

14  
28

03072

UNAM  
UACPyP/CCH  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

FALLA DE ORIGEN  
DISEÑO DE UN SISTEMA DE DETECCION DE NUEVAS  
 $\delta$ -ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*

Tesis que para obtener el grado de  
Maestría en Biotecnología  
presenta

Argelia Lorence Quiñones

Cuernavaca, Mor.

Febrero ,1995.



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología/UNAM, bajo la dirección de:

**TUTORES PRINCIPALES**

Dra. Ma. Alejandra Bravo de la Parra  
Dr. Rodolfo Quintero Ramírez

**COTUTORES**

Dr. Alberto Darszon Israel  
Dr. Baltazar Becerril Luján

Durante el desarrollo del presente estudio la Ing. Argelia Lorence Quiñones contó con la beca-crédito del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 81909.

## AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Alejandra Bravo, Rodolfo Quintero y Alberto Darszon a quienes por su dirección e incondicional apoyo debo parte fundamental de mi formación.

A los miembros del Laboratorio de Parasitología Vegetal de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, por el apoyo brindado para la cría de los insectos y realización de los bioensayos. En especial a la Biol. Laura Lina y al M.C. Guadalupe Peña.

A los M.B. Felipe Espinoza y M.C. Otilia Zapata, miembros del grupo del Dr. Darszon, por su ayuda en el montaje del equipo y la discusión de los resultados.

A mis compañeros de laboratorio: Roberto Meza, Leopoldo Güereca, Eduardo Aranda, Jairo Cerón, Benito Pereyra, Carlos Rincón, Claudia Díaz, Miriam Ortiz, Anabel Ortiz, Carolina Abarca y Jorge Sánchez por su amistad y apoyo.

A los miembros del grupo del Dr. Mario Soberón por su gran compañerismo.

A Laura Genis y Angeles Pérez por hacer posible el funcionamiento administrativo del grupo.

A los integrantes del jurado: Dr. Antonio Peña, Dr. Rodolfo Quintero, Dr. Alberto Darszon, Dra. Alejandra Bravo y Dr. Baltazar Becerril por haber leído y discutido el contenido de esta tesis.

Gracias a todos,

Argelia.

# INDICE

INTRODUCCION.....	1-58
1 Los biopesticidas, una herramienta efectiva para el control de plagas dentro del esquema de la agricultura sustentable	1
2 ¿ Qué es <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)?	1-5
3 ¿ Para qué se usa Bt ?	5-14
4 Nomenclatura y clasificación de las $\delta$ -endotoxinas	14-22
4.1 Toxinas CryI	
4.2 Toxinas CryII	
4.3 Toxinas CryIII	
4.4 Toxinas CryIV	
4.5 Toxinas CryV	
4.6 Toxinas CryVI	
4.7 La necesidad de un nuevo esquema de clasificación	
5 Estructura de las $\delta$ -endotoxinas	22-25
6 El intestino de los insectos	26-28
6.1 El orden <i>Lepidoptera</i>	
6.2 El orden <i>Diptera</i>	
6.3 El orden <i>Coleoptera</i>	
7 Mecanismo de acción de las $\delta$ -endotoxinas	28-51
7.1 Solubilización	
7.2 Procesamiento	
7.3 Unión al receptor	
7.3.1 Estudios cinéticos y de competencia	
7.3.2 Naturaleza bioquímica del receptor	
7.3.3 Unión y desarrollo de resistencia	
7.4 Inserción a la membrana	

## 7.5 Formación del poro

### 7.5.1 ¿Cuál es el papel del receptor en la formación del poro?

## 7.6 Citólisis

- 8 Relación estructura-función 51-57
- 9 Diferentes estrategias de búsqueda de nuevas  $\delta$ -endotoxinas 57-58

OBJETIVOS..... 59-60

RESULTADOS..... 61-79

Lorence, A., A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero and A. Bravo (1995). "δ-Endotoxins Induce Cation Channels in *Spodoptera frugiperda* Brush Border Membranes in Suspension and in Planar Lipid Bilayers". FEBS Lett. Aceptado para publicación.

DISCUSION..... 80-91

- 1 Purificación y caracterización de las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) de *Spodoptera frugiperda* 80-81
- 2 Purificación, solubilización, procesamiento y almacenamiento de las  $\delta$ -endotoxinas empleadas 81
- 3 Condiciones óptimas de ensayo para el monitoreo del potencial de membrana de las vesículas 82
- 4 Determinación del potencial de reposo de la membrana de las vesículas 82-84

<b>5</b>	<b>Efecto inicial de las <math>\delta</math>-endotoxinas en la membrana de la microvellosidad apical (MMA)</b>	<b>84-85</b>
<b>6</b>	<b>Especificidad de la respuesta observada</b>	<b>85-87</b>
<b>7</b>	<b>Selectividad de la vía de permeabilidad inducida por CryID</b>	<b>87-89</b>
<b>8</b>	<b>Distinción farmacológica de las vías de permeabilidad intrínseca e inducida por CryID</b>	<b>89-90</b>
<b>9</b>	<b>Resultados del presente estudio en el contexto del mecanismo molecular de acción de las <math>\delta</math>-endotoxinas</b>	<b>90-91</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>92-93</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>		<b>94-113</b>

# INTRODUCCION



## 1 Los biopesticidas, una herramienta efectiva para el control de plagas dentro del esquema de la agricultura sustentable.

Son incuestionables los graves daños que el hombre ha causado a la naturaleza al seguir la filosofía de la revolución verde. Actualmente se plantea que la actividad agrícola humana debe concebir en lo posible los principios ecológicos básicos con el fin de mantener un buen estado de equilibrio y evitar disturbios que afecten tanto la rentabilidad de las actividades como la calidad de los bienes para la producción.

En este orden de ideas ha surgido el concepto de manejo integrado de plagas. Una de las herramientas que contempla dicho manejo es el control biológico, es decir, el uso de los organismos naturales o de sus partes para mantener controlada a una población a la que se considera como plaga. Aplicaciones comunes de esta forma de control son la conservación de parasitoides, depredadores y entomopatógenos nativos, así como su introducción a los campos de cultivo. A los productos comerciales cuyo principio activo es alguno de este tipo de organismos se les denomina biopesticidas (Bishop, 94).

En la Tabla 1 se enlistan los biopesticidas actualmente registrados por la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency o EPA). Estos productos representan en buena medida el tipo de biopesticidas usados en la actualidad a nivel mundial ya que la EPA es considerada por muchos países como referencia. En 1990 el mercado internacional de pesticidas fue de 26,000 millones de dólares distribuidos de la siguiente forma: 4,500 en Estados Unidos, 4,500 en Europa Occidental y 17,000 en el resto del mundo. Se estima que de este global los biopesticidas representan el 1% (Frost y Sullivan, 90); de éstos los productos basados en *Bacillus thuringiensis* abarcan del 90 al 95% (Feitelson et al, 1992).

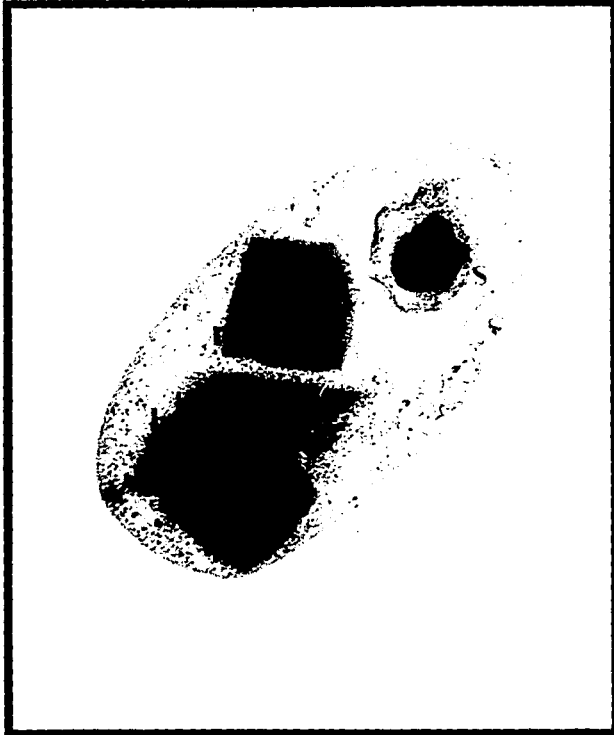
## 2 ¿Qué es *Bacillus thuringiensis* (Bt)?

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria entomopatógena Gram positiva, que se distingue de otros *Bacillus* por su capacidad para sintetizar durante el proceso de esporulación un cristal paraesporal insecticida (Figuras 1 y 2).

