hr</b>	<b>inducido</b>	14	0	119	3	0	29
	<b>reprimido</b>	1	0	36	1	0	3
<b>9hr</b>	<b>inducido</b>	78	0	140	49	0	72
	<b>reprimido</b>	13	1	83	7	0	28
<b>12hr</b>	<b>inducido</b>	353	0	460	183	0	318
	<b>reprimido</b>	106	0	334	29	0	204

*Tabla 7.4. Comparación del número de genes diferencialmente expresados determinados por el modelo básico o el modelo general lineal de DESeq2 o EdgeR.*

Los resultados del número de lecturas por gen en cada muestra fueron reunidos en una tabla única, la cual contenía la información de los 5 tiempos de las 4 réplicas secuenciadas de la curva de intoxicación. Esta tabla se utilizó para la determinación de DEG. Una vez que se tuvieron los resultados de DESeq2 y EdgeR para cada tiempo se compararon entre sí las listas de genes para identificar aquellos que por medio de ambos paquetes se detectaban con un cambio de expresión significativo. En la tabla 7.5 se presentan los datos de este análisis. En general, DESeq2 indica más genes como DEG que EdgeR en nuestro conjunto de datos. El número de genes determinados como DEG sólo por EdgeR es menor que aquellos exclusivos para DESeq2 y proporcionalmente es drásticamente menor que DESeq2. Esto sugiere que utilizar únicamente DESeq2 para nuestro análisis podría haber incluido un número alto de falsos positivos. Con nuestros datos, EdgeR es más conservador con sus resultados, aunque también podría estar excluyendo un número no insignificante de verdaderos positivos. Excepto a las 3 h, el número de genes que muestran aumento en el nivel de expresión es mayor que aquellos que disminuyen su expresión. Esto concuerda con lo que se observó por medio de microarreglos de *A. aegypti* expuesto a Cry11Aa (S. Gill, datos no publicados), donde una dosis  $LC_{50}$  mostró más genes inducidos que reprimidos. A medida que el tiempo de exposición a Cry11Aa se alarga, el número de DEG se incrementa. A tiempos cortos el bajo número de DEG puede deberse a que no todos los individuos se han alimentado aún de suficiente toxina para desencadenar una respuesta, o que la respuesta aún no involucra el proceso de cambios transcripcionales.

Dado que el tiempo máximo de nuestra curva, 12 h, es un tiempo considerable para el ciclo de vida de una larva de mosquito, existía la posibilidad de que muchos de los cambios transcripcionales que observamos a tiempos prolongados fueran efecto del desarrollo de nuestros individuos. Para verificar esto se disectaron larvas de 0 y 12 h, en los mismos momentos del día correspondientes a las larvas intoxicadas, pero en ausencia de Cry11Aa. Esto se realizó en tres réplicas biológicas. El ARN mensajero de estas réplicas biológicas también fue procesado, secuenciado, y analizado como las réplicas de la curva de intoxicación. La tabla 7.6 muestra los DEG comunes entre DESeq2 y EdgeR para este ensayo. Sólo 13 genes mostraron expresión diferencial entre las 0 y 12 h sin toxina, en comparación con 1038 genes en un tiempo igual de exposición a Cry11Aa. De estos 13 genes, 9 muestran reducción en

expresión y 4 un aumento. Esto también contrasta con la intoxicación con Cry11Aa durante 12 h, donde el número de genes con inducción transcripcional supera al de los genes reprimidos. El número de DEG a las 12 h sin toxina es similar a las 3 h de exposición a Cry11Aa. A las 12 h sólo 6 genes fueron comunes entre las larvas control y las larvas intoxicadas, entre los cuales están genes del péptido antimicrobiano defensina (AAEL003841 y un homólogo AAEL003816). Todo esto nos indica fuertemente que la gran mayoría de los cambios transcripcionales que detectamos a lo largo de los tiempos de intoxicación corresponden al efecto de la toxina y no son meramente cambios del desarrollo de las larvas.

Condición		EdgeR	DESeq2	Comunes	Solo EdgeR	Solo DESeq2
3 h	todos	10	5	4	6	1
	inducidos	3	1	1	2	0
	reprimidos	7	4	3	4	1
6 h	todos	33	340	27	6	313
	inducidos	24	245	23	1	222
	reprimidos	9	95	4	5	91
9 h	todos	151	458	145	6	313
	inducidos	105	273	104	1	169
	reprimidos	46	185	41	5	144
12 h	todos	1059	1980	1038	21	942
	inducidos	623	1123	613	10	510
	reprimidos	436	857	425	11	432
12 h sin toxina	todos	39	16	13	26	3
	inducidos	20	7	5	15	2
	reprimidos	19	9	9	10	0

**Tabla 7.5. Número de genes determinados como diferencialmente expresados.** Se presentan los genes para la curva de intoxicación por Cry11Aa por DESeq2, EdgeR y en común. así como aquellos de las larvas secuenciadas sin exposición a toxina.

Gene id	log <sub>2</sub> Fold Change	Descripción	Común a 12 h Cry11Aa
AAEL000566	2.41447		Sí
AAEL001418	1.557316		Sí
AAEL002309	-0.90108	Thioredoxin Peroxidase.	No
AAEL003201	1.277251	Carboxy/choline esterase Alpha Esterase	No
AAEL003588	-1.1039	DNA-J/hsp40	No
AAEL003816	-4.50705		No
AAEL003821	-3.11335		Sí
AAEL003841	-3.50846	defensin anti-microbial peptide	Sí
AAEL004223	-2.48894	cecropin anti-microbial peptide	Sí
AAEL006704	-2.80016	fibrinogen and fibronectin	No
AAEL007060	0.898981	lipase	Sí
AAEL007942	-2.59226	fibrinogen and fibronectin	No
AAEL008312	1.281071		No

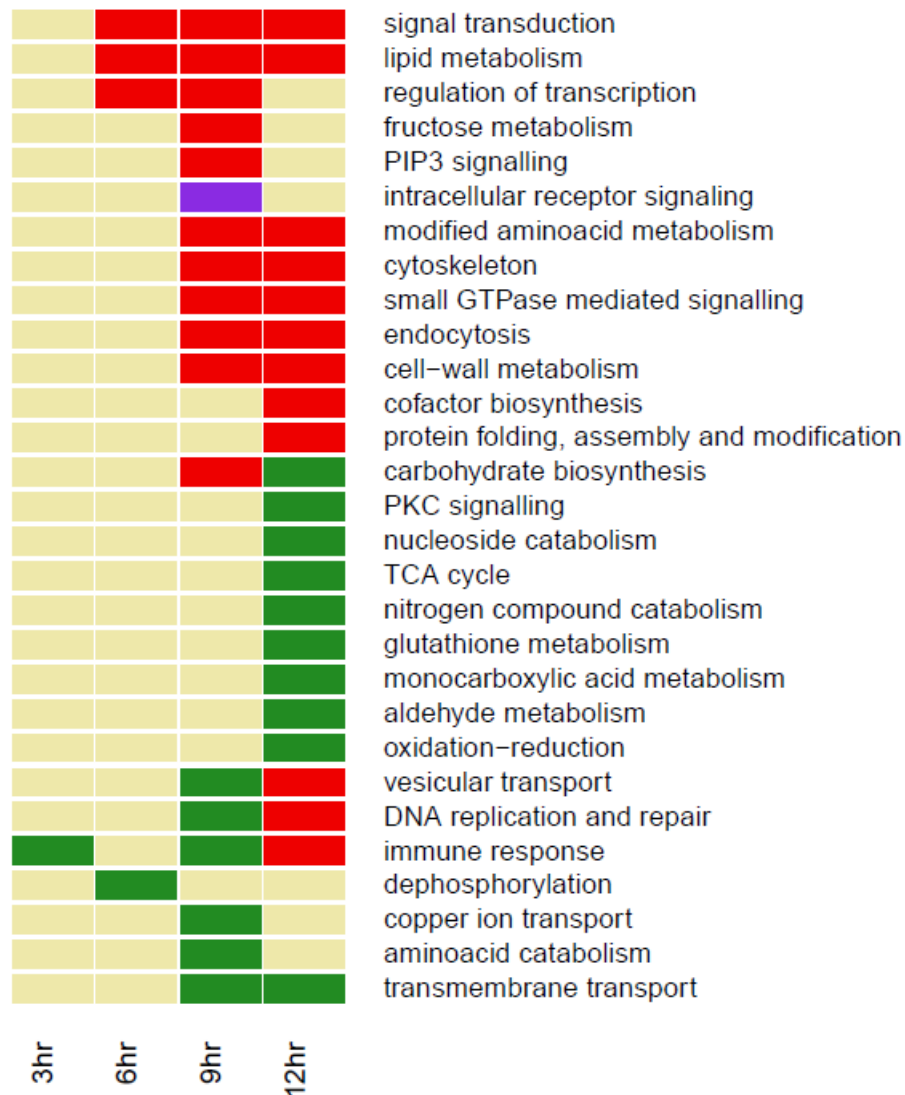
**Tabla 7.6. Genes diferencialmente expresados en larvas control a las 12 h sin toxina.**

### 7.5 Análisis de procesos celulares con cambios transcripcionales

Una vez que se obtuvo un perfil de genes que muestran cambios transcripcionales significativos a diferentes tiempos de exposición con Cry11Aa, se procedió a investigar en qué procesos celulares estaban involucrados esos genes. Gene Ontology es una jerarquía de términos biológicos que permiten la anotación de un gen por el proceso celular en el que participa, su función bioquímica o la ubicación celular donde se encuentra. Cada uno de estos tres dominios contiene un árbol de términos desde los más generales a los más particulares.



Para determinar cuáles de los términos GO en la anotación de *A. aegypti* se encuentran sobre-representados en nuestro conjunto de DEG se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO con la herramienta TopGO de Bioconductor. Este paquete de funciones permite determinar cuáles términos GO en un conjunto de genes aparecen con mayor frecuencia que lo que se esperaría dada la proporción que representan del total de términos en la anotación de un organismo. Este análisis se realizó por separado para los genes inducidos o reprimidos en cada condición. Al utilizar el paquete con los parámetros básicos se obtuvieron términos muy generales que limitaban el contexto funcional que se podía deducir. Se utilizaron dos parámetros adicionales: 1) para ser incluido en el análisis, un término tenía que estar asociado al menos a 5 genes para reducir la proporción de términos determinados con significativos de forma espuria; 2) se utilizó el algoritmo "weight" para evaluar los términos, ya que procede a través de la topología buscando favorecer términos más específicos y más informativos [103]. La figura 7.5 representa el enriquecimiento de términos GO del dominio de "Biological Process" en cada una de las condiciones experimentales probadas. Los términos son incluidos si fueron determinados como enriquecidos significativamente en los genes inducidos o reprimidos de cada uno de los tiempos de la curva de intoxicación.



**Figura 7.5. Enriquecimiento de términos GO de "Biological Process" para los genes diferencialmente expresados ante Cry11Aa.** Para cada tiempo se denotan en color rojo los términos enriquecidos en genes inducidos, en verde para genes reprimidos y morado para ambos conjuntos de genes. Los nombres de las categorías resumen varios términos relacionados

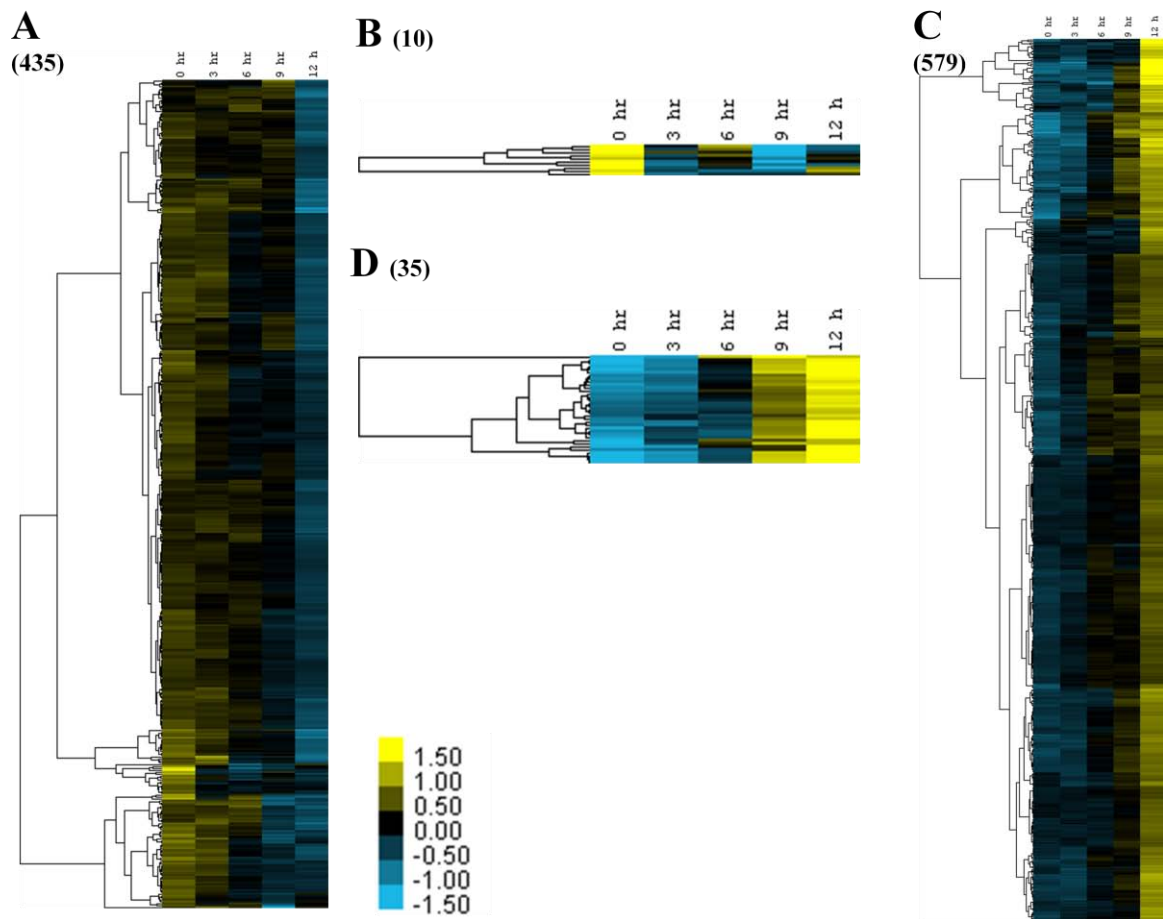
Se pueden hacer algunas observaciones a partir de los términos enriquecidos. Había pocos DEG a las 3 h por lo que es congruente que se encontró un sólo término enriquecido en esa condición. A partir de las 6 y hasta las 12 h observamos enriquecimiento de categorías relacionadas a la transducción de señales y metabolismo de lípidos en los genes inducidos. A

las 9 h también observamos sobre-representado entre los genes inducidos al término de la señalización mediada por PIP<sub>3</sub>, y a las 9 y 12 h se indujo la señalización mediada por GTPsas pequeñas. Se conoce previamente el papel de las MAPK en la respuesta a toxinas formadoras de poro, en particular con las toxinas Cry [73, 74, 83]. Nuestros datos sugieren que además de estas vías de MAPK existen otras cascadas de señalización que podrían jugar un papel relevante en la respuesta de defensa. A partir de las 9 h se observa que en los genes inducidos sobresalen términos relacionados con el tráfico vesicular, el metabolismo de membrana, y actividades post-traduccionales como el plegamiento y la modificación de proteínas. La relación entre estos términos puede deberse a la activación de procesos de remodelación de la membrana para reparar el daño provocado por la formación de poros por la toxina Cry. La endocitosis ha sido propuesta como un posible mecanismo de eliminación de membrana dañada por PFT, el cual puede jugar un papel importante en la supervivencia de las células en mamíferos e invertebrados. Por ejemplo, Rab-11 (AAEL009317), una proteína involucrada en el reciclaje de endosomas tardíos, presenta una ligera inducción a las 12 h. La activación de la función de protección de los componentes celulares podría deberse al estrés osmótico derivado de la permeabilidad provocada en la célula. Destacan entre los genes con estos términos las proteínas Hsp70, Hsp20, y  $\alpha$ -cristalina.

El enriquecimiento de términos en los genes reprimidos sugiere una represión de actividades celulares centrales. A las 9 y 12 h hay una represión de genes asociados al transporte transmembranal. En nuestra hipótesis habíamos supuesto que los procesos para restablecer los gradientes de solutos ante la formación del poro se verían inducidos, pero los datos apuntan a una situación opuesta. También observamos represión en términos relacionados con el ciclo de ácidos tricarboxílicos, al metabolismo de aminoácidos, nucleótidos, y al de carbohidratos a las 12 h de intoxicación. Esta respuesta es similar a la observada con Cry3A en *Tenebrio molitor* [83], Cry1Ab en *O. nubilalis* [85], y Cry5B en *C. elegans* [69]. Adicionalmente, en los genes reprimidos a las 12 h vemos la presencia de términos relacionados a procesos de contención con estrés oxidativo. Nuevamente, en *T. molitor*, *C. elegans*, *O. nubilalis*, y en larvas de *A. aegypti* con cierta tolerancia a *Bti* se detectó también reducción en procesos de destoxificación y actividad anti-oxidante. Al igual que en esos casos, en nuestros datos muchos de los genes asociados a esos términos son Citocromos P450 y algunos transportadores ABC. La replicación celular primero está asociada a los genes reprimidos a las 9 h y después a los genes inducidos a las 12 h . De

igual forma que el mantenimiento de los gradientes celulares, la replicación celular es un proceso costoso energéticamente. Es probable que la célula primero dedique recursos al restablecimiento de la integridad celular antes que utilizarlos en mantener el metabolismo en un ambiente de estrés. Cuando el contexto celular se comienza a estabilizar se puede iniciar una proliferación para recomponer el tejido epitelial. Otro término que en los primeros tiempos es significativo en los genes reprimidos y después a genes inducidos es la respuesta inmune. Aunque en las larvas control a 12 h hubo represión de péptidos antimicrobianos, parte de la respuesta inmune innata del mosquito también se encontró inducida, por ejemplo genes como Hopscotch (AAEL0012553) y Toll-Like receptor (AAEL017523).

Las observaciones anteriores se hicieron analizando la expresión de los genes por separado en cada tiempo de la curva de intoxicación. Se decidió que era interesante observar el enriquecimiento de categorías funcionales en genes que tuvieran niveles de expresión similares a lo largo de toda la curva que podrían indicar procesos que se regulan conjuntamente. Para realizar este análisis se tomaron los valores de abundancia normalizados a las 0, 3, 6, 9, 12 h de los 1060 genes individuales que fueron determinados como diferencialmente expresados en alguna de las condiciones probadas. Estos valores fueron transformados para el análisis por medio del programa Cluster 3.0. Con esta herramienta se construyeron los grupos de genes con perfiles de expresión similar en los diferentes tiempos y se visualizaron con Java Treeview. Se tuvieron genes con una expresión inducida o reprimida a medida que incrementa el tiempo de exposición a Cry11Aa; estos se pudieron dividir en aquellos que sufrieron un cambio moderado o fuerte, dependiendo si la diferencia entre los niveles de expresión (en escala  $\log_2$ ) era mayor o menor a 2. La figura 7.6 representa estos grupos o "clusters" de genes. El cluster moderado de genes inducidos contiene 579 genes, y el cluster fuertemente inducido 35. El cluster moderadamente reprimido tiene 435 genes y el cluster fuertemente reprimido 10. Únicamente el gen AAEL008767, correspondiente a una serin proteasa, no se agrupó con ninguno de estos grupos, teniendo un pico de expresión a las 3 h.



**Figura 7.6. Grupos de genes con perfiles de expresión compartida a lo largo de la curva de intoxicación con *Cry11Aa*.** A: Genes moderadamente reprimidos, B: Genes fuertemente reprimidos, C: Genes moderadamente inducidos, D: Genes fuertemente inducidos. El número entre paréntesis indica el número de genes en cada grupo.

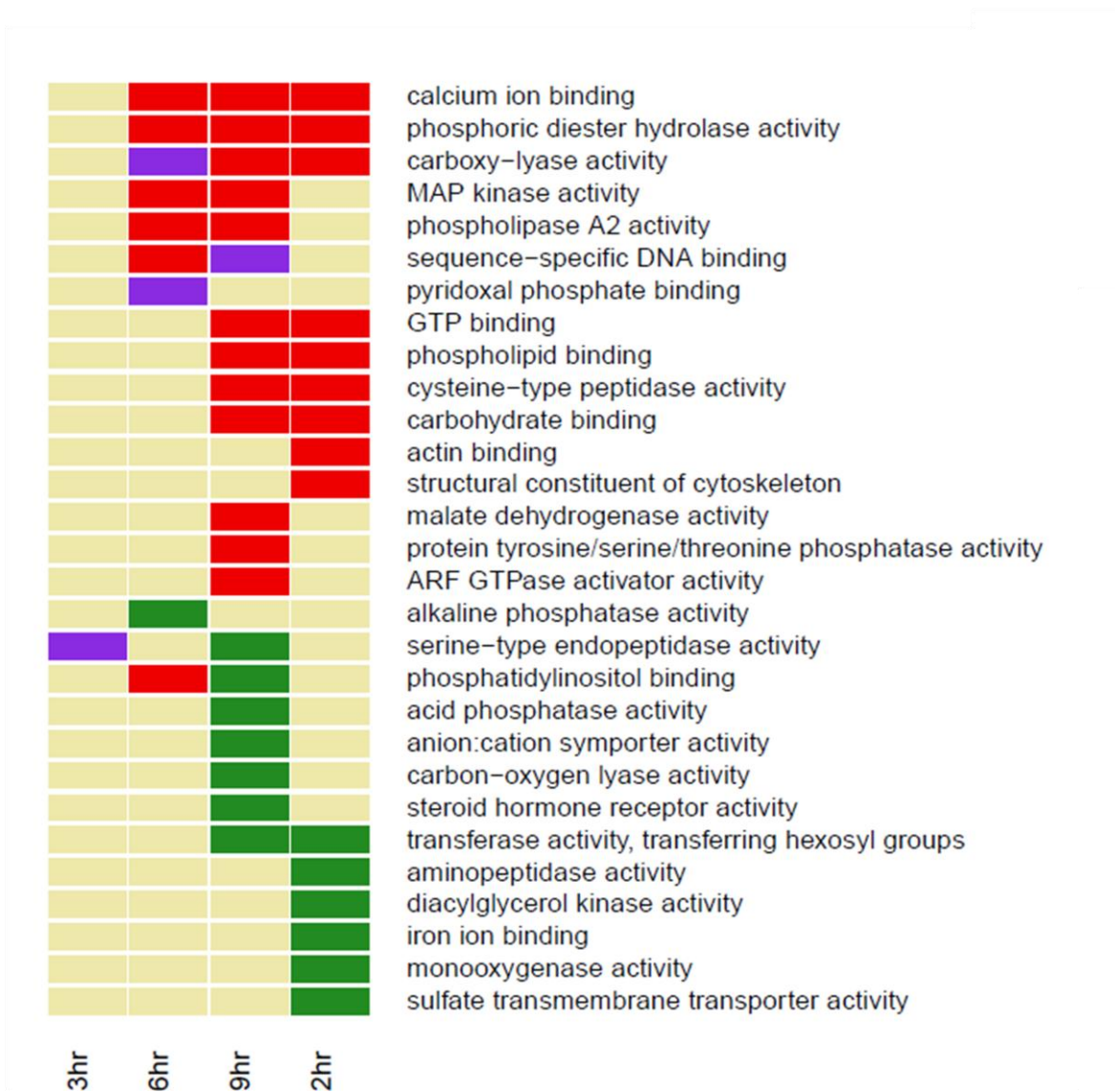
Con los genes que componen cada uno de estos grupos se realizó un análisis de enriquecimiento de términos GO de proceso biológico como aquél hecho con las tiempos individuales. La tabla 1 del apéndice I contienen todos los términos enriquecidos en cada grupo. De forma general, las categorías coinciden con aquellas del análisis separado por condición. Están dominados por los genes con un mayor cambio de expresión a las 12 h. En el cluster de represión moderada observamos términos de procesos oxidativos, ciclo de ácidos tricarboxílicos, transporte transmembranal, de aldehídos y de ácidos monocarboxílicos, así como señalización por PKC y metabolismo de compuestos nitrogenados. En el grupo de genes con represión fuerte destaca el término de defensa a bacterias. Este grupo contiene

principalmente péptidos antimicrobianos, incluyendo las defensinas que sufren un cambio en su expresión en las larvas control, pero también un transportar de cloro (AAEL009888) y la tripsina (AAEL0012852). En el cluster de inducción moderada se encuentran términos de transporte vesicular, biogénesis de lípidos, plegamiento de proteínas, unión a citoesqueleto, morfogénesis celular, señalización por integrinas, MAPK y GTPsas pequeñas. El cluster de inducción fuerte está enriquecido en términos de regulación de Rho GTPsas, nucleación de actina, catabolismo de lípidos (con genes de fosfolipasas A2) y transporte de iones calcio. La actividad de las fosfolipasas A2 es dependiente de calcio [108], lo que puede ser una explicación de su regulación ocurra con perfiles similares.

## 7.6 Análisis de funciones moleculares con cambios transcripcionales

De los 17,478 genes incluidos en el transcriptoma de *A. aegypti*, aproximadamente un tercio están anotados con un término GO de "Biological Process". Esto implica que un número importante de DEG quedan excluidos al realizar el análisis previo. En comparación, más de la mitad de las genes tiene una anotación de términos GO de "Molecular Function". Se repitió el análisis de enriquecimiento de términos pero utilizando la anotación por "Molecular Function". La figura 7.7 muestra los resultados de este análisis por condición, de la misma forma que la figura 7.5. De forma general, las categorías enriquecidas para los genes reprimidos e inducidos están relacionadas con aquellas obtenidas al hacer la búsqueda con términos de "Biological Process". Por ejemplo, en los genes inducidos a partir de las 6 h encontramos proteínas que unen calcio, que unen fosfolípidos, y tienen actividad de fosfolipasa A2. También aparecen inducidos a las 6 y 9 h los genes relacionados a la actividad de MAP cinasas. Entre las 9 y 12 h de intoxicación los genes inducidos están enriquecidos en términos relacionados a la unión a GTP y ARF GTPsas. La unión de fosfatidilinositol es una función inducida a las 6 h. A las 12 h se inducen genes con actividad de unión a actina o que son componentes del citoesqueleto. Esto coincide con las vías de señalización indicadas por el análisis de proceso biológico, así como también con una inducción eventual de procesos de tráfico intracelular y remodelación del citoesqueleto. De igual forma, observamos similitud en los procesos reprimidos. Tanto a las 9 y 12 h se observan funciones de transporte transmembranal. Quizá relacionados a la degradación de azúcares por el ciclo de los ácidos tricarbónicos, las funciones de transferasa de grupos hexosa, así como la ruptura de enlaces carbono-oxígeno. De forme interesante, a las

6 h hay represión en genes con actividad de alcalino fosfatasas y a las 12 h de actividad de aminopeptidasa. Proteínas de ambas familias han sido identificadas como receptores de las toxinas Cry en diferentes insectos [45], aunque en este caso los genes asociados no son aquellos caracterizados para el mecanismo de acción en mosquitos.



