



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis *in vivo* de los receptores APN1 y mALP de las toxinas Cry mediante edición genética por CRISPR-Cas9 en *Aedes aegypti*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.B.Q. Adrián Salvador Gallegos Hernández

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Sabino Pacheco Guillén
[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adrián Ochoa Leyva
[Instituto de Biotecnología](#)
Dr. Pavel Isa Haspra
[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca, Mor. enero, 2024



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.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
I.2. Toxinas Cry.....	4
I.3. Regulación de genes <i>cry</i>	6
I.4. Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	7
I.5. Factores que afectan el mecanismo de acción.....	9
II. ANTECEDENTES.....	11
II.1. Receptores APN1 y mALP.....	11
II.2. Relevancia de mALP (AAEL015070) y APN1 (AAEL012783) en la susceptibilidad de <i>Aedes aegypti</i> a las toxinas Cry.....	14
II.3. Biología de <i>Aedes aegypti</i>	15
II.4. CRISPR-Cas9.....	17
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVO GENERAL.....	21
V. METAS PARTICULARES.....	21
VI. METODOLOGÍA.....	22
VI.1 Producción de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa.....	22
VI.2 Diseño y síntesis del sgRNA.....	22
VI.3 Amplificación de un fragmento de los genes <i>apn1</i> y <i>m-alp</i>	23
VI.4 Expresión de Cas9.....	24
VI.5 Purificación de Cas9.....	24
VI.6 Prueba de digestión de DNA <i>in vitro</i>	25
VI.7 Capilares para microinyección.....	26
VI.8 Alineamiento de huevos de <i>A. aegypti</i>	26
VI.9 Microinyección de huevos de <i>A. aegypti</i>	26
VI.10 Tratamiento post-inyección.....	26
VI.11 Genotipificación.....	27
VI.12 Bioensayos.....	27
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28

VII.1. Producción de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa.....	28
VII.2. Valoración <i>in vitro</i> del diseño de sgRNAs para la edición de genes por CRISPR-Cas9.....	28
VII.2.1 Síntesis de sgRNA.....	28
VII.2.2 Producción de fragmentos de <i>apn1</i> y <i>m-alp</i>	30
VII.2.3 Purificación de Cas9.....	31
VII.2.4 Prueba de digestión <i>in vitro</i> de los sgRNA.	33
VII.3 Microinyección de los embriones de <i>A. aegypti</i>	35
VII.3.1 Identificación de puntos críticos en el proceso de microinyección.	35
VII.3.2 Microinyección de huevos de <i>A. aegypti</i> con el complejo Cas9-gRNA. ...	37
VII.4 Genotipificación de mosquitos para editar genéticamente a mALP.....	39
VII.5 Genotipificación de mosquitos para editar genéticamente a APN1.	41
VII.6 Bioensayos.....	42
VIII. CONCLUSIONES	47
IX. REFERENCIAS	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> durante la etapa de esporulación (esporangio). ..	2
Figura 2. Protoxina y toxina activada Cry1A.	5
Figura 3. Mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab en lepidópteros.	8
Figura 4. Modelo estructural de mALP de <i>A. aegypti</i>	12
Figura 5. Modelado de APN (AAEL012783) de <i>A. aegypti</i>	13
Figura 6. Morfología de <i>A. aegypti</i>	17
Figura 7. Mecanismo de defensa CRISPR-Cas9 bacteriano contra fagos.	19
Figura 8. SDS-PAGE de suspensiones de espora/cristal de cultivos de Cry4Ba y Cry11Aa.	28
Figura 9. Esquema de los genes <i>apn1</i> (AAEL012783) y <i>m-alp</i> (AAEL015070).	29
Figura 10. Análisis de los productos de PCR (izquierda) y de la transcripción <i>in vitro</i> (derecha) para la generación de los sgRNAs.....	30
Figura 11. Amplificación de <i>apn1</i> y <i>m-alp</i>	31
Figura 12. Purificación de Cas9 por cromatografía de afinidad.	32
Figura 13. Purificación de Cas9 por cromatografía de exclusión molecular.	33
Figura 14. Prueba de digestión <i>in vitro</i> para valorar los sgRNAs.....	35
Figura 15. Microinyección de huevos de <i>A. aegypti</i>	38
Figura 16. Secuenciación de dos mosquitos con mutación en el gen <i>m-alp</i>	40
Figura 17. Mutación 1 para <i>apn1</i>	41
Figura 18. Mutación 2 para <i>apn1</i>	41
Figura 19. Resultado de los bioensayos realizados.	43
Figura 20. Modelo de APN1 de <i>A. aegypti</i>	46

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos sobrelapantes para generar los sgRNAs.....	23
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de <i>apn1</i> y <i>m-alp</i>	24
Tabla 3. Tamaño de los fragmentos de DNA esperadas después de la digestión <i>in vitro</i> de <i>apn1</i> y <i>m-alp</i>	25
Tabla 4. Rendimiento del proceso de purificación de Cas9.....	33
Tabla 5. Controles en el proceso de microinyección del huevo de <i>A. aegypti</i>	36
Tabla 6. Resumen de las microinyecciones realizadas.....	38
Tabla 7. Mutaciones encontradas en G ₁	39
Tabla 8. Mortalidad de la colonia G ₂ mutante en APN1 contra las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Bt: *Bacillus thuringiensis*

ALP: Fosfatasa alcalina

APN: Aminopeptidasa-N

mALP: Fosfatasa alcalina de membrana

VIPs: Proteínas insecticidas vegetativas

GPI: Glucosil-fosfatidil-inositol

ABC: *ATP Binding Cassettes*

cAMP: AMP cíclico

PKA: Proteincinasa A

BBMV: Vesículas de membrana de microvellosidades

ECALP: ALP de *Escherichia coli*

PLALP: ALP de placenta humana

sALP: ALP soluble

Sf: *Spodoptera frugiperda*

iRNA: RNA de interferencia

CRISPR: *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*

Cas: *CRISPR associated sequences*

crRNA: CRISPR RNA

tracrRNA: RNA transactivador de crRNA

PAM: *Proto-spacer Adjacent Motifs*

Sp: *Streptococcus pyogenes*

pb: Pares de bases

NHEJ: Reparación por unión de extremos no homólogos

HDR: Reparación dirigida por homología

sgRNA: RNA guía sencillo

MBP: Proteína de unión a maltosa

rpm: Revoluciones por minuto

DO: Densidad óptica

CM-FF: Carboximetil sefarosa

G₀: Generación 0

G₁: Primera generación

G₂: Segunda generación

ON: Toda la noche

AGRADECIMIENTOS

Al Conahcyt por haberme permitido concluir mis estudios de posgrado. A mis padres María de Lourdes Hernández Romo y Salvador Gallegos Nieto, que nunca me dejaron de apoyar sin importar el proyecto que llevé a casa. A mis hermanos Rodrigo, Daniel, Ale y Luly, por su amor y su cariño. A Mariely Montes Camacho, por nunca rendirse sin importar el viaje que tuve o tuvo que realizar y por siempre apoyar mis sueños. A los doctores Mario Soberón Alejandra Bravo por aceptarme en su laboratorio, por sus consejos y ánimos. A la doctora Isabel Gómez por escucharme y aconsejarme cuando lo necesité. Especial agradecimiento al Doctor Sabino Pacheco Guillén por aceptarme como su estudiante sin tener ninguna experiencia en la investigación, por su tutela durante más de dos años, por sus ánimos, y por todo el apoyo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio y aún fuera de este. A Ulises Gómez, Mariana Sotelo, Alba Reyes, Karla Guerrero, Alberto Parra y Moisés López, cuya amistad y compañía hicieron que pudiera llamar segundo hogar a una ciudad tan lejana del primero. A Joaquín Crispín y Jair Flores, por ser mi soporte moral siempre que lo necesité a pesar de la distancia.

En memoria de Fernando Covarrubias Gallegos, que no alcanzó a ver este trabajo terminado y seguramente no lo hubiera hecho nunca, pero que siempre se preocupó por mí y siempre lo hacía por toda su familia.

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram-positiva que en su etapa de esporulación es capaz de producir un cristal proteico en el que se pueden encontrar diferentes proteínas. Entre estas proteínas se encuentran las toxinas Cry, las cuales tienen actividad insecticida en contra de diferentes órdenes de insectos, como coleópteros, lepidópteros y dípteros. La toxina Cry1Ab, la cual tiene actividad contra lepidópteros, interacciona con receptores que se encuentran anclados por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) a la membrana de las células del epitelio intestinal, como Aminopeptidasa-N (APN), Fosfatasa Alcalina (ALP) y con la proteína transmembranal caderina. Estos tres receptores también están involucrados en el mecanismo de acción de toxinas Cry con actividad contra dípteros. Además, se ha propuesto que APN y ALP podrían tener una función redundante en el mecanismo de acción de estas toxinas. El mosquito *Aedes aegypti* es un vector de enfermedades como chikunguya, fiebre amarilla y dengue, y al no existir vacuna para estas enfermedades, el control biológico de este mosquito es de gran importancia para la salud pública. Las etapas larvarias de *A. aegypti* son susceptibles a la acción de las toxinas Cry, y en este sentido el estudio del reconocimiento toxina-receptor es fundamental para utilizarlas como agentes de biocontrol. En este estudio se utilizó la estrategia CRISPR-Cas9 para editar los genes *apn1* y *m-alp* en el mosquito *Aedes aegypti* y valorar su función en la susceptibilidad de este insecto contra de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba, las cuales son las más activas contra este mosquito. Generamos una colonia heterocigota con dos mutaciones puntuales en el gen *apn1*, esta colonia mostró tener una reducción en la susceptibilidad contra la toxina Cry11Aa, y no para la toxina Cry4Ba. El análisis estructural de la Aminopeptidasa 1 (APN1) reveló que la mutación E53K se localiza en una región expuesta al solvente que pudiera ser el sitio de unión para la toxina Cry11Aa. Estos resultados sugieren que el receptor APN1 tiene una función importante en el mecanismo de acción de la toxina Cry11Aa, y que parece no tener redundancia con mALP. Por otra parte, la toxina Cry4Ba podría tener un mecanismo donde APN1 no es fundamental, o podría tener redundancia funcional con otros receptores, como mALP.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium that during the sporulation phase is able to produce a protein crystal, which contains different proteins. One of these is the Cry toxin family which have insecticidal activity against different orders of insects, such as Coleoptera, Lepidoptera and Diptera. The Cry1Ab toxin, which has activity against lepidopteran, interacts with receptors anchored by glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) to the membrane from epithelial cells of midgut, such as Aminopeptidase-N (APN) and Alkaline Phosphatase (ALP); and with the transmembrane protein cadherin. These three receptors are also involved in the mechanism of action of Cry toxins with activity against dipteran. Furthermore, it has been proposed that APN and ALP could play a redundant role in the mechanism of action of these toxins. The mosquito *Aedes aegypti* is a vector of diseases such as chikungunya, yellow fever, and dengue, and since there is no vaccine for these diseases, the biological control of this mosquito is of great importance for public health. The larval stages of *A. aegypti* are susceptible to the action of Cry toxins, and in this sense, the study of toxin-receptor recognition is essential to use them as biocontrol agents. In this study, the CRISPR-Cas9 strategy was used to edit the *apn1* and *m-alp* genes in the *A. aegypti* mosquito and to assess its role in the susceptibility of this insect to Cry11Aa and Cry4Ba toxins, which are the most active toxins against this mosquito. We generated a heterozygous colony with two single-mutations in the *apn1* gene, this colony showed to have reduced susceptibility to Cry11Aa toxin, but not for Cry4Ba toxin. Structural analysis of APN1 revealed that the mutation E53K is located in a solvent-exposed region that could be the binding-site for Cry11Aa toxin. These results suggest that the APN1 receptor has an important role in the mechanism of action of Cry11Aa toxin, and that it does not appear to have redundancy with mALP. On the other hand, the Cry4Ba toxin could have a mechanism where APN1 is not essential, or it could have functional redundancy with other receptors, such as mALP.

I. INTRODUCCIÓN

Las toxinas Cry son una familia de proteínas producidas por la bacteria Gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) que forman un cristal durante la esporulación cuando se encuentra en limitación de nutrientes. Estas toxinas Cry tienen actividad insecticida contra varios órdenes de insectos, incluyendo coleópteros, dípteros y lepidópteros. Las toxinas Cry son biodegradables e inocuas para los vertebrados y plantas. Estas características las han hecho una alternativa viable para utilizarlas como biopesticidas (Bravo et al., 2007).

Dentro de los organismos blanco de las toxinas Cry se encuentra el mosquito *Aedes aegypti*, (*A. aegypti*) el cual es vector de los virus del dengue, chikunguya, zika y fiebre amarilla. Los casos de dengue en México han aumentado en las últimas décadas, y debido a que actualmente no existen vacunas o medicamentos para esta enfermedad, el control de este mosquito es una de las principales medidas para combatirla, y representa un tema de salud pública muy importante. (Lozano-Fuentes et al., 2012). *Bt* subespecie *israelensis* es una cepa que es tóxica para larvas del mosquito *A. aegypti*, debido a que es capaz de producir diversas proteínas insecticidas que se encuentran en el cristal paraesporal, como las toxinas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa y Cyt2Ba (Bravo et al., 2007).

Las toxinas Cry tienen una alta especificidad contra los insectos blanco, ya que estas toxinas interactúan con distintas proteínas de membrana conocidas como “receptores”, los cuales se encuentran en las microvellosidades del intestino medio. La interacción de las toxinas Cry con estos receptores desencadena la oligomerización de las toxinas, y posteriormente la formación de poros en las células del intestino de la larva, lo que provoca la lisis celular, y tiempo después la muerte del insecto (Likitvivanavong et al., 2011). Algunos de los receptores de toxinas Cry mejor caracterizados son las proteínas caderina, fosfatasa alcalina (ALP), y aminopeptidasa-N (APN). Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la interacción de las toxinas Cry con estos receptores han sido descritos principalmente en insectos lepidópteros y existen muy pocos estudios en insectos dípteros (Likitvivanavong et al., 2011). En este proyecto proponemos estudiar la relevancia funcional de dichos receptores, específicamente APN1 y ALP de membrana (mALP), en el díptero *A. aegypti* usando la técnica CRISPR-Cas9, y así describir su papel en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, en específico para las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba.

1.1. *Bacillus thuringiensis*

La identificación de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) remonta a los inicios del siglo XX en Japón, donde el científico Ishiwata observó que había un microorganismo patógeno en las larvas del gusano de la seda (*Bombix mori*), por lo que en un inicio el microorganismo fue llamado *Bacillus sotto* (*sotto*=suave, en japonés). Poco tiempo después la misma bacteria se aisló de una polilla de la harina (*Ephestia kuehniella*) en la provincia alemana de Turingia, por lo que se nombró *Bacillus thuringiensis*, nombre que prevalece hasta la fecha. Desde el descubrimiento de *Bt*, esta bacteria se comenzó a aislar y usar como biopesticida, saliendo al mercado la primera formulación al final de la década de 1930 con el nombre “Sporeine” en Francia. Posteriormente, con el desarrollo de la biología molecular, se comenzaron a desarrollar plantas genéticamente modificados para expresar genes *cry* provenientes de esta bacteria (Schnepf et al., 1998; Melo et al., 2014).

Bacillus thuringiensis es una bacteria aerobia perteneciente al grupo de *Bacillus cereus sensu lato*, las cuales son bacterias de suelo Gram-positivas. Se han aislado diferentes subespecies de *Bt*, y cada subespecie está categorizada gracias a sus características filogenéticas y serotípicas. Algunos ejemplos son *Bt* subsp. *kurstaki*, *Bt* subsp. *aizawai*, *Bt* subsp. *tenebrionis* y *Bt* subsp. *israelensis*. Además, se ha observado que durante su evolución cada subespecie se ha especializado en atacar cierto orden de insectos; por ejemplo, *Bt* subsp. *israelensis* produce toxinas en contra de dípteros.

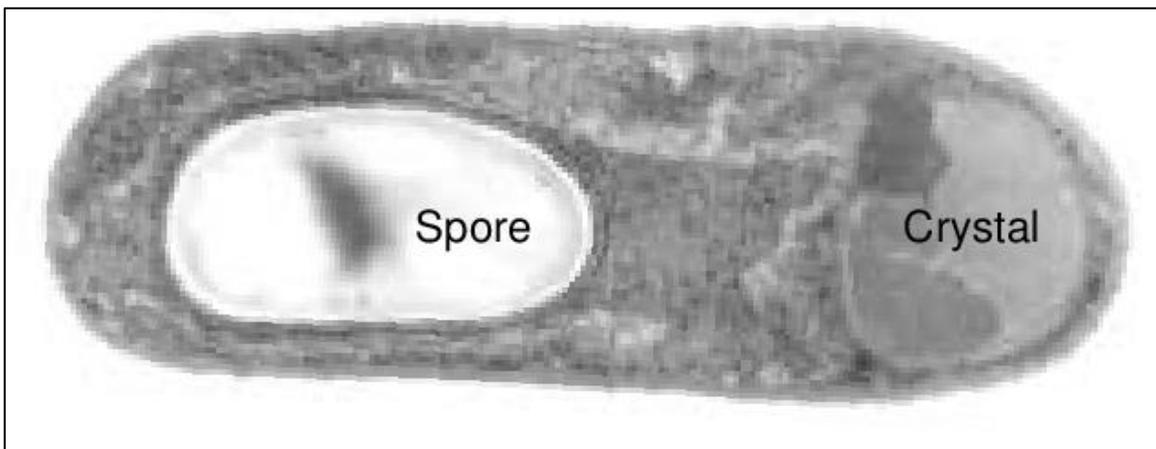


Figura 1. Bacteria *Bacillus thuringiensis* durante la etapa de esporulación (esporangio). Se puede observar la espora y la inclusión proteica (cristal).