**TABLA 1.- LISTA ACTUALIZADA DE LOS BIOPESTICIDAS REGISTRADOS POR LA EPA**

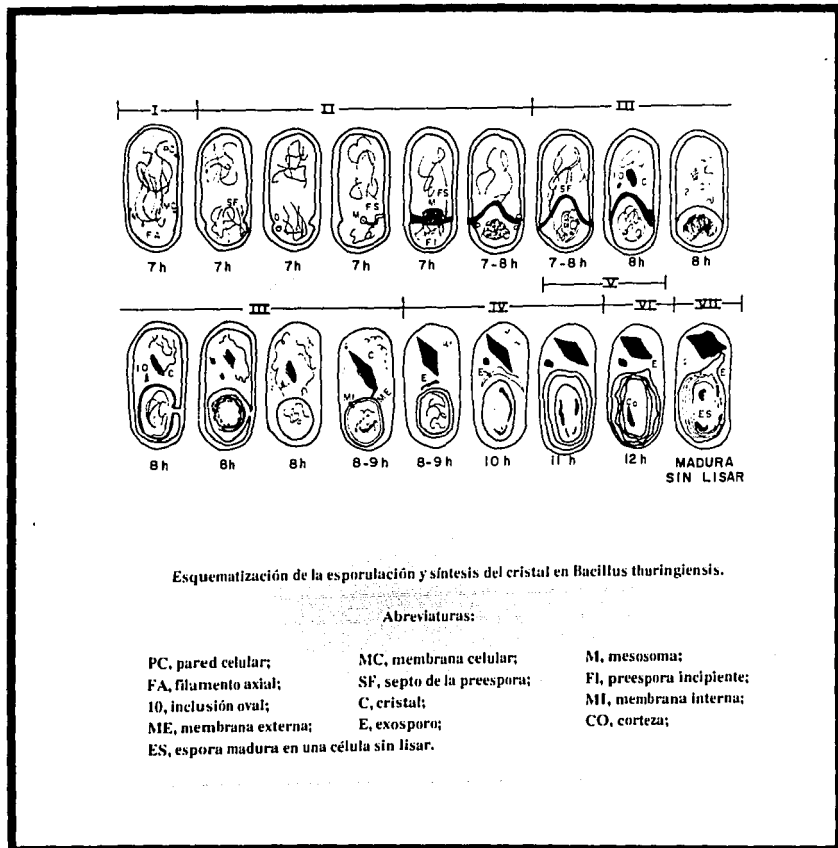
INGREDIENTE ACTIVO	AÑO REGISTRO	# REGISTROS	PLAGA/ENFERMEDAD CONTROLADA
<b>BACTERIAS</b>			
<i>Bacillus popilliae</i> + <i>B. lentimorbus</i>	1948	5	Larvas del escarabajo japonés
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> (Btk)	1961 <sub>a</sub>	132	Larvas de lepidópteros
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	1979	2	Enfermedad de la agalla de la corona
<i>Bi</i> subsp. <i>israelensis</i>	1981	25	Larvas de dípteros
<i>Bi</i> subsp. <i>san diego</i> <sub>b</sub>	1988	1	Larvas de coleópteros
<i>Bi</i> subsp. <i>tenebrionis</i>	1988	4	Larvas de coleópteros
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1988	2	<i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
Btk cepa EG 2348	1989	1	Larvas de lepidópteros
Btk cepa EG 2424	1989	1	Larvas de lepidópteros y coleópteros
Btk cepa EG 2371	1990	1	Larvas de lepidópteros
<i>B. sphaericus</i>	1991	1	Larvas de dípteros
<i>B. subtilis</i> GB03	1992	2	Enfermedad de la pudrición
<b>HONGOS</b>			
<i>Phytophthora citrophthora</i>	1981	1	Estranguladora de los cítricos
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1982	1	Alveja del norte
<i>Trichoderma harzianum</i> (ATCC 20476) <sub>c</sub>	1989	1	Decaimiento invernal de los árboles
<i>T. polysporum</i> (ATCC 20475) <sub>c</sub>	1989	1	Pudrición de la madera
<i>Glucadium virens</i> (G-21)	1990	2	<i>Phyium</i> , <i>Rhizoctonia</i>
<i>T. harzianum</i> Rifai cepa KRL-AG2	1990	2	Enfermedad de la pudrición
<i>Laenidium giganteum</i>	1991	3	Larvas de mosquitos
<b>PROTOZOARIOS</b>			
<i>Nosema locustae</i>	1980	6	Chapulines
<b>VIRUS</b>			
Cuerpos de inclusión del virus de la polihedrosis nuclear (NPV)	1985	1	Gusano rosado del algodón, gusano de la yema del algodón
Cuerpos de inclusión del virus NPV de la palomilla de la inflorescencia de los pinos	1976	1	Larvas de la palomilla de la inflorescencia de los pinos
Cuerpos de inclusión del virus NPV de la palomilla gitana	1978	2	Larvas de la palomilla gitana
Cuerpos de inclusión del virus NPV de la mosca barrenadora de los pinos	1983	1	Larvas de la mosca barrenadora de los pinos

NOTA: Tomada de Matten, S.R., Milewski, E.A., Schneider, W.R. and B.I. Slutsky (1993). Biological pesticides and the U.S. Environmental Protection Agency. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc. U.S.A. p. 321-335.  
 a *Bacillus thuringiensis* (Bt) subsp. *thuringiensis* fue registrado en 1961 y después fue remplazado por la subsp. *kurstaki* en 1970.  
 b La designación taxonómica del pesticida microbiano *Bi* subsp. *san diego* es *Bi* subsp. *tenebrionis*.  
 c *Trichoderma harzianum* (ATCC 20476) y *T. polysporum* (ATCC 20475) se venden y usan combinadamente.



**Figura 1.** - Micrografía de *Bacillus thuringiensis* cepa E62424 en la que se ilustran la espora(s), los cristales romboidales que contienen la proteína CryIII A (r) y el cristal bipiramidal que contiene la proteína CryI A (c) (b). Aumentos totales 60,000x.

Tomada de: **Carlton, B.C.** and C. Gawron-Burke. (1993). Genetic improvement of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide development. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor) Marcel Dekker, Inc. USA. p. 43-61



**Figura 2**

Adaptada de: **Bechtel, D.B. and L.A. Bulla (1976).** Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 127: 1472-1478.

Ishiwata, un investigador japonés, aisló esta bacteria a partir de un gusano de seda muerto en 1901; sin embargo, fue hasta los años cincuenta cuando se relacionó a la estructura cristalina que produce con los efectos tóxicos observados al ponerla en contacto con larvas de insectos (Tabla 2).

Se han aislado miles de cepas de *Bt* de diversas regiones del mundo (Martin, 94), mismas que han sido clasificadas con base en el antígeno H del flagelo, de acuerdo con el esquema propuesto por De Barjac y Frachon (Tabla 3).

El cristal paraesporal está formado de una, y más comúnmente de varias proteínas llamadas  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry. En el cristal, las proteínas insecticidas se encuentran en forma de protoxinas, por lo que deben ser procesadas para ser activas. Las  $\delta$ -endotoxinas son altamente tóxicas contra diversas plagas y muy específicas en su actividad. Estas pueden representar hasta el 20 o 30% del peso seco del cultivo esporulado (Van Rie, 1992) y cerca del 33 al 43% del total de las proteínas sintetizadas (Aronson *et al*, 1986).

A la fecha se han encontrado  $\delta$ -endotoxinas activas contra lepidópteros [1901]<sup>1</sup>, dípteros [1977], coleópteros [1983], nemátodos [1988], protozoarios [1989], platelmintos [1990], ácaros [1990] e himenópteros [1992] (Feitelson, 1993). Una explicación posible a la enorme diversidad de cepas de *Bt* en la naturaleza es que los genes bacterianos que codifican para las proteínas Cry y los genes blanco de la toxina en el huésped hayan coevolucionado (Rennie, 1992).

### 3 ¿ Para qué se usa *Bt*?

Las esporas y cristales producidos por *Bt* se han usado como principio activo de insecticidas comerciales para controlar plagas agrícolas, forestales y también aquéllas que son vectores de enfermedades (Feitelson *et al*, 92; Lambert y Peferoen, 92). En Europa, el uso de biopesticidas formulados con *Bt* se remonta a los años treinta; en Estados Unidos se han usado a partir de 1961, año en el que se registró el primer producto (Matten *et al*, 93). En México fue hasta fines de los años sesenta cuando *Bt* comenzó a usarse en los campos agrícolas (Galán-Wong, 93).

---

<sup>1</sup> En corchetes se señala el año en que se reportó la primera cepa con esa actividad.