**Figura 7.7. Enriquecimiento de términos GO para "Molecular Function" de los DEG en los distintos tiempo de intoxicación.** Se denotan en color rojo los términos enriquecidos en genes inducidos, en verde para genes reprimidos y morado para ambos conjuntos de genes.

Los nombres de las categorías resumen varios términos relacionados

El análisis de términos de función molecular se extendió siguiendo otra estrategia. Para los 676 genes que carecen de una anotación para proceso biológico se buscó si tenían algún dominio proteico identificable, utilizando los dominios de la base de datos Interpro para este fin. Se recuperaron desde Vectorbase los dominios proteicos encontrados para los DEG sin GO de "Biological Process" y después se determinó la frecuencia con que estos dominios eran encontrados en esta lista de genes. Se consideró que un dominio proteico era de interés cuando su frecuencia se encontraba por encima del 90 percentil. La tabla 2 del apéndice I muestra todos los dominios Interpro identificados de esta forma, así como el percentil al que pertenecen. La tabla 7.8 indica los dominios representativos más frecuentes en cada condición. En los genes inducidos desde las 6 h observamos una alta frecuencia de dominios de carboxilesterasas, que concuerda con los datos del enriquecimiento de GO por función molecular. Las carboxilesterasas son de especial interés en la defensa ya que la sobreexpresión y amplificación de genes con esta función están asociadas a la aparición de resistencia a insecticidas en las poblaciones de mosquitos [109]. Este fenómeno no es exclusivo de dípteros, ya que en larvas del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* resistente a Cry1F se detectó, entre otros cambios metabólicos, un incremento en la expresión basal de carboxilesterasas (Domingues, FA, datos no publicados). En *O. nubilalis* algunas carboxilesterasas se indujeron en respuesta a Cry1Ab [85]. Otros dominios con una alta frecuencia en los genes inducidos a las 9 y 12 h son aquellos de las chaperonas Hsp20 y Hsp70. En los genes inducidos a las 12 h están también en alta frecuencia los dominios de unión a calcio (EF-Hand) y de unión a anexinas. Estos dominios podrían estar relacionados al procesamiento de lípidos de las fosfolipasas A2 o la actividad de unión a membrana y citoesqueleto, respectivamente. En los genes reprimidos encontramos siempre dominios de dedos de Zinc, en especial del tipo C2H2. A las 12 h, los genes reprimidos muestran una alta frecuencia de dominios del tipo 2 de transportadores ABC.

Condición	InterproID	Percentil	Descripción
6 h reprimidos	IPR007588	1	Zinc finger, FLYWCH-type
6 h inducidos	IPR002018	0.94	Carboxylesterase, typeB
	IPR029058	1	Alpha/Beta hydrolase fold
9 h reprimidos	IPR007087	0.9	Zinc finger, C2H2
9 h inducidos	IPR013126	0.966	Heat shock protein 70 family
	IPR029058	0.955	Alpha/Beta hydrolase fold
	IPR002018	0.944	Carboxylesterase, typeB



	IPR013783	0.933	Immunoglobulin-like fold
12 h reprimidos	IPR007087	0.996	Zinc finger, C2H2
	IPR011009	0.977	Protein kinase-like domain
	IPR013026	0.936	Tetratricopeptide repeat-containing domain
	IPR013525	0.936	ABC-2 type transporter
12 h inducidos	IPR029058	1	Alpha/Beta hydrolase fold
	IPR008978	0.997	HSP20-like chaperone
	IPR027417	0.988	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase
	IPR013126	0.969	Heat shock protein 70 family
	IPR002048	0.969	EF-hand domain
	IPR002018	0.958	Carboxylesterase, typeB
	IPR001849	0.947	Pleckstrin homology domain
	IPR015880	0.947	Zinc finger C2H2-like
	IPR002110	0.925	Ankyrin repeat
	IPR001452	0.925	SH3 domain
	IPR008985	0.925	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily
	IPR018502	0.925	Annexin repeat

**Tabla 7.8. Dominios proteicos Interpro representativos en alta frecuencia en genes DEG sin anotación de proceso biológico.**

	3hr up	3hr down	6hr up	6hr down	9hr up	9hr down	12hr up	12hr down
<b>DEG</b>	1	3	23	5	104	42	613	425
<b>no BP</b>	0	1	13	1	68	19	375	209
<b>no Interpro</b>	0	1	2	0	19	11	79	43

**Tabla 7.9. Número de genes sin términos GO de "Biological Process" o dominios Interpro asociados. "Up" se refiere a genes inducidos y "down" a genes reprimidos**

Entre los 1060 DEG de todas las condiciones hay algunos genes que no tienen anotación de GO de proceso biológico, ni se pudieron asociar a algún dominio Interpro. La tabla 7.9 muestra para las diferentes condiciones el número de genes con estas características. Representan entre ~5 a 20 % del total de DEG para condición.

Con el objetivo de incluir información sobre estos genes en el análisis global se hizo una búsqueda de homólogos por medio de pBLAST de los péptidos de estos 154 genes. Aunque los genes no tuvieran una firma proteica identificable quizá tuvieran homología con alguna otra proteína mejor estudiada en su función. Se estableció un corte de e-value de  $10^{-8}$  y una identidad de más del 40% de la secuencia para considerar un alineamiento como relevante, esperando encontrar genes con fuerte evidencia de similitud funcional. Se obtuvieron pocos alineamientos que cumplieran con estos criterios y se muestran a continuación en la tabla 7.10. Ciertos homólogos que destacan son algunos péptidos antimicrobianos reprimidos a las 9 h: cecropina-A y gambicina. Esto coincide con la observación previa del enriquecimiento de términos de la defensa inmune en el mosquito. En los genes inducidos se observa que AAEL000811 es homólogo de Methuselah, un gen involucrado en respuesta a estrés y longevidad [110]. Adicionalmente, a las 12 h destaca la inducción de dos homólogos de proteínas involucradas en la homeostasis epitelial a través del mantenimiento de uniones estrechas entre las células: crimped [111] y snakeskin [112]. Algunas otras proteínas reafirman las categorías GO observadas previamente, como un intercambiador de nucleótidos de proteínas Ras inducido a las 9 h y una fosfolipasa A2 inducida a las 12 h.

**Tabla 7.10. Homólogos detectados por pBLAST.** \* indica que la proteína es clasificada como "PREDICTED". En la columna de especies Aa: *Aedes albopictus*, Ad: *Anopheles darlingi*, Ag: *Anopheles gambiae*, Am: *Anopheles melas*, Apm: *Apis mellifera*, Bi: *Bombus impatiens*, Cc: *Ceratitis capitata*, Cq: *Culex quinquefasciatus*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Md: *Microplitis demolitor*, Mud: *Musca domestica*, Mr: *Megachile roduntata*, Pp: *Phlebotomus papatas*

Condición	Gene ID	Cobertura	E-value	Identidad	Homolog ID	Proteína	Especie
9 h reprimidos	AAEL013895	90%	1e-32	53%	XP_001868961.1	14.5 kDa salivary protein	Cq
	AAEL009985	94%	2e-59	65%	XP_001868961.1	14.5 kDa salivary protein	Cq
	AAEL000777	83%	3e-15	60%	ABU80079.1	CEC-A	Ag
	AAEL004522	98%	8e-29	65%	ACA05605.1	gambicin	Am
9 h inducidos	AAEL007206	92%	2e-22	48%	XP_004526025.1	* rhythmically expressed gene 5 protein-like	Cc
	AAEL000811	91%	1e-127	48%	ETN67412.1	methusalah	Ad
	AAEL002963	32%	5e-09	57%	XP_008549507.1	* ras guanine nucleotide exchange factor L isoform X8	Md
	AAEL006228	98%	9e-102	45%	XP_001846856.1	PPARGamma constitutive conactivator 1	Cq
12 h reprimidos	AAEL012622	98%	5e-108	68%	XP_001862944.1	ADAM metalloprotease	Cq
	AAEL007780	96%	2e-107	57%	AAV90698.1	putative salivary secreted protein 275	Aa
	AAEL009985	94%	2e-59	65%	XP_001868961.1	14.5 kDa salivary protein	Cq
	AAEL006346	81%	5e-62	55%	XP_005177200.1	* BAG family molecular chaperone regulator 2-like isoform X1	Mud
	AAEL003594	98%	1e-169	61%	XP_001862361.1	microtubule binding protein D-CLIP-190	Cq
	AAEL013356	30%	8e-62	62%	XP_003401795.1	* eukaryotic initiation factor 4A-like isoform 2	Bi
	AAEL006493	98%	7e-11	49%	AAV90653.1	putative salivary secreted peptide	Aa
	AAEL005874	100%	4e-63	73%	XP_003707525.1	* E3 ubiquitin-protein ligase AMFR-like	Mr
	AAEL006493	98%	7e-11	49%	AAV90653.1	putative salivary secreted peptide	Aa
	AAEL013220	75%	3e-62	72%	NP_648500.1	crimped	Dm
	AAEL01867	92%	0	40%	XP_003395464.1	* muscle M-line assembly protein unc-89 isoform X3	Apm
	AAEL014310	86%	8e-34	79%	NP_648366.2	calcium-independent phospholipase A2 VIA, isoform B	Dm
12 h inducidos	AAEL007206	92%	2e-22	48%	XP_004526025.1	* rhythmically expressed gene 5 protein	Cc
	AAEL001576	94%	1e-31	83%	ETN61409.1	cysteine string protein	Ad
	AAEL003567	99%	6e-43	49%	AAV90653.1	putative salivary secreted peptide	Aa
	AAEL002578	97%	1e-59	65%	NP_649184.1	snakeskin, isoform A	Dm
	AAEL000811	91%	1e-127	48%	ETN67412.1	methusalah	Ad
	AAEL005428	98%	2e-32	51%	ABV44740.1	13.6 kDa midgut protein	Pp
	AAEL002963	32%	5e-09	57%	XP_008549503.1	* myb-like protein J isoform X4	Md

Después de estos análisis de búsqueda de funciones sobre DEG, quedó la duda de cuáles de ellas son las principales. Teniendo 4 réplicas de la curva de intoxicación, se hizo un análisis de búsqueda de genes diferencialmente expresados utilizando sólo 3 de ellas a la vez, determinando de igual forma aquellos que son comunes entre los dos algoritmos usados previamente. Esto nos da un total de 16 listas de genes comunes (4 tercias por 4 tiempos de exposición). Después, se determinó cuáles de esos genes, por tiempo de exposición a Cry11Aa, eran comunes con los DEG en el análisis previo utilizando las 4 réplicas en conjunto. La tabla 7.11 muestra el número de genes de esta comparación. Se puede observar que el conjunto de los genes que no están presentes en las determinaciones con 4 réplicas juntas mayormente sólo fueron significativos en 1 o 2 tercias. También, hay genes cuya identificación como diferencialmente expresado sólo se obtiene al incorporar información de las 4 réplicas. Hay muchos genes determinados como diferencialmente expresados que son comunes a las determinaciones utilizando las 4 réplicas pero que son inferidos únicamente con la información de una de las tercias. Sin embargo, estadísticamente, los genes que se encontraron en 3 o 4 tercias son aquellos con mejores valores significativos. Estos genes los podemos considerar que representan a los más robustos, ya que son recurrentes independientemente de qué réplicas se analicen.

<b>Presencia de genes</b>		<b>3hr</b>	<b>6hr</b>	<b>9hr</b>	<b>12hr</b>
<b>Presentes en análisis de 4 réplicas</b>	<b>En 4 tercias</b>	0	1	35	272
	<b>En 3 tercias</b>	0	6	22	132
	<b>En 2 tercias</b>	2	14	35	172
	<b>En 1 tercia</b>	2	5	40	294
	<b>Sólo 4 réplicas juntas</b>	0	1	13	168
<b>No presentes en análisis 4 réplicas</b>	<b>En 4 tercias</b>	0	0	0	0
	<b>En 3 tercias</b>	0	0	0	0
	<b>En 2 tercias</b>	2	2	1	3
	<b>En 1 tercia</b>	3	110	102	360

**Tabla 7.11. Genes comunes entre la búsqueda de DEG con tres o cuatro réplicas.**

Los números indican el número de DEG identificados como comunes o no entre el análisis de 4 réplicas y 1, 2, 3 o 4 de las tercias.

Se realizó un análisis de enriquecimiento de funciones biológicas en los 272 genes comunes en las 4 tercias a las 12 hr de intoxicación con Cry11Aa. Los términos más significativos se muestran en la tabla 7.12. Estas categorías coinciden en gran medida con lo descrito previamente para los DEG a las 12 h, tanto para los genes inducidos como los genes reprimidos, lo cual indica que los genes que contribuyeron más a los análisis anteriores son genes que se observaron diferencialmente expresados en todas las réplicas de los experimentos.

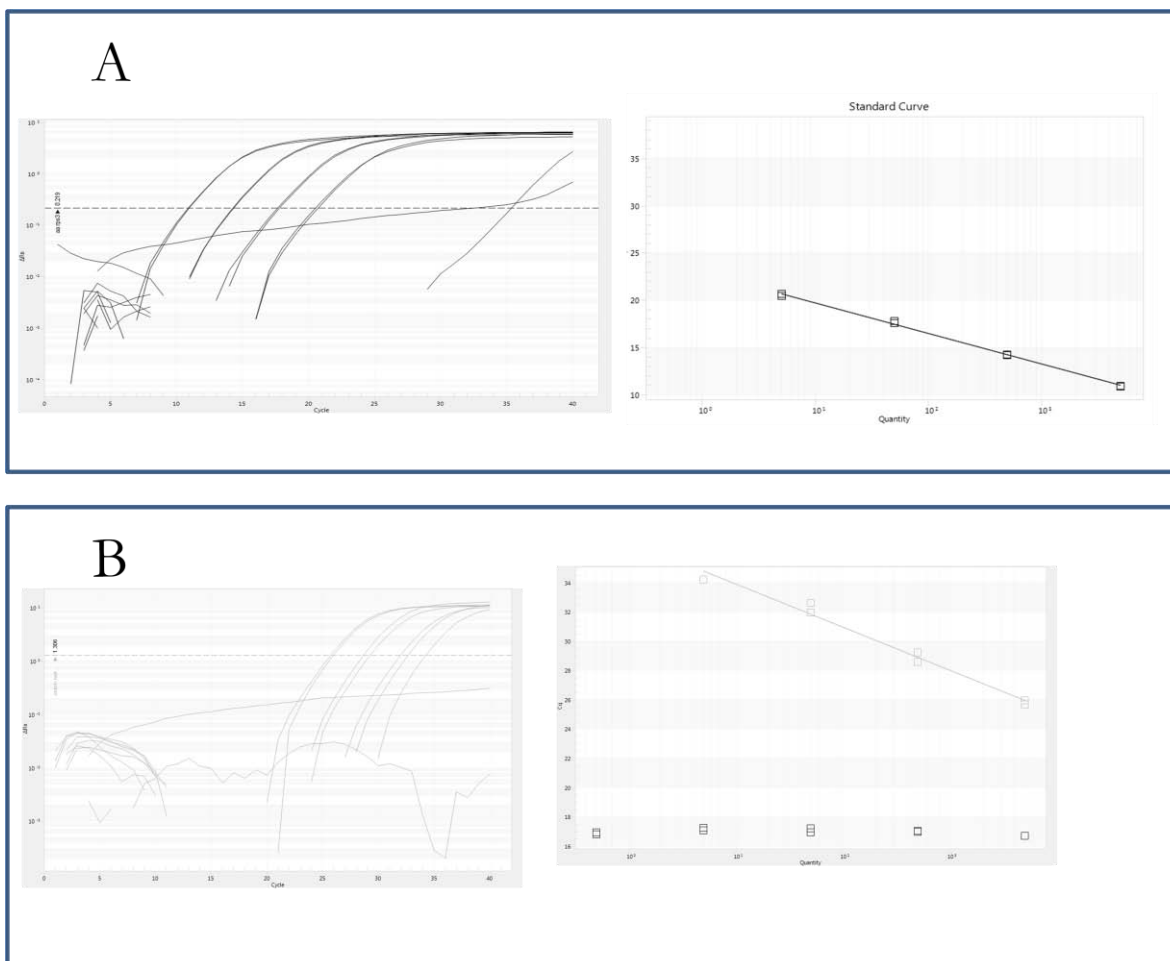
<b>Reprimidos</b>		<b>Inducidos</b>	
<b>GO ID</b>	Descripción	<b>GO ID</b>	Descripción
<b>GO:0006749</b>	glutathione metabolic process	<b>GO:0051258</b>	protein polymerization
<b>GO:0006729</b>	tetrahydrobiopterin biosynthetic process	<b>GO:0006184</b>	GTP catabolic process
<b>GO:0016197</b>	endosomal transport	<b>GO:0006915</b>	apoptotic process
<b>GO:1902358</b>	sulfate transmembrane transport	<b>GO:0009108</b>	coenzyme biosynthetic process
<b>GO:0006596</b>	polyamine biosynthetic process	<b>GO:0016998</b>	cell wall macromolecule catabolic process
<b>GO:0006081</b>	cellular aldehyde metabolic process	<b>GO:0046939</b>	nucleotide phosphorylation
<b>GO:0055085</b>	transmembrane transport	<b>GO:0035335</b>	peptidyl-tyrosine dephosphorylation
<b>GO:0016311</b>	dephosphorylation	<b>GO:0007017</b>	microtubule-based process
<b>GO:0006099</b>	tricarboxylic acid cycle	<b>GO:0007264</b>	small GTPase mediated signal transduction
		<b>GO:0006108</b>	malate metabolic process
		<b>GO:0048015</b>	phosphatidylinositol-mediated signaling
		<b>GO:0006188</b>	IMP biosynthetic process
		<b>GO:0018342</b>	protein prenylation
		<b>GO:0071363</b>	cellular response to growth factor stimulus

**Tablas 7.12. Categorías de procesos biológicos enriquecidos en genes robustos a las 12 h.**

## 7.7. Selección de genes blanco y prueba de oligonucleótidos

La validación de los cambios transcripcionales mediante una técnica distinta a RNAseq da mayor valor a los resultados del análisis bioinformático. En este proyecto realizamos esta validación por el método de la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa de transcripción reversa, o RT-qPCR por sus siglas en inglés. Con este objetivo en mente se seleccionaron 14 genes de los 1060 DEG entre DESeq2 y EdgeR. Esta selección se hizo con algunos criterios: un valor significativo ( $p_{adj}$  o FDR) muy bajo, que tuvieran un cambio amplio en niveles de expresión (mayor a 2), y que fueran detectados como DEG en más de una condición. No todos los genes seleccionados presentan todas las características pero fueron incluidos por su valor significativo y/o magnitud del cambio. Con el software Oligo 7 se utilizó la secuencia del transcrito de estos 15 genes para diseñar pares de oligonucleótidos que amplificaran un fragmento entre 100 y 200 pares de bases a una temperatura de 60° C, sin blancos adicionales, y que el fragmento estuviera contenido en el tercio 3' de las secuencias. La tabla 3 del apéndice I contiene las secuencias de estas parejas de oligonucleótidos.

El primer paso para establecer las condiciones del RT-qPCR era saber en qué concentraciones de ADNc se podía obtener señal clara y reproducible de los niveles de expresión de los transcritos, el rango dinámico efectivo en nuestras muestras. Para cumplir esto, se sintetizó ADNc a partir de diluciones seriadas equivalentes a 5000, 500, 50, 5 y 0.5 ng de ARN total de intestino de larvas de *A. aegypti*. Se utilizó un equipo Eco (Illumina) para obtener las curvas de amplificación de dos genes: un gen referencia rpS3 (AAEL008192) y un gen blanco, matrix metalloprotease (AAEL002661). La figura 7.8 muestra las curvas de amplificación con estas parejas. Empezando con 5000, 500 y hasta 50 ng de ARN total se obtienen curvas de amplificación con poca desviación estándar para el gen referencia. El gen blanco, que es menos abundante, sólo presenta curvas con baja desviación estándar cuando se utilizan 5000 y 500 ng de ARN total. Por este motivo se decidió que los ADNc se prepararían con 1 a 3 µg de ARN total. No se podía exceder una dilución 1:10 de los ADNc en el RT-qPCR ya que en el orden de decenas de ng de templado los genes menos abundantes podrían presentar mayor desviación estándar.

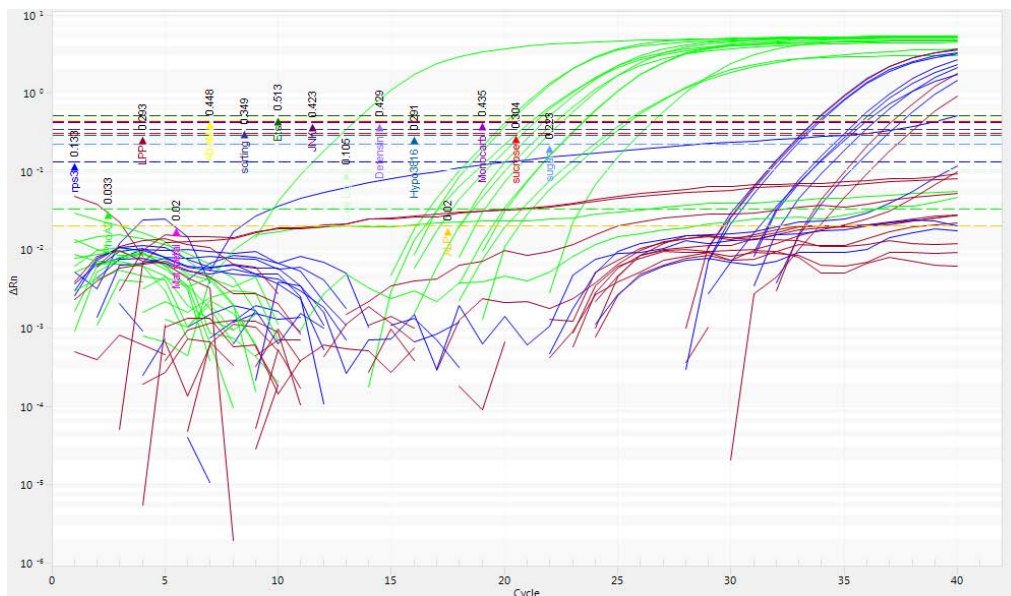


**Figura 7.8. Rango dinámico de amplificación por RT-qPCR para dos genes de *A. aegypti*.**

El panel A muestra la amplificación del gen referencia rpS3 y el panel B la amplificación de Matrix metalloproteinase.

El fragmento amplificado por las parejas de oligonucleótidos está contenido en su totalidad dentro de un exón único en su correspondiente gen, a excepción de los pares de oligonucleótidos usados para rpS3 y sucrose transporter protein (AAEL003633). Si después de la extracción y limpieza del ARN total de los intestinos de *A. aegypti* existiera algún remanente de ADN genómico, éste podría servir como templado para los oligonucleótidos y contribuir a la señal obtenida desde el ADNc. Se buscó analizar la posible contribución de esta contaminación de ADN genómico con nuestros oligonucleótidos. Se preparó ADNc de prueba con un total de 1.5 µg de ARN donde se incluyeron 300 ng de ARN total de cada uno de los 5 tiempos de una las réplicas biológicas de la curva de intoxicación de Cry11Aa que no

se analizaron por secuenciación masiva. Por otro lado, se preparó una reacción equivalente pero sin adicionar la enzima transcriptasa reversa. Con el ADNc prueba, la reacción sin transcriptasa reversa, y en agua libre de nucleasas se probó la amplificación de los 15 pares de oligonucleótidos. La figura 7.9 muestra los resultados de estas amplificaciones. Sólo algunos pares de oligonucleótidos amplifican en ausencia de templado, pero lo hacen en los últimos ciclos del programa, y aparentan ser productos de dímeros de oligonucleótidos. Algunos pares de oligonucleótidos amplifican en el templado sin transcriptasa reversa, lo que sugiere remanente de ADN genómico, pero la diferencia de Cq con la señal obtenida del ADNc prueba al menos de 10. Considerando que un par de oligonucleótidos 100% eficiente duplica la cantidad de material cada ciclo de RT-qPCR, esto indicaría que si existe contaminación de ADN genómico en las extracciones de ARN total esta se encuentran en el orden de  $2^{10}$  menos abundante que el ADNc generado a partir de los ARNm. Esto nos permitió suponer que las señales que observaríamos en los experimentos comparativos de expresión no tendrían aportación considerable de posibles remanentes de ADN genómico.



**Figura 7.9. Amplificación por RT-qPCR desde ARN total de *A. aegypti* con y sin transcriptasa reversa.** En verde se indican las curvas de amplificación desde ADNc con transcriptasa reversa, en azul aquellas sin la enzima, y en rojo la amplificación en agua libre de nucleasas.



## 7.8. Determinación de niveles de expresión por RT-qPCR de larvas intoxicadas

La comparación entre niveles de expresión en RT-qPCR se realizó mediante el método de  $\Delta\Delta C_q$ . En este método, primero se normaliza la señal de amplificación del gen blanco contra la amplificación del gen referencia en su propia muestra y después se comparan estos valores normalizados entre muestras distintas. No todas los pares de oligonucleótidos son 100% eficientes; esto depende de múltiples factores como el contenido de GC del gen o la abundancia del transcrito mismo. Por esta razón se requiere determinar la eficiencia de cada par de oligonucleótidos e introducir esta corrección al momento de estimar los niveles de expresión a partir de las diferencias en ciclos de amplificación entre dos genes. Se utilizó ADNc preparado a partir de la mezcla de ARN total de las diferentes condiciones como templado para realizar estas estimaciones. Se prepararon curvas estándar por triplicado de diluciones seriadas de ADNc con cada uno de los pares de oligonucleótidos. Estas curvas de amplificación fueron analizadas con el software EcoStudy (Illumina) para determinar la eficiencia de cada par de oligonucleótidos. La tabla 7.11 muestra la eficiencia de los 15 pares de oligonucleótidos utilizadas para la validación. Todas ellas tienen un ajuste de regresión lineal bueno ( $R^2 > 0.99$ ).

ID	Nombre	Regulación	Condiciones	Eficiencia	$R^2$
AAEL001523	Secretory Phospholipase A2	Inducido	6,9,12 h	89.77%	0.996
AAEL007704	Lipoma preferred partner	Inducido	6,9,12 h	96.13%	0.998
AAEL002661	Matrix metalloproteinase	Inducido	9,12 h	92.61%	0.995
AAEL005992	ADAM metalloproteinase	Inducido	6,9,12 h	93.69%	0.996
AAEL005655	Sorting Nexin	Inducido	6,9, 12 h	88.8%	0.997
AAEL006533	Ets domain containing protein	Inducido	6,9,12 h	103.35%	0.993
AAEL008622	JNK	Inducido	6,9, 12 h	87.09%	0.993
AAEL014664	AMP dependent Coa Ligase	Reprimido	6, 12 h	99.04%	0.996
AAEL003841	Defensin	Reprimido	3,9, y 12 h	90.18%	0.996

AAEL003816	antimicrobial peptide Conserved	Reprimido	3,9,12 h	101.3%	0.987
AAEL003905	hypothetical protein Alkaline	Reprimido	6 h	97.84%	0.997
AAEL008347	phosphatase Monocarboxylate	Reprimido	9 y 12 h	93.35%	0.995
AAEL003633	transporter Sucrose transport	Reprimido	9 y 12 h	92.02%	0.998
AAEL012903	protein Sugar transporter	Reprimido	12 h	95.29%	0.999
AAEL008192	40s ribosomal protein S3	Referencia	----	103.84%	0.998

***Tablas 7.11. Eficiencias de amplificación en RT-qPCR de los oligonucleótidos de genes de validación.***

### **7.8. Comparación de valores de niveles de expresión entre RT-qPCR y RNA-seq.**

Habiendo determinado los valores de corrección para los distintos pares de oligonucleótidos para los genes blanco, se realizaron las reacciones de RT-qPCR de todos ellos con ADNc preparado a partir de 3 µg de ARN total de cada una de las condiciones a evaluar. Para la validación de los niveles de expresión diferencial obtenidos de forma bioinformática se utilizó el ARN total obtenido de una las réplicas biológicas de la curva de intoxicación que no fue analizada por secuenciación masiva. Al igual que en el análisis de RNAseq, la condición referencia fue las 0 h de exposición a Cry11Aa. Adicionalmente, también se determinaron los niveles de expresión para las 0, 9 y 12 h de larvas no expuestas a toxina o expuestas a 500 ng/ml de las toxinas mutantes Cry11A-E97A y Cry11Aa-V142D. Los cristales de estas dos mutantes fueron producidos y purificados de la misma forma que los de Cry11Aa silvestre. Ambas mutantes están abatidas en toxicidad. Aunque son capaces de unir a los receptores en las células de la microvellosidad apical, la mutante E97A no puede formar oligómeros [113] y la mutante V142D que sí es capaz de oligomerizar no puede formar un poro funcional [114]. Habíamos corroborado esta falta de toxicidad en larvas de 4<sup>o</sup> instar de *A. aegypti* a 24 h, como se observa en la tabla 7.1. La utilización de estas dos toxinas mutantes nos permitiría ver que tan bien cotejan los datos de expresión de RNAseq de la toxina silvestre con aquellos de una toxina no funcional, lo cual nos ayudaría a saber si los cambios transcripcionales observados

responden a la presencia de la toxina o requieren de un proceso de formación de poro para desencadenarse.

Los datos de expresión relativa por RT-qPCR fueron determinados mediante el equipo Roche Light Cycler 480 y analizados con el software del dispositivo. Para comparar con los datos obtenidos de RNAseq, los niveles de expresión fueron convertidos a una escala  $\log_2$ . La ventaja de la escala logarítmica es que centra los valores de expresión en cero y es simétrica para niveles por encima o por debajo de la condición de referencia. Las figuras A.1 del apéndice I muestran de manera gráfica los valores de expresión por RT-qPCR y RNAseq en escala  $\log_2$  para todos los genes seleccionados en las diferentes condiciones examinadas. Para resumir estas comparaciones, se determinó la correlación de Spearman entre los datos de expresión de RNAseq y sus correspondientes valores en RT-qPCR. La figura 7.10 contiene todos los datos de correlación para los genes probados por RT-qPCR. Para casi el 80% de los genes seleccionados hay una alta correlación entre los datos obtenidos por RNAseq y los de RT-qPCR. Esto es una correlación alta, y dentro de los rangos de una validación buena dadas las diferencias experimentales de las dos técnicas. Todos los genes inducidos tuvieron buena correlación. Los tres genes que no correlacionaron eran señalados como reprimidos por la acción de la toxina Cry11Aa en el análisis de RNAseq. En comparación, los datos obtenidos de las larvas control que no estuvieron expuestas a toxina presentan sólo un 40% de genes que tienen buena correlación. Este nivel de correlación no es una validación aceptable entre réplicas biológicas analizadas con diferentes técnicas, por lo que no podrían considerarse fenómenos relacionados. Tampoco existe un porcentaje alto de genes con correlación fuerte positiva entre los datos de RNAseq y el RT-qPCR de las dos mutantes de Cry11Aa abatidas en toxicidad. Específicamente, el control con la mutante Cry11Aa-E97A que está afectada en oligomerización, y que por lo tanto no puede formar poros en la membrana, presenta una correlación de 7%. Es interesante observar que los genes que fueron determinados como inducidos por RNAseq son los que, de forma general, sí correlacionan con los datos de RT-qPCR de la curva de intoxicación y no con los datos de RT-qPCR sin toxina o con toxinas mutantes. Los genes reprimidos no muestran un perfil constante. Esto sugiere que en las condiciones analizadas hay un proporción de genes que sufren reducción en sus niveles de transcrito sin que sea una acción dirigida por la maquinaria de transcripción o remodelación de

cromatina, y quizá, por ejemplo, por alocaación de recursos como nucleótidos a la transcripción de genes inducidos

		Cry11Aa WT	Sin toxina	Cry11Aa E97A	Cry11Aa V142D	Regulación
Phospholipase A2	AAEL001523	0.987	-0.475	-0.913	0.374	inducido
Lipoma Preferred Partner	AAEL007704	0.822	-0.855	-0.004	-0.637	inducido
ADAM metalloprotease	AAEL005992	0.718	-0.803	-0.851	-0.997	inducido
Matrix Metalloproteinase	AAEL002661	0.769	-0.567	-0.944	-0.979	inducido
Ets Domain Containing Protein	AAEL006533	0.939	0.663	-0.806	-0.844	inducido
JNK	AAEL008622	0.983	0.788	-0.562	-0.626	inducido
Sorting Nexin	AAEL005655	0.819	-0.827	-0.59	-0.873	inducido
Sucrose transporter	AAEL003633	0.98	0.246	-0.974	0.864	reprimido
Sugar transport protein	AAEL012903	0.845	0.784	-0.098	0.978	reprimido
Monocarboxylate Transporter	AAEL008347	0.917	0.834	-0.383	0.851	reprimido
Defensin Antimicrobial Peptide	AAEL003841	0.761	-0.136	-0.92	0.537	reprimido
Hypothetical protein	AAEL003816	0.22	0.99	-0.574	0.596	reprimido
AMP Dependent CoA ligase	AAEL014664	-0.104	0.904	0.986	0.346	reprimido
Alkaline Phosphatase	AAEL003905	0.266	-0.024	0.456	0.661	reprimido

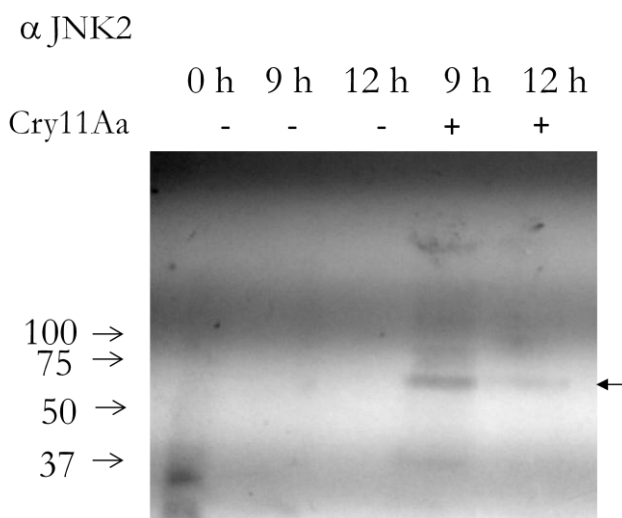
Porcentaje correlación positiva fuerte      78.6%      42.9%      7.1%      42.9%

**Figura 7.10. Correlación en niveles de expresión de genes entre RNAseq y RT-qPCR.** Los genes con correlación fuerte positiva (mayor a 0.5) se muestran en color morado, los genes con correlación débil positiva (entre 0.3 y 0.5) en gris, y los genes con baja, ninguna o correlación negativa en amarillo.

### 7.9 Corroboración de niveles de ARNm con niveles de proteína

Finalmente, se determinó el efecto de la intoxicación con Cry11Aa sobre los niveles de proteína de JNK, por su posible importancia en la regulación de la respuesta. Se intoxicaron larvas de *A. aegypti* con LC<sub>50</sub> de Cry11Aa por 9 y 12 h y se obtuvieron lisados proteicos a partir

del tejido intestinal. De cada lisado se tomó una cantidad equivalente de proteína total que se separó por SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. Una comprobación inicial de equivalencia de carga se hizo por tinción de rojo de Ponceau de la membrana y fue similar. Estos lisados proteicos fueron analizados mediante Western Blot usando anticuerpos  $\alpha$ -JNK, con especificidad para JNK de humano a falta de uno contra *A. aegypti*. La conservación de las MAPK permite cruce del anticuerpo en otros organismos. Como muestras control se utilizaron larvas sin toxina a las 0, 9 y 12 h. La figura 7.11 muestra una imagen de una de las réplicas del experimento. Podemos ver que el nivel de proteína JNK en ausencia de intoxicación no es detectable, mientras que una banda de aproximadamente 60 kDa, cercano al tamaño esperado para JNK, se vuelve visible cuando las larvas son expuestas a toxina. Esta visibilidad de proteína refleja los incrementos en nivel de transcrito de AAEL008622 visto por RNAseq y RT-qPCR. El anticuerpo utilizado fue desarrollado contra JNK de humano, por lo que las bandas adicionales podrían deberse a inespecificidad. También podríamos estar observando JNK en un complejo de alto peso molecular.



**Figura 7.11. Efecto de la toxina Cry11Aa en el nivel de proteína de JNK.** Western Blot  $\alpha$ -JNK de lisados de tejido intestinal. Los primeros tres carriles son sin exposición a toxina, los carriles 4 y 5 a una LC<sub>50</sub> de Cry11Aa silvestre. Se muestra el tiempo antes de disección. Las flechas y valores del lado izquierdo corresponden a pesos moleculares en kDa.

## 8. Discusión

La utilización de las toxinas de Bt para el control de la población de mosquitos de manera continua requiere que conozcamos que efectos puedan tener sobre los organismos blanco. En el control de plagas agrícolas, la aparición de insectos resistentes a toxinas Cry en poblaciones de distintos organismos es ya un problema en varios países ante el cual se han tenido que diseñar nuevas estrategias de cultivo e ingeniería molecular. Si bien no existen aún reportes de poblaciones silvestres de mosquitos resistentes a *Bti*, es factible suponer que en un futuro pudieran surgir mosquitos resistentes a estas toxinas. El aprovechamiento adecuado de este tipo de información nos permite tener un manejo más preciso de las ventajas provistas con las toxinas Cry ante otro tipo de herramientas de control y darle mayor longevidad a esta tecnología.

El conjunto de datos obtenidos a lo largo de este proyecto describen los cambios transcripcionales asociados a una respuesta de defensa ante la acción de la toxina Cry11Aa en el intestino de las larvas de *A. aegypti*. La actividad de una toxina formadora de poro puede llevar a la muerte o sobrevivencia de una célula o un organismo y ambos procesos involucran cambios importantes en el estado metabólico celular y a una compleja red de interacciones. Nosotros utilizamos una dosis intermedia de toxina que se había visto podía permitir la sobrevivencia de algunas larvas. Por definición, una dosis  $LC_{50}$  implica que a 24 h tendríamos una respuesta mixta dada por la igual proporción de larvas muertas y las larvas sobrevivientes. Por esto, las larvas analizadas sólo fueron aquellas que se mostraban sanas al momento de la disección y nosotros suponemos son aquellas que hasta ese instante habían sido exitosas en su defensa a la toxina. Por otro lado, las condiciones experimentales de intoxicación implementadas impiden que sepamos exactamente cuánta toxina ingiere cada larva y a qué ritmo; en cada tiempo analizado podría haber diferentes proporciones de larvas en diferentes etapas de intoxicación. De ahí se desprende que los primeros tiempos analizados presenten un menor número de genes diferencialmente expresados, quizá debido a que dominan las larvas que no han consumido suficiente toxina para provocar una respuesta de defensa a nivel transcripcional. Aprovechando la relativa transparencia de las larvas de *A. aegypti*, una modificación posible al protocolo sería la adición de un colorante que permitiera determinar con facilidad qué larvas han ingerido toxina. Una complicación derivada de esto sería que el

colorante mismo podría significar un estímulo adicional y que ofuscaría los resultados buscados al usar toxina purificada, requiriendo controles de toxicidad y secuenciación propios. Correspondiente a las larvas sobrevivientes, lo que pudimos determinar es que en aquellos tiempos más largos de exposición dominan las larvas con cambios transcripcionales significativos, llegando a involucrar cerca del 6% de los genes de *A. aegypti*, que no corresponden a cambios simplemente por el paso del tiempo. No sabemos si esta tendencia continúa más allá de las 12 h. Sin embargo, en el coleóptero *T. molitor* fue también a las 12 h de intoxicación donde se observó el mayor número de genes diferencialmente expresados [83] a pesar de la gran diferencia en el tiempo de su desarrollo y vida en comparación al mosquito *A. aegypti*. Así, aún cuando el metabolismo general de estos organismos sea distinto, a nivel celular los eventos bioquímicos y biofísicos provocados por la acción de la toxina obedecen a una misma escala temporal y espacial. Cabe mencionar que las proteínas de una célula pueden jugar papel en más de un proceso celular, por lo que no se puede descartar por completo que aquellos genes que son diferencialmente expresados tanto en ausencia o presencia de Cry11Aa tengan alguna influencia en la sobrevivencia de las larvas durante la intoxicación.

Otra evidencia que le da apoyo a los resultados transcriptómicos es que en nuestro proyecto realizamos un análisis de expresión mediante RT-qPCR para corroborar los datos de RNAseq. Los resultados obtenidos por RT-qPCR indican que sí existe validación de los cambios en niveles de expresión al utilizar una  $LC_{50}$  de Cry11Aa. Este no es el caso para las otras condiciones analizadas. No hubo parecido entre los perfiles transcriptómicos de RNAseq de 12 h sin toxina con los datos de RNAseq de larvas intoxicadas. De igual forma, no hubo una buena correlación entre el RT-qPCR de 9 y 12 h sin toxina y los datos de RNAseq de 9 y 12 h con toxina. Tampoco la hubo cuando ocupamos toxinas Cry11Aa incapaces de formar poro. Al menos para una proteína, JNK, también tenemos datos que sugieren que cambios en nivel de expresión de ARNm cotejan con la producción de esta proteína a las 9 y 12 h después de administrar la toxina Cry11Aa silvestre. En conjunto, nuestros resultados apoyan que los perfiles transcripcionales que interpretamos son realmente una respuesta a la actividad de formación de poro de la toxina. Se ha propuesto que la unión de una toxina Cry al receptor caderina podría ser suficiente para ejercer un efecto tóxico a través de la activación de la vía de PKA [115]. Con nuestros datos, podemos decir que al menos a nivel transcriptómico, la unión a receptores de membrana por una toxina Cry no es un estímulo suficiente para replicar la

respuesta completa de una célula que detecta permeabilidad en su membrana. Esto no descarta que la unión pueda despertar respuestas celulares, pero en todo caso no es plenamente semejante a la defensa montada ante un proceso que es una amenaza letal para el organismo. Además, a nivel transcriptómico no detectamos cambios significativos en la enzima PKA. Es interesante que los genes que mostraron la mayor distinción entre la réplica de la curva de  $LC_{50}$  y las otras condiciones analizadas por RT-qPCR son aquellos inducidos ante la intoxicación por Cry11Aa. La respuesta inducida parece ser definitivamente activada en respuesta a la formación de poro, mientras que la respuesta reprimida tiene un poco más de variabilidad, y puede suceder en respuesta a otros estados del organismo, como desarrollo o detección del agente foráneo sobre la membrana. En los genes diferencialmente expresados en todas las réplicas, al menos a las 12 h existe una relación 2:1 de genes inducidos a genes reprimidos, un dato que también sugiere que la inducción es más reproducible que la represión.

Este estudio nos aportó evidencia de varios procesos con un papel potencial importante en la defensa a toxinas Cry. Hay que recordar que el análisis de funciones es completamente dependiente de la cobertura y calidad de anotación para los genes del organismos en cuestión. A pesar de que *A. aegypti* es el insecto mejor anotado de aquellos que se han usado para transcriptómica en respuestas a toxinas Cry, aún muchos genes no tienen caracterización o función atribuida, no se encuentra al nivel de modelos como *Drosophila melanogaster* o *C. elegans*. Los resultados que hemos obtenido en este trabajo podrán ser incrementados o reinterpretados a medida que se mejoren las predicciones de funciones y las relaciones de ortología con otros organismos, para así incrementar la especificidad y sensibilidad de los análisis estadísticos.

Para empezar, el análisis de los resultados obtenidos mediante RNAseq muestran en varias ocasiones una inducción de componentes de las vías de señalización por GTPsas pequeñas. La superfamilia de las GTPsas pequeñas abarca cascadas de diversas proteínas intracelulares que se han caracterizado por participar en la regulación del desarrollo, respuesta a estrés y diferenciación. Diversos genes de la superfamilia intervienen en procesos de homeostasis del epitelio intestinal, tanto en mamíferos como en insectos [116, 117]. Nuevamente, en comparación con el estudio transcriptómico en *T. molitor*, las vías de las GTPsas Ras y Rho también fueron inducidas con la intoxicación con Cry3A [83]. En particular, la inducción de



componentes de las vías de ARF y Rab apuntan a la regulación del tráfico vesicular; nuestro análisis muestra un progresivo incremento en estas funciones entre los genes inducidos. Como se mencionó en la introducción, los procesos vesiculares como el reciclaje de endosomas se han asociado a mecanismos para retirar membrana dañada por toxinas formadoras de poro, como la  $\alpha$ -toxina de *S. aureus*, la estreptolisina-O de *Streptococcus pyogenes* y Cry5B. En específico, la ausencia de Rab-5 y Rab-11 en *C. elegans* conlleva un fenotipo de hipersensibilidad a la toxina Cry5B. Esta similitud entre diferentes toxinas y diferentes organismos sugiere que la promoción de la endocitosis es un mecanismo importante por el cual se puede retirar toxina de la membrana plasmática. Ésta es una respuesta conservada para la defensa a toxinas Cry.

El papel de las GTPsas pequeñas en la homeostasis epitelial también regula el establecimiento y mantenimiento de uniones estrechas entre las células epiteliales. Es interesante que encontramos inducidos dos homólogos de proteínas asociadas a este proceso celular a las 12 h de intoxicación, y que las funciones de síntesis de pared celular y unión a citoesqueleto se encuentren representadas entre los genes inducidos desde las 9 h de intoxicación. La observación de varios procesos regulados por GTPsas pequeñas necesarios para recuperar integridad celular y tisular resalta una importancia antes no atribuida a estas vías de señalización en la defensa a toxinas Cry y se perfilan como buenos candidatos para comprobar *in vivo*.

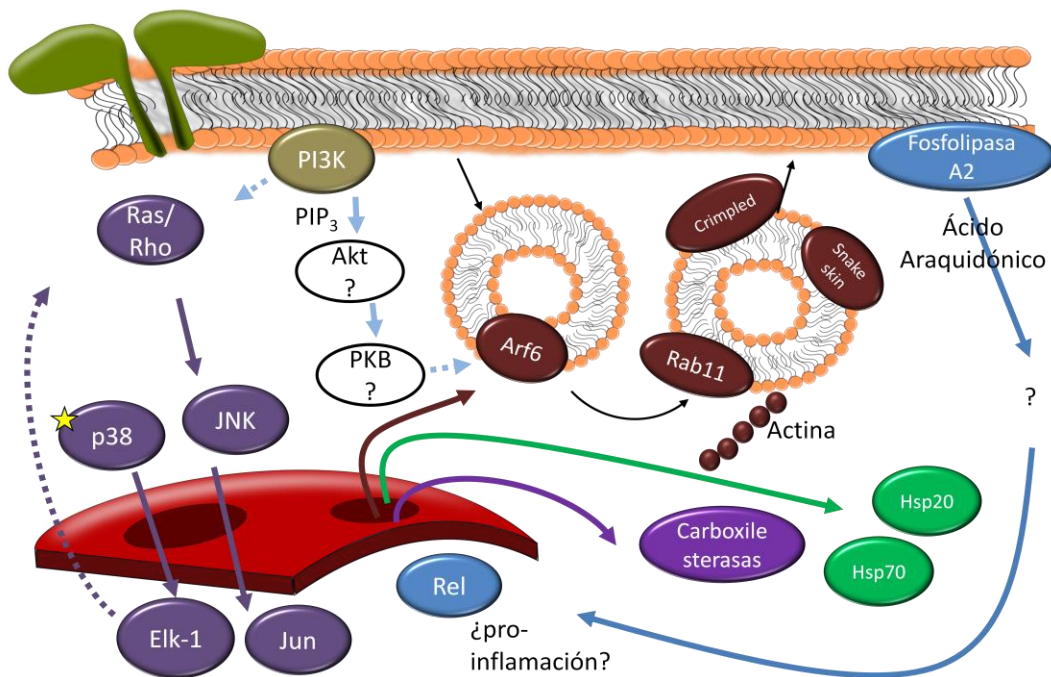
Reafirmando nuestra hipótesis, entre los genes inducidos sí encontramos componentes de vías de MAP cinasas lo cual es consistente con estudios previos de toxinas Cry [69, 83], en particular la inducción de JNK (y el factor transcripcional c-jun). Uno de los genes inducidos validados a través de RT-qPCR fue Ets domain-containing protein (AAEL006533), un homólogo a un factor transcripcional que es blanco de p38. Adicionalmente, existe interconexión entre las vías de señalización de las MAP cinasas y las GTPsas pequeñas [116], por lo que la presencia de inducción de genes de ambas podría ser indicativo de la activación de un módulo integrado de respuesta a formación de poro. Genes asociados a la señalización de PIP<sub>3</sub> también muestran inducción a las 6 h y a las 9 h. Esta vía también puede interconectar con las GTPsas pequeñas [116]. PIP<sub>3</sub> ha sido muy estudiado dentro del eje de la vía Akt-PKB. Aunque en nuestro análisis estas proteínas y funciones no fueron detectadas, cabe la posibilidad que estos componentes no sufran modificaciones en los niveles de sus transcritos,

sino a nivel post transcripcional o incluso post traduccional, como en el caso de la MAPK p38 en *A. aegypti* y *M. sexta* en donde se activa su fosforilación [74].

Otros genes notoriamente inducidos en diferentes tiempos de intoxicación están relacionados a la actividad de las fosfolipasas A2. Un producto enzimático de estas proteínas es la liberación de ácido araquidónico desde fosfolípidos de la membrana. El ácido araquidónico puede funcionar como molécula señalizadora para receptores nucleares y está asociado a la respuesta inflamatoria en mamíferos [118]. En *D. melanogaster* se ha propuesto que la respuesta inflamatoria podría tener un papel en la producción de factores de crecimiento y proliferación celular del epitelio intestinal [119] y tal mecanismo podría estar ocurriendo en el intestino de las larvas de *A. aegypti*. Recientemente se publicó un reporte de una activación de MAP cinasas mediada por ácido araquidónico asociada a adhesión celular [120]. Utilizando sólo los datos obtenidos en este proyecto no es posible saber si tal conexión existe en el mosquito. Para confirmar o refutar la posible interconexión, jerarquía, y temporalidad de estas diferentes vías de señalización inducidas durante la intoxicación se requieren complementar con otros experimentos bioquímicos y con silenciamiento de genes.

Existen otros procesos inducidos durante la intoxicación que llamaron nuestra atención. En primer lugar, diferentes chaperonas Hsp70, Hsp20 y  $\alpha$ -cristalinas aumentan su expresión y estarían encargadas de proteger la integridad de las proteínas celulares ante el estrés creado por la formación de poros en la membrana, por ejemplo como consecuencia de la activación de la vía UPR del retículo endoplásmico después de la detección del daño celular. Conservar debidamente plegadas las proteínas permitiría una más rápida recuperación de las células al contender con el daño membranal. Esto a su vez reduciría el uso de recursos celulares que se ocuparían para degradar y resintetizar los péptidos dañados, los cuales entonces podrían ser usados para la reconstitución de los componentes de membrana como una medida eficaz de supervivencia. Aún más destacado es el aumento en expresión de genes con una posible actividad de carboxilesterasas, desde las 6 h de intoxicación con Cry11Aa. Como se mencionó previamente, la resistencia en insectos a insecticidas [109, 121] y posiblemente a toxinas Cry ha sido asociada en algunos casos a una sobreexpresión y amplificación de genes con actividad de carboxilesterasas. En nuestros datos observamos que aún antes de que el cambio metabólico se fije genéticamente en una población, la actividad de carboxilesterasas ya se presenta como un

mecanismo relevante en la defensa transitoria a agentes de estrés como lo es la toxina Cry11Aa en mosquitos o la toxina Cry1Ab en *O. nubilalis*. Esto refuerza la noción que el análisis de las respuestas transitorias de defensa nos puede ayudar a predecir los potenciales cambios que podrían dar lugar a una resistencia genética en una población de insectos sujeta a presión selectiva por una toxina Cry. La figura 8.1 presenta un esquema que resume los procesos discutidos que sufren inducción transcripcional en el mosquito ante la intoxicación con la toxina Cry11Aa.



**Figura 8.1. Esquema de algunos de los procesos celulares más destacados inducidos en respuesta a Cry11Aa.** En verde se representa Cry11Aa integrada a la membrana plasmática y formando un poro.

La inducción de proteínas con posible actividad de carboxilesterasas es indicativo de la necesidad de destoxicación de la célula. Sin embargo, otros procesos regularmente inducidos en procesos de destoxicación se encuentran reprimidos, de acuerdo a nuestros datos. Este es el caso para la actividad de citocromos P450, glutatión y transportadores ABC. Este efecto es común con toxinas Cry en el coleóptero *T. molitor* [83], el lepidóptero *O. nubilalis* [85] y el nemátodo *C. elegans* [69]. Esta repetición es sugerente de una importancia evolutiva. La

resistencia a insecticidas químicos también puede darse por una mayor actividad de estas enzimas [122, 123]; la existencia de estas alteraciones metabólicas y genéticas es una de las razones para la implementación del uso de las toxinas de *Bt* como alternativa a los insecticidas convencionales. Los cambios transcripcionales detectados en este estudio indican que, al menos con respecto a Cry11Aa, *A. aegypti* no depende de la detoxificación provista por los citocromos P450 o los transportadores ABC para contender con este estrés. Recientemente se reportó que diferentes insecticidas pueden seleccionar distintos perfiles genéticos en *A. aegypti* [124] y que además la aparición de una tolerancia moderada a *Bti* involucra diferentes genes que la selección de resistencia a insecticidas químicos. En ese estudio se encontró que los insecticidas químicos provocaron sobreexpresión de precisamente genes de glutatión y citocromos P450, entre otros, mientras que las larvas tolerantes a *Bti* se decantaban hacia una sobreexpresión de endopeptidasas. Nuestro estudio de transcriptómica en larvas de mosquito sensibles corrobora que la respuesta de defensa ante toxinas insecticidas difiere hasta cierto punto de aquella asociada a la protección de insecticidas piretroides, neonicotinoides y carbamatos. Este tipo de diferencias apoyan que los efectos descritos no son una respuesta a estrés general e inespecífica sino que corresponden al daño particular ocasionado por Cry11Aa. En insectos lepidópteros se ha acumulado evidencia del papel de proteínas de la familia de los transportadores ABC en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, posiblemente como un receptor putativo [125-127]. Varios eventos de resistencia se asocian a mutaciones o cambios de expresión de estos transportadores. Es posible que los altos niveles de resistencia observados se deban a un efecto combinado de la pérdida de un receptor para la toxina y una disminución en la expresión, en respuesta al daño, de proteínas que podrían suplir su función.

También en similitud con el estudio de selección de resistencia de larvas de *A. aegypti* genes asociados a la respuesta innata muestran en general una represión transcripcional. Con ciertas variaciones, esta represión se puede seleccionar tanto para insecticidas químicos como biológicos [124]. Los autores de ese estudio atribuyen esta reducción a una compensación del costo metabólico que implicaría la síntesis de péptidos antimicrobianos y tener una respuesta inmune altamente activada a la par de la respuesta al insecticida, de la misma forma que tener dos distintos estados de detoxificación es costoso energéticamente. El mismo raciocinio puede ser aplicado para el caso de la respuesta transitoria inicial a la intoxicación por Cry11Aa que observamos en este proyecto. De hecho, son los genes de inmunidad innata los que

componen el bloque de genes con mayor represión durante la curva de intoxicación. Aún así, existen ciertas diferencias, ya que vimos algunos genes asociados a inmunidad innata inducidos a las 12 h. La compensación observada en selección a largo plazo puede diferir de la respuesta transitoria. Sin embargo, el hecho de encontrar evidencia de coincidencias en ambos procesos, como en el caso de las carboxilesterasas, indica que a horas de iniciar intoxicación con Cry11Aa se pueden vislumbrar indicios del perfil que podría fijarse como fenotipo de resistencia.

Una categoría que nos sorprendió por encontrarse reprimida, pero que puede enmarcarse en la discusión de compensación metabólica, son las funciones de transporte transmembranal. Nuestra hipótesis inicial suponía que ante la pérdida de impermeabilidad de la membrana y la disipación de gradientes de iones y solutos habría un esfuerzo celular de recomponer dichos gradientes. Sin embargo, observamos de forma general que el transporte es reducido. *O. nubilalis* presentó un fenotipo similar al ser retada con Cry1Ab. El transporte de metabolitos a través de la membrana plasmática es un proceso en general costoso energéticamente. Es probable que los recursos energéticos que se destinarían al transporte se desvíen a las funciones inducidas como la reparación de membrana. Adicionalmente, mientras la integridad de la membrana no sea restituida, el material transportado a través de la membrana podría regresar a su origen a través de los poros, si su tamaño molecular lo permite; la señal celular podría ser parar estos procesos mientras no se detecte que la membrana ha sido sellada. Relacionado a este uso de recursos, observamos una represión en funciones del metabolismo central y la replicación celular. Aquí también existe cierta coincidencia con la respuesta en *T. molitor* y *C. elegans*. Ante la perforación de la célula no parece ser posible mantener operativas estas funciones básicas, que se mantienen en pausa posiblemente hasta completar la reparación de la integridad membranal e intercelular. De ser así, como indican nuestros datos, el restablecimiento de estabilidad membranal y uniones estrechas intercelulares antecede al reinicio de programas de replicación y metabolismo basal; nuestro último punto analizado podría ser el principio de su reactivación para restituir tejido. Seguir los cambios celulares más allá de las 12 h, incluso con experimentos para detectar proliferación celular en cortes histológicos, podría confirmar o refutar estas observaciones.

Pese a todos los procesos celulares que hemos descrito en este trabajo, hay que tener en mente que los cambios en expresión de genes son sólo uno de los múltiples tipos de regulación que las células poseen. Se ha confirmado que procesos importantes para la sobrevivencia se regulan más allá de ARNm. La MAPK p38 es regulada ante la intoxicación con toxinas Cry únicamente a nivel de fosforilación de la proteína. Asimismo, en *A. aegypti*, el ramal dependiente de XBP-1 de la respuesta UPR del retículo endoplásmico juega un papel importante en la defensa a Cry11Aa [128] sin que haya cambios a nivel de transcrito, sino a nivel de regulación de la traducción del transcrito. La información que hemos extraído a partir de la secuenciación de mensajeros nos apunta en la dirección de aquello que puede ser importante para la sobrevivencia de las larvas pero nuestro entendimiento certero de esto requerirá de la incorporación de datos provenientes de otras técnicas que evalúen otros cambios celulares, por ejemplo proteómica, fosfoproteómica, o perfiles de metabolitos.

También se debe considerar que aunque observamos ciertos procesos con transcripción diferencial y especulamos acerca de las interconexiones entre ellos, no obstante es requerido saber si estos procesos en efecto tienen una relevancia *in vivo* durante la intoxicación. La diferencia de las mutaciones en los receptores de toxinas, que generalmente tienen impactos importantes con modificaciones en un solo gen, la contribución de cada gen individual de los procesos celulares elucidados es menor y es la acumulación de pequeñas contribuciones las que consolidan un estado de defensa eficiente. Algunos genes podrían tener isoformas o genes duplicados que suplan su lugar en experimentos de pérdida de función o abatimiento por silenciamiento.

Aunque hemos encontrado similitudes entre los procesos de defensa provocados en insectos e invertebrados con considerable separación filogenética, es claro que los perfiles transcriptómicos no son idénticos, en ocasiones hasta invocan discrepancias, como con las aproximaciones transcriptómicas preliminares realizadas hace algunos años con los lepidópteros *Choristoneura fumiferana* [86] y *Spodoptera frugiperda* [87]. Esto nos indica que aún hay mucho que entender, incluso a nivel de cambios en abundancia de transcritos, y que posiblemente cada especie vaya a presentar cambios particulares. A medida que la utilización de tecnologías como la secuenciación masiva de ARNm sea más rutinaria podremos empezar a extraer más y mejores datos de expresión con organismos no secuenciados y con poca

representación en bases de datos, como fue el caso de estos dos lepidópteros. Los insectos plaga de cultivo y vectores de enfermedades seguirán siendo un problema para las poblaciones humanas por mucho tiempo aún, y requeriremos tener herramientas para estudiarlos, compararlos, y agentes con los cuáles controlarlos. De esta forma, los datos generados a través del presente estudio poseen un valor elevado para futuros esfuerzos de análisis de respuesta a toxinas Cry en insectos, pero también para los mecanismos de respuesta a toxinas formadoras de poro en general.

## 9. Conclusiones

El incremento de las enfermedades transmitidas por mosquitos es y resulta cada vez más un problema de salud costoso y perjudicial para el desarrollo propicio de las comunidades. Determinar la forma que en estos organismos contienen con un agente de control biológico nos permite anticiparnos al desarrollo de resistencias y nos da un conocimiento más integral del mecanismo de acción de las toxinas Cry. En este trabajo pudimos llegar a algunas conclusiones, que se enlistan a continuación:

- La respuesta transcripcional de larvas de *A. aegypti* a la intoxicación por Cry11Aa no es inmediata y es mayor mientras se prolonga el tiempo de exposición. A las 12 h de intoxicación, esta respuesta puede involucrar hasta el 6% de los genes predichos para este mosquito.
- Se confirma un papel relevante de las MAP cinasas en la respuesta a Cry11Aa, sobre todo la MAPK JNK.
- La inducción de las cascadas de las GTPsas pequeñas Rho/Rab/ARF/Ras también tiene un papel importante en la defensa a Cry11Aa en *A. aegypti*, mecanismo aparentemente compartido con otros organismos expuestos a toxinas Cry.

- La señalización mediada por metabolitos derivados de lípidos de membrana, como son PIP3 y ácido araquidónico, podrían también activar mecanismos de defensa en el epitelio intestinal del mosquito.
- El tráfico vesicular, sobre todo la endocitosis/exocitosis, podría ser el mecanismo preferencial mediante el cual la célula retira y elimina toxina Cry11Aa de las membranas de las células intestinales. Estos mecanismos, modulados por GTPsas pequeñas, podrían también estar involucrados en restablecer las uniones estrechas en este tejido.
- Algunos procesos centrales del metabolismo celular son reprimidos en presencia de daño a la membrana de las células del intestino de las larvas, así como el transporte de solutos a través de la membrana.
- La replicación celular aparentemente se detiene a principios de la intoxicación, para restituirse a tiempos más largos, quizá para reponer células dañadas en el epitelio intestinal.
- La respuesta inmune innata tiene un comportamiento complejo en la respuesta de defensa, donde los péptidos antimicrobianos son reprimidos, pero algunas vías de señalización como Toll-like y Hopscotch se inducen a tiempos prolongados de intoxicación.
- A excepción de las carboxilesterasas, que son inducidas, los mecanismos clásicos de detoxificación de insecticidas como glutatión transferasas, transportadores ABC, y citocromos P450 se encuentran reprimidos a lo largo de la intoxicación con Cry11Aa.
- Existe similitud general en los procesos biológicos regulados diferencialmente en respuesta a toxinas Cry en *A. aegypti*, *T. molitor*, *C. elegans* y *O. nubilalis*, así como con larvas de mosquitos tolerantes a *Bti*. Esto podría sugerir una conexión en la respuesta transitoria y los genotipos de resistencia basal en insectos.



## 10. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este proyecto representan sólo una aproximación a los procesos celulares que pueden ocurrir en las células del epitelio intestinal en respuesta a toxinas Cry. De aquí que se desprendan múltiples perspectivas que ayudarían a reforzar y complementar el panorama descrito por nuestros datos.

- La diferencia en porcentaje de lecturas alineadas con el genoma y con el transcriptoma sugieren que pueden existir genes o exones transcritos que no están descritos en la base de datos. La reconstrucción del transcriptoma con Trinity permitiría descubrir si existen tales genes o exones, y con ello determinar si algunos están diferencialmente expresados.
- La diferencia en respuesta transcriptómica en larvas resistentes a insecticidas químicos y la respuesta transitoria a toxinas Cry sugiere que existe especificidad. Hacer estudios transcriptómicos con otros agentes de estrés como metales pesados permitiría ver si realmente existe un módulo específico para contender con formación de poro.
- Los datos de transcriptómica se complementarían con datos de estudios proteómicos, pero sobre todo fosfoproteómicos para monitorear la regulación post-traducciona de aquellos genes que no tienen cambios en niveles de ARN mensajero.
- El análisis de las regiones reguladoras de los genes con perfiles similares de expresión a lo largo de la intoxicación podría revelar motivos críticos, como secuencias de unión para factores de transcripción involucrados para la defensa a toxinas Cry. Estos factores de transcripción podrían ser blancos interesantes para inhibir y mejorar la toxicidad de preparaciones de *Bt*.
- El desarrollo de métodos de edición genética como CRISPR/Cas9 facilitarían la generación de mosquitos knock-out para confirmar *in vivo* la participación de algunas de las vías descritas en este proyecto en la defensa a toxinas Cry en insectos.

- Al conocer algunas vías involucradas en la defensa a toxinas Cry, se podrían buscar inhibidores de estas proteínas y enzimas que se podrían incorporar a una preparación de *Bt*, con lo cual potencialmente se requeriría una dosis menor de toxina para tener el nivel de control deseado.
- Realizar un análisis de RNAseq similar con las larvas que dejan de moverse, y por lo tanto están en proceso de muerte, podría ayudarnos a comprender cuales son los cambios que llevan a la muerte de las larvas.

## 11. Bibliografía

1. Weissenböck, H., et al., *Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 271-80.
2. WHO. *Dengue and Severe Dengue*. September, 2013 [cited 2013 22 November]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.
3. Tsetsarkin, K.A. and S.C. Weaver, *Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence*. PLoS Pathog, 2011. **7**(12): p. e1002412.
4. WHO, *World Malaria Report 2013*. 2013, World Health Organization.
5. Takala-Harrison, S. and M.K. Laufer, *Antimalarial drug resistance in Africa: key lessons for the future*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1342**: p. 62-7.
6. Montoya-Lerma, J., et al., *Malaria vector species in Colombia: a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011. **106 Suppl 1**: p. 223-38.
7. *Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial*. Lancet, 2015. **386**(9988): p. 31-45.
8. Murray, K.O., et al., *West Nile virus, Texas, USA, 2012*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(11): p. 1836-8.
9. WHO. *Lymphatic Filariasis*. 2016 February 2016; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs102/en/>.
10. Gotuzzo, E., S. Yactayo, and E. Cordova, *Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years*. Am J Trop Med Hyg, 2013. **89**(3): p. 434-44.
11. Bhatt, S., et al., *The global distribution and burden of dengue*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 504-507.
12. *Toxicological profile for DDT, DDE, DDD*, A.f.T.S.a.D. Registry, Editor. 2002, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service: Atlanta, GA.
13. Icaza, J.T., *El Mosquito Aedes aegypti y el dengue en México*. 2010, Ciudad de México: Bayer Environmental Science.
14. WHO. *Chikungunya Fact Sheet*. 2016 April 2016; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>.
15. WHO. *Microcephaly/Zika Virus*. 2016 February 2016 [cited 2016 March 8th]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>.
16. Becker, N., et al., *Biology of Mosquitoes*, in *Mosquitoes and Their Control*, N. Becker, Editor. 2010, Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg. p. 9-25.
17. Volkmann, A. and W. Peters, *Investigations on the midgut caeca of mosquito larvae-II. Functional aspects*. Tissue Cell, 1989. **21**(2): p. 253-61.
18. Boudko, D.Y., et al., *In situ analysis of pH gradients in mosquito larvae using non-invasive, self-referencing, pH-sensitive microelectrodes*. J Exp Biol, 2001. **204**(Pt 4): p. 691-9.
19. Kokoza, V.A., et al., *Transcriptional regulation of the mosquito vitellogenin gene via a blood meal-triggered cascade*. Gene, 2001. **274**(1-2): p. 47-65.
20. Gabrieli, P., et al., *Sexual transfer of the steroid hormone 20E induces the postmating switch in Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(46): p. 16353-8.
21. Franz, A.W., et al., *Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes*. Viruses, 2015. **7**(7): p. 3741-67.
22. Joy, T.K., et al., *Aging field collected Aedes aegypti to determine their capacity for dengue transmission in the southwestern United States*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46946.
23. Becker, N., et al., *Chemical Control*, in *Mosquitoes and Their Control*, N. Becker, Editor. 2010, Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg. p. 441-475.
24. Sivagnaname, N., D.D. Amalraj, and T. Mariappan, *Utility of expanded polystyrene (EPS) beads in the control of vector-borne diseases*. Indian J Med Res, 2005. **122**(4): p. 291-6.
25. Becker, N., et al., *Physical Control*, in *Mosquitoes and Their Control*, N. Becker, Editor. 2010, Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg. p. 476-481.
26. Zaim, M., *Global Insecticide Use for Vector-Borne Disease Control*. Third Edition ed. 2007: World Health Organization.
27. Jirakanjanakit, N., et al., *Trend of temephos resistance in Aedes (Stegomyia) mosquitoes in Thailand during 2003-2005*. Environ Entomol, 2007. **36**(3): p. 506-11.
28. Hargreaves, K., et al., *Anopheles funestus resistant to pyrethroid insecticides in South Africa*. Med Vet Entomol, 2000. **14**(2): p. 181-9.

29. Becker, N., et al., *Biological Control*, in *Mosquitoes and Their Control*, N. Becker, Editor. 2010, Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg, p. 405-433.
30. Hammond, A., et al., *A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae**. *Nat Biotechnol*, 2016. **34**(1): p. 78-83.
31. Gantz, V.M., et al., *Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(49): p. E6736-43.
32. Kistler, K.E., L.B. Vosshall, and B.J. Matthews, *Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti**. *Cell Rep*, 2015. **11**(1): p. 51-60.
33. Carvalho, D.O., et al., *Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. **9**(7): p. e0003864.
34. Joubert, D.A., et al., *Establishment of a *Wolbachia* Superinfection in *Aedes aegypti* Mosquitoes as a Potential Approach for Future Resistance Management*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(2): p. e1005434.
35. Chalegre, K.D., et al., *Detection of an allele conferring resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex quinquefasciatus* populations by molecular screening*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(4): p. 1044-9.
36. Bravo, A., et al., **Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011. **41**(7): p. 423-31.
37. Ben-Dov, E., **Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and its dipteran-specific toxins*. *Toxins (Basel)*, 2014. **6**(4): p. 1222-43.
38. Becker, N., *Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies*, in *Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application*, J.-F. Charles, A. Delécluse, C. Nielsen-LeRoux, Editor. 2000, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, Netherlands. p. 383-398.
39. Wirth, M.C., G.P. Georgioui, and B.A. Federici, **CytA* enables *CryIV* endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of *CryIV* resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10536-40.
40. Perez, C., et al., **Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis *Cyt1Aa* synergizes *Cry11Aa* toxin by functioning as a membrane-bound receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(51): p. 18303-8.
41. Canton, P.E., et al., *Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis *Cry4Ba* to *Cyt1Aa* has an important role in synergism*. *Peptides*, 2011. **32**(3): p. 595-600.
42. Crickmore, N., et al., *Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. **62**(3): p. 807-13.
43. Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberon, *Mode of action of *Bacillus thuringiensis* *Cry* and *Cyt* toxins and their potential for insect control*. *Toxicon*, 2007. **49**(4): p. 423-35.
44. Soberon, M., et al., *Mode of action of mosquitoicidal *Bacillus thuringiensis* toxins*. *Toxicon*, 2007. **49**(5): p. 597-600.
45. Pardo-Lopez, L., M. Soberon, and A. Bravo, **Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain *Cry* toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection*. *FEMS Microbiol Rev*, 2013. **37**(1): p. 3-22.
46. Pacheco, S., et al., *Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* *Cry1Ab* toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(47): p. 32750-7.
47. Weng, Y.P., et al., *Functional domains of a pore-forming cardiotoxic protein, volvatoxin A2*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(8): p. 6805-14.
48. Liu, W.H. and L.S. Chang, *Reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of U937 cells in response to *Naja nigricollis* toxin-gamma*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(8B): p. 1695-705.
49. Bubeck, D., *The making of a macromolecular machine: assembly of the membrane attack complex*. *Biochemistry*, 2014. **53**(12): p. 1908-15.
50. Peraro, M.D. and F.G. van der Goot, *Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion*. *Nat Rev Microbiol*, 2016. **14**(2): p. 77-92.
51. McClane, B.A. and G. Chakrabarti, *New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin*. *Anaerobe*, 2004. **10**(2): p. 107-14.
52. Nelson, K.L., R.A. Brodsky, and J.T. Buckley, *Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of *T lymphomas**. *Cell Microbiol*, 1999. **1**(1): p. 69-74.
53. Stringaris, A.K., et al., *Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase*. *Neurobiol Dis*, 2002. **11**(3): p. 355-68.
54. Wiles, T.J., et al., *Inactivation of host *Akt*/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(4): p. 1427-38.
55. Timmer, A.M., et al., **Streptolysin O* promotes group *A* *Streptococcus* immune evasion by accelerated macrophage apoptosis*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(2): p. 862-71.

56. Fink, S.L., T. Bergsbaken, and B.T. Cookson, *Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4312-7.
57. Popova, T.G., et al., *Acceleration of epithelial cell syndecan-1 shedding by anthrax hemolytic virulence factors*. BMC Microbiol, 2006. **6**: p. 8.
58. Keyel, P.A., et al., *Streptolysin O clearance through sequestration into blebs that bud passively from the plasma membrane*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 14): p. 2414-23.
59. Corrotte, M., et al., *Toxin pores endocytosed during plasma membrane repair traffic into the lumen of MVBs for degradation*. Traffic, 2012. **13**(3): p. 483-94.
60. Idone, V., et al., *Repair of injured plasma membrane by rapid Ca<sup>2+</sup>-dependent endocytosis*. J Cell Biol, 2008. **180**(5): p. 905-14.
61. Husmann, M., et al., *Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis*. FEBS Lett, 2009. **583**(2): p. 337-44.
62. Los, F.C., et al., *RAB-5- and RAB-11-dependent vesicle-trafficking pathways are required for plasma membrane repair after attack by bacterial pore-forming toxin*. Cell Host Microbe, 2011. **9**(2): p. 147-57.
63. Kloft, N., et al., *Pro-autophagic signal induction by bacterial pore-forming toxins*. Med Microbiol Immunol, 2010. **199**(4): p. 299-309.
64. Gutierrez, M.G., et al., *Protective role of autophagy against Vibrio cholerae cytolysin, a pore-forming toxin from V. cholerae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1829-34.
65. Meyer-Morse, N., et al., *Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during Listeria monocytogenes infection*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8610.
66. Gurcel, L., et al., *Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1135-45.
67. Krishna, M. and H. Narang, *The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(22): p. 3525-44.
68. Stassen, M., et al., *The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways*. Infect Immun, 2003. **71**(11): p. 6171-7.
69. Kao, C.Y., et al., *Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins*. PLoS Pathog, 2011. **7**(3): p. e1001314.
70. Husmann, M., et al., *Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming S. aureus alpha-toxin or streptolysin O*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(4): p. 1128-34.
71. Ratner, A.J., et al., *Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12994-8.
72. Nagahama, M., et al., *The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against Clostridium perfringens beta-toxin*. Infect Immun, 2013. **81**(10): p. 3703-8.
73. Huffman, D.L., et al., *Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(30): p. 10995-1000.
74. Cancino-Rodezno, A., et al., *The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem Mol Biol, 2010. **40**(1): p. 58-63.
75. Bogoyevitch, M.A. and B. Kobe, *Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(4): p. 1061-95.
76. Cuadrado, A. and A.R. Nebreda, *Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling*. Biochem J, 2010. **429**(3): p. 403-17.
77. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
78. Nonis, A. and B. De Nardi, *Choosing between RT-qPCR and RNA-seq: a back-of-the-envelope estimate towards the definition of the break-even-point*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**(15): p. 3533-6.
79. Jaluria, P., et al., *A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses*. Microb Cell Fact, 2007. **6**: p. 4.
80. Liu, L., et al., *Comparison of next-generation sequencing systems*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 251364.
81. Quail, M.A., et al., *A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers*. BMC Genomics, 2012. **13**: p. 341.
82. Huang, H.C., Y. Niu, and L.X. Qin, *Differential Expression Analysis for RNA-Seq: An Overview of Statistical Methods and Computational Software*. Cancer Inform, 2015. **14**(Suppl 1): p. 57-67.
83. Oppert, B., et al., *Transcriptome profiling of the intoxication response of Tenebrio molitor larvae to Bacillus thuringiensis Cry3Aa protoxin*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34624.

84. Sparks, M.E., et al., *Transcriptome of the Lymantria dispar (gypsy moth) larval midgut in response to infection by Bacillus thuringiensis*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e61190.
85. Yao, J., et al., *Changes in gene expression in the larval gut of Ostrinia nubilalis in Response to Bacillus thuringiensis Cry1Ab protoxin ingestion*. Toxins (Basel), 2014. **6**(4): p. 1274-94.
86. Meunier, L., et al., *Transcriptional response of Choristoneura fumiferana to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from Bacillus thuringiensis*. Insect Mol Biol, 2006. **15**(4): p. 475-83.
87. Rodriguez-Cabrera, L., et al., *Molecular characterization of Spodoptera frugiperda-Bacillus thuringiensis Cry1Ca toxin interaction*. Toxicon, 2008. **51**(4): p. 681-92.
88. Akbari, O.S., et al., *The developmental transcriptome of the mosquito Aedes aegypti, an invasive species and major arbovirus vector*. G3 (Bethesda), 2013. **3**(9): p. 1493-509.
89. Bonizzoni, M., et al., *RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, Aedes aegypti*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 82.
90. Bonizzoni, M., et al., *Complex modulation of the Aedes aegypti transcriptome in response to dengue virus infection*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50512.
91. David, J.P., et al., *Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito Aedes aegypti using mRNA sequencing*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 174.
92. Despres, L., et al., *Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to Bacillus thuringiensis israelensis toxins*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 926.
93. Lee, S.B., K.G. Aimanova, and S.S. Gill, *Alkaline phosphatases and aminopeptidases are altered in a Cry11Aa resistant strain of Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol, 2014. **54**: p. 112-21.
94. Stalinski, R., et al., *Alkaline phosphatases are involved in the response of Aedes aegypti larvae to intoxication with Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Cry toxins*. Environ Microbiol, 2016. **18**(3): p. 1022-1036.
95. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
96. Giraldo-Calderon, G.I., et al., *VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D707-13.
97. Kim, D., et al., *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions*. Genome Biol, 2013. **14**(4): p. R36.
98. Anders, S. and W. Huber, *Differential expression analysis for sequence count data*. Genome Biol, 2010. **11**(10): p. R106.
99. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
100. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics, 2010. **26**(1): p. 139-40.
101. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2*. 2014.
102. Alexa, A. and J. Rahnenfuhrer, *topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology*. 2010. p. R package.
103. Alexa, A., J. Rahnenfuhrer, and T. Lengauer, *Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure*. Bioinformatics, 2006. **22**(13): p. 1600-1607.
104. Saldanha, A.J., *Java Treview--extensible visualization of microarray data*. Bioinformatics, 2004. **20**(17): p. 3246-8.
105. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
106. Winnebeck, E.C., C.D. Millar, and G.R. Warman, *Why does insect RNA look degraded?* J Insect Sci, 2010. **10**: p. 159.
107. Nene, V., et al., *Genome sequence of Aedes aegypti, a major arbovirus vector*. Science, 2007. **316**(5832): p. 1718-23.
108. Burke, J.E. and E.A. Dennis, *Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S237-42.
109. Grigoraki, L., et al., *Transcriptome Profiling and Genetic Study Reveal Amplified Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance, in the Asian Tiger Mosquito Aedes albopictus*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(5): p. e0003771.
110. Araujo, A.R., et al., *The Drosophila melanogaster methuselab gene: a novel gene with ancient functions*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63747.
111. Nilton, A., et al., *Crooked, coiled and crimped are three Ly6-like proteins required for proper localization of septate junction components*. Development, 2010. **137**(14): p. 2427-37.
112. Yanagihashi, Y., et al., *Snakeskin, a membrane protein associated with smooth septate junctions, is required for intestinal barrier function in Drosophila*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 8): p. 1980-90.

113. Carmona, D., et al., *Dominant negative phenotype of Bacillus thuringiensis Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba mutants suggest hetero-oligomer formation among different Cry toxins*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19952.
114. Munoz-Garay, C., et al., *Oligomerization of Cry11Aa from Bacillus thuringiensis has an important role in toxicity against Aedes aegypti*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(23): p. 7548-50.
115. Zhang, X., et al., *A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 9897-902.
116. Citalan-Madrid, A.F., et al., *Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms*. Tissue Barriers, 2013. **1**(5): p. e26938.
117. Citi, S., et al., *Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome*. Small GTPases, 2014. **5**(4): p. 1-15.
118. Stenson, W.F., *The universe of arachidonic acid metabolites in inflammatory bowel disease: can we tell the good from the bad?* Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(4): p. 347-51.
119. Panayidou, S. and Y. Apidianakis, *Regenerative inflammation: lessons from Drosophila intestinal epithelium in health and disease*. Pathogens, 2013. **2**(2): p. 209-31.
120. Garcia, M.C., et al., *Arachidonic acid stimulates cell adhesion through a novel p38 MAPK-RhoA signaling pathway that involves heat shock protein 27*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20936-45.
121. Poupardin, R., et al., *Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(3): p. e2743.
122. Che-Mendoza, A., *Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review*. African Journal of Biotechnology, 2009. **8**(8): p. 1386-1397.
123. Bariami, V., et al., *Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, Aedes aegypti*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(6): p. e1692.
124. Despres, L., et al., *Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in Aedes aegypti mosquito*. Biol Lett, 2014. **10**(12): p. 20140716.
125. Ocelotl, J., et al., *Binding and Oligomerization of Modified and Native Bt Toxins in Resistant and Susceptible Pink Bollworm*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144086.
126. Tanaka, S., et al., *The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in Bombyx mori larvae is a functional receptor for Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. FEBS J, 2013. **280**(8): p. 1782-94.
127. Gahan, L.J., et al., *An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac toxin*. PLoS Genet, 2010. **6**(12): p. e1001248.
128. Bedoya-Perez, L.P., et al., *Role of UPR pathway in defense response of Aedes aegypti against Cry11Aa toxin from Bacillus thuringiensis*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 8467-78.

## **Apéndice I: Tablas y figuras adicionales de resultados**



*Tabla A.1. Términos enriquecidos en los grupos de genes de perfil similar*

Grupo	GO ID	Descripción	Anotados	Significativos	Esperados	classicFisher
A moderadamente reprimidos	GO:0055114	oxidation-reduction process	769	75	29.4	2.10E-13
	GO:0008272	sulfate transport	10	5	0.38	1.70E-05
	GO:0006081	cellular aldehyde metabolic process	9	3	0.34	0.0039
	GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	70	8	2.68	0.0067
	GO:0006749	glutathione metabolic process	14	3	0.54	0.0147
	GO:0005978	glycogen biosynthetic process	6	2	0.23	0.0197
	GO:1901700	response to oxygen-containing compound	6	2	0.23	0.0197
	GO:0044270	cellular nitrogen compound catabolic process	385	17	14.72	0.0235
	GO:0046700	heterocycle catabolic process	386	17	14.76	0.0264
	GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	18	3	0.69	0.0295
	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	41	6	1.57	0.0318
	GO:1901361	organic cyclic compound catabolic process	388	17	14.83	0.0326
	GO:0006730	one-carbon metabolic process	8	2	0.31	0.035
	GO:1901292	nucleoside phosphate catabolic process	357	13	13.65	0.0511
	GO:0055085	transmembrane transport	576	34	22.02	0.0619
	GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	11	2	0.42	0.0638
	GO:0007205	protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	11	2	0.42	0.0638
	GO:0044106	cellular amine metabolic process	20	3	0.76	0.0743
GO:0006979	response to oxidative stress	28	3	1.07	0.0897	
B Fuertemente reprimidos	GO:0006952	defense response	14	2	0.01	0.0021
	GO:1902476	chloride transmembrane transport	6	1	0	0.0034
	GO:0042742	defense response to bacterium	9	1	0.01	0.0051
C Moderadamente inducidos	GO:0071702	organic substance transport	266	27	10.92	2.10E-05
	GO:0008610	lipid biosynthetic process	103	13	4.23	0.00025
	GO:0016192	vesicle-mediated transport	114	15	4.68	0.00091
	GO:0043623	cellular protein complex assembly	32	7	1.31	0.00103
	GO:0042398	cellular modified amino acid biosynthetic process	20	5	0.82	0.00105
	GO:0007229	integrin-mediated signaling pathway	8	3	0.33	0.00329

		purine nucleotide catabolic process	GO:0006195	341	24	14	0.00404
		immune response	GO:0006955	17	4	0.7	0.00433
		defense response to bacterium	GO:0042742	9	3	0.37	0.00478
		secretion by cell	GO:0032940	18	4	0.74	0.00539
		purine ribonucleoside triphosphate catabolic process	GO:0009207	340	24	13.96	0.00684
		Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process	GO:0006777	11	3	0.45	0.00884
		actin filament-based process	GO:0030029	35	6	1.44	0.00941
		negative regulation of peptidase activity	GO:0010466	24	4	0.99	0.01544
		malate metabolic process	GO:0006108	5	2	0.21	0.01547
		cell-cell signaling	GO:0007267	14	3	0.57	0.0178
		cellular protein localization	GO:0034613	136	11	5.58	0.01829
		small GTPase mediated signal transduction	GO:0007264	189	12	7.76	0.02202
		protein dephosphorylation	GO:0006470	54	6	2.22	0.02244
		polyol metabolic process	GO:0019751	6	2	0.25	0.02258
		organic hydroxy compound biosynthetic process	GO:1901617	6	2	0.25	0.02258
		carbohydrate biosynthetic process	GO:0016051	26	4	1.07	0.04051
		protein folding	GO:0006457	80	7	3.28	0.04524
		microtubule-based process	GO:0007017	81	7	3.33	0.04786
		purine ribonucleoside catabolic process	GO:0046130	340	24	13.96	0.04798
		organelle fission	GO:0048285	34	4	1.4	0.04903
		MAPK cascade	GO:0000165	9	2	0.37	0.04995
		DNA replication initiation	GO:0006270	9	2	0.37	0.04995
		tetrapyrrole biosynthetic process	GO:0033014	10	2	0.41	0.06079
		nucleotide phosphorylation	GO:0046939	11	2	0.45	0.07233
		cell wall macromolecule catabolic process	GO:0016998	11	2	0.45	0.07233
		cell morphogenesis	GO:0000902	11	2	0.45	0.07233
		cellular carbohydrate metabolic process	GO:0044262	41	4	1.68	0.08597
		cellular iron ion homeostasis	GO:0006879	13	2	0.53	0.09725
		iron ion transport	GO:0006826	13	2	0.53	0.09725
		phosphatidylinositol phosphorylation	GO:0046854	13	2	0.53	0.09725
<b>D Fuertemente inducidos</b>		lipid catabolic process	GO:0016042	51	2	0.11	0.005
		Arp2/3 complex-mediated actin nucleation	GO:0034314	7	1	0.01	0.015
		calcium ion transmembrane transport	GO:0070588	17	1	0.04	0.035
		regulation of Rho GTPase activity	GO:0032319	24	1	0.05	0.05

*Tabla A.2 Listado completo de dominios Interpro y su frecuencia*

Condición	InteproID	Descripción	Rango en percentil
<b>6 h reprimidos</b>	IPR007588	Zinc finger, FLYWCH-type	1
<b>6 h inducidos</b>	IPR002018	Carboxylesterase, typeB	0.94
	IPR029058	Alpha/Beta hydrolase fold	1
<b>9 h reprimidos</b>	IPR015880	Zinc finger, C2H2-like	0.9
	IPR013087	Zinc finger C2H2-type/integrase DNA binding domain	0.9
	IPR007087	Zinc finger, C2H2	0.9
<b>9 h inducidos</b>	IPR029048	Heat shock protein 70kD, C-terminal domain	0.966
	IPR029047	Heat shock protein 70kD, peptide binding domain	0.966
	IPR013126	Heat shock protein 70 family	0.966
	IPR018181	Heat shock protein 70, conserved site	0.966
	IPR029058	Alpha/Beta hydrolase fold	0.955
	IPR002018	Carboxylesterase, typeB	0.944
	IPR013783	Immunoglobulin-like fold	0.933
<b>12 h reprimidos</b>	IPR015880	Zinc finger C2H2-like	1
	IPR007087	Zinc finger, C2H2	0.996
	IPR013087	Zinc finger C2H2-type/integrase DNA binding domain	0.992
	IPR027417	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	0.988
	IPR011009	Protein kinase-like domain	0.977
	IPR016024	Armadillo-type fold	0.977
	IPR013083	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type	0.977
	IPR011990	Tetratricopeptide-like helical domain	0.973
	IPR015943	WD40/YVTN repeat-like-containing domain	0.936
	IPR003593	AAA+ ATPase domain	0.936
	IPR013069	BTB/POZ	0.936
	IPR013026	Tetratricopeptide repeat-containing domain	0.936
	IPR011333	BTB/POZ fold	0.936
	IPR013783	Immunoglobulin-like fold	0.936
	IPR013525	ABC-2 type transporter	0.936
	IPR003439	ABC transporter-like	0.936
IPR012934	Zinc finger, AD-type	0.936	
IPR000210	BTB/POZ-like	0.936	
<b>12 h inducidos</b>	IPR029058	Alpha/Beta hydrolase fold	1
	IPR008978	HSP20-like chaperone	0.997
	IPR002068	Alpha crystallin/Hsp20 domain	0.991
	IPR001436	Alpha crystallin/Heat shock protein	0.991
	IPR027417	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	0.988
	IPR029047	Heat shock protein 70kD, peptide-binding domain	0.969
	IPR013126	Heat shock protein 70 family	0.969
	IPR029048	Heat shock protein 70kD, C-terminal domain	0.969
	IPR001611	Leucine-rich repeat	0.969
	IPR011992	EF-hand domain pair	0.969
	IPR002048	EF-hand domain	0.969

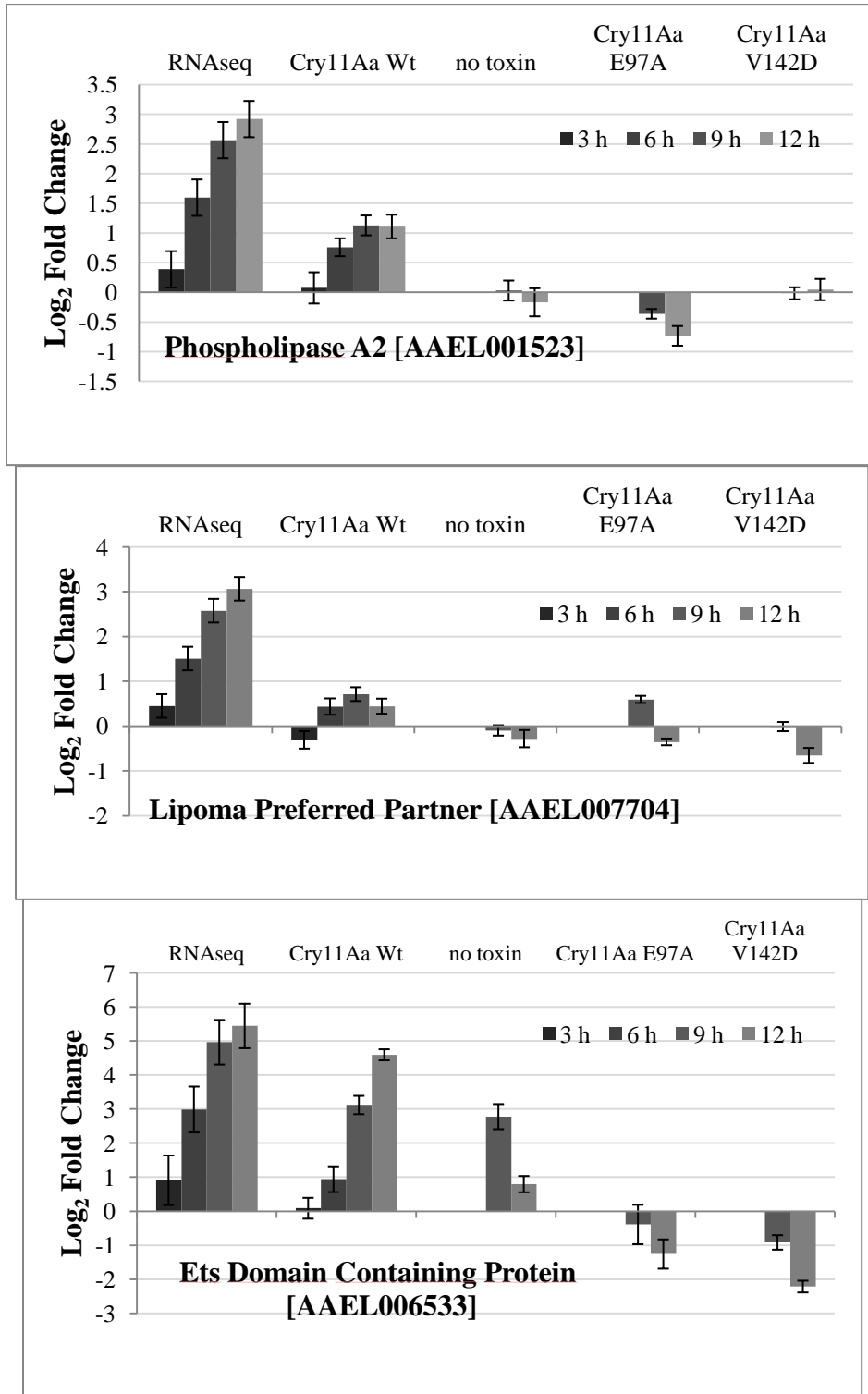
IPR018181	Heat shock protein 70, conserved site	0.969
IPR013783	Immunoglobulin-like fold	0.958
IPR002018	Carboxylesterase, typeB	0.958
IPR018247	EF-Hand 1, calcium-binding site	0.958
IPR011993	Pleckstrin homology-like domain	0.958
IPR001849	Pleckstrin homology domain	0.947
IPR020683	Ankyrin repeat-containing domain	0.947
IPR013083	Zinc finger, RING/FYVE/PHD-type	0.947
IPR015880	Zinc finger C2H2-like	0.947
IPR015943	WD40/YVTN repeat-like-containing domain	0.925
IPR002110	Ankyrin repeat	0.925
IPR007110	Immunoglobulin-like domain	0.925
IPR017986	WD40-repeat-containing domain	0.925
IPR001680	WD40 repeat	0.925
IPR001452	SH3 domain	0.925
IPR008985	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily	0.925
IPR018502	Annexin repeat	0.925
IPR003591	Leucin-rich repeat, typical subtype	0.903
IPR001715	Calponin homology domain	0.903
IPR018252	Annexin repeat, conserved site	0.903
IPR000504	RNA recognition motif domain	0.903
IPR013320	Concanavalin A-like lectin/glucanase domain	0.903
IPR012677	Nucleotide-binding alpha-beta plait domain	0.903
IPR007087	Zinc finger, C2H2	0.903
IPR001464	Annexin	0.903

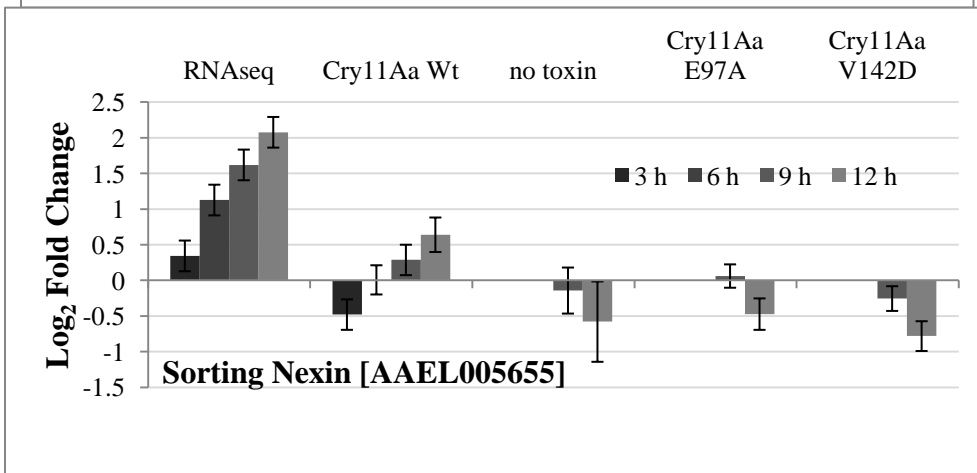
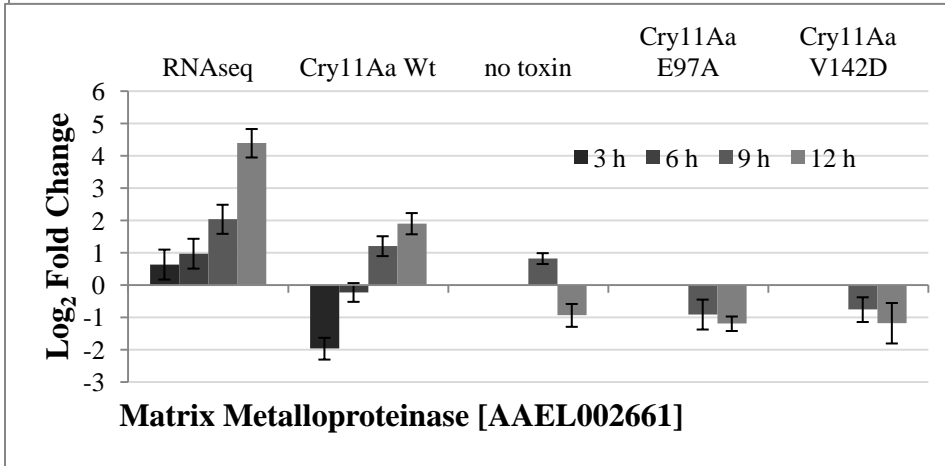
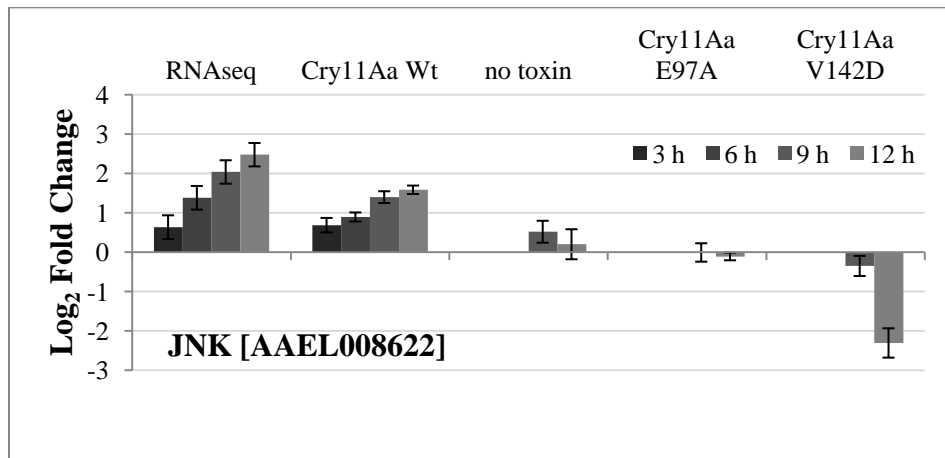
**Tabla A.3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en RT-qPCR**

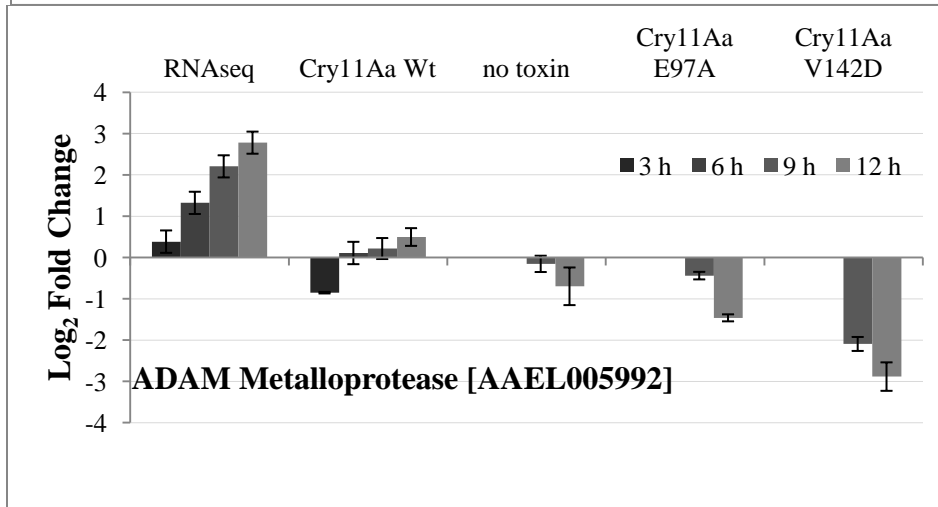
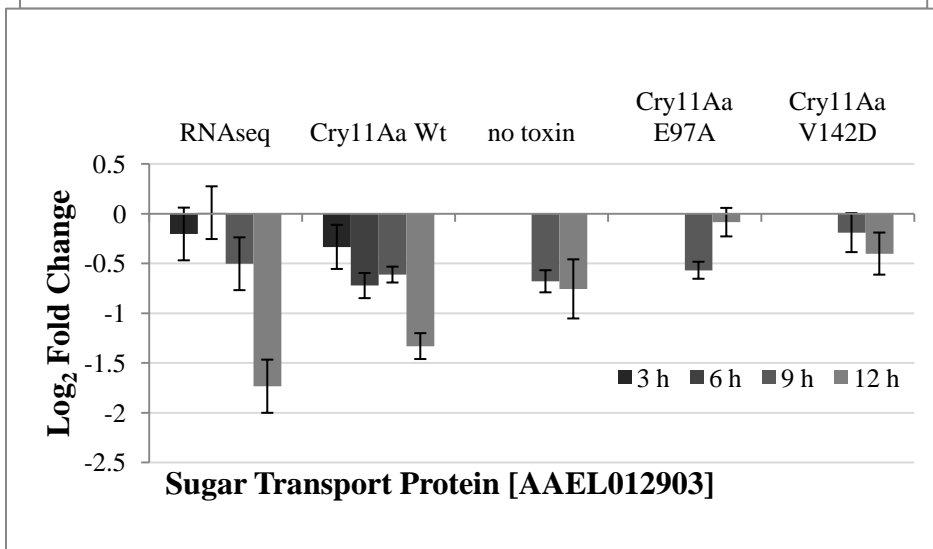
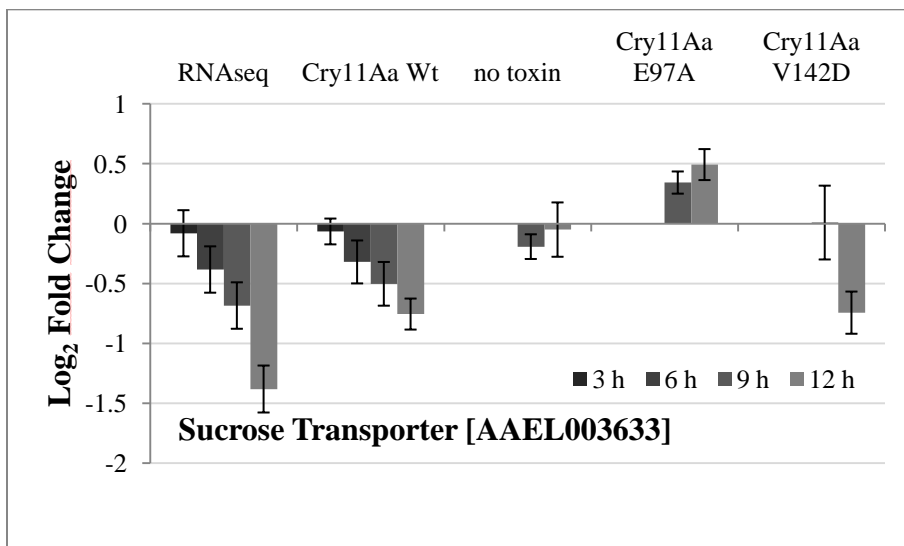
<b>ID</b>	<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Ubicación en transcrito</b>
AAEL001523	Secretory Phospholipase A2	Fwd: 5' ATCCATCATAACTAACGAGCAAC 3'	962
		Rev: 5' ATGATTTAAGCCCTAGAATGCC 3'	1108
AAEL007704	Lipoma preferred partner	Fwd: 5' ACTT* <sup>T</sup> GT* <sup>T</sup> AGT* <sup>T</sup> AAGATCAAGCG 3'	1935
		Rev: 5' AATAAT* <sup>T</sup> TGTGCCACTATGCC 3'	2059
AAEL002661	Matrix metalloproteinase	Fwd: 5' GCCATCACCTATCGGGACCAG 3'	1073
		Rev: 5' GAGCAAGCCGTCCAATCCATC 3'	1199
AAEL005992	ADAM metalloproteinase	Fwd: 5' CCAGTATCTAGCTCCGAACCAG 3'	2915

		Rev: 5' ACCTTTGGCTTTGATCTCGTG 3'	3053
AAEL005655	Sorting Nexin	Fwd: 5' TTCGCAAGCTCTTTCCCAGTTG 3'	1237
		Rev: 5' CCTTGATAGCGCCAAACAGTC 3'	1350
AAEL006533	Ets domain containing protein	Fwd: 5' GTGGAATCGTATAGCGGTGGA 3'	817
		Rev: 5' GGTAGGTGAGGATGAAGAAGC 3'	913
AAEL008622	JNK	Fwd: 5' AAGGAGATTCAAGCACAGACG 3'	1377
		Rev: 5' AACCTACTCGAGCATAACAGC 3'	1500
AAEL014664	AMP dependent Coa Ligase	Fwd: 5' ATCTAACGGATCACTACGAGG 3'	1205
		Rev: 5' TCATCACCCCAGTATCCAAGC 3'	1305
AAEL003841	Defensin antimicrobial peptide	Fwd: 5' GATGAACTGCCGGAGGAAACC 3'	118
		Rev: 5' TAGCCTCCCCGATTGCCAC 3'	242
AAEL003816	Conserved hypothetical protein	Fwd: 5' TGAAGAGCAGAGTTTGGAGTC 3'	182
		Rev: 5' GCTACACTTTCCCTTCATTC 3'	297
AAEL003905	Alkaline phosphatase	Fwd: 5' CAATCAGCTACGCCAATGGAC 3'	1613
		Rev: 5' GTCTCCAAACCCAACGGCAC 3'	1723
AAEL008347	Monocarboxylate transporter	Fwd: 5' AGTACTGAAAATGAGCAAGCCT 3'	3056
		Rev: 5' GGCTGGCACTAAACTACGCTAC 3'	3177
AAEL003633	Sucrose transport protein	Fwd: 5' GCAATCCATGAAGTTATAACCACG 3'	1122
		Rev: 5' GCAGTTTAGTAGCAGACCTCC 3'	1572
AAEL012903	Sugar transporter	Fwd: 5' TGAAGGCTTTCCAAGTGACTC 3'	1287
		Rev: 5' GATTGCCCCGCACTATCCG 3'	1427
AAEL008192	40s ribosomal protein S3	Fwd: 5' GGC ATG TTC CGT GCT GAA TTG AAC G 3'	588
		Rev: 5' TTC TCG GCG TAC AGC TCG ACG 3'	794

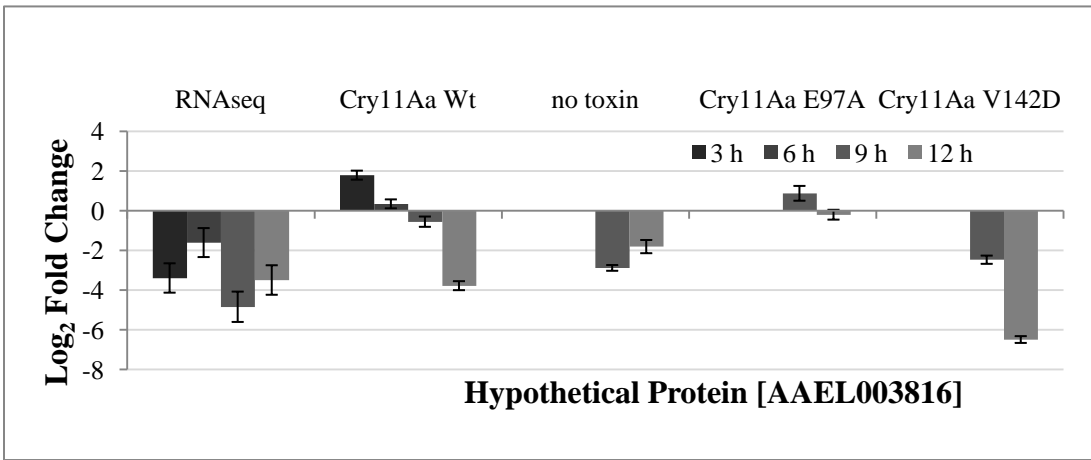
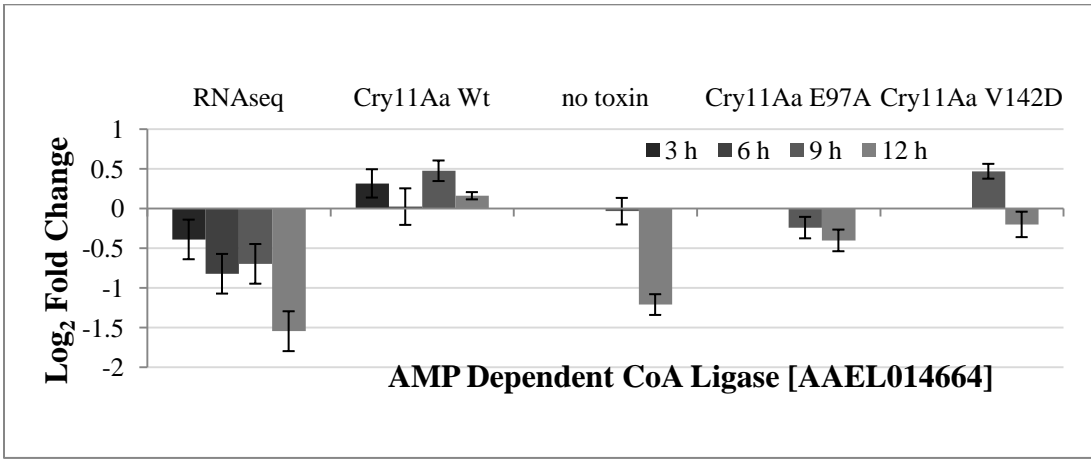
Figura A.1 Valores de expresión log<sub>2</sub> de RT-qPCR











## **Apéndice II: Artículo original derivado del proyecto**

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*

Pablo Emiliano Canton<sup>1</sup>, Angeles Cancino-Rodezno<sup>2</sup>, Sarjeet S. Gill<sup>3</sup>, Mario Soberón<sup>1</sup> and Alejandra Bravo<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Although much is known about the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins, the target tissue cellular responses to toxin activity is less understood. Previous transcriptomic studies indicated that significant changes in gene expression occurred during intoxication. However, most of these studies were done in organisms without a sequenced and annotated reference genome. A reference genome and transcriptome is available for the mosquito *Aedes aegypti*, and its importance as a disease vector has positioned its biological control as a primary health concern. Through RNA sequencing we sought to determine the transcriptional changes observed during intoxication by Cry11Aa in *A. aegypti* and to analyze possible defense and recovery mechanisms engaged after toxin ingestion.

**Results:** In this work the changes in the transcriptome of 4<sup>th</sup> instar *A. aegypti* larvae exposed to Cry11Aa toxin for 0, 3, 6, 9, and 12 h were analyzed. A total of 1060 differentially expressed genes after toxin ingestion were identified with two bioconductor packages: DESeq2 and EdgeR. The most important transcriptional changes were observed after 9 or 12 h of toxin exposure. GO enrichment analysis of molecular function and biological process were performed as well as Interpro protein functional domains and pBLAST analyses. Up regulated processes include vesicular trafficking, small GTPase signaling, MAPK pathways, and lipid metabolism. In contrast, down regulated functions are related to transmembrane transport, detoxification mechanisms, cell proliferation and metabolism enzymes. Validation with RT-qPCR showed large agreement with Cry11Aa intoxication since these changes were not observed with untreated larvae or larvae treated with non-toxic Cry11Aa mutants, indicating that a fully functional pore forming Cry toxin is required for the observed transcriptional responses.

**Conclusions:** This study presents the first transcriptome of Cry intoxication response in a fully sequenced insect, and reveals possible conserved cellular processes that enable larvae to contend with Cry intoxication in the disease vector *A. aegypti*. We found some similarities of the mosquito responses to Cry11Aa toxin with previously observed responses to other Cry toxins in different insect orders and in nematodes suggesting a conserved response to pore forming toxins. Surprisingly some of these responses also correlate with transcriptional changes observed in Bti-resistant and Cry11Aa-resistant mosquito larvae.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*, RNA-seq, biological control, defense response, Cry toxins

\* Correspondence: bravo@ibt.unam.mx

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250 Morelos, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Vector-borne diseases remain some of human kind's biggest health challenges that impose a significant toll on afflicted populations. The World Health Organization (WHO) estimates more than 500 million cases of malaria worldwide, transmitted by *Anopheles* mosquitoes, while *Aedes* mosquitoes transmit different viruses that cause hundreds of millions of annual infections of yellow fever, dengue, and chikungunya fever [1]. About 40 % of the human population is at risk since they live in *Aedes* inhabited locations. Importantly effective vaccines or antiviral drugs for most of these diseases do not exist, except for yellow fever. Thus efforts to control mosquito populations remain an important strategy to reduce infection rates. Biological control through the use of insecticidal proteins produced by the bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) represents a promising alternative to control mosquitoes due to the emergence of mosquito populations that are resistant to chemical insecticides [1]. In addition, the recalcitrant nature of chemical insecticides and their non-target effects pose environmental and health disadvantages [2, 3].

*Bt* bacteria produce a wide variety of toxins, of which the pore-forming 3-domain Cry and the Cyt toxin families have been widely studied, and used in mosquito control due to their highly specific insecticidal activities [4]. In particular, the *Bt* subsp. *israelensis* (*Bti*) strain has been used in the control of *A. aegypti*. *Bti* mainly produces a combination of Cry11Aa, Cry4Ba, Cry4Aa and Cyt1Aa toxins as crystalline inclusions during the sporulation phase. Although *Bti* has been used for more than four decades in vector control programs worldwide, resistant populations have not been observed in the field. This lack of resistance is usually explained by the combined action of *Bti* Cry and Cyt toxins which are synergistic towards mosquito larvae [5, 6]. Also, it was shown that Cyt1Aa overcomes lab-generated resistance to individual Cry toxins [7].

The mode of action of Cry toxins has been characterized mainly in lepidopteran insect species. However, conservation of the three-dimensional structure among Cry toxins specific to different insect orders as well as conservation of cell receptors and other biochemical evidence suggest a common mechanism of action of Cry toxins in different insect orders [4]. Briefly, susceptible larvae ingest the toxin crystals, from which protoxins are solubilized and processed by midgut proteases. Activated toxin monomers bind to GPI-membrane anchored proteins, such as aminopeptidases (APN) or alkaline phosphatases (ALP). Subsequently, an additional binding event occurs with a cadherin protein, which favors further processing of monomers and induces conformational changes that generate an oligomeric toxic structure. This oligomer gains higher affinity to GPI-anchored receptors and subsequently inserts into the membrane, opening a non-selective pore [8]. Osmotic shock mediated by this pore is thought to be the main cause of

cell death [8]. For the mosquitocidal Cry toxins produced by *Bti*, similar Cry-receptor molecules have been identified in different mosquito species like cadherins, APN and ALP indicating a conserved mode of action in mosquitoes (reviewed in [9]). In addition an  $\alpha$ -amylase was shown to bind Cry4Ba and Cry11Aa toxins and proposed as toxin receptor in *Anopheles albimanus* [10].

Although much is known about the molecular interactions of Cry toxins with its membrane receptors, much less is known about the cellular responses after Cry toxin action. Bacterial pore-forming toxins have been studied in a number of systems including mammalian-cells, where toxin-receptor binding or damage to the membrane elicits a diverse array of responses depending on the toxin dose, cell type, and duration of exposure. Mechanisms such as apoptosis and pyroptosis have been observed, as well as lipid synthesis, membrane repair, endo/exocytosis and activation of autophagy [11–15]. Shedding of membrane proteins [16] and membrane vesicle blebbing are other observed effects [13]. It has been reported that phosphorylation of MAP kinases is frequently observed during the responses elicited in different cells to several pore-forming toxins. Specifically JNK kinase was activated by streptolysin-O [17] and Cry5B [18]; ERK 1/2 by anthralysin-O [16]; and p38 MAPkinase by streptolysin-O [17], anthralysin-O [16],  $\alpha$ -toxin [14, 19], pneumolysin [20, 21],  $\beta$ -toxin [22], aerolysin [23], Cry5B [18], Cry3Aa [24], Cry1Ab and Cry11Aa toxins [25].

The targets of these MAP kinases include transcriptional factors implying that changes in gene expression can be expected during cellular responses to damage induced by a pore-forming toxin. Previous studies have indicated that this is indeed the case for Cry toxins in insects and nematodes. For example, transcript changes in response to Cry toxins have been reported in lepidopteran larvae, such as *Spodoptera frugiperda* [26], *Choristoneura fumiferana* [27], and *Lymntria dispar* [28], as well as in the coleopteran *Tenebrio molitor* [24]. However, limitations on the availability of a reference genome restricted the amount of information obtained, and phylogenetic distances between these insects may influence the response mechanisms to Cry toxins. Therefore, any new information about transcriptome changes after Cry toxin exposure in larvae brings us closer to unraveling a shared response in insects against these important toxins. In this paper we present a transcriptomic study of the response of the mosquito *A. aegypti* in the midgut tissue after intoxication with Cry11Aa.

## Results

### High-throughput Illumina sequencing

*Bti* produces several mosquitocidal toxins. For this study, we chose Cry11Aa since it shows high toxicity to *A. aegypti* larvae with an LC<sub>50</sub> value of 450.9 ng/ml (confidence limits, 350.5–557.1 ng/ml). Also, because it was

previously shown that Cry11Aa affects MAPK p38 phosphorylation during intoxication of *A. aegypti* larvae [25]. In this work we analyzed the transcriptome of 4th instar *A. aegypti* larvae exposed to Cry11Aa toxin (500 ng/ml) for different times. Control larvae at the shorter and longer incubation times in the absence of toxin were also included in our analyses. The Illumina reads obtained were checked for overrepresented sequences or artifacts, but none were found. All samples produced around 20–60 million reads with good quality. Reads were aligned to the *A. aegypti* transcripts as indicated in methods. Additional file 1: Table S1 shows the alignment rates for all samples. Above 65 % of all reads were aligned to *A. aegypti* transcripts uniquely. In addition 5 % to 12 % of total reads aligned to *A. aegypti* genome but not to the transcriptome, which could represent new genes or new splicing alternatives that have not been characterized before (data not shown).

#### Differential expression analysis

We used two different algorithms, DESeq2 and EdgeR [29, 30], to identify genes with significant differential expression. Table 1 shows that DESeq2 reported more genes as differentially expressed genes (DEG) than EdgeR for every exposure time except at 3 h. Also, most of the genes detected by EdgeR were also detected by DESeq2, with the subset of genes defined as DEG only by EdgeR being small overall. We observed that as the exposure time to Cry11Aa increases, the number of DEGs also increases, where the number of positively regulated genes is larger than the number of negatively regulated ones.

Across all timepoints, a total of unique 1060 DEG common to both packages were used for further analyses (Additional file 2: Table S2). As control we analyzed the DEG of non-toxin exposed larvae after incubation for 0 or 12 h by RNAseq in triplicate. In contrast to the 1038 common DEG seen at 12 h of Cry11Aa exposure, only 13 DEG were found in the control non-toxin exposed larvae after 12 h, with nine genes down regulated and four up regulated genes (Additional file 3: Table S3). Of these genes found in control larvae, only 6 genes are also found in the 1060 DEGs found for all toxin exposure conditions. Two of them, AAEL003841 and AAEL003816, correspond to a defensin antimicrobial peptide and a close homolog, suggesting that this process is not related to the response to Cry11Aa toxicity.

#### Biological Process and Molecular Function GO enrichment analysis

We performed a GO enrichment analysis of biological process annotations on the subset of DEG that were common in the DESeq2 and EdgeR results. Figure 1 represents these overrepresented terms for each toxin exposure time. Some related GO terms are represented as a single term for simplicity. It is not surprising to find almost no enriched terms at 3 h of Cry11Aa exposure since few genes were detected as differentially expressed under this condition. However, there is a clear increase in this number as exposure time increases, as is expected from the number of DEG for each condition. As exposure time to Cry11Aa increases there is a progressive enrichment of terms related to cellular remodeling and component shuttling in positively regulated genes:

**Table 1** Number of genes reported in differential expression analysis by DESeq2 (P-adj < 0.05) and EdgeR (FDR < 0.05)

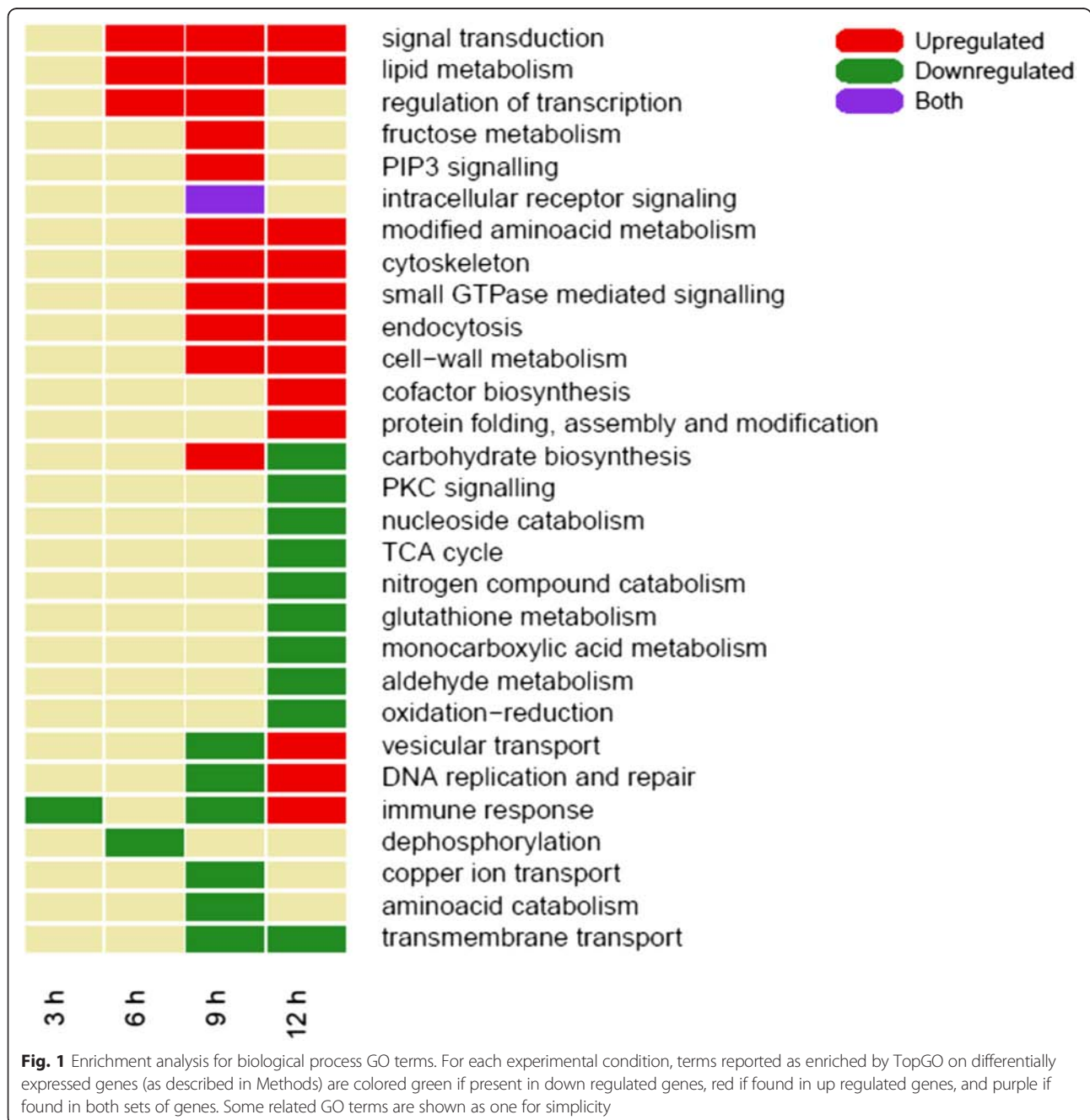
Condition		EdgeR	DESeq2	Common	Only EdgeR	Only DESeq2
3 h	all	10	5	4	6	1
	Up regulated	3	1	1	2	0
	Down regulated	7	4	3	4	1
6 h	all	33	340	27	6	313
	Up regulated	24	245	23	1	222
	Down regulated	9	95	4	5	91
9 h	all	151	458	145	6	313
	Up regulated	105	273	104	1	169
	Down regulated	46	185	41	5	144
12 h	all	1059	1980	1038	21	942
	Up regulated	623	1123	613	10	510
	Down regulated	436	857	425	11	432
	all	39	16	13	26	3
12 h no toxin	Up regulated	20	7	4	16	3
	Down regulated	19	9	9	10	0

cytoskeleton, endocytosis, lipid metabolism, cell-wall metabolism and vesicular transport.

In addition, our data suggest that small GTPase and PIP<sub>3</sub> signaling contribute to a general response to the membrane damage induced by Cry11Aa. It was previously reported that signaling through Rho-GTPase participates in the regulation of vesicular traffic [31], indicating that this response could have a role in the removal and repair of damaged cell membranes after Cry toxin intoxication. Protein integrity is also conserved through the up regulation of chaperones Hsp70 and Hsp20, and this is reflected

in the enrichment of the terms for protein folding, complex assembly and post-translational modification.

Among the terms that were down regulated we found some transmembrane transport functions such as those involved in sulfate and carbohydrate transport. Other terms that were highly repressed include those related to catabolic pathways, cell replication, and PKC signaling. The GO term for immune response was initially negatively regulated, but as intoxication proceeds, immune response showed a positive regulation. Importantly our studies were done with purified Cry11Aa-crystals by



sucrose gradient centrifugation, limiting the number of bacteria or bacterial wall components present in the crystal samples used for intoxication. These data may represent a survival response of larvae that attempt to defend against possible future bacterial intrusions.

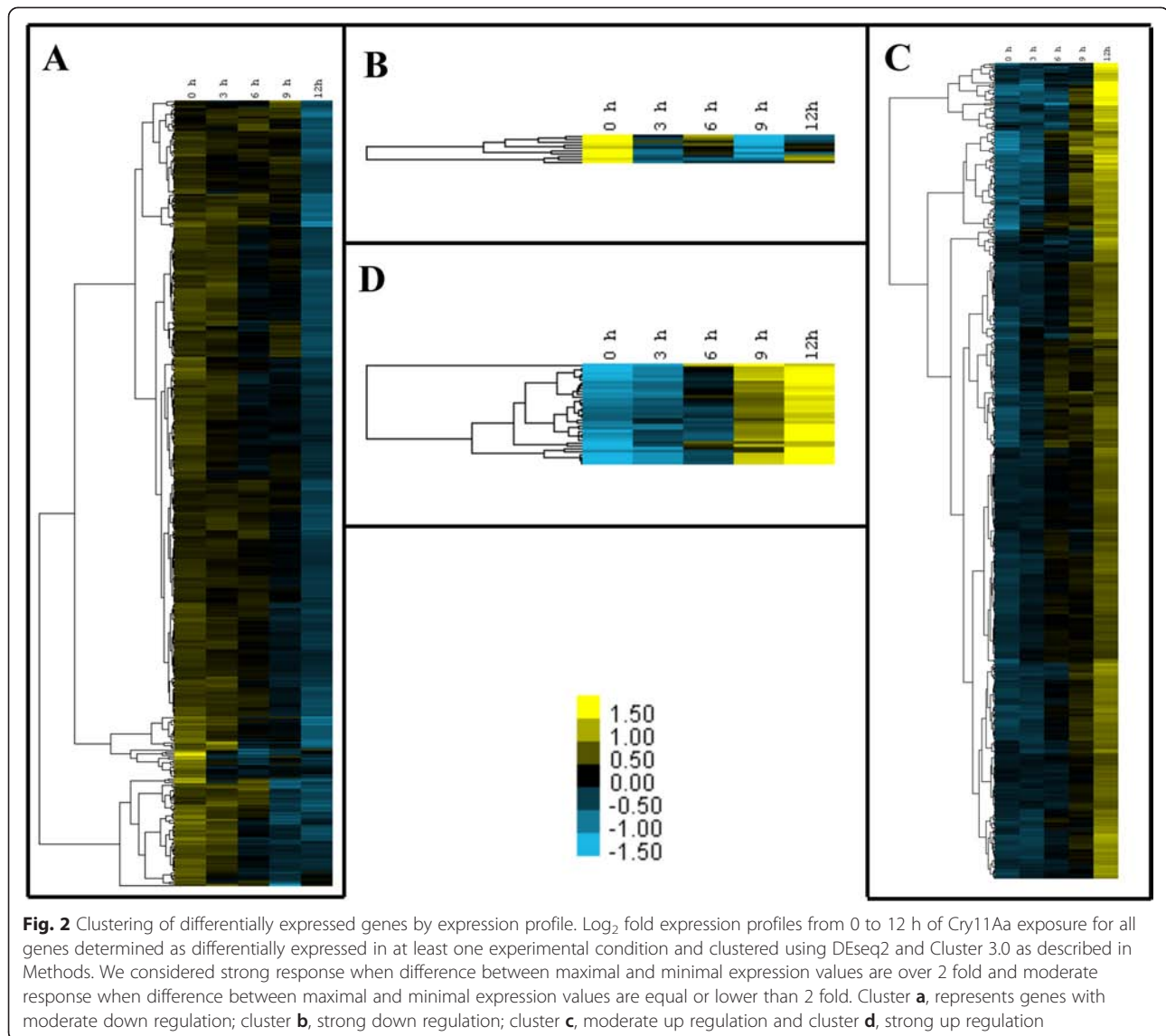
To compare all conditions at the same time instead of through individual enrichment, we performed a clustering analysis on the  $\log_2$  fold values of the 1060 common DEG as described in Methods, and determined those genes with an overall similar expression profile throughout the time of toxin exposure. Four different clusters could be observed (Fig. 2). Clusters A and B show groups of genes with down regulation patterns. Genes with strong down regulation (when difference between maximal and minimal expression values are over 2 fold) are grouped in cluster B while moderately down regulated genes (when the difference between maximal and minimal expression values are equal or lower than 2 fold) are in cluster A. Up regulated genes were grouped in clusters C and D. Cluster C showed those with moderate up regulation and cluster D those with strong up regulation. Additional file 2: Table S2 lists all genes that are present in each cluster. The only exception was AAEL008767 gene, corresponding to a serine protease, which showed a unique expression profile with a peak induction at 3 h. With these separate clusters we performed again a GO enrichment analysis of biological process terms as described above and results are presented in Table 2. In general the GO enrichment results of these clusters resemble the GO terms shown in Fig. 1. We observed moderate down regulation of terms involved in oxidation processes, TCA enzymes, transmembrane transport, aldehyde, monocarboxylic acid and glutathione metabolisms, catabolic process of nitrogen compounds, heterocycle and nucleosides, and PKC signaling. The strongest down regulation at 9 h were found in bacterial defense terms. The cluster with moderate up regulation is enriched with terms of vesicular transport, lipid biosynthetic process, protein complex formation and protein folding, cellular morphogenesis, cytoskeleton binding, initiation of DNA replication, integrin and cell-cell signaling, as well as MAPK and small GTPase signaling. The strong up regulation cluster was enriched for actin nucleation, lipid catabolism, calcium ion transport, and Rho GTPase regulation (Table 2).

Of the 17,478 predicted genes for *A. aegypti*, only about a third are annotated with a biological process GO term. Therefore, there are many DEG for which a role in biological process could not be assigned in our GO analysis shown in Fig. 1. We performed a similar enrichment analysis but using a different GO ontology, that was focused to the molecular function instead of the biological process. Figure 3 shows this GO molecular function enrichment analysis. At 3 h the only enriched term for both up and down regulated genes is for serine-type endopeptidase activity. This could be an artifact

due to the small number of DEG detected for this condition. An alternate explanation is that the serine protease response may be down-regulated when the insects stop feeding as a response to intoxication, and other serine proteases may be up-regulated due to a starvation response. From 6 h onwards, up regulated genes are enriched in terms related to phospholipid interactions, such as lipid binding or phospholipase A2 activity. We also observed enrichment of carboxylase activity in both up and down regulated genes at 6 h, but this activity is only further enriched at 9 and 12 h of toxin exposure. Here again, MAPK activity and terms related to both ARF and Rho GTPase activity are enriched in up regulated genes from 6 h and forward, supporting a possible role these two signaling pathways in the response to Cry intoxication. Probably related to the activity of these proteins, nucleotide binding and phosphotransferase terms are also enriched at 12 h. The scavenger receptor term in these exposure times may point to the recycling of membrane proteins. In the down regulated genes at 9 and 12 h we observed enrichment of terms related to ion binding and transport as well as terms related to oxidation-reduction processes, although other different terms involved in oxidation-reduction processes were observed in the group of up regulated genes. Interestingly, the ALP and APN activity terms were down regulated at 6 and 12 h, respectively. Proteins in both these families function as receptors for Cry toxins [4]. However, these genes that are down regulated do not correspond to the ALP or APN proteins that have been shown to bind Cry11Aa toxin in mosquito epithelial cells [32].

#### Identification of differential expressed genes that were not annotated

We found 676 DEG that were not annotated with GO biological process terms. To extend our analysis, these 676 genes were analyzed to obtain their Interpro protein functional domains [33] as described in Methods. Table 3 shows the representative domains that are distributed in the different sets of genes, and Additional file 4: Table S4 shows a list with all domains found with frequency  $\geq 90^{\text{th}}$  percentile (0.9). For the up regulated genes at 6 h of toxin exposure we detected protein domains related to carboxylases, and these are also up regulated at 9 and 12 h of Cry11Aa intoxication. At these times we also found further evidence of genes that support the results of up regulated genes identified by GO enrichment of biological functions that were presented in Fig. 1 such as chaperones involved in protein folding and complex assembly, annexin involved in cytoskeleton and EF-Hand domains involved in  $\text{Ca}^{2+}$  binding. Regarding DEG that were down regulated we found domains of zinc fingers, type-C lectins, and ATPse domains of replication proteins.



ABC transporter domains were also found to be down regulated.

After performing the Interpro analysis we realized that 154 DEG still did not have any identifiable protein domain. These 154 genes were further analyzed by performing pBLAST analysis on the NR database [34], though few proteins were found to have significant homology to other gene targets. Table 4 shows the identified genes. We found homologs of phospholipase A2 family, which supports the importance of activating this process in response to Cry11Aa intoxication. Again, a component of Ras GTPase signaling such as the homolog of Ras guanine exchange factor was identified in genes induced after Cry11Aa exposure. Among the down regulated genes we found some antimicrobial peptides such as CEC-A and gambicin, and also an ADAM metalloprotease.

#### Validation through RT-qPCR

To corroborate the RNAseq data, we selected 14 genes from the common DEG to validate their expression by RT-qPCR at the same time-points analyzed by RNAseq. Among these genes, two genes related to MAPK signaling: JNK (AAEL008622) and Ets domain containing protein (AAEL006533) were analyzed. The closest homolog for AAEL006533 is Elk-1 transcription factor, a known downstream target of MAPK-p38. Therefore its positive regulation may confirm the activation of this pathway, as the transcript for p38 itself does not show differential expression, which is consistent with previous observations [25]. According to Vectorbase annotation *A. aegypti* has two isoforms of JNK, where AAEL008622 shows higher homology to human JNK2. We also selected one gene for phospholipase A2 activity (AAEL001523), two genes for vesicular traffic such as lipoma preferred partner and



**Table 2** TopGO enrichment of biological process terms in differentially expressed gene clusters

Cluster	GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	ClassicFisher
A. Moderate down regulated	GO:0055114	oxidation-reduction process	769	75	29.4	2.10E-13
	GO:0008272	sulfate transport	10	5	0.38	1.70E-05
	GO:0006081	cellular aldehyde metabolic process	9	3	0.34	0.0039
	GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic process	70	8	2.68	0.0067
	GO:0006749	glutathione metabolic process	14	3	0.54	0.0147
	GO:0005978	glycogen biosynthetic process	6	2	0.23	0.0197
	GO:1901700	response to oxygen-containing compound	6	2	0.23	0.0197
	GO:0044270	cellular nitrogen compound catabolic process	385	17	14.72	0.0235
	GO:0046700	heterocycle catabolic process	386	17	14.76	0.0264
	GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	18	3	0.69	0.0295
	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	41	6	1.57	0.0318
	GO:1901361	organic cyclic compound catabolic process	388	17	14.83	0.0326
	GO:0006730	one-carbon metabolic process	8	2	0.31	0.035
	GO:1901292	nucleoside phosphate catabolic process	357	13	13.65	0.0511
	GO:0055085	transmembrane transport	576	34	22.02	0.0619
	GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	11	2	0.42	0.0638
	GO:0007205	protein kinase C-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	11	2	0.42	0.0638
	GO:0044106	cellular amine metabolic process	20	3	0.76	0.0743
	GO:0006979	response to oxidative stress	28	3	1.07	0.0897
	B. Strong down regulated	GO:0006952	defense response	14	2	0.01
GO:1902476		chloride transmembrane transport	6	1	0	0.0034
GO:0042742		defense response to bacterium	9	1	0.01	0.0051
C. Moderate up regulated	GO:0071702	organic substance transport	266	27	10.92	2.10E-05
	GO:0008610	lipid biosynthetic process	103	13	4.23	0.00025
	GO:0016192	vesicle-mediated transport	114	15	4.68	0.00091
	GO:0043623	cellular protein complex assembly	32	7	1.31	0.00103
	GO:0042398	cellular modified amino acid biosynthetic process	20	5	0.82	0.00105
	GO:0007229	integrin-mediated signaling pathway	8	3	0.33	0.00329
	GO:0006195	purine nucleotide catabolic process	341	24	14	0.00404
	GO:0006955	immune response	17	4	0.7	0.00433
	GO:0042742	defense response to bacterium	9	3	0.37	0.00478
	GO:0032940	secretion by cell	18	4	0.74	0.00539
	GO:0009207	purine ribonucleoside triphosphate catabolic process	340	24	13.96	0.00684
	GO:0006777	Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process	11	3	0.45	0.00884
	GO:0030029	actin filament-based process	35	6	1.44	0.00941
	GO:0010466	negative regulation of peptidase activity	24	4	0.99	0.01544
	GO:0006108	malate metabolic process	5	2	0.21	0.01547
	GO:0007267	cell-cell signaling	14	3	0.57	0.0178
	GO:0034613	cellular protein localization	136	11	5.58	0.01829
	GO:0007264	small GTPase mediated signal transduction	189	12	7.76	0.02202
	GO:0006470	protein dephosphorylation	54	6	2.22	0.02244
	GO:0019751	polyol metabolic process	6	2	0.25	0.02258
GO:1901617	organic hydroxy compound biosynthetic process	6	2	0.25	0.02258	

**Table 2** TopGO enrichment of biological process terms in differentially expressed gene clusters (*Continued*)

	GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	26	4	1.07	0.04051
	GO:0006457	protein folding	80	7	3.28	0.04524
	GO:0007017	microtubule-based process	81	7	3.33	0.04786
	GO:0046130	purine ribonucleoside catabolic process	340	24	13.96	0.04798
	GO:0048285	organelle fission	34	4	1.4	0.04903
	GO:0000165	MAPK cascade	9	2	0.37	0.04995
	GO:0006270	DNA replication initiation	9	2	0.37	0.04995
	GO:0033014	tetrapyrrole biosynthetic process	10	2	0.41	0.06079
	GO:0046939	nucleotide phosphorylation	11	2	0.45	0.07233
	GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	11	2	0.45	0.07233
	GO:0000902	cell morphogenesis	11	2	0.45	0.07233
	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	41	4	1.68	0.08597
	GO:0006879	cellular iron ion homeostasis	13	2	0.53	0.09725
	GO:0006826	iron ion transport	13	2	0.53	0.09725
	GO:0046854	phosphatidylinositol phosphorylation	13	2	0.53	0.09725
D. Strong up regulated	GO:0016042	lipid catabolic process	51	2	0.11	0.005
	GO:0034314	Arp2/3 complex-mediated actin nucleation	7	1	0.01	0.015
	GO:0070588	calcium ion transmembrane transport	17	1	0.04	0.035
	GO:0032319	regulation of Rho GTPase activity	24	1	0.05	0.05

sorting nexin (AAEL007704, AAEL005655), two metalloproteases (AAEL002661, AAEL005992), three genes for transporter proteins related to transport such as monocarboxylate, sucrose and sugar transporter proteins (AAEL008347, AAEL003633, AAEL012903), a CoA-Ligase (AAEL014664) and an ALP (AAEL003905). We also analyzed the gene for the antimicrobial peptide defensin (AAEL003841) and a hypothetical protein with high homology to defensin (AAEL003816) that were also observed in control larvae.

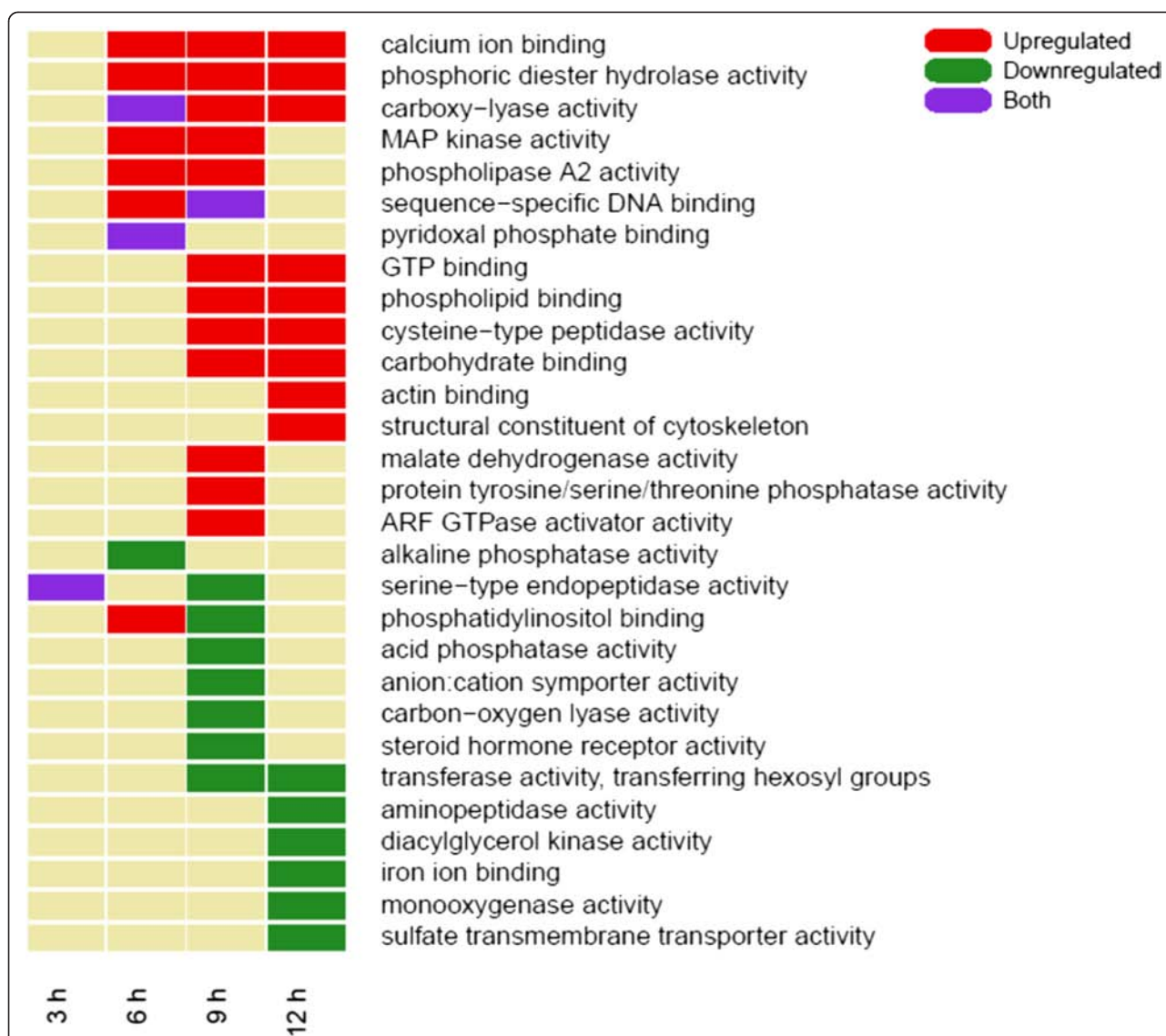
Transcript abundance ratios were determined at all times after toxin exposure. As controls we analyzed the transcript abundance ratios of control larvae without toxin exposure for different times or after exposure to the non-lethal Cry11Aa mutants E97A and V142D. The mutant E97A is not toxic since it is unable to form toxin oligomers required for pore formation [35], while the mutant V142D is able to oligomerize but it does not insert into the lipid bilayer of the cell membrane [36]. Additional file 5: Figure S1 shows the relative expression of all 14 genes at different times of the four conditions analyzed (after Cry11Aa toxin ingestion, control without toxin, or with non-toxic mutants Cry11Aa-E97A and Cry11AaV142D). In order to compare data of Additional file 5: Figure S1 with our results of transcription expression by RNAseq a correlation coefficient for each target gene between the RT-qPCR and their corresponding RNAseq data is presented in Fig. 4. Most target genes show strong positive correlation with the data of the

biological replicate of the LC<sub>50</sub> curve, but not strong positive correlation with data of either non-exposed larvae or non-lethal Cry11Aa exposed larvae. Overall correlation of this set of genes is 79 % with the Cry11Aa LC<sub>50</sub> biological replicate, which is more than the closest value of 43 % with Cry11Aa V142D data. These results indicate that our RNAseq data and observations have good experimental validation. Results also indicate that the expression values observed are more likely a response to the successful formation of toxin pores in the membranes of the intestinal epithelial cells than to the presence of the toxin, and that changes observed are not merely due to the growth or circadian regulation of genes in the mosquito larvae during the time of the experiment.

As an additional validation analysis of RNAseq data we determined the changes in expression of JNK protein by western blot analysis (Additional file 6: Figure S2). RNAseq data showed that JNK (AAEL008622) was up regulated after 9 and 12 h of Cry11Aa exposure. Our analysis indicated a direct correlation of the expression of JNK protein with JNK (AAEL008622) gene expression after 9 and 12 h of Cry11Aa exposure (Additional file 6: Figure S2).

## Discussion

Here we show the analysis of the transcriptional response of *A. aegypti* midgut epithelial cells after the first 12 h of Cry11Aa exposure. With intoxication, cellular responses are likely diverse in an attempt by the host to avert



**Fig. 3** Molecular functions of genes differentially expressed. For each experimental condition, genes were categorized into different categories as reported by TopGO and enrichment on differentially expressed genes (as described in Methods) are colored green indicating down regulated genes, red indicating up regulated genes, and purple if found in both sets of genes

toxicity. We took care not to include severely intoxicated or dead larvae in the sequenced samples. That way we could say that the larvae analyzed were mildly intoxicated and maybe able to defend from the toxin up to the point when they were sampled. We found that the longer the exposure the more genes were differentially expressed. This is consistent with previous microarray data obtained (Gill SS, data not published), where high doses of toxin generated a widespread repression of genes while an LD<sub>50</sub> or lower showed a general profile favoring positive differential expression. Also in the coleopteran pest *Tenebrio molitor* the timepoint where the most differential gene expression was observed was after 12 h incubation with Cry3Aa toxin [24].

Due to the experimental bioassays conditions we cannot be sure that all individual larvae consume Cry toxin at the same rate and in the same amount. It is possible that in the shorter exposure times not all larvae had fed Cry11Aa crystals, which could explain why the overall transcriptional response is milder than at longer exposure times. However, at 9 and 12 h of Cry11Aa toxin exposure we saw a strong cellular response and a similar profile of enriched biological functions. The control larvae at 0 and 12 h in absence of toxin administration showed a limited number of DEG, indicating that the responses observed here correspond to transcriptional changes due to Cry11Aa toxin action.

**Table 3** Representative Interpro domains identified on differential expressed genes without biological process GO annotation

Condition	InterproID	Percentile	Description
6 h down regulated	IPR007588	1	Zinc finger, FLYWCH-type
6 h up regulated	IPR002018	0.94	Carboxylesterase, typeB
	IPR029058	1	Alpha/Beta hydrolase fold
9 h down regulated	IPR007087	0.9	Zinc finger, C2H2
9 h up regulated	IPR013126	0.966	Heat shock protein 70 family
	IPR029058	0.955	Alpha/Beta hydrolase fold
	IPR002018	0.944	Carboxylesterase, typeB
12 h down regulated	IPR013783	0.933	Immunoglobulin-like fold
	IPR007087	0.996	Zinc finger, C2H2
	IPR011009	0.977	Protein kinase-like domain
	IPR013026	0.936	Tetratricopeptide repeat-containing domain
12 h up regulated	IPR013525	0.936	ABC-2 type transporter
	IPR029058	1	Alpha/Beta hydrolase fold
	IPR008978	0.997	HSP20-like chaperone
	IPR027417	0.988	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase
	IPR013126	0.969	Heat shock protein 70 family
	IPR002048	0.969	EF-hand domain
	IPR002018	0.958	Carboxylesterase, typeB
	IPR001849	0.947	Pleckstrin homology domain
	IPR015880	0.947	Zinc finger C2H2-like
	IPR002110	0.925	Ankyrin repeat
12 h up regulated	IPR001452	0.925	SH3 domain
	IPR008985	0.925	Concanavalin A-like lectin/glucanases superfamily
	IPR018502	0.925	Annexin repeat

### Up-regulated responses

Our results indicate that exposure to an LC<sub>50</sub> of Cry11Aa induces the expression of genes related to vesicular traffic, protein folding, lipid metabolism and cell membrane metabolism. Chaperone, phospholipase A2 and carboxylesterase activities were also found among the induced functions at longer intoxication times. Small GTPases of the Ras superfamily are known regulators of cell junctions, cytoskeleton and vesicular traffic in cells [37, 38]. In particular, they play key roles in maintaining epithelial homeostasis [38], as observed in mammalian intestinal epithelium [31] and also insect epithelium [39]. Here we observed that components of the ARF and Rab family are induced, as well as many nucleotide exchangers and regulators of Rho signaling, especially at 12 h of exposure. These data, coupled with the induction of genes related to actin nucleation and cell junction establishment, point to an active process of epithelial tissue homeostasis. We also found homologs of *Drosophila melanogaster* crimped and snakeskin genes induced at 12 h; both have a role in maintenance of

cell junctions [40, 41]. It is important to mention that these genes were shown to be expressed in the gut of *D. melanogaster* [40, 41]. The gene for Rab-11 was induced in *A. aegypti* after 12 h of toxin ingestion which is consistent with previous reports that showed that Rab-5 and Rab-11 had an important role in the response to Cry5B in *C. elegans* [42]. Rab-5 and Rab-11 of *C. elegans* are thought to regulate a pathway through which Cry5B exposed cells may remove and recycle damaged membranes, since it was shown that absence of either of these two proteins results in a hypersensitive phenotype to Cry toxin exposure [42]. Endocytosis is also utilized in the clearance of membranes damaged by toxin pores of *S. aureus*  $\alpha$ -toxin [15] and *S. pyogenes* streptolysin-O [43]. Thus, while the specific genes involved may vary the overall cellular responses detected in this work are similar to the responses observed in other organism to different pore forming toxins.

Small GTPase signaling networks involve MAPK proteins and, since genes related to these transduction modules are induced, it could partly explain the cellular response to Cry toxins provided by JNK and p38

**Table 4** Homologs to differentially expressed genes without biological process GO annotation found by pBLAST analysis

Condition	Gene ID	Coverage	E-value	Identity	Homolog ID	Protein	Species
9 h Down regulated	AAEL013895	90 %	1e-32	53 %	XP_001868961.1	14.5 kDa salivary protein	Cq
	AAEL009985	94 %	2e-59	65 %	XP_001868961.1	14.5 kDa salivary protein	Cq
	AAEL000777	83 %	3e-15	60 %	ABU80079.1	CEC-A	Ag
	AAEL004522	98 %	8e-29	65 %	ACA05605.1	gambicin	Am
9 h up regulated	AAEL007206	92 %	2e-22	48 %	XP_004526025.1	<sup>a</sup> rhythmically expressed gene 5 protein-like	Cc
	AAEL000811	91 %	1e-127	48 %	ETN67412.1	methusalah	Ad
	AAEL002963	32 %	5e-09	57 %	XP_008549507.1	<sup>a</sup> ras guanine nucleotide exchange factor L isoform X8	Md
12 h Down regulated	AAEL006228	98 %	9e-102	45 %	XP_001846856.1	PPARgamma constitutive coactivator 1	Cq
	AAEL012622	98 %	5e-108	68 %	XP_001862944.1	ADAM metalloprotease	Cq
	AAEL007780	96 %	2e-107	57 %	AAV90698.1	putative salivary secreted protein 275	Aa
	AAEL009985	94 %	2e-59	65 %	XP_001868961.1	14.5 kDa salivary protein	Cq
	AAEL006346	81 %	5e-62	55 %	XP_005177200.1	<sup>a</sup> BAG family molecular chaperone regulator 2-like isoform X1	Mud
	AAEL003594	98 %	1e-169	61 %	XP_001862361.1	microtubule binding protein D-CLIP-190	Cq
	AAEL013356	30 %	8e-62	62 %	XP_003401795.1	<sup>a</sup> eukaryotic initiation factor 4A-like isoform 2	Bi
12 h Up regulated	AAEL006493	98 %	7e-11	49 %	AAV90653.1	putative salivary secreted peptide	Aa
	AAEL005874	100 %	4e-63	73 %	XP_003707525.1	<sup>a</sup> E3 ubiquitin-protein ligase AMFR-like	Mr
	AAEL006493	98 %	7e-11	49 %	AAV90653.1	putative salivary secreted peptide	Aa
	AAEL013220	75 %	3e-62	72 %	NP_648500.1	crimped	Dm
	AAEL011867	92 %	0	40 %	XP_003395464.1	<sup>a</sup> muscle M-line assembly protein unc-89 isoform X3	Apm
	AAEL014310	86 %	8e-34	79 %	NP_648366.2	calcium-independent phospholipase A2 VIA, isoform B	Dm
	AAEL007206	92 %	2e-22	48 %	XP_004526025.1	<sup>a</sup> rhythmically expressed gene 5 protein	Cc
	AAEL001576	94 %	1e-31	83 %	ETN61409.1	cysteine string protein	Ad
	AAEL003567	99 %	6e-43	49 %	AAV90653.1	putative salivary secreted peptide	Aa
	AAEL002578	97 %	1e-59	65 %	NP_649184.1	snakeskin, isoform A	Dm
	AAEL000811	91 %	1e-127	48 %	ETN67412.1	methusalah	Ad
	AAEL005428	98 %	2e-32	51 %	ABV44740.1	13.6 kDa midgut protein	Pp
	AAEL002963	32 %	5e-09	57 %	XP_008549503.1	<sup>a</sup> myb-like protein J isoform X4	Md

Aa *Aedes albopictus*, Ad *Anopheles darlingi*, Ag *Anopheles gambiae*, Am *Anopheles melas*, Apm *Apis mellifera*, Bi *Bombus impatiens*, Cc *Ceratitis capitata*, Cq *Culex quinquefasciatus*, Dm *Drosophila melanogaster*, Md *Microplitis demolitor*, Mud *Musca domestica*, Mr *Megachile roduntata*, Pp *Phlebotomus papatasi*  
<sup>a</sup>indicates protein classified as "PREDICTED"

[31]. It was previously reported the participation of the p38 MAPK signaling pathway in the response and defense against Cry11Aa toxin in *A. aegypti* [18, 25].

JNK and p38 have been shown to regulate a great number of genes in response to Cry5B in *C. elegans* [18]. The p38 MAPK pathway may be inducing expression of Ets domain containing transcription factors, which in turn could be the reason for an up regulation of metalloproteases [44]. Our data also suggest the involvement of signaling via PIP<sub>3</sub> in the larval defense response. Arachidonic acid, the product of phospholipase A2 activity, has been reported to stimulate cell adhesion via a novel MAPK p38-RhoA

pathway [45]. Both arachidonic acid and PIP<sub>3</sub> are messenger metabolites derived from membrane phospholipids. These data may indicate a link between some enriched functional processes detected in our analysis, and the potential role that they may play in defending *A. aegypti* from the effects of pore forming toxins. However, more precise biochemical experiments are required to evaluate the cross-talk between these signaling pathways.

#### Down-regulation response

*A. aegypti*'s defense response involves the down-regulation of several processes. Among these we identify

		Cry11Aa WT	No toxin	Cry11Aa E97A	Cry11Aa V142D	Regulation
Phospholipase A2	AAEL001523	0.987	-0.475	-0.913	0.374	up
Lipoma Preferred Partner	AAEL007704	0.822	-0.855	-0.004	-0.637	up
ADAM metalloprotease	AAEL005992	0.718	-0.803	-0.851	-0.997	up
Matrix Metalloproteinase	AAEL002661	0.769	-0.567	-0.944	-0.979	up
Ets Domain Containing Protein	AAEL006533	0.939	0.663	-0.806	-0.844	up
JNK	AAEL008622	0.983	0.788	-0.562	-0.626	up
Sorting Nexin	AAEL005655	0.819	-0.827	-0.59	-0.873	up
Sucrose transporter	AAEL003633	0.98	0.246	-0.974	0.864	down
Sugar transport protein	AAEL012903	0.845	0.784	-0.098	0.978	down
Monocarboxylate Transporter	AAEL008347	0.917	0.834	-0.383	0.851	down
Defensin Antimicrobial Peptide	AAEL003841	0.761	-0.136	-0.92	0.537	down
Hypothetical protein	AAEL003816	0.22	0.99	-0.574	0.596	down
AMP Dependent CoA ligase	AAEL014664	-0.104	0.904	0.986	0.346	down
Alkaline Phosphatase	AAEL003905	0.266	-0.024	0.456	0.661	down
Overall strong positive correlation		78.6%	42.9%	7.1%	42.9%	

**Fig. 4** RNAseq and RT-qPCR correlation. Transcript abundance ratios were determined for each gene by SYBR Green RT-qPCR on a biological replicate of a 12 h Cry11Aa exposure curve, a control curve of non-toxin exposed *A. aegypti* larvae, or larvae exposed to non-lethal Cry11Aa mutants. Spearman correlation was determined between corresponding RNAseq values and log<sub>2</sub> transformed abundance ratios. Strong positive correlations (above 0.5) are colored in white, weak positive correlation (between 0.3 and 0.5) are colored in light gray, and low, negative or no correlation values are colored in dark gray. Genes are indicated to be up regulated or down regulated as determined by RNAseq analysis. The percentage of genes with strong positive correlation between each curve and RNAseq data is shown

genes related detoxification proteins such a cytochrome 450 and ABC transporters. Most of these down-regulated processes were observed at 12 h of toxin exposure. It is notable that similar expression patterns were observed in *Bti* tolerant *A. aegypti* strains [46], in the Cry11Aa resistant *A. aegypti* [47], as well as in chemical insecticide resistant strains of *A. aegypti* [48]. It was suggested that this down-regulation may be a metabolic tradeoff for the energy spent on other defense processes [46, 48]. In the absence of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) from bacterial components to stimulate innate immunity in our purified Cry11Aa crystals, our results suggest that the cells divert metabolism to membrane remodeling and tissue junction

sealing, rather than functions for which no stimuli is detected. This energy saving measures could explain the initial down-regulation of cell proliferation, although this process seems to be induced at the last time-point analyzed, perhaps to substitute irreparably damaged cells after wound-healing. Our analysis also revealed an overall repression of transmembrane transport, especially that concerning sulfate metabolism and carbohydrates, which seems inconsistent with attempts to reestablish solute gradients after the disruption produced by Cry11Aa pores at the cell membrane. However, the cell appears to shift first to restore membrane integrity and repress any energy consuming activities not related to this process.

As mentioned above we found genes with ABC transporter domains down-regulated DEG. This is relevant since some Cry1Ac resistance phenotypes in different lepidopteran species, such as *Plutella xylostella*, *Bombyx mori*, *Heliothis virescens* and *Helicoverpa armigera* larvae are linked to mutations in the ABCC2 transporters [49–51], and negative differential expression of genes involved in detoxification activity, including ABC transporters and cytochrome 450, has been found in mosquitoes tolerant to *Bti* [46]. Many detoxification processes require energy consumption to pump offending agents out of the cell. We show here that when membrane is damaged due to the pore formation of the toxin, the cell responds by resealing the cell membrane and removing damaged parts of the membrane instead of activation of transmembrane transporters and detoxification. A possible explanation is that down regulation of detoxification-related genes could be an energy saving process as previously suggested for *Bti*- and Cry11Aa-resistant *Ae. aegypti* mosquitoes that also showed under-transcription of enzymes classically involved in the detoxification [46–48].

#### Comparison with mosquito resistant to *Bti* toxins and with Cry toxin intoxications in different insect orders

It is interesting to mention that the convergence of some processes from the transitory response to Cry11Aa intoxication with that of a genetically established resistance to *Bti* toxins [46–48] may suggest that resistance involves the selection of mutations that could confer a metabolic state similar to a constitutive toxin defense response. Awareness of the pathways utilized by midgut cells to contend with toxin damage may allow us to better predict possible resistance mechanisms that could occur by field application of *Bt* formulations.

Importantly, there is a great deal of overlap in genome wide transcription changes and functional enrichment of *A. aegypti* reported here with that found for intoxication of *T. molitor* with Cry3Aa [24]. For example, both analyses found that toxin treated larvae show a repression of enzymes related to antioxidant processes, as well as functions associated with DNA replication and cell division. Carbohydrate and tricarboxylic acid enzymes are also repressed in both organisms. Signaling through MAPK and small GTPases are induced in both organisms upon intoxication, as are functions related to maintaining cell integrity and cytoskeleton complexes. All of these data suggest that insects from different orders respond similarly to Cry toxin action, supporting a conserved defense response to Cry toxins in these insect species.

#### Implications in the Cry11Aa mechanism of action

Finally, it appears that only fully functional pore forming Cry11Aa toxins is able to elicit the full range of

transcriptional changes observed in this work. Neither Cry11Aa-mutant toxins tested in RT-qPCR assays showed high positive correlation with RNAseq data, where Cry11Aa E97A, which is unable to form a stable oligomeric pre-pore structure, was most different. The higher correlation observed with Cry11Aa V142D for some genes is similar to that observed for non-toxin exposed larvae, but could also be due to non-complete loss of function. The oligomeric structure formed by this toxin may not form a pore stable enough to cause a lethal phenotype, but that is nonetheless sufficient to be sensed by the cellular machinery.

Our data indicated that binding to the cell membrane was not enough to provoke a response, involving an intracellular cascade activation of a receptor coupled protein G that activates adenylate cyclase and PKA activities as was proposed in Zhang *et al.*, 2006 [52]. First, our results with the mutant toxins indicated that full pore formation is required to elicit the entire response program, at least for the genes tested. We observed activation of PIP3 response and small monomeric GTPases families which are found in the cytosol and have a molecular weight of about 21 kDa, in contrast to the proposed participation of a heterotrimeric G proteins, specifically from  $G_s$  family that participates in activation of adenylate cyclase [52]. Finally, we did not observe changes in PKA expression.

#### Conclusions

The burden imposed on global human health by mosquito borne diseases is tremendous. Biological control of mosquito populations through the use of *Bt* toxins is an important part of strategies to diminish this burden. However, it is important to consider emergence of resistant insect vector populations due to widespread use of *Bti* preparations. Although *Bti* has been used for decades worldwide seemingly without such resistance events surfacing, the risk remains. In this work we took a glimpse at the physiological response that the *A. aegypti* midgut mounts upon action of a Cry toxin, and how the epithelial cells therein change their gene expression to defend and restore tissue integrity. This knowledge contributes to the field of *Bt* toxins in several ways. First, it complements and extends earlier transcriptomic studies performed on other insects exposed to Cry that may allow us to determine differences and similarities in response between distinct insect species. Second, it improves our understanding of the overall molecular interactions and the mode of action of Cry toxins with target cells, building upon the *in vitro* biochemical data with data of *in vivo* effects. Lastly, we now possess information that may be helpful to improve our use of *Bti* toxins for the biological control of mosquitoes. Knowing what are the defense response pathways employed by mosquito larvae

to survive the activity of *Bt* toxins may potentially help in the design of better strategies or formulations that could limit the defense response in mosquito. An alternative could be the use of inhibitors of pathways that may weaken the mosquito's defense mechanisms. Another alternative is the release of mosquitoes with knock-out or mutant alleles in proteins of the defense pathways. It is clear that these ideas are just speculations that require much further work before their field application to minimize the impact of vector-borne diseases on human populations.

## Methods

### Production, purification of Cry11Aa toxins and insect bioassay

*Bt* strains were grown for three days on HCT medium supplemented with 10 µg/ml of erythromycin as previously described [5] for the production of crystals of Cry11Aa or its mutants E97A and V142D [35, 36]. Crystals were obtained by washing the cultures with 0.3 M NaCl/0.01 M EDTA and purified by discontinuous sucrose gradients [53]. The medium lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of wild-type Cry11Aa pure crystals was determined after 24 h exposure of 4th instar *A. aegypti* larvae to different doses in a response curve in triplicate as previously reported [5] and calculated by ProBit analysis (POLO-Plus, LeOra Software).

### Intoxication and tissue dissection

For each time of each biological replicate of the intoxication assay, a dose of 500 ng Cry11Aa pure crystals per ml was administered to three cups containing each ten 4<sup>th</sup>-instar *A. aegypti* larvae in 100 ml of water, these experiments were performed four times. After 3, 6, 9 and 12 h of incubation with Cry11Aa crystals the midgut tissue was dissected from the larvae, taking care to remove the food bolus. Control conditions of non-intoxicated larvae at time point zero and 12 h without toxin were also analyzed in triplicate. Dead larvae or larvae that were severely affected by intoxication were discarded. Each biological replicate was conducted at the same time of the day to minimize gene expression changes due to circadian rhythms. The dissected midguts were placed in RNeasy lysis buffer (Qiagen) for subsequent processing and stored at -70 °C per the manufacturer's instructions.

### RNA extraction and sequencing

Strength of differential expression analysis increases with the number of replicates used to estimate the expression levels, for this reason four biological replicates were sequenced on an Illumina platform. RNeasy lysis buffer was removed from dissected midguts and the tissues homogenized with 27G syringes in TRIzol reagent (Ambion, Life Technologies). Cellular debris was removed by

centrifugation at 12,000 *xg* for 10 min at 4 °C, and the supernatant transferred to new tubes. RNA was extracted following the manufacturer's instructions. Total RNA was dissolved in DEPC treated water and quantified by NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). RNA was treated with DNase I (Thermo Scientific), and samples were cleaned with RNeasy columns (QIAGEN) following the kit's protocol. The integrity and concentration of eluted RNA were determined by Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). For sequencing, mRNA libraries were prepared from 2 µg of total RNA using standard Illumina protocols using the TruSeq RNA Sample Preparation Kit. The mRNA libraries were sequenced in 72 bp pair-ended format on a Genome Analyzer Iix (Illumina) at the Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) of the Instituto de Biotecnología-UNAM facilities, or in 100 bp pair-ended format on a Illumina Hi-Seq 2000 at Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) of Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) facilities. Quality control of reads was performed at UUSMB facilities. Read quality control include data for GC content, for overrepresented reads (for example, contaminating ribosomal RNA reads). Quality per base and more parameters were obtained using the FastQC utility. A specific read is flagged as overrepresented if that identical sequence appears above the 0.1 % of total reads obtained in the sequencing of an individual sample. Longer reads were trimmed with FastX-Trimmer to 72 bp to remove adapter and lower quality bases at the ends.

### Differential expression analysis

RNAseq reads were aligned to *A. aegypti* transcripts v3.2 (Vectorbase) [54] using TopHat 2 v 2.0.12 [55] in transcriptome mode and base features file v 3.2, allowing for 2 mismatches. For each sample, a count table for all genes was generated with HTSeq Count v0.5.4p5 [56]. Aligned reads were filtered to remove reads with multiple alignments or ambiguous assignment by executing the script in "intersection non-empty" mode. Only reads with unique alignments were further analyzed. A count table for all samples of four biological replicates was compiled and used for differential expression analysis by the Bioconductor packages DESeq2 v 1.4.5 [29] and EdgeR v 3.6.8 [30], both in generalized linear model mode that included both time of toxin exposure and biological replicate of the experiment as possible sources of variation to control for differences among individuals dissected on different days. Results for DEG were obtained from comparisons of each intoxication time to non-intoxicated control. A gene was considered significant if the adjusted *p*-value was < 0.05 for DESeq2 or if False Discovery Rate was < 0.05 for EdgeR. For each



intoxication time DEG reported by both tools were recovered by a custom R script.

### Functional analysis

GO enrichment analysis of biological process annotations was performed with the Bioconductor package TopGO v 2.16.0 [57] using the “Weight” algorithm. GO annotations for all genes were retrieved from Vectorbase, formatted, and used to detect enrichment of GO terms in up or down regulated DEG from each intoxication condition on genes common to both differential expression analysis tools. We used the “Weight” algorithm because it yields more informative GO terms due to the way it processes the GO ontology hierarchy, and allowed us to obtain information of more particular metabolic processes. A *p*-value of 0.1 was used as cutoff for enriched terms. GO annotations terms with less than five annotated genes were excluded from analysis to reduce statistical artifacts. Genes without a GO biological process term were further analyzed, and their predicted Interpro functional domains were retrieved from Vectorbase. Frequency for domains was counted with a custom Perl script and those above the 90<sup>th</sup> percentile were kept. Finally, we conducted pBLAST queries [34] against NR database with genes for which no Interpro domain could be retrieved. Only matches having more than 40 % of query identity and an *e*-value of <  $e^{-8}$  were considered significant.

### Clustering analysis

Through DESeq2 a variance stabilized transformation was performed on all  $\log_2$  fold changes for all samples. These data were filtered to retain only those genes that were determined to have significant differential expression in at least one treatment and were part of the genes common to DESeq2 and EdgeR analysis. Data for each gene were summarized as mean of replicates per treatment. Clustering of individual DEGs that followed the same expression pattern over the 4 time points was performed with Cluster 3.0 (Stanford University), centering values by mean and using complete linkage and euclidian distances as parameters. Java Treeview v1.1.6r4 [58] was used to visualize results and to recover clusters of genes with common expression profiles throughout the intoxication experiment. GO enrichment analysis was performed within these clusters as before.

### RT-qPCR target selection and validation

Targets for validation by RT-qPCR were selected from DEG. These targets were selected according to three criteria: high statistical significance of differential expression, absolute  $\log_2$  fold change larger than 2, and statistical significance in more than one tested condition. Some target

genes do not cover all criteria but were nonetheless selected due to their very high significance or  $\log_2$  fold change. Primers were designed to amplify products of 100–180 bp. All primer pairs were designed in the same exon with exception of two pairs of primers for AAEL003633 and AAEL008192 genes, which were located in two exons separated by an intron. For cDNA template synthesis from RNA samples we used Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer’s instructions. For all primers, a control amplification was performed with the total RNA in absence of reverse transcriptase, in these controls the signal was absent or extremely low indicating that contamination of our total RNA samples was negligible.

Dynamic range for signal detection was determined by SYBR-green (Thermo Scientific) RT-qPCR amplification of some selected genes on cDNA prepared using 5000, 500, 50, 5 and 0.5  $\mu\text{g}$  of total RNA from *A. aegypti* midgut on Illumina Eco equipment. To determine primer amplification efficiency, 1.5  $\mu\text{g}$  of total RNA from each time of a LC<sub>50</sub> intoxication replicate were mixed for cDNA synthesis. This template was used for SYBR green RT-qPCR amplification in 10-fold serial dilutions for each primer pair.

RT-qPCR was performed (Roche Light Cycler 480) using a Cry11Aa LC<sub>50</sub> intoxication biological replicate that was not sequenced. The RT-qPCR data for all 14 selected genes presented in Additional file 5: Figure S1 were obtained for 0, 3, 6, 9 and 12 h after administration of Cry11Aa. In the case of Cry11Aa Cry11Aa E97A, and Cry11Aa V142D mutants the RT-qPCR data were obtained after 0, 9, and 12 h since these times were the ones that showed most important significant changes in expression. The controls of no-toxin exposed larvae were also done at 0, 9 and 12 h. Primer efficiency correction was used in  $\Delta\Delta\text{Cq}$  relative quantitation analysis. The ribosomal protein S3 gene was used for reference and normalization. Transcript abundance ratios between conditions were  $\log_2$  transformed and the Spearman correlation determined with corresponding RNAseq  $\log_2$  fold data for each gene.

### Western blot

Midguts were dissected from 4<sup>th</sup> instar *A. aegypti* larvae and pools of 50 entire midguts in 100  $\mu\text{l}$  of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4 % CHAPS, 40 mM dithiothreitol, 0.5 % pharmalyte or IPG buffer [GE Life Sciences], 0.002 % bromophenol blue, 2.5 ml) containing protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics) and were kept at  $-80^\circ\text{C}$  until processed. Midgut pools were homogenized with a motorized pellet pestle (Motor Sigma-Aldrich Z359971.1EA) on ice. Ten  $\mu\text{g}$  of midgut protein was fractionated by 10 % SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Western blot was performed as described by Aranda *et al.*, (1996) [59]. JNK protein was detected after incubation of 1 h with polyclonal anti-JNK (1/5,000; JNK2 N-18: sc-827

Santacruz Biotech. Inc). Visualization was performed with goat anti-rabbit secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (Amersham) (1/10,000; 1 h), followed by Super Signal chemiluminescence Luminol substrate (Pierce), according to the manufacturer's instructions.

#### Data accessibility

Raw RNA-seq data and gene expression abundance measurements for this study have been deposited at Gene Expression Omnibus under accession code GSE74785. Read data can be accessed directly in Sequence Read Archive with accession code SRP065731.

#### Additional files

**Additional file 1: Table S1.** TopHat2 alignment rates. Number of total reads is rounded to closest million. (DOCX 73 kb)

**Additional file 2: Table S2.** Complete list of 1060 differentially expressed genes across all experimental conditions (3–12 h of Cry11Aa toxin administration) and gene description (if available), by expression profile cluster. (DOCX 325 kb)

**Additional file 3: Table S3.** List of differentially expressed genes in control (non-toxin exposed larvae) RNAseq data at 12 h. (DOCX 68 kb)

**Additional file 4: Table S4.** List of all Interpro domains found in differentially expressed genes without biological process GO annotation. (DOCX 92 kb)

**Additional file 5: Figure S1.** RNAseq and log<sub>2</sub> transformed RT-qPCR fold changes. Data is presented for RNAseq and RT-qPCR at 3, 6, 9, and 12 h of an LC<sub>50</sub> Cry11Aa treatment. Also shown are RT-qPCR values for 9 and 12 h of unexposed larvae or Cry11Aa non-toxic mutants treatments. All log<sub>2</sub> fold changes are referred to control larvae at the start of respective treatment. Panel A and B show genes with high correlation between RNA-seq data and RT-qPCR of Cry11Aa. Panel C shows the three genes with low or no positive correlation between these data. (ZIP 779 kb)

**Additional file 6: Figure S2.** Characterization of JNK expression by Western Blot analysis using α-JNK antibody. Presence of JNK was determined on protein extracts of midguts of *A. aegypti* larvae exposed to Cry11Aa for 9 or 12 h (lanes 4 and 5, respectively). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes for Western Blotting with human αJNK2 antibody. Non-toxin exposed larvae dissected at corresponding times were used as controls (lanes 1 to 3). (TIF 1042 kb)

#### Abbreviations

ALP: alkaline phosphatases; APN: aminopeptidases; *Bt*: *Bacillus thuringiensis*; *Bti*: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; DEG: differentially expressed genes; WHO: World Health Organization.

#### Competing interests

Authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

PEC performed most of the experimental and bioinformatics analysis of this study. ACR performed larvae dissection, protein extraction and western blotting. PEC, AB, MS and SSG participate in data analysis, wrote and corrected the manuscript. PEC, MS and AB conceived and designed the project. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera, and Ricardo Grande, Alejandro Sánchez, Verónica Jiménez and Jérôme Verleyen of the UUSMB of the Instituto de Biotecnología-UNAM, and LANGEBIO of CINVESTAV facilities for their technical assistance. Research was funded in part through grant NIH 2R01 AI066014, CONACYT 0221200, PEC acknowledges CONACYT for PhD fellowship.

#### Author details

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250 Morelos, Mexico. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Coyoacán, Distrito Federal 04510, Mexico. <sup>3</sup>Cell Biology and Neuroscience Department, University of California, Riverside, Riverside, CA 92521, USA.

Received: 7 September 2015 Accepted: 24 November 2015

Published online: 09 December 2015

#### References

- WHO: Dengue and Severe Dengue, Fact sheet No 117 WHO. 2015 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Jirakanjanakit N, Saengtharapip S, Rongnoparut P, Duchon S, Bellec C, Yoksan S. Trend of temephos resistance in *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes in Thailand during 2003–2005. *Environ Entomol.* 2007;36(3):506–11.
- Devine G, Furlong M. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agric Hum Values.* 2007;24(3):281–306.
- Bravo A, Likitvatanavong S, Gill SS, Soberon M. Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol.* 2011;41(7):423–31.
- Perez C, Fernandez LE, Sun J, Folch JL, Gill SS, Soberon M, et al. Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(51):18303–8.
- Canton PE, Zanich Reyes EZ, de Escudero R, Bravo A, Soberon M. Binding of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides.* 2011;32(3):595–600.
- Wirth MC, Georghiou GP, Federici BA. CytA enables CryIV endotoxins of Bacillus thuringiensis to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10536–40.
- Pardo-Lopez L, Soberon M, Bravo A. Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev.* 2013;37(1):3–22.
- Likitvatanavong S, Chen J, Evans AM, Bravo A, Soberon M, Gill SS. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(7):2829–38.
- Fernandez-Luna MT, Lanz-Mendoza H, Gill SS, Bravo A, Soberon M, Miranda-Rios J. An alpha-amylase is a novel receptor for Bacillus thuringiensis ssp. israelensis Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ Microbiol.* 2010;12(3):746–57.
- Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell.* 2006;126(6):1135–45.
- Mestre MB, Colombo MI. Autophagy and toxins: a matter of life or death. *Curr Mol Med.* 2013;13(2):241–51.
- Keyel PA, Loultcheva L, Roth R, Salter RD, Watkins SC, Yokoyama WM, et al. Streptolysin O clearance through sequestration into blebs that bud passively from the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 14): 2414–23.
- Husmann M, Dersch K, Bobkiewicz W, Beckmann E, Veerachato G, Bhakdi S. Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming *S. aureus* alpha-toxin or streptolysin O. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(4):1128–34.
- Husmann M, Beckmann E, Boller K, Kloft N, Tenzer S, Bobkiewicz W, et al. Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. *FEBS Lett.* 2009;583(2):337–44.
- Popova TG, Millis B, Bradburne C, Nazarenko S, Bailey C, Chandhoke V, et al. Acceleration of epithelial cell syndecan-1 shedding by anthrax hemolytic virulence factors. *BMC Microbiol.* 2006;6:8.
- Stassen M, Muller C, Richter C, Neudorff C, Hultner L, Bhakdi S, et al. The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infect Immun.* 2003; 71(11):6171–7.
- Kao CY, Los FC, Huffman DL, Wachi S, Kloft N, Husmann M, et al. Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathog.* 2011;7(3):e1001314.

19. Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, et al. Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385(4):503–6.
20. Ratner AJ, Hippe KR, Aguilar JL, Bender MH, Nelson AL, Weiser JN. Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J Biol Chem*. 2006;281(18):12994–8.
21. Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshusemann C, Lee U, Zysk G, et al. Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis*. 2002;11(3):355–68.
22. Nagahama M, Shibutani M, Seike S, Yonezaki M, Takagishi T, Oda M, et al. The p38 MAPK and JNK pathways protect host cells against *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Infect Immun*. 2013;81(10):3703–8.
23. Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbeil J, van der Goot FG, Aroian RV. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(30):10995–1000.
24. Oppert B, Dowd SE, Bouffard P, Li L, Conesa A, Lorenzen MD, et al. Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS One*. 2012;7(4):e34624.
25. Cancino-Rodezno A, Alexander C, Villaseñor R, Pacheco S, Porta H, Pauchet Y, et al. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2010;40(1):58–63.
26. Rodriguez-Cabrera L, Trujillo-Bacallao D, Borrás-Hidalgo O, Wright DJ, Ayra-Pardo C. Molecular characterization of Spodoptera frugiperda-Bacillus thuringiensis Cry1Ca toxin interaction. *Toxicon*. 2008;51(4):681–92.
27. Meunier L, Prefontaine G, Van Munster M, Brousseau R, Masson L. Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Mol Biol*. 2006;15(4):475–83.
28. Sparks ME, Blackburn MB, Kuhar D, Gundersen-Rindal DE. Transcriptome of the *Lymantria dispar* (gypsy moth) larval midgut in response to infection by *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One*. 2013;8(5):e61190.
29. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
30. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26(1):139–40.
31. Citalan-Madrid AF, Garcia-Ponce A, Vargas-Robles H, Betanzos A, Schnoor M. Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms. *Tissue Barriers*. 2013;1(5):e26938.
32. Likitvatanavong S, Chen J, Bravo A, Soberón M, Gill SS. Cadherin, alkaline phosphatase and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus thuringiensis* jegathesan in *Aedes aegypti*. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(1):24–31.
33. Mitchell A, Chang HY, Daugherty L, Fraser M, Hunter S, Lopez R, et al. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D213–21.
34. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403–10.
35. Muñoz-Garay C, Rodríguez-Almazan C, Aguilar JN, Portugal L, Gomez I, Saab-Rincon G, et al. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(23):7548–50.
36. Carmona D, Rodríguez-Almazan C, Muñoz-Garay C, Portugal L, Perez C, de Maagd RA, et al. Dominant negative phenotype of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab, Cry11Aa and Cry4Ba mutants suggest hetero-oligomer formation among different Cry toxins. *PLoS One*. 2011;6(5):e19952.
37. Nielsen E, Cheung AY, Ueda T. The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiol*. 2008;147(4):1516–26.
38. Citi S, Guerrero D, Spadaro D, Shah J. Epithelial junctions and Rho family GTPases: the zonular signalosome. *Small GTPases*. 2014;5(4):1–15.
39. Warner SJ, Longmore GD. Distinct functions for Rho1 in maintaining adherens junctions and apical tension in remodeling epithelia. *J Cell Biol*. 2009;185(6):1111–25.
40. Yanagihashi Y, Usui T, Izumi Y, Yonemura S, Sumida M, Tsukita S, et al. Snakeskin, a membrane protein associated with smooth septate junctions, is required for intestinal barrier function in *Drosophila*. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 8):1980–90.
41. Nilton A, Oshima K, Zare F, Byri S, Nannmark U, Nyberg KG, et al. Crooked, coiled and crimped are three Ly6-like proteins required for proper localization of septate junction components. *Development*. 2010;137(14):2427–37.
42. Los FC, Kao CY, Smitham J, McDonald KL, Ha C, Peixoto CA, et al. RAB-5 and RAB-11-dependent vesicle-trafficking pathways are required for plasma membrane repair after attack by bacterial pore-forming toxin. *Cell Host Microbe*. 2011;9(2):147–57.
43. Corrotte M, Fernandes MC, Tam C, Andrews NW. Toxin pores endocytosed during plasma membrane repair traffic into the lumen of MVBs for degradation. *Traffic*. 2012;13(3):483–94.
44. Ghosh S, Basu M, Roy SS. ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3. *J Biol Chem*. 2012;287(18):15001–15.
45. Garcia MC, Ray DM, Lackford B, Rubino M, Olden K, Roberts JD. Arachidonic acid stimulates cell adhesion through a novel p38 MAPK-RhoA signaling pathway that involves heat shock protein 27. *J Biol Chem*. 2009;284(31):20936–45.
46. Despres L, Stalinski R, Tetreau G, Paris M, Bonin A, Navratil V, et al. Gene expression patterns and sequence polymorphisms associated with mosquito resistance to *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins. *BMC Genomics*. 2014;15:926.
47. Lee S-B, Aimanova KG, Gill SS. Alkaline phosphatase and aminopeptidase are altered in a Cry11Aa resistant strain of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014;54:112–21.
48. Despres L, Stalinski R, Faucon F, Navratil V, Viari A, Paris M, et al. Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. *Biol Lett*. 2014;10(12):20140716.
49. Guo Z, Kang S, Zhu X, Xia J, Wu Q, Wang S, et al. Down-regulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Insect Biochem Mol Biol*. 2015;59:30–40.
50. Baxter SW, Badenes-Perez FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N, Kain W, et al. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in lepidoptera. *Genetics*. 2011;189(2):675–9.
51. Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H, Heckel DG. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *PLoS Genet*. 2010;6(12):e1001248.
52. Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:9897–902.
53. Thomas WE, Ellar DJ. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci*. 1983;60:181–97.
54. Giraldo-Calderon GI, Emrich SJ, MacCallum RM, Maslen G, Dialynas E, Topalis P, et al. VectorBase: an updated bioinformatics resource for invertebrate vectors and other organisms related with human diseases. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D707–713.
55. Kim D, Perteu G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013;14(4):R36.
56. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11(10):R106.
57. Alexa A, Rahnenfuhrer J. topGO: Enrichment analysis for Gene Ontology. In. 2.6.0 edn; 2010: R package version 2.23.0 <https://www.bioconductor.org/packages/3.3/bioc/html/topGO.html>.
58. Saldanha AJ. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 2004;20(17):3246–8.
59. Aranda E, Sanchez J, Peferoen M, Guereca L, Bravo A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Invertebr Pathol*. 1996;68(3):203–12.