El tamaño del genoma de las diferentes subespecies de *Bt* es de 2.4-5.7 Mpb, y es común encontrar uno o varios elementos extracromosomales circulares (plásmidos), los cuales suelen contener genes que codifican para las proteínas que forman el cristal paraesporal (Fig. 1) (Schnepf et al., 1998). Este cristal proteico paraesporal contiene toxinas insecticidas del tipo Cry y/o Cyt, las cuales forman alrededor del 20% de las proteínas totales del cristal (Sanahuja et al., 2011). Además de estas toxinas, *Bt* es capaz de producir y secretar otros factores de virulencia como fosfolipasas, proteasas, quitinasas, beta-exotoxinas y proteínas insecticidas vegetativas (VIPs). Gracias a estas características *Bt* ha sido considerado el mejor biopesticida durante las últimas décadas (Schnepf et al., 1998; Jouzani et al., 2017).

La actividad de *Bt* en contra de distintos ordenes de insectos, como lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros, homópteros y ortópteros, ha ocasionado que se utilice como biopesticida o como complemento de pesticidas químicos para el control de mosquitos, como agropesticida y para la gestión de bosques (Schnepf et al., 1998). El uso de *Bt* es compatible con el medio ambiente, en contraste los pesticidas químicos usados en las últimas décadas, que contribuyen a la contaminación de suelos y aguas. Además, los productos químicos no tienen especificidad por su organismo blanco, por lo que existe el riesgo de intoxicaciones en humanos u otros animales, y en consecuencia generar enfermedades como cáncer y desórdenes en el sistema inmune (Pardo-López et al., 2012). Los genes que codifican para las toxinas de *Bt* han sido usados para desarrollar plantas transgénicas que producen toxinas de *Bt*, como maíz y algodón. Esta estrategia contribuye, no solo a disminuir el uso de pesticidas químicos (en India se ha reducido el uso de pesticidas sintéticos hasta un 70%), sino que la expresión de las toxinas Cry dentro de las células de la planta ayudan a prevenir su inactivación por rayos UV y facilita el transporte de la toxina hacia el insecto blanco, ya que éste ingiere directamente los tejidos de la planta que producen la toxina. Para el año 2017 se comercializaban 98 formulaciones tipo *spray* de biopesticidas con toxinas de *Bt* que representan un mercado de 424 millones de dólares alrededor del mundo (Bravo et al., 2011; Pardo-López et al., 2012; Jouzani et al., 2017).

Bt se encuentra distribuido en todo el planeta, y es posible aislarlo en varios tipos de hábitats, tales como cadáveres de insectos y hojas de plantas. Esta diversidad de hábitats en los que se encuentra *Bt*, puede ser atribuido a que la bacteria posee los plásmidos que contienen los genes *cry*, en donde además existen múltiples elementos móviles que le permiten la transferencia horizontal de los mismos. Esta característica tiene

como resultado una alta variabilidad génica, lo que le confiere una capacidad de adaptabilidad y supervivencia a todos estos hábitats (Schnepf et al., 1998). Además de su actividad entomopatógena, en los últimos años se ha encontrado que *Bt* tiene muchas otras aplicaciones como la generación de nanopartículas de metales usando sus cristales proteicos, promotor para el crecimiento de plantas, agente para biorremediación de metales pesados, antagonista fúngico, e incluso se ha encontrado que algunas toxinas de *Bt* pueden tener actividad contra células cancerígenas (Jouzani, 2017).

I.2. Toxinas Cry

Las toxinas Cry se encuentran mayoritariamente en el cristal paraesporal de *Bt*, formando una numerosa familia de proteínas. Existen más de 500 genes diferentes agrupados en al menos 40 grupos (Crickmore et al., 2020). La forma activa de estas toxinas se caracteriza por tener una estructura globular compuesta por 3 dominios. Sin embargo, las toxinas Cry se expresan en forma de protoxinas, las cuales tienen un tamaño de aproximadamente 130 kDa y contienen 7 dominios. Al activarse esta protoxina sufre un corte proteolítico en sus extremos N- y C-terminal, estas regiones son ricas en cisteínas, las cuales permiten la formación de puentes disulfuro entre otras regiones C-terminal, permitiendo el empaquetamiento y cristalización de la toxina, por lo que se le conoce también como región de cristalización. Posterior al corte proteolítico se obtiene la toxina activada con un peso aproximado de 60-65 kDa (Fig. 2a) y es conocida como fragmento tóxico, el cual está compuesto por aproximadamente 600 aminoácidos (Pardo-López et al., 2012; Jisha et al., 2013). Los tres dominios que conforman a la toxina activada son: el dominio I, que está conformado por un conjunto de 7 hélices α y está implicado en la oligomerización, inserción en la membrana celular, y en la formación de poro; el dominio II, que está compuesto por 3 láminas β antiparalelas y está involucrado en el reconocimiento de los receptores; y el dominio III, el cual está conformado por 2 láminas β antiparalelas con un plegamiento tipo “sándwich”, y al igual que el dominio II, éste está implicado con el reconocimiento de receptores, lo cual da especificidad por cierto insecto (Fig. 2b) (Bravo et al., 2011).

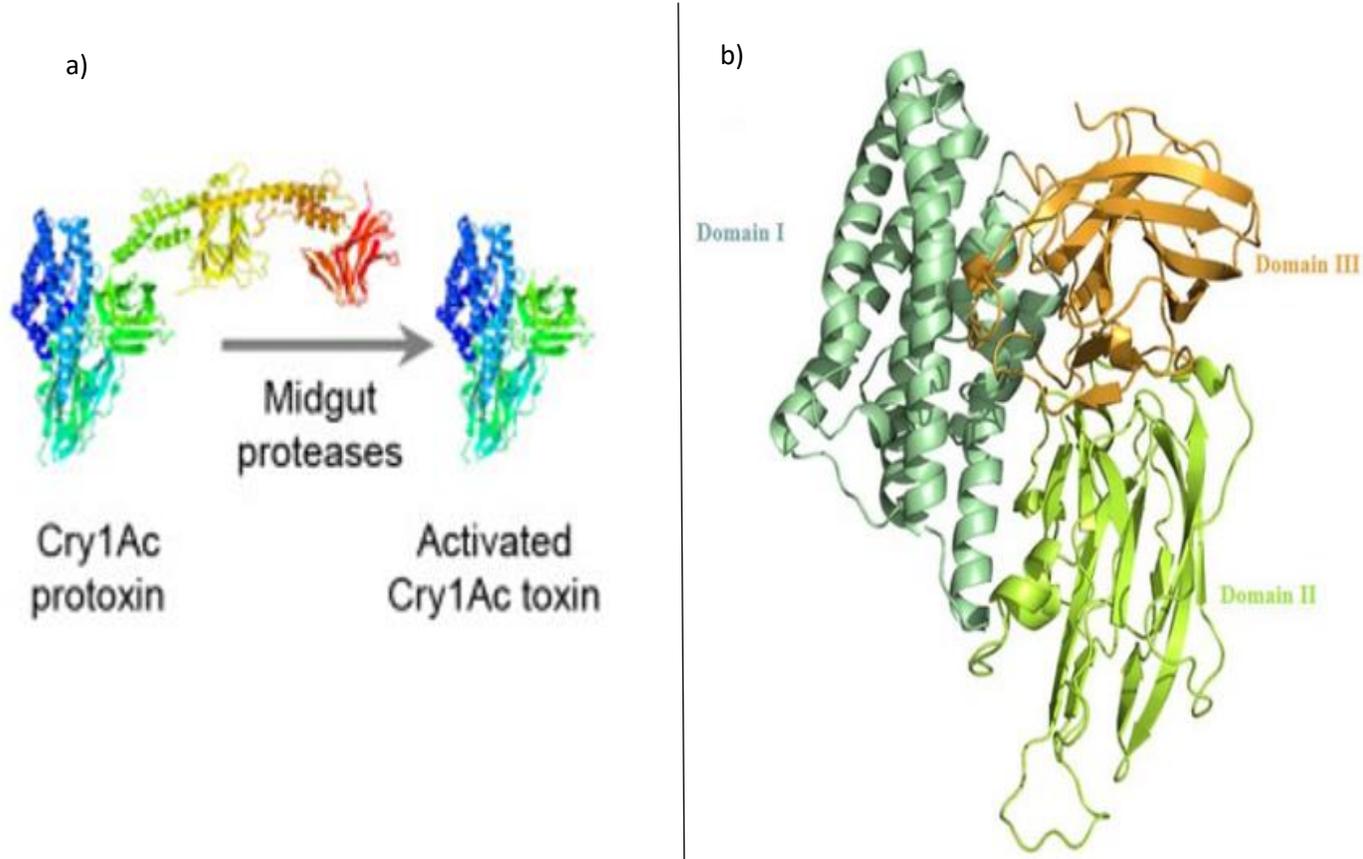


Figura 2. Protoxina y toxina activada Cry1A. a) Protoxina de Cry1A y posterior activación por proteasas intestinales. Imagen tomada de Gup et al., 2020. b) Estructura típica de una toxina Cry (Cry1A activada) con sus tres dominios resaltados en distintos colores. Imagen tomada de Xu et al., 2014.

Las toxinas Cry son expresadas durante la esporulación, debido a que los genes están regulados por factores *sigma* de la RNA polimerasa específicos de la etapa de esporulación, como SigK y SigE. Otra característica interesante de las toxinas Cry es que tienen una similitud importante en su estructura tridimensional aunque tienen actividad para distintos órdenes de insectos; como Cry1Aa (lepidópteros), Cry4Ba (dípteros) y Cry3Bb (coleópteros), las cuales son toxinas que tienen menos del 45% de identidad en sus secuencias. Se ha propuesto que dichas características son resultado de un proceso individual de evolución entre los 3 dominios que componen a la toxina activada. Sin embargo, se ha propuesto que el dominio III pudo haber sido intercambiado entre diferentes toxinas. Este proceso evolutivo resultaría en toxinas con mecanismos de acción similares, pero especificidades diferentes (Sanahuja et al., 2011; Pardo-López et al., 2012).

I.3. Regulación de genes *cry*

La bacteria *Bt* forma dos compartimentos durante su esporulación: la célula madre y la endospora, y posteriormente se forma la inclusión cristalina. El cristal formado por *Bt* representa alrededor del 25% del peso seco de la bacteria, esto significa que durante la fase estacionaria se lleva a cabo una producción masiva de proteínas, lo cual requiere un fino mecanismo de regulación de los genes *cry*, donde la regulación transcripcional, la estabilidad del mensajero y la acumulación de las proteínas Cry juegan un papel importante (Deng et al., 2014).

El mecanismo de regulación transcripcional de los genes *cry* se puede clasificar en dos grupos: dependientes e independientes de esporulación. Los primeros están controlados por factores sigma específicos de la etapa de esporulación SigK y SigE (en la célula madre), mientras que los segundos por el factor SigA, que está presente en la fase vegetativa. SigE y SigK controlan la transcripción de numerosos genes *cry* durante las etapas temprana y tardía de esporulación, respectivamente, su activación permite una producción continua y masiva de las proteínas Cry en la célula madre durante la esporulación. Sin embargo, existen algunos genes *cry* (como los *cry1*) cuya expresión comienza (débilmente) desde la fase vegetativa tardía por el factor SigH y no por SigE y SigK, lo cual indica que la expresión de todos los genes *cry* no sigue un solo mecanismo de expresión (Deng et al., 2014). Por otro lado, la transcripción de los genes *cry* independientes de esporulación comienza desde la fase de crecimiento exponencial de *Bt* y continúa durante algunas horas en la fase estacionaria, incluso hay expresión de genes *cry*, como *cry3A*, cuya expresión es sostenida hasta la fase de esporulación. Además, se ha encontrado que la expresión de este tipo de genes se ve aumentada en bacterias con mutaciones que les impiden entrar a la etapa de esporulación (*spo0A*) lo que sugiere que el mecanismo de expresión de este tipo de genes, aunque no está caracterizado, es un mecanismo independiente de la esporulación de la bacteria (Ibrahim et al., 2010; Deng Et al., 2014).

Una vez transcritos, la estructura de los RNA mensajeros juega un papel muy importante en la producción masiva de las proteínas Cry. Éstos tienen una región conservada en el extremo 3', la cual contiene secuencias repetidas invertidas que ayudan a formar estructuras tipo asa o *loop* y protegen al mRNA de las exonucleasas. Esto contribuye a que la vida media del mRNA alcance los 10 minutos lo cual, comparado con

los 2-3 minutos en *E. coli*, favorece la síntesis de proteínas por un tiempo más prolongado (Deng et al., 2014).

A nivel proteína, la regulación se da gracias al mecanismo de cristalización que tienen las proteínas Cry. Este mecanismo de cristalización ayuda a proteger a las proteínas de las proteasas, debido a que ambas se comienzan a producir en grandes cantidades durante la fase estacionaria. Algunas proteínas Cry logran cristalizar gracias a dominios de cristalización en el C-terminal. Sin embargo, algunas toxinas Cry no poseen estos dominios y requieren de otras proteínas accesorias/chaperonas (como ORFs asociados a los genes, P19 y P20), ubicadas en el mismo operón que la proteína Cry. Estas proteínas actúan de distinta forma, algunas emulan el dominio de cristalización del C-terminal, mientras que otras actúan como andamio para formar la estructura del cristal (Deng et al., 2014).

I.4. Mecanismo de acción de las toxinas Cry

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha estudiado con mayor énfasis en insectos lepidópteros, específicamente en el insecto *Manduca sexta*.

Se ha propuesto que una vez que la toxina Cry1Ab es activada, interacciona por medio del *loop* 3 del dominio II y la cadena β -16 del dominio III con los receptores APN y ALP, respectivamente. Estos receptores son proteínas muy abundantes que se encuentran en balsas lipídicas anclados a la membrana por el lípido glucosil-fosfatidil-inositol (GPI) y presentan baja afinidad con la toxina ($K_d = 100\text{-}267$ nM). Sin embargo, al ser proteínas abundantes, esta interacción ayuda a concentrar la toxina sobre la membrana plasmática y facilitar la interacción con el receptor caderina. La interacción toxina-caderina es más compleja y se da a través de los *loops* 2, 3 y alfa-8 del dominio II, con epítopes localizados en los ectodominios CR7, CR11 y CR12 de la caderina. La caderina induce cambios conformacionales en la toxina que inducen a la formación de un oligómero (Pacheco et al., 2020; Bravo, et al., 2011; Pardo-López et al., 2012). Se propone que tres o cuatro monómeros de toxina conforman esta estructura oligomérica, que interactúa con los receptores APN y ALP con una afinidad mayor que en su forma de monómero ($K_d = 0.5$ nM). Esta interacción es necesaria para inducir la inserción del oligómero en la membrana, y así formar poros que causan la lisis celular (Fig. 3). Las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba producidas por *Bt* subsp. *israelensis*, son toxinas estructuralmente muy parecidas a la toxina Cry1Ab, y ésta última es la toxina mejor caracterizada con la que se ha establecido el mecanismo

de acción en lepidópteros. Debido a esta similitud estructural, y a que en dípteros también se ha encontrado que APN, ALP y caderina participan como receptores, se propone que estas toxinas tienen un mecanismo de acción similar (Bravo et al., 2007).

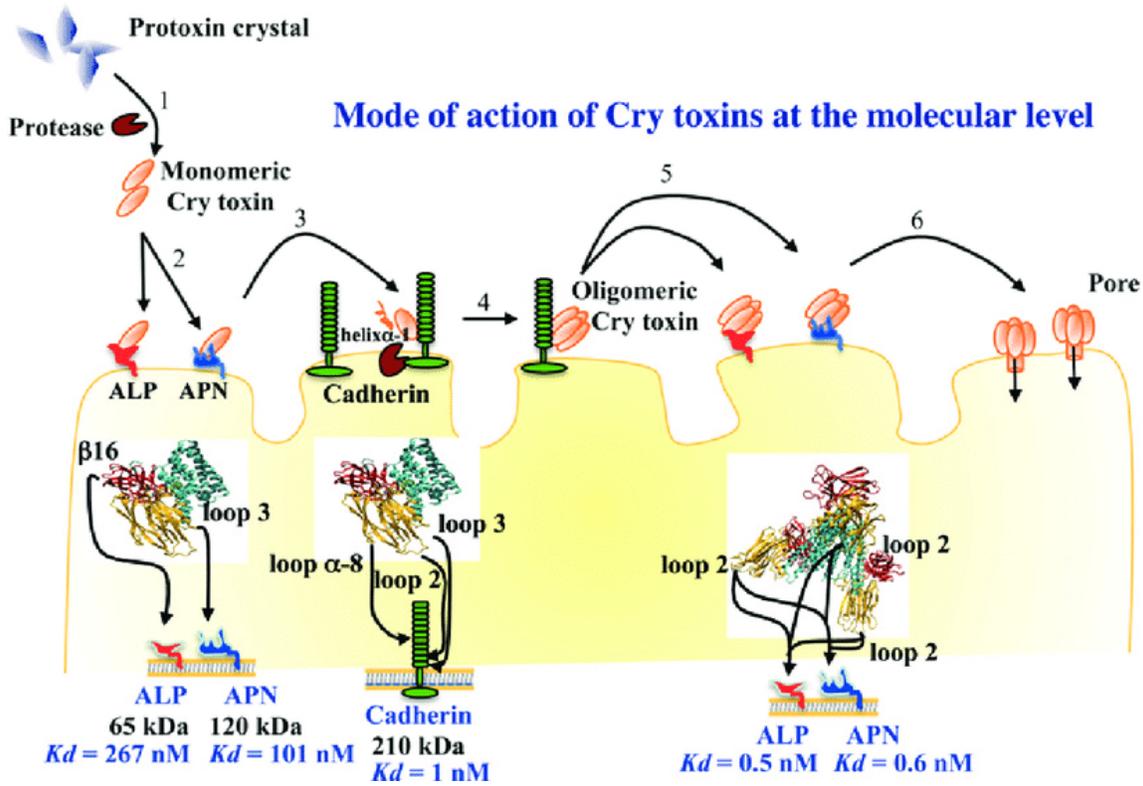


Figura 3. Mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab en lepidópteros. Imagen tomada de Pardo-López et al., 2021.

La familia de toxinas Cry incluye una variedad muy amplia de proteínas, y existen algunas toxinas que presentan diferencias en su mecanismo de acción. Un ejemplo es la dependencia por el receptor caderina para la formación del oligómero en toxinas que matan dípteros. Se ha observado que la toxina Cry11Aa necesita interactuar con este receptor para inducir su oligomerización, mientras que la toxina Cry4Ba forma el complejo espontáneamente después de ser activada (Rodríguez- Almazan et al., 2012). Sin embargo, es muy probable que la interacción con un receptor como APN o ALP, sea fundamental para llevar a cabo la inserción del pre-poro de ambas toxinas. El silenciamiento de la expresión con dsRNA de estos receptores en el lepidóptero *M. sexta* causa resistencia a toxinas Cry1A's, lo cual indica que ambos receptores son importantes en el mecanismo de

acción y se propone que pudieran tener una función redundante (Flores-Escobar et al., 2013).

I.5. Factores que afectan el mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las toxinas Cry contiene múltiples pasos, lo cual implica que el bloqueo o alteración de éstos podría afectar su toxicidad. Los insectos pueden desarrollar varios mecanismos para alterar el mecanismo de acción y así generar resistencia. Con el objetivo de identificar mecanismos de resistencia, se han estudiado poblaciones resistentes a las toxinas Cry. Dicha resistencia se ha generado en el laboratorio, donde se pueden analizar varias generaciones con condiciones controladas, o bien en el campo, donde las condiciones naturales pueden incluir factores que no son reproducibles en un laboratorio, pero provoca el desarrollo de resistencia de otras formas (Jisha et al., 2013).

Existen múltiples estudios (la mayoría en Lepidópteros) en los cuales se ha encontrado distintos mecanismos evolutivos para alterar el mecanismo de acción y así desarrollar resistencia. Uno de ellos es una alteración en la activación de la protoxina, en una población de *Plodia interpunctella* se observaron bajos niveles de proteasas tipo tripsina en el intestino, lo cual provocó una deficiente activación de la toxina Cry1Ac (Oppert et al., 1997). Por otra parte, se reportó un caso opuesto, en el que un incremento en la actividad de proteasas del intestino medio en *Plutella littoralis* confiere resistencia a la toxina Cry1C debido a su degradación proteolítica (Keller et al., 1996).

Otras alteraciones involucran la interrupción de la interacción toxina-receptor, en algunos casos debido a que se afecta la expresión de dichos receptores. Un ejemplo es la generación de mutaciones en el gen del receptor caderina de *Heliothis virescens*, como resultado se tiene la expresión de una caderina incompleta que no interactúa con la toxina Cry1Ac (Gahan et al., 2001). De manera similar, se observó una delección en el gen *apn1* de *Helicoverpa armigera*, lo cual le otorgó resistencia a la toxina Cry1Ac (Zhang et al., 2009). En cuanto a mALP, existe evidencia de que poblaciones de *H. virescens*, *H. armigera* y *S. frugiperda* presentan resistencia a toxinas de la familia Cry1, interesantemente todas las poblaciones mostraron una reducción en la expresión de este receptor (Jurat-Fuentes et al., 2011). Por otra parte, se ha encontrado que la familia de genes de los transportadores ABC (ATP Binding Cassettes) están involucrados en la resistencia de *H. virescens* (entre

otras especies de lepidópteros) a la toxina Cry1Ac, encontrando alelos mutantes del transportador ABCC2. Esto sugiere que estos transportadores están involucrados de alguna forma en el mecanismo de acción de las toxinas Cry (Gahan et al., 2010).

II. ANTECEDENTES

II.1. Receptores APN1 y mALP

Algunas toxinas formadoras de poros producidas por bacterias utilizan las balsas lipídicas para insertarse en la membrana, y éstas regiones están enriquecidas con proteínas ancladas a la membrana por GPI. Ensayos de unión con vesículas de membrana de microvellosidades (BBMV) aisladas del mosquito *A. aegypti*, han permitido identificar que las proteínas APN y ALP son receptores de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba. Además, se ha encontrado que estas proteínas se localizan en las células de la parte posterior del intestino en larvas de *A. aegypti*, coincidiendo con la localización de las toxinas Cry después de su ingesta por la larva (Dechklar et al., 2011; Fernandez et al. 2006; Likitvivatanavong et al., 2011).

Una de las proteínas que funciona como receptor es la mALP, la cual tiene un peso molecular de 65 kDa. Las proteínas ALP forman un grupo de isoenzimas que tienen como función hidrolizar monoésteres de ácido fosfórico y, en presencia de abundantes receptores de fosfatos, pueden catalizar reacciones de transfosforilación. Estas enzimas están ampliamente distribuidas desde procariontes hasta eucariontes superiores, teniendo distintas características muy conservadas, tales como la región que comprende el sitio activo y la fuerte dependencia por los iones Mg^{2+} y Zn^{2+} , que al unirse al sitio activo de la enzima permite que esta realice su función. En células eucariotas como en el caso de los dípteros, las ALP presentan una distribución específica de tejido con transporte de membrana en células epiteliales, túbulos de Malpighi, hemolinfa y glándulas salivales (Han et al., 2021; Millán, 2006).

Una de las primeras estructuras de ALP fue de *Escherichia coli* (ECALP), y tiempo después se resolvieron distintas estructuras de ALP de mamíferos, entre ellas la ALP presente en placenta humana (PLALP). Estas estructuras muestran una proteína homodimérica, cuya principal similitud es un núcleo central formado por una lámina beta extendida flanqueada por alfa- hélices, la cual muestra que los residuos esenciales para la catálisis están conservados entre las ALP de ambas especies. Además, el residuo Serina en el sitio activo está conservado en todas las ALP secuenciadas, sin importar la especie. Sin embargo, esta región del sitio catalítico es la única conservada, ya que los residuos que rodean el sitio activo entre ECALP y PLALP es del 8% (Millán, 2006).

Generalmente las ALP de insectos están más relacionadas filogenéticamente a la de humano (~42% de identidad) que a la de *E. coli* (~28% de identidad). A pesar de esta similitud, una de las principales diferencias entre la ALP humana e insectos, es que en estos últimos la proteína se encuentra en una forma monomérica, a diferencia del homodímero comúnmente observado en las de humano (Eguchi, 1995).

En insectos es común encontrar ALP en células epiteliales del intestino medio, específicamente en las microvellosidades de células columnares. Las ALP se pueden clasificar como solubles (sALP) o unidas a membrana (mALP). Sin embargo, solo las mALP se localizan en la región de las microvellosidades del intestino medio y posterior, a diferencia de las sALP que se encuentran exclusivamente en la región apical del intestino medio. Además, tienen actividades enzimáticas diferentes, lo que podría indicar que su función *in vivo* es distinta (Dechklar et al., 2011). Likitvivatanavong et al. (2011) realizaron un análisis filogenético y clasificaron las ALP de 3 especies de mosquitos (*A. aegypti*, *Anopheles gambiae* y *Culex pipens*) en 7 familias (ALP1-ALP7).

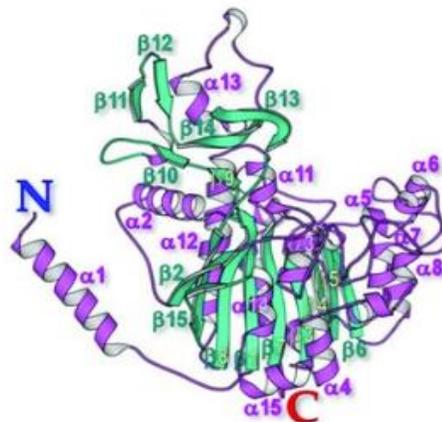


Figura 4. Modelo estructural de mALP de *A. aegypti*. Imagen tomada de Thammasittirong et al., 2021.

Por otra parte, las APN son proteínas de la familia de ectopeptidasas, y son abundantes en las microvellosidades del intestino medio en larvas de distintos insectos. Estas proteínas de membrana funcionan como metaloproteasas para la degradación de péptidos desde su extremo N-terminal provenientes de la dieta del insecto, acción necesaria para el transporte de aminoácidos hacia las células epiteliales. Las proteínas del tipo APN suelen tener una secuencia consenso de unión a Zn^{+2} , HEXXH-(X18)-E. Además, las APN

contienen una secuencia GAMEN en su sitio activo (Aroonkesorn et al., 2015). La estructura de las APN de *A. aegypti* aún es desconocida. Sin embargo, las estructuras de APN en otras especies, como *E. coli* e incluso en humanos, contienen 4 dominios, de los cuales el dominio II es el más conservado, mientras que el dominio IV es el más variable (Aroonkesorn et al., 2015). Las APN tienen diferentes modificaciones post-traduccionales, como la N- y O-glicosilación, lo que les confiere pesos moleculares entre 90-170 kDa, en contraste con pesos de alrededor de 100 kDa en la predicción de algunas secuencias previas a la glicosilación. Las APN tienen un péptido señal en su secuencia primaria que dirige al polipéptido hacia la membrana de la célula, en donde permanece anclada por un GPI (Adang, 2004; Likitvivatanavong et al., 2011). El análisis filogenético de las 3 especies de mosquitos mencionadas anteriormente, permitió clasificar a las APN en 8 familias (APN1-APN8) (Likitvivatanavong et al., 2011).

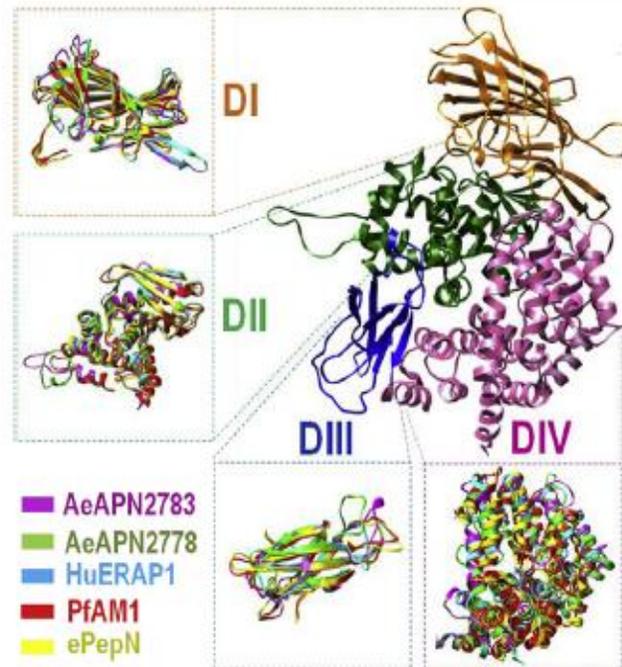


Figura 5. Modelado de APN (AAEL012783) de *A. aegypti*. En la imagen se pueden observar los 4 dominios estructurales en colores distintos y un alineamiento estructural con APNs de Humano (HuERAP1), *P. falciparum* (PfAM1) y *E. coli* (ePepN). Imagen tomada de Aroonkesorn et al., 2015.

II.2. Relevancia de mALP (AAEL015070) y APN1 (AAEL012783) en la susceptibilidad de *Aedes aegypti* a las toxinas Cry

Múltiples estudios han propuesto que las proteínas ALP y APN son receptores para diferentes toxinas Cry. Arenas et al. (2010) demostraron que ambas proteínas son clave para la inserción de la toxina Cry1Ab en células del epitelio intestinal del insecto *M. sexta*. Tres años después Flores-Escobar et al. (2013) realizaron un silenciamiento de la expresión de ambas proteínas por RNA de interferencia en larvas de *M. sexta* y encontraron una disminución importante en la mortalidad de las larvas cuando se retaron contra diferentes toxinas Cry1. Además, Flores-Escobar et al. (2013) propusieron que ALP y APN1 pueden tener una función redundante en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A.

Debido a que las diferentes toxinas Cry tienen una estructura similar, se propone que los ortólogos de APN y ALP en *A. aegypti* pueden funcionar como receptores importantes en el mecanismo de acción de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa, las cuales son específicas para este mosquito. Las proteínas ALP y APN están presentes en balsas lipídicas de las células epiteliales provenientes del intestino medio de *A. aegypti*. Estudios de proteómica, en los cuales se separaron y analizaron las proteínas localizadas en balsas lipídicas de *A. aegypti*, se encontraron varias proteínas, incluyendo a mALP y APN1. Además, se demostró que estas balsas lipídicas muestran unión con la toxina Cry4Ba (Bayyareddy et al., 2012). Ensayos de *ligand-blot* y *pulldown* usando a la toxina Cry11Aa como “carnada” y posterior análisis proteómico, han mostrado que Cry11Aa es capaz de unirse a ambos receptores en células del intestino medio en *A. aegypti* (Fernández et al., 2006; Likitvivanavong et al., 2011).

Decklar et al. (2011) encontraron un ortólogo del receptor mALP de *B. mori* en el genoma de *A. aegypti*, el cual clonaron y expresaron en una línea celular de *S. frugiperda* (Sf9). La línea celular obtenida fue sometida a pruebas de actividad enzimática para demostrar que la mALP tenía actividad y posteriormente fue retada contra la toxina Cry4Ba. El resultado de este estudio demostró que la presencia de la mALP de *A. aegypti* en la línea celular es suficiente para conferir susceptibilidad a la toxina Cry4Ba.

Por otra parte, las isoformas de las proteínas APN1 y APN2 de *A. aegypti* son capaces de unir a la toxina Cry11Aa, y de éstas dos sólo la proteína APN1 se expresa en la parte posterior del intestino medio de las larvas, en donde las toxinas Cry llevan a cabo su actividad citolítica (Aroonkerson et al., 2015).

Aroonkerson et al. (2015) identificaron dos isoformas de APN1 de *A. aegypti* (APN2778 y APN2783) y las expresaron en una línea celular de *S. frugiperda* (*Sf9*). Esta línea celular se retó con la toxina Cry4Ba y se encontró que ambas APN colocalizaron con la toxina Cry4Ba. Además, la expresión de ambas APN confirió susceptibilidad a la toxina Cry4Ba. Sin embargo, un estudio reciente en el que se hizo el *knockout* de APN1 (AAEL012778) y APN2 (AAEEL008155) por medio del sistema CRISPR-Cas9 en el mosquito *A. aegypti* mostró que estas dos isoformas no tuvieron un efecto considerable en la susceptibilidad del mosquito contra las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba (Wang et al., 2021). Por otro lado, en otro estudio, se hizo el silenciamiento de dos isoformas de APN1 (AAEL012778 y AAEL012783) por RNA de interferencia (iRNA) en larvas de *A. aegypti*. Estos experimentos tuvieron como resultado poblaciones de mosquitos que generaron cierto nivel de resistentes a la toxina Cry4Ba, y el silenciamiento de AAEL012783 presentó una resistencia aproximadamente dos veces mayor que la observada con AAEL012778 (Saengwiman et al. 2011), sugiriendo que AAEL012783 podría ser más importante en el mecanismo de acción.

En conjunto estos trabajos sugieren que mALP y APN1 pueden ser receptores importantes para el mecanismo de acción de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba en el mosquito *A. aegypti*. Una de las preguntas que nos hemos planteado sobre el mecanismo de acción de las toxinas Cry es ¿Por qué se requieren múltiples receptores para modular la actividad de las toxinas? Dado que estudios *in vitro* han propuesto que los receptores APN y ALP tienen un papel fundamental en los eventos iniciales (concentrar a la toxina sobre la membrana) y finales (favorecer la inserción del oligómero) del mecanismo de acción, en este proyecto nos enfocaremos en estudiar su papel funcional como receptores utilizando un enfoque *in vivo*.

II.3. Biología de *Aedes aegypti*

El mosquito *A. aegypti* es el principal vector del dengue, además de ser vector de otras enfermedades como fiebre amarilla, chikunguya y Zika, razones por la que está catalogado como el animal más letal del mundo según la OMS (Hillary et al., 2020). Este mosquito es extremadamente sinantrópico gracias a su naturaleza antropofílica, además de sus necesidades específicas de reproducción. Condiciones ambientales como temperatura, humedad y lluvia favorecen su abundancia en regiones neotropicales. Su distribución global está limitada a estos factores, por ejemplo, temperaturas menores a los

10°C limitan el desarrollo de la larva y la supervivencia del adulto, siendo las temperaturas óptimas de desarrollo de 22-32°C. Temperaturas cercanas a los 32°C disminuyen el tiempo de oviposición y aumentan el rango de supervivencia (Marinho et al., 2016).

El ciclo de vida del mosquito comprende básicamente de 4 etapas: huevo, larva, pupa y adulto. A una temperatura de 25°C el desarrollo del huevo a adulto puede completarse en poco más de una semana. La hembra, una vez que se apareó y alimentó de sangre, busca agua fresca para ovipositar. Los huevos tienen una peculiar forma ovalada y alargada, y miden en promedio 1 milímetro de longitud (Hillary et al., 2020). Los sitios naturales de oviposición incluyen agujeros en árboles, rocas huecas y cáscara de fruta. Sin embargo, recipientes artificiales como tanques, jarrones, neumáticos y latas funcionan como sitio de oviposición. En condiciones desfavorables como la falta de humedad o bajas temperaturas provocan que el embrión entre en un estado de quiescencia, en el que pueden permanecer durante algunos meses hasta encontrar las condiciones favorables para su desarrollo. La larva y la pupa que suceden al embrión son estrictamente acuáticas y omnívoras, se alimentan de materia orgánica y microorganismos presente en el agua, la cual incluye protozoos, bacterias, levaduras y algas (OECD, 2018). La larva tiene 4 estadios, los cuales se distinguen el uno del otro ya que el anterior tiene un tamaño menor, por lo que, al alcanzar un tamaño determinado para pasar al siguiente estadio, hay una muda de piel. En total este proceso dura de 5 a 7 días y termina cuando la larva alcanza el cuarto estadio desarrolla y se diferencia a la forma de pupa. La pupa es móvil pero ya no se alimenta y el periodo que tarda en pasar de pupa al adulto puede durar de 2-4 días. Una vez que emerge, el adulto vuela a un lugar seco y las siguientes 24 horas posteriores a la eclosión sirven para el endurecimiento del exoesqueleto y la maduración sexual. La esperanza de vida es de 3-6 días para los machos y de 10-35 días para las hembras. Sin embargo, es altamente dependiente de las condiciones climáticas en especial de la temperatura (OECD, 2018). Las hembras de *A. aegypti* suelen ser de un tamaño mayor al macho y tienen una probóscide en forma de aguja, a diferencia del macho cuya probóscide tiene una especie de ramificaciones. Además, las antenas del macho son más “plumosas” que en las hembras (Fig. 6) (National Environment Agency, 2020).

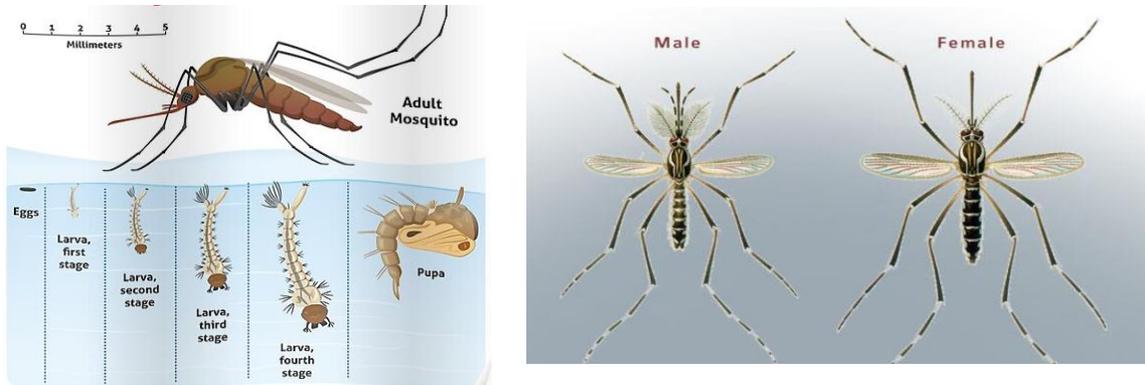


Figura 6. Morfología de *A. aegypti*. A la izquierda se muestran las distintas etapas de vida del mosquito desde el huevo hasta adulto y a la derecha una representación del macho y la hembra donde se pueden apreciar las principales diferencias morfológicas. Imágenes tomadas iStock, 2016 y Mckenney D. y M. Mckenney, 2023.

El mosquito puede aparearse después de 2-3 días de eclosionar. Primero, la hembra debe alimentarse con sangre para asegurar el desarrollo de los huevos. Estas se ven atraídas por animales hospederos gracias a la humedad, ácido láctico, dióxido de carbono y calor corporal. Las hembras cuentan con una probóscide compuesta de 6 agujas que actúan por pares: las primeras 2 funcionan como dientes, el segundo par como pinzas y del último par funciona como manguera e inyecta químicos que ayudan a favorecer el flujo sanguíneo y la otra succiona la sangre (Hillary et al., 2020). Las hembras usan la vibración del movimiento de sus alas en el vuelo para atraer al macho y aparearse. Durante el apareamiento, el macho sujeta la punta del abdomen de la hembra usando la terminalia e inserta el edeago en la cámara genital de la hembra y se comienza a llenar la bolsa genital de espermatozoides, que pasará a la espermateca en 1-2 minutos. Este proceso de apareamiento generalmente solo se da una vez gracias a que una sola inseminación es suficiente para fertilizar todos los huevos que la hembra producirá a lo largo de su vida (OECD, 2018).

II.4. CRISPR-Cas9 como herramienta de edición génica

El sistema CRISPR (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*) junto con proteínas Cas (*CRISPR associated sequences*) es usado por muchos organismos

procariotas para defenderse de virus, plásmidos y otros tipos de DNA invasivo. El sistema CRISPR-Cas funciona como “memoria inmunológica”, ya que corta e introduce secuencias de DNA provenientes de agentes infecciosos al genoma del hospedero; de esta forma cada vez que el hospedero sea invadido por el mismo agente infeccioso utilizará las secuencias de DNA adquiridas para reconocerlo e identificarlo como peligroso y degradar su DNA (Thurtle-Schmidt & Lo, 2018).

La primera etapa de la inmunidad otorgada por CRISPR-Cas se da cuando se integran secuencias cortas de DNA extraño en el locus CRISPR de la bacteria o arquea. La integración se da en un loci específico que se caracteriza por tener repeticiones no continuas que flanquean secuencias cortas integradas llamados espaciadores. La transcripción de los espaciadores tiene como resultado un RNA (llamado crRNA por CRISPR RNA) el cual forma un complejo con endonucleasas Cas. Este crRNA guiará a la nucleasa hacia el DNA extraño y lo degradará. La forma de generar el crRNA y las distintas Cas que se utilizan han hecho posible clasificar a los sistemas CRISPR-Cas en tipo I, tipo II y tipo III (Thurtle-Schmidt & Lo, 2018).

El tipo más usado para edición génica debido a su simplicidad y a que solo hace uso de una nucleasa, la Cas9, es el tipo II. El crRNA en realidad primero forma parte de un RNA muy largo que contiene varias secuencias cortas, cada una flanqueada por las repeticiones mencionadas anteriormente (pre-crRNA), se hace uso de otro RNA transcrito de un locus corriente arriba del locus CRISPR, cuya función es la transactivación del pre-crRNA (tracrRNA). El tracrRNA hibrida con la región de repeticiones características del locus CRISPR y forma un RNA de doble cadena con el pre-crRNA, el cual es identificado y cortado por la RNasIII, formando un complejo tracrRNA-crRNA el cual ya solo contiene una secuencia espaciadora. Este complejo se une entonces a la Cas9, lo cual la activa y permite la degradación del DNA extraño. La búsqueda de la región del DNA extraño que hibrida con el crRNA comienza cuando la Cas9 se une al DNA extraño en una región específica denominada PAM (Proto-spacer Adjacent Motifs). La secuencia PAM difiere entre las diferentes endonucleasas Cas de cada especie de bacterias o arqueas, siendo la más utilizada la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (*Sp*) cuya secuencia PAM es 5´-NGG-3´. Dos residuos de Arginina de esta Cas9 (R3133 y R1335) interactúan con las guaninas de la secuencia PAM permitiendo desenrollar la hebra de DNA, si el DNA es complementario al crRNA, ambos hibridan, se forma un *loop* R y la Cas9 realiza un corte. Cas9 tiene 2 dominios que se encargan de realizar el corte de la doble hélice de DNA, el dominio HNH

corta la hebra que hibrida con el crRNA y el dominio RuvC-like corta la hebra complementaria. El corte se hace 3 pares de bases (pb) río arriba de la secuencia PAM, lo que resulta en su degradación por otros mecanismos bacterianos (Thurtle-Schmidt & Lo, 2018).

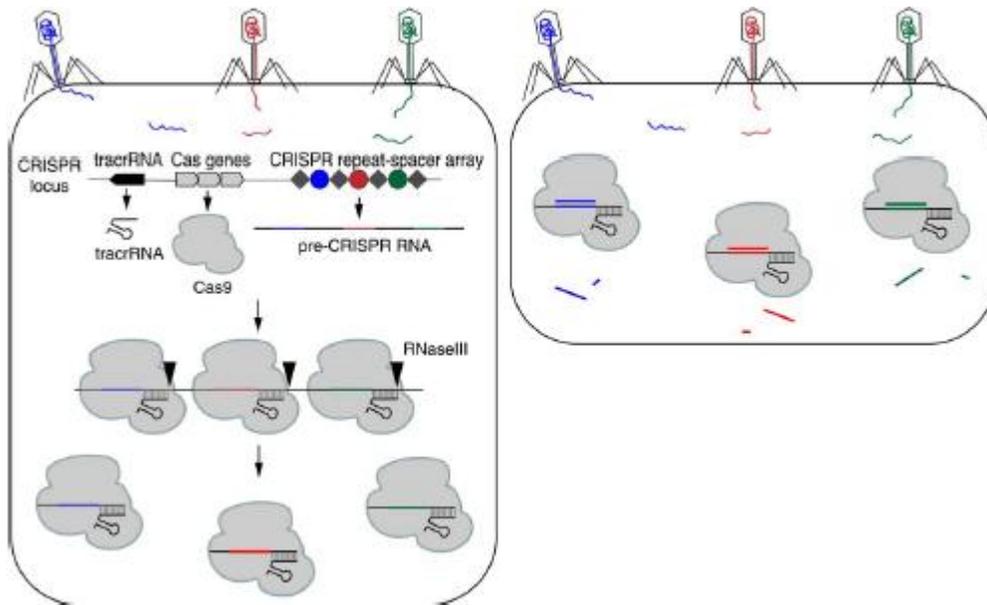


Figura 7. Mecanismo de defensa CRISPR-Cas9 bacteriano contra fagos. Del lado izquierdo se muestra el proceso de formación del complejo de RNA-Cas9 resultado de una primera infección de fagos y del lado derecho se representa la defensa contra una segunda infección de fagos. Imagen tomada de Turtle-Schmidt & Lo, 2018.

En los últimos años CRISPR-Cas9 se ha usado como una herramienta de edición génica que ha permitido generar mosquitos genéticamente modificados, gracias a que el corte en la doble hélice de DNA activa la maquinaria de reparación celular y en este proceso se generan mutaciones. Existen dos mecanismos de reparación: la reparación por unión de extremos no homóloga (NHEJ) y reparación dirigida por homología (HDR) (Kistler et al., 2015; Thurtle-Schmidt & Lo, 2018). Esta técnica hace uso de un RNA guía sencillo (sgRNA) que contiene una región complementaria al DNA blanco, la cual debe ser adyacente a una secuencia PAM. En paralelo a la hibridación sgRNA-DNA, se acopla la endonucleasa Cas9 por el reconocimiento al sgRNA por una segunda región denominada tracrRNA. Las Cas9 entonces identifica la zona de corte en el DNA blanco y finalmente los mecanismos de reparación celular de DNA provocarán inserciones o deleciones de nucleótidos, trayendo como resultado mutaciones que interrumpen el marco de lectura del RNA mensajero (Jiang, F. and J. Doudna, 2017; Thurtle-Schmidt & Lo, 2018). El diseño de los sgRNAs es de particular importancia en el empleo de esta técnica. Estos RNAs deben ser muy específicos

para hibridar sólo con la región dentro del genoma que se desea editar y así evitar efectos de cortes inespecíficos u “*off-targets*”. Además, la estructura secundaria del sgRNA debe asistir de forma correcta a los cambios conformacionales de la Cas9 que le permiten interactuar y cortar de forma correcta el DNA del organismo (Hillary et al., 2020). En este trabajo utilizamos esta técnica para hacer un *knock-out* de *apn1* y *m-alp* en *A. aegypti* y elucidar su rol en el mecanismo de acción de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba.

III. HIPÓTESIS

Las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa utilizan los receptores APN1 y mALP de manera redundante para causar toxicidad en el mosquito *A. aegypti*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar la función *in vivo* de los receptores APN1 y mALP de *A. aegypti* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba en una colonia de mosquitos genéticamente modificados deficientes en la expresión de estos dos receptores.

V. METAS PARTICULARES

- 1) Generar mosquitos de *A. aegypti* deficientes en la expresión de APN1 y mALP.
- 2) Determinar si las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba tienen preferencia por utilizar APN1 o mALP como receptores.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 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 inocularon por estría confluyente cuatro placas de medio HCT con eritromicina a 10 µg/mL y se incubaron a 30°C hasta la esporulación (48-72 h). Para monitorear la esporulación se hicieron observaciones en microscopio óptico. El cultivo fue recuperado y suspendido en 25 mL de solución amortiguadora de lavado (300 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH= 8) y centrifugado a 10,000 rpm por 5 min, este procedimiento se repitió dos veces. La pastilla resultante fue resuspendida y lavada en 30 mL de una solución con 1 mM de PMSF, seguido de una centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos, este paso se repitió dos ocasiones más. El *pellet* se resuspendió en PMSF 1 mM y la suspensión espora/cristal se almacenó a 4°C. La producción de Cry11Aa y Cry4Ba se analizó por SDS-PAGE al 10%.

VI.2 Diseño y síntesis del sgRNA

En la base de datos www.vectorbase.com se hizo una búsqueda de los genes de los receptores APN1 (AAEL012783) y mALP (AAEL015070). Dicha búsqueda proporcionó información de la estructura de cada gen (número de exones, número de intrones, transcritos reportados) y la secuencia de ambos genes. Se tomó una región de la secuencia (entre 110 y 300 pb) correspondiente al primer exón de cada gen para generar una serie de RNAs guía (sgRNAs) usando el servidor CRISPOR (www.crispor.tefor.net) (Ingreso en febrero del 2021), el cual ubicó las secuencias PAM (NGG) de Cas9 de *S. pyogenes* presentes en la secuencia de DNA. Se seleccionaron 2 sgRNAs con mejor *score* y con una separación entre ellos de aproximadamente 100 pb para cada receptor.

El servidor CRISPOR generó la secuencia de 2 oligonucleótidos sobrelapantes, uno de ellos contiene la región que hibrida con el gen (20 pb) y el otro tiene la región TRACR, este último es común para todos los sgRNAs generados. Los oligonucleótidos se sintetizaron en la unidad de síntesis del IBT-UNAM, se ensamblaron mediante una PCR y

se purificaron con el kit *MiniElute PCR* (Quiagen). Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%) en amortiguador TAE a 120 volts (V) durante 20 min. Los sgRNA se sintetizaron usando el producto de la PCR como templado para una reacción de transcripción in vitro usando el kit *TranscriptAid T7 High Yield* (Thermo Scientific), la reacción se llevó a cabo a 37°C por 2 horas. Los sgRNA se purificaron con el kit *RNA Clean and Concentrator* (Zymo Research) y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%) en amortiguador TAE a 120 V durante 30 min. Los sgRNAs se almacenaron a -70°C.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos sobrelapantes para generar los sgRNAs.

sgRN A	Secuencia (5' → 3')
58 APN1	GAAATTAATACGACTCACTATAGGAAGATTCTGTCGCTCTAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
144 APN1	GAAATTAATACGACTCACTATA TTGTCAGTTCTACGTTGTACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
23 mALP	GAAATTAATACGACTCACTATAGACTTTGTATCGGTCTCGCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
124 mALP	GAAATTAATACGACTCACTATAGCCTGCTGGTTCCAATAGCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
Comú n	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTTAAGTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

VI.3 Amplificación de un fragmento de los genes *apn1* y *m-alp*

Se extrajo y purificó el DNA genómico de larvas de *A. aegypti* de 4º instar de desarrollo con el kit *Quick-DNA Miniprep Plus* (Zymo Research). Se usaron 4 larvas (25 mg aproximadamente), y el tejido fue disgregado con un homogeneizador. La solubilización del tejido para la extracción se realizó a 55°C durante 1 hr en presencia de Proteinasa-K.

Usando la secuencia de DNA de los receptores APN1 (AAEL012783) y mALP (AAEL015070) se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR una región del primer exón de ambos receptores que contiene la zona de hibridación de los sgRNA. Los oligonucleótidos se seleccionaron bajo el criterio de tener una Tm de 55-60°C, y que además terminaran con guanina o citosina en el extremo 3'. Mediante una PCR usando como templado el DNA genómico y los oligonucleótidos diseñados, se amplificó un fragmento de *apn1* de 1388 pb y uno de *m-alp* de 1599 pb. Los productos de PCR se

purificaron y analizaron como se describió previamente. Finalmente, los fragmentos se cuantificaron usando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se almacenaron a -20 °C.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación de los fragmentos de *apn1* y *m-alp*.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
<i>apn1</i>	-1 Kb APN1 F	CAGAGTGATTTCGTTTCTCTCGC
	-0.3 Kb APN1 R	CGTTATCGGTACGGAGCTCTC
<i>m-alp</i>	-1 Kb mALP F	GCAGCACGGTACTATCTGTGC
	-0.3 Kb mALP R	CTCTGGGCCTCGACAGTTAAG

VI.4 Expresión de Cas9

Se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pMJ806, el cual contiene un gen de resistencia a kanamicina y un gen para expresar la *SpCas9* fusionado a una etiqueta de histidinas y la proteína de unión a maltosa (MBP) en el extremo N-terminal (6His-MBP-*SpCas9*). Se tomó una colonia de *E. coli* pMJ806 para inocular 10 ml de medio LB-Kanamicina (30 ug/ml). El pre-inóculo se incubó por 12 horas a 37°C con agitación constante de 200 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente se inocularon 250 ml de medio TB-Kanamicina (30 ug/ml) con el pre-inóculo (10 ml) *E. coli* pMJ806. Se incubó a 37°C con agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6. Se indujo la expresión de Cas9 adicionando IPTG a una concentración final 0.5 mM y se incubó a 18°C durante 12 horas con agitación constante (200 rpm). Las células se recuperaron centrifugando a 10,000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 20 ml de una solución de resuspensión (HEPES 20 mM, KCl 150 mM, Imidazol 25 mM, Lisozima 1 mg/ml, pH 7.5).

VI.5 Purificación de Cas9

Se lisaron las células de *E. coli* pMJ806 usando una prensa de French. La lisis se hizo en 3 pasos de prensado a 1250 psi. La muestra se centrifugó a 50,000 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se recolectó el sobrenadante y la proteína Cas9 se purificó en dos pasos. El primer paso se realizó con una columna de Niquel-Agarosa HiTrap (GE Healthcare) en un cromatógrafo FPLC AKTA (Amersham Biosciences). Se hizo un

lavado con 20 ml de Solución A (HEPES 20 mM, KCl 150 mM, pH 7.5) a un flujo de 1 ml/min, la elución se hizo con un gradiente de Imidazol 0-500 mM (1 ml/min) recuperando fracciones de 1 ml, las cuales se analizaron por SDS-PAGE. Posteriormente el volumen recuperado en la elución se concentró (5000 rpm) usando un tubo Amicon Ultra 100 kDa (Millipore). Posteriormente se dializó en Solución A- Glicerol (10%) usando una membrana con un tamaño de poro de 12-14 kDa durante 12 hr. La cuantificación de esta proteína se realizó por el método de Bradford.

El segundo paso de purificación se realizó por una cromatografía de exclusión molecular. Con ayuda del FPLC se inyectó la proteína a una columna Superdex[®] 200. Se realizó la elución durante 60 min (0.5 ml/min) usando Solución A. Finalmente, la proteína Cas9 se concentró por centrifugación (5000 rpm) usando un filtro Amicon Ultra 100 kDa (Millipore) y se cuantificó por el método de Bradford. El producto final se almacenó a -70 °C.

VI.6 Prueba de digestión de DNA *in vitro*

Se hizo una mezcla de reacción en 30 uL, que contiene 1 uL de enzima Cas9 1 uM (New England BioLabs) y aproximadamente 3 uL de sgRNA (211 nM). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 75 ng del fragmento de DNA del gen *apn1* o *m-alp*. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas, analizando 10 uL de muestra después de la primera hora y 10 uL al final de la segunda. La reacción se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%) con amortiguador TAE a 120 v durante 30 minutos, usando como control negativo 75 ng del fragmento amplificado de cada receptor.

De acuerdo con la región de hibridación de cada sgRNA, en la Tabla 3 se muestra el tamaño de los fragmentos de DNA generados después de la digestión de los fragmentos de *apn1* y *m-alp*.

Tabla 3. Tamaño de los fragmentos de DNA esperadas después de la digestión *in vitro* de *apn1* y *m-alp*.

Fragmento de gen	sgRNA a probar	Tamaños esperados (pb)
<i>apn1</i> (1388 pb)	58	992 y 396

	144	1078 y 310
<i>m-<i>alp</i></i> (1599 pb)	23	998 y 601
	124	1102 y 497

VI.7 Capilares para microinyección

Capilares de Aluminosilicato (Sutter Instrument) fueron generados con el P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument), con los siguientes parámetros: Pressure=500; Heat=548; Pull= 60; Velocity=60; Delay= 60. Después se hizo un pulido y biselado del capilar usando un micropulidor EG-401 Micropipette Grinder (Narishige).

VI.8 Alineamiento de huevos de *A. aegypti*

Las hembras de *A. aegypti* fertilizadas de la colonia silvestre de nuestro insectario se alimentaron con sangre de bovino y se indujo la oviposición aislándolas en la oscuridad durante aproximadamente 1 hora. Los huevos se recuperaron y se mantuvieron húmedos mientras se alinearon sobre papel filtro con ayuda de un microscopio estereoscópico y pinzas. Usando cinta adhesiva doble cara los huevos se trasladaron del papel filtro a un portaobjetos con ayuda de un pincel. Por último, los huevos se cubrieron de aceite Halocarbon 700 (Sigma).

VI.9 Microinyección de huevos de *A. aegypti*

Los huevos fueron inyectados con una mezcla de 5 uM de Cas9 y 2.5 uM de cada uno de los dos sgRNA dependiendo del gen a editar (58/144 para *apn1* y 23/124 para *m-*alp**) usando la bomba de vacío PicoPump PV830 (World Precision Instruments) y bajo micromanipulación en el microscopio óptico (Jasinskiene et al., 2007). Los embriones se colocaron en una cámara durante 2 días, después de este tiempo los embriones se sumergieron en agua hasta su eclosión.

VI.10 Tratamiento post-inyección

Una vez que eclosionaron los embriones, las larvas se mantuvieron sumergidas en agua a una temperatura promedio de 25°C y se alimentaron con migajas de alimento para canino hasta alcanzar el estadio de pupa (una semana aproximadamente), la cual se aisló

dentro de un vaso de plástico cubierto con una red hasta alcanzar su etapa adulta (2-4 días). En paralelo con el desarrollo de las pupas de mosquitos microinyectados (G_0), se recolectaron pupas de mosquitos silvestres en placas de 24 pozos (una pupa por pozo). De esta forma se sincronizó la obtención de los mosquitos adultos de G_0 y los silvestres. Se tomaron de 2 a 3 machos o hembras para mezclarlos con el mosquito G_0 de sexo opuesto. Los mosquitos adultos fueron alimentados con miel de abeja diluida en agua al 5% durante 2 días. Después se alimentó a las hembras con sangre de bovino para permitir la oviposición.

VI.11 Genotipificación

Una vez obtenidos los huevos (G_1), producto de la cruce entre G_0 y los mosquitos silvestres, se sacrificaron los mosquitos G_0 , y posteriormente se extrajo el DNA genómico como se describió anteriormente. El DNA genómico de G_0 se usó como templado para amplificar por PCR el fragmento del gen de *apn1* o *m-alp*. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis y se recuperaron del gel de agarosa para su purificación. El DNA purificado se secuenció en la unidad de secuenciación del IBT, UNAM. En caso de encontrar una mutación se realizó el mismo procedimiento extrayendo el DNA genómico de 4 larvas de la primera generación (G_1).

VI.12 Bioensayos

Las larvas de cuarto estadio de la segunda generación (G_2) de la población de mosquitos mutante fueron trasladadas a vasos con 100 ml de agua con una concentración de 1000 ng/ml de toxina Cry4Ba o 500 ng/ml de toxina Cry11Aa. Después de 24 horas se determinó la mortalidad. Como control positivo se usaron larvas silvestres, las cuales fueron expuestas a la misma dosis de toxinas. Como control negativo se usaron larvas silvestres en agua.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Producción de espora/cristal de Cry4Ba y Cry11Aa.

Las toxinas Cry4BA y Cry11Aa fueron producidas en cepas de *Bt* que contienen un plásmido para su expresión individual. Se hicieron cultivos de estas cepas y se crecieron hasta alcanzar la esporulación. La biomasa se recuperó y las proteínas que se suspendieron a partir de la espora/cristal se analizaron por SDS-PAGE. La proteína Cry4Ba en su forma de protoxina posee una masa de 128 kDa, mientras que la proteína Cry11Aa pesa 72 kDa. En las muestras se encontraron las proteínas Cry4BA y Cry11Aa que fueron identificadas por su tamaño esperado e intensidad de las bandas (Figura 8).

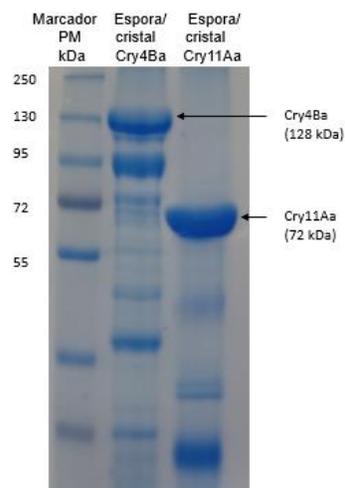


Figura 8. SDS-PAGE de suspensiones de espora/cristal de cultivos de *Bt* que expresan Cry4Ba o Cry11Aa. Gel de acrilamida al 10%.

VII.2. Valoración *in vitro* del diseño de sgRNAs para la edición de genes por CRISPR-Cas9.

VII.2.1 Síntesis de sgRNA.

El genoma del mosquito *A. aegypti* contiene 3 cromosomas somáticos y 1 cromosoma mitocondrial. Los genes *apn1* (AAEL012783) y *m-alp* (AAEL015070) están localizados en los cromosomas 1 y 2, respectivamente. La estructura del gen *apn1* tiene 4 exones y 3 intrones, mientras que *m-alp* tiene 7 exones y 6 intrones (Figura 9). De ambos genes se tomó la secuencia del primer exón para hacer una predicción de sgRNAs para su edición por el sistema CRISPR-Cas9 utilizando el servidor CRISPOR. De los sgRNA

candidatos se seleccionaron 2 sgRNAs para cada gen. Se siguieron dos criterios de selección: uno de ellos fue el *score* arrojado por el servidor CRISPOR, el cual está basado en un análisis de potenciales sitios de hibridación de los sgRNAs en el genoma de *A. aegypti*, penalizando a los sgRNA que sean capaces de hibridar en una región diferente al del gen seleccionado, a estos sitios se les conocen como “*off-targets*”. El segundo criterio de selección fue que existiera un espacio de aproximadamente 100 pb entre los sitios de hibridación de los sgRNA, esto con la finalidad de monitorear la edición de los genes por PCR identificando una delección de 100 pb. Para realizar la síntesis de los sgRNA, el servidor CRISPOR generó la secuencia de 2 oligonucleótidos superpuestos para cada uno de los 4 sgRNA, los cuales fueron nombrados como 58, 144, 23 y 124, siendo los primeros dos dirigidos hacia *apn1* y los dos últimos para *m-alp*. Se nombrará de esta forma a los sgRNAs en el escrito para conservar el sistema de nomenclatura que otorga CRISPOR.

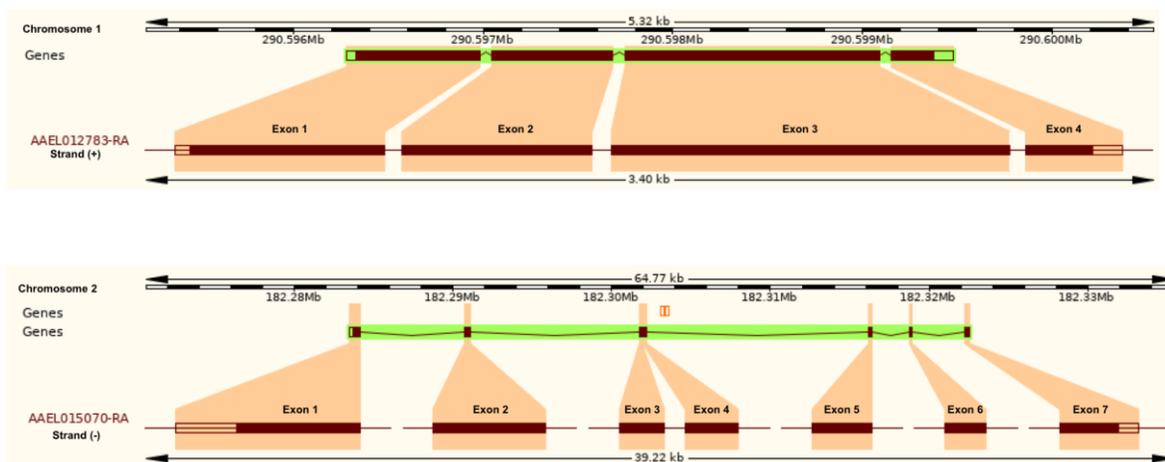


Figura 9. Representación esquemática de los genes *apn1* (AAEL012783) y *m-alp* (AAEL015070).

Para obtener los sgRNA se realizó una reacción de PCR de ensamble usando dos oligonucleótidos superpuestos: uno de ellos contiene la secuencia para el crRNA y el otro para el tracrRNA. Los productos de PCR se observan en el panel izquierdo de la figura 10, en la que se pueden observar fragmentos de DNA de 120 pb, lo cual coincide con la longitud esperada del fragmento ensamblado. Posteriormente dicho fragmento de DNA se utilizó como templado para realizar la síntesis del sgRNA por transcripción *in vitro*. En el panel derecho de la figura 10 se observa el gel en el que se analizaron los productos obtenidos de la transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa T7. Los RNAs sintetizados se pueden

observar en el gel de agarosa coincidentes con el marcador de peso molecular de RNA más pequeño, el cual es de 100 bases. Además, se observa que el tamaño de los RNAs de las 4 muestras analizadas es similar.

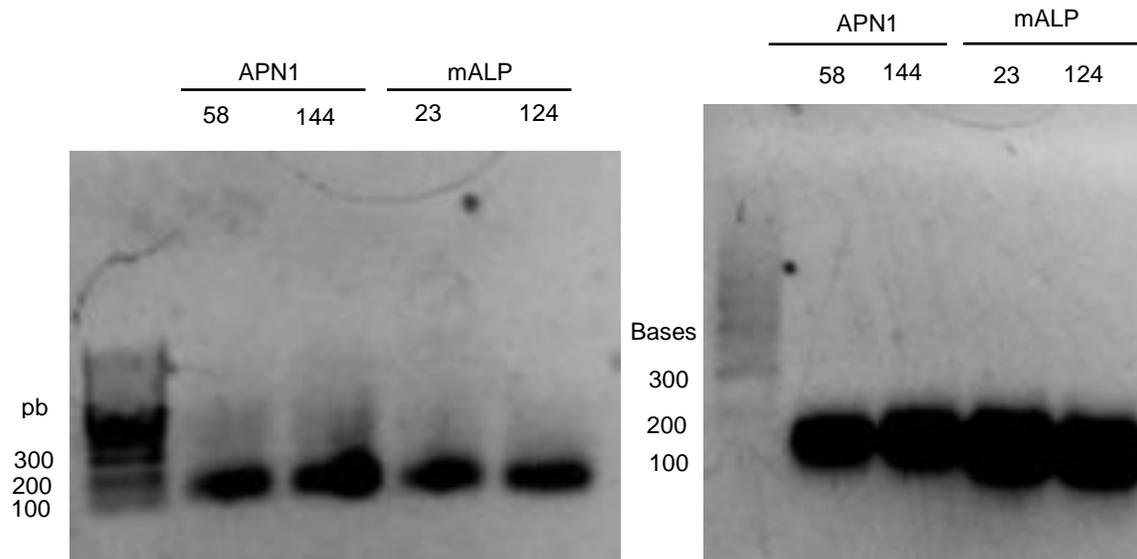


Figura 10. Análisis de los productos de PCR (izquierda) y de la transcripción in vitro (derecha) para la generación de los sgRNAs nombrados como 58 y 144 los dirigidos hacia el gen *apn1*, y 23 y 124 los dirigidos hacia el gen *m-alp*. Geles de agarosa al 1%.

VII.2.2 Producción de fragmentos de *apn1* y *m-alp*.

Por otra parte, se realizó una extracción de gDNA de *A. aegypti* y se utilizó como templado para amplificar por PCR un fragmento de los genes *apn1* y *m-alp*. En la figura 11 se observan los fragmentos de los genes de *apn1* y *m-alp* obtenidos por PCR, los cuales coinciden con el tamaño esperado cuando se comparan con el marcador de peso molecular. La amplificación de los fragmentos de *apn1* y *m-alp* corresponden a una región de aproximadamente 1400 y 1600 pb, respectivamente, del primer exón que contiene las zonas de hibridación para los sgRNAs generados.

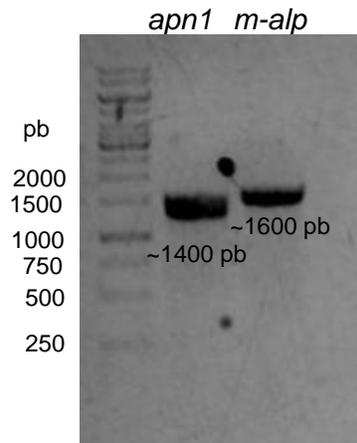


Figura 11. Amplificación de *apn1* y *m-alp*. Debajo de cada banda se indica el tamaño en pb esperado. Gel de agarosa al 1%.

VII.2.3 Purificación de Cas9.

La endonucleasa Cas9 se produjo de forma heteróloga a partir de cultivos de *E. coli* transformados con el plásmido pMJ806 que contiene el gen *cas9* fusionado a la proteína de unión a maltosa (MBP), además de una etiqueta 6-His, la cual nos permitió realizar una primera purificación por afinidad con el uso de una la columna de Níquel-Agarosa. Las fracciones que fueron recuperadas por la elución con Imidazol se analizaron por SDS-PAGE.

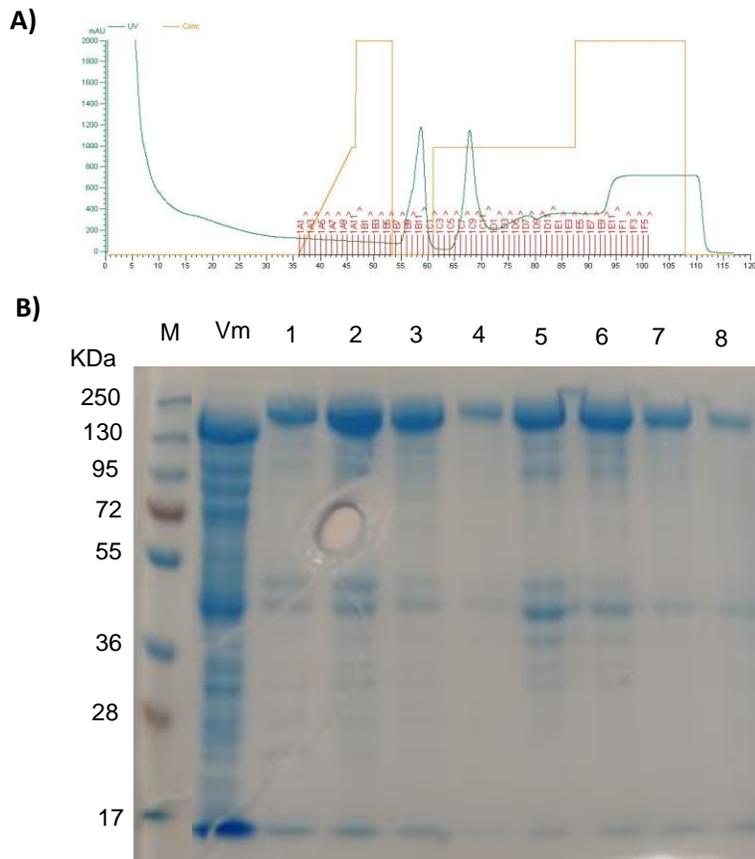


Figura 12. Purificación de Cas9 por cromatografía de afinidad. A) Cromatograma de la purificación de Cas9, el eje Y corresponde a la absorbancia a 280 nm y el eje X corresponde al paso del tiempo en minutos, la curva azul corresponde a la lectura de absorbancia y la curva naranja al gradiente de imidazol, siendo el imidazol 1 M el punto más alto. B) SDS-PAGE de las fracciones recuperadas en la cromatografía. Los carriles 1-8 corresponden a las eluciones de Cas9. M: Marcador de peso molecular. Vm: Volúmen muerto.

Como se puede observar en la figura 12-b la Cas9 contiene impurezas, por lo que se decidió realizar una segunda purificación por exclusión molecular. Durante esta purificación se obtuvieron dos fracciones mayoritarias que contienen a Cas9. El análisis por SDS-PAGE de dichas fracciones revelaron que la primera fracción que corresponde a la proteína de mayor peso molecular resultó ser la proteína Cas9 fusionada a MBP (MBP-Cas9), y la segunda fracción a la proteína Cas9 no fusionada, lo cual indica que la MBP fue proteolizada durante el proceso de producción/purificación (dato no mostrado).

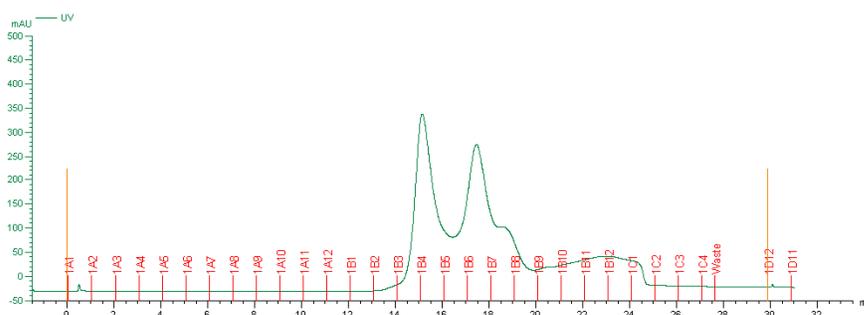


Figura 13. Purificación de Cas9 por cromatografía de exclusión molecular. El eje Y corresponde a la absorbancia a 280 nm y el eje X corresponde al paso del tiempo en minutos, la curva azul representa la lectura de la absorbancia y las líneas rojas numeradas representan las fracciones recuperadas.

El cromatograma mostró dos picos y se recuperó la primer fracción en salir de la columna, ya que los gels de acrilamida de la figura 12-b mostraron que la Cas9 era la proteína más grande presente en la muestra.

Tabla 4. Rendimiento del proceso de purificación de Cas9.

Etapas	Volumen inicial (ml)	Concentración inicial (g/L)	Volumen final (ml)	Concentración final (g/L)
Cromatografía de afinidad	20	N/C	16	N/C
Filtración	16	N/C	3	4.5
Diálisis	3	N/C	3	4.5
Cromatografía de exclusión molecular	3	4.5	2	N/C
Filtración	2	N/C	0.1	1.25

N/C= No cuantificado

VII.2.4 Prueba de digestión in vitro de los sgRNA.

Para valorar la funcionalidad de los sgRNAs de dirigir a la nucleasa Cas9 a la región específica del gen, se hizo una prueba de digestión *in vitro*. Esta prueba consistió en preparar el complejo Cas9-sgRNA e incubarlo con los fragmentos de los genes descritos anteriormente para permitir el corte de los mismos. Además, se agregó una tercera prueba en la cual se incubó el fragmento de *apn1* con los dos sgRNA dirigidos hacia este gen para observar la eficiencia del corte usando dos sgRNAs. En la figura 14 se puede observar que los fragmentos de DNA de *apn1* o *m-alp* fueron cortados cuando se trata la muestra con el complejo sgRNA-Cas9. Se observaron dos fragmentos de bajo peso molecular con respecto al fragmento inicial, cuyos tamaños corresponden a los esperados después de ser digeridos por Cas9 (Tabla 3), con excepción del fragmento de DNA con un tamaño de 88 pb, cuando la digestión se realizó con ambos sgRNA, el cual al ser demasiado pequeño no se pudo observar en el gel.

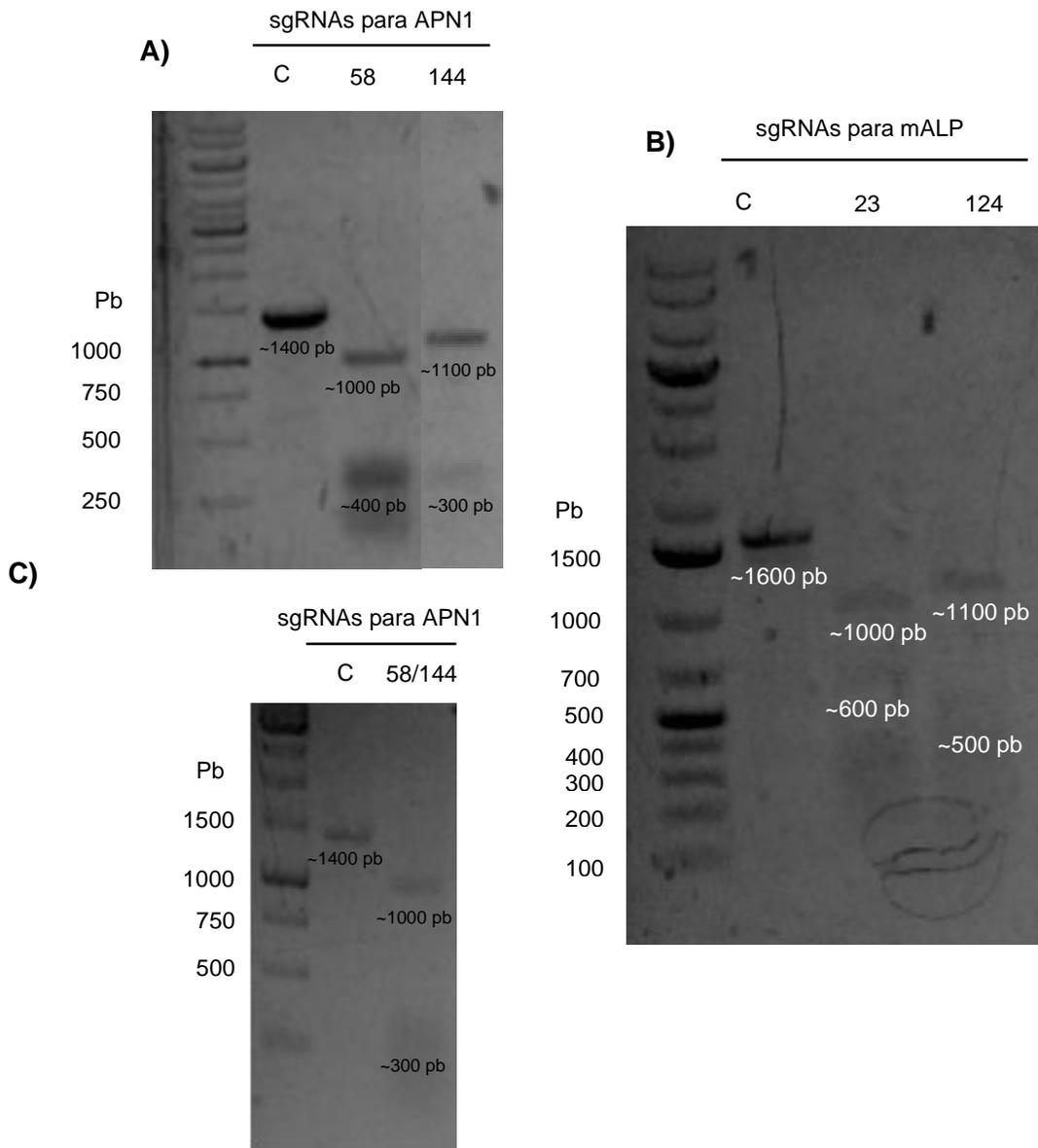


Figura 14. Prueba de digestión in vitro para valorar los sgRNAs. A) Prueba de digestión usando los sgRNAs 58 y 144 por separado, dirigidos hacia el fragmento de *apn1*. C: Control sin sgRNAs ni Cas9. B) Prueba de digestión usando los sgRNAs 23 y 124 por separado, dirigidos hacia el fragmento de *m-alp*. C: Control sin sgRNAs ni Cas9. C) Prueba de digestión usando los sgRNAs 58 y 144 juntos. C: Control sin sgRNAs ni Cas9. Geles de agarosa al 1%.

Antes de realizar la microinyección de huevo con la enzima Cas9 producida en nuestro laboratorio, se decidió realizar algunos controles para detectar algún punto crítico en el proceso de microinyección.

Tabla 5. Controles en el proceso de microinyección del huevo de *A. aegypti*.

Control	Número de huevos	Número de eclosiones	Tasa de eclosión (%)
Sin manipulación	63	50	79.3
Alineados y transferidos	100	8	8
Inyección con agua	100	0	0
Alineados y transferidos (sin presión por pincel)	92	30	32.6
Inyección con agua	76	6	7.9

Es importante mencionar que para mejorar la oviposición de las hembras de *A. aegypti* se evaluaron varios factores, las cuales incluyen: dieta con miel de abeja para alimentar los mosquitos adultos, alimentación de hembras de mosquito con sangre de bovino fresca, o con almacenamiento menor a un mes, e inducción de oviposición en un horario más cerca al anochecer (horario natural de oviposición). Estas acciones nos permitieron obtener una cantidad de huevos suficiente para realizar el proceso de microinyección, ya que la colonia de mosquitos de nuestro insectario atravesó un periodo en el que la tasa de oviposición fue muy baja. En este proceso se puede observar que los huevos ovipositados sin manipulación tienen una tasa de eclosión del 79.3%, lo que indica que naturalmente existe un 20% de embriones defectuosos que no logran eclosionar. Otro de los controles que se realizó fue el de manipular los huevos sin ser inyectados. En este paso observamos que el uso de un pincel para presionar los huevos y transferirlos del papel filtro al portaobjetos disminuye la tasa de eclosión de ~32 al 8% por lo que se consideró el punto crítico del proceso. Otro paso importante es la inyección, así que se inyectó agua estéril a los huevos montados en el portaobjetos con/sin el pincel. En este control se observó un 7.9% de eclosión con los huevos manipulados sin el pincel e inyectados con agua.

Con los datos obtenidos de los controles se decidió realizar la transferencia de los huevos sin el uso del pincel y se realizó un ajuste en el biselado para generar capilares de inyección más fino/filoso, y de esta manera ejercer el menor daño posible a los huevos al inyectarlos. Además, después de la inyección, los huevos se mantuvieron en un periodo de

24 horas en una cámara húmeda. También se decidió usar agua destilada para que exista un ambiente aséptico y evitar la infección de los huevos.

Pudimos observar que la manipulación de los huevos desde el alineamiento es fundamental, ya que en cada paso se pierde la posibilidad de lograr la eclosión de los embriones que podrían ser candidatos a tener una mutación. Naturalmente, no todos los huevos son viables, y sobre todo en el paso de transferencia de los huevos alineados al portaobjetos, lo cual daña seriamente a los huevos por la presión ejercida con el portaobjetos. Otro paso crítico resultó ser la microinyección, ya que la herida causada al huevo con el capilar parece tener un efecto de daño mecánico, pues observamos una disminución importante en la tasa de eclosión, aun cuando se hace la inyección con agua estéril. Esta observación nos condujo a generar capilares con un biselado que nos permitiera obtener una punta más fina y así disminuir el daño por la punción al huevo. La remoción del aceite mineral, con el que se cubren los huevos en el proceso de inyección, también fue determinante, ya que durante la incubación post-inyección contribuye en generar un ambiente favorable para reparar las capas externas del huevo, dañadas al momento de la inyección, y que sumado a la esterilidad impide el riesgo de infecciones y aumenta la posibilidad de eclosión de la larva.

VII.3.2 Microinyección de huevos de *A. aegypti* con el complejo Cas9-gRNA.

Los huevos recién depositados por las hembras de *A. aegypti* (1-2 hrs después de la oviposición), fueron colectados y alineados en un portaobjetos y se cubrieron con aceite mineral para hacer la microinyección del complejo Cas9-sgRNAs. Este es el paso más importante en el proceso de *knock-out* de los genes, debido a que la correcta inyección permitirá, no solo que la larva logre desarrollarse, sino que también puede determinar si la mutación es heredable. Al igual que en *Drosophila melanogaster*, durante el desarrollo del embrión de *A. aegypti*, las células que formarán la banda de células germinales se concentran en la parte dorsal o posterior del huevo y es completamente definida a las 9 horas después de la oviposición (Raminani and Cupp, 1975). Es por esto que, un correcto alineamiento de huevos orientados es fundamental para realizar con éxito la microinyección en el polo posterior. Como se muestra en la figura 15, los huevos se orientan con la parte posterior o dorsal hacia la punta del capilar. El polo posterior se puede identificar fácilmente por ser más delgado que el anterior. Otro aspecto por considerar es la presión con la que

se inyecta la solución que contiene el complejo Cas9-sgRNAs dentro del huevo. Este factor fue controlado con una bomba neumática (Pico Pump, PV830) para inyectar de 0.1-0.5 nL del complejo Cas9-gRNA, evitando así que el contenido interno del huevo saliera expulsado. En la figura 15 se puede observar que cuando se realiza la inyección se forma una gota frente al huevo: cuando el contenido del huevo es expulsado al exterior se puede observar una gota que tiene una apariencia turbia, en caso contrario se forma una gota cristalina, indicando que la presión de inyección es adecuada.

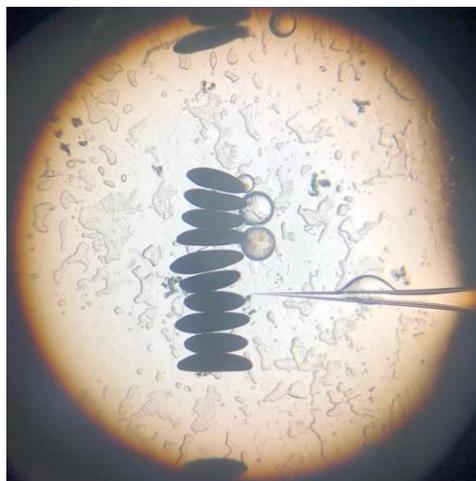


Figura 15. Microinyección de huevos de *A. aegypti*. Se puede observar la parte posterior (extremo más pequeño) orientado hacia el capilar. En la parte superior se observa una gota transparente que indicando que no se dañó el huevo, por el contrario, la gota turbia debajo indica que el contenido del huevo fue expulsado por la inyección.

Se inyectaron 1680 huevos con el complejo Cas9-sgRNAs del gen *apn1* y 2050 para el gen *m-alp* y se obtuvo un porcentaje de eclosión de larvas de 2.38% y 2.1%, respectivamente. La tasa de eclosión de embriones inyectados de *A. aegypti* en trabajos publicados varía entre el 5% y el 11% (Wang et al., 2021). Sin embargo, nuestros resultados muestran que tasa puede bajar hasta un ~2%. El porcentaje de eclosión de larvas depende enormemente del daño hecho al embrión durante la microinyección, por lo que es recomendado hacer las microinyecciones durante las 3 horas posteriores a la oviposición.

Tabla 6. Resumen de las microinyecciones realizadas.

sgRNAs inyectados	Gen diana	Número de embriones inyectados	Número de larvas obtenidas	Tasa de eclosión (%)	Número de mutantes	Tasa de mutación (%)

58/144	<i>apn1</i>	1680	40	2.38	1	2.5
23/124	<i>m-alp</i>	2050	43	2.1	2	4.65

Tabla 7. Mutaciones encontradas en G₁.

sgRNAs inyectados	Gen diana	Número de mutantes en G ₀	Número de mutantes en G ₁
58/144	<i>apn1</i>	1	1
23/124	<i>m-alp</i>	2	0

VII.4 Genotipificación de mosquitos para editar genéticamente a mALP.

Las larvas que eclosionaron después de la microinyección se desarrollaron hasta su etapa adulta (G₀) y se genotipificaron por secuenciación de DNA. Para esto se realizaron cruces de los mosquitos G₀ con silvestres, y así obtener la descendencia (G₁). Una vez que se obtuvieron huevos G₁, se sacrificaron los mosquitos G₀ para extraer y purificar el gDNA y posteriormente amplificar por PCR una región del gen *m-alp* que contiene el sitio de hibridación de los sgRNA. La secuenciación de dichos fragmentos reveló dos mosquitos que presentaron mutaciones (figura 16).

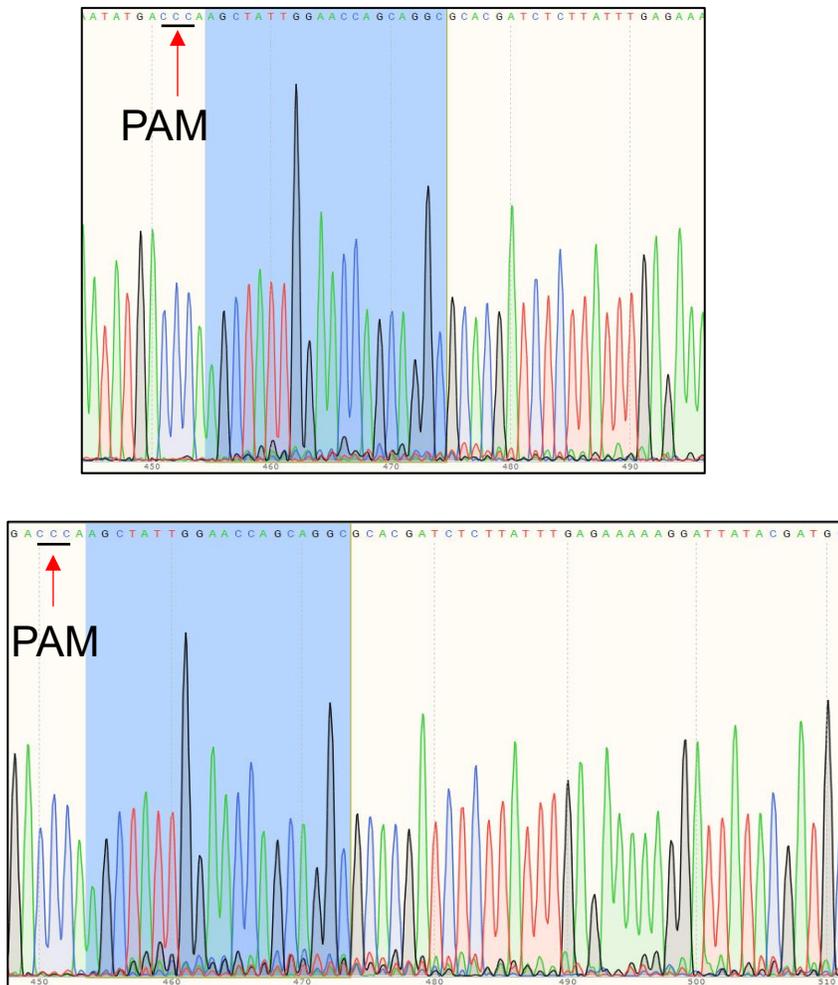


Figura 16. Secuenciación de dos mosquitos con mutación en el gen *m-alp*. Las flechas indican la posición de la secuencia PAM y la parte sombreada en azul indica la posición del sgRNA 124 para ambos casos.

En los cromatogramas de secuencias de DNA en la figura 16 se observa en la parte inferior un sobrelapamiento de picos a partir de aproximadamente 3 bases después la secuencia PAM en la región que corresponde al sgRNA 124. Este fenómeno se debe a que se generaron distintas mutaciones, lo cual es característico de mutaciones somáticas, lo cual es de esperarse en G_0 .

Una vez confirmadas las mutaciones en G_0 , se permitió el desarrollo de las larvas G_1 hasta el cuarto instar para extraer el DNA genómico, amplificar la región del gen *m-alp*

y secuenciarlo como se hizo anteriormente para G₀. Sin embargo, en los resultados no se encontraron mutaciones, indicando que de las mutaciones generadas en G₀ ninguna de ellas fue en células de la línea germinal, por lo que no se heredaron en G₁.

VII.5 Genotificación de mosquitos para editar genéticamente a APN1.

En el caso de los mosquitos candidatos para el *knock-out* de *apn1* no se genotificó G₀. Se decidió analizar directamente G₁ debido a que en ésta se pueden identificar mutaciones en la línea germinal. Se encontraron dos mutaciones puntuales en una de descendencias (G₁) analizadas.

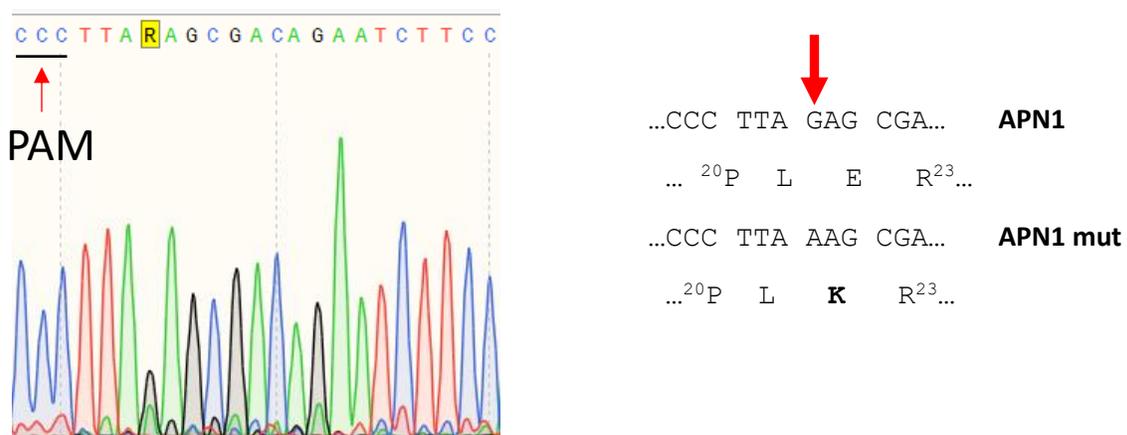


Figura 17. Mutación 1 para *apn1*. Al lado izquierdo se encuentra la secuenciación del fragmento de *apn1*, la flecha roja indica la posición de la secuencia PAM y el recuadro amarillo indica la posición del intercambio de base. Del lado derecho se muestra el cambio en la secuencia de DNA y de aminoácidos provocado por la mutación, la flecha roja indica la base intercambiada y los números la posición del aminoácido.

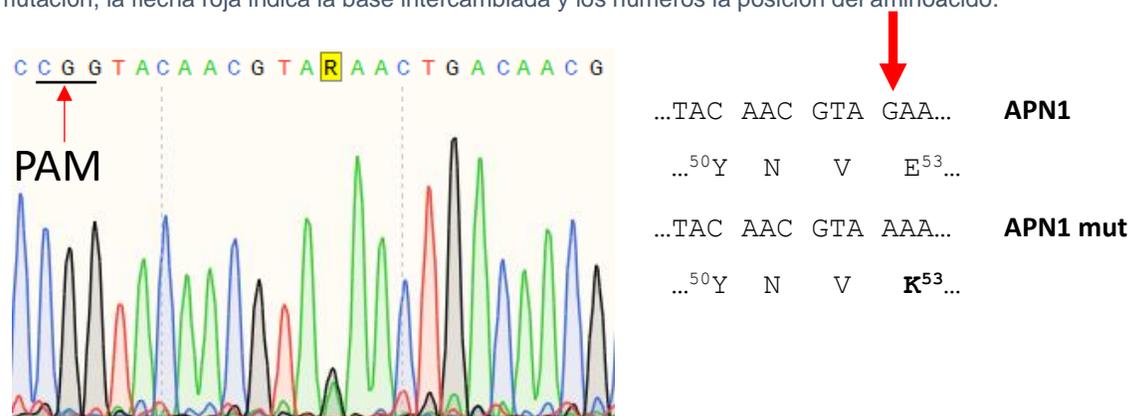


Figura 18. Mutación 2 para *apn1*. Al lado izquierdo se encuentra la secuenciación del fragmento de *apn1*, la flecha roja indica la posición de la secuencia PAM y el recuadro amarillo indica la posición del intercambio de base. Del lado derecho se muestra el cambio en la secuencia de DNA y de aminoácidos provocado por la mutación, la flecha roja indica la base intercambiada y los números la posición del aminoácido.

Las mutaciones se identificaron gracias al solapamiento de 2 picos en regiones adyacentes a la secuencia PAM dentro de la región de los sgRNAs 58 y 144. En ambos casos el pico corresponde a una mezcla de bases guanina (G) y adenina (A), de las cuales la base G corresponde al alelo silvestre. La mutación generada por el gRNA 58 se generó justo en el sitio de corte de la endonucleasa Cas9, tres bases después de la secuencia PAM, dando como resultado la mutación puntual E22K; por otra parte la mutación generada con el gRNA 144 se generó a una distancia de 9 bases después de la secuencia PAM. En esta última mutación, probablemente en el proceso de reparación celular de DNA tuvo como resultado la reparación del gen con las mismas bases que el DNA silvestre, con excepción de una G que fue intercambiada por A (Fig. 17 y 18) para dar como resultado la mutación E53K. A diferencia de las mutaciones encontradas en *m-alp*, las mutaciones en *apn1* se dieron en la línea germinal al ser encontradas en G₁.

VII.6 Bioensayos.

Debido a que las mutaciones generadas representan un cambio de carga en la cadena lateral de los aminoácidos en las posiciones 22 y 53 de APN1, se realizó un bioensayo con larvas del mosquito *A. aegypti* de la segunda generación (G₂) para analizar si dichas mutaciones tienen un efecto significativo en la susceptibilidad hacia las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba. La dosis letal 50 (LC₅₀) (concentración de toxina a la que muere la mitad de la población del organismo blanco) de las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa usadas por nuestro equipo de trabajo es de ~450 y ~230 ng/ml, respectivamente. Usamos estos datos para hacer un bioensayo con el doble de la LC₅₀ siendo esta una concentración suficiente para matar al 100% de las larvas (Pacheco et al., 2017; Perez et al., 2005).

Tabla 8. Mortalidad de la colonia G₂ mutante en APN1 contra las toxinas Cry4Ba y Cry11Aa.

<i>A. aegypti</i>	n	Toxina	% mortalidad
Población G ₂ de mutante en APN1	77	Cry4Ba (1000 ng/ml)	94.8
	53	Cry4Ba (1000 ng/ml)	92.45
	37	Cry4Ba (1000 ng/ml)	91.89
Población G ₂ de mutante en APN1	77	Cry11Aa (500 ng/ml)	79.22
	53	Cry11Aa (500 ng/ml)	54.71
	37	Cry11Aa (500 ng/ml)	78.37
Población silvestre	10	Cry4Ba (1000 ng/ml)	100

	10	Cry4Ba (1000 ng/ml)	100
	10	Cry4Ba (1000 ng/ml)	100
Población silvestre	10	Cry11Aa (500 ng/ml)	100
	10	Cry11Aa (500 ng/ml)	100
	10	Cry11Aa (500 ng/ml)	100
Wt	10	-	0

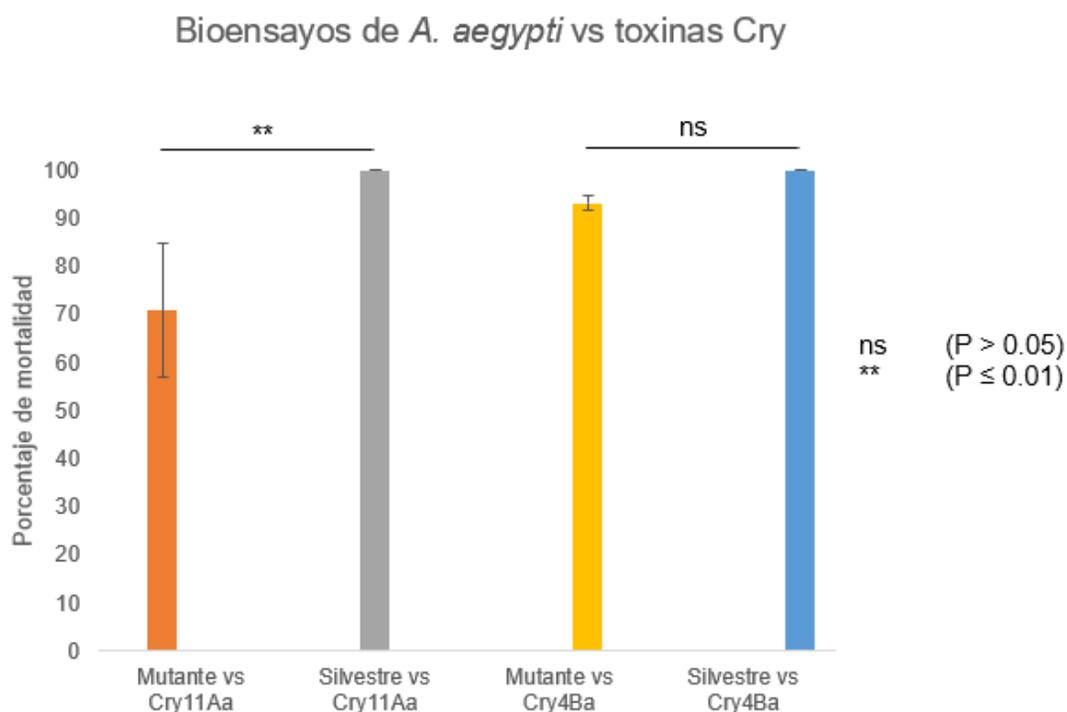


Figura 19. Resultado de los bioensayos realizados con las poblaciones mutantes en el gen *apn1* y las silvestres como control. Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía con el software Graph Prism para comprobar si hay una diferencia significativa entre la mortalidad de la colonia mutante vs Cry11Aa y su control, a diferencia de la colonia mutante vs Cry4Ba en donde según el análisis no hubo una diferencia significativa con el control.

Los resultados del bioensayo se muestran en la tabla 11 y Figura 19. La población de larvas de mosquitos con las mutaciones en APN1 presentaron una menor susceptibilidad hacia la toxina Cry11Aa (~70% de mortalidad) y no hacia la toxina Cry4Ba (~93% de mortalidad), indicando que las mutaciones E22K y E53K tuvieron un efecto notorio en la toxicidad de Cry11Aa. Los controles realizados con la población silvestre, la cual fue

expuestas a la misma concentración de toxina, mostraron un 100% de mortalidad. Como control negativo se utilizó la población silvestre sin toxina y presentó un 0% de mortalidad.

Debido a que G_2 es la descendencia de la población heterocigota mutante G_1 , teóricamente la presencia de individuos homocigotos mutantes es del 25%, siendo solo este porcentaje de larvas las que tendrían la capacidad de sobrevivir en caso de que la mutación interrumpa la interacción de APN1 con alguna de las toxinas. Esto coincide con los valores obtenidos para el caso de la toxina Cry11Aa, donde el ~20% de las larvas de mosquito sobrevivió. No obstante, para obtener datos sólidos es necesario obtener la población homocigota mutante y retarla contra estas toxinas para comprobar el fenotipo de resistencia. Existen estudios en los que se analizaron colonias de insectos como *S. exigua* y *H. virescens* resistentes a toxinas Cry, en los cuales se comparó la expresión de distintas proteínas presentes en el epitelio intestinal, región en donde se concentran mayoritariamente las toxinas Cry. En estos estudios se pudo observar una disminución importante en proteínas del tipo APN y ALP, por lo que se puede afirmar que en el caso de estos insectos la interacción de la toxina Cry con estos receptores era necesaria para causar toxicidad en el insecto (Herrero et al., 2005; Jurat-Fuentes et al. (2004). Estos experimentos sugieren que en diferentes especies de insectos las proteínas membranales del tipo ALP y APN funcionan como receptores de las toxinas Cry, lo cual puede indicar que en *A. aegypti* podrían tener una función importante como receptores. En este caso podría ocurrir que el 25% de los individuos con el receptor APN1 mutante impidan esta interacción toxina-receptor, logrando así la resistencia a la toxina Cry11Aa.

Se hizo un modelado estructural de la APN1 de *A. aegypti* en el servidor SwissModel para encontrar la región en donde ocurrieron las mutaciones (figura 20). Se generó un modelo por homología de la APN1 de *A. aegypti* tomando como templado la APN1 de *Anopheles gambiae*, siendo esta la estructura con el mayor porcentaje de homología que se encontró (41.39%). En el modelo obtenido se observa que el residuo E53 se encuentra en el dominio I en una región expuesta al solvente, el cual se encuentra orientado hacia el lado opuesto de la membrana celular, por lo que es posible que esté involucrado en la interacción con la toxina Cry11Aa específicamente. Aroonkesorn et al. (2015) proponen que el sitio de interacción de APN1 con la toxina Cry4Ba se encuentra en el dominio IV. Esta hipótesis se basó en que distintas especies de APN de lepidópteros el sitio de unión para las toxinas Cry se encuentra en el dominio IV. Sin embargo, este análisis se hizo

comparando la secuencia de aminoácidos entre APNs de dípteros y lepidópteros, pero no fueron comprobados experimentalmente.

Por otra parte, el residuo E22 en la APN1 de *A. aegypti* no se encontró en la estructura del modelo generado. Posiblemente dicho residuo forme parte del péptido señal de APN1 y es cortado en el proceso de síntesis/exportación (Aroonkesorn et al., 2015). Probablemente, la mutación E22K podría afectar la exportación de la proteína APN1 a la membrana celular y así afectar la interacción de la APN1 con la toxina Cry11Aa. Nuestros intentos por buscar fuentes bibliográficas sobre mutaciones en el péptido señal de APN1 y correlacionarlas con su producción fueron inútiles. Sin embargo, existen reportes en donde se hacen mutaciones en un solo aminoácido correspondiente a la péptido señal al precursor del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (pre-pro factor α). En 4/5 casos esta mutación sencilla alteró la traslocación de este precursor hacia el retículo endoplásmico (RE) en donde sufre modificaciones postraduccionales, como glicosilaciones para ser enviado hacia la membrana externa, el resultado es la acumulación de la proteína en el citoplasma (Allison & Young, 1989). Otro estudio en el precursor de la hormona paratiroidea (PPTH), demostró que un cambio de cisteína por arginina en el péptido señal impide la excreción celular de la hormona. Además, se encontró que PPTH fue retenida en RE, lo cual causaba toxicidad para las células que presentaban la mutación de PPTH (Datta et al., 2007). Estos datos los podemos extrapolar a nuestros resultados, en la mutación E22K de APN1 podría estar siendo retenida en RE o acumulada en el citoplasma. También se puede intuir que, al no poderse transportar hacia su destino final, la proteína esté siendo degradada en cualquiera de estos dos compartimientos celulares. Sin embargo, estas hipótesis deben comprobarse experimentalmente.

Estos datos en conjunto sugieren que el dominio I de la APN1 de *A. aegypti* contiene una región importante para la interacción con la toxina Cry11Aa. También sugieren que las toxinas Cry11Aa y Cry4Ba tienen sitios de unión diferentes, ya que no se encontró un cambio en la susceptibilidad de la población mutante cuando se retó a la toxina Cry4Ba. Como se mencionó anteriormente, el dominio de interacción de las APNs en lepidópteros es el dominio IV, lo cual podría ser compartido con la toxina Cry4Ba. Las mutaciones E22K y E53K en APN1 podrían estar truncando el mecanismo de acción de la toxina Cry11Aa, lo que sugiere que el receptor APN1 podría tener una función fundamental en dicho mecanismo. Esto podría indicar también que para esta toxina no hay redundancia funcional entre los receptores APN1 y mALP, a diferencia de la toxina Cry4Ba cuyo mecanismo de

acción podría implicar receptores diferentes a APN1, o incluso que existiera redundancia funcional entre APN1 y mALP de *A. aegypti*.

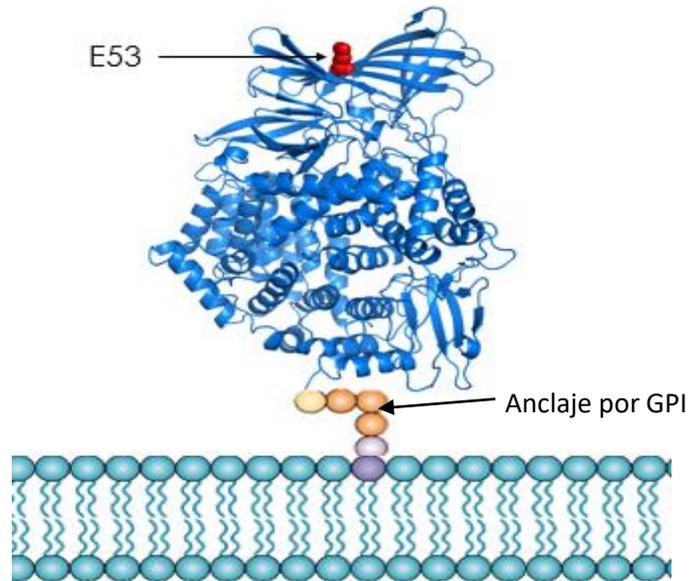


Figura 20. Modelo de APN1 de *A. aegypti*. En rojo se muestra el residuo E53. El modelo se construyó con el servidor SwissModel usando a la APN1 de *A. gambiae* como templado.

VIII. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se logró mejorar la oviposición de *A. aegypti* modificando varios factores nutricionales y ambientales. Además, mejorando la manipulación de los huevos para evitar su daño mecánico, logramos elevar la tasa de eclosión de embriones microinyectados con el complejo Cas9-gRNA.
2. Se generaron sgRNAs funcionales dirigidos al primer exón de los genes *m-alp* y *apn1* de *A. aegypti*, con los cuales se obtuvieron dos mosquitos con mutaciones somáticas en G_0 para el gen *m-alp* y una población heterocigota mutante G_1 con dos las mutaciones puntuales E22K y E53K en el gen *apn1*.
3. Se obtuvo una población G_2 a partir de la población heterocigota mutante G_1 , la cual presentó un fenotipo de resistencia hacia la toxina Cry11Aa y no hacia la toxina Cry4Ba. Estos datos nos permiten sugerir que los receptores APN1 y mALP no tienen una función redundante en el mecanismo de acción de la toxina Cry11Aa. Sin embargo, parece que si existe redundancia para la toxina Cry4Ba.
4. Aunque nuestros datos sugieren una redundancia funcional entre los receptores APN1 y mALP, es necesario analizar otras proteínas candidatas como receptores, las cuales están presentes en la membrana del intestino medio del insecto y se necesitan más estudios *in vivo* acerca de su participación en el mecanismo de acción.

IX. REFERENCIAS

- 1) Adang, M. (2004). 71 - Insect aminopeptidase N. En A. Barrett, N. Rawlings, J. Woessner (Ed.). *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 296-299. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-079611-3.50079-3>
- 2) Allison, D. S., and Young, E. T. (1989). Mutations in the signal sequence of prepro-alpha-factor inhibit both translocation into the endoplasmic reticulum and processing by signal peptidase in yeast cells. *Molecular and cellular biology*, 9 (11), 4977–4985. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.11.4977-4985.1989>
- 3) Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M. and Gómez, I. (2010). Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (17), 12497-503.
- 4) Aroonkesorn, A., Pootanakit, K., Katzenmeier, G., and Angsuthanasombat, C. (2015). Two specific membrane-bound aminopeptidase N isoforms from *Aedes aegypti* larvae serve as functional receptors for the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin implicating counterpart specificity. *Biochemical and biophysical research communications*, 461 (2), 300–306.
- 5) Bravo, A., Gill, G. and Soberón M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 49 (4), 423-435.
- 6) Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. and 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>
- 7) Bayyareddy, K., Zhu, X., Orlando, R. and Adang, MJ. (2012). Proteome analysis of Cry4Ba toxin-interacting *Aedes aegypti* lipid rafts using geLC-MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 11 (12), 5843-45.
- 8) Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. and Bonning, B. (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>.
- 9) Datta, R., Waheed, A., Shah, G. and Sly, W., (2007). Signal sequence mutation in autosomal dominant form of hypoparathyroidism induces apoptosis that is corrected by a chemical chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (50), 19989-19994.

- 10) Dechklar, M., Tiewisiri, K., Angsuthanasombat, C., and Pootanakit, K. (2011). Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3), 159–166.
- 11) Deng, C., Peng, Q., Song, F. and D. Lereclus. (2014). Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*, 6, 2194-2209. doi:10.3390/toxins6072194
- 12) Eguchi M. (1995). Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 111(2), 151–162. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)00248-s](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)00248-s)
- 13) Fernández, L., Aimanova, K., Gill, S., Bravo, A. and Soberón, M. (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal*, 394 (1), 77–84.
- 14) Flores-Escobar, B., Rodríguez-Magadan, H., Bravo, A., Soberón, M. and Gómez, I. (2013). Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ba and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4543-4550.
- 15) Gahan et al., 2001. Gahan LJ, Gould F and Heckel DG (2001) Identification of a gene associated with *Bt* resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293, 857–860.
- 16) Gahan LJ, Pauchet Y, Vogel H and Heckel DG. (2010). An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Public Library of Science Genet* 6: e1001248.
- 17) Guo, Z., Gong, L., Kang, S., Zhou, J., Sun, D., Qin, J., Guo, L., Zhu, L., Bai, Y., Bravo, A., Soberón, M. and Zhang, Y. (2020). Comprehensive analysis of Cry1Ac protoxin activation mediated by midgut proteases in susceptible and resistant *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163, 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.10.006>
- 18) Han, W.-H.; Zou, C., Qian, L.-X., Wang, C., Wang, X.-W., Liu, Y.-Q. and Wang, X.-R. (2021). Functional Analysis of Alkaline Phosphatase in Whitefly *Bemisia tabaci* (Middle East Asia Minor 1 and Mediterranean) on Different Host Plants. *Genes*, 12 (4), 497. <https://doi.org/10.3390/genes12040497>

- 19) Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P., Moar, W. and Maagd, R. (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6 (96). doi:10.1186/1471-2164-6-96.
- 20) Hillary, V., Ceasar, S. and Ignacimuthu, S. (2020). Genome Engineering in insects: focus on CRISPR-Cas9 system- Chapter 18. Academic Press, 219-249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818140-9.00018-0>.
- 21) Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., and Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered bugs*, 1 (1), 31–50. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>
- 22) iStock. (02 de febrero del 2016). Naturaleza, Aedes Aegypti Mosquito cigüeñuelas, la vida ciclo. <https://www.istockphoto.com/es/vector/naturaleza-aedes-aegypti-mosquito-cig%C3%BCe%C3%B1uelas-la-vida-ciclo-gm507689700-84681811>
- 23) Jasinskiene, N., Juhn, J. and James, A. (2007). Microinjection of *A. aegypti* embryos to obtain transgenic mosquitoes. *Journal of Visualized Experiments*, 1 (5), e219.
- 24) Jiang, F. and J. Doudna. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *The Annual Review of Biophysics*, 406, 505-29.
- 25) Jouzani, G., Valijanian, E., and R. Sharafi. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biothecnology*, 101, 2691-2711. DOI 10.1007/s00253-017-8175-y
- 26) Jurat-Fuentes, J. and Adang, M. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry*, 271(15), 3127-3135. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04238.x
- 27) Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning, C., Liu, C., Wu, K., Jackson, J., Gould, F., Blanco, C., Portilla, M., Perera, O., and Adang, M. (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Public Library of Science ONE* 6, e17606.
- 28) Keller M, Sneh B, Strizhov N, Prudovsky E, Regev A, Koncz C, Schell J and Zilberstein A. (1996). Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 365–373.
- 29) Kistler, K., Vosshall, L. and Matthews, B. (2015). Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Reports*, 11(1), 51-60.

- 30) Li, M., Bui, M., Yang, T., Bowman, C., White, B. and Akbari, O. (2017). Germline Cas9 expression yields highly efficient genome engineering in a major worldwide disease vector, *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114 (49), E10540-E10549. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1711538114
- 31) Likitvivatanavong, S., Chen, J., Evans, A., Bravo, A., Soberón, M., and Gill, S. (2011). Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (7), 2829–2838.
- 32) Lozano-Fuentes, S., Hayden, M., Welsh-Rodriguez, C., Ochoa-Martínez, C., Tapia-Santos, B., Kobylinski, K., Ueijo, C., Zielinski-Gutiérrez, E., Delle Monache, L., Monaghan, A., Steinhoff, D. and Einsen, L. (2012). The Dengue Virus Mosquito Vector *Aedes aegypti* at High Elevation in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87(5), 902–909.
- 33) Marinho, R., Beserra, E., Bezerra-Gusmão, M., Porto, V., Olinda, R. and dos Santos, C. (2016). Effects of temperature on the life cycle, expansion, and dispersion of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in three cities in Paraíba, Brazil. *Journal of Vector Ecology* 41(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/jvec.12187>
- 34) Mckenney D. and M. Mckenney. (14 de marzo del 2023). Why Mosquitoes Love to Bite Some People, and Not Others. <https://owlcation.com/stem/Why-Do-Mosquitoes-Love-to-Bite-Humans>
- 35) Melo, A., Soccol, V. and Soccol, C. (2014). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical reviews in biotechnology* 36(2), 317–326. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.960793>
- 36) Millán, J. (2006). Alkaline Phosphatases. *Purinergic Signalling* 2, 335. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-5435-6>
- 37) Moreno-Mateos, M., Fernandez, J., Rouet, R., Vejnar, C., Lane, M., Mis, E., Khokha, M., Doudna, J. and Giraldez, A., (2017). CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing. *Nature Communications* 8, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01836-2>
- 38) National Environment Agency. (16 de diciembre del 2020). Male mosquitos do not bite or transmit disease. <https://www.nea.gov.sg/corporate-functions/resources/research/wolbachia-aedes-mosquito-suppression-strategy/male-mosquitoes-do-not-bite>

- 39) OECD. (2018). Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment. *Organisation for Economic Co-operation and Development* (8), 50-53. <https://doi.org/10.1787/9789264302235-en>
- 40) Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D and McGaughey WH. (1997). Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Biological Chemistry* 272, 23473–23476.
- 41) Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazan, C., Gill, S., Bravo, A. and Soberón, M. (2009). Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping-pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors. *Journal of Biological Chemistry* 284 (47), 32750-32757.
- 42) Pacheco, S., Gómez, I., Sánchez, J., García-Gómez, B. I., Soberón, M., and 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>
- 43) Pacheco, S., Quiliche, J.P.J., Gomez, I., Sánchez, J., Soberón, M. and Bravo, A. (2020). Rearrangement of N-Terminal alpha-Helices of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin Essential for Oligomer Assembly and Toxicity. *Toxins (Basel)* 12 (10), 647.
- 44) Pardo-López, L., Soberón, M. and A. Bravo. (2012). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 3-22. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x
- 45) Pérez, C., Fernández, L., Sun, J., Folch, J., Gill, S., Soberón, M. and 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* 102(51), 18303-18308.
- 46) Raminani, L. and Cupp, E. (1975). Early Embryology of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 4, 517-528.
- 47) Rodríguez-Almazan, C., Reyes, E., Zuniga-Navarrete, F., Munoz-Garay, C., Gómez, I., Evans, A., Likitvivanavong, S., Bravo, A., Gill, S. and Soberón, M. (2012). Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal* 443 (3), 711-717.

- 48) Saengwiman, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetachewa, S., Angsuthanasombat, C. and Pootanakit, K. (2011). In vivo identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol-linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 407(4), 708-713. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.085>.
- 49) Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R., Capell, T. and Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9, 283-300. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x
- 50) Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D., and Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(3), 775–806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- 51) Thammasittirong, A., Thammasittirong, S., Imtong, C., Charoenjotivadhanakul, S., Sakdee, S., Li, H., Okonogi, S. and Angsuthanasombat, C. (2021). *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba Insecticidal Toxin Exploits Leu615 in Its C-Terminal Domain to Interact with a Target Receptor—*Aedes aegypti* Membrane-Bound Alkaline Phosphatase. *Toxins*, 13, 553. 10.3390/toxins13080553.
- 52) Thurtle-Schmidt, D. and Lo, T. (2018). Molecular Biology at the Cutting Edge: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 46(2), 195-205. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>
- 53) Wang, J., Yang, X., He, H., Chen, J., Liu, Y., Huang, W., Ou, L., Yang, Z., Guan, X., Zhang, L. and 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>
- 54) Xu, C., Wang, B., Ziniu, Y. and Sun, M. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins* 6 (9), 2732-2770.
- 55) Zhang S, Cheng H, Gao Y, Wang G, Liang G and Wu K. (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39, 421–429.