**TABLA 2.- ANTECEDENTES HISTORICOS DEL DESCUBRIMIENTO DE *Bacillus thuringiensis***

AÑO	DESCRIPCION
1901	El científico japonés Ishiwata descubrió una bacteria aislada de un gusano de seda enfermo a la que denominó <i>Bacillus sotto</i> .
1911	1ª descripción válida de <i>B. thuringiensis</i> realizada por Berliner al aislar una bacteria aeróbica formadora de esporas de una larva enferma de la palomilla harinosa del Mediterráneo ( <i>Ephesia kühniella</i> Zell).
1915	Berliner identificó a esta bacteria como una especie nueva y propuso el nombre de " <i>Bacillus thuringiensis</i> " ya que la aisló en Thuringen, Alemania.
1915	Aoki y Chigasaki demostraron que los cultivos viejos de <i>B. sotto</i> eran más tóxicos a insectos que los cultivos jóvenes, debido a una toxina presente en los cultivos viejos.
1927	Mattes confirma las investigaciones de Berliner agregando que el "cuerpo de desecho" cambia la posición de la espora.
30's	Se realizaron extensivas pruebas de campo con esporas aisladas contra <i>Ostrinia nubilalis</i> (barrenador del maíz), éstas resultaron satisfactorias. Con ésto se elaboró un producto comercial en Francia, "Sporeine". La producción de "Sporeine" terminó al ser destruida la fábrica que lo producía durante la Guerra Mundial.
1946	Smith, Gordon y Clarke describieron a <i>Bt</i> como una variedad de <i>B. cereus</i> por ser casi indistinguibles.
1951/52	Toumanoff y Vago aislaron una cepa que causa toxemia y septicemia en larvas del gusano de seda y observaron que estos síntomas varían con la cantidad de cultivo ingerido por la larva, la denominaron <i>B. cereus</i> var. <i>alesti</i> .
1953	Hannay estudió la esporulación de <i>B. cereus</i> var. <i>alesti</i> y redescubrió el "cuerpo de desecho" confirmando las observaciones de Berliner. Informó la presencia de inclusiones cristalinas en forma de diamante en las células esporuladas y sugirió que los cristales podrían estar relacionados con la sustancia tóxica que produce la septicemia en las larvas de insectos.
1953/54	Angus demostró que la toxicidad en el insecto está asociada principalmente con la inclusión cristalina del bacilo y que ésta requiere ser solubilizada en álcali diluido o en jugo intestinal del insecto para ser activa.
1955	Hannay y Fitz-James informaron que la inclusión cristalina es de naturaleza proteica y que su ingestión es suficiente para causar la muerte a larvas de lepidópteros susceptibles.
1960	Se comercializó "Thuricide".
1962	De Barjac y Bonnefoi propusieron una clasificación serológica en base al antígeno flagelar H para esta bacteria.
1968	Dulmage aisló una cepa que resultó 20-200 veces más potente que todas las cepas conocidas, la denominó HD-1. Esta cepa es la base de la mayor parte de los productos comerciales.
1968/69	Se desarrolló "Dipel" el producto comercialmente más exitoso el cual contiene la cepa HD-1 aislada por Dulmage.
1977	Goldberg y Margalit descubrieron en Israel una nueva cepa con actividad hacia larvas de mosquitos y moscas negras, <i>Bt</i> subsp. <i>israelensis</i> .
1983	Krieg y colaboradores aislaron en Alemania una nueva cepa de <i>Bt</i> de una larva de <i>Tenebrio molitor</i> con actividad tóxica para coleópteros, <i>Bt</i> subsp. <i>tenebrionis</i> .
90's	El auge en el descubrimiento de toxinas Cry con nuevas actividades (toxinas contra nemátodos, platelmintos, ácaros, protozoarios, himenópteros y áfidos).

Nota: Adaptada de Galán-Wong, L.J. (1993). Historia del descubrimiento de *Bacillus thuringiensis*. En "Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Luis Galán-Wong (compilador). UNAM-Iztacala, México, D.F., p. 19-21.

TABLA 3.- CLASIFICACION DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* DE ACUERDO AL SEROTIPO H,

ANTIGENO H	SEROVARIEDAD	ABREVIATURA
1	<i>thuringiensis</i>	THU
2	<i>finitimus</i>	FIN
3a3c	<i>alesti</i>	ALE
3a3b3c	<i>kurstaki</i>	KUR
3a3d	<i>sumiyoshiensis</i>	SUM
3a3d3e	<i>fukuokaensis</i>	FUK
4a4b	<i>sotto</i>	SOT
4a4c	<i>kenyae</i>	KEN
5a5b	<i>galleriae</i>	GAL
5a5c	<i>canadensis</i>	CAN
6	<i>entomocidus</i>	ENT
6a6b	<i>subtoxicus</i>	SUB
7	<i>aizawai</i>	AIZ
8a8b	<i>morrisoni</i>	MOR
8a8c	<i>ostrinae</i>	OST
8b8d	<i>nigeriensis</i>	NIG
9	<i>tolworthi</i>	TOL
10	<i>darmstadiensis</i>	DAR
11a11b	<i>taumanoffi</i>	TOU
11a11c	<i>kyushuensis</i>	KYU
12	<i>thompsoni</i>	THO
13	<i>pakistani</i>	PAK
14	<i>israelensis</i>	ISR
15	<i>dakota</i>	DAK
16	<i>indiana</i>	IND
17	<i>tohokuensis</i>	TOH
18	<i>kumamotoensis</i>	KUM
18a18c	<i>yosoo</i>	YOS
19	<i>tochigiensis</i>	TOC

20a20b	<i>yunnanensis</i>	YUN
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	PON
21	<i>colmeri</i>	COL
22	<i>shandongiensis</i>	SHA
23	<i>japonensis</i>	JAP
24	<i>neoleonensis</i>	NEO
25	<i>coreanensis</i>	COR
26	<i>silo</i>	SIL
27	<i>mexicanensis</i>	MEX
28	<i>monterrey</i>	MON
29	<i>amagiensis</i>	AMA
30	<i>medellin</i>	MED
31	<i>toguchini</i>	TOG
32	<i>cameroun</i>	CAM
33	<i>leesis</i>	LEE
34	<i>konkukian</i>	KON
.....	.....	.....
40	<i>huazhongensis</i>	HUA
41	<i>sooncheon</i>	SOO
N.D.	<i>jegathesan</i>	JEG
.....	.....	.....

Cepa no mótil: *wuhanensis* (Hubei Institute of Microbiology, 1976).

Nota:

Adaptada de De Barjac, H. and E. Franchon (1990). Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* 35: 233-240.

a Lecadet, M.M., Franchon, E., Cusmao-Dumanoir, V. and H. De Barjac (1994). An updated version of the *Bacillus thuringiensis* strains classification according to H-serotypes II<sup>nd</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. *Abstracts*, p. 345. En esta referencia se indica que actualmente existen 45 serotipos que representan un total de 58 serovariedades, sin embargo esta lista actualizada de nuevos serotipos no ha sido publicada.



Las ventajas más importantes de los productos formulados a base de las esporas y cristales producidos por *Bt* son su especificidad (no son tóxicos para los humanos ni otros mamíferos, aves, plantas e insectos benéficos), baja persistencia en el ambiente y la baja tasa de desarrollo de resistencia a éstos por parte de los insectos (MacClintock et al, 94).

En la Tabla 4 se muestran los principales productos comerciales basados en *Bt*. Se distinguen varios tipos de productos: a) los de la primera generación, que son todos aquellos cuya formulación incluye como ingrediente activo un conjunto de toxinas y esporas provenientes de una cepa nativa, generalmente aislada del suelo; b) los de segunda generación; son aquéllos constituidos por un conjunto de toxinas y esporas provenientes de una cepa en la que previamente se introdujeron por conjugación los plásmidos (donde se localizan los genes que codifican para las  $\delta$ -endotoxinas) de varias cepas nativas y c) los de tercera generación; son aquéllos cuya formulación contiene bacterias muertas *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) a las que previamente les fueron clonados los genes que codifican para las toxinas de *Bt*. La tecnología utilizada para elaborar este último tipo de productos se conoce como "CellCap", ya que una vez que las células recombinantes de *Pf* expresan las toxinas de *Bt*, éstas son tratadas con un solvente que las mata sin destruir su pared celular, por lo que se dice las toxinas quedan "encapsuladas" (Gaertner et al, 93).

Es precisamente la posibilidad de clonar los genes que codifican para las  $\delta$ -endotoxinas en otro tipo de organismos lo que ha permitido plantear nuevas estrategias para proteger a los cultivos del daño causado por los diversos tipos de plagas (Leemans et al, 90).

Varios grupos de investigación han desarrollado plantas que expresan dichos genes ya sea de forma constitutiva o de forma tejido-específica (Tabla 5). Para lograr que estos genes clonados se expresen eficientemente ha sido necesario modificarlos de acuerdo con el uso preferencial de codones de las plantas, ya sea en su totalidad o sólo en algunas regiones. Se estima que las plantas transformadas con los genes de *Bt* estarán disponibles comercialmente en los próximos cinco años (Timmins, 93).

Otro enfoque que se ha utilizado para el control de las plagas chupadoras y de la raíz ha sido transformar con estos mismos genes diversas especies de microorganismos epífitos y endofíticos; es decir, microorganismos que se reproducen sobre o dentro de las plantas (Tabla 6).

