



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Optimización de la mutagénesis en los genes *abca2*, *abcb1*, *abcc2* y *phb2*
del mosquito *Aedes aegypti* utilizando CRISPR-Cas9”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Juan Ulises Gómez Hernández

DIRECTORA DE TESIS

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Enrique Salas Vidal
Instituto de Biotecnología, UNAM

CO-DIRECTOR

Dr. Sabino Pacheco Guillén
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Enero, 2023



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.

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN206721 y CONACYT
Ciencia de Frontera 6693.

AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México** por darme las herramientas necesarias para continuar con mi formación académica en el área de la investigación científica.

A la **Dra. María Alejandra Bravo de la Parra** por recibirme en su laboratorio para realizar mi proyecto de maestría, por la motivación constante para seguir adelante con mi carrera científica y por todos sus consejos, enseñanzas y críticas constructivas que me hicieron mejorar semestre tras semestre.

Al **Dr. Sabino Pacheco Guillén** por darme la confianza para formar parte de su equipo de trabajo, por la paciencia, comprensión y toda experiencia transmitida durante los dos años de maestría. Por hacer de mi estadía en el IBt una experiencia realmente enriquecedora.

Al **Dr. Mario Soberón Chávez** por sus comentarios enriquecedores en el seminario y por transmitirme su experiencia como investigador.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por otorgarme la beca con CVU **1083035** para poder realizar mis estudios de posgrado.

Al **Dr. David Romero**, Al **Dr. Ismael Hernández**, al **Dr. Adán Guerrero**, a la **Dra. Blanca Ruíz** y a la **Dra. Denhi Schnabel**, miembros del jurado de examen, por todo el tiempo que dedicaron a leer mi tesis, y por darme las correcciones y sugerencias que permitieron mejorar este trabajo.

A **Isabel Gómez** por sus consejos y motivación que hicieron realmente agradable mi estancia en el laboratorio.

A **Lizbeth Cabrera** y **Jorge Sánchez** por su apoyo en cuestiones técnicas que contribuyeron a que pudiera realizar mis actividades de manera adecuada. Especialmente a Liz por su apoyo en el cuidado y mantenimiento del insectario.

A **Adrián, Samira, Nathaly, Ángel, Francisco** y **Jhones** por hacer tan agradable mi estancia en el laboratorio 20 con su buena actitud, plática y consejos. Especialmente agradezco a Adrián por su amistad y apoyo antes y durante nuestra estancia en el IBt.

A mis padres **Ulises Gómez** y **Beatriz Hernández**, y mis hermanos **Isaac, Oswaldo** y **Mariana**, por su amor y apoyo para llevar a cabo mis objetivos de vida.

A **Mariana, Alba, Karla** y **Adrián** por su amistad, las risas, los viajes y todos los momentos agradables que compartimos gracias a que coincidimos en el posgrado.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	10
<i>Bacillus thuringiensis</i>	10
Las toxinas Cry	13
<i>Aedes aegypti</i>	15
ANTECEDENTES.....	18
Los transportadores ABC	18
La prohibitina.....	24
El sistema CRISPR-Cas9.....	26
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
METAS ESPECÍFICAS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Identificación de genes <i>abc</i> en el genoma de <i>A. aegypti</i>	30
Perfil de expresión de genes <i>abc</i> y <i>phb2</i>	31
Diseño y síntesis de sgRNA's	31
Expresión y purificación de N-MBP-Cas9.....	33
Evaluación de la eficiencia de edición <i>in vitro</i>	34
Microinyección de embriones	36
Aislamiento y caracterización de mutantes.....	37
Producción de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa	37
Bioensayos de susceptibilidad a Cry4Ba y Cry11Aa	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
Genes <i>abc</i> en <i>A. aegypti</i>	38
Perfil de expresión de genes <i>abc</i> y <i>phb2</i>	40
Selección de crRNA's.....	42
Ensamble de sgRNA's	42
Producción y determinación de la actividad de N-MBP-Cas9.....	45
Análisis del corte en el DNA templado inducido por Cas9	47
Microinyección de embriones	49
Caracterización de mutantes.....	51
Producción de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa	53

Bioensayos de susceptibilidad a Cry4Ba y Cry11Aa	53
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS	¡Error! Marcador no definido.

Índice de figuras

Figura 1. Estructura completa de la toxina Cry1Ac.....	13
Figura 2. Mecanismo de acción de las toxinas Cry en lepidópteros.....	15
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	17
Figura 4. Estructura general de un transportador completo (FT) tipo exportador.....	19
Figura 5. Estructura del complejo de prohibitina en la membrana interna mitocondrial	25
Figura 6. Sistema CRISPR-Cas9.....	27
Figura 7. Árbol filogenético de los genes <i>abc</i> de <i>A. aegypti</i>	39
Figura 8. Perfil de expresión de genes <i>abc</i> y <i>phb2</i> en el intestino de larvas de 4° instar de <i>A. aegypti</i>	41
Figura 9. Diagrama de procedimiento para síntesis de sgRNA's.....	42
Figura 10. Esquema representativo de genes seleccionados y los sitios objetivo de cada sgRNA.....	43
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del ensamblaje por PCR del DNA correspondiente a cada sgRNA.....	44
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la transcripción in vitro correspondiente a cada sgRNA.	44
Figura 13. Cromatograma resultante de la cromatografía de afinidad por interacción Níquel/ Tag Poli-Histidina.....	45
Figura 14. SDS-PAGE de volumen muerto y fracciones recuperadas de la elución de la cromatografía de afinidad.	45
Figura 15. Cromatograma resultante de la cromatografía de intercambio catiónico.....	46
Figura 16. SDS-PAGE de fracciones recuperadas de la elución de la cromatografía de afinidad.....	46
Figura 17. Digestión de fragmento de <i>abca2</i> con Cas9 comercial (BioLabs) y N-MBP-Cas9.	47

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación de las regiones seleccionadas de los genes <i>abca2</i> , <i>abcb1</i> y <i>abcc2</i>	48
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de ensayo de digestión in vitro con nuevo lote de Cas9 y concentraciones de sgRNA's ajustadas.	49
Figura 20. Genotipificación de a) G ₁ ABCA2mut y b) G ₁ PHB2mut.....	52
Figura 21. SDS-PAGE de suspensiones de espora/cristal de cultivos de Cry4Ba y Cry11Aa.	53

Índice de tablas

Tabla 1. Primers utilizados para ensamblaje de DNA de cada sgRNA.	32
Tabla 2. Primers diseñados para amplificación de regiones de genes <i>abca2</i> , <i>abcb1</i> y <i>abcc2</i>	35
Tabla 3. Tamaño esperado de productos de digestión in vitro con cada sgRNA.	36
Tabla 4. Resultados de microinyecciones realizadas.....	50
Tabla 5. Controles implementados durante proceso de microinyección.	50
Tabla 6. Resultados de bioensayos de susceptibilidad a Cry4Ba y Cry11Aa.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC:	ATP Binding Casstette
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
ALP:	Fosfatasa Alcalina
APN:	Aminopeptidasa
ARN:	Ácido ribonucleico
ATP:	Adenosin trifosfato
Bt:	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti:	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i>
Cas:	CRISPR-Associated Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic
CRISPR:	Repeats
crRNA:	CRISPR-RNA
DO:	Densidad Óptica
ECL:	Extra Celular Loop
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
FPLC:	Fast Protein Liquid Chromatography
FT:	Full-Transporter
GBS:	Genotyping by sequencing
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HT:	Half-Transporter
IPTG:	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB:	Luria Bertani
LC-MS:	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
MBP:	Maltose Binding Protein
ORF:	Open Reading Frame
PAM:	<u>P</u> rospacer <u>A</u> djacent <u>M</u> otif
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PHB1:	Prohibitina 1
PHB2:	Prohibitina 2
PicR:	Pleiotropic transcriptional regulator
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS- Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
PAGE: electrophoresis
sgRNA: single guide RNA
TAE: Tris-Acetato-EDTA
TMD: Transmembrane domains
tracrRNA: Trans-activating crRNA
UTR: Untranslated region

RESUMEN

El control biológico del mosquito *Aedes aegypti*, vector de enfermedades como el dengue y la fiebre del Zika, se ha realizado con éxito mediante la utilización de *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti), bacteria productora de toxinas entomopatógenas letales para esta especie como son la toxina Cry4Ba y Cry11Aa. El modo de acción de las toxinas Cry inicia con la unión reversible con diferentes proteínas membranales del células del epitelio intestinal de las larvas de las especies susceptibles, proteínas que funcionan como receptoras y que suelen ser redundantes entre órdenes de insectos como lepidópteros, coleópteros y dípteros. Los transportadores ABC son proteínas transmembranales encargadas del transporte activo de una gran diversidad de sustratos, incluyendo xenobióticos. La prohibitina es una proteína encontrada principalmente en la membrana mitocondrial y la membrana plasmática de la célula que se ha relacionado con diferentes procesos celulares como la apoptosis. Existe evidencia de la participación de estos dos grupos de proteínas como receptores de las toxinas Cry en lepidópteros y coleópteros por lo que se ha propuesto que estas proteínas también están involucradas en el mecanismo de acción en *A. aegypti*. En este proyecto se desarrolló y optimizó una estrategia para mutagenizar los genes *abca2*, *abcb1*, *abcc2* y *phb2* mediante la estrategia de edición de genomas por CRISPR-Cas9 con la finalidad de producir cambios importantes en su expresión. Finalmente se obtuvieron un par de mutantes, una en el gen *abca2* y la otra en *phb2*, que fueron retadas a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.

ABSTRACT

Biological control of the *Aedes aegypti* mosquito, a vector of diseases such as dengue and Zika fever, has been successfully carried out using *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* (Bti), a bacterium that produces entomopathogenic toxins that are lethal for this species, such as the toxin Cry4Ba and Cry11Aa. The mode of action of the Cry toxins begins with the reversible union with different membrane proteins of the intestinal epithelium cells of the larvae of the susceptible species, proteins that function as receptors and that are usually redundant among orders of insects such as Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. ABC transporters are transmembrane proteins responsible for the active transport of a wide variety of substrates, including xenobiotics. Prohibitin is a protein found mainly in the

mitochondrial membrane and the plasma membrane of the cell that has been related to different cellular processes such as apoptosis. There is evidence of the participation of these two groups of proteins as receptors for Cry toxins in lepidoptera and coleoptera, so it has been proposed that these proteins are also involved in the mechanism of action in *A. aegypti*. In this project, a strategy was developed and optimized to mutagenize the *abca2*, *abcb1*, *abcc2* and *phb2* genes using the CRISPR-Cas9 genome editing strategy to produce significant changes in their expression. Finally, a pair of mutants were obtained, ABCA2mut and one PHB2mut, that were challenged by the Cry4Ba and Cry11Aa toxins.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis

Historia de Bt

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva descubierta en el año 1901 por Shigetane Ishiwatari al ser aislada del gusano de la seda (*Bombyx mori*), y se consideró que era el agente causante de la muerte de poblaciones de insectos en su etapa larvaria (Watkins et al., 2012). Diez años después fue redescubierta en pupas de *Ephestia kuehniella*, un lepidóptero plaga de cultivos de trigo, atribuyéndole actividad insecticida contra este insecto. En el año 1928 se puso en marcha el primer proyecto a pequeña escala para utilizar un preparado de espora-cristal de Bt, el cual se utilizó como agente insecticida para controlar la plaga de *Ostrinia nubilalis* en cultivos de maíz en Europa. Sin embargo, no fue hasta el año 1938 que se comenzó a comercializar una presentación en *spray* de Bt en Francia, y dos décadas después en Estados Unidos (Lambert & Peferoen, 1992).

A mediados de los años 70's ya se conocían 13 cepas de Bt con actividad contra lepidópteros. En el año 1977 se descubrió que la subespecie Bt *israelensis* tiene actividad contra dípteros, y cinco años más tarde se aisló la subespecie Bt *tenebrionis* que actúa contra coleópteros. Actualmente se han descubierto múltiples cepas de Bt con toxicidad hacia lepidópteros, coleópteros, dípteros, entre otros insectos, e incluso contra nemátodos. Cabe mencionar que los insecticidas basados en Bt no eran muy utilizados en sus inicios, dada su susceptibilidad a los factores medioambientales y la disponibilidad de insecticidas sintéticos más efectivos (Watkins et al., 2012).

En los años 80's se comenzó a documentar el desarrollo de resistencia hacia los insecticidas sintéticos, y algunas consecuencias nocivas debido al uso de estos compuestos se comenzaron a reflejar en el medio ambiente, razón por la que se buscaron alternativas más ecológicas (Watkins et al., 2012). El trabajo de investigación sobre Bt y el desarrollo exitoso de las plantas transgénicas, propició que en 1985 se concibiera el primer cultivo de tabaco expresando el gen *bt2* de Bt. Este gen codifica a la toxina Cry1Ab de 1155 aminoácidos con actividad contra *Manduca sexta* y otros lepidópteros (Vaeck et al., 1987). Sin embargo, no fue hasta 1995 que la Environmental Protection Agency (EPA) de Estados Unidos aprobó la comercialización de cultivos transgénicos de Bt (tabaco, maíz, papa y algodón). Actualmente se cultivan plantas transgénicas de diferentes especies de cereales, árboles, legumbres, etc. destacando el maíz y el algodón (Abbas, 2018).

Generalidades de Bt

Bt pertenece a la familia *Bacillaceae*, específicamente al grupo *Bacillus cereus* sensu lato, que incluye otras especies de bacterias, como *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, entre otras (Pigott & Ellar, 2007). Bt tiene un ciclo de vida dividido en dos fases. En la fase vegetativa las células crecen y se reproducen por bipartición. Al encontrarse en un ambiente adverso (carencia de nutrientes, elevada concentración de sales, etc.) la bacteria entra en una fase estacionaria de crecimiento y empieza a esporular, fase en la que se forma una endospora y al mismo tiempo dentro de la célula madre se produce un cristal parasporal con propiedades insecticidas. Cuando la espora encuentra un ambiente apropiado para iniciar su fase vegetativa, ésta germina y se repite el ciclo (Lambert & Peferoen, 1992). Bt se distingue del resto de especies del grupo *Bacillus cereus* sensu lato por la producción de la inclusión cristalina, la cual se compone de un grupo de proteínas que, sumados varios factores de virulencia, le dan a Bt su poder insecticida (Pigott & Ellar, 2007).

La distribución de Bt en los ecosistemas es muy variada, se le puede aislar de suelos ricos en insectos, plantas, rizosfera, insectos, crustáceos, corrientes de agua, anélidos, etc. La fase dominante en estos ecosistemas es su forma esporulada. Bt es considerada una bacteria entomopatógena oportunista, ya que se ha identificado en grandes cantidades en zonas donde no habitan las especies objetivo. Bt afecta a una gran cantidad de especies de insectos, siendo los defoliadores (que se alimentan de hojas) los más estudiados (Raymond et al., 2010).

Bt como bacteria entomopatógena

La toxicidad de Bt en insectos está dirigida principalmente hacia las células del intestino medio de las larvas susceptibles; por lo tanto, los insectos deben consumir a esta bacteria en sus alimentos. Se ha sugerido que la toxicidad de Bt puede verse influenciada por la microbiota intestinal de la especie afectada. En este sentido, el género *Enterobacter* parece potenciar su toxicidad, y se tienen reportes de que *Enterococcus* tiene un efecto contrario, ya que se observó una protección (Raymond et al., 2010).

Bt se ha adaptado a las condiciones del organismo blanco y ataca a las células del epitelio intestinal por la acción de toxinas y varios factores de virulencia, como fosfolipasas, enterotoxinas y proteasas. Esta acción conjunta favorece el acceso de la bacteria a la hemolinfa del insecto, llegando a producir septicemia y posteriormente la muerte de la larva (Raymond et al., 2010). Los genes codificantes a la mayoría de las toxinas de Bt se localizan en plásmidos que son transmitidos durante la división celular, o incluso adquiridos por transferencia horizontal. Los factores de virulencia se encuentran regulados por un regulador global conocido como PlcR (pleiotropic transcriptional regulator), cuyo gen está localizado en el cromosoma bacteriano, de manera que una alteración en este regulador puede afectar la expresión de estos factores y en consecuencia la toxicidad de la cepa de Bt (Bravo et al., 2005)

La toxicidad de Bt se debe principalmente a la variedad de toxinas presentes en la inclusión cristalina producida durante la esporulación, entre las que se encuentran las toxinas Cry y Cyt (Raymond et al., 2010). Cabe mencionar que la toxicidad específica de una cepa de Bt hacia cierta especie de insectos, es determinada por el conjunto particular de toxinas que produce, dado que cada una tiene un espectro de acción limitado y específico (Pigott & Ellar, 2007).

Bacillus thuringiensis israelensis

Hasta mediados de los años 70's se tenía la idea de que Bt sólo poseía actividad insecticida contra lepidópteros. En 1977 se aisló la subespecie *israelensis* (Bti) de un criadero de mosquitos en el desierto de Negev (Israel), la cual presentó toxicidad hacia las larvas del díptero *Culex pipiens*. Bti es un claro ejemplo de la especificidad en la toxicidad de Bt, y hasta hoy se continúa usando con éxito para el control de poblaciones de otros dípteros

como *Aedes*, *Culex* y, en menor medida de *Anopheles spp* (Goldberg & Margalit, 1977; Lambert & Peferoen, 1992; Bravo et al., 2011).

Bti produce las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y la toxina citolítica Cyt1Aa. Esta última no está relacionada estructuralmente con las toxinas Cry. El díptero *A. aegypti* es especialmente susceptible a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa de Bti, por lo que se ha aprovechado esta subespecie para hacer frente a la transmisión de enfermedades transmitidas por este mosquito, como el dengue, la fiebre del Zika y la chikungunya. Si bien existen otras toxinas con actividad contra mosquitos como las Cry2, Cry29, etc. la combinación de toxinas producidas por Bti ha destacado por su efectividad. Este conjunto de toxinas ha mostrado tener un efecto sinérgico, ya que la toxicidad del cristal es mucho más alta que la suma de la toxicidad de las toxinas individuales (Bravo et al., 2011).

Las toxinas Cry

Las toxinas Cry son una familia de proteínas con actividad insecticida originalmente aisladas de los cristales parasporales de Bt y que en su forma activada poseen una estructura conformada por tres dominios. Entre las proteínas Cry existen unas de 65 kDa y otras de 130 kDa, ambas conteniendo un fragmento tóxico conformado por 3 dominios (Fig. 1). Las proteínas Cry de 130 kDa poseen una región C-terminal extendida conformada por otros 4 dominios estructurales (Crickmore et al., 2021).

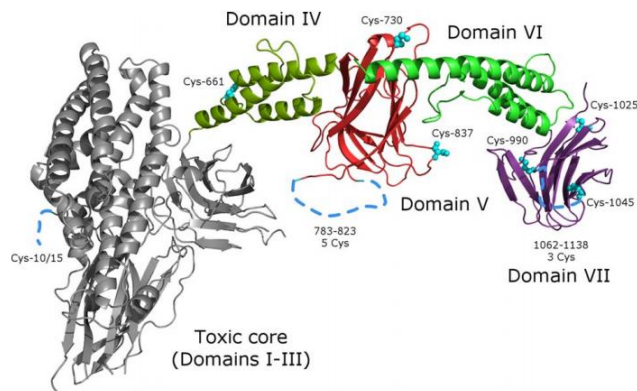


Figura 1. Estructura completa de la toxina Cry1Ac. En gris los tres dominios del núcleo tóxico. El dominio I se compone de alfa-hélices mientras que los dominios II y III se componen principalmente de hojas beta. El C-terminal extendido se compone de los dominios IV-VII (Evdokimov et al., 2014).

La familia de proteínas Cry es la más amplia entre las familias de toxinas producidas por Bt, conteniendo muchos miembros que han sido clasificados de acuerdo con su secuencia primaria utilizando un sistema de nomenclatura de 4 niveles. En el primer nivel de la nomenclatura se asigna un número arábigo a grupos de proteínas que presentan al menos 45% de identidad en su secuencia (Cry1, Cry2, etc.). En este primer nivel de clasificación se encuentran alrededor de 60 subgrupos (Adang et al., 2014). El segundo nivel agrupa proteínas dentro del mismo primer nivel con menos del 78% de identidad en su secuencia de aminoácidos y les adjudica una letra mayúscula (p. ej. Cry1A, Cry1B, etc.). El tercer nivel corresponde a proteínas que poseen menos del 95% de identidad, estas son distinguidas por letras minúsculas (p. ej. Cry1Aa, Cry1Ab, etc.). Finalmente, el cuarto nivel engloba proteínas con más del 95% de identidad asignándoles un número arábigo (p. ej. Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.) (Crickmore et al., 2021).

Mecanismo de acción de las toxinas Cry

El mecanismo de acción de las toxinas Cry (Fig. 2) se ha caracterizado principalmente en insectos lepidópteros e involucra la unión con diferentes proteínas membranales que funcionan como receptoras en el epitelio del intestino de los insectos en su etapa larval. Este mecanismo inicia cuando la larva ingiere los cristales que contienen las toxinas, los cuales se solubilizan por el pH alcalino del intestino y se liberan las protoxinas que son activadas por acción de proteasas presentes en el intestino larvario. Después, la toxina activada interactúa con proteínas como son la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa en una interacción de baja afinidad, las cuales se encuentran de manera abundante en la membrana. Posteriormente, interactúa con mayor afinidad con la caderina y esta interacción induce el corte de la primer alfa-hélice del dominio 1, lo cual permite que la toxina forme un oligómero. Finalmente, el oligómero interactúa de nuevo con la fosfatasa alcalina y la aminopeptidasa utilizando epítomos diferentes de los usados por el monómero en una interacción de mayor afinidad (100-200 veces mayor afinidad). Se propone que esta interacción es necesaria para que el oligómero se inserte en la membrana de la célula causando su lisis y posterior muerte del insecto (Pardo-López et al., 2013).

En los últimos años los transportadores ABC se han identificado como otro tipo de receptores en insectos coleópteros y lepidópteros (Wu et al., 2019). Se propone que

presentan una función dual en el mecanismo de acción ya que induce la formación de oligómeros y también la inserción en la membrana (Ocelotl et al 2017). La prohibitina es otra proteína identificada como posible receptor en dípteros (Kuadkitkan et al, 2012), lepidópteros (Sena da Silva et al., 2021) y coleópteros (Ochoa-Campuzano, 2013).

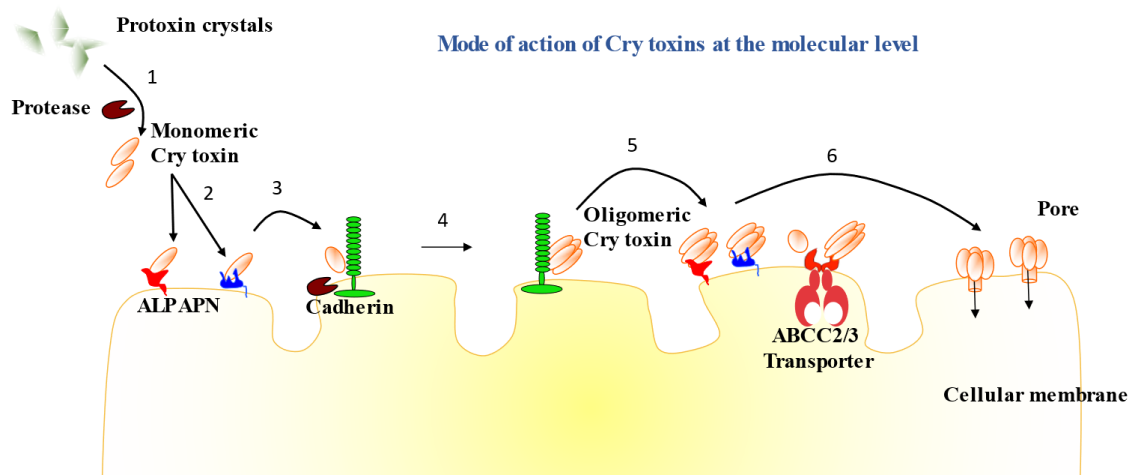


Figura 2. Mecanismo de acción de las toxinas Cry en lepidópteros. 1. Solubilización cristalina en intestino medio de la larva y activación de toxina. 2. Interacción de toxina monomérica con APN y ALP. 3. Interacción de toxina monomérica con caderina y corte de primer alfa-hélice. 4. Oligomerización. 5. Interacción de oligómero con APN y ALP. 6. Formación de poro lítico (Pardo-López et al., 2013).

Aedes aegypti

Distribución geográfica

Aedes aegypti es un insecto perteneciente al orden de los dípteros proveniente del continente africano. Fue introducido en el continente americano entre los siglos XV y XVII por medio del tráfico de esclavos provenientes de África occidental. Actualmente se encuentra distribuido en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (hasta los 40° de latitud norte y sur del ecuador), pudiéndose incluso encontrar en zonas templadas en los meses más cálidos. Tiene presencia en la mayor parte de países americanos, a excepción de Canadá, Bermuda, Chile y Uruguay. *A. aegypti* es un mosquito doméstico muy

relacionado a los seres humanos, ya que rara vez se le encuentra a más de 90 metros de un lugar habitado (Carrada et al., 1984; Savage & Smith, 1995).

Características y ciclo de vida

A. aegypti es holometábolo, es decir que sigue un proceso de metamorfosis completo dividido en cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. El ciclo de vida de *A. aegypti* (Fig. 3) inicia cuando los huevos son depositados por las hembras en tandas de 100-200 unidades, esto después de haber consumido una comida completa a base de sangre. Cabe mencionar que cada hembra puede llegar a depositar hasta 5 tandas de huevos durante su vida adulta. Los huevos son de forma ovoides, alargados, suaves y de hasta 1 mm de largo. Recién puestos poseen un color claro pero rápidamente pasan a ser de color negro y pueden tardar de 2 a 7 días en eclosionar. Los huevos son resistentes a la desecación, pudiendo resistir ambientes secos durante meses y eclosionar al encontrarse en un ambiente con el adecuado nivel de humedad (charcos, agua estancada, etc.) (Nelson, 1986; Foster & Walker, 2002).

La etapa larval de *A. aegypti* inicia con la eclosión de los huevos fertilizados en un ambiente acuático. Las larvas pasan por cuatro instares de crecimiento, pasando un breve periodo de tiempo en los primeros tres y un lapso de más de tres días en el cuarto, alcanzando un largo de 8 mm. Se suelen denominar larvas “contoneantes” por el movimiento que hacen en el agua al ser perturbadas y su alimentación se basa en materia orgánica suspendida en el agua como algas y otros microorganismos. El consumo de oxígeno se da por un sifón localizado en la parte posterior mientras que el resto de la larva permanece sumergida en el agua. Las larvas de *A. aegypti* pueden ser fácilmente distinguidas de otros géneros por su sifón corto. Después del cuarto instar de la etapa larval, *A. aegypti* entra a la etapa de pupa. La pupa posee un tamaño de 2 mm y, como la de otras especies de mosquitos, se diferencia de otros insectos holometábolos por su movilidad y respuesta a estímulos (luz, sonido, movimiento del agua). Durante esta fase el insecto no se alimenta y tarda dos días en convertirse en adulto. El mosquito sale de la pupa ingiriendo aire para expandir su abdomen, de manera que rompe la pupa y saca su cabeza y sus alas (Nelson, 1986; Foster & Walker, 2002).

El mosquito adulto mide entre 4 y 7 mm y se caracteriza por tener escamas blancas en la superficie superior del tórax que forman un patrón como de cuerdas de violín. Sus patas

traseras tienen bandas blancas en cada segmento tarsal y su abdomen puede ser de color negro o marrón. Las hembras pueden ser distinguidas por tener un mayor tamaño, por la presencia de palpos más cortos que la probóscide que además tienen las puntas blancas. Además, las hembras se caracterizan por poseer antenas delgadas con pequeños pelos en el lugar en que los machos tienen antenas plumosas. Aparte de su habitual alimentación a base de néctar o líquidos dulces, las hembras se alimentan de sangre (necesario para la producción de huevos). Existen diferencias notables entre el aparato bucal o probóscide del macho y la hembra. En las hembras se conforma por un conducto alargado, recto y resistente, adaptado para perforar y succionar, mientras que el macho posee un aparato bucal más blando y palpos alargados recubiertos de pelos largos. En general, la vida del mosquito adulto oscila entre las dos semanas y un mes, dependiendo de las condiciones en que se encuentre (su vida se ve alargada por ambientes húmedos y cálidos) (Carrada et al., 1984; Zettel & Kaufman, 2008).

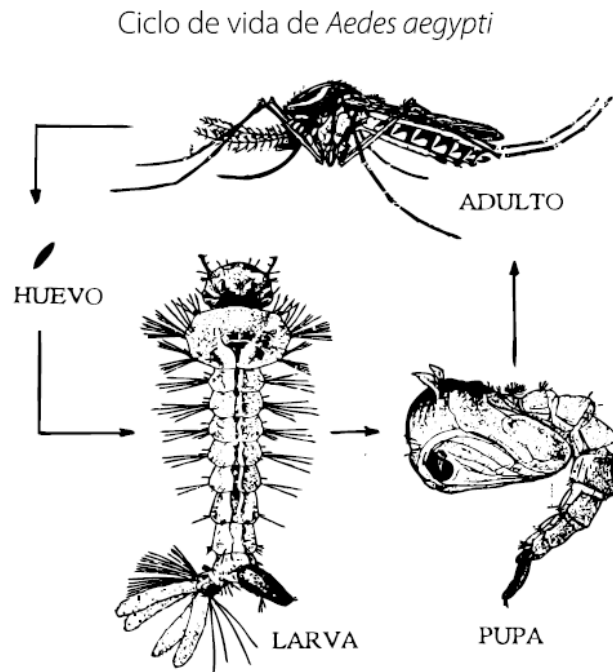


Figura 3. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Se muestra el proceso de metamorfosis completo dividido en cuatro fases (Eiman et al., 2016).

***Aedes aegypti* como problema de salud pública**

Las enfermedades transmitidas por vectores son una importante causa de muerte a nivel mundial, causando cada año más de 700 mil defunciones y representado más del 17% de todas las enfermedades infecciosas. Estas enfermedades son transmitidas por una gran variedad de especies tales como garrapatas, ácaros, piojos, caracoles, mosquitos, entre otros. *A. aegypti* es uno de los principales mosquitos transmisores de enfermedades en el mundo, siendo vector de cuatro enfermedades causadas por arbovirus y que son potencialmente mortales para el ser humano: la fiebre amarilla, del Zika, del dengue y la chikungunya (OMS, 2020; López-Latorre & Neira, 2016). El dengue representa un importante problema de salud pública en México al ser la principal enfermedad transmitida por vectores, siendo *A. aegypti* el de mayor importancia. A pesar de los esfuerzos para controlar las poblaciones de esta especie, los casos de dengue se han ido incrementando en las últimas décadas. Sólo en el año 2020 se registraron 25,226 casos confirmados y 154 defunciones (Torres-Galicia et al., 2014; Secretaría de Salud, 2021).

ANTECEDENTES

Los transportadores ABC

Los transportadores ABC (ATP-Binding-Cassette) son proteínas transmembranales presentes en todos los seres vivos y transportan diferentes sustratos a través de la membrana plasmática con dependencia de hidrólisis de ATP. Estos sustratos son muy variados entre sí, como pueden ser azúcares, péptidos, lípidos, iones de metales pesados, xenobióticos, entre otros. Esta superfamilia de proteínas se clasifica en subfamilias denominadas con las letras A-H (ABCA, ABCB, ABCC, etc.) con base en las diferencias de los dominios intracelulares de unión a ATP. Cada subfamilia puede tener varios miembros denominados con números arábigos (ABCA1, ABCA2, etc.) (Merzendorfer, 2014; Wu et al., 2019).

La estructura general de los transportadores ABC (Fig. 4) se compone de dos dominios transmembranales (TMD1 y 2) que comprenden 6 alfa-hélices cada uno, además de dos dominios intracelulares de unión a ATP (NBD1 y 2). Los NBDs contienen varias secuencias conservadas de unión a nucleótido como los motivos Walker A y B que proveen la base

catalítica de la hidrólisis del ATP. El conjunto de estos cuatro dominios que se suelen sintetizar en un solo polipéptido conforma lo que se conoce como un transportador completo (FT). En ocasiones la proteína completa se forma por un dímero entre dos medios transportadores (HT) que contienen sólo un TMD y un NBD cada uno y requieren complementarse para tener actividad. Cabe mencionar que la estructura de estos transportadores se encuentra bastante conservada entre eucariontes, incluidos los insectos (Wu et al., 2019).

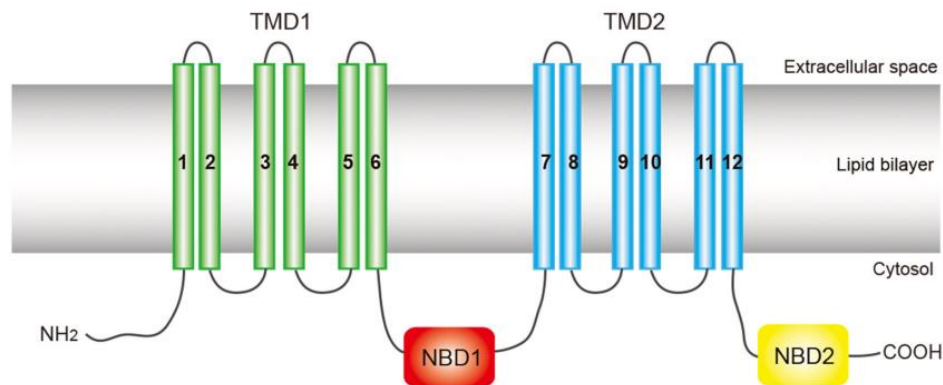


Figura 4. Estructura general de un transportador completo (FT) tipo exportador. TMD1 y TMD2 con sus seis alfa-hélices cada uno se presentan en verde y azul, respectivamente. NBD1 y NBD2 se presentan en rojo y amarillo, respectivamente. El extremo amino y carboxilo terminal, así como NBD1 y NBD2, se localizan intracelularmente (Wu et al., 2019).

Existen varios modelos propuestos que explican el mecanismo que siguen los transportadores ABC para la exportación de sustratos. El modelo ATP-Switch es el que posee mayor evidencia bioquímica y estructural. Este modelo propone que la unión del ATP promueve la formación de un dímero entre NBD1 y NBD2, mientras que la hidrólisis del ATP causa la disociación de este. Los cambios conformacionales causados por esta asociación/disociación permiten la translocación del sustrato por parte de los TMD's (Higgins y Linton, 2004).

Mutaciones en los transportadores ABC están ligadas con la resistencia a las toxinas Cry

Dada su capacidad para transportar un gran espectro de sustratos, incluidos xenobióticos, se ha descrito el rol de los transportadores ABC en procesos de detoxificación celular. En insectos se ha descubierto que una sobrerregulación de los genes de los transportadores ABC está involucrada a la resistencia hacia efectivos agentes insecticidas como los piretroides. Además, alteraciones en genes de diferentes subfamilias de transportadores ABC (ABCA, ABCB, ABCC, ABCG, etc.) causan altos niveles de resistencia a la acción de las proteínas Cry en insectos, por lo que tienen una función importante en su mecanismo de acción (Wu et al., 2019).

Resistencia ligada a mutaciones en el transportador ABCC2

El primer reporte sobre el desarrollo de resistencia de insectos a las toxinas Cry fue publicado en el 2010, en el cual se describió la inserción de un retrotransposón en el gen del receptor caderina en una colonia del lepidóptero *Heliothis virescens* (Gahan et al., 2001). Esta colonia fue mantenida en el laboratorio bajo una continua exposición a la toxina Cry1Ac, y con el tiempo los niveles de resistencia se incrementaron. Con la caracterización genética de esta colonia se identificó una delección de 22 pb en el segundo exón del gen codificante para el transportador ABCC2, dicha mutación generó una proteína trunca de 99 aminoácidos, mientras que la longitud completa del transportador ABCC2 en dicha especie es de 1,339 aminoácidos (Gahan et al., 2010).

Poco tiempo después, en otro trabajo que siguió la misma estrategia experimental, se reportó que dos poblaciones de diferente especie de lepidópteros (*Plutella xylostella* y *Trichoplusia ni*) presentaron altos niveles de resistencia a la toxina Cry1Ac debido a alteraciones en el gen del transportador ABCC2. La mutación en el gen del ABCC2 de *P. xylostella* fue caracterizada y se encontró una delección de 30 pb en la región codificante del alfa-hélice 12 localizada en el segundo TMD, provocando una delección de 10 aminoácidos, y se propuso que el segundo NBD perdió su localización citoplasmática. La mutación en *T. ni* no fue caracterizada en este trabajo (Baxter et al., 2011).

Posteriormente, se estudió el perfil de expresión de 12 genes relacionados con la resistencia a Bt en dos poblaciones de *B. mori*, una susceptible y una resistente a Cry1Ac, seleccionadas en laboratorio. Se encontraron dos genes que presentaban una expresión

alélica desequilibrada en la población resistente, uno correspondiente al transportador ABCC2 y el otro a una isoforma de la aminopeptidasa (APN3). Sabido esto se estudió la respuesta alélica específica a Bt, encontrándose que el patrón de expresión de ambos genes cambiaba de una manera alélica específica, correlacionando la expresión del alelo relacionado con la resistencia a Cry1Ac con la supervivencia de las larvas (Chen et al., 2014).

Después se caracterizó una mutación en el gen de ABCC2 de una población resistente a Cry1Ac de *Helicoverpa armigera* empleando RT-PCR y secuenciación. Los individuos resistentes resultaron ser homocigotos a un alelo mutante del gen de ABCC2 con una delección de 6 pb en un sitio de splicing, lo cual interfería con la remoción de un intrón en el RNA mensajero lo que a su vez conducía a que se produjera un codón de paro prematuro codificando una proteína ABCC2 con el segundo NBD incompleto (Xiao et al., 2014).

Trabajos posteriores demostraron la implicación de este transportador en la actividad de las toxinas Cry1 en otros lepidópteros como *Spodoptera exigua* y *Ostrinia nubilalis* (Wu et al., 2019).

Resistencia ligada a mutaciones en el transportador ABCB1

El primer estudio en dar indicios de la implicación de un transportador ABC en la actividad de las toxinas Cry en coleópteros fue resultado de estudiar la resistencia a las toxinas Cry3 del coleóptero *Diabrotica virgifera* (plaga de cultivos de maíz). Con el objetivo de identificar marcadores genéticos asociados a la resistencia a la toxina Cry3Bb1 un sistema de genotipificación basado en GBS (Genotyping by Sequencing) fue desarrollado y se construyó un mapa genético de la especie. Los resultados arrojaron 39 genes candidatos a estar implicados en la resistencia a Cry3Bb1, uno de los cuales correspondió a un transportador ABC de la subfamilia B (Flagel et al., 2015).

Tiempo después, teniendo evidencia concreta de la participación de los transportadores ABC en la actividad de las toxinas Cry en lepidópteros, una población del coleóptero *Chrysomela tremula* resistente a los altos niveles de toxina Cry3Aa expresados por álamos (género *Populus*) transgénicos, fue analizada con la sospecha de que alguna proteína de esta superfamilia tenía implicación. Por medio de RT-PCR, PCR y secuenciación se encontró que el ORF (marco abierto de lectura) correspondiente a un transportador ABC, nombrado ABCB1, presentaba una delección de 4 pb en la posición 1561 produciendo un

codón de paro prematuro. Según las predicciones, la proteína trunca estaba desprovista de una parte de NDB1 así como de TM2 y NBD2. La participación del transportador ABCB1 de *C. tremula* en la actividad de Cry3Aa fue verificada mediante su expresión heteróloga en células Sf9 de *S. frugiperda* (un lepidóptero), observando pérdida de viabilidad al tener contacto con la toxina. Este estudio fue el primero en demostrar la implicación de la superfamilia ABC en el mecanismo de acción de las toxinas Cry en coleópteros, además de probar la participación de un transportador de la subfamilia B como receptor (Pauchet et al., 2016).

Resistencia ligada a mutaciones en el transportador ABCA2

Entre los años 2002 y 2004 se seleccionaron en laboratorio poblaciones de *H. armigera* y *H. punctigera* heterocigotas a resistencia a la toxina Cry2Ab. Años después se buscó caracterizar dicha resistencia a través de una metodología basada en biphasic linkage analysis sucedido por un mapeado de marcadores EPIC (exon-primed intron-crossing) y secuenciación de los genes candidatos. Fue así como se encontraron tres diferentes mutaciones involucrando deleciones y/o inserciones en el gen del transportador ABCA2 de *H. armigera*, además de una deleción de 14 pb en el ortólogo de *H. punctigera*. Las cuatro mutaciones producían una proteína truncada por la generación de un codón de paro prematuro en distintas posiciones, afectando TM2 y/o NBD2 (Tay et al., 2015).

Teniendo conocimiento de la participación de la proteína ABCA2 en la actividad de Cry2Ab en lepidópteros, se procedió a probar la hipótesis de que las bases genéticas de la resistencia a esta toxina eran similares en dos poblaciones de *Pectinophora gossypiella* con distintos orígenes. Una de dichas poblaciones fue seleccionada en un laboratorio proveniente de Arizona y la otra obtenida de campos de cultivo de algodón en la India. A través de RT-PCR, PCR y secuenciación se identificaron diferentes mutaciones afectando al gen de ABCA2 de ambas poblaciones. La mutación más recurrente y presente en las poblaciones de ambos orígenes fue la pérdida del exón 6 por un splicing alternativo, truncando parte de la proteína. Para establecer la relación entre dichas mutaciones y la resistencia a Cry2Ab se hicieron bioensayos con la progenie resultante de retrocruzas individuales entre individuos homocigotos y heterocigotos a la respectiva mutación en ABCA2. Este fue el primer reporte de la implicación del transportador ABCA2 en la resistencia a Cry2Ab generada en el medio ambiente (Mathew et al., 2018).

Además de las subfamilias ya mencionadas, la subfamilia G se ha relacionado con el mecanismo de las toxinas Cry1. Esto fue sugerido por un estudio que comparó cuantitativamente el transcriptoma del intestino medio de larvas del lepidóptero *Ostrinia furnacalis* susceptibles y resistentes a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, encontrando una descenso en la expresión de un gen de ABCG en la población resistente (Zhang et al., 2017).

Actualmente se han identificado transportadores ABC de las subfamilias A, B, C y G como posibles receptores de diferentes toxinas Cry (Wu et al., 2019). Los transportadores de la subfamilia C de lepidópteros funcionan como receptores de las toxinas Cry1A, y las subfamilias A y B son receptores de las toxinas Cry2 y Cry3 en insectos lepidópteros y coleópteros, respectivamente (Tay et al., 2015; Pauchet et al., 2016).

Rol de los transportadores ABC en el mecanismo de acción de las toxinas Cry

La función como receptor del transportador ABCC2 de *P. xylostella* en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ac fue descrita en el año 2017, encontrándose que propicia la formación del oligómero y además asiste su inserción en la membrana celular. El estudio se basó en una serie de ensayos comparativos entre dos poblaciones de lepidópteros: *P. xylostella* susceptible y *P. xylostella* con resistencia a Cry1Ac ligada a mutaciones en el transportador ABCC2 (Ocelotl et al., 2017).

En un trabajo posterior, se propuso que la función de ABCC2 como receptor de la toxina Cry1Aa en el lepidóptero *B. mori* no está relacionada con la hidrólisis de ATP. Para llegar a dicha conclusión se expresó heterológamente en células Sf9 una serie de transportadores ABCC2 mutantes de *B. mori* carentes de alguno de los NBD, o con la lisina de los motivos Walker A sustituida por alanina. Estas mutaciones dan lugar a dominios NBD incapaces de hidrolizar el ATP e impiden los cambios conformacionales del transportador ABC para transitar del estado abierto/cerrado. Las células Sf9 expuestas resultaron susceptibles a las toxinas Cry1A, por lo que se concluyó que la toxicidad de Cry1Ab no depende de la actividad de apertura de poro de ABCC2. Para mapear el sitio de unión de la toxina Cry1Aa en ABCC2 se produjeron una serie de mutantes en los “loops” extracelulares (ECLs) del transportador y se expresaron heterológamente en células Sf9. Se identificó que el sitio putativo de unión de ABCC2 de *B. mori* con la toxina Cry1Aa comprende una región de cuatro aminoácidos (⁷⁷⁰DYWL⁷⁷³) localizada en el cuarto “loop” extracelular. El Alineamiento

del ABCC2 de *B. mori* con las secuencias de los ortólogos de otros lepidópteros se encontró que la secuencia de unión está conservada, por lo que se ha sugerido que la especificidad podría depender de la interacción de la toxina con este motivo (Tanaka et al., 2017).

Por otra parte, se ha observado que el transportador ABCC2 de lepidópteros como *B. mori*, *T. ni* y *H. armigera* tienen un efecto sinérgico con la caderina en la toxicidad de las toxinas Cry1A. Esto se ha propuesto en base a resultados de experimentos donde se expresan heterológicamente uno o ambos receptores en diferentes líneas celulares, y se analiza el efecto en la viabilidad celular a diferentes concentraciones de toxina. Los resultados mostraron que esta sinergia radica en que el receptor caderina promueve una alta tasa de oligomerización de la toxina Cry, proveyendo de oligómero a ABCC2 para que éste asista la formación del poro lítico (Sato et al., 2019).

En el caso de insectos dípteros, no se tiene información sobre el papel de los transportadores ABC en la toxicidad de las toxinas Cry (Wu et al., 2019). Probablemente esto se debe a que las poblaciones resistentes aún son escasas en este orden de insectos. Sin embargo, tomando en cuenta que proteínas ortólogas funcionan como receptores de las toxinas Cry entre coleópteros, dípteros y lepidópteros, como son la caderina, la aminopeptidasa y la fosfatasa alcalina (Pigott & Ellar, 2007), es probable que uno o varios transportadores ABC están involucrados en el modo de acción de las toxinas Cry también en dípteros.

La prohibitina

Las prohibitinas son una familia de proteínas localizadas principalmente en la membrana interna de las mitocondrias, aunque también se han identificados en otros compartimentos celulares, el núcleo celular y la membrana plasmática. Se les han atribuido diferentes roles en la progresión del ciclo celular, la regulación transcripcional, la cohesión de cromátidas hermanas, la señalización celular, el proceso de apoptosis, la biogénesis mitocondrial y la homeostasis celular. La gran mayoría de las funciones son atribuidas a la prohibitina en forma de complejos mitocondriales (Merkwirth & Langer, 2009).

La estructura de estos complejos mitocondriales (Fig. 5) se compone de un heterooligómero formado por dos tipos de proteínas, prohibitina-1 (PHB1) y prohibitina-2 (PHB2). PHB1 y PHB2 se localizan de forma intercalada formando una estructura en forma de anillo

con un diámetro 20-25 nm y con un peso >1000 kDa (Merkwirth & Langer, 2009). Esta estructura se encuentra anclada a la membrana interna mitocondrial por medio de una región hidrofóbica en el extremo N-terminal de PBH1 y 2, mientras que la región C-terminal se encuentra orientada hacia el espacio intermembranal (Tatsuta et al., 2005).

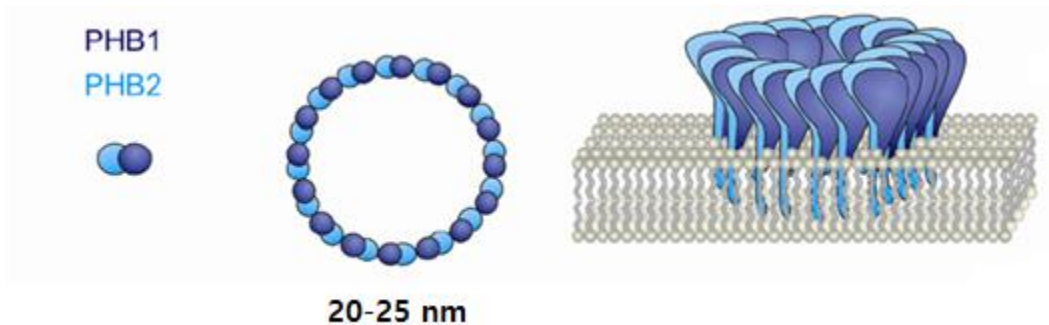


Figura 5. Estructura del complejo de prohibitina en la membrana interna mitocondrial. El complejo en forma de anillo se compone de dímeros formados por PHB1 (azul claro) y PHB2 (azul oscuro) (Merkwirth & Langer, 2009).

La prohibitina como receptor de las toxinas Cry

Uno de los primeros trabajos en relacionar directamente a las toxinas Cry con PHB fue cuando se probó la interacción de tres isoformas de ALP y PHB de células de *A. aegypti* con la toxina Cry4B empleando 2D-ligand blot y espectrometría de masas (Bayyareddy et al., 2012). Poco tiempo después fue confirmada esta interacción por medio de co-inmunoprecipitación, además de que se demostró la co-localización de PHB y Cry4B por microscopía confocal en células de esta misma especie (Kuadkitkan et al, 2012).

En el caso de los coleópteros, se descubrió por medio de ligand blot que la toxina Cry3Aa une a PHB1 de *Leptinotarsa decemlineata*. Se realizó el silenciamiento del gen de PHB1 a través de RNAi descubriéndose que tiene efectos adversos para la viabilidad de las larvas y que, sumando la exposición a la toxina Cry3Aa, se presenta un alto nivel de toxicidad (Ochoa-Campuzano, 2013).

Tiempo después, por medio de un ensayo de pulldown y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se identificó a PHB2 de larvas de *H. armigera* como proteína de unión a Cry1Ac. Empleando una serie de mutantes de la toxina Cry1Ab se demostró que el dominio 3 de la toxina estaba involucrado en la unión a PBH2 y que variaciones en la afinidad entre ambas proteínas correlacionaba con un aumento o disminución de la toxicidad (Sena da Silva et al., 2021).

El sistema CRISPR-Cas9

El sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas (CRISPR-Associated) fue descubierto como un mecanismo de defensa adaptativo contra infecciones de fagos y transmisión de plásmidos en diferentes bacterias y arqueas. Esta respuesta defensiva se basa en la inactivación de ADN exógeno a través de endonucleasas que actúan en un sitio específico al ser “guiadas” por una o varias moléculas de ARN. A nivel genómico, el sistema CRISPR/Cas está organizado en un operón compuesto de los genes de Cas (correspondientes a las endonucleasas) seguidos del elemento CRISPR. Esta última sección se compone de secuencias cortas únicas de ADN (llamadas espaciadores) provenientes de los diferentes agentes invasores, intercalándose con secuencias idénticas repetidas palindrómicas cortas (Jinek et al., 2012).

Se han identificado varios tipos de sistemas CRISPR-Cas. Específicamente, el sistema CRISPR-Cas9 (descubierto en *Streptococcus pyogenes*) pertenece al tipo II, en el que la endonucleasa Cas9 es la única enzima involucrada en el corte de la doble cadena de ADN, actividad dependiente de dos ARN's diferentes: crRNA y tracrRNA (Jiang & Doudna, 2017). Por un lado, crRNA (CRISPR-RNA) proviene de la transcripción de alguno de los espaciadores. Este ARN posee una secuencia complementaria a una de las dos cadenas del sitio objetivo de corte, sitio que debe ser sucedido por una secuencia corta adyacente reconocida por la endonucleasa Cas9 llamada PAM (Protospacer Adjacent Motif). Por otro lado, tracrRNA (Trans-activating crRNA) asiste en la estructuración de crRNA para que se funcional y actúa como intermediario en el complejo crRNA-tracrRNA-Cas9, ya que posee una región complementaria a una sección de crRNA, además de que forma una estructura tallo-asa que interacciona con la Cas9 para formar dicho complejo (Jinek et al., 2012).

Actualmente el sistema bacteriano CRISPR-Cas9 (Fig. 6) se ha adaptado e implementado como una alternativa novedosa para la edición genética de diversos organismos. Funciona mediante un complejo formado por la ADN-endonucleasa Cas9 y un ARN “guía” (sgRNA). Cas9 es guiada por una sección de la secuencia del sgRNA hacia un sitio específico del genoma, donde ejerce su actividad cortando la cadena doble del ADN. El ARN guía (sgRNA) se compone de dos regiones que mimetizan la estructura dual bacteriana crRNA-tracrRNA. Una vez que se realiza el corte del ADN el sistema de reparación de la célula liga las cadenas de ADN, proceso durante el cual se insertan o retiran bases nitrogenadas al azar que generan mutaciones y podrían inclusive interrumpir el marco de lectura del gen, provocando así efectos muy importantes en su expresión (Jiang & Doudna, 2017).

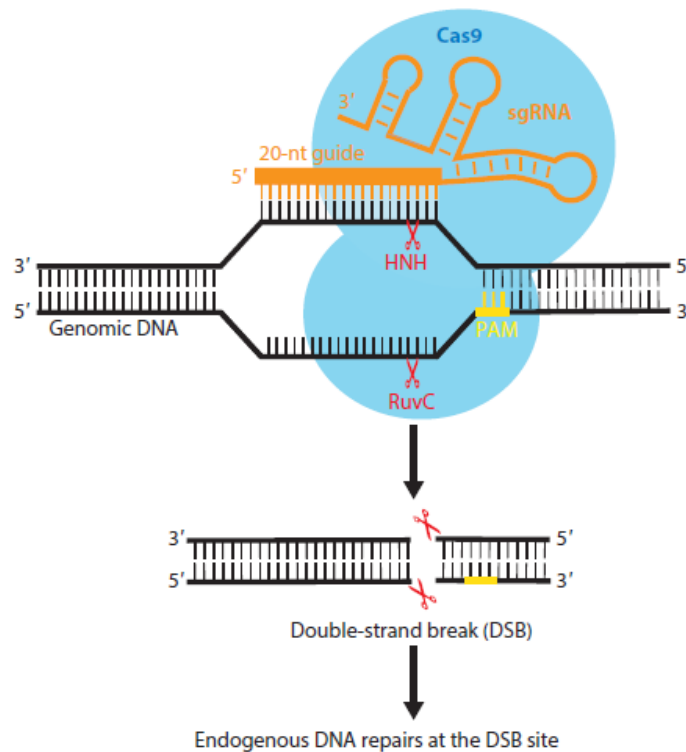


Figura 6. Sistema CRISPR-Cas9 (Jiang & Doudna, 2017). Para ejercer la actividad endonucleasa se requiere la formación de un complejo tripartita entre la Cas9 (en azul), el sgRNA (en naranja) y el ADN genómico del organismo a editar (en negro). La región crRNA (en línea naranja gruesa) se alinea con la región complementaria del ADN genómico, secuencia sucedida por PAM (en amarillo) que es reconocida por la Cas9 y es necesaria para realizar el corte. La región tracrRNA (en línea naranja delgada) con su estructura de tallo-asa interactúa con la Cas9 para formar el complejo.

El sistema CRISPR-Cas9 como herramienta para el estudio de receptores de toxinas Cry en insectos

En los últimos años el sistema CRISPR-Cas9 se ha convertido en una alternativa novedosa y confiable para la validación de receptores involucrados en el mecanismo de acción de las toxinas Cry. La caderina de *H. armigera* fue el primer receptor que se editó por CRISPR-Cas9, y se obtuvo una población homocigota con una delección de 4 pb en el exón 9 del gen, produciendo un codón de paro prematuro. Para evaluar la susceptibilidad de las larvas modificadas genéticamente se hicieron bioensayos retándola con las toxinas Cry1Ac y Cry2Ab. Los resultados arrojaron que las larvas mutantes fueron 549 veces más resistentes a la toxina Cry1Ac comparando con una población susceptible, mientras que para Cry2Ab no se presentaron cambios significativos (Wang et al., 2016).

Un año después, con el objetivo de confirmar la importancia del transportador ABCA2 en la resistencia a Cry2Ab en *H. armigera*, se utilizó el sistema CRISPR-Cas9 para producir insectos deficientes en la expresión de esta proteína. Se obtuvieron dos poblaciones mutantes, una con una delección de 2 pb en el exón 2 del gen objetivo y otra con una delección de 5 pb en el exón 18. Ambas poblaciones homocigotas presentaron una resistencia significativa a Cry2Ab (mayor a 120 veces) y Cry2Aa (mayor a 100 veces), comparadas con una población susceptible (Wang et al., 2017).

Al año siguiente, una población de *T. ni* fue modificada genéticamente por CRISPR-Cas9 generando un par de poblaciones con mutaciones en el gen caderina. Dichas alteraciones consistieron en una delección de 10 pb y una de 26 pb, ambas localizadas en la región repetida 11 de la proteína, generando una proteína trunca desprovista del sitio de unión de la toxina Cry1Ac. Ambas poblaciones homocigotas fueron cruzadas con una población resistente a Cry1Ac por una alteración en el gen del transportador ABCC2, de manera que se obtuvieron dos poblaciones modificadas genéticamente en ambos receptores. Bioensayos con las toxinas Cry1A revelaron que la caderina y ABCC2 actúan de manera independiente en el modo de acción de este grupo de toxinas. Además, se propuso que las toxinas Cry ejercen su actividad a través de receptores que llegan a tener un papel redundante en insectos (Wang et al., 2018).

Más tarde se consiguió realizar un doble *knock-out* de los genes de los transportadores ABCC2 y ABCC3 en *H. armigera*. A través de una serie de bioensayos con las toxinas Cry1A en poblaciones de insectos con uno o ambos de los transportadores analizados se

pudo demostrar que ABCC2 y ABCC3 funcionan como receptores para Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. El nivel de resistencia en ausencia de ambos receptores fue >15,000 veces para Cry1Ac, comparando con la población susceptible. Por otra parte la ausencia de un solo transportador modificó muy poco o no modificó la susceptibilidad del insecto. Con estos resultados los autores propusieron que existe una redundancia entre ABCC2 y ABCC3, ya que la ausencia de uno de ellos no presentó un fenotipo de resistencia, en contraste con la doble mutante (Wang et al., 2020).

CRISPR-Cas9 ha sido una valiosa herramienta para analizar varias proteínas que potencialmente funcionan como receptores para las toxinas Cry (por mencionar algunas, APN, caderina, tetraspanina y transportadores ABC). Por otra parte, los modelos biológicos también han sido muy variados, entre ellos se incluyen varias especies de lepidópteros como *P. xylostella*, *S. exigua*, *O. furnacalis* y *S. frugiperda*, consolidando el sistema CRISPR-Cas9 como una herramienta versátil para el estudio *in vivo* del mecanismo de acción de las toxinas Cry (Douris et al., 2020).

Por otra parte, el uso de CRISPR-Cas9 en dípteros, principalmente con *Drosophila melanogaster* y *A. aegypti*, ha sido muy útil para el estudio funcional de ciertas proteínas en el campo de biología del desarrollo. En el caso específico de *A. aegypti* y el uso de este sistema de edición genética para estudiar los receptores de la toxina Cry, se tiene reporte del *knock-out* de dos isoformas de aminopeptidasa N (APN1 y APN2). En este trabajo destaca el uso de un par de sgRNA's para cada gen, con 100 pb de separación entre sus sitios de corte con el objetivo de aumentar la probabilidad de generar mutaciones en la región objetivo (exón 3 de ambos genes). Las mutaciones producidas en APN1 y APN2 generaron un codón de paro prematuro antes de la zona de anclaje a GPI, produciéndose proteínas truncas no funcionales. Los bioensayos con Cry4Ba y Cry11Aa en las poblaciones mutadas en una sola isoforma y en ambas, mostraron que estas proteínas no tienen un fenotipo de resistencia (Wang et al., 2021).

HIPÓTESIS

Los transportadores ABC y la prohibitina son receptores membranales de las toxinas Cry en lepidópteros y coleópteros. Dado que existe redundancia funcional de receptores entre diferentes órdenes de insectos, los transportadores ABC y la prohibitina también están involucrados en el mecanismo de acción de las toxinas Cry en el mosquito *Aedes aegypti*.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel de prohibitina-2 y los transportadores ABC en la toxicidad de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba en *Aedes aegypti*.

METAS ESPECÍFICAS

- Mutagenizar los genes que codifican para los transportadores ABCA2, ABCB1, ABCC2 y la prohibitina-2 de *A. aegypti* mediante CRISPR-Cas9.
- Analizar la susceptibilidad de los mosquitos genéticamente modificados a las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de genes *abc* en el genoma de *A. aegypti*

Se realizó una búsqueda de todos los genes de *A. aegypti* conteniendo una secuencia conservada de NBD (dominio de los transportadores ABC) en la base de datos Pfam. Se realizó un alineamiento múltiple en el programa Clustal Omega de todos los genes recuperados y se obtuvo un archivo .tree. Un árbol filogenético fue generado en base a secuencias nucleotídicas a través de la herramienta iTOL y se realizó un análisis

comparativo con un árbol filogenético de los genes *abc* de *Anopheles gambiae* para identificar las diferentes subfamilias de *A. aegypti*.

Perfil de expresión de genes *abc* y *phb2*

La elección de PHB2 como candidato a ser receptor de las toxinas Cry se basó en un trabajo previo donde recuperamos datos de análisis proteómicos de interacción de la toxina Cry4Ba con proteínas del intestino medio de *A. aegypti*, encontrándonos con los dos tipos de prohibitinas (PHB1 y PHB2). Dada la existencia de evidencia más contundente de la interacción entre Cry4Ba y PHB2 (Bayyareddy et al., 2012), optamos por enfocarnos también en mutagenizar este gen.

Se recuperaron datos del transcriptoma del epitelio intestinal de larvas del cuarto instar de *A. aegypti* que fueron generados previamente en nuestro laboratorio por el Dr. Emiliano Canton. Estos datos fueron analizados junto con el Dr. Sabino Pacheco para identificar el perfil de expresión de los genes *abc* en el intestino durante la etapa larvaria, además de que se verificó la expresión de *phb2*.

Tomando ventaja de que todos los genes *abc* en el mosquito *An. gambiae* se encuentran anotados y mediante un análisis filogenético en Clustal Omega, se identificaron los genes codificantes a transportadores ABC en *A. aegypti* que son ortólogos a los que se han reportado como receptores para las toxinas Cry en otros insectos. Estos ortólogos son los transportadores ABCA2 (receptor de las toxinas Cry2A's en lepidópteros), ABCB1 (receptor de las toxinas Cry3's en coleópteros), ABCC2 (receptor de las toxinas Cry1A's, Cry1Ca y Cry1Fa en lepidópteros), ABCC3 (receptor de la toxina Cry1Ac en lepidópteros) y ABCG1 (posible receptor de las toxinas Cry1A's) (Wu et al., 2019).

Diseño y síntesis de sgRNA's

Las secuencias de DNA de los genes *abca2*, *abcb1* y *abcc2* de *A. aegypti* se obtuvieron de la base de datos VectorBase. Se seleccionó una región de 300-330 pb de cada gen, la cual contiene el primer y/o el segundo exón. Con ayuda del servidor CRISPOR (www.crispor.tefor.net) se localizaron los motivos PAM para la endonucleasa Cas9 (5'-NGG-3') en las regiones de los genes seleccionados y se tomaron los 20 nucleótidos

adyacentes al 5' como potenciales RNA guías (sgRNA's). Dos sgRNA's fueron seleccionados para cada gen, esto se realizó considerando su especificidad y un espacio conveniente entre ellos. Los primers para el ensamble de los sgRNA's fueron recuperados del mismo servidor (un T7crTarget específico para cada sgRNA y un solo primer guideRNAallT7common para todos).

Tabla 1. Primers utilizados para ensamblaje de DNA de cada sgRNA.

Nombre primer*	Secuencia
abca2_sgRNA137fwT7crTarget	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGCTCATTCTTGTACGAGGACGT TTTAGAGCTAGAAATAGCAAG3'
abca2_sgRNA297fwT7crTarget	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGTTGCAGAATTACTACGCCTCG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG3'
abcb1_sgRNA156rvT7crTarget	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGTCGGGCTTACTTCCGTCCCA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG3'
abcb1_sgRNA235rvT7crTarget	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGAATCGCACCACGGTCAGTAC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG3'
abcc2_sgRNA26rvT7crTarget	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGTTGATGAGCGAGGGTTCGTCC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG3'
abcc2_sgRNA134rvT7crTarget	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGAGCAACCAGCCAAGGAAGAT GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG3'
phb2_sgRNA506rvT7crTarget**	5'GAAATTAATACGACTCACTATAGCCTGCTTGCGCGCTCTACG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG3'
guideRNAallT7common	5'AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGAC TAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC3'

*La notación de los primers específicos para cada sgRNA comprende el gen objetivo, el número y la dirección del guía arrojado por CRISPOR, T7 por la polimerasa T7 y crTarget por aportar el componente crRNA.

**El sgRNA PHB2_506rv ya se había sintetizado y probado en un trabajo anterior, por lo que ya se encontraba listo para ser utilizado en las microinyecciones.

El ensamblaje de los sgRNA's se realizó por PCR utilizando la DNA polimerasa Phusion. Los productos de la amplificación se purificaron utilizando el kit MinElute™ PCR purification (Qiagen) y se cuantificaron con NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific). El tamaño de los productos de PCR (120 pb) se comprobó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% a 120 V durante 30 minutos en buffer TAE. Los sgRNA's fueron sintetizados por transcripción *in vitro* utilizando los productos de PCR purificados como templado y usando el kit TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific). Los transcritos se purificaron con el kit RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research), se cuantificaron con NanoDrop™ 2000 y se almacenaron a -70°C. Para comprobar el tamaño de los sgRNA's (100 pb), se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% a 120 V durante 30 minutos en buffer TAE.

Expresión y purificación de N-MBP-Cas9

Una placa de agar con medio Luria-Bertani (LB) suplementada con kanamicina (30µg/ml) fue estriada con la cepa *E. coli* BL21 DE3, la cual contiene el plásmido Pmj806 con la secuencia codificante a la proteína N-MBP-Cas9 con un tag poli-Histidina. La placa se incubó a 37°C durante 12 h. Una de las colonias fue utilizada para producir un pre-inóculo en medio LB con kanamicina (30µg/ml) que fue incubado a 37°C con agitación a 200 rpm durante 12 h.

Se tomaron 10 mL de pre-inóculo para inocular 500 ml de medio Terrific Broth (TB). Se incubó a 37°C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}} = 0.6$ (2 h aproximadamente). Se indujo la expresión de N-MBP-Cas9 añadiendo IPTG a una concentración final de 0.5 mM. El cultivo se incubó a 18°C durante 12 h a 200 rpm.

Las células fueron recuperadas centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min, se resuspendieron en 40 ml de Buffer A con lisozima (20 mM HEPES, 150 mM KCl, 25 mM imidazol y 1 mg/ml lisozima, pH=7.5) y se almacenaron a -70°C. Las células fueron descongeladas y lisadas en prensa francesa (4 pases). La muestra se centrifugó a 50,000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante fue pasado por una columna de resina Níquel-Agarosa HiTrap HP de 5 ml (GE Healthcare) con la ayuda de la misma jeringa. Se equilibró el equipo AKTA FPLC (Amersham Biosciences) con Buffer A. La columna fue conectada al FPLC y se lavó con 15-30 ml de Buffer A. La elución se realizó con un gradiente de solución B (Buffer A con 1 M Imidazol) hasta una concentración del 50% con un flujo de 1 ml/min y se recolectaron fracciones de 1 ml. La columna fue lavada con 5 ml de buffer B y tanto las fracciones como el volumen muerto fueron analizados por SDS-PAGE al 8%. Las fracciones correspondientes a la elución fueron concentradas a un volumen final de 3 ml por medio de centrifugación a 5,000 rpm en filtros Amicon 100K (Merck Millipore).

Se realizó un segundo paso de purificación por una cromatografía de intercambio catiónico con una columna CM Sepharose FF HiTrap de 5 ml (GE Healthcare). La muestra se pasó por la columna en el FPLC previamente equilibrado con Buffer A (20 mM HEPES, 150 mM KCl, pH=7.5). La columna se lavó con 10-15 ml de buffer A. Un gradiente de solución B (solución A con 1M KCl) se pasó hasta una concentración del 100% con un flujo de 1ml/min. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se analizaron por SDS-PAGE al 8%.

Las fracciones conteniendo la N-MBP-Cas9 en su estado más puro fueron concentradas en un volumen final de 100 μ L por medio de centrifugación a 5,000 rpm en filtros Amicon 100K. La cuantificación de la concentración de proteína se realizó por el método de Bradford.

El fragmento de 655 pb del gen del transportador ABCA2 conteniendo los sitios de corte de los guías 137fw y 297fw fue amplificado y purificado. Este producto de PCR se empleó para probar la actividad de la N-MBP-Cas9 purificada. La mezcla de reacción en 10 μ L constó de 200 ng de templado, N-MBP-Cas9 a 0.4 μ M, 137fw y 297fw a 0.2 μ M y 1 μ L de buffer 10x. La reacción se incubó a 37°C durante 2 h. El corte de los fragmentos se comprobó por medio de una electroforesis en geles de agarosa 1% a 120 V durante 30 min en buffer TAE.

Evaluación de la eficiencia de edición *in vitro*

El DNA genómico de tres larvas del cuarto instar de *A. aegypti* fue extraído y purificado utilizando el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus (Zymo Research) y fue cuantificado con NanoDrop™ 2000. Una región de 0.6-1 kb de cada gen abarcando los sitios de corte de los sgRNA's fue seleccionada para ser el templado de los ensayos de digestión in vitro. Se

diseñaron un par de primers para amplificar la región seleccionada de cada gen utilizando el software SnapGene®.

Tabla 2. Primers diseñados para amplificación de regiones de genes *abca2*, *abcb1* y *abcc2*.

Nombre primer	Secuencia
ABCA2-F	5'GCCGCTTCCTCATGAATG3'
ABCA2-R2	5'GGCCTTCCAGGTCACGAGAG3'
ABCB1-F2	5'CTTTGTTTGGTTTAATCTCGTTCTG3'
ABCB1-R2	5'GATTTTCTTGTTGTAGATCGGAACG3'
ABCC2-F2	5'GTTTCATTCGATGACATTCTAATGAC3'
ABCC2-R2	5'GAATGCAGGAAAACCTGATACAATG3'

Los fragmentos fueron amplificados por PCR usando la DNA polimerasa Phusion, se purificaron con el kit MinElute™ PCR purification kit (Qiagen) y se cuantificaron con NanoDrop™ 2000. El tamaño de los productos obtenidos se comprobó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% a 120 V durante 30 minutos en buffer TAE.

La mezcla de reacción para la digestión in vitro se realizó en un volumen total de 30 µL que contuvo 75 ng de DNA templado, 1 µL de buffer 10x, 1 µL de Cas9 de New England BioLabs a 1 µM y 3 µL de cada sgRNA a 300 Nm. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h. El corte de los fragmentos se comprobó por medio de una electroforesis en geles de agarosa 1% a 120 V durante 30 min en buffer TAE.

Tabla 3. Tamaño esperado de productos de digestión in vitro con cada sgRNA.

Gen, clave en VectorBase y tamaño	sgRNA usado para digestión	Tamaño esperado de productos
<i>abca2</i> AAEL012698 655 pb	ABCA2_137fw	354 y 301 pb
	ABCA2_297fw	514 y 141 pb
<i>abcb1</i> AAEL008134 953 pb	ABCB1_156rv	298 y 655 pb
	ABCB1_235rv	377 y 576 pb
<i>abcc2</i> AAEL025460 770 pb	ABCC2_26rv	301 y 469 pb
	ABCC2_134rv	409 y 361 pb

Microinyección de embriones

La colonia silvestre de *A. aegypti* adultos fue alimentada con sangre de bovino. Después de 3 días se indujo la oviposición introduciendo a la jaula un pequeño vaso con agua, algodón y un cuadro de papel filtro y asilándola en oscuridad. Los huevos fertilizados fueron recolectados una hora después y se alinearon bajo el estereoscopio en filas de 10 unidades con pinzas de metal en un cuadro de papel filtro humedecido con agua. Los huevos alineados fueron transferidos a un portaobjetos con ayuda de cinta adhesiva de doble cara y presionando ligeramente con un pincel.

Los capilares fueron preparados a partir de microtubos de aluminosilicato utilizando el P-97 Flaming/Brown™ Micropipette Puller (Sutter Instrument®). Las puntas fueron abiertas y biseladas con el EG-401 Micropipette Grinder (Narishige). Cada capilar fue llenado con 3 µL de una solución acuosa de la N-MBP-Cas9 a 2-5 µM y los dos sgRNA's correspondientes para cada gen a una concentración de 1-2.5 µM cada uno.

La microinyección fue realizada con los capilares y la bomba de vacío PicoPump PV830 bajo manipulación con microscopio óptico empleando el objetivo x5, inyectando aproximadamente 1 nL de la solución sgRNA's/Cas9 a cada embrión. El portaobjetos con los huevos fue sumergido en agua hasta su eclosión (1 semana aproximadamente).

Aislamiento y caracterización de mutantes

Las larvas se mantuvieron en agua y se alimentaron con algunas migajas de croquetas comerciales para alimentar gatos hasta su pupación (1 semana aproximadamente). Las pupas se colocaron individualmente en un vaso pequeño con algodón, un trozo de papel filtro y agua, esto a su vez dentro de un vaso más grande cubierto con una malla. Los mosquitos adultos tardaron de 2-3 días en salir y fueron alimentados con una solución de glucosa. Cada adulto proveniente de un embrión microinyectado fue apareado con un adulto silvestre del sexo opuesto durante 3 días. Las hembras de cada apareamiento fueron alimentadas con sangre de bovino y se esperó a que ovopositaran. Obtenidos los huevos de la descendencia de cada cruce (G_1), los adultos G_0 se sacrificaron para hacer la extracción de su DNA genómico con el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus (Zymo Research). Dicho DNA genómico fue cuantificado con NanoDrop™ 2000 y se utilizó como templado para amplificar la región específica del gen con posible mutación, esto empleando la polimerasa Phusion y los mismos primers utilizados para obtener los templados de las digestiones *in vitro*. Los productos de PCR fueron purificados por medio del kit MinElute™ PCR purification kit (Qiagen), se cuantificaron con NanoDrop™ 2000 y se mandaron a secuenciar.

Producción de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa

Las cepas de Bt con el plásmido que contiene los genes para las toxinas Cry4Ba o Cry11Aa fueron activadas en una placa de agar LB con eritromicina a 10 µg/ml incubándose a 30°C durante 12 h. Se sembraron masivamente cuatro placas de medio HCT suplementadas con eritromicina a 10 µg/ml para cada cepa y se incubaron a 30°C hasta la esporulación (48-72 h). Para asegurar que la mayoría de las células se encontraban en forma esporulada se hicieron observaciones en microscopio óptico. El cultivo fue recuperado con un asa estéril,

suspendido en 25 ml de buffer de lavado (300 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH= 8) y centrifugado a 10,000 rpm por 5 min, procedimiento repetido dos veces. La pastilla resultante fue resuspendida y lavada en 30 ml de una solución a 1 mM de PMSF, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm durante 5 min, paso repetido en dos ocasiones. El pellet se resuspendió en 1 mM PMSF, se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford y se almacenaron las suspensiones a 4°C. La producción de Cry11Aa y Cry4Ba se comprobó por SDS-PAGE al 10%.

Bioensayos de susceptibilidad a Cry4Ba y Cry11Aa

Las hembras de las colonias G₁ mutantes se alimentaron con sangre de bovino y se esperó a que ovopositaran para obtener la segunda generación (G₂). Aproximadamente 500 larvas G₂ del cuarto instar distribuidas en 10 grupos se pusieron en contacto con una suspensión de espora/cristal Cry4Ba (1000 ng /mL) o Cry11Aa (500 ng/mL). Pasadas 24 horas se realizó el conteo de las larvas sobrevivientes. El control positivo constó de 10 larvas silvestres bajo el mismo tratamiento, mientras el control negativo se realizó con 10 larvas silvestres en agua sin toxina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Genes *abc* en *A. aegypti*

Los NBD's son dominios bastante conservados localizados en los transportadores ABC (Berger et al., 2004), de manera que son útiles para identificar genes *abc* en genomas no anotados. En el caso de *A. aegypti* se pudieron identificar 56 genes codificantes a esta superfamilia de proteínas. Mediante un análisis comparativo entre el árbol filogenético generado para los genes *abc* de *A. aegypti* y un árbol filogenético de *An. Gambiae* se clasificaron los genes de *A. aegypti* dentro de su respectiva subfamilia, encontrándose 11 miembros ABCA, 5 ABCB, 16 ABCC, 2 ABCD, 1 ABCE, 3 ABCF, 18 ABCG y 3 ABCH.

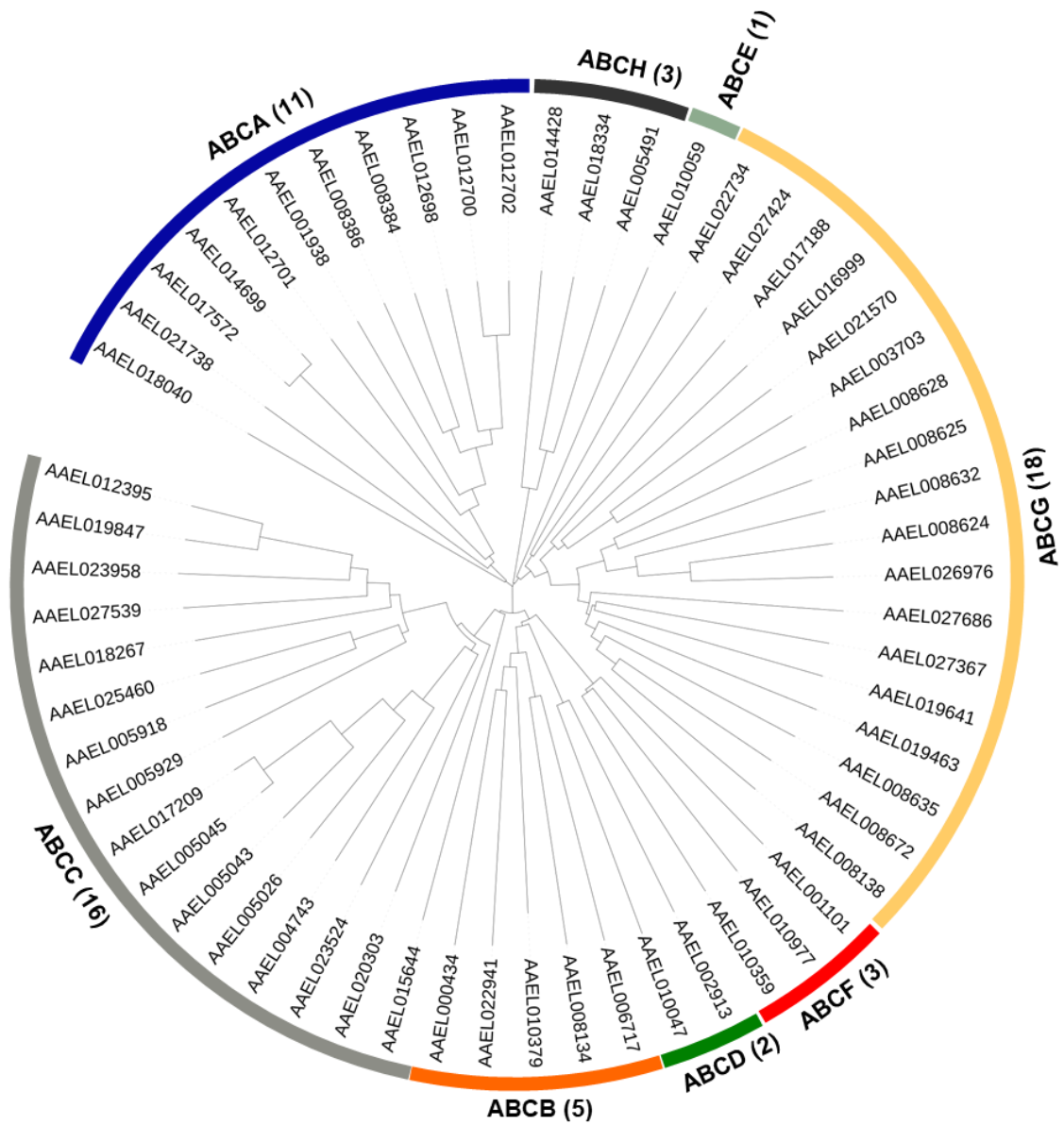


Figura 7. Árbol filogenético de los genes *abc* de *A. aegypti*. Se encontraron 56 genes *abc* distribuidos en las ocho subfamilias conocidas de transportadores ABC (A-H). Cada gen se presenta con su respectiva clave de acceso en la base de datos VectorBase.

Perfil de expresión de genes *abc* y *phb2*

Los datos recuperados del transcriptoma de Canton et al. 2015 permitieron generar un perfil de expresión de los genes *abc* en el epitelio intestinal de larvas de *A. aegypti*. Se pudo observar que genes de las 8 subfamilias son expresados en diferentes medidas. Respecto a los genes ortólogos reportados como receptores de las toxinas Cry en otras especies, se observó que *abca2*, *abcb1*, *abcc2* y *abcc3* son expresados, mientras que *abcg1* no presentó expresión. Dada la gran similitud entre *abcc2* y *abcc3* (Wang et al., 2020), y que el primero mostró un mayor nivel de expresión, optamos por seleccionar *abcc2* como candidato para mutagenizar por CRISPR-Cas9 junto con *abca2* y *abcb1*. En el caso de *phb2*, se confirmó su expresión y se mantuvo como gen candidato.

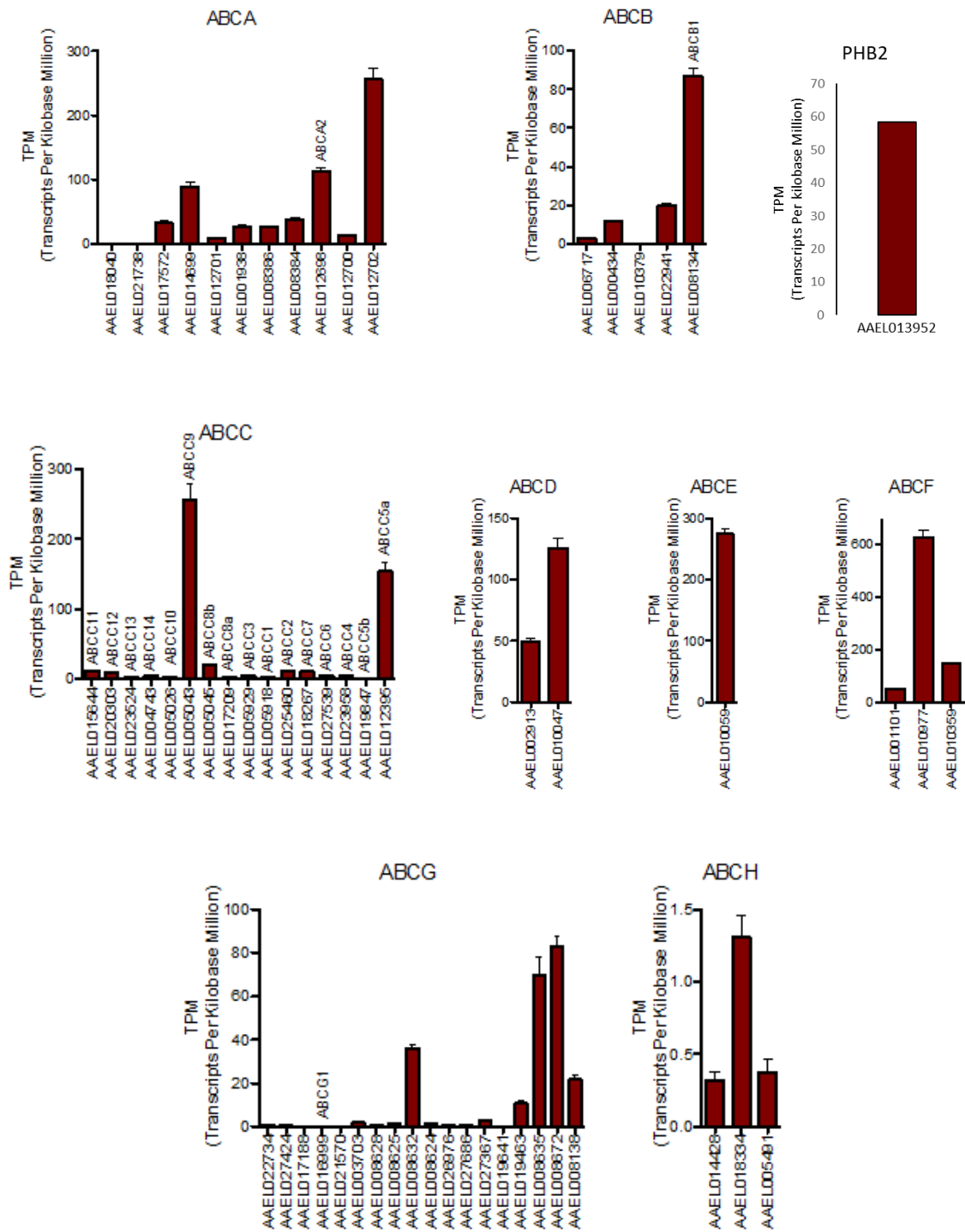


Figura 8. Perfil de expresión de genes *abc* y *phb2* en el intestino de larvas de 4° instar de *A. aegypti*. En el eje X de cada gráfico se presenta cada gen analizado con su clave de acceso en la base de datos VectorBase.

Selección de crRNA's

Utilizando el servidor CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) se realizó una búsqueda de secuencias PAM en la secuencia de ADN seleccionada, la cual corresponde a los primeros exones de los genes a estudiar. En este caso se usó la Cas9 cuya secuencia PAM es NGG. El servidor generó secuencias de 20 nt (crRNA's) que hibridan con la cadena complementaria de las regiones que preceden a las secuencias PAM identificadas. Cada crRNA predicho se alineó con el genoma completo de la especie a editar, en este caso, *A. aegypti* y se reportó un score que es asignado a cada crRNA de acuerdo con su especificidad por la región objetivo a editar. El programa CRISPOR también produjo los primers para el ensamblaje del sgRNA completo, uno correspondiente a la región específica crRNA y uno común para todos los guías con la región tracrRNA que es reconocida por la endonucleasa Cas9. De los sgRNA's potenciales predichos por CRISPOR seleccionamos dos sgRNA's para utilizarlos en la edición de los genes *abca2*, *abcb1*, *abcc2*. La selección tomó como criterios el mayor score de cada sgRNA predicho, específicamente se prestó atención al número y características de sus off-targets (preferencia por una menor cantidad, mayor contenido de mis-matches y alineamiento en regiones intergénicas). También se procuró que el espacio entre los dos sgRNA's de cada gen fuera ~100 pb.

Ensamble de sgRNA's

Con el fin de sintetizar en una sola secuencia de DNA, con los dos oligonucleótidos sintetizados (crRNA y tracrRNA) se realizó un ensamblaje por PCR.

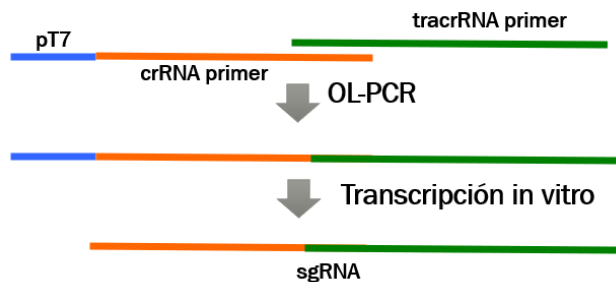


Figura 9. Diagrama de procedimiento para síntesis de sgRNA's. El primer paso fue una Over-Lapping PCR para ensamblar los elementos crRNA y tracrRNA. El segundo paso fue la transcripción in vitro del producto de PCR del ensamblaje anterior con la polimerasa T7. En verde el tracrRNA

primer empleado para todos los sgRNA's. El crRNA específico para cada región específica de los genes en color naranja, antecedido por el promotor de la polimerasa T7 en azul.

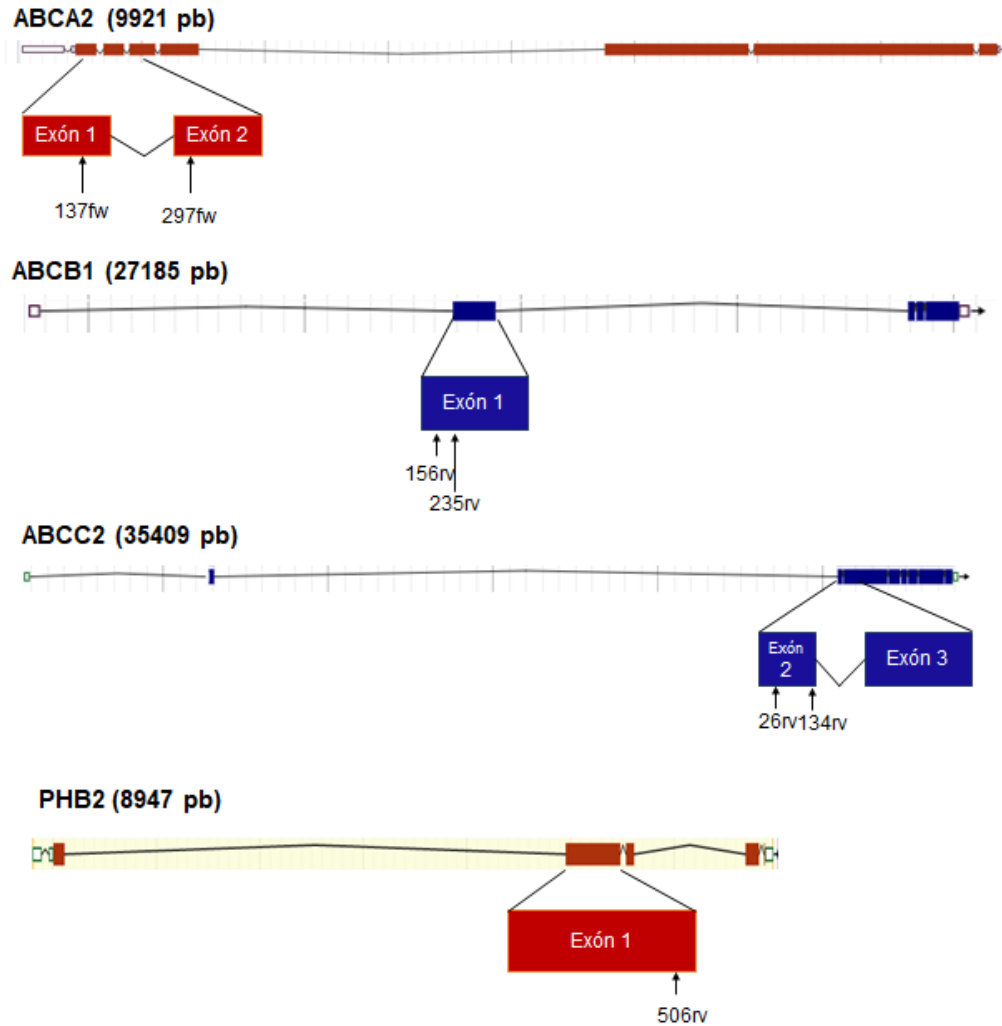


Figura 10. Esquema representativo de genes seleccionados y los sitios objetivo de cada sgRNA. Los exones están representados por los bloques de color naranja o azul, los intrones en línea negra y las UTR en bloques blancos.

Los productos de PCR purificados de dicho ensamblaje se analizaron en un gel de agarosa y mostraron una sola banda ligeramente mayor a 100 pb del marcador de PM, consistente con los 120 pb esperados.

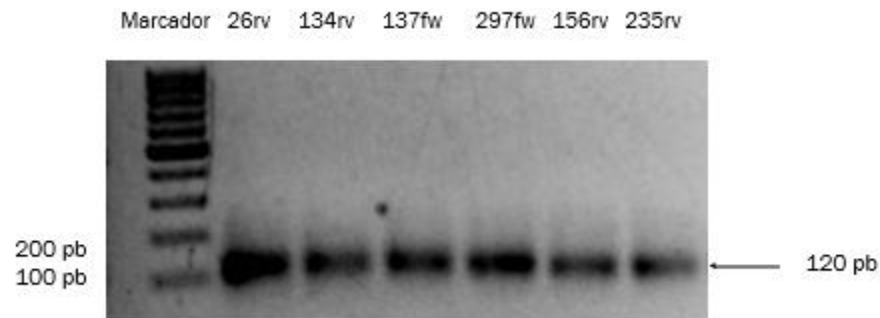


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del ensamblaje por PCR del DNA correspondiente a cada sgRNA.

La síntesis de los sgRNA's se realizó por transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7 utilizando como templado los productos de PCR descritos anteriormente. Los sgRNA's purificados se analizaron en un gel de agarosa y observamos bandas individuales definidas. Las bandas de los productos obtenidos en la transcripción *in vitro* coinciden con el marcador de peso molecular de 100 nt, por lo tanto los transcritos tienen el tamaño esperado (100 nt). La ligera diferencia de tamaño entre las bandas de los sgRNA's se pudo deber a la formación de estructuras secundarias en la región tracrRNA.

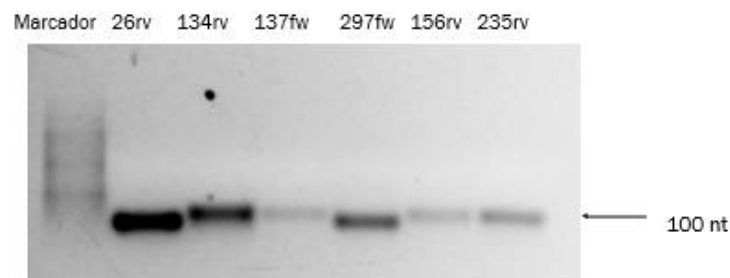


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la transcripción *in vitro* correspondiente a cada sgRNA.

Producción y determinación de la actividad de N-MBP-Cas9

La proteína N-MBP-Cas9 fue recuperada en el sobrenadante después de centrifugar el extracto resultante de la lisis por prensado. Como primer paso para purificar se realizó una cromatografía de afinidad en FPLC con una resina de Níquel-Agarosa aprovechando el tag poli-Histidina que posee la N-MBP-Cas9.

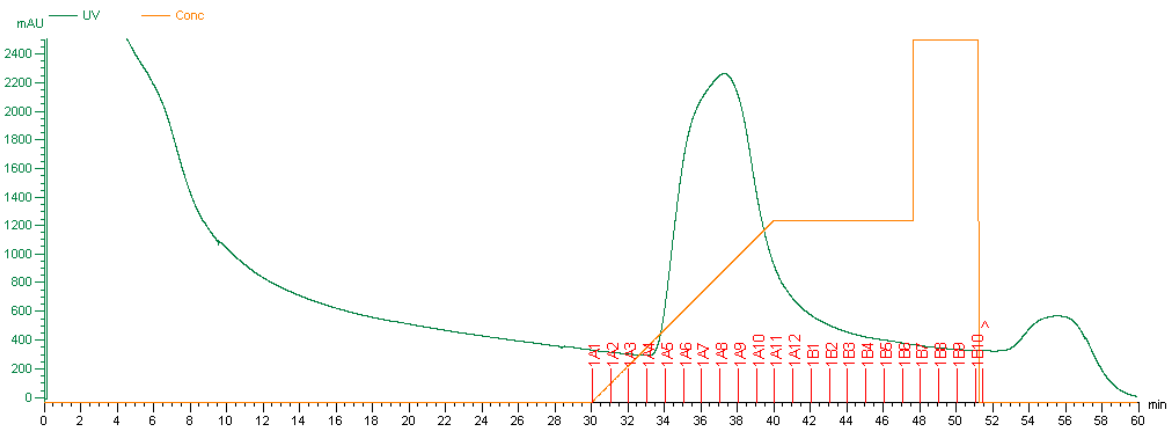


Figura 13. Cromatograma resultante de la cromatografía de afinidad por interacción Níquel/ Tag Poli-Histidina. Se recuperaron las fracciones A5-A12 correspondientes a la elución por gradiente con imidazol.

Tanto en las fracciones como en el volumen muerto (Vm) analizados por SDS-PAGE se detectó la presencia de la N-MBP-Cas9 (PM= 200 kDa).

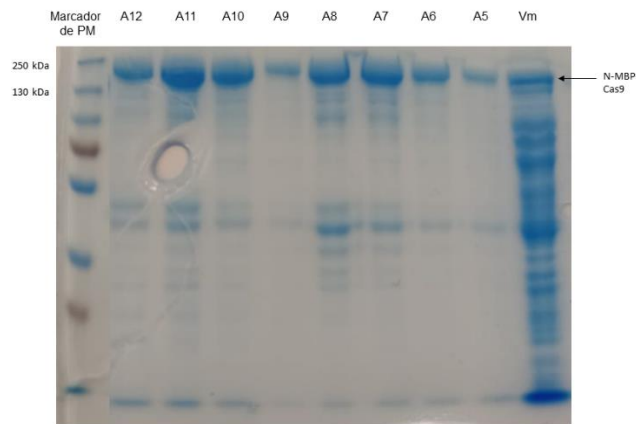


Figura 14. SDS-PAGE de volumen muerto y fracciones recuperadas de la elución de la cromatografía de afinidad.

Las fracciones concentradas en 3 mL se sometieron a una cromatografía de intercambio catiónico a pH=7 tomando en cuenta el punto isoeléctrico teórico de la N-MBP-Cas9 (pI=9).

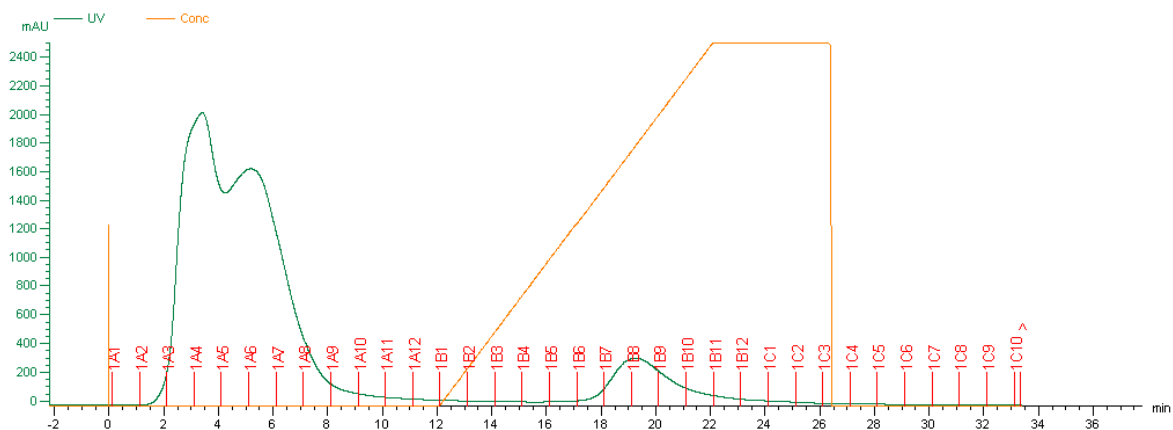


Figura 15. Cromatograma resultante de la cromatografía de intercambio catiónico. Se recuperaron las fracciones B7 y B8 correspondientes a la elución con gradiente de KCl.

Las fracciones B7 y B8 se analizaron por SDS-PAGE encontrándose en ambas la proteína de interés en un estado bastante puro.

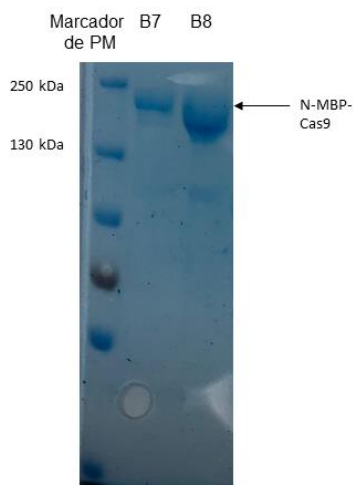


Figura 16. SDS-PAGE de fracciones recuperadas de la elución de la cromatografía de afinidad.

Las fracciones se concentraron en un volumen final de 100 μ L. La concentración de proteína se cuantificó por Bradford dando una concentración final de 1.25 μ g/ μ L.

La actividad de la N-MBP-Cas9 se probó con un ensayo de digestión *in vitro* con el fragmento del gen *abca2* de 655 pb y los sgRNA's 137fw y 297fw. El gel de agarosa de la reacción a las 2 h mostró una degradación completa de la banda correspondiente al fragmento completo por lo que se tiene la certeza de la actividad de la enzima.

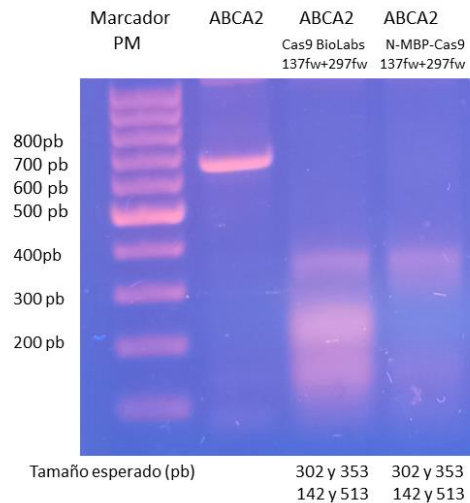


Figura 17. Digestión de fragmento de *abca2* con Cas9 comercial (BioLabs) y N-MBP-Cas9.

Análisis del corte en el DNA templado inducido por Cas9

El corte del DNA con la endonucleasa Cas9 dirigido por cada sgRNA fue probado con un ensayo de digestión *in vitro*. Como DNA sustrato se utilizó una región del gen objetivo (600-1000 pb) conteniendo los sitios de corte de sus sgRNA's correspondientes.

Los fragmentos de DNA de los genes de los transportadores ABC se obtuvieron por PCR utilizando como templado DNA genómico de larvas del cuarto instar de *A. aegypti*. El tamaño esperado de los productos de PCR de los genes *abca2*, *abcb1*, *abcc2* amplificados fue de 655, 953 y 770 pb respectivamente. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y observamos bandas definidas del tamaño esperado.

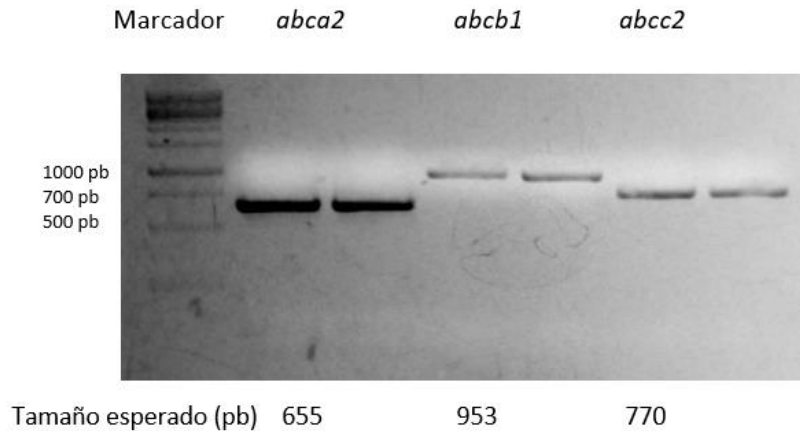


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación de las regiones seleccionadas de los genes *abca2*, *abcb1* y *abcc2*.

Los ensayos de digestión *in vitro* se realizaron utilizando cada uno de los sgRNA's, su respectivo fragmento de DNA como sustrato y la enzima N-MBP-Cas9, una endonucleasa "programable" dirigida por la secuencia del sgRNA. El producto de esta reacción se analizó en geles de agarosa.

La electroforesis de la digestión de los tres templados con sus dos sgRNA's correspondientes mostró las dos bandas con los tamaños esperados, aunque con diferencias en su intensidad, y la banda correspondiente al templado ausente, indicando una digestión completa. Estos datos confirmaron que los sgRNA's sintetizados sí guiaron de manera específica la actividad endonucleasa de la N-MBP-Cas9 a los sitios objetivo, pero lo hicieron con eficiencias diferentes.

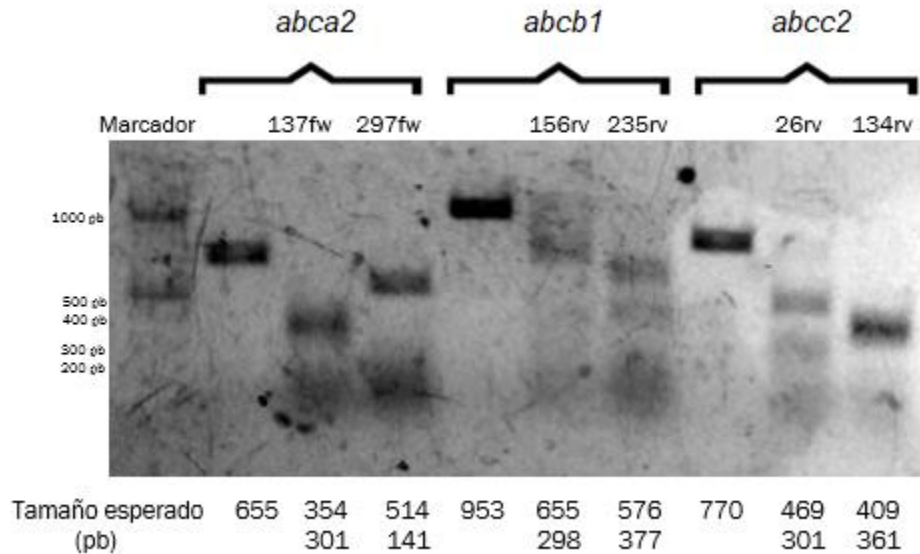


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de ensayo de digestión in vitro con nuevo lote de Cas9 y concentraciones de sgRNA's ajustadas.

Microinyección de embriones

Las microinyecciones de los embriones fueron realizadas en días separados para cada gen dando un total de 1550 intentos (Tabla 4). Se microinyectaron 800 huevos para *abca2*, 400 para *abcb1*, 250 para *abcc2* y 100 para *phb2*. Del total de huevos inyectados se tuvieron 24 eclosiones, 12 inyectados para editar *abca2*, tres para el gen *abcb1*, tres para el gen *abcc2* y seis para el gen *phb2*. Las tasas de eclosión obtenidas están por debajo de lo reportado en trabajos anteriores donde este valor ronda entre 6.5 y 11% (Wang et al., 2021).

Se implementaron una serie de controles (Tabla 5) con la finalidad de analizar en qué medida afectaban la tasa de eclosión los puntos considerados como críticos durante el proceso de microinyección. También se probó reduciendo la concentración de la Cas9, esto considerando su posible toxicidad al adicionarse junto con los sgRNA's a una alta concentración (Li et al., 2017). El daño físico causado por la manipulación con el pincel resultó ser el principal factor que afecta la tasa de eclosión, en contraparte al daño fisiológico que pudiera causar la solución sgRNA-Cas9. Los datos de la tabla 5 muestran claramente que la manipulación y la presión ejercida por el pincel fue lo que más dañó a los huevos y que evitando este paso se incrementa considerablemente la eclosión de los

huevos. Es importante mencionar que no todas las larvas eclosionadas llegaron a la etapa adulta y no todos los adultos tuvieron descendencia, reduciendo así las probabilidades de tener mutaciones analizables en G₀ o G₁.

Tabla 4. Resultados de microinyecciones realizadas.

Gen	sgRNA's	Embriones inyectados	Larvas eclosionadas	Tasa de eclosión	Adultos	G1
ABCA2 (AAELO12698)	137fw 297fw	800	12	1.5%	2	2 (1 mutante)
ABCB1 (AAELO08134)	156rv 235rv	400	3	0.75%	2	1
ABCC2 (AAELO25460)	26rv 134rv	250	3	1.2%	2	1
PHB2 (AAELO13952)	506rv	100	6	6%	5	5 (1 mutante)

Tabla 5. Controles implementados durante proceso de microinyección.

Control	Embriones inyectados	Tasa de eclosión
Sin manipular	250	79%
Alineados y transferidos	100	8%
Inyectados con agua estéril	100	0%
Alineados y transferidos sin presionar con pincel	100	32%
Inyectados con agua estéril (transferidos sin presionar con pincel)	150	12%

La microinyección de huevos es un procedimiento delicado que requiere una gran destreza por lo que requiere de mucha práctica. Este proyecto permitió optimizar aspectos que pueden afectar la tasa de eclosión, tales como la reducción del tiempo que tarda el alineamiento de los huevos, una transferencia hacia el portaobjetos más cuidadosa y una inyección más suave. La experiencia permitió ver que se requiere realizar el procedimiento de alineamiento y microinyección dentro de la primera hora después de la oviposición, alineando cuando los huevos aún son blancos e inyectando cuando son grises. De esta manera, tandas de entre 100 y 200 huevos pueden ser procesadas. Una microinyección demasiado temprana revienta los huevos blancos frágiles, mientras que una inyección tardía (huevos negros) no permite una microinyección adecuada dada la presión interna del huevo, además de que disminuye las posibilidades de editar el genoma en línea germinal.

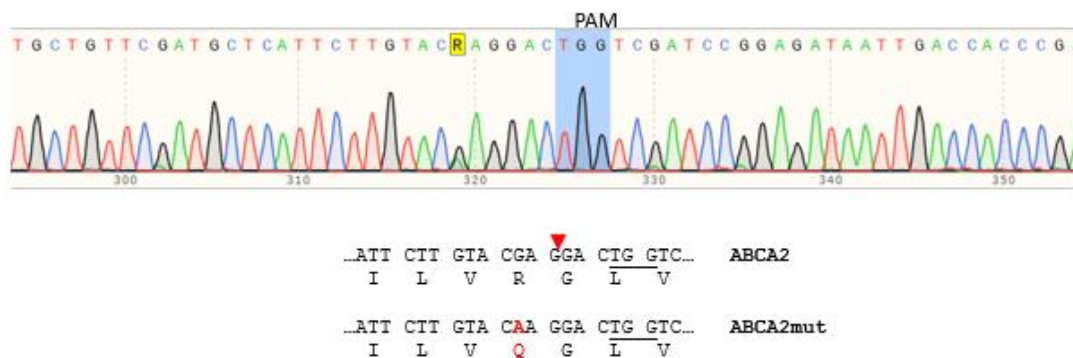
Si bien se ha observado que no todas las larvas eclosionadas de huevos sin manipular llegan a la etapa adulta (alrededor del 70% de sobrevivencia), es destacable el hecho de que alrededor del 80% de las larvas eclosionadas para el gen *abca2* no llegaron a la etapa de pupa, muriendo la mayoría en el primer instar. Esto podría sugerir una posible letalidad en la alteración de este gen. Se conoce que la subfamilia ABCA está involucrada en el transporte de lípidos y que una disrupción en la expresión de *abca2* puede provocar alteraciones en el comportamiento y en la función neuronal en seres humanos y roedores (Dean et al., 2021). En el caso de insectos, se han reportado varios casos en los que el silenciamiento de genes *abc* provocan fenotipos letales, tales como el de los genes *abce3* y *abcf2* en el coleóptero *Tribolium castaneum* y el del gen *abch1* en el lepidóptero *P. xylostella* (Broehan et al., 2013; Guo et al., 2015). Sin embargo, se han reportado varios casos exitosos en provocar el knock-out de *abca2* mediante CRISPR-Cas9 en insectos, específicamente el lepidópteros, generando poblaciones mutantes funcionales (Wang et al., 2017; Fabrick et al., 2021, Yang et al., 2019). En el caso del lepidoptero *Spodoptera frugiperda* se reportó que el doble knock-out de *abca2* y *abca3* mediante CRISPR-Cas9 también resultó en un fenotipo letal (Jin et al., 2020).

Caracterización de mutantes

Los 11 adultos resultantes de la microinyección (G_0) fueron aislados y apareados con individuos silvestres del sexo opuesto. Las hembras fueron alimentadas con sangre y se esperó a obtener larvas de la descendencia (G_1) para sacrificar G_0 , extraer el ADN

genómico, amplificar la región del gen objetivo y secuenciarlo. Dada la poca cantidad de ADN genómico recuperado de un solo mosquito, sólo fue posible analizar un individuo G_0 correspondiente a *abcb1*, el cual no presentó mutaciones. Para el resto de los adultos se analizó la población G_1 que, en caso de haber generado mutaciones en la línea germinal, debía ser heterocigota. Los resultados de la secuenciación indicaron que se produjeron dos poblaciones mutantes, una en *abca2* (G_1 ABCA2mut) y otra en *phb2* (G_2 PHB2mut). Por un lado, en ABCA2mut el sgRNA 137fw condujo a una sustitución de un par de bases (G por A) ocasionando un cambio de codón y por consiguiente una sustitución Arg44Gln. Por otro lado, PHB2mut se caracterizó por una delección de 3 pb guiada por el sgRNA 506rv que resultó en la delección del residuo Val163.

a)



b)

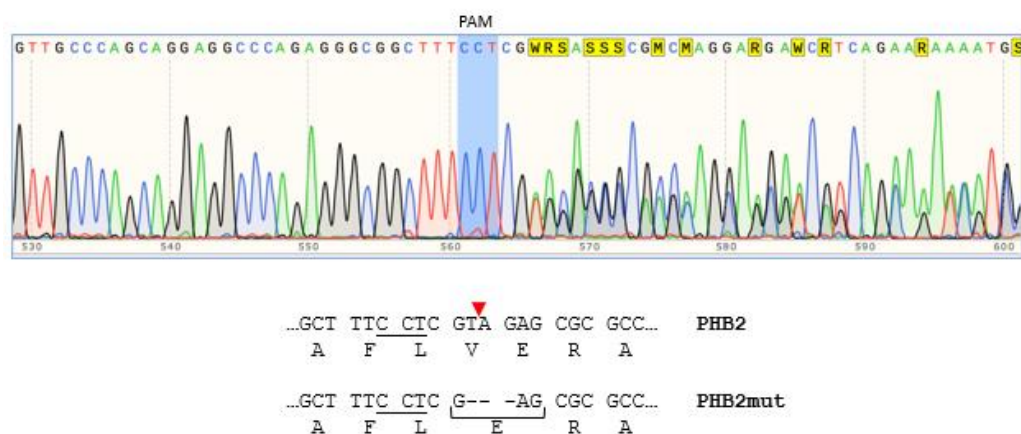


Figura 20. Genotipificación de a) G_1 ABCA2mut y b) G_1 PHB2mut. La secuencia PAM subrayada y resaltada en azul (cromatograma). La flecha roja indica el sitio de corte de la Cas9.

Producción de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa

Las suspensiones de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa se analizaron por SDS-PAGE. La proteína Cry4Ba en su forma de protoxina posee una masa de 128 kDa mientras que la proteína Cry11Aa tiene un tamaño de 72 kDa. En ambas suspensiones se encontraron proteínas de diferentes tamaños, destacando por su tamaño e intensidad las bandas del tamaño esperado.

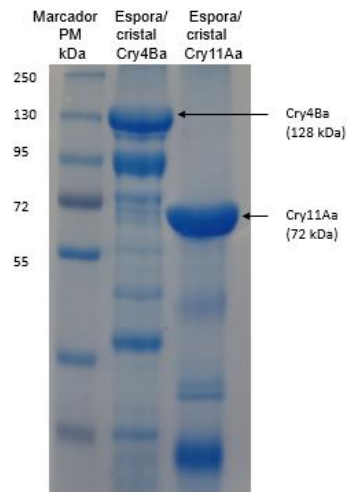


Figura 21. SDS-PAGE de suspensiones de espora/cristal de cultivos de Cry4Ba y Cry11Aa.

Bioensayos de susceptibilidad a Cry4Ba y Cry11Aa

Los bioensayos fueron realizados con la segunda generación (G_2) con la finalidad de tener individuos homocigotos a las mutaciones generadas (por genética mendeliana se espera obtener alrededor del 25% de individuos homocigotos), dado que los alelos que generan toxicidad a las toxinas Cry suelen ser recesivos. Cabe mencionar que las concentraciones empleadas de cada toxina fueron aproximadamente el doble de las LC_{50} (Concentración Letal 50) reportadas, siendo $LC_{50} = 455$ ng/mL para Cry4Ba y $LC_{50} = 227.3$ ng/mL para Cry11Aa (Pacheco et al., 2017; Pérez et al., 2005).

El conteo de las larvas sobrevivientes fue realizado al cabo de 24 horas del inicio del bioensayo. Las larvas G_2 PHB2mut presentaron un 100% de mortalidad a las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa. En el caso de las larvas G_2 ABCA2mut, se presentó una mortalidad del

100% para la toxina Cry4Ba y del 87% para Cry11Aa. Sin embargo, pasadas 72 horas todas las larvas habían muerto. Los controles positivos de ambas toxinas presentaron una susceptibilidad total, mientras el control negativo presentó un 100% de supervivencia. Es así como se puede decir que tanto G₂ PHB2mut como G₂ ABCA2mut no presentaron un fenotipo de resistencia a ninguna de las dos toxinas.

Tabla 6. Resultados de bioensayos de susceptibilidad a Cry4Ba y Cry11Aa.

Población	Cry4Ba (1000 ng/mL)		Cry11Aa (500 ng/mL)	
	n	% mortalidad	n	% mortalidad
G ₂ PHB2mut	500	100	500	100
G ₂ ABCA2mut	90	100	90	100
Control positivo (silvestres)	10	100	10	100
Control negativo (silvestres sin toxina)	10	0	10	0

CONCLUSIONES

- El daño físico a los huevos provocado por el proceso de microinyección es el principal factor que afecta la tasa de eclosión.
- Una buena alimentación de los mosquitos (miel de calidad, sangre fresca) es un factor clave para una buena oviposición.
- Se requiere trabajar dentro de la primera hora desde que los huevos son ovopositados para aumentar la tasa de eclosión (alineamiento de huevos blancos, microinyección de huevos grises).
- Los sgRNA's diseñados dirigen de manera específica la actividad de la Cas9, aunque cada uno lo hace con diferentes eficiencias.
- Se generó una población homocigota a una mutación puntual en ABCA2 que resultó en una sustitución Arg44Gln y que es sensible a Cry4Ba y Cry11Aa.
- Se logró una mutante homocigota en el gen de prohibitina que tenía una delección Val43 que resultó ser sensible a Cry4Ba y Cry11Aa.
- Aún se requiere generar una mutación más drástica, por ejemplo, que presente corrimiento en el marco de lectura o que generen deleciones importantes en los genes objetivo para validar su participación o no en la toxicidad de las toxinas Cry.
- La estrategia planteada es efectiva para seleccionar mutantes en los genes que codifican para transportadores ABC seleccionados y del gen de prohibitina. Sin embargo, se requiere continuar con las microinyecciones para poder generar nuevos candidatos que contengan estas nuevas mutaciones más drásticas, como se describió arriba.

PERSPECTIVAS

- Se pueden realizar ensayos para analizar la cinética de diferentes sgRNA's candidatos para emplear los que se comporten de manera similar para cada gen.
- Se pueden estandarizar las soluciones de microinyección con el par de sgRNA's con una eficiencia de edición similar para maximizar las posibilidades de obtener

mutaciones más drásticas, por lo que sería necesario considerar más sgRNA's candidatos.

- Se han empleado nanopartículas que, por difusión, acarrean el complejo sgRNA-Cas9 para editar genéticamente plantas y hacer frente a enfermedades (Mujtaba et al., 2021). Se plantea la formulación de nanopartículas afines a los huevos de *A. aegypti* en colaboración con el Dr. Jhones Luiz de Oliveira. Se han sugerido preparaciones a base de quitosano/tripolifosfato de sodio, alginato/quitosano y zeína como una alternativa a la microinyección.

REFERENCIAS

- Abbas, M. (2018). Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28 (52). <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0051-2>
- Adang, M., Crickmore, N. & Jurat-Fuentes, J. L. (2014). Chapter two – Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Advances in Insect Physiology*, 47, 39–87. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6>
- Bayyareddy, K., Zhu, X., Orlando, R. & Adang, M. (2012). Proteome analysis of Cry4Ba toxin-interacting *Aedes aegypti* lipid rafts using geLC-MS/MS. *Journal of Proteome Research.*, 11(12), 5843-5855. <https://doi.org/10.1021/pr3006167>
- Berger, A., Ikuma, M. & Welsh, M. (2005). Normal gating of CFTR requires ATP binding to both nucleotide-binding domains and hydrolysis at the second nucleotide-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(2), 455-460. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408575102>
- Bravo, A., Soberón, M. & Gill, S. (2005). *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. En L.I. Gilbert, K. Iatrou, S.S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science* (Vol. 6, pp. 175-206). Elsevier.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>

- Broehan, G., Kroeger, T., Lorenzen & Merzendorfer, H. (2013). Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-6>
- Canton, P., Cancino-Rodezno, A., Gill, S., Soberón, M. & Bravo, A. (2015). Transcriptional cellular responses in midgut tissue of *Aedes aegypti* larvae following intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *BMC Genomics*, 16(1042). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2240-7>
- Carrada, T., Vázquez, L. & López, I (1984). Ecología del dengue y el *Aedes aegypti*. *Salud Pública México*, 26(3), 297-311.
- Chen, Y., Li, M., Islam, I., You, L., Wang, Y., Li, Z., Ling, L., Zeng, B., Xu, J., Huang, Y. & Tan, A. (2014). Allelic-specific expression in relation to *Bombyx mori* resistance to Bt toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 54, 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.07.007>
- Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T & Bonning, B. (2021). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186(107438). <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
- Dean, M., Moitra, K. & Allikmets, R. (2021). The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily, *Authorea*. <https://doi.org/10.22541/au.164001179.92800452/v1>
- Douris, V., Denecke, S., Van Leeuwen, T., Bass, C., Nauen, R. & Vontas, J. (2020). Using CRISPR/Cas9 genome modification to understand the genetic basis of insecticide resistance: *Drosophila* and beyond. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 167(104595). <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104595>
- Eiman, M., Introini, M., Ripoll, C. (2016). *Ciclo de vida de Aedes aegypti* [PDF]. Ministerio de Salud Argentina, Argentina. <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/directrices-para-la-prevencion-y-control-de-aedes-aegypti>
- Evdokimov, A., Moshiri, F., Sturman, E., Rydel, T., Zheng, M., Seale, J. & Franklin, S. (2014). Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into *in vivo* formed crystals. *Protein science*, 23, 1491-1497. <https://doi.org/10.1002/pro.2536>

- Fabrick, J., Le Roy, D., Mathew, L. *et al.* (2021). CRISPR-mediated mutations in the ABC transporter gene ABCA2 confer pink bollworm resistance to Bt toxin Cry2Ab. *Scientific Reports*, 11(10377). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89771-7>
- Flagel, L., Swarup, S., Chen, M., Bauer, C., Wanjugi, H., Carrill, M., Hill, P., Tuscan, M., Bansal, R., Flannagan, R., Clark, T., Michel, A., Head, G y Goldman, B. (2015). Genetic Markers for Western Corn Rootworm Resistance to Bt Toxin. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 5(3), 399-405. <https://doi.org/10.1534/g3.114.016485>
- Foster, W.& Walker, E. (2002). *Medical and Veterinary Entomology*. San Diego,CA: Academic Press. 597 pp.
- Gahan, L. J., Gould, F., & Heckel, D. G. (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293, 857–860. <https://doi.org/10.1126/science.1060949>
- Goldberg L. & Margalit J. (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*. 37(3), 355-358.
- Guo, Z., Kang, S., Zhu, X. *et al.* (2015). The novel ABC transporter ABCH1 is a potential target for RNAi-based insect pest control and resistance management. *Scientific Reports*, 5(13728). <https://doi.org/10.1038/srep13728>
- Higgins, C. y Linton, K. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), 918-926. <https://doi.org/10.1038/nsmb836>
- Jin, M., Yang, Y., Shan, Y., Chakrabarty, S., Cheng, Y., Soberón, M., Bravo, A., Liu, K., Wu, K. & Xiao, Y. (2020). Two ABC transporters are differentially involved in the toxicity of two *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the invasive crop-pest *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pest Managem Sciences*, 77(3), 1492-1501. <https://doi.org/10.1002/ps.6170>
- Jiang, F. & Doudna, J. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Reviews Further*, 46, 505-529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kuadkitkan, A., Smith, D. & Berry, C. (2012). Investigation of the Cry4B–Prohibitin interaction in *Aedes aegypti* cells. *Current Microbiology*, 65, 446-454. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0178-4>

- Lambert, B. & Peferoen, M. (1992). Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*: facts and mysteries about a successful biopesticide, *BioScience*, 42(2), 112–122, <https://doi.org/10.2307/1311652>
- Li, M., Bui, M., Yang, T., Bowman, C., White, B. & Akbari, O. (2017). Germline Cas9 expression yields highly efficient genome engineering in a major worldwide disease vector, *Aedes aegypti*. *PNAS*, 114(49): E10540-E10549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711538114>
- López-Latorre, M. & Neira, M. (2016). (2016). Influencia del cambio climático en la biología de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito transmisor de arbovirosis humanas. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 37(2), 11-21.
- Mathew, L., Ponnuraj, J., Mallappa, B., Chowdary, L., Zhang, J., Tay, W., Walsh, T., Gordon, K., Heckel, D., Downes, S., Carrière, Y., Li, X., Tabashnik, B. y Fabrick, J. (2018). ABC transporter mis-splicing associated with resistance to Bt toxin Cry2Ab in laboratory- and field-selected pink bollworm. *Scientific Reports*, 8(1), 13531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31840-5>
- Merkwirth, C. & Langer, T. (2009). Review. Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793, 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.013>
- Merzendorfer, H. (2014). Chapter One - ABC Transporters and Their Role in Protecting Insects from Pesticides and Their Metabolites. En Cohen E, (Ed.), *Advances in Insect Physiology*, 46, 1-72.
- Mujtaba, M., Wang, D., Carvalho, L. B., Oliveira, J. L., Espirito Santo Pereira, A. d., Sharif, R., et al. (2021). Nanocarrier-Mediated Delivery of miRNA, RNAi, and CRISPR-Cas for Plant Protection: Current Trends and Future Directions. *ACS Agric. Sci. Technol.* 1, 417–435. <https://doi.org/10.1021/ACSAGSCITECH.1C00146>
- Nelson, M. (1986). *Aedes aegypti*: Biology and ecology. Washington: Pan American Health Organization. 50 pp.
- Ocelotl, J.; Sánchez, J.; Gómez, I.; Tabashnik, B.; Bravo, A. & Soberón, M. (2017). ABCC2 is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth. *Scientific Reports*, 7, 2386. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02545-y>
- Ochoa-Campuzano, C., Martínez-Ramírez, A., Contreras, E., Rausell, C. & Real, M. (2013). Prohibitin, an essential protein for Colorado potato beetle larval viability, is

- relevant to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107, 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.09.001>
- Organización Mundial de la Salud (2 de marzo de 2020). *Enfermedades transmitidas por vectores*. Who. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
 - Pacheco, S., Gómez, I., Sánchez, J., García-Gómez, B. I., Soberón, M., & Bravo, A. (2017). An intramolecular salt bridge in *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin is involved in the stability of helix α -3, which is needed for oligomerization and insecticidal activity. *Applied and environmental microbiology*, 83(20), e01515-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01515-17>
 - Pardo-López L., Soberón M. & Bravo A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 3-22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>
 - Pauchet, Y., Bretschneider, A., Augustin, S. y Heckel, D. (2016). A P-Glycoprotein Is Linked to Resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Toxin in a Leaf Beetle. *Toxins*, 8, 362-373. <https://doi.org/10.3390/toxins8120362>
 - Pérez, C., Fernandez, L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. (2005). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18303–18308. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505494102>
 - Pigott, C. & Ellar, D. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255-281. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>
 - Raymond, B., Johnston, P., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D. & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
 - Sato, R., Adegawa, S., Li, X., Tanaka, S. y Endo, H. (2019). Function and role of ATP-Binding cassette transporters as receptors for 3D-Cry toxins. *Toxins*, 11(2), 124. <https://doi.org/10.3390/toxins11020124>
 - Savage, H. & Smith, G. (1995). *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* en las Américas: implicaciones para la transmisión de arbovirus e identificación de hembras adultas dañadas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*, 118(6), 473-487.

- Secretaría de Salud (2021). *Panorama epidemiológico del dengue. Semana epidemiológica 52 de 2021*. Recuperado de <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2021>
- Sena da Silva, I., Gómez, I., Pacheco, S., Sánchez, J., Zhang, J., Luque, T., Desiderio, J., Soberón, M., Bravo, A. & Polanczyk, R. (2021). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab domain III β -16 is involved in binding to prohibitin, which correlates with toxicity against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2), e01930-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01930-20>
- Tatsuta, T., Model, K. & Langer, T. (2005). Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 248-259. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-09-0807>
- Tay, W., Mahon, R., Heckel, D., Walsh, T., Downes, S., James, W., Lee, S., Reineke, A., Williams, A. y Gordon, K. (2015). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily a protein. *PLoS Genetics*, 11(11): e1005534. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005534>
- Torres-Galicia, I., Cortés-Poza, D. & Becker, I. (2014). Dengue en México: Análisis de dos décadas. *Gaceta Médica de México*, 150(2), 122-127.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. & Leemans, J. (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328, 33-37. <https://doi.org/10.1038/328033a0>
- Wang, J., Zhang, H., Wang, H., Zhao, S., Zuo, Y., Yang, Y., & Wu, Y. (2016). Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 76, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.06.008>
- Wang, J., Wang, H., Liu, S., Liu, L., Tay, W., Walsh, T., Yang, Y. & Wu, Y. (2017). CRISPR/Cas9 mediated genome editing of *Helicoverpa armigera* with mutations of an ABC transporter gene HaABCA2 confers resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 87, 147-153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.07.002>
- Wang, S., Kain, W. & Wang, P. (2018). *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exert toxicity by multiple pathways in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 102, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.09.013>

- Wang, J.; Ma, H.; Zhao, S.; Huang, J.; Yang, Y.; Tabashnik, B. & Wu, Y. (2020). Functional redundancy of two ABC transporter proteins in mediating toxicity of *Bacillus thuringiensis* to cotton bollworm. *PLoS Pathogens* 16(3), e1008427. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008427>
- Wang, J., Yang, X., He, H., Chen, J., Liu, Y., Huang, W., Ou, L., Yang, Z., Guan, X., Zhang, L. & Wu, S. (2021). Knockout of two Cry-binding aminopeptidase N isoforms does not change susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insects*, 12, 223. <https://doi.org/10.3390/insects12030223>
- Watkins, P., Huesing, J., Margam, V., Murdock, L. & Higgins, T. (2012). 23 - Insects, nematodes, and other pests. En A. Altman y P. M. Hasegawa (Eds.), *Plant Biotechnology and Agriculture* (pp. 353-370). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00023-7>
- Wu, C., Chakrabarty, S., Jin, M., Liu, K., & Xiao, Y. (2019). Insect ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters: Roles in Xenobiotic Detoxification and Bt Insecticidal Activity. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2829. <https://doi.org/10.3390/ijms20112829>
- Xiao, Y., Zhang, T., Liu, C., Heckel, D., Li, X., Tabashnik, B. & Wu, K. (2014). Mis-splicing of the ABCC2 gene linked with Bt toxin resistance in *Helicoverpa armigera*. *Scientific Reports*, 4, 6184. <https://doi.org/10.1038/srep06184>
- Yang, X., Chen, W., Song, X., Ma, X., Cotto-Rivera, R., Kain, W., Chu, H., Chen, Y., Fei, Z. & Wang, P. (2019). Mutation of ABC transporter ABCA2 confers resistance to Bt toxin Cry2Ab in *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103209>
- Zettel, C. & Kaufman, P. (2008). Common name: yellow fever mosquito. Scientific name: *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Culicidae). University of Florida. Recuperado de https://entnemdept.ufl.edu/creatures/aquatic/aedes_aegypti.htm
- Zhang, T., Coates, B.S., Wang, Y., Wang, Y., Bai, S., Wang, Z., He, K. (2017). Down-regulation of aminopeptidase N and ABC transporter subfamily G transcripts in Cry1Ab and Cry1Ac resistant Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Int. J. Biol. Sci*, 13, 835–851. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18868>