



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Identificación de los sitios de interacción de la toxina Vip3Aa con sus receptores en *Spodoptera frugiperda*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Oscar Alexei Infante Montaña

TUTOR PRINCIPAL

Mario Soberón Chávez

[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Enrique Rudiño Piñera

[Instituto de Biotecnología](#)

Ernesto Ortiz Suri

[Instituto de Biotecnología](#)

Cuernavaca. Agosto, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE
INTEGRIDAD Y HONESTIDAD
ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Identificación de los sitios de interacción de la toxina Vip3Aa con sus receptores en *Spodoptera frugiperda* que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, aceptó que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Infante Oscar

**Oscar Alexei Infante Montaña
No. cuenta: 314300700
(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)**

El presente proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Mario Soberón Chávez con el financiamiento de beca CONACYT 815628 y el financiamiento del donativo PAPIIT, DGAPA no IN-202718.

Dedicatoria:

Mamá, gracias por todo lo que hiciste, haces y harás por mi, esta tesis te la dedico a ti.

我还要把这篇论文献给我自己，奥斯卡，你过得不太好，但你总是领先，继续。

Agradecimientos:

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Soberón y a la Dra. Bravo. Muchas gracias por haberme acogido en su laboratorio hace ya varios años, por su constante apoyo a lo largo de todo este proyecto y por haberme ayudado a cumplir mi sueño de viajar a China.

Agradezco también al Dr. Xiao por permitirme visitar su laboratorio, y al Dr. Minhui por su invaluable ayuda y por facilitar mi estancia.

A mi comité, el Dr. Rudiño y el Dr. Ortiz, les agradezco profundamente por su ánimo, por escucharme y por sus valiosos consejos durante este proyecto.

A la UNAM, como institución, gracias por ofrecerme un espacio donde recibir una educación de calidad. A la UNAM como comunidad, deseo mencionar a Toño, Judith, Gloria del posgrado, a Iliana y a los uatis de la licenciatura, quienes me salvaron en múltiples ocasiones con los trámites.

Extiendo mi gratitud a todos en el lab 20; espero no olvidar a nadie: a Jorge, Blanca, Chelita, Liz, Xochitl, Jonathan, Dago, Don Toño, por asegurarse de que el laboratorio siempre estuviera en funcionamiento, su trabajo es impresionante y siempre estuvieron ahí para ayudarme y conversar conmigo. A Sabino, Ángel, Emiliano, Nathaly, Daphne, Mich, Adrián (Perú), Lucero, Vale, Rosi, y Luis, gracias por escuchar mis seminarios, por sus ideas, comentarios y por darme ánimo durante todo el proyecto.

Y de forma mucho más personal:

Mario, muchas gracias por estar siempre dispuesto a escucharme; valoro profundamente que hayas sido mi tutor.

Isa, gracias por enseñarme todo, por tu infinita paciencia, por dejarme desahogarme y por ayudarme a salir adelante.

A Samira, Alejandro y Alan, gracias por ser mis amigos más cercanos en el laboratorio.

A mis amigos de Torres: Diana, Cris, César, Ulises, Víctor, Mateo y Baloo, por estar siempre ahí.

A mis amigos en China: Alexander, Nimlin, Vigan, Shawn, Fernando y DanDan, por ayudarme a sobrevivir durante mi estancia en China.

A Dani, Georgie y Pau, que aunque nos veamos una vez al año, siempre están dispuestos a escucharme.

A ti, aunque ya no estés, gracias.

A mis amigos de toda la vida: Beto, Manu, Niño, David, Alex y Tibu. Ya llevamos 10 años juntos, y espero que sean muchos más.

A mis tíos: Gaby, Lalo y Sandra, por su constante apoyo y consejos en este camino.

Finalmente, a mi familia: abuelos, Feri, Lulu y especialmente a mi mamá, muchas gracias por todo. Sé que durante estos últimos años han hecho un gran esfuerzo para que yo pueda seguir mi camino. Gracias por quererme tal y como soy. Espero que estén orgullosos de mí. Los amo.

ÍNDICE

Dedicatoria:	4
Agradecimientos:	5
ÍNDICE	7
I. Abreviaturas	9
II. Resumen	10
III. Abstract	10
1. Introducción	12
1.1 Bacillus thuringiensis.....	12
1.2 Proteínas formadoras de poro producidas por Bt.....	13
1.2.1 Nomenclatura proteínas de Bt.....	14
1.3 Toxinas Cry.....	15
1.4 Toxinas de la fase vegetativa Bacillus.....	16
1.5 Vip3A.....	17
1.6 Carrera armamentística.....	20
1.7 Spodoptera frugiperda.....	21
2 Antecedentes	23
2.1 Mecanismo de acción de toxina Vip3A.....	23
2.1.1 Activación de la protoxina.....	23
2.1.2 Receptores de Vip3Aa.....	24
2.1.3 Efecto citotóxico.....	25
2.2 Aminoácidos relevantes.....	26
2.3 Sinergia entre toxinas Cry y toxinas Vip3A.....	27
3. Hipótesis	28
4. Objetivo	28
4.1 Objetivos específicos.....	28
5 Materiales y Métodos	29
5.1 Fragmentos de Vip3Aa11.....	29
5.1.1 Cepas y materiales.....	29
5.1.2 Inducción, expresión y purificación de los fragmentos.....	29
5.1.3 Purificación de BBMV.....	30
5.1.4 Análisis de ELISA.....	31
5.1.5 Análisis de residuos de aminoácidos expuestos al solvente en la Vip3Aa.....	32
5.1.6 Comparación estructural entre proteínas.....	33
5.2 Variantes de Vip3Aa11.....	33
5.2.1 Síntesis de oligos.....	33
5.2.2 Mutación sitio dirigida.....	34
5.2.3 Electro transformación en E. coli DH5-alfa.....	35
5.2.4 Químico transformación en E. coli BL21.....	35
5.2.5 Expresión de las variantes.....	36
5.2.6 Bioensayo.....	36
5.2.7 Ensayo de unión de mutantes de Vip3Aa11.....	37
5.2.8 Alineamiento múltiple de secuencias.....	37

6 Resultados.....	39
6.1 Expresión de los fragmentos del dominio III, IV y V.....	39
6.2 Ensayo de unión de los fragmentos a BBMV.....	40
6.3 Residuos de aminoácidos expuestos al solvente.....	41
6.4 Sitio de interacción.....	44
6.5 Variantes de Vip3Aa.....	45
6.6 Bioensayo.....	46
6.7 Proteólisis de las variantes.....	48
6.8 Ensayo de unión de las variantes a BBMV.....	49
6.9 Análisis de la conservación del sitio de interacción en la familia Vip3.....	50
7 Discusión.....	52
7.1 Unión del dominio III a BBMV.....	52
7.2 Residuos de aminoácidos expuestos en la toxina activada.....	53
7.3 Sitio de interacción en el dominio III.....	54
7.4 Sustituciones de aminoácidos en la proteína silvestre.....	55
7.5 Conservación del sitio de interacción en la familia Vip3A.....	55
7.6 Mecanismo de acción de Vip3Aa.....	56
8 Conclusiones.....	57
9 Referencias.....	59
10 Material suplementario.....	66

I. Abreviaturas

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Vip	Proteína Insecticida Vegetativa
APN	Aminopeptidasa-N
ALP	Alcalino fosfatasa
BBMV	Vesícula de la membrana del intestino medio
CBM	Módulo de Unión a Carbohidratos
PM	Membrana peritrófica
DE3	Cepa de <i>E. coli</i> BL21
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
LC₅₀	Concentración letal media
IPTG	Isopropil β-d-tiogalato piranosido
BSA	Seroalbúmina bovina
WT	Silvestre
Sf21	Línea celular 21 de <i>Spodoptera frugiperda</i>
Sf9	Línea celular 9 de <i>Spodoptera frugiperda</i>

II. Resumen

Bacillus thuringiensis (Bt) produce una variedad de proteínas formadoras de poros, entre las cuales se encuentra Vip3A, que tiene un potente efecto insecticida sobre plagas de lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda*, una de las principales plagas del maíz y otros cultivos. La protoxina Vip3Aa forma una estructura tetramérica, en la que cada monómero está compuesto por cinco dominios. Tras su activación, un corte proteolítico entre los dominios I y II provoca un cambio conformacional en el tetrámero, permitiendo su inserción en la membrana, la formación de un poro y, en última instancia, la muerte del insecto. Se ha propuesto que los dominios III, IV y V de Vip3Aa desempeñan un papel crucial en la interacción con los receptores presentes en la membrana del insecto.

A través de un análisis de residuos de aminoácidos expuestos al solvente y ensayos de unión con vesículas de la membrana del intestino medio (BBMV) de *S. frugiperda*, identificamos tres residuos de aminoácidos (K385, K526 y V529) que, tras la activación de la protoxina, se exponen al solvente y se agrupan, formando un sitio de interacción clave. Las variaciones en estos residuos eliminan la unión a las BBMVs de *S. frugiperda* y reducen significativamente la toxicidad hacia los neonatos de esta especie.

Este sitio de interacción se localiza en dos asas del dominio III, una de las cuales conecta de manera única los dominios III y IV, ambas asas están orientadas hacia la parte superior del dominio III. Nuestros resultados sugieren que el primer evento de unión ocurre a través de este sitio de interacción, lo que facilita que otras asas del dominio III interactúen con el receptor. La formación de este sitio de interacción es esencial para la unión al receptor, la inserción en la membrana y la subsecuente muerte del insecto.

Los hallazgos de este trabajo contribuyen a profundizar en el mecanismo de acción de Vip3Aa, ya que el estudio de los sitios de interacción es fundamental para ampliar nuestro conocimiento sobre esta toxina y podría permitir futuras modificaciones para mejorar su eficacia en el control de plagas.

III. Abstract

Bacillus thuringiensis (Bt) produces a range of pore-forming proteins, including Vip3A, which shows potent insecticidal effects against lepidopteran pests such as *Spodoptera frugiperda*, a major pest of maize and other crops. The Vip3Aa protoxin forms a tetrameric structure, with each monomer composed of five domains. After activation, a proteolytic cleavage between domains I and II induces a conformational change in the tetramer, allowing it to insert into the membrane, form a pore, and ultimately kill the insect. Domains III, IV, and V of Vip3Aa are thought to play a crucial role in receptor interactions on the insect's membrane.

Through solvent-accessible amino acid analysis and binding assays with brush border membrane vesicles (BBMV) from *S. frugiperda*, we identified three amino acid residues (K385, K526, and V529) that become exposed and cluster together following protoxin activation, forming a critical interaction site. Substitutions in these residues abolish binding to *S. frugiperda* BBMVs and significantly reduce toxicity toward *S. frugiperda* neonates.

This interaction site is located on two loops in domain III, one of which uniquely connects domains III and IV, and both loops are oriented to the top of domain III. Our findings suggest that initial binding occurs through this interaction site, facilitating subsequent interactions between other loops in domain III and the receptor. The formation of this site is essential for receptor binding, membrane insertion, and subsequent insect lethality.

This work advances our understanding of Vip3Aa's mechanism of action and provides insight into key interaction sites, paving the way for potential modifications to enhance its efficacy in pest control applications.

1. Introducción

Desde el inicio de la agricultura, el control de plagas ha sido un tema de vital importancia en la producción agrícola. Se estima que a nivel mundial se pierde entre el 50% y el 80% de la producción agrícola debido a las plagas de insectos ¹. Los pesticidas son moléculas utilizadas para matar o reducir las poblaciones de insectos evitando así pérdidas agrícolas. En las últimas décadas, el uso de pesticidas químicos ha aumentado. Esto ha provocado una gran contaminación ambiental e impactos negativos en la salud pública ¹⁻⁵. Se ha reportado que solo una pequeña cantidad del pesticida aplicado (menos del 0.1%) afecta al organismo objetivo, mientras que el resto contamina los suelos, cuerpos de agua y otros organismos cercanos a los cultivos ¹. El uso indiscriminado de pesticidas químicos ha llevado al desarrollo de resistencia en algunos insectos, lo que, a su vez, ha incrementado la aplicación de estos compuestos, generando la llamada carrera armamentística ^{4,5}. Dado los problemas asociados a los pesticidas químicos, es esencial considerar el uso de otro tipo de pesticidas, como los insecticidas microbianos. Entre estos, los más eficientes son los producidos por la bacteria *Bacillus thuringiensis* ⁶.

1.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva, estrictamente aeróbica, que está relacionada con otros bacilos como *B. cereus* y *B. anthracis*. Estas bacterias tienen dos etapas: una fase de crecimiento vegetativo, en la que se duplican por bipartición, y una fase de esporulación, que es un proceso de diferenciación inducido por la falta de nutrientes. La espora puede germinar nuevamente cuando se encuentra en un entorno con los nutrientes necesarios ⁷. Bt se encuentra presente en una amplia variedad de ecosistemas, como diferentes tipos de suelos, cuerpos de agua y la superficie de algunas plantas, entre otros ^{8,9}. Una de las características distintivas de Bt es su capacidad para producir proteínas formadoras de poro con propiedades insecticidas, las cuales han sido utilizadas de manera continua como pesticidas. Su principal ventaja en comparación con otros

pesticidas es su alta especificidad para afectar a los insectos, sin causar efectos en los vertebrados ^{10,11}.

Bt fue descubierta por primera vez en 1901 por el científico japonés Shigetane Ishiwata, quien inicialmente la denominó *Bacillus sotto*. Sin embargo, en 1911, el científico alemán Ernst Berliner la renombró como *Bacillus thuringiensis*, en alusión a la región de Turingia en Alemania, donde fue originalmente descubierta. En 1961, se registró el primer bioinsecticida basado en productos derivados de Bt ante la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos. En 1978, se describió la subespecie *israelensis*, que tiene proteínas con la capacidad de eliminar mosquitos, y en 1983, se describió la subespecie *tenebrionis*, que afecta a ciertos coleópteros. En 1995, la Agencia de Protección Ambiental aprobó la producción comercial y distribución de productos basados en Bt. Finalmente, en 1996, se utilizó la modificación genética para producir cultivos que expresan proteínas de Bt, conocidos como cultivos-Bt, siendo los más comunes maíz y algodón ^{2,12}.

1.2 Proteínas formadoras de poro producidas por Bt

Las distintas cepas de Bt producen una amplia variedad de proteínas formadoras de poros (www.bpprc.org) ¹³. Al ser ingeridas por el insecto blanco, estas proteínas rompen la membrana del tejido epitelial del intestino, causando la muerte del insecto. Para que estas proteínas formen un poro en la membrana, es necesario que sufran un corte proteolítico por peptidasas presentes en el intestino, lo cual induce un cambio conformacional necesario para obtener el efecto insecticida ¹⁴.

El tipo de proteína insecticida producida por Bt depende, entre otros factores, de la fase de crecimiento de la bacteria. Durante la fase de esporulación, se producen las toxinas Cry (cristal) y Cyt (citotóxicas), entre otras, conocidas como delta-endotoxinas (www.bpprc.org). Estas toxinas se acumulan en forma de cuerpos paraesporales en la bacteria ^{8,14}. En la fase vegetativa, Bt expresa y secreta al ambiente circundante las toxinas Vip (proteínas vegetativas insecticidas). Estas toxinas difieren en secuencia, estructura y mecanismo de acción de las

delta-endotoxinas ^{8,14,15}. Además de las toxinas mencionadas, Bt produce otras proteínas que, debido a su secuencia y dominios conservados, podrían tener actividad insecticida, aunque han sido poco estudiadas ⁸ (**Fig. 1**).

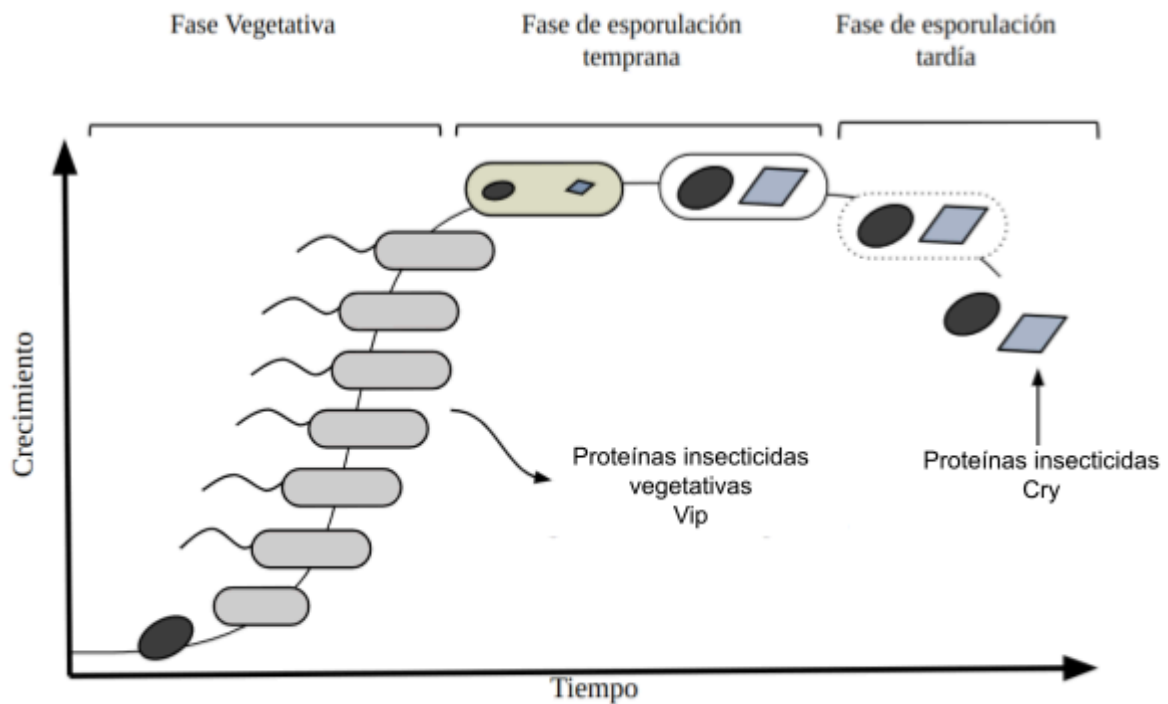


Figura 1. Proteínas formadoras de poro de Bt. Fases de crecimiento en la que Bt expresa las proteínas formadoras de poro. Imagen de Sabino Pacheco no publicada.

1.2.1 Nomenclatura proteínas de Bt

La nomenclatura de las toxinas de Bt ha evolucionado a lo largo del tiempo. Inicialmente, las toxinas eran nombradas según el insecto al que afectan y luego de acuerdo a la similitud de sus secuencias. Sin embargo, con el descubrimiento continuo de nuevas proteínas con efecto insecticida, esta nomenclatura se ha vuelto limitada. Para abordar esta situación, se desarrolló un nuevo sistema de nomenclatura basado en la estructura de las toxinas ¹³. Es importante destacar que los grupos previamente mencionados (Cry, Cyt y Vip) no han sido afectados por este cambio en la nomenclatura.

1.3 Toxinas Cry

El grupo de toxinas Cry es el más diverso y ampliamente utilizado entre los grupos previamente mencionados. Se han secuenciado más de 700 tipos diferentes de toxinas Cry, aunque no todas tienen su insecto blanco definido. En general, estas toxinas afectan a lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos) y otras familias de insectos. Todas las toxinas Cry conservan una estructura de tres dominios. El dominio I, ubicado en el N-terminal de la proteína, consiste en siete hélices alfa y desempeña un papel crucial en la inserción en la membrana y la formación del poro. El dominio II, compuesto por tres láminas beta antiparalelas, es responsable de la interacción entre la toxina y proteínas de membrana de las células intestinales de las larvas susceptibles. Por último, el dominio III, también formado por dos láminas beta antiparalelas, participa en la interacción entre la toxina y los receptores ^{8,14}.

Para las toxinas Cry1, se han identificado al menos cuatro moléculas receptoras distintas en el intestino: cadherina, aminopeptidasa N (APN), fosfatasa alcalina (ALP) y transportadores tipo ABC. Estos receptores interactúan con la toxina facilitando la formación del poro en la membrana ^{16,17}. La toxina Cry1Ab puede unirse a sus receptores tanto en forma de protoxina como en forma de toxina activada por proteólisis, lo que desencadena su oligomerización e inserción en la membrana, formando el poro ^{16,17} **(Fig. 2)**.

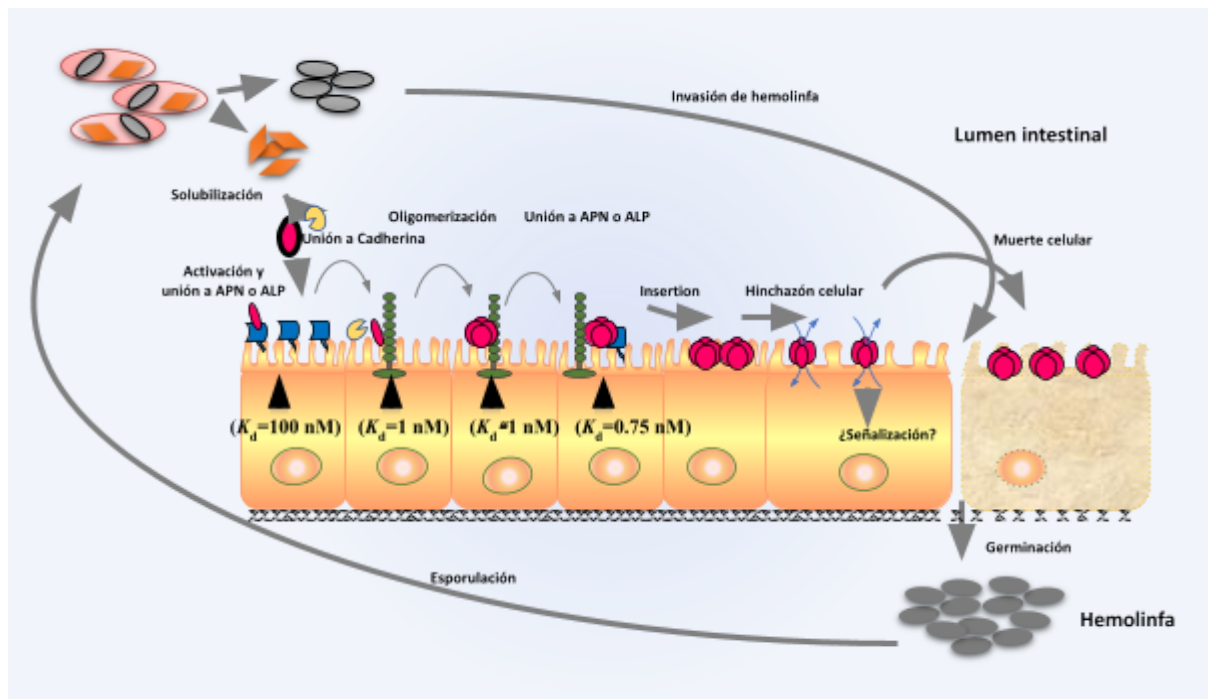


Figura 2. Modo de acción de la toxina Cry1Ab en *Manduca sexta*. Los cristales paraesporales producidos por *Bacillus thuringiensis* (Bt) se solubilizan en el intestino del insecto. La protoxina se activa mediante la acción de peptidasas y se une de manera débil tanto a los receptores APN como a ALP, lo que facilita su acercamiento a la membrana celular. Posteriormente, la protoxina forma una interacción fuerte con el receptor cadherina en la membrana, lo que permite su inserción en la membrana. Esta inserción favorece la formación de un poro en la membrana, lo que interrumpe la función celular y lleva a la muerte del insecto. Imagen modificada de Pardo-Lopez et al. (2013) ¹⁸.

1.4 Toxinas de la fase vegetativa Bacillus

Además de producir proteínas insecticidas durante la esporulación, *Bacillus thuringiensis* (Bt) también expresa y libera al medio proteínas formadoras de poros durante su fase vegetativa. Entre las toxinas expresadas en esta fase se encuentran Vpa y Vpb, anteriormente conocidas como VipA1 y VipA2, las cuales funcionan como un complejo binario. Estas toxinas son transcritas bajo el mismo operón, lo que da como resultado proteínas de aproximadamente 100 y 50 kDa, respectivamente, con actividad insecticida contra coleópteros y hemípteros ^{8,15}.

El grupo más diverso de proteínas expresadas en la fase vegetativa son las proteínas Vip3, de las cuales, se han descrito alrededor de 130 variantes ¹⁹. La nomenclatura de estas toxinas se basa en el porcentaje de similitud entre sus secuencias. Las toxinas Vip3 tienen efectos sobre los insectos del orden

Lepidoptera^{15,20,21}. Aunque se han utilizado en algunos cultivos transgénicos con éxito, existe poca información disponible sobre su modo de acción.

1.5 Vip3A

Dentro del grupo de las toxinas Vip3, las más estudiadas son las proteínas pertenecientes a la clasificación Vip3A. El número de aminoácidos de las proteínas Vip3A es de aproximadamente 787, con una masa molecular de ~89 kDa²². Gracias a estudios del gen de Vip3Aa16, se reportó que el inicio de la transcripción se encuentra en la base 101 y las regiones promotoras -35 y -10 son muy similares a aquellas reguladas por el factor transcripcional σE en *B. subtilis*²³, el cual está relacionado con el proceso de esporulación²⁴.

Estas proteínas, al igual que otras proteínas formadoras de poro, se pueden encontrar en dos estados, en el no activo, conocido como protoxina, y en el estado activo o toxina activa. El cambio entre ambos estados se da cuando la protoxina sufre un corte proteolítico. La estructura de ambos estados se resolvió por crio-microscopía y se pueden encontrar en el *Protein Data Bank* con los números de acceso 6TFJ para la protoxina y 6TFK para la toxina activada²⁵ (**Fig. 3B y 3C**).

La proteína Vip3A se compone de 5 dominios (**Fig. 3A**), el dominio I abarca desde el extremo N-terminal hasta el residuo K198, y está compuesto por 4 hélices alfa largas, que al momento de activarse la protoxina sufren una reorganización que forma una hélice enrollada extendida. El dominio II, se encuentra ubicado después del sitio de corte proteolítico, tiene una longitud de 125 aminoácidos, formado por 5 hélices alfa, cuenta con una similitud estructural con el dominio I de las toxinas Cry por lo que se ha sugerido que desempeña un papel en la inserción a la membrana y la formación del poro²⁵.

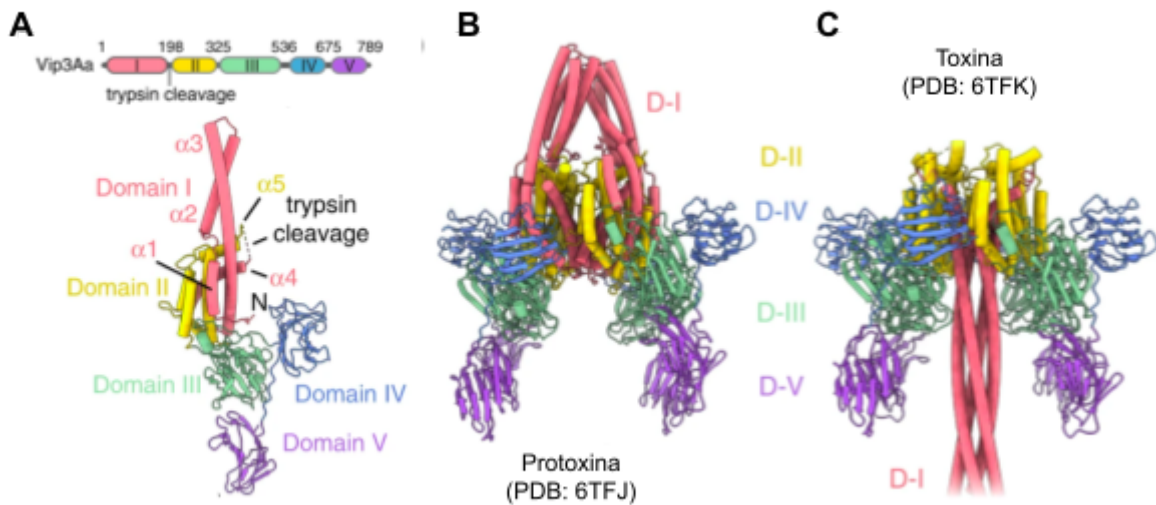


Figura 3. Estructura de Vip3Aa. Estructura tridimensional del monómero (A), de la protoxina (B) y toxina (C) de Vip3Aa. Imagen modificada de Nuñez-Ramirez et al. (2020)²⁵.

El dominio III se extiende desde el residuo 328, hasta el residuo 532 y está compuesto por tres láminas beta antiparalelas, adoptando una estructura similar al beta-prisma presente en el dominio II de las toxinas Cry el cual está involucrado en la unión a proteínas de membrana del intestino de larvas de insectos²⁵ (**Fig. 4**). A pesar de su similitud, no se ha podido describir el papel del dominio III de la Vip3A.

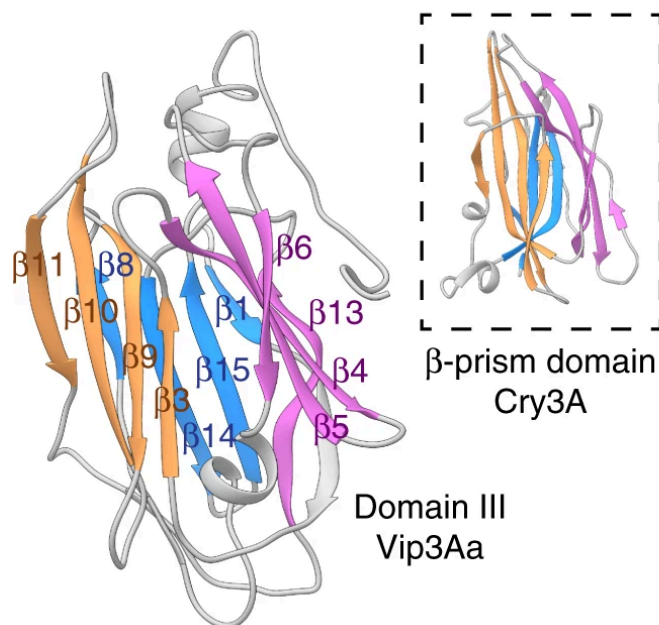


Figura 4. Similitud entre el dominio III de Vip3Aa y el dominio II de Cry3A. Imagen parcial de Nuñez-Ramirez et al. (2020)²⁵.

Finalmente, los últimos dos dominios de la Vip3A presentan una topología en forma de "jelly-roll" con dos láminas beta antiparalelas y contienen el módulo de unión a carbohidratos CBM (carbohydrate-binding module). Al comparar la estructura tridimensional de los dominios IV y V con bases de datos de proteínas, se observa una similitud con glucosidasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos ^{25,26}. De manera similar, los dominios IV y V de Vip3A muestran una similitud estructural con el dominio III de algunas toxinas Cry, el cual se ha asociado con la especificidad del insecto blanco y la unión a las proteínas de membrana ^{20,25,26} (**Fig. 5**).

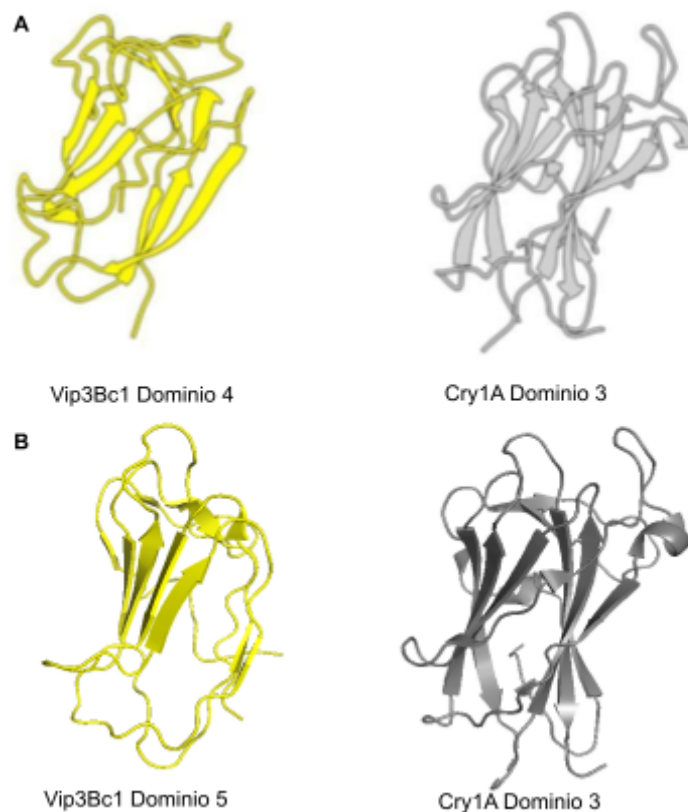


Figura 5. Similitud entre el dominio IV y V de Vip3Bc1 con el dominio III de Cry1A. A Imagen parcial de Byrne, M. et al 2021 ²⁰. **B** Dominio 5 de Vip3Bc1 y dominio 3 de Cry1A imagen obtenida usando PyMOL. Cry1A PDB: 6DJ4.

De acuerdo a algunos análisis filogenéticos de las toxinas Vip3A, se ha descrito que los dominios I y II se encuentran altamente conservados, lo cual está relacionado con la activación de la toxina. Mientras que en los dominios III, IV y V,

existe más variabilidad y pueden estar implicados en la especificidad hacia los receptores ¹⁵.

Aunque se ha encontrado similitud estructural entre los dominios de las toxinas Cry y los dominios de las toxinas Vip3, éstas no comparten receptores, por lo tanto, las toxinas Vip3, se han utilizado como alternativa ante aquellos insectos que han mostrado resistencia ante las toxinas Cry ^{4,11,27-29}.

1.6 Carrera armamentística

Debido a los problemas relacionados con el uso de pesticidas químicos, se ha buscado una alternativa para controlar los diferentes insectos que afectan los cultivos. Los biopesticidas ofrecen una buena opción y actualmente el 90% de ellos se basan en alguna proteína de Bt ³⁰. Los productos de Bt han tenido un éxito moderado como productos asperjables debido a su efecto específico en las larvas de insectos y su fácil aplicación con equipos estandarizados. Sin embargo, su eficacia se ve limitada por su sensibilidad a la luz ultravioleta y su especificidad para los estados larvarios jóvenes, lo que exige una aplicación controlada justo en el momento de la emergencia de las larvas ³⁰. Desde 1996, se han cultivado plantas transgénicas que producen proteínas de Bt, como varias endotoxinas Cry, las cuales han mostrado una alta eficacia en el control de plagas agrícolas y han contribuido a reducir el uso de insecticidas químicos ^{4,31}.

La presión de selección, la cual lleva a la resistencia, no solo es creada por los pesticidas químicos, sino también por las proteínas Bt, y ya se han encontrado diferentes poblaciones de insectos con resistencia ante algunas toxinas Cry, debido a que se han utilizado por alrededor de 20 años ³². El mecanismo para generar resistencia más frecuente está asociado a mutaciones en los genes de los receptores afectando su expresión o presencia en la membrana, lo que resulta en un gran nivel de resistencia. Además, se ha descrito que algunos insectos al estar en contacto con concentraciones no letales de toxina pueden aumentar la respuesta inmune al estar en contacto nuevamente con la toxina, provocando una resistencia más moderada ⁴.

Para disminuir la evolución de resistencia por parte de los insectos se han propuesto diferentes soluciones, como puede ser el uso de dos o más toxinas Cry. A esta estrategia se le conoce como piramidal, donde el objetivo es utilizar toxinas con diferentes modos de acción. En el caso de las toxinas de Bt, modo de acción se refiere a proteínas que se unan a distintos receptores. Con esta estrategia se esperaría una disminución en la resistencia, ya que tendrían que aumentar el número de mutaciones para obtener resistencia a todas las toxinas utilizadas. Otra posible solución es el uso de otro tipo de proteínas producidas por Bt, como son las proteínas Vip3, entre otras, donde de la misma forma, al tener diferentes modos de acción, se espera que la resistencia disminuya ^{4,33}.

Ambas estrategias ya se han aplicado en campos de cultivos con buenos resultados ^{4,15}. Estas estrategias no son excluyentes entre sí, en algunas plantas se han expresado las toxinas Vip3 y Cry, y se ha observado que aumenta el efecto insecticida ¹⁵, en un caso particular entre la toxina Vip3Aa y la toxina Cry9Aa, se encontró que tienen un efecto de sinergia, aumentando la letalidad cuando se encuentran juntas ³⁴. El uso conjunto de las toxinas Cry y las toxinas Vip3 presenta una ventaja, ya que no se ha encontrado ningún insecto que presente resistencia cruzada, es decir, que sea resistente a ambas toxinas ^{15,33}. Aunque el uso de Vip3, tanto de forma aislada como en conjunto con otras toxinas, ha dado resultados positivos, aún falta mucha información sobre el modo de acción de Vip3 y la función de sus dominios estructurales.

1.7 *Spodoptera frugiperda*

La invasión de plagas es una de las principales causas de pérdida económica en el sector agrícola, con una reducción estimada del 26% de la producción mundial de cultivos, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ³⁵. El proceso de invasión de una especie conlleva tres pasos: la introducción de la especie, que generalmente ocurre de forma accidental por acciones humanas como el transporte o la urbanización; la estabilización de la población en el nuevo ambiente, gracias a un alto grado de reproducción o ventajas evolutivas sobre las especies nativas; y finalmente, la

expansión de la especie invasora en el nuevo ecosistema ³⁶. Un ejemplo claro de plaga con un alto impacto económico es el cogollero del maíz ³⁶⁻³⁸.

El cogollero del maíz o gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (*Lepidoptera: Noctuidae*) (2021) ³⁹, cuenta con alta capacidad de dispersión y un comportamiento migratorio, lo que lo ha llevado a esparcirse por Europa, África y Asia, siendo nativa del continente americano ^{37,38}. Es una plaga polifágica, ya que puede alimentarse de más de 80 plantas, dentro de las que se encuentran el maíz, arroz, algodón y sorgo, cultivos de gran importancia dentro de la agricultura mexicana ^{38,39}.

El cogollero del maíz es, en zonas tropicales, una plaga permanente, ya que sus estados de desarrollo se mantienen activos durante todo el año. En cambio, en zonas templadas, se comporta como una plaga estacional. Las hembras ponen, en promedio, entre 100 a 150 huevos por ciclo, los cuales suelen colocar sobre la planta. Una vez que los huevos eclosionan, las larvas se alimentan durante el día en los primeros instares, mientras que los últimos instares se alimentan por la noche, siendo este el momento en el que consumen más alimento. Posteriormente, las larvas se entierran en el suelo, donde forman la cámara pupal, en la cual se produce la metamorfosis, y de donde emergen como adultos. El ciclo en total puede durar de 30 a 60 días, dependiendo de la temperatura ³⁹.

El daño que provoca al cultivo principalmente se debe a la alimentación de las larvas y al excremento húmedo del insecto. En las zonas del trópico las larvas pueden dirigirse a la base de la planta para barrenar el tallo sin que este se caiga y refugiarse dentro de él ³⁹. En México se encuentra bien estipulado qué tipo de pesticidas químicos se pueden utilizar para controlar la población del cogollero. En la ficha técnica de J.E Smith (2021) ³⁹ emitida por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural no se describe el uso de biopesticidas, pero en otras partes del mundo ya se han utilizado cultivos Bt para controlar al cogollero del maíz, principalmente usando toxinas Cry. Desgraciadamente, ya se han encontrado poblaciones de *S. frugiperda* resistentes ante toxinas Cry ³⁷. Debido a esta problemática, se ha aumentado el uso de la toxina Vip3Aa en plantas transgénicas

para controlar esta plaga, pero aún es necesario aumentar los conocimientos que se tienen de esta toxina.

2 Antecedentes

2.1 Mecanismo de acción de toxina Vip3A

A pesar de su similitud estructural con las toxinas Cry, el modo de acción de las proteínas Vip3A aún no se comprende por completo. Sin embargo, se propone que la secuencia de eventos es similar en ambos tipos de toxinas: activación de la protoxina mediante un corte proteolítico, unión a receptores específicos en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio y, finalmente, formación del poro, lo que conduce a la muerte celular, septicemia y, eventualmente, a la muerte del insecto ^{11,22} (**Fig. 6**).

2.1.1 Activación de la protoxina

La protoxina de Vip3A es una proteína de aproximadamente 89 kDa que espontáneamente forma un tetrámero, que, al ser cortada por proteasas del intestino medio del insecto, se separa en 4 productos principales de 62, 45, 33 y 22 kDa ¹¹. *In vitro*, al ser procesada con tripsina se obtienen dos productos de 66 y 22 kDa, siendo este último el correspondiente al dominio I de la proteína. El sitio donde se realiza el corte proteolítico por la tripsina se encuentra en un asa entre los dominios I y II, y en la Vip3Aa la secuencia de este sitio es 195 KVKK 198 ^{25,40}. En el intestino medio, la protoxina puede ser procesada por diferentes proteasas ⁴¹, pero en los lepidópteros, el grupo de las serina proteasas son las que comúnmente realizan este proceso ⁴⁰.

La activación de la protoxina Vip3A ocurre cuando esta se encuentra en forma de tetrámero. Tras el corte proteolítico, los segmentos de la proteína permanecen unidos principalmente a través de enlaces hidrofóbicos entre las hélices α_4 , permitiendo la estabilidad del tetrámero. Además de las interacciones entre las hélices α_4 de cada monómero, cada hélice α_4 mantiene contacto con distintos aminoácidos en su propio dominio II, lo que contribuye aún más a la

cohesión estructural ²⁵. La activación de la protoxina conlleva un gran cambio conformacional en el tetrámero (**Fig 3B y 3C**), debido a que el corte permite a las hélices adjuntas al sitio de corte ($\alpha 4$ y $\alpha 5$) moverse. La hélice $\alpha 5$ se acerca al monómero vecino formando una serie de enlaces hidrofóbicos, y la hélice $\alpha 4$, se mueve en dirección a la hélice $\alpha 3$, aplicando presión en el resto del dominio I facilitando la formación de la hélice enrollada extendida ²⁵. La activación de la protoxina es un evento crucial para el mecanismo de acción de las toxinas Vip3A, de tal forma que, al aumentar la eficacia de este evento, al añadir sitios de corte entre la hélice $\alpha 4$ y $\alpha 5$, incrementa la toxicidad de la proteína ⁴².

Basándose en la estructura, se han desarrollado modelos para explicar el mecanismo de acción de Vip3Aa. En el modelo propuesto por Núñez-Ramírez et al., (2020) ²⁵, se propone que después de formarse el tetrámero en la membrana de borde ciliado, BBM (*brush border membrane*) ¹², se realiza el corte proteolítico en el dominio II de la toxina, permitiendo que los dominios I y II formen una estructura en forma de alfa hélice capaz de penetrar la bicapa lipídica ^{22,24} (**Fig 2**). Cuando los insectos susceptibles consumen estas toxinas, sufren un daño extenso en el tejido epitelial. Los efectos incluyen lisis celular, fuga de contenido e hinchazón celular ¹².

2.1.2 Receptores de Vip3Aa

Gracias a múltiples líneas de investigación, se han identificado algunos receptores potenciales tanto en líneas celulares de *S. frugiperda*, como en vesículas de membrana (*Brush Border Membrane Vesicles*; BBMs). Por ejemplo, en la línea celular Sf21 de células de ovario, se identificó la proteína ribosomal S2 como proteína asociada a la toxina que interactúa con Vip3Aa y media la toxicidad en esta línea celular ⁴³. En la línea celular Sf9, establecida a partir de tejido ovárico, se propuso que el factor de crecimiento de fibroblastos, Sf-FGFR ⁴⁴, y el receptor Scavenger clase C, Sf-SR-C ⁴⁵, son posibles receptores; esta observación fue confirmada mediante ensayos de unión con Vip3Aa ^{27,44,45}. Con el objetivo de identificar el mecanismo de acción de la toxina Vip3Aa *in vivo*, el grupo del Dr. Yutao Xiao, realizó el *knockout* de estos dos receptores, Sf-FGFR y Sf-SR-C, en larvas de *S. frugiperda* utilizando CRISPR/Cas9. No se observó un cambio en la susceptibilidad

del insecto, lo que sugiere que estos receptores no están involucrados en la toxicidad en las larvas ³⁷.

De igual forma, el grupo del Dr. Xiao identificó que el decremento de la expresión del factor de transcripción *SfMyb* aumenta más de 200 veces la resistencia de *S. frugiperda* a la proteína Vip3Aa. Dentro de la lista de los posibles genes regulados por este factor transcripcional, se identificó a la proteína transmembranal, *serine protease stubble-like (SfStubble)*, perteneciente al grupo de las serina proteasas ⁴⁶, que son la familia de proteasas que principalmente se encargan de la proteólisis de Vip3Aa en lepidópteros ⁴⁰.

Aunque se conocen algunos de los posibles receptores a los cuales se une la proteína Vip3A, el mecanismo de la interacción sigue siendo poco claro. A la fecha se ha demostrado que el dominio III es el dominio que lleva a cabo la unión con el tejido epitelial del intestino medio en *S. frugiperda* ^{19,47}. Pero para tener acceso a este tejido epitelial aún es necesario atravesar la membrana peritrófica (PM), una membrana semipermeable con la que cuentan la mayoría de los insectos, para separar procesos digestivos y tiene una función de protección contra las toxinas ⁴⁸. El mecanismo por el cual la proteína Vip3Aa esquiva esta estructura aún se desconoce, pero se ha descrito que el dominio V de Vip3Aa es capaz de unirse a la PM. El dominio V presenta un plegamiento similar al módulo de unión a carbohidratos ²⁵ y la PM cuenta con una gran cantidad de glicanos a los que se podría unir este dominio ^{19,49}.

2.1.3 Efecto citotóxico

Al ingerir la toxina, los insectos muestran síntomas como hinchazón de las células, vacuolización del citoplasma, fuga de contenido celular, lisis de las células epiteliales y desintegración celular, síntomas asociados con la formación de poros, lo cual se ha confirmado por ensayos de cambio de voltaje ^{27-29,50}. La formación de estos poros se realiza mediante la inserción del dominio I en la membrana celular ^{20,25}.

En líneas celulares, se han descrito otros mecanismos, como que la toxina Vip3Aa al unirse con el receptor Sf-SR-C sufre un proceso de endocitosis, proceso

asociado con su toxicidad en Sf9⁴⁵. De igual forma, en Sf9 se ha descrito que la toxina Vip3Aa induce la apoptosis de las células^{27,51,52}.

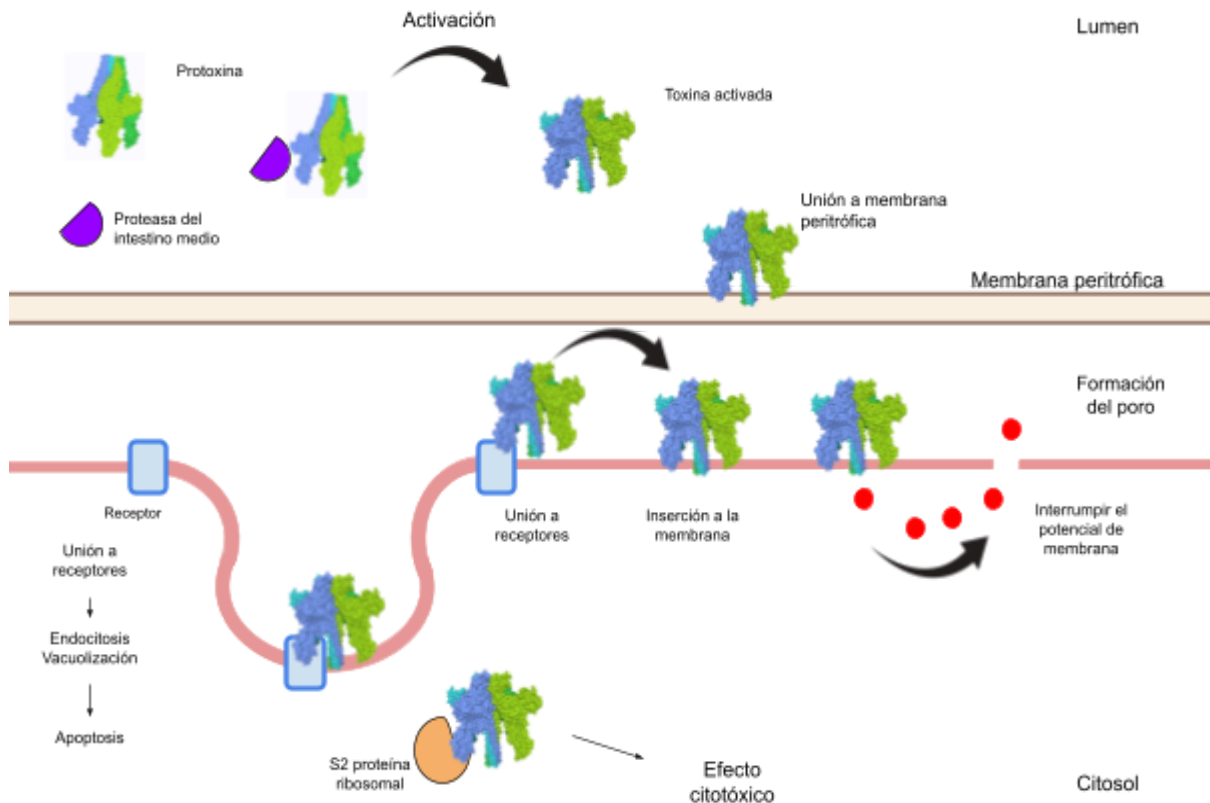


Figura 6. Mecanismo de acción Vip3Aa. El tetramero de la protoxina se activa en el lumen del intestino del insecto. Tras pasar la membrana peritrófica, la toxina activa se une a receptores específicos, donde puede sufrir un proceso de endocitosis o insertarse en la membrana formando un poro. En ambos casos, esto conduce a la muerte del insecto. Comunicado personal de la Dra. Patricia Casino Ferrando.

2.2 Aminoácidos relevantes

El papel del dominio I en Vip3Aa se ha asociado con la formación del poro y tiene un papel fundamental en la estabilización del tetramero; deleciones de los primeros 39 aminoácidos afectan directamente la toxicidad de la toxina. Además de sustituciones puntuales en la hélice $\alpha 1$, puede aumentar la toxicidad favoreciendo la inserción a la membrana^{19,20,25,26,41,53}. El dominio II tiene un papel en la estabilidad estructural del tetramero, así como en la unión al dominio I una vez realizado el corte proteolítico^{25,54}. La secuencia de aminoácidos de los dominios I y II es similar

a través de toda la familia de toxinas Vip3, teniendo una identidad de 68% y 62% respectivamente ^{25,26}.

Los dominios III, IV y V se han asociado con una posible unión a los receptores o a la membrana celular. El dominio III junto con el dominio II, es esencial para la unión a tejido epitelial ¹⁹ y comparten similitud estructural con el dominio II de las toxinas Cry, el cual se ha demostrado que tienen un papel en la unión a receptores ²⁵. Los dominios IV y V cuentan con una similitud estructural con el dominio III de las toxinas Cry, asociados de igual manera a la unión de receptores ²⁵; el dominio IV podría tener un papel en la estabilidad de la toxina ⁵⁵ y el dominio V se ha mostrado que se une a la membrana peritrófica (PM) en el intestino medio de los insectos ¹⁹. En el trabajo de Chi et al. (2019) ⁵⁶ utilizando métodos bioinformáticos, *docking*, identificaron algunos aminoácidos que posiblemente interaccionan con la proteína aminopeptidasa N (APN) e identificaron que el aminoácido H618 en Vip3Aa tiene un papel importante en la toxicidad frente al insecto *Helicoverpa armigera* ⁵⁶. Aun con esta información, es relevante aumentar el conocimiento acerca del mecanismo por el cual la toxina reconoce los receptores de sus insectos objetivo.

2.3 Sinergia entre toxinas Cry y toxinas Vip3A

En investigaciones anteriores realizadas por nuestro grupo, Wang et al. (2018) ³⁴, se demostró que las toxinas Vip3Aa y Cry9Aa poseen un efecto de sinergia al interactuar entre ellas dentro del insecto *Chilo suppressalis*, una plaga del arroz ³⁴. Se describió la región de Vip3Aa que interactuaba con la toxina Cry9Aa, realizando ensayos de unión entre la toxina Cry y fragmentos de la toxina Vip3Aa de ~150 aminoácidos, los cuales presentan secuencias superpuestas. Con esta metodología se pudo identificar con precisión que los aminoácidos Asn 364 - Ser 366 y Lys 432 - Leu 434 de Vip3Aa, son los involucrados en la unión con la toxina Cry9Aa ³⁴.

Las toxinas Vip y las toxinas Cry cuentan con diferentes mecanismos de acción ^{29,57}. Además, no se ha descubierto ningún insecto que cuente con resistencia para ambas toxinas, de esta forma el uso de ambas en cultivos Bt es una alternativa para lidiar con el aumento en los últimos años de la resistencia contra proteínas de Bt ⁵⁶⁻⁵⁸.

3. Hipótesis

Los dominios III, IV y V de Vip3Aa están involucrados en la unión de la toxina con los receptores presentes en las células intestinales de *Spodoptera frugiperda*.

4. Objetivo

Identificar los aminoácidos de Vip3Aa que están involucrados en la unión a sus receptores en el insecto *S. frugiperda*.

4.1 Objetivos específicos.

- Determinar si los dominios III, IV o V de Vip3Aa están involucrados en la unión a vesículas del intestino medio de *S. frugiperda*.
- Identificar los aminoácidos expuestos al solvente en la protoxina y la toxina activada.
- Cambiar aquellos aminoácidos que puedan tener un papel en la unión a receptores
- Analizar la toxicidad de las variantes de Vip3Aa hacia neonatos de *S. frugiperda*.
- Evaluar la unión de las variantes a vesículas del intestino medio de *S. frugiperda*.

5 Materiales y Métodos

5.1 Fragmentos de Vip3Aa11

5.1.1 Cepas y materiales

En el laboratorio, gracias a investigaciones previas ³⁴, se dispone de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) que contiene el plásmido pET28a-vip3Aa11, el cual contiene la proteína Vip3Aa11. Asimismo, se cuenta con las cepas de *E. coli* que expresan los fragmentos de Vip3Aa que abarcan los dominios III, IV y V: F4 (R246–L399), F5 (I301–D451), F6 (K352–R500), F7 (L400–E550), F8 (L502–S651), F9 (K602–A749) y F10 (Q652–K789) (**Fig. 7A**).

5.1.2 Inducción, expresión y purificación de los fragmentos.

Con el objetivo de analizar la unión de los fragmentos a las BBMV's se expresaron y purificaron, siguiendo las siguientes indicaciones. Las cepas de *E. coli* BL21 que contienen los fragmentos: F4, F5, F6, F7, F8, F9 y F10, se cultivaron en 30 mL de medio 2XTY kanamicina y la expresión de los fragmentos se indujo con 0.5 mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) a 30 °C durante toda la noche. Las células se colectaron por centrifugación a 10,000 x g durante 15 min, el precipitado celular se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El precipitado celular se resuspendió en 4 mL de solución amortiguadora sarkosyl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, imidazol 20 mM, DTT 1 mM y sarkosyl 2.5%). Las células se lisaron mediante sonicación, aplicando tres pulsos de 35 segundos con intervalos de 30 segundos en hielo, a una potencia del equipo del 100% (ULTRASONIC PROCESSOR GEX 130PB). Posteriormente, se centrifugaron a 14000 x g durante 15 minutos a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante.

La purificación se llevó a cabo mediante una cromatografía de afinidad a níquel. La columna se equilibró con PBS y la muestra se pasó dos veces, realizando

un lavado con 3 mL de imidazol 25 mM, los fragmentos se recuperaron en 3 mL de imidazol 250 mM; finalmente, se realizó un lavado de 3 mL de imidazol 500 mM.

5.1.3 Purificación de BBMV

Con el objetivo de identificar al fragmento o los fragmentos que se unen a los receptores del intestino de *S. frugiperda*, se realizó una purificación de las vesículas de membrana (BBMVs). Para ello, se seleccionaron larvas de tercer instar *S. frugiperda* proporcionadas por el insectario de nuestro laboratorio, a las cuales se les procedió a remover el intestino. Posteriormente, se retiró todo el bolo alimenticio y sus desechos, se realizó un lavado con solución amortiguadora para disectar (manitol 300 mM, Tris-HCl 7 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM y PMSF 0.5 mM, pH final 7.4 con KOH). Finalmente, se conservaron los intestinos a -70 °C hasta su utilización.

La purificación de las BBMVs se llevó a cabo mediante el método de precipitación por magnesio reportado previamente⁵⁹. Se utilizaron 3 g de tejido y se descongelaron en hielo y se colocaron en un tubo de vidrio estéril que contenía 30 mL de solución amortiguadora de manitol (Manitol 300 mM, EGTA 5 mM, EDTA 1 mM, HEPES 10 mM, Tris-HCl 17 mM, DTT 2 mM PMSF 1 mM, pH final 7.4 con KOH). El tejido se desintegró con un émbolo estéril montado en un homogenizador Black & Decker U-114 tipo FV dando 9 golpes a 2,250 rpm. Se agregó un volumen de 30 mL de cloruro de magnesio 24 mM al tubo y se agitó por inversión 3 veces, se incubó por 15 min en hielo. En tubos estériles, se centrifugó a 4500 rpm por 15 min a 4 °C, en un rotor de ángulo fijo JA-20 (Beckman) utilizando una centrífuga J2-HS (Beckman). La pastilla se descartó y el sobrenadante se pasó a nuevos tubos estériles. Se centrifugó a 16,000 rpm durante 30 minutos a 4°C usando el equipo anteriormente descrito. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se suspendió en 15 mL de solución amortiguadora de manitol y 15 mL de cloruro de magnesio. Se repitieron los dos pasos de centrifugación nuevamente y la pastilla final se resuspendió en 600 µL de solución amortiguadora de manitol y agua estéril fría, se volvió a homogeneizar. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry, DC protein assay dye method (Bio-Rad) utilizando BSA como estándar. Finalmente, las BBMVs se almacenaron a -70°C hasta su uso.

El enriquecimiento de las BBMVs se llevó a cabo comparando la actividad enzimática de APN y ALP en el homogeneizado inicial del intestino y en las BBMVs, ya que estas enzimas son marcadores en estas membranas.

A lo largo de esta investigación, se purificaron diferentes lotes de BBMVs con diferentes concentraciones de proteínas y diferentes enriquecimientos. A continuación, se muestra una tabla con la comparación entre el homogeneizado de referencia y las BBMVs (**Tabla 1**). A lo largo del escrito se especifica la concentración y el enriquecimiento de las BBMVs utilizadas para cada experimento.

Experimento	Homogeneizado de referencia	BBMVs	Enriquecimiento
Lowry	5.48 µg/µL	9.99 µg/µL	
APN	0.34 U	4.7 U	13.8
ALP	46.7 U	183.38 U	3.9

Tabla 1 Enriquecimiento de las BBMVs. Cuantificación de proteína en el homogeneizado de referencia y la purificación de BBMVs mediante el método de Lowry. Medición de la actividad enzimática de aminopeptidasa-N (APN) y alcalino fosfatasa (ALP) en el homogeneizado de referencia y la purificación de BBMVs.

5.1.4 Análisis de ELISA

El ensayo de ELISA se realizó para identificar la unión de los fragmentos a las BBMVs. Se incubó en una placa MaxiSorp de Nunc de 96 pozos con BBMVs (5 µg en 100 µL de PBS pH 7.4; BBMVs: 4 µg/µL, APN 6.7, ALP 5.1) durante toda la noche a 4 °C. La placa se lavó con PBS-T (PBS pH 7.4 con Tween-20 al 0.05%) para la detección se utilizó anti-His de QIAGEN, con lo que se siguieron las indicaciones del fabricante y se bloqueó la placa con 200 µL del reactivo de bloqueo durante 1 hora a 37 °C. Después, se realizaron 3 lavados con PBS-T, se incubaron los pozos con los fragmentos purificados 4, 5, 6, 7, 8 y 9, se utilizó dos cantidades (10 y 20 µg en 100 µL de PBS-T 0.1%) durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS-T 0.05%, se detectó la unión de los fragmentos con las

BBMVs con el anticuerpo anti-His de QIAGEN (en una dilución de 1:7500) incubando cada pozo por 1 hora y media a 37 °C. Finalmente, tras lavar los pozos con PBS-T 0.05%, se añadieron 100 µL del sustrato de revelado (2 mM de O-fenilendiamina (Sigma) y H₂O₂ al 0.05% (v/v) en fosfato 0.1 M, pH 5.0) y se incubaron durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µL de HCl 5 M y luego se determinó la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de 96 pozos (Infinite M1000 PRO, TECAN).

5.1.5 Análisis de residuos de aminoácidos expuestos al solvente en la Vip3Aa.

La estructura tridimensional del tetrámero de la protoxina (PDB ID: 6TFJ) y el tetrámero de la toxina (PDB ID: 6TFK), se utilizaron para realizar el análisis de residuos de aminoácidos expuestos al solvente. Se utilizaron dos programas para este análisis, el programa GETAREA ⁶⁰ accesible en la url <https://curie.utmb.edu/getarea.html> y el programa PDBePISA ⁶¹ accesible en la url <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>.

El programa utilizado fue GETAREA determina el porcentaje de un residuo de aminoácido que podría entrar en contacto con una molécula de agua de 1.4 Å. Cuando menos del 20% del área de un aminoácido se encuentra expuesta al solvente, se considera enterrado en la estructura y cuando el 50% o más del área puede entrar en contacto con el solvente, se considera expuesto ⁶⁰. Mientras que el PDBePISA calcula el área accesible en Angstroms al cuadrado (Å²) de los residuos de aminoácidos ⁶¹.

Se utilizaron ambos programas en la protoxina y en la toxina activa. Considerando los resultados de ambos programas se identificó aquellos residuos de aminoácidos que se encuentran expuestos en ambas estructuras. Para identificar los aminoácidos que cambian su exposición al solvente después de la activación de la protoxina, se utilizó un programa en bash desarrollado internamente, para comparar las listas de residuos de aminoácidos expuestos entre ambas estructuras.

5.1.6 Comparación estructural entre proteínas.

Para identificar el cambio conformacional de la protoxina a la toxina activada en los dominios III, IV y V, y la similitud de estos dominios con dominios de otras toxinas producidas por Bt, se utilizó el programa PyMol versión 4.6.0⁶². Se compararon las estructuras de la protoxina y la toxina Vip3Aa haciendo uso de la función “align” con todos los parámetros por defecto, y de igual manera se compararon los dominios de la toxina Vip3Aa con los dominios de la toxina Cry1Aa (PDB ID: 1CIY) con la función “super”, con los parámetros por defecto.

5.2 Variantes de Vip3Aa11

Una vez identificados aquellos residuos de aminoácidos expuestos en los fragmentos que mostraron unión con las BBMV, se procedió a realizar la sustitución de ellos en la proteína Vip3Aa11 silvestre.

5.2.1 Síntesis de oligos

Gracias a la investigación realizada por N Banyuls et al. (2018)⁵⁴, en la cual realizaron un escaneo por sustituciones con alaninas en la proteína Vip3Af (GenBank: AJ872070.1), con un porcentaje de identidad con Vip3Aa11 (GenBank: AY489126.1) de 96%, sabemos que el cambio por alaninas en nuestros residuos de aminoácidos propuestos no tienen un efecto en la toxicidad de Vip3Af. Por lo tanto, se determinó modificar los aminoácidos usando las siguientes reglas, si el residuo de aminoácido cuenta con una carga cambiarla de signo, si no cuenta con carga sustituir por un residuo de aminoácido que posea carga. Tres posiciones se cambiaron además por alanina (**Tabla 2**).

Los oligos se crearon bajo las siguientes condiciones: minimizar el número de cambios para sustituir el aminoácido, un mínimo de 40% GC, en el extremo 3' tiene que poseer G o C, que el extremo 3' no contenga bucles y, por último, la temperatura de fusión (TM) tiene que ser aproximadamente de 65 °C. Estos oligos se sintetizaron por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Aminoácido Nativo	Mutante	Nombre oligo	Secuencia del oligo
Lys 385	Glu	>Oligo_1_K385E	TTATCAAGTCGAT GAG GATTTCCTTATCGG
Thr 466	Glu	>Oligo_2_T466E	AGCGGAGTATAGA GAG TTAAGTGCTAATGATG
Asn 522	Asp	>Oligo_3_N522D	GCTAGCAACAGACTTAAGC GAT AAAGAAAC
Lys 526	Glu	>Oligo_4_K526E	AGCAATAAAGAAACT GAA TTGATCGTCCCGCC
Val 529	Asp	>Oligo_5_V529D	AAGAACTAAATTGATC GAC CCGCCAAGTG
Ser 536	Asp	>Oligo_6_S536D	GCCAAGTGGTTTTATT GAC AATATTGTAGAGAACGGG
Glu 656	Lys	>Oligo_7_E656K	AAGTCAAATGGAGAT AAA GCTTGGGGAG
Asp 751	Arg	>Oligo_8_D751R	AGCGGTGCTAAA CGT GTTTCTGAAATG
Lys 526 Val 529	Ala Ala	>Oligo_9_Doble_ K526AV529A	ATAAAGAACT GCA TTGATC GCC CCGCCAAGTG
Lys 385	Ala	>Oligo_10_Triple_ K385A	TTATCAAGTCGAT GCG GATTTCCTTATCGGAAG

Tabla 2. Oligos de Vip3Aa. Oligonucleótidos diseñados para la mutación de Vip3Aa11, con el codón mutagénico resaltado en amarillo.

5.2.2 Mutación sitio dirigida.

La purificación del plásmido de Vip3Aa11 se llevó a cabo utilizando el protocolo de extracción de DNA plasmídico Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando una mezcla con 10 µL de solución amortiguadora HF 5X, 1.5 µL de dNTPs, 2 µL de DNA polymerase Phusion, 0.2-0.3 µg de DNA templado, y 100 pmol del oligo mutagénico en un volumen final de 50 µL. Con los siguientes parámetros: 3 min a 98 °C, 35 ciclos de 98 °C por 15 seg, 60 °C por 30 seg y 72 °C por 5 min y por último 10 min a

72 °C. La purificación de la reacción se realizó utilizando el protocolo propuesto por MinElute PCR Purification kit, eluyendo la muestra en 20 µL. Por último, la muestra se digirió con DpnI por 2 horas a 37 °C.

5.2.3 Electro transformación en *E. coli* DH5-alfa

Se agregó 5 µL de la purificación de la PCR mutagénica a una alícuota de 100 µL de células electrocompetentes DH5-alfa. Se realizó la electroporación en una celda de 0.2 cm de BIO-RAD, con 2.5 V y 400 Ohms en el equipo de BIO-RAD. Al finalizar la electroporación se agregó 900 µL de medio LB se incubó 1 hora a 37 °C a 800 rpm, posteriormente se sembraron 100 µL en cajas Petri con medio LB con 0.1% de kanamicina y se incubó durante toda la noche.

Se seleccionaron colonias aisladas y se cultivaron en 3 mL de medio LB con kanamicina. Para confirmar la mutación, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, y se secuenció el plásmido en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBt.

5.2.4 Quimio transformación en *E. coli* BL21.

Para la expresión de las variantes de Vip3Aa se extrajo DNA plasmídico de las células DH5-alfa que poseen el plásmido mutagénico utilizando el protocolo de Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Para posteriormente realizar una quimio transformación en la cepa de *E. coli* BL21.

En una alícuota de 100 µL de *E. coli* BL21 se agregó 1 µL del plásmido mutagénico y se incubó durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos en un equipo thermomixer. Después del choque térmico se agregaron 800 µL de medio LB y se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C a 1000 rpm, y se sembraron 50 µL en cajas LB kanamicina durante toda la noche. Finalmente, se seleccionó una colonia aislada para conservarla en glicerol a -80 hasta su uso.

5.2.5 Expresión de las variantes

Las cepas de *E. coli* BL21 que contienen la Vip3Aa11 silvestre (GenBank número de acceso AAR36859) y sus variantes se cultivaron en 40 mL de medio LB kanamicina y su expresión se indujo con 0.5 mM de IPTG a 18 °C durante toda la noche. Las células se colectaron por centrifugación a 10,000 x g durante 15 min, el precipitado celular se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La pastilla de células se resuspendió en 5 mL de PBS y las células se lisaron mediante sonicación durante 5 min con pulsos de 3 segundos encendido y 5 segundos apagado a una potencia del equipo del 70% (ULTRASONIC PROCESSOR GEX 130PB). Finalmente, se centrifugó a 14,000 x g durante 15 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante. Para verificar la expresión de la proteína silvestre y sus variantes, se realizó un gel SDS-PAGE al 10%.

5.2.6 Bioensayo

Para el bioensayo, la protoxina de Vip3Aa y sus variantes se indujeron como se describió previamente, la proteína silvestre y la concentración de cada protoxina se estimó mediante la separación de las proteínas en un gel 10% SDS-PAGE junto con diferentes concentraciones conocidas de BSA y finalmente la concentración se estimó con el uso del programa imageJ (<https://imagej.net/ij/index.html>)⁶³.

Diferentes dosis de las protoxinas, desde 0.1 ng hasta 500 ng, se aplicaron en la superficie del sustrato alimenticio colocado en cajas de poliestireno de 24 pozos (Cell Wells; Corning Glass Works, Corning, NY). Se utilizaron neonatos de *S. frugiperda*, procedentes del insectario del laboratorio, y se colocó una larva por pozo. En una caja de 24 pozos sólo se utilizó una concentración de protoxina. Las cajas se incubaron a 28°C con una humedad relativa de 65% ± 5% y un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Después de 7 días se registró la cantidad de larvas muertas. Una larva muerta es aquella que conserva el tamaño de un neonato

o que no muestra movimiento después de ser tocada. La concentración letal media (LC_{50}), se calculó con el análisis Probit en el programa PoloPlus⁶⁴.

5.2.7 Ensayo de unión de mutantes de Vip3Aa11

La proteína Vip3Aa11 silvestre y todas sus variantes se marcaron con biotina, según las indicaciones del fabricante. El ensayo de unión se realizó incubando 10 μ g de BBMV junto con 10 nM de cada proteína, en 100 μ L de solución amortiguadora de unión (PBS - Tween 20 0.1% y seroalbúmina bovina (BSA) al 0.1% (m/v)) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min para retirar el sobrenadante y se realizó un lavado con 100 μ L de solución amortiguadora de unión. Finalmente, se centrifugó nuevamente a 10,000 x g durante 10 min, y el precipitado celular se reveló en un western blot con los siguientes ajustes: se bloqueó la membrana PVDF con PBS-T al 2% durante 20 min, se realizó un lavado con PBS-T al 0.1%. A continuación, se incubó con estreptavidina asociada a peroxidasa en una dilución 1:40,000. Se realizaron 2 lavados de 10 min con PBS-T 0.1% y un lavado con PBS de 5 min. Finalmente, la membrana se reveló utilizando el kit Western Blotting Luminol Reagent de Santa Cruz.

5.2.8 Alineamiento múltiple de secuencias.

Para observar la similitud del dominio III a lo largo de la familia de toxinas Vip3 se seleccionaron las siguientes proteínas: Vip3Aa1 (número de acceso en NCBI: AAC37036.1), la proteína con la que se trabajó Vip3Aa11 (número de acceso en NCBI : AAR36859.1), la proteína con estructura cristalográfica Vip3Aa16²⁵ (número de acceso en NCBI: AAW65132.1), Vip3Ab1 (número de acceso en NCBI: AAR40284), Vip3Ac1 (número de acceso en NCBI: ABL23218.1), Vip3Ad2 (número de acceso en NCBI: CAI43276.1), Vip3Ae1 (número de acceso en NCBI: CAI43277.1), Vip3Af1 (número de acceso en NCBI: CAI43275.1), Vip3Ag2 (número de acceso en NCBI: ACL97352.2), Vip3Ah1 (número de acceso en NCBI: ABH10614.1), Vip3Ai1 (número de acceso en NCBI: AGU13858.1), Vip3Aj1 (número de acceso en NCBI: AIT93172.1), Vip3Ba1 (número de acceso en NCBI:

AAV70653.1), Vip3Bb2 (número de acceso en NCBI: ABO30520.1), Vip3Bc1, proteína cristalizada por Zheng et al. (2020)⁶⁵ (número de acceso en PDB: 6YRF) y Vip3Ca1 (número de acceso en NCBI: ADZ46178.1). Para las proteínas del grupo Vip3A, se seleccionó el dominio III según lo descrito por Núñez-Ramírez et al. (2020)²⁵, del aminoácido 325 al 536. En el caso de las proteínas Vip3B, se realizó un análisis de la estructura tridimensional de la proteína Vip3Bc1⁶⁵ y se determinó que el dominio III corresponde a los aminoácidos de 341 a 557. Por último, para la proteína Vip3Ca1, al no contar con una estructura cristalizada, se seleccionó el dominio 3 de la misma manera que para las proteínas Vip3B.

Después de seleccionar el dominio III de todas las secuencias, se realizó un alineamiento de secuencias múltiples con el programa ClustalW 2.1, en el servicio web que ofrece el Kyoto University Bioinformatics Center, en su portal web (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), con el parámetro Pairwise Alignment en SLOW/ACCURATE, y el resto de los parámetros predeterminados⁶⁶. Para visualizar el alineamiento múltiple se utilizó el programa Jalview 2.11.4.0⁶⁷. Por último, se realizó un Logo de la secuencia utilizando el programa WebLogo 3 versión 3.7.12 en su portal web (<https://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>)⁶⁸.

6 Resultados

6.1 Expresión de los fragmentos del dominio III, IV y V

Con el fin de obtener los fragmentos que abarcan los dominios III, IV y V de Vip3Aa, se realizó la expresión y purificación de los fragmentos del F4 al F10 (**Fig. 7A**), como se especifica en los materiales y métodos.

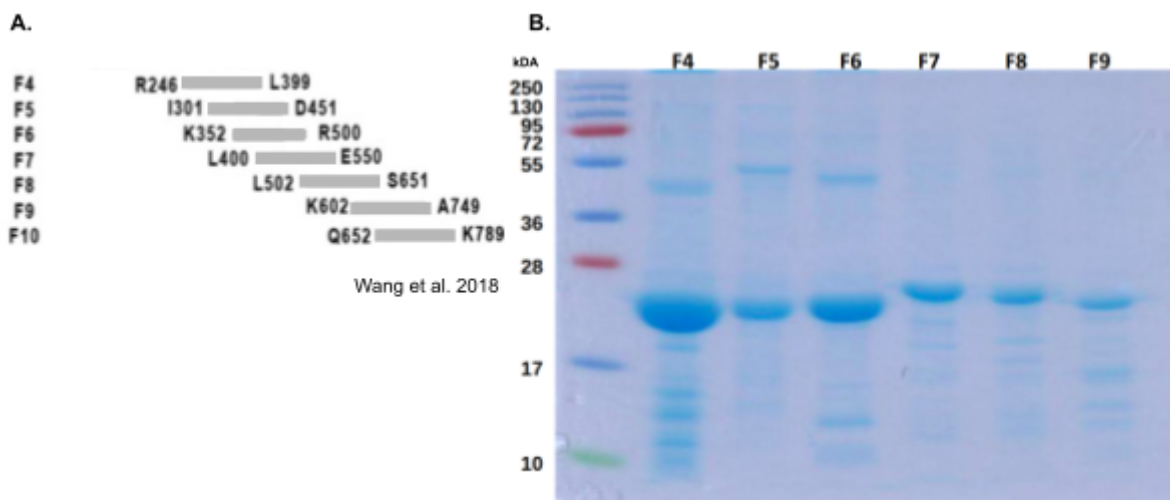


Figura 7. Fragmentos de los dominios III, IV y V. A. Longitud de los fragmentos F4 al F10. Imagen modificada de Wang et al. (2018) ³⁴ **B.** Gel SDS-PAGE que muestra la fracción de la purificación con la mayor cantidad de péptido de los fragmentos del F4 al F9.

En la imagen **Fig. 7B**, se muestra que no se obtuvo la expresión del fragmento F10 (Q652–K789), por lo que fue descartado de futuros análisis. Sin embargo, en el resto de fragmentos, del F4 al F9, se observan bandas claras con un peso aproximado de 25 kDa, lo cual se asemeja a lo previamente reportado por Wang et. al (2018) ³⁴. Aunque la purificación no es completamente óptima en los fragmentos F4, F5 y F6, los resultados obtenidos son adecuados para realizar los análisis posteriores.

6.2 Ensayo de unión de los fragmentos a BBMV

Con el propósito de identificar si alguno de los fragmentos se une a las BBMVs de *S. frugiperda*, se realizó un ensayo ELISA. En este, la fase inmóvil estuvo compuesta por las BBMVs (4.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, enriquecidas 6 veces en APN) y la fase líquida consistió en los fragmentos del F4 al F9.

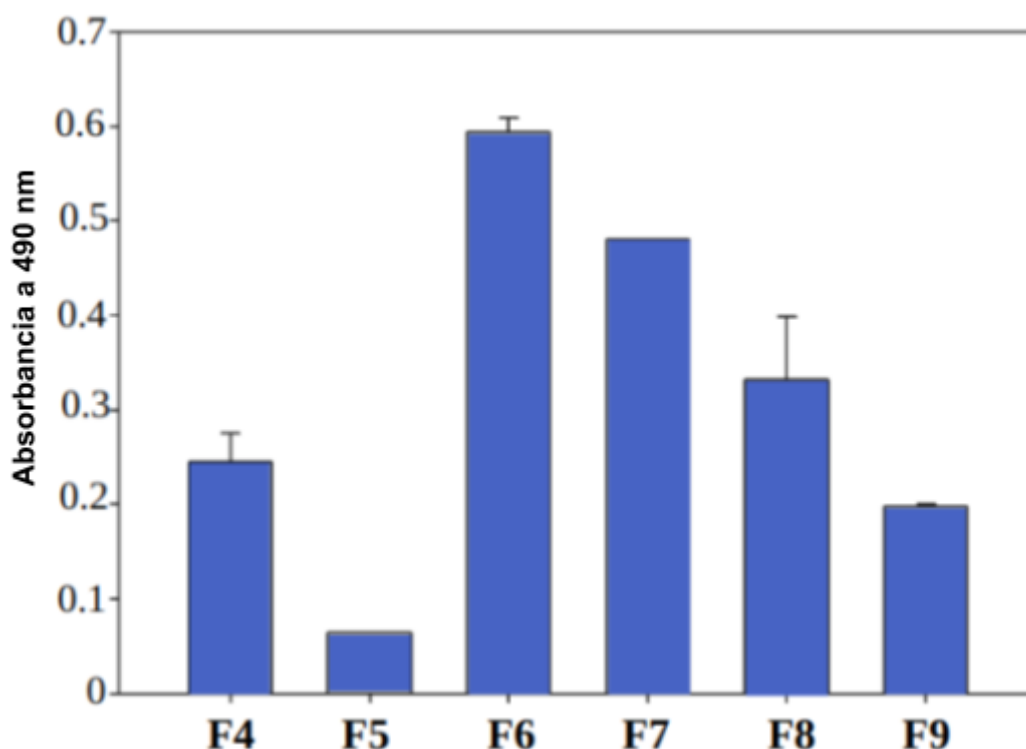


Figura 8. Ensayo de unión fragmentos con BBMVs de *S. frugiperda*. Se muestra la absorbancia de los fragmentos al estar en contacto con BBMVs de *S. frugiperda* ensayo realizado por triplicado

En la **Fig. 8** se observa que el fragmento F6 mostró una unión mayor a las BBMVs de *S. frugiperda*, seguido por los fragmentos F7 y F8. Mientras que los fragmentos F4 y F9, mostraron una unión menor. Por último, el F5 mostró una unión notablemente baja. Debido a estos resultados, nos enfocaremos en las regiones correspondientes a los fragmentos F6, F7 y F8 para estudios posteriores.

6.3 Residuos de aminoácidos expuestos al solvente

Con el objetivo de reducir los candidatos de las regiones de posible unión identificadas en el ensayo de unión, se realizó un análisis de residuos de aminoácidos expuestos al solvente, bajo la premisa de que los residuos expuestos tienen más probabilidad de interactuar con los receptores. Este análisis se realizó utilizando los 4 monómeros disponibles en la estructura cristalográfica tanto de la protoxina (PDB ID: 6TFJ), como para la toxina activada (PDB ID: 6TFK), enfocándonos únicamente en los aminoácidos que constituyen los dominios III, IV y V de Vip3Aa (325 al 789).

Para la protoxina se identificaron 133 residuos de aminoácidos expuestos al solvente, mientras que para la toxina activada son 126 residuos expuestos (**Tabla suplementaria 1 y 2**). Al contrastar ambos datos, se observó que ambas estructuras comparten un total de 118 aminoácidos expuestos al solvente. En la protoxina, 15 aminoácidos disminuyen su área expuesta al solvente por debajo del 50%, pasando a la categoría de no expuestos (**Tabla suplementaria 3**). Estos 15 aminoácidos son: S331, K339, S341, S389, K398, S405, V415, D451, K454, Y464, R465, Q495, D497, E498 y S500. Es importante destacar que todos ellos se encuentran en el dominio III (325 - 536) de Vip3Aa.

En el caso de la toxina activa, además de los 118 que comparte con la protoxina, se identificaron 8 residuos de aminoácidos adicionales que se exponen al solvente cuando se activa la protoxina: K385, T466, N522, K526, V529, S536, E656 y D751 (**Fig. 9 y Tabla 3**). De estos, tres aminoácidos están localizados en el dominio III (K385, T466 y N522), dos en el asa que conecta al dominio III con el dominio IV (K526 y V529), dos en el dominio IV (S536 y E656), y uno en el dominio V (D751).

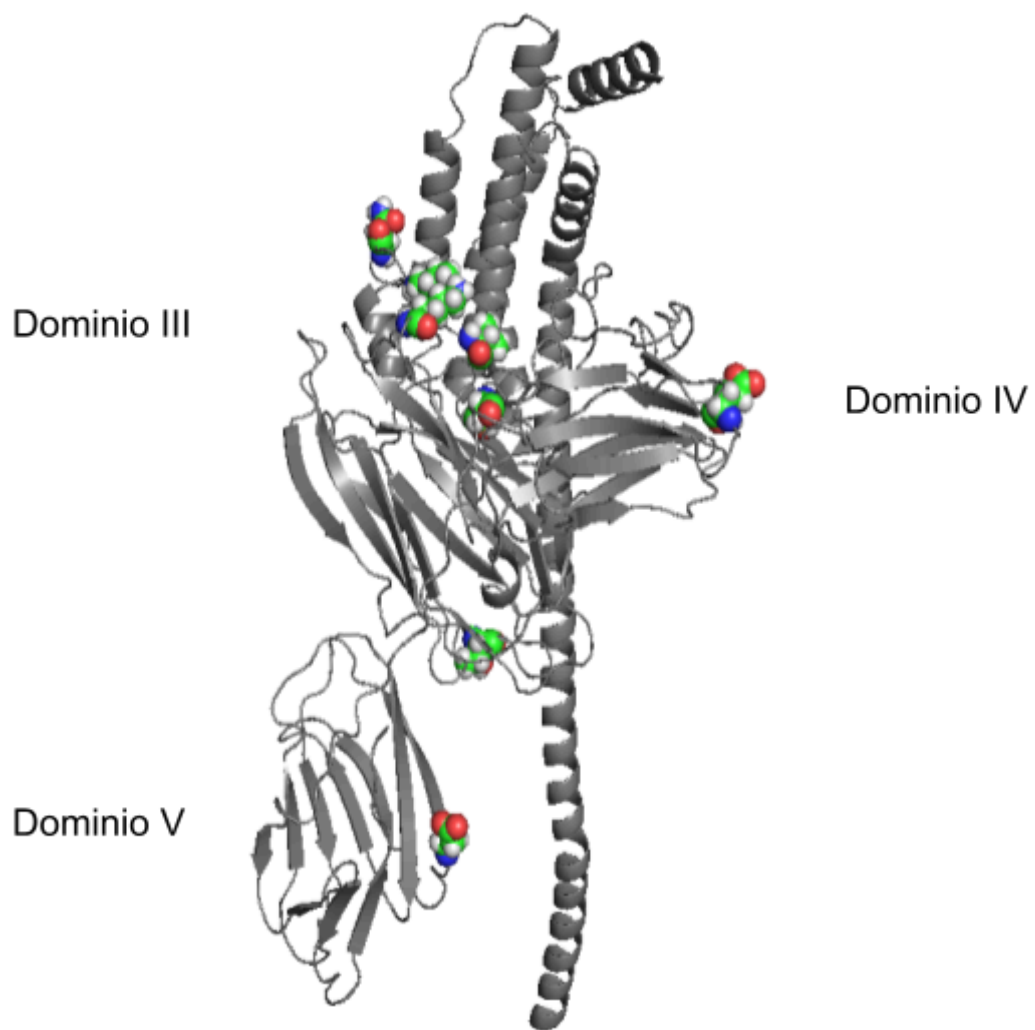


Figura 9. Aminoácidos expuestos únicamente en la toxina activada. Se muestra un monómero de la toxina activada obtenido del PDB (ID: 6TFK) y en esferas de colores los 8 aminoácidos que se exponen al activarse la protoxina. Imagen creada con PyMol versión 4.6.0.

Programa	GETAREA Protoxina	GETAREA Toxina	PDBePISA Protoxina	PDBePISA Toxina
No. Aminoácido	Porcentaje del área expuesta (%)	Porcentaje del área expuesto (%)	Área accesible (Å ²)	Área accesible (Å ²)
K385	31.2	61.2	55.6	112.97
T466	44.7	51.1	48.88	61.49
N522	43.5	76.8	58.88	107.71
K526	34.2	74.0	61.17	129.01
V529	0	75.7	2.21	96.76
S536	17.4	54.4	39.67	39.81
E656	48.7	50.0	73.13	77.43
N751	48.8	50.0	82.32	83.43

Tabla 3. Aminoácidos que se exponen al activarse la protoxina. Se muestran los aminoácidos que al activarse la protoxina aumentan su porcentaje de superficie expuesta al solvente a más del 50% según datos obtenidos con el programa GETAREA. Asimismo, se muestra el área expuesta al solvente en Å² determinada mediante el programa PDBePISA.

6.4 Sitio de interacción

Al visualizar estos 8 aminoácidos en la estructura tridimensional de Vip3Aa, se observa que tres de ellos, K385, K526 y V529, se localizan en la misma región. El aminoácido K385 está ubicado en el asa β 5- β 6, mientras que K526 y V529 se encuentran en el asa α 11- β 16, que conecta el dominio III con el dominio IV.

Al medir la distancia entre estos tres residuos en la protoxina y la toxina activada, se observa que K385 se aproxima a V529, pasando de 11.1 Å en la

protoxina a 9.0 Å en la toxina activada, y a K526, pasando de 8.8 Å a 4.8 Å. Por otro lado, los residuos K526 y V529 se aproximan de 14.7 Å a 9.1 Å. Estas medidas se tomaron considerando como punto de referencia el último carbono de cada residuo (Fig. 10).

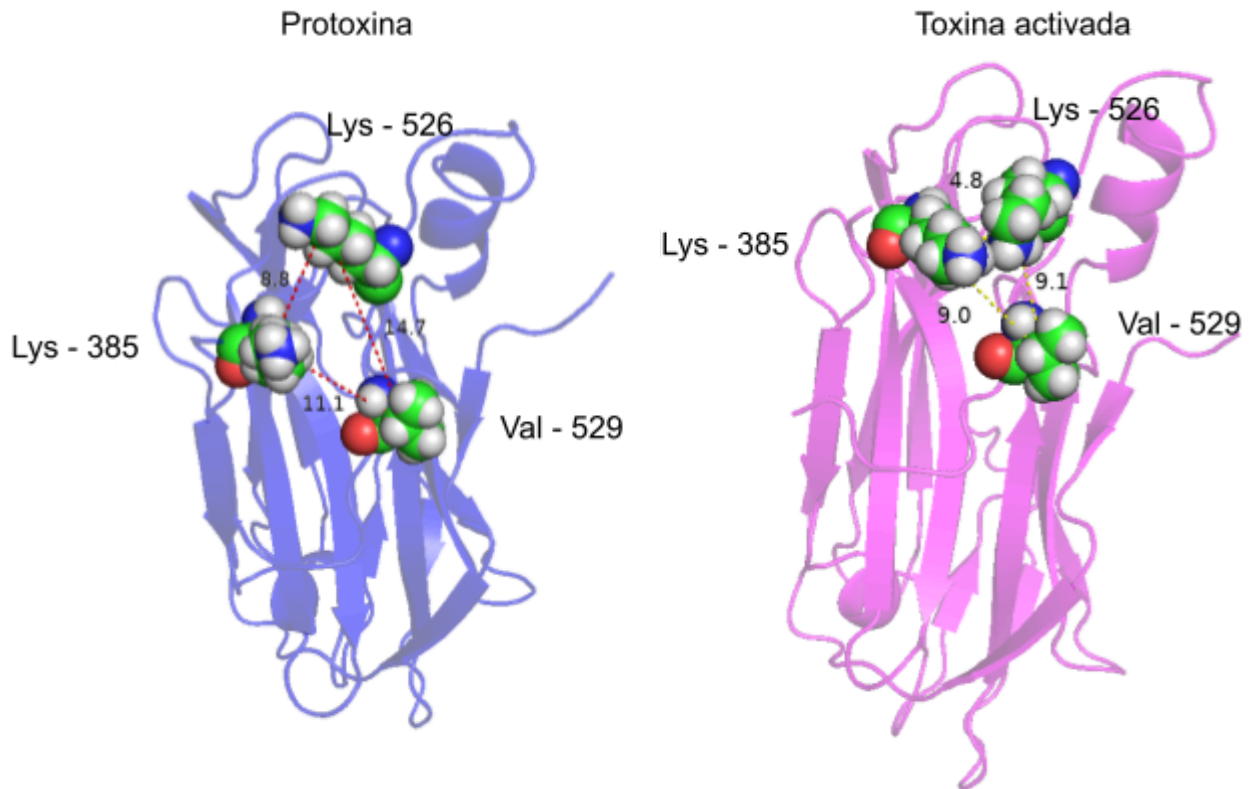


Figura 10. Sitio de interacción en el dominio III. Se muestra la distancia entre los aminoácidos K385, K526 y V529, en la protoxina (PDB: 6TFJ) y la toxina activada (PDB: 6TFK). Protoxina, K385 a K526 8.8 Å, K385 a V529 11.1 Å y de K526 a V529 14.7 Å. Toxina activada, K385 a K526 4.8 Å, K385 a V529 9.0 Å y de K526 a V529 9.1 Å. Imagen creada con PyMol versión 4.6.0.

6.5 Variantes de Vip3Aa

Para evaluar si los 8 residuos de aminoácidos que se exponen al activarse la protoxina participan en la unión a las vesículas de *S. frugiperda*, se generaron mutaciones sitio-dirigidas, como se describe en la sección de materiales y métodos. Además, se diseñó un mutante triple en dos etapas, que incluye los aminoácidos K385, K526 y V529, los cuales conforman el sitio de interacción identificado (**Fig. 11**).

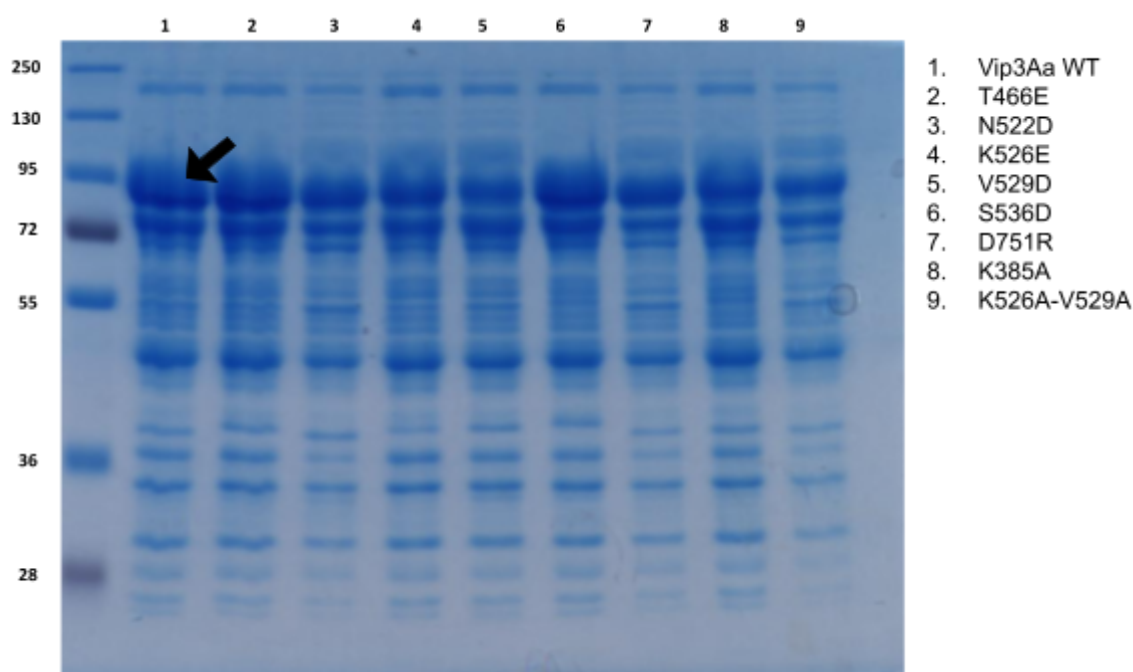


Figura 11. Expresión de las variantes de Vip3Aa. Gel SDS-Page mostrando la expresión de las diferentes variantes de Vip3Aa. La flecha negra indica la banda correspondiente a la protoxina Vip3Aa WT.

De las 10 variantes propuestas, se lograron obtener 8: T466E, N522D, K526E, V529D, S536D, D751R, K385A y la mutante doble K526A-V529A. Las variantes K385E, E656K y la mutante triple K385A-K526A-V529A no pudieron generarse, por lo que se descartaron de análisis posteriores. Las variantes obtenidas mostraron una expresión comparable a la proteína silvestre, la banda de la protoxina se observa en todas las proteínas con un peso molecular aproximado de 93 kDa. Estos resultados sugieren que las mutaciones introducidas no afectan la expresión de la proteína.

6.6 Bioensayo

Para evaluar el impacto de las variantes en la toxicidad de Vip3Aa, se realizaron bioensayos contra neonatos de *S. frugiperda*, como se describe en la sección de materiales y métodos. Las variantes K385A, K526E y V529D mostraron una reducción en la toxicidad, con factores de disminución de 73, 78 y 66 veces, respectivamente, en comparación con la toxina Vip3Aa silvestre. De la misma forma, las mutantes K526A y V529A presentaron factores de reducción menores, de 10 y 6, respectivamente, mientras que la mutante doble K526A-V529A mostró una reducción de la toxicidad 20 veces mayor respecto a la proteína silvestre.

Por otro lado, las variantes T466E, N522D, S536D y D751R mostraron niveles similares de toxicidad a los de Vip3Aa silvestre. Estos resultados sugieren que los aminoácidos K385, K526 y V529 desempeñan un papel clave en la toxicidad de Vip3Aa frente a *S. frugiperda*.

Proteína	LC₅₀ en ng/cm² (95 % límites fiduciales)	Factor de reducción de la toxicidad
Vip3Aa	15 (11-18)	
Vip3AaK385A	1100 (700-3700)	73
Vip3AaT466E	13 (9-17)	
Vip3AaN522D	13 (8-18)	
Vip3AaK526E	1180 (800-3000)	78
Vip3AaK526A	150 (120-180)	10
Vip3AaV529D	1000 (800-2000)	66
Vip3AaV529A	100 (63-140)	6
Vip3AaK526A-V529A	300 (200-300)	20
Vip3AaS536D	11 (7-14)	
Vip3AaD751R	19 (13-26)	

Tabla 4. Toxicidad de mutantes. La concentración letal media (LC₅₀) para las 10 mutantes creadas con los intervalos de confianza.

6.7 Proteólisis de las variantes.

A partir de los resultados del bioensayo, identificamos cuatro variantes que presentan una disminución en la toxicidad de la proteína Vip3Aa. Para confirmar que la activación de estas variantes es similar a la proteína silvestre, se llevó a cabo el proceso de activación con tripsina, según lo descrito en la sección de materiales y métodos.

Las variantes exhibieron un patrón de proteólisis similar a la proteína silvestre. En todas las variantes de Vip3Aa se observó una banda nítida de 66 kDa correspondiente a la toxina activa, lo que confirma que estas sustituciones no tienen un efecto en la activación de la protoxina (**Fig. 12**).

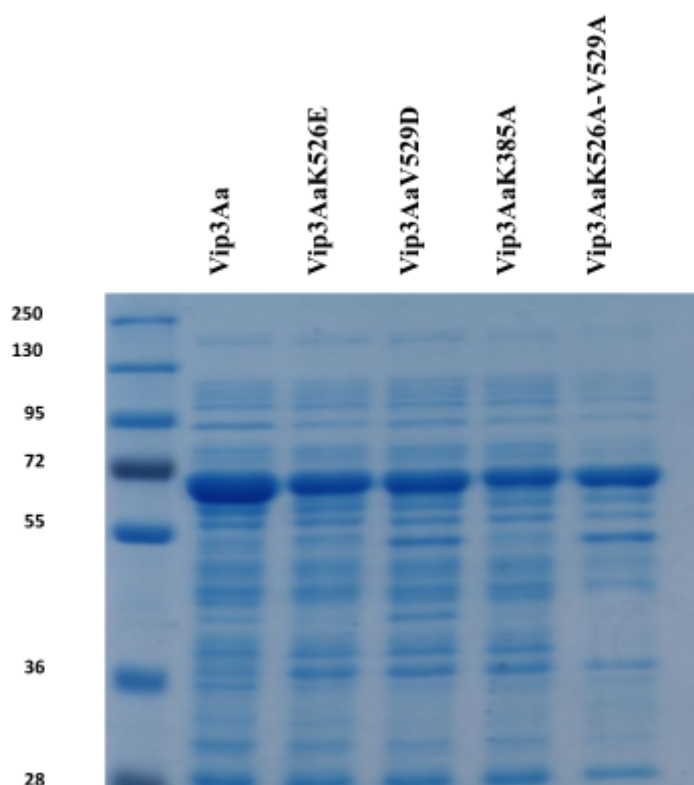


Figura 12. Activación de las variantes de Vip3Aa. Gel SDS-PAGE mostrando la activación de las variantes que tienen un efecto en la toxicidad de Vip3Aa con tripsina.

6.8 Ensayo de unión de las variantes a BBMV

Con el propósito de determinar si las variantes afectadas en la toxicidad también presentan alteraciones en la unión a las vesículas de *S. frugiperda*, se llevó a cabo un ensayo de unión contra las BBMV de *S. frugiperda*, siguiendo los procedimientos descritos en la sección de materiales y métodos. Las diferentes proteínas fueron previamente marcadas con biotina (**Fig. 13A**), las variantes mostraron un patrón de bandeo similar a la proteína silvestre.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de estas proteínas para unirse a las BBMV (**Fig. 13B**). Se observó que las variantes no mostraron ninguna interacción con las vesículas de *S. frugiperda*, en comparación con la toxina activa silvestre. Esto sugiere que la disminución en su toxicidad de estas variantes se debe a una afectación en la capacidad de unión a los receptores presentes en el tejido epitelial del intestino medio de *S. frugiperda*.

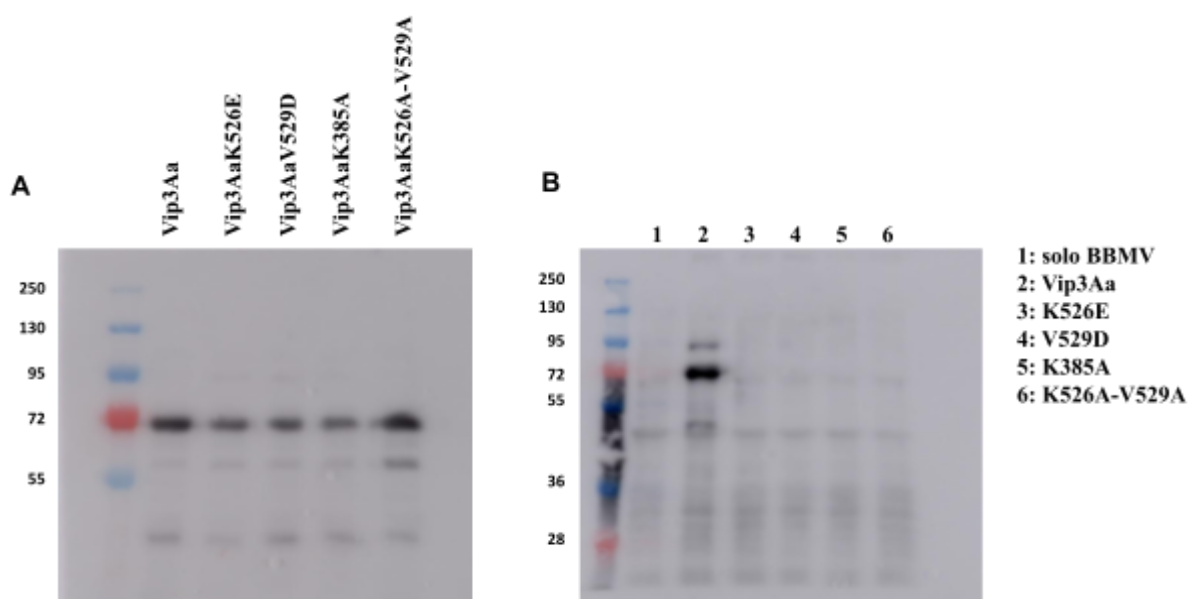


Figura 13. Ensayo de unión de las variantes con BBMV de *S. frugiperda*. **A.** Marcateo de la proteína activada Vip3Aa silvestre y sus mutantes afectadas en toxicidad. **B.** Ensayo de unión de las proteínas activas marcadas con biotina con BBMV de *S. frugiperda*.

6.9 Análisis de la conservación del sitio de interacción en la familia Vip3

Al identificar que este sitio de interacción tiene un efecto en la toxicidad de la proteína Vip3Aa11, se evaluó si los aminoácidos involucrados están conservados en otras proteínas de la familia Vip3, dado que cada proteína Vip3 muestra especificidad hacia diferentes especies de insectos lepidópteros ²². Para ello, se realizó un alineamiento de secuencias múltiple utilizando las secuencias del dominio III de las siguientes proteínas: Vip3Aa1, Vip3Aa11, Vip3Aa16, Vip3Ab1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1, Vip3Ag2, Vip3Ah1, Vip3Ai1, Vip3Aj1, Vip3Ba1, Vip3Bb2 y Vip3Bc1. Los números de acceso correspondientes se encuentran en la sección correspondiente de materiales y métodos. En la **Figura 14 A y B**, se pueden observar las dos regiones que tienen los aminoácidos que conforman el sitio de interacción.

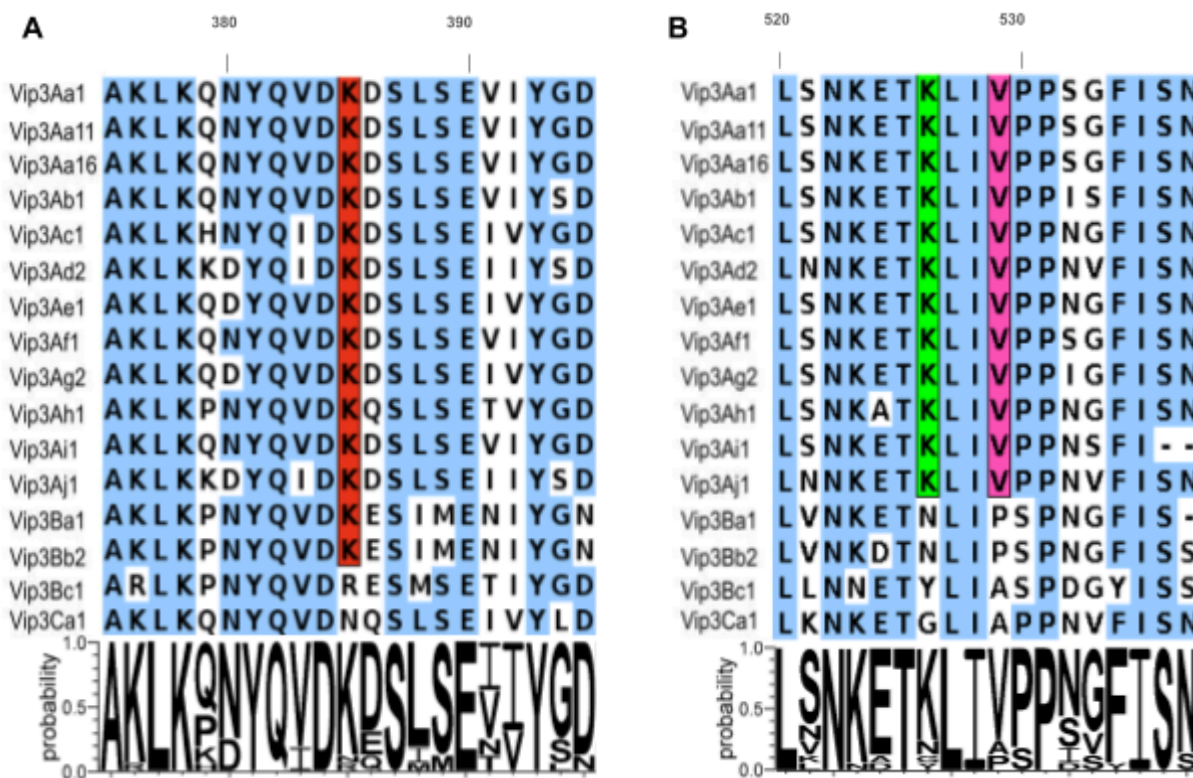


Figura 14. Alineamiento múltiple de las secuencias del dominio III de las toxinas Vip3. Utilizando el algoritmo ClustalW, se realizó un alineamiento múltiple de los dominios 3 de las siguientes secuencias, Vip3Aa1, Vip3Aa11, Vip3Aa16, Vip3Ab1, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1, Vip3Ag2, Vip3Ah1, Vip3Ai1, Vip3Aj1, Vip3Ba1, Vip3Bb2 y Vip3Bc1. El color azul indica que al menos el 70% de las secuencias comparten el aminoácido. **A.** Se muestra la región cercana al aminoácido K385, marcado en rojo. **B.** Se muestra la región cercana a los aminoácidos K526 en verde y V529 en rosa. El número del aminoácido corresponde al de la proteína Vip3Aa16.

El alineamiento de estas secuencias mostró que todas las proteínas, excepto las Vip3Bc1 y Vip3Ca1, presentan el aminoácido K385 (**Fig. 14A**). Según la estructura de Vip3Aa16, descrita por Núñez-Ramírez et al. (2020)²⁵, este aminoácido se encuentra entre las láminas $\beta 5$ y $\beta 6$. En cuanto a los aminoácidos K526 y V529 (**Fig. 14B**), se observa que únicamente las proteínas del grupo Vip3A presentan estos residuos en el asa entre la hélice $\alpha 11$ y la lámina $\beta 16$, una región que conecta los dominios III y IV. Por el contrario, las toxinas Vip3B no contienen este par de aminoácidos en dicha región.

7 Discusión

Las toxinas Vip3A, son proteínas compuestas por 5 dominios estructurales, que tienen un efecto insecticida en insectos del orden Lepidoptera¹³. Aunque se han propuesto algunos receptores^{8,44-46}, el mecanismo de acción de estas proteínas sigue siendo una incertidumbre. Nuestro estudio contribuye al entendimiento de este mecanismo al identificar regiones clave para la interacción con receptores en el intestino medio de *S. frugiperda*. Este conocimiento no solo amplía nuestra comprensión del funcionamiento de las toxinas Vip3A, sino que también podría tener implicaciones en la optimización de estrategias para el control de plagas.

Los dominios III, IV y V de Vip3Aa, desempeñan roles clave en la interacción con componentes del intestino medio de insectos lepidópteros. Estudios previos han señalado al dominio III como esencial para la unión a receptores de *S. frugiperda*, mientras que los dominios IV y V podrían tener funciones adicionales relacionadas con la toxicidad^{19,25,47}.

Los dominios III, IV y V de Vip3A, tienen una similitud estructural con los dominios II y III de las endotoxinas Cry, los cuales están asociados con la unión a receptores del intestino medio de diferentes insectos²⁵. Esto sugiere que estos dominios de Vip3A de igual forma tienen un papel en la unión a receptores. Gracias a diferentes ensayos de unión entre Vip3Aa y Vip3Af a vesículas de membrana del intestino medio de *S. frugiperda*, se ha reportado que el dominio III es esencial para esta unión, mientras que, en el caso de Vip3Aa el dominio V está involucrado a la unión con la membrana peritrófica¹⁹. De igual manera, un análisis con la proteína Vip3Af mostró que el dominio III está involucrado con la unión a BBMV de *S. frugiperda*, mientras que los dominios IV y V no se unen a estas vesículas⁴⁷.

7.1 Unión del dominio III a BBMV

Se llevó a cabo un ensayo de unión utilizando fragmentos de polipéptidos de 150 aminoácidos, que se solapan entre sí, cubriendo los dominios III, IV y V de Vip3Aa, para evaluar su interacción con las BBMV de *S. frugiperda*. Con este

análisis, se identificó que la región correspondiente a los fragmentos F6, F7 y F8 (**Fig. 8**), que abarcan los aminoácidos 352 a 550, presenta la mayor interacción con las vesículas. Estos fragmentos están ubicados dentro del dominio III, que comprende del aminoácido 325 al 536. Estos resultados corroboran que el dominio III desempeña un papel clave en la unión de la proteína Vip3Aa a las vesículas del intestino medio de *S. frugiperda*, lo cual es consistente con reportes previos sobre las toxinas Vip3Aa y Vip3Af^{19,47},

Sin embargo, se observó un nivel menor de interacción en el fragmento F9 correspondiente a los dominios IV y parte del V, lo que sugiere que estos dominios podrían contribuir parcialmente a la unión. Además, debido a que no fue posible expresar el fragmento F10, que cubre una región del dominio V, no se puede descartar la posibilidad de que este dominio también esté involucrado en la interacción con receptores de la membrana epitelial. Por lo tanto, aunque el dominio III tiene un rol predominante en la unión, el papel de los dominios IV y V en este proceso merece ser explorado más a fondo.

7.2 Residuos de aminoácidos expuestos en la toxina activada

Gracias a una investigación en curso en el laboratorio, con datos próximos a ser publicados, se determinó que, tras la activación de la protoxina de Vip3Aa, la toxina activa presenta una mayor capacidad de unión a las BBMV de *S. frugiperda*. Al realizar un análisis de los residuos de aminoácidos expuestos al solvente en ambas estructuras, encontramos que los dominios III, IV y V comparten 118 residuos expuestos. Sin embargo, 15 de estos residuos están expuestos solo en la protoxina, mientras que 8 se exponen únicamente tras la activación (**Fig. 9**), lo que podría explicar el aumento en la capacidad de unión a las BBMV de la toxina activa en comparación con la protoxina.

Cinco de estos residuos, K385, T466, N522, K526 y V529, se localizan en el dominio III de la toxina Vip3Aa, y, considerando los resultados del ensayo de unión, podrían tener un papel más relevante en la interacción con los receptores. Sin

embargo, los tres aminoácidos restantes, S536, E656 y D751, aunque no forman parte del dominio III, también se exponen tras la activación. Al ser residuos de aminoácidos que se exponen sólo tras la activación de la protoxina, estos ocho residuos de aminoácidos tienen una mayor probabilidad de estar involucrados en la interacción con los receptores presentes en el intestino medio del insecto.

7.3 Sitio de interacción en el dominio III

Dentro de estos ocho aminoácidos, tres de ellos, K385, K526 y V529, se localizan en una misma región, formando un posible sitio de interacción. El aminoácido K385 está situado en el asa entre las láminas $\beta 5$ y $\beta 6$, una región orientada en dirección opuesta a la posición de la membrana celular. Por otro lado, K526 y V529 pertenecen a un asa entre la hélice $\alpha 11$ y la lámina $\beta 16$, que conecta los dominios III y IV. Aunque forman parte de esta conexión, estos dos aminoácidos están orientados cerca del asa que contiene a K385, consolidándose dentro del dominio III. Al comparar las estructuras de la protoxina y la toxina activada, se observa que las cadenas laterales de estos aminoácidos se aproximan entre sí tras la activación de la protoxina (**Fig. 10**).

Dada la similitud estructural del dominio III de Vip3Aa y el dominio II de las toxinas Cry, se analizó si las asas expuestas de Vip3Aa, ubicadas en el vértice de la estructura del beta-prisma, están involucradas en la unión, como es el caso de las toxinas Cry⁶⁹. Hou et al. (2024)⁶⁹, mostraron que las asas entre las láminas $\beta 4$ - $\beta 5$ y $\beta 14$ - $\beta 15$ afectan la toxicidad y la unión de Vip3Aa, de manera similar a lo que se ha reportado para las asas del dominio II de las toxinas Cry⁷⁰⁻⁷³. Sin embargo, el sitio de interacción caracterizado en este trabajo no se encuentra en el vértice del beta-prisma, sino en la parte superior. Estos datos sugieren que la unión de Vip3Aa a su receptor podría involucrar múltiples regiones del dominio III, y posiblemente también del dominio IV o V. Sin embargo, se requiere más investigación para identificar con precisión todas las regiones implicadas en este proceso.

7.4 Sustituciones de aminoácidos en la proteína silvestre

Para evaluar si alguno de los aminoácidos que se exponen exclusivamente en la toxina activada tienen un efecto en la toxicidad de la proteína, se realizaron bioensayos contra neonatos de *S. frugiperda* (**Tabla 3**). Los resultados mostraron que, la mayoría de casos, estas sustituciones no alteran la toxicidad de Vip3Aa. Sin embargo, tres aminoácidos, K385, K526 y V529, que forman parte del sitio de interacción propuesto, sí presentaron una disminución en la toxicidad comparada con la proteína silvestre. Cada una de estas sustituciones resultó en una reducción evidente de la toxicidad, lo que sugiere que estos aminoácidos son esenciales para la actividad insecticida de Vip3Aa en *S. frugiperda*. Este resultado contrasta con un estudio previo en el que la sustitución de estas mismas posiciones por alaninas no afectó la toxicidad, aunque es importante señalar que dicho estudio se realizó con Vip3Af, no con Vip3Aa ⁵⁴.

La sustitución de estos aminoácidos no tiene un efecto ni en la expresión de la proteína (**Fig. 11**), ni en la activación de la protoxina corroborada por el patrón de bandeo por corte proteolítico de tripsina (**Fig. 12**). No obstante, un ensayo de unión realizado entre estas variantes de Vip3Aa afectadas en toxicidad y las BBMV de *S. frugiperda* (**Fig. 13B**) reveló que dichas variantes no presentan interacción con las vesículas. Este resultado indica que los aminoácidos K385, K526 y V529 desempeñan un papel crucial en la interacción entre la proteína y los receptores del intestino medio de *S. frugiperda*. La ausencia de esta interacción explica la disminución de la toxicidad observada en las variantes de Vip3Aa..

7.5 Conservación del sitio de interacción en la familia Vip3A

Durante este estudio, se utilizó la información estructural de la proteína Vip3Aa16 (No. Acceso NCBI: AAW65132.1), aunque el análisis de las variantes se llevó a cabo utilizando la proteína Vip3Aa11 (No. Acceso NCBI: AAR36859.1), que comparten un 99.87% de identidad. Debido a la alta similitud entre ambas proteínas,

proponemos que la toxicidad se vería afectada en ambos casos al sustituir los aminoácidos K385, K526 y V529.

Para determinar si estos aminoácidos están presentes en otras proteínas, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias del dominio III de la familia Vip3, principalmente de Vip3A, pero también se incluyeron algunas proteínas Vip3B y una Vip3C (**Fig. 14**). En el grupo de proteínas Vip3A, que comparten una identidad del 76% al 94%, estos tres aminoácidos se encuentran conservados en todas las proteínas analizadas. Por lo tanto, podríamos postular que estos aminoácidos desempeñan un papel común en la familia de proteínas Vip3A en cuanto a la unión a receptores en el intestino medio. Sin embargo, dado que las proteínas Vip3A afectan a más de un tipo de insecto, como se ha reportado, es necesario verificar si la variación de este sitio de interacción produce el mismo efecto en todos los insectos afectados o si es específico para *S. frugiperda*.

7.6 Mecanismo de acción de Vip3Aa

Tomando en cuenta los resultados de este trabajo, la exposición de estos tres aminoácidos al solvente, la nula unión a BBMVs de *S. frugiperda* y la conservación de estos aminoácidos a lo largo de la familia de proteínas Vip3A, junto con el conocimiento sobre el modelo de acción de las toxinas Cry⁶⁹⁻⁷³, proponemos que este sitio de interacción es el primer evento de unión entre la toxina activada y los receptores de la membrana epitelial de *S. frugiperda*. Es necesario continuar la investigación para identificar el resto de regiones involucradas en esta interacción, las cuales podrían encontrarse en el dominio III, pero también podrían estar presentes en los dominios IV y V.

Los hallazgos obtenidos en este estudio sugieren que la activación de la protoxina de Vip3Aa resulta en la exposición de tres aminoácidos (K385, K526 y V529) al solvente, los cuales forman un sitio de interacción en las asas del dominio III. Este sitio de interacción es crucial, ya que la toxina activada muestra una mayor afinidad por las BBMVs de *Spodoptera frugiperda*, lo que respalda la hipótesis de que la activación de la toxina facilita la unión a los receptores. En consecuencia, la exposición de este sitio permite una mayor interacción con los receptores, lo que, a

su vez, podría favorecer la inserción de la toxina en la membrana celular e inducir la formación del poro, proceso fundamental para su actividad biológica.

8 Conclusiones

La activación de la protoxina Vip3Aa expone un sitio de interacción en las asas del dominio III, conformado por tres aminoácidos (K385, K526 y V529). La mutación de estos aminoácidos provoca una disminución en la toxicidad frente a neonatos de *S. frugiperda* y una falta de unión a las BBMV de *S. frugiperda*, confirmando que este sitio es esencial para la interacción con los receptores del intestino medio.

Proponemos que este sitio de interacción es el primer punto de contacto entre la toxina activada y sus receptores. Esta interacción inicial podría facilitar subsecuentes interacciones a lo largo del dominio, contribuyendo a la acción tóxica de la proteína. Además, sugerimos que la activación de la toxina es crucial para la interacción con los receptores de la membrana del intestino medio de *Spodoptera frugiperda*, lo que lleva a la inserción en la membrana y, finalmente, a la muerte del insecto.

Los resultados obtenidos abren nuevas perspectivas para entender el mecanismo de acción de Vip3Aa y, en consecuencia, para el diseño de estrategias más efectivas para el control de plagas. Sin embargo, es necesario continuar con la investigación para identificar otras regiones involucradas en la interacción, tanto dentro del dominio III como en los dominios IV y V, y explorar la variabilidad del mecanismo en diferentes insectos afectados por las toxinas de la familia Vip3.

9 Referencias

1. Sabzevari, S. & Hofman, J. A worldwide review of currently used pesticides' monitoring in agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 812, 152344 (2022).
2. Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M. & Bulla, L. A. *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioeng. Bugs* 1, 31–50 (2010).
3. Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P. & Hens, L. Chemical Pesticides and Human Health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health* 4, (2016).
4. Bravo, A. & Soberón, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* 26, 573–579 (2008).
5. Sparks, T. C. & Nauen, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 122–128 (2015).
6. Bravo, A. & Soberón, M. Can microbial-based insecticides replace chemical pesticides in agricultural production? *Microb. Biotechnol.* 16, 2011–2014 (2023).
7. Alejandra Bravo, Mario Soberon, Esperanza Martínez Romero, & Julio César Martínez Romero. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. in *Microbios en Línea*. (UNAM, Coordinación Científica, México, 2001).
8. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. & Caballero, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins* 6, 3296–3325 (2014).
9. Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D. & Crickmore, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* 18, 189–194 (2010).
10. Raymond, B. & Federici, B. A. In defence of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity—a response to EFSA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, (2017).
11. Bel, Y., Banyuls, N., Chakroun, M., Escriche, B. & Ferré, J. Insights into the structure of the Vip3Aa insecticidal protein by protease digestion analysis. *Toxins* 9, 131 (2017).
12. Abbas, M. S. T. Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops)

- and the world controversy on their safety. *Egypt. J. Biol. Pest Control* 28, 52 (2018).
13. Crickmore, N. et al. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 186, 107438 (2021).
 14. Pacheco, S. et al. Rearrangement of N-Terminal α -Helices of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin essential for oligomer assembly and toxicity. *Toxins* 12, 647 (2020).
 15. Chakrabarty, S., Jin, M., Wu, C., Chakraborty, P. & Xiao, Y. *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. *Pest Manag. Sci.* 76, 1612–1617 (2020).
 16. Bravo, A., Gill, S. S. & Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435 (2007).
 17. Liao, C. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin and activated toxin exert differential toxicity due to a synergistic interplay of Cadherin with ABCC transporters in the cotton bollworm. *Appl. Environ. Microbiol.* 88, e02505-21 (2022).
 18. Pardo-López, L., Soberón, M. & Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 3–22 (2013).
 19. Jiang, K. et al. Functional characterization of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* reveals the contributions of specific domains to its insecticidal activity. *J. Biol. Chem.* 299, 103000 (2023).
 20. Byrne, M. J. et al. Cryo-EM structures of an insecticidal Bt toxin reveal its mechanism of action on the membrane. *Nat. Commun.* 12, 2791 (2021).
 21. Estruch, J. J. et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 5389–5394 (1996).
 22. Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B. & Ferré, J. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 329–350 (2016).
 23. Mesrati, L. A., Tounsi, S. & Jaoua, S. Characterization of a novel vip3 -type gene from

- Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. FEMS Microbiol. Lett. 244, 353–358 (2005).
24. Haldenwang, W. G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev. 59, 1–30 (1995).
 25. Núñez-Ramírez, R. et al. Molecular architecture and activation of the insecticidal protein Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis*. Nat. Commun. 11, 3974 (2020).
 26. Jiang, K. et al. Structural and functional insights into the C-terminal fragment of insecticidal Vip3A toxin of *Bacillus thuringiensis*. Toxins 12, 438 (2020).
 27. Gupta, M., Kumar, H. & Kaur, S. Vegetative insecticidal protein (Vip): A potential contender from *Bacillus thuringiensis* for efficient management of various detrimental agricultural pests. Front. Microbiol. 12, 659736 (2021).
 28. Chakroun, M. & Ferré, J. *In Vivo* and *In Vitro* binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by ¹²⁵I radiolabeling. Appl. Environ. Microbiol. 80, 6258–6265 (2014).
 29. Lee, M. K., Walters, F. S., Hart, H., Palekar, N. & Chen, J.-S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -Endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4648–4657 (2003).
 30. Sanchis, V. & Bourguet, D. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. Agron. Sustain. Dev. 28, 11–20 (2008).
 31. Soberón, M., Bravo, A. & Blanco, C. A. Strategies to reduce insecticide use in agricultural production. in Reference Module in Food Science B9780081005965030638 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.03063-8.
 32. Tabashnik, B. E., Fabrick, J. A. & Carrière, Y. Global patterns of insect resistance to transgenic Bt crops: The First 25 Years. J. Econ. Entomol. 116, 297–309 (2023).
 33. Chakroun, M. et al. Characterization of the resistance to Vip3Aa in *Helicoverpa armigera* from Australia and the role of midgut processing and receptor binding. Sci. Rep. 6, 24311 (2016).
 34. Wang, Z. et al. Specific binding between *Bacillus thuringiensis* Cry9Aa and Vip3Aa

- toxins synergizes their toxicity against Asiatic rice borer (*Chilo suppressalis*). J. Biol. Chem. 293, 11447–11458 (2018).
35. Junaid, M. & Gokce, A. Global Agricultural Losses and their causes. *Bull. Biol. Allied Sci. Res.* **2024**, 66 (2024).
 36. Yainna, S. et al. The evolutionary process of invasion in the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Sci. Rep.* 12, 21063 (2022).
 37. Shan, Y. et al. Sf-FGFR and Sf-SR-C are not the receptors for Vip3Aa to exert insecticidal toxicity in *Spodoptera frugiperda*. *Insects* 13, 547 (2022).
 38. Prasanna, B. M. et al. Host plant resistance for fall armyworm management in maize: relevance, status and prospects in Africa and Asia. *Theor. Appl. Genet.* 135, 3897–3916 (2022).
 39. J.E Smith (2021). Gusano Cogollero *Spodoptera Frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural.
https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/635234/Gusano_cogollero_en_ma_z_y_arroz.pdf.
 40. Zhang, J. et al. Proteolytic activation of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa protein by *Spodoptera exigua* midgut protease. *Int. J. Biol. Macromol.* 107, 1220–1226 (2018).
 41. Lázaro-Berenguer, M. et al. Structural and functional role of Domain I for the insecticidal activity of the Vip3Aa protein from *Bacillus thuringiensis*. *Microb. Biotechnol.* 15, 2607–2618 (2022).
 42. Jiang, K. et al. A strategy to enhance the insecticidal potency of Vip3Aa by introducing additional cleavage sites to increase its proteolytic activation efficiency. *Eng. Microbiol.* 3, 100083 (2023).
 43. Singh, G., Sachdev, B., Sharma, N., Seth, R. & Bhatnagar, R. K. Interaction of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with Ribosomal S2 Protein Triggers larvicidal activity in *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7202–7209 (2010).
 44. Jiang, K. et al. Fibroblast growth factor receptor, a novel receptor for vegetative insecticidal protein Vip3Aa. *Toxins* 10, 546 (2018).

45. Jiang, K. et al. Scavenger receptor-C acts as a receptor for *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa and mediates the internalization of Vip3Aa via endocytosis. *PLOS Pathog.* 14, e1007347 (2018).
46. Jin, M. et al. Downregulation of a transcription factor associated with resistance to Bt toxin Vip3Aa in the invasive fall armyworm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120, e2306932120 (2023).
47. Quan, Y., Lázaro-Berenguer, M., Hernández-Martínez, P. & Ferré, J. Critical domains in the specific binding of radiolabeled Vip3Af insecticidal protein to brush border membrane vesicles from *Spodoptera spp.* and cultured insect cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e01787-21 (2021).
48. Rodríguez-de La Noval, C. et al. Functional expression of a peritrophin A-like SfPER protein is required for larval development in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Sci. Rep.* 9, 2630 (2019).
49. Pigeyre, L. et al. Interaction of a *Densovirus* with glycans of the peritrophic matrix mediates oral infection of the Lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*. *Viruses* 11, 870 (2019).
50. Boukedi, H. et al. Overproduction of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin and study of its insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*. *J. Invertebr. Pathol.* 127, 127–129 (2015).
51. Jiang, K. et al. Vip3Aa induces apoptosis in cultured *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. *Toxicon* 120, 49–56 (2016).
52. Nimsanor, S., Srisaisup, M., Jammor, P., Promdonkoy, B. & Boonserm, P. Intracellular localization and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa against *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. *J. Invertebr. Pathol.* 171, 107340 (2020).
53. Banyuls, N., Quan, Y., González-Martínez, R. M., Hernández-Martínez, P. & Ferré, J. Effect of substitutions of key residues on the stability and the insecticidal activity of Vip3Af from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 186, 107439 (2021).
54. Banyuls, N., Hernández-Rodríguez, C. S., Van Rie, J. & Ferré, J. Critical amino acids for

- the insecticidal activity of Vip3Af from *Bacillus thuringiensis*: Inference on structural aspects. *Sci. Rep.* 8, 7539 (2018).
55. Fu, B.-W. et al. Stability is essential for insecticidal activity of Vip3Aa toxin against *Spodoptera exigua*. *AMB Express* 12, 92 (2022).
 56. Chi, B. et al. *In Silico* structure-based identification and validation of key residues of Vip3Aa involving in Lepidopteran brush border receptor binding. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187, 1448–1459 (2019).
 57. Tabashnik, B. E. & Carrière, Y. Evaluating cross-resistance between Vip and Cry toxins of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 113, 553–561 (2020).
 58. Wei, J., Zhang, Y. & An, S. The progress in insect cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 102, e21547 (2019).
 59. Wolfersberger, M. et al. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 86, 301–308 (1987).
 60. Fraczkiwicz, R. & Braun, W. Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *J. Comput. Chem.* 19,.
 61. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774–797 (2007).
 62. Schrödinger, L., D., W. The PyMOL molecular graphics system. LLC (2020).
 63. Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.net/ij/>, 1997-2018. Bethesda.
 64. LeOra Software (2006) POLO-Plus 1.0 Probit and Logit Analysis. LeOra Software, Petaluma.
 65. Zheng, M., Evdokimov, A. G., Moshiri, F., Lowder, C. & Haas, J. Crystal structure of a Vip3B family insecticidal protein reveals a new fold and a unique tetrameric assembly. *Protein Sci.* 29, 824–829 (2020).
 66. Kanehisa, M. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res.* 30, 42–46 (2002).

67. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191 (2009).
68. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: A sequence Logo generator: Figure 1. *Genome Res.* 14, 1188–1190 (2004).
69. Hou, X. et al. Domain III β 4– β 5 Loop and β 14– β 15 Loop of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa are involved in receptor binding and toxicity. *Toxins* 16, 23 (2024).
70. Gómez, I. et al. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with Cadherin and Aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 281, 34032–34039 (2006).
71. Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A. & Soberón, M. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor interact with loops α -8 and 2 in Domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry* 42, 10482–10489 (2003).
72. Gomez, I. et al. Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope 869HITDTNNK876 in *Manduca sexta* Bt-R1 receptor with Loop 2 of domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J. Biol. Chem.* 277, 30137–30143 (2002).
73. Gómez, I., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A. & Soberón, M. Mapping the epitope in Cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* 276, 28906–28912 (2001).

10 Material suplementario



Figura suplementaria 1. Orientación asas involucradas a la unión de receptores. En naranja se muestra la estructura del dominio II de la toxina Cry1Aa (PDB ID: 1CIY), en cian las asas involucradas en la unión a receptores. En verde dominio III de Vip3Aa, en amarillo asas que contienen el sitio de interacción, K385, K526 y V529.

Imagen creada con PyMol versión 4.6.0.

THR	325	o	ASN	499	o	LYS	672	o
SER	327	o	SER	500	o	LEU	674	o
SER	331	o	LYS	523	o	PRO	676	o
ASN	334	o	GLU	524	o	GLU	677	o
LYS	337	o	SER	532	o	ASN	680	o
LYS	339	o	GLU	540	o	THR	681	o
SER	341	o	GLU	545	o	ASN	682	o
GLU	343	o	GLU	546	o	ASN	683	o
GLU	350	o	ASP	547	o	THR	685	o
LYS	352	o	ASN	548	o	THR	687	o
PRO	353	o	GLU	550	o	GLY	688	o
ASP	365	o	LYS	553	o	ASN	691	o
LYS	376	o	ASN	555	o	SER	693	o
LYS	378	o	ASN	556	o	GLY	694	o
GLN	379	o	LYS	557	o	ASN	695	o
ASP	386	o	TYR	560	o	ARG	704	o
SER	389	o	HIS	563	o	ASN	710	o
LYS	398	o	THR	564	o	GLN	712	o
GLN	404	o	ASN	568	o	ASP	714	o
SER	405	o	GLY	569	o	SER	726	o
GLU	406	o	LYS	577	o	SER	736	o
ASN	413	o	ASP	578	o	ARG	737	o
VAL	415	o	PHE	584	o	GLU	742	o
PRO	417	o	ASP	587	o	LYS	743	o
ASN	418	o	LYS	590	o	ARG	744	o
SER	446	o	PRO	591	o	MET	746	o
THR	447	o	LYS	592	o	SER	747	o
GLU	449	o	GLU	612	o	GLY	748	o
ASP	451	o	ASN	613	o	LYS	750	o
LEU	452	o	THR	614	o	LYS	759	o
ASN	453	o	GLY	615	o	PHE	760	o
LYS	454	o	ASN	623	o	LYS	762	o
LYS	455	o	ASN	625	o	ASP	763	o
LYS	456	o	GLU	627	o	ASN	764	o
SER	460	o	ASP	628	o	GLY	772	o
ALA	462	o	GLN	630	o	ASN	774	o
GLU	463	o	THR	631	o	LEU	775	o
TYR	464	o	LYS	634	o	TYR	776	o
ARG	465	o	THR	637	o	GLY	777	o
SER	468	o	ASP	641	o	GLY	778	o
ASP	471	o	LYS	643	o	PRO	779	o
ASP	472	o	ASN	653	o	ASP	785	o
GLN	495	o	GLY	654	o	LYS	789	o
ASP	497	o	PRO	669	o			
GLU	498	o	GLU	671	o			

Tabla suplementaria 1. Aminoácidos de los dominios III, IV y V expuestos al solvente de la protoxina

THR	325	o	GLU	545	o	PRO	676	o
SER	327	o	GLU	546	o	GLU	677	o
ASN	334	o	ASP	547	o	ASN	680	o
LYS	337	o	ASN	548	o	THR	681	o
GLU	343	o	GLU	550	o	ASN	682	o
GLU	350	o	LYS	553	o	ASN	683	o
LYS	352	o	ASN	555	o	THR	685	o
PRO	353	o	ASN	556	o	THR	687	o
ASP	365	o	LYS	557	o	GLY	688	o
LYS	376	o	TYR	560	o	ASN	691	o
LYS	378	o	HIS	563	o	SER	693	o
GLN	379	o	THR	564	o	GLY	694	o
LYS	385	o	ASN	568	o	ASN	695	o
ASP	386	o	GLY	569	o	ARG	704	o
GLN	404	o	LYS	577	o	ASN	710	o
GLU	406	o	ASP	578	o	GLN	712	o
ASN	413	o	PHE	584	o	ASP	714	o
PRO	417	o	ASP	587	o	SER	726	o
ASN	418	o	LYS	590	o	SER	736	o
SER	446	o	PRO	591	o	ARG	737	o
THR	447	o	LYS	592	o	GLU	742	o
GLU	449	o	GLU	612	o	LYS	743	o
LEU	452	o	ASN	613	o	ARG	744	o
ASN	453	o	THR	614	o	MET	746	o
LYS	455	o	GLY	615	o	SER	747	o
LYS	456	o	ASN	623	o	GLY	748	o
SER	460	o	ASN	625	o	LYS	750	o
ALA	462	o	GLU	627	o	ASP	751	o
GLU	463	o	ASP	628	o	LYS	759	o
THR	466	o	GLN	630	o	PHE	760	o
SER	468	o	THR	631	o	LYS	762	o
ASP	471	o	LYS	634	o	ASP	763	o
ASP	472	o	THR	637	o	ASN	764	o
ASN	499	o	ASP	641	o	GLY	772	o
ASN	522	o	LYS	643	o	ASN	774	o
LYS	523	o	ASN	653	o	LEU	775	o
GLU	524	o	GLY	654	o	TYR	776	o
LYS	526	o	GLU	656	o	GLY	777	o
VAL	529	o	PRO	669	o	GLY	778	o
SER	532	o	GLU	671	o	PRO	779	o
SER	536	o	LYS	672	o	ASP	785	o
GLU	540	o	LEU	674	o	LYS	789	o

Tabla suplementaria 2. Aminoácidos de los dominios III, IV y V expuestos al solvente de la toxina

No Aminoacido	Porcentaje del aminoácido expuesto en la Protoxina en Å ²	Porcentaje del aminoácido expuesto en la Toxina en Å ²
Ser 331	51.0	49.2
Lys 339	54.2	42.2
Ser 341	57.8	41.8
Ser 389	50.7	26.4
Lys 398	58.1	42.3
Ser 405	50.4	42.6
Val 415	59.1	47.4
Asp 451	52.6	49.2
Lys 454	50.4	49.4
Tyr 464	50.0	48.4
Arg 465	55.3	48.6
Gln 495	51.8	45.3
Asp 497	55.2	47.6
Glu 498	55.1	45.8
Ser 500	52.9	41.4

Tabla suplementaria 3. Aminoácidos de la protoxina que dejan de estar expuestos.