TABLA 4.- PRINCIPALES PRODUCTOS COMERCIALES BASADOS EN LAS TOXINAS PRODUCIDAS POR *Bacillus thuringiensis*

COMPANÍA	PRODUCTO	VARIEDAD/SEROTIPO	BLANCO	PROTEINAS
Abbott Labs.	Dibeta	N.D./N.D.	*	$\beta$ -exotoxina
	Dipel	kurstaki/3a3b	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
	Diterra	tenebrionis/8a8b	C	IIIA
	Gnatrol	israelensis/14	D	N.D.
	Xentari	N.D./N.D.	L	IAa, IAb, IC y ID
All Union Inst. Agr. Microbiol.	Biotoksybacillin	N.D./N.D.	*	$\beta$ -exotoxina
American Cyanamid	Acrobe	israelensis/14	D	N.D.
Bactec	Bernan Bt	kurstaki/3a3b	L	N.D.
Biochem Products	Bactmos	israelensis/14	D	N.D.
Chemapol-Biokrna	Bathurin	thuringiensis/1	L	N.D.
Ciba-Geigy	Agree <sub>a</sub>	N.D./N.D.	L	IAa, IAc, IC y ID
Compagnia di Ricerca Chim (CRC)	Bactis	kurstaki/3a3b	L	N.D.
	Bactucide	israelensis/14	D	N.D.
	Exobac	N.D./N.D.	*	$\beta$ -exotoxina
Ecogen, Inc.	Condor <sub>a</sub>	kurstaki/3a3b	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
	Cutlass <sub>a</sub>	kurstaki/3a3b	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
	Foil <sub>a</sub>	N.D./N.D.	L/C	IAC y IIIA
	Raven <sub>a</sub>	kurstaki/3a3b	C/L	IAC, IIIA y IIB2
Farbwerke-Hoechst	Biospor	kurstaki/3a3b	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
Fermenta ASC Corporation	Cutless	kurstaki/3a3b	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
Farmos	Muscabac	thuringiensis/1	L	N.D.
Glavmikrobioprom	Dendrobacillin	dendrolimus/4	L	N.D.
	Endobacterin	galleriae/5a5b	L	N.D.
	Eksotoksin	tolworthi/9	*	$\beta$ -exotoxina
	Insektin	thuringiensis/1	L	N.D.
	Toxobacterin	tolworthi/9	*	$\beta$ -exotoxina
Grain Proc. Lab.	Parasporin	N.D./N.D.	L	N.D.
ICI Americas, Inc.	Ecodart	N.D./N.D.	N.D.	N.D.
Knoll Bioproducts, Co., Inc.	Larvo-Bt	kurstaki/3a3b	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
Korea Explosives	Bt	kurstaki/3a3b	L	N.D.
Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.	Selectgyn	aizawai/7	L	N.D.

LIBEC Laboratoire	Sporine	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
Merck	Agritol	N.D./N.D.	N.D.	N.D.
Mycogen	M-One	<u>tenebrionis/8a8b</u>	C	IIIA
	M-Peril <sup>b</sup>	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
	M-Trak <sup>b</sup>	<u>san diego/8a8b</u>	C	IIIA
	MVP <sup>b</sup>	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	IAB
Nor-Am Chemical Co.	SOK	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
Novo Nordisk	Biobit	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
	Foray 48B	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
	Novodor	<u>tenebrionis/8a8b</u>	C	IIIA
	Skeetal	<u>israelensis/14</u>	D	N.D.
Nutrilité Prod.	Biotrol BTB	N.D./N.D.	L	N.D.
Pfizer	Envirobac-ES	N.D./N.D.	N.D.	N.D.
Phillips Duphar (Chemagro)	Bactospeine	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
	Bactimos	<u>israelensis/14</u>	D	N.D.
	Futura	N.D./N.D.	N.D.	N.D.
Procida	Plantibac	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
Radonja	Baturad	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
	Nubilacid	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
	Moskitocid	<u>israelensis/14</u>	D	N.D.
Rohm and Hass	Bakthane	N.D./N.D.	N.D.	N.D.
Sandoz Corp.	Javelin	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
	Thuricide	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	IAa, IAb, IAc, IIA y IIB
	Certan	<u>aizawai/7</u>	L	N.D.
	Teknar	<u>israelensis/14</u>	D	N.D.
	Trident	<u>tenebrionis/8a8b</u>	C	IIIA
	Trident II	<u>tenebrionis/8a8b</u>	C	IIIA
	Vault	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
	Delfin	N.D.	N.D.	N.D.
Serun Zavod Kalinovica	Baktukal	<u>thuringiensis/1</u>	L	N.D.
Shionogi and Co., Ltd.	Bacillex	<u>kurstaki y aizawai/3a3b y 7</u>	L	N.D.
Thompson-Hayward Chem. Co.	Bactur	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
Tomogosei Chem. K.K.	Toaro-CT	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.
	Toaro	<u>kurstaki/3a3b</u>	L	N.D.

Notas: Adaptada de Bravo, A., Lorence A y R. Quintero (1992). Perspectivas en la utilización de Bacillus thuringiensis como bioinsecticida. Biocnología 2 (5-6): 139-154. <sup>c</sup>

N.D.= no disponible; \* = no específico; a curación de plásmidos y conjugación; b tecnología Cellcap.

TABLA 5.- PLANTAS TRANSFORMADAS CON LOS GENES *cry* DE *Bacillus thuringiensis*

CULTIVO GEN	OBSERVACIONES	ORGANISMO BLANCO	REFERENCIA
<b>TABACO</b>			
<i>cryIA(b)</i>	Gen truncado; promotor MS	<i>Manduca sexta</i>	Vaeck <i>et al.</i> (87)
<i>cryIA(a)</i>	Gen truncado; promotor CaMV 35S + AMV	<i>Manduca sexta</i>	Barton <i>et al.</i> (87)
<i>cryIA(c)</i> <i>cryIA(b)</i>	Gen sintético; promotor MS Gen sintético; promotor CaMV 35S	<i>Manduca sexta</i> <i>Manduca sexta</i>	Perlak <i>et al.</i> (91)
<i>cryIA(b)</i>	Gen truncado; promotor PR-la	<i>Manduca sexta</i>	Williams, <i>et al.</i> (92)
<i>cryIA(b)</i>	Gen truncado; promotor CaMV 35S + AMV	<i>Manduca sexta</i>	Carozzi <i>et al.</i> (92)
<i>cryIIIA</i>	Gen sintético; promotor CaMV 35S + AMV	<i>Lepitnotarsa decemlineata</i>	Sutton <i>et al.</i> (92)
<b>TOMATE</b>			
<i>cryIA(b)</i>	Gen truncado; promotor CaMV 35S	<i>Manduca sexta</i> <i>Heliothis virescens</i> y <i>zea</i>	Fischhoff <i>et al.</i> (87)
<i>cryIA(b)</i>	Gen truncado; promotor MS	<i>Manduca sexta</i> <i>Heliothis virescens</i> y <i>zea</i>	Delannay <i>et al.</i> (89)
<i>cryIC-cryIA(b)</i>	Gen modificado; promotor CaMV 35S	<i>Spodoptera exigua</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Manduca sexta</i>	Van der Salm <i>et al.</i> (94)
<b>ALGODON</b>			
<i>cryIA(b)</i> <i>cryIA(c)</i>	Gen sintético; promotor CaMV 35S Gen sintético; promotor CaMV 35S	<i>Heliothis zea</i> <i>Trichoplusia ni</i>	Perlak <i>et al.</i> (90)
<b>MAIZ</b>			
<i>cryIA(b)</i>	Gen sintético; promotor CaMV 35S y promotor PEPC	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Koziel <i>et al.</i> (93)
<b>ARROZ</b>			
<i>cryIA(b)</i>	Gen sintético; promotor CaMV 35S + 1 <sup>er</sup> intrón del gen catalasa I	<i>Chilo suppressalis</i> <i>Cnaphalocrosis medinales</i>	Fujimoto <i>et al.</i> (93)
<b>PAPA</b>			
<i>cryIIIA</i>	Gen sintético; promotor CaMV 35S + MS	<i>Lepitnotarsa decemlineata</i>	Adang <i>et al.</i> (93)
<i>cryIIIA</i>	Gen sintético; promotor CaMV 35S con doble enhancer	<i>Lepitnotarsa decemlineata</i>	Perlak <i>et al.</i> (93)
<b>NOGAL</b>			
<i>cryIA(c)</i>	Gen truncado; promotor CaMV 841	<i>Plodia interpunctella</i> <i>Cydia pomonella</i> <i>Ameylois transitella</i>	Dandekar <i>et al.</i> (94)
<b>CRISANTEMO</b>			
<i>cryIA(b)</i>	Gen truncado; N.D.	<i>Heliothis virescens</i>	Van Wordragen <i>et al.</i> (93)

Notas: MS manopina sintetasa; CaMV 35S virus del mosaico de la coliflor; AMV virus del mosaico de la alfalfa; PR-la promotor de la proteína asociada a la patogénesis (inducible por ácido salicílico); PEPC promotor de la fosfoenolpiruvato carboxilasa; gen truncado sólo se clonó la región que codifica para la fracción tóxica del gen correspondiente; gen sintético modificado en el uso preferencial de codones para permitir una mejor expresión en la planta; gen modificado en sitios potenciales de poliadenilación.

TABLA 6.- MICROORGANISMOS QUE HAN SIDO USADOS COMO HOSPEDEROS ALTERNATIVOS PARA LA CLONACION DE GENES *cry* DE *Bacillus thuringiensis*

HOSPEDERO	GEN	ORGANISMO BLANCO	REFERENCIA
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	<i>cryIVA</i> <i>cryIVB</i> <i>cryIVD</i> <i>cryIVB</i>	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes aegypti</i> <i>Culex pipiens</i> <i>Culex restuans</i>	Angsuthanasombat y Panyim (89) Chungjatupornchai <i>et al.</i> (90) Murphy y Stevens (92) Soltes-Rak <i>et al.</i> (93)
<i>Bacillus cereus</i>	<i>cryIA(c)</i>  <i>cryIB</i> <i>cryIIA</i>	N.D.  N.D. N.D.	González <i>et al.</i> (82); Aronson y Beckman (87) González <i>et al.</i> (82) González <i>et al.</i> (82)
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>cryIVD</i> <i>cryIA(a)</i> <i>cryIA(c)</i> <i>cryIIA</i>	<i>Aedes aegypti</i> N.D. N.D. N.D.	Donovan <i>et al.</i> (88.) Shivakumar <i>et al.</i> (89) Mettus y Macaluso (90) Mettus y Macaluso (90)
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>cryIVB</i> <i>cryIVD</i>	<i>Aedes aegypti</i> <i>Aedes aegypti</i>	Poncet <i>et al.</i> (94) Poncet <i>et al.</i> (94)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>cryIA(b)</i>	N.D.	Nakamura e Imanaka (89)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>cryIA's</i> <i>cryIA(c)</i>	<i>Trichoplusia ni</i> N.D.	Shivakumar <i>et al.</i> (86) Calogero <i>et al.</i> (89)
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>cryIV's</i>	N.D.	Nambiar <i>et al.</i> (90)
<i>Caulobacter crescentus</i>	<i>cryIVB</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Thanabalu <i>et al.</i> (92)
<i>Clavibacter xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i>	<i>cryIA(c)</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	Turner <i>et al.</i> (91)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>cryIA(c)</i>	<i>Manduca sexta</i>	Stock <i>et al.</i> (90)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>cryIA(b)</i> <i>cryIVB</i>  <i>cryIA(c)</i>	N.D. <i>Anopheles stephensi</i> <i>Tipula oleracea</i> <i>Heliothis armigera</i>	Obukowicz <i>et al.</i> (86) Waalwijk <i>et al.</i> (91) Rajendran <i>et al.</i> (94)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	N.D.	N.D.	Bezdicsek <i>et al.</i> (90)
<i>Rhizobium meliloti</i>	N.D.	N.D.	Bezdicsek <i>et al.</i> (90)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	<i>cryIV's</i>	<i>Aedes aegypti</i>	Zaritsky <i>et al.</i> (90)
<b>BACULOVIRUS</b>			
<i>Autographa californica</i>	<i>cryIA(c)</i> <i>cryIA(b)</i> <i>cryIVD</i>	<i>Trichoplusia ni</i> <i>Pieris brassicae</i> N.D.	Merryweather <i>et al.</i> (90) Martens <i>et al.</i> (90) Pang <i>et al.</i> (92)

Notas: Adaptada de Koziel, M.G., Carozzi, N.B., Currier, T.C., Warren, G.W. and S.V. Evola (1993). The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 11: 171-228.  
N.D. = no disponible

La clonación de los genes *cry* en baculovirus (virus de insectos) es también una nueva estrategia de control de este tipo de plagas (Cunningham, 88).

Igualmente novedoso ha sido para el control de larvas de mosquitos la clonación de estos mismos genes en microorganismos que residen en las capas superiores de los hábitats acuáticos (Porter et al, 93).

## 4 Nomenclatura y clasificación de las $\delta$ -endotoxinas.

En 1989 Höfte y Whiteley propusieron un esquema de nomenclatura y clasificación de los genes *cry* basado en su secuencia nucleotídica y el espectro insecticida de sus productos (proteínas Cry). Se establecieron cuatro grandes clases: *cryI*, específica contra lepidópteros; *cryII*, específica contra lepidópteros y dípteros; *cryIII*, específica contra coleópteros y *cryIV*, específica contra dípteros. A esta clasificación se han aumentado dos nuevas clases *cryV* y *cryVI* específicas contra nemátodos y ácaros. Cada clase a su vez se divide en subclases (ver Tabla 7).

### 4.1 Toxinas CryI.

Esta clase de toxinas es la más comúnmente encontrada en los serotipos de *Bt* (Yamamoto y Powell, 93). Se han caracterizado a la fecha trece diferentes holotipos (autores reportados en la Tabla 7). Todas estas proteínas se producen como protoxinas de 130 a 140 kDa y generalmente forman cristales bipiramidales. Los fragmentos tóxicos pesan entre 60 y 70 kDa. Aunque puede generalizarse que todas ellas son activas sólo contra los lepidópteros, existen excepciones. Las toxinas CryIA(b) y CryIC son tóxicas tanto para lepidópteros como para dípteros (Haider y Ellar, 88; Smith y Ellar, 94). El caso más extraño es la toxina CryIB para la cual se ha reportado actividad contra lepidópteros, coleópteros y áfidos (Brizzard y Whiteley, 88; Aranda, 95).

### 4.2 Toxinas CryII.

A la fecha se conocen tres holotipos de esta clase de proteínas. El peso molecular de las formas inactivas es de 70 kDa, mismas que se acumulan en

TABLA 7.- LISTA ACTUALIZADA DE LAS PROTEINAS Cry Y Cyt PRODUCIDAS POR *Bacillus thuringiensis*

ICP	TAMAÑO (a.a.)/ PM PROTOXINA (Da)	RANGO HUESPED	SUBESPECIE ORIGINARIA DEL GEN/CEPA	PRINCIPAL BLANCO <sub>2</sub>	REFERENCIA
<b>Cry Ia</b>					
CryIAa	1176/132,985	L	<i>kurstaki</i> /HD1	<i>Bombyx mori</i>	Schnepf et al. (85a)
Variantes CryIAa	1176/133,021 1176/132,971 1176/132,927	L	<i>aizawai</i> /IPL-7 <i>entomocidus</i> N.D./FU-2-7	<i>Bombyx mori</i>	Simizu et al. (88) Masson et al. (89) Udayasuriyan (94)
CryIAb	1155/130,478	L	<i>Berliner</i> /1715 <i>kurstaki</i> /HD-1 <i>aizawai</i> /HD-133	Varios lepidópteros	Wabiko et al. (86) Geiser et al. (86); Kondo et al. (87) Chark y Jen (93)
Variantes CryIAb	1155/130,322 1155/130,553 1155/130,573 1156/130,998	L	<i>kurstaki</i> /NRD-12 <i>aizawai</i> /IPL7 <i>Berliner</i> /1715 <i>aizawai</i> /IC1 <i>kurstaki</i>	Varios lepidópteros	Hefford et al. (87) Oeda et al. (87) Höfte et al. (86) Haider y Ellar (88) Thorne et al. (86)
CryIAc	1177/133,000	L	<i>kurstaki</i> /HD-73	<i>Heliothis virescens</i>	Adang et al. (85)
Variantes CryIAc	1177/132,966 1177/133,008 618/69,182	L	<i>kenyae</i> /HD-588 N.D./PSB1GG N.D./BT589A	<i>Heliothis virescens</i>	Von Tersch et al. (91) Feitelson (91) Dardenne et al. (90)
CryIAd	1179/133,228	L	<i>aizawai</i> /PSB11	N.D.	Feitelson (91)
CryIB	1228/139,474	L/C/AF	<i>thuringiensis</i> /HD-2	<i>Pieris brassicae</i> / <i>Leptinotarsa</i> <i>decemlineata</i> / <i>Rhopalosiphum maidis</i>	Brizzard y Whiteley (88)/ Aranda et al. (93)
CryIC	1189/134,686	L/D	<i>entomocidus</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> / <i>Aedes aegypti</i>	Honée et al. (88)/ Smith y Ellar (94)
Variantes CryIC	1176/132,720 1189/134,662	L	<i>galleriae</i> /HD-29 <i>aizawai</i> /PSB11	<i>Spodoptera exigua</i>	Kalman (93) Feitelson (91)
CryICb	1171/133,104	L	<i>kenyae</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	Bosse et al. (90)
CryID	1165/132,333	L	<i>aizawai</i> /HD-68	<i>Manduca sexta</i>	Höfte et al. (90)
CryIE	1171/133,104	L	<i>tolworthi</i>	<i>Spodoptera exigua</i>	Visser et al. (90)
Variantes CryIE	1171/133,118	N.D.	<i>kenyae</i> /PSB1F	N.D.	Feitelson (91) Payne y Sick (91b)
CryIEb	1174/133,453	N.D.	<i>aizawai</i> /PSB1A2	N.D.	Feitelson (91)

CryII	1174/133,473	L	<u>aizawai/EG6346</u> <u>aizawai/PS811</u>	<u>Spodoptera exigua</u>	Chambers <u>et al.</u> (91) Feitelson (91)
CryIG	1156/129,582	L	<u>galleriae/11-67</u>	<u>Galleria mellonella</u>	Smulevitch <u>et al.</u> (91)
Variantes CryIG	1151/128,996	L	N.D./DSIR517	<u>Phthorimaea operculella</u>	Gleave <u>et al.</u> (92) Wigley <u>et al.</u> (94)
CryIH	1157/129,632	L	N.D.	Amplio espectro de Lepidópteros	Van Rie (94)
CryIX <sub>6</sub>	1151/130 kDa	N.D. (críptico)	<u>galleriae</u>	N.D.	Shevelev <u>et al.</u> (93)
CryIX <sub>7</sub>	N.D./- 81 kDa	L	N.D.	N.D.	Gawron-Burke <u>et al.</u> (91)
CryI ?	N.D./- 133 kDa	L	N.D./PSB1RR1	N.D.	Payne y Sick (90)
CryI ?	N.D./- 133 kDa	L	N.D./PSB1GG	N.D.	Payne <u>et al.</u> (92a)
CryI ?	N.D./- 133 kDa	L	N.D./B11A2	N.D.	Payne y Sick (91a)
CryI ?	N.D./- 132 kDa	L	N.D./B11B	N.D.	Payne y Sick (91a)
CryI ?	N.D./- 135 kDa	L	N.D./B11B2	N.D.	Payne y Sick (91a)
CryI ?	N.D./- 134 kDa	L	N.D./B11A	N.D.	Payne y Sick (91a)
CryI ?	N.D./- 47, 37, 34 y 32 kDa	L	N.D./PS158C2	N.D.	Payne <u>et al.</u> (93)
<b>Cry IIs</b>					
CryIIA	633/70,773	L/D	<u>kurstaki/HD-1</u>	Baja toxicidad para ambos tipos de insectos	Donovan <u>et al.</u> (88a)
CryIIB	633/70,662	L (críptico)	<u>kurstaki/HD-1</u>	<u>Manduca sexta</u>	Widner y Whiteley (89) Dankocsik <u>et al.</u> (90)
CryIIC	622/69,651	L	<u>shanghai</u>	<u>Trichoplusia ni</u> y <u>Manduca sexta</u>	Wu <u>et al.</u> (91)
<b>Cry IIIs</b>					
CryIIIA	652/73,953 644/73,027 644/73,041	C	<u>san diego</u> <u>tenebrionis</u> <u>morrisoni/EG2158</u> <u>tenebrionis/B1256-82</u>	<u>Leptinotarsa</u> <u>decehlineata</u>	Herrnstadt <u>et al.</u> (87) Sekar <u>et al.</u> (87); Höfte <u>et al.</u> (87) Donovan <u>et al.</u> (88b) McPherson <u>et al.</u> (89)
CryIIIB	659/75,075	C	<u>tolworthi/PS43F</u> <u>pakistani</u>	<u>L. decehlineata</u>	Sick <u>et al.</u> (90)



Variante CryIIIB	N.D./74,257	C	tolworth/EG2838	<i>L. decemlineata</i>	Rupar et al. (91)
CryIIIB2	652/74,302	C	kumamotoensis/EG4961	<i>L. decemlineata</i> y baja toxicidad para <i>Diabrotica undecimpunctata</i>	Donovan et al. (92a)
CryIIIC <sub>c</sub>	1138/129,247	C	galleriae/BTS137J	<i>L. decemlineata</i>	Höfte et al. (92)
CryIIIC <sub>c</sub>	N.D./- 74.4 kDa	C	N.D.	N.D.	Donovan et al. (93)
CryIIIC <sub>b</sub>	N.D./- 70 kDa	C	N.D.	N.D.	Donovan et al. (92b)
CryIIID	649/72,945	C	kurstaki/BI109P	N.D.	Lambert et al. (92a)
CryIIIE	1157/130,864	C/A	kumamotoensis/PS50C(a)	<i>L. decemlineata</i> / <i>Tetranychus urticae</i>	Narva y Fu (94a)/ Payne et al. (92c)
CryIII ?	1169/133,395	C	kumamotoensis/PS50C(b)	N.D.	Narva y Fu (94a)
CryIII ?	1138/128,633	C	dakota/HD-511	N.D.	Narva y Fu (94a)
CryIII ?	1138/129,514	C	kumamotoensis/HD-867	N.D.	Narva y Fu (94a)
CryIII ?	1186/131,547	C	sotto/PS80JJ1	N.D.	Narva et al. (94b)
CryIII ?	1160/130,281	C	japonensis/Buibui	<i>Anomala cuprea</i>	Sato et al. (94)
CryIII ?	N.D./- 130 kDa	C	japonensis/N141	<i>A. cuprea</i>	Iizuka et al. (94)
CryIII ?	654/74,228	C	N.D./PS43F	<i>L. texana</i>	Sick y Gilroy (91)
CryIII ?	N.D./- 72 y 65 kDa	C	morrisoni/PS12203	<i>L. decemlineata</i>	Payne (89)
CryIII ?	N.D./N.D.	C	N.D./PS40D1	<i>Alphitobius diaperinus</i>	Hickle et al. (92)
CryIII ?	N.D./- 63-70, 32 y 14 kDa	C	N.D./NCIMB40152	N.D.	Cidaria et al. (91)
CryIII ?	475/54,045 N.D./- 45 kDa	C/A	N.D./PSB6A1	N.D./ <i>T. urticae</i>	Bradfish et al. (93)/ Payne et al. (92c)
CryIII ?	N.D./- 155, 135, 98, 62 y 58 kDa	C/H	N.D./PSB603	N.D./ <i>Monomorium pharaonis</i>	Bradfish et al. (93)/ Payne et al. (92b)
CryIII ?	N.D./N.D.	C	N.D./14-4	N.D.	Carozzi et al. (93)
CryIII ?	N.D./N.D.	C	N.D./14-5	N.D.	Carozzi et al. (93)
CryIII ?	N.D./N.D.	C	N.D./14-8	N.D.	Carozzi et al. (93)
CryIII ?	N.D./N.D.	C	N.D./14-10	N.D.	Carozzi et al. (93)

<b>Cry IVs</b>					
CryIVA	1180/134,370	D	<u>israelensis</u>	<u>Aedes aegypti</u> y moscas negras	Ward y Ellar (87)
Variantes CryIVA	1180/134,388	D	<u>israelensis</u> /HD-522	<u>A. aegypti</u> y moscas negras	Sen et al. (88)
CryIVB	1136/127,621	D	<u>israelensis</u> /402-72	<u>A. aegypti</u> y moscas negras	Chungjatupornchai et al. (88)
Variantes CryIVB	1136/127,706 1135/128,362	D	<u>israelensis</u> <u>israelensis</u> /HD-567	<u>A. aegypti</u> y moscas negras	Tungpradubkul et al. (88) Yamamoto et al. (88)
CryIVC	675/77,673	D	<u>israelensis</u>	<u>A. aegypti</u> y moscas negras	Thorne et al. (86)
CryIVD	643/72,267	D	<u>israelensis</u> /HD-567	<u>A. aegypti</u> y moscas negras	Donovan et al. (88c)
CryIV?	N.D./- 135 kDa	D	N.D./PS71M3-1	N.D.	Sick (91)
CryIV?	N.D./- 78 kDa	D	N.D./PS71M3-2	N.D.	Sick (91)
<b>Cry Vs</b>					
CryV <sub>6</sub>	719/81,173	C/L	<u>kurstaki</u> /JHCC4835	<u>L. decemlineata</u> (baja toxicidad) y <u>Ostrinia nubilalis</u> (alta toxicidad)	Taylor et al. (92)
Variantes CryV <sub>6</sub>	719/81,204 719/81,160 719/81,125	L N.D. L	N.D./BP465 <u>kurstaki</u> /HD-1 <u>kurstaki</u> /DSIR732	<u>Plutella xylostella</u> N.D. <u>Epiphyas postvittana</u>	Shin et al. (94b/c) Shin et al. (94a) Gleave et al. (93)
CryVAa <sub>6</sub>	1385/152,270	N/A <sub>7</sub>	<u>darmstadiensis</u> /PS17a	<u>Caenorhabditis elegans</u> y <u>Haemonchus contortus</u> / <u>T. urticae</u>	Narwa et al. (91)/ Payne et al. (92c)
CryVAb <sub>6</sub>	1289/141,825	N/A <sub>7</sub>	<u>darmstadiensis</u> /PS17b	<u>C. elegans</u> y <u>H. contortus</u> / <u>T. urticae</u>	Narwa et al. (91)/ Payne et al. (92c)
CryVB <sub>6</sub>	1257/142,107	N/A <sub>7</sub>	N.D./PS33F2	<u>C. elegans</u> y <u>H. contortus</u> / <u>T. urticae</u>	Narwa et al. (91)/ Payne et al. (92c)
CryVC <sub>6</sub>	803/88,044	N <sub>7</sub>	N.D./PS63B	<u>C. elegans</u> y <u>H. contortus</u>	Narwa et al. (91)
<b>Cry VIs</b>					

CryVIA	475/54,015	N/A <sub>7</sub>	N.D./PS52A1	<u>C. elegans</u> y <u>H. contortus</u> / <u>T. urticae</u>	Nerva <u>et al.</u> (91)/ Payne <u>et al.</u> (92c)
CryVIB	395/44,018	N/A <sub>7</sub>	N.D./PS69D1	<u>C. elegans</u> y <u>H. contortus</u> / <u>T. urticae</u>	Nerva <u>et al.</u> (91)/ Payne <u>et al.</u> (92c)
No clasificadas					
Cry 7	1171/133,266	P	N.D./PSB1F	<u>Giardia lamblia</u>	Thompson y Gaertner (91)
Cry ?	N.D./- 78, 70 y 35 kDa	H	N.D./PS140E2	<u>M. pharaonis</u>	Payne <u>et al.</u> (92b)
Cry ?	N.D./- 175, 130, 100, 83, 69, 43, 40, 36, 35, 34 y 27 kDa	H	N.D./PS211B2	<u>M. pharaonis</u>	Payne <u>et al.</u> (92b)
Cry ?	1167/132,612	N.D.	N.D./EG5847	N.D.	Donovan (94)
Cry ?	1229/139,597	N.D.	N.D./EG5847	N.D.	Donovan (94)
Cry ?	1181/133,589	N.D.	alesti	N.D.	Lee y Aronson (91)
Cry ?	1178/133,148	N.D.	kurstaki/PS85A1	N.D.	Feitelson (91)
Cry ?	1157/129,632	N.D.	N.D.	N.D.	Lambert (94)
Cry ?	1166/131,857	N.D.	N.D./BT500349A	N.D.	Lambert (93)
Cry ?	1160/130,823	N.D.	N.D./BT500349A	N.D.	Lambert (93)
Cry ?	1172/132,832	N.D.	N.D./BT502069AA	N.D.	Lambert (93)
Cry ?	1174/133,202	N.D.	N.D./BT500349A	N.D.	Lambert (93)
Cyts					
Cyt A	249/27,310 249/27,284	Citolítica	<u>israelensis</u> <u>morrisoni</u> /PG-14	Citolítica	Ward y Ellar (84); Waalwijk <u>et al.</u> (85) Earp y Ellar (87); Galjart <u>et al.</u> (87)
Cyt B	259/29,202	Citolítica	<u>kyushuensis</u>	Citolítica	Koni y Ellar (93)

Notas: Esta tabla fue elaborada con base en las secuencias de nucleótidos incluidas en GenBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, october 1994).

A = ácaros; AF = áfidos; C = coleópteros; D = dípteros; H = himenópteros; L = lepidópteros; N = nemátodos; P = protozoarios.

N.D. = no disponible.

- 1 peso molecular predicho por GeneWorks 2.4.
- 2 organismo particularmente susceptible a dicha toxina.
- 3 peso molecular de la toxina CryIA(c).
- 4 Ambos grupos propusieron el nombre CryX para estas protefnas.
- 5 Ambos grupos propusieron el nombre CryIIIC para estas protefnas.
- 6 Ambos grupos propusieron el nombre CryV para estas protefnas.
- 7 Se ha reportado que estas toxinas son activas contra las formas larvaria y adulta de los nemátodos (Edwards et al, 90).

Brown y Whiteley (1992) reportaron una protefna con actividad tóxica para lepidópteros (Manduca sexta) aislada a partir de una cepa de B. thuringiensis subsp. thompsoni de 340 residuos y 37,505 Da; dicha protefna no puede considerarse de la familia Cry ya que la secuencia de nucleótidos respectiva no contiene ninguno de los 5 bloques conservados característicos de dicha familia de protefnas.

Recientemente se describen en el "abstract" de una patente nuevas cepas y protefnas Cry con actividad acaricida para Dermatophagodes pteronyssinus (ácaros del polvo); la denominación de dichas cepas es: GS45B1, PS42J, PS94R3, PS17, PS62B1 y PS74G1. Biotechnology abstracts 13(25): 68-69.

cristales de forma cuboidal. La activación de estas proteínas da como resultado fragmentos de 50 a 60 kDa. La toxina CryIIA tiene actividad dual para lepidópteros y dípteros (Donovan *et al*, 88<sub>a</sub>). CryIIB y CryIIC son activas sólo para los lepidópteros (Widner y Whiteley, 89; Wu *et al*, 91).

#### 4.3 Toxinas CryIII.

Ocho diferentes holotipos integran esta clase de proteínas (autores reportados en la Tabla 7). Pueden diferenciarse dos tipos de protoxinas, un primer tipo de peso molecular de entre 70 y 75 kDa que forma cristales de tipo romboidal y otro de 130 kDa que se acumula en cristales bipiramidales (CryIIIC) y esféricos (CryIIIE). Se considera que las protoxinas de menor peso molecular son productos truncados de las más grandes. Las formas activas pesan alrededor de 66 kDa. Puede generalizarse que todas estas proteínas son activas exclusivamente para los coleópteros, a excepción de la toxina CryIIIE que además es tóxica para los ácaros (Payne *et al*, 92<sub>c</sub>).

#### 4.4 Toxinas CryIV.

Son cuatro las proteínas CryIV, todas presentan actividad contra los dípteros, pero difieren considerablemente en su peso molecular. CryIVA y CryIVB se producen como protoxinas de 135 (Ward y Ellar, 87) y 128 kDa (Chungjatupornchai *et al*, 88) respectivamente; los fragmentos tóxicos correspondientes son de 50 a 70 kDa. CryIVC y CryIVD se producen como protoxinas de 78 y 72 kDa y sus fragmentos tóxicos son de 58 y 30 kDa respectivamente (Thorne *et al*, 86; Donovan *et al*, 88<sub>c</sub>). Esta clase de proteínas se ha encontrado comúnmente en el serotipo *israelensis*.

#### 4.5 Toxinas CryV.

En 1992 Tailor y colaboradores propusieron el nombre CryV para un tipo de protoxina de 81 kDa con actividad dual para lepidópteros y coleópteros. Recientemente otros autores han reportado genes con una secuencia altamente homóloga al gen *cryV* de Tailor. Los productos de estos genes son protoxinas de 81 kDa con actividad exclusiva para los lepidópteros (Gleave *et al*, 93; Shin *et al*, 94<sub>a, b y c</sub>).

Otros autores (ver Tabla 7) también han sugerido la denominación *cryV* para otra clase de genes. El nombre propuesto para los productos correspondientes es: CryVA(a), CryVA(b), CryVB y CryVC. Las protoxinas pesan

152, 141.8, 142.1 y 88 kDa respectivamente. Las tres primeras tienen actividad dual contra nemátodos y ácaros, la última sólo para los nemátodos.

#### 4.6 Toxinas CryVI.

Dos proteínas integran esta clase (CryVIA de 54 kDa y CryVIB de 44 kDa), ambas son activas contra nemátodos (Edwards *et al*, 90) y ácaros (Payne *et al*, 92<sub>c</sub>). Una característica de estas proteínas es que se acumulan en cristales elongados que permanecen unidos a la espora después de la citólisis del bacilo.

Se ha reportado que las proteínas activas contra los nemátodos (CryV y CryVI) son tóxicas tanto para las formas larvarias como para las formas adultas de estos organismos (Edwards *et al*, 90).

#### 4.7 La necesidad de un nuevo esquema de clasificación.

Como puede verse en la Tabla 7, son varios los casos en los que se presentan ambigüedades en la denominación de las toxinas, ya que varios grupos de investigación han propuesto el mismo nombre para diferentes genes (p. ej. *cryIIIc*, *cryV*). Este problema se agudiza cuando se considera que aún no se ha dado nombre a más de treinta genes que se han clonado, secuenciado y determinado el espectro insecticida de las proteínas para las que codifican: diez productos tóxicos para lepidópteros, dieciséis para coleópteros, dos para dípteros, un producto activo para protozoarios y dos para himenópteros.

Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de diseñar un nuevo sistema de clasificación para los genes *cry*, mismo que pudiera estar basado en el grado de similitud de su secuencia nucleotídica, como se ha sugerido recientemente (The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C.).

### 5 Estructura de las $\delta$ -endotoxinas.

Por estudios de proteólisis *in vitro* y análisis de delección (Schnepf *et al*, 85<sub>E</sub>; Höfte *et al*, 86) se ha demostrado que el fragmento mínimo de codificación de la toxina está localizado en el extremo N-terminal de las proteínas. La porción C-terminal no se requiere para la actividad tóxica (Wabiko *et al*, 85; Chestukhina *et al*, 90).

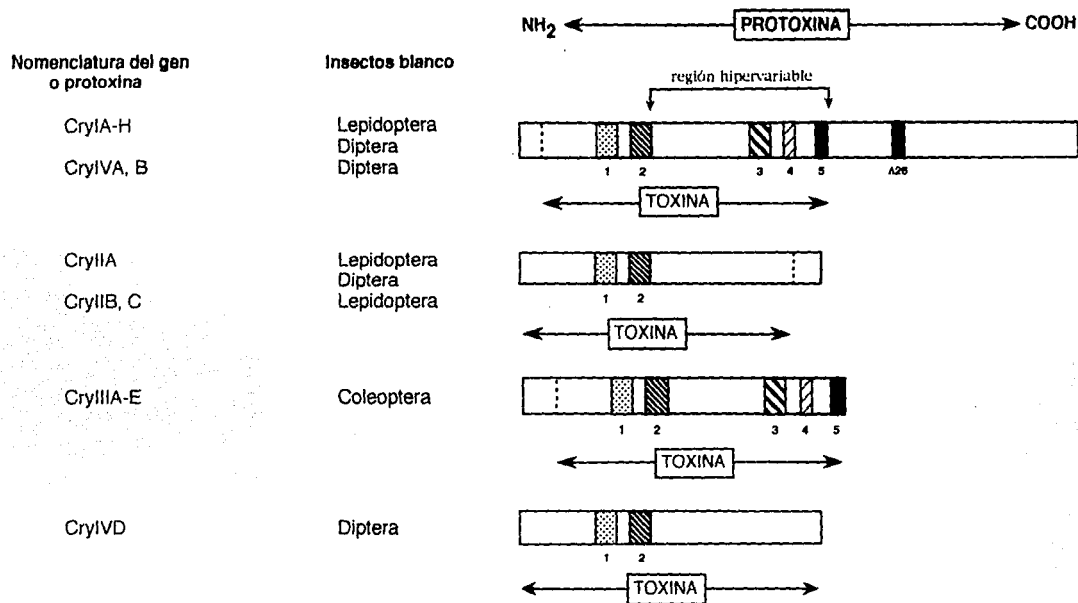
El alineamiento y comparación de la estructura primaria de las proteínas CryI, CryII, CryIII y CryIV, reveló la existencia de cinco bloques de aminoácidos altamente conservados. Estos bloques están separados por regiones hipervariables de diferentes longitudes (Höfte y Whiteley, 89) (Figura 3). La alta conservación de estos cinco bloques sugiere que son importantes para la función biológica de las proteínas Cry.

En 1991 Li y colaboradores publicaron los resultados de los estudios de difracción de rayos X de una de las  $\delta$ -endotoxinas en su forma activa: la toxina CryIIIa de *Bt var. tenebrionis*. Dichos estudios revelaron que esta proteína está compuesta por tres dominios estructurales, como puede verse en la Figura 4. El dominio I (residuos 1 al 290) está formado por un haz de siete  $\alpha$ -hélices anfipáticas; seis de ellas están dispuestas alrededor de una central, la  $\alpha$ -hélice 5. El dominio II (residuos 291 al 500) está formado por tres láminas  $\beta$ -antiparalelas que terminan en asas (*loops*) en el vértice de la molécula. A este tipo de topología se le ha denominado prisma  $\beta$  (Murzin, 94). La región que forma estas asas es la menos conservada en las proteínas Cry (región hipervariable). El dominio III (residuos 501 al extremo C-terminal) tiene una estructura  $\beta$ -sandwich con una topología de doble hélice  $\beta$  (Murzin, 94).

Cabe señalar que los cinco bloques antes citados constituyen la parte central de la molécula (denominada "corazón" de la toxina) por lo que se propone que todas las proteínas Cry poseen una conformación general similar y por lo tanto un mecanismo de acción semejante (Li et al, 91).

La evidencia que apoya esta afirmación fue obtenida por Grochulski y colaboradores (94), quienes determinaron la estructura tridimensional de la porción tóxica de la proteína CryIA(a) (residuos 34 al 608) de *Bt var. kurstaki* cepa HD-1. Estos autores encontraron que el plegamiento de la proteína es muy similar al de CryIIIa: un primer dominio integrado por siete  $\alpha$ -hélices anfipáticas (residuos 34 al 250), un dominio central conformado por tres láminas  $\beta$  (residuos 258 al 457) y un tercer dominio con estructura tipo  $\beta$ -sandwich (residuos 463 al 600). Una característica diferente de las asas que conforman el vértice de CryIA(a) (dominio II) respecto de la primer estructura reportada es que son más largas.

La posible función en la que cada uno de estos dominios está involucrada, así como el papel de cada uno de los bloques conservados, se revisa en la sección de relación estructura-función (ver sección 8).



**Figura 3.** - Esquematización de las diferentes clases de genes donde se muestra la localización y extensión aproximada de las cinco regiones altamente conservadas (bloques 1, 2, 3, 4 y 5).

Tomada de: **Aronson, A.I.** (1993). The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.* 7 (4): 489-496.





**Figura 4.** - Representación en forma de listones de la estructura tridimensional de la toxina CryIIIA de *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. El dominio I (mostrado en amarillo) está constituido por siete  $\alpha$ -hélices anfipáticas, seis de ellas están arregladas alrededor de una central, la  $\alpha$ -hélice 5. El dominio II (mostrado en verde) está formado por tres láminas  $\beta$  que terminan en asas (*loops*) en el vértice de la molécula.

A esta topología se le conoce como prisma  $\beta$ . El dominio III (mostrado en morado) tiene una estructura  $\beta$ -sandwich con una topología típica de doble hélice  $\beta$ .

Tomada de: Li, J., Carrol, J. and D.J. Ellar (1991). Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.

## 6 El intestino de los insectos.

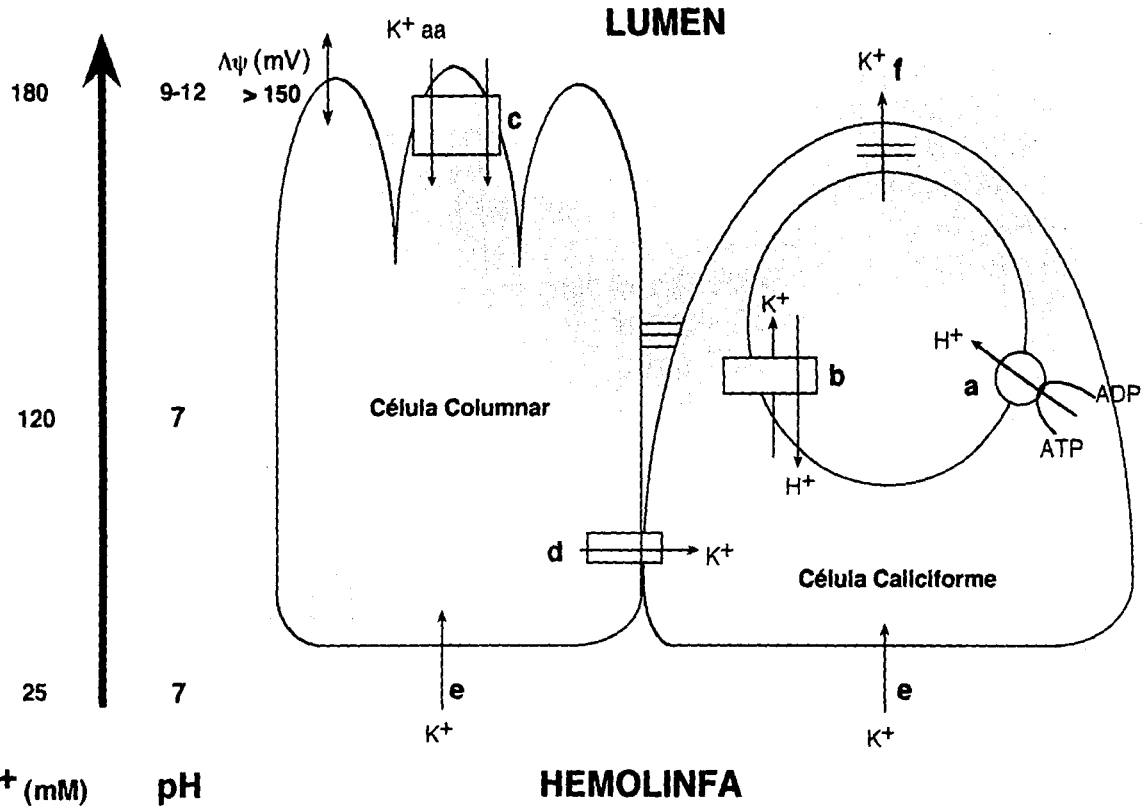
El tejido blanco de las proteínas Cry es el epitelio del intestino medio de los insectos susceptibles. A continuación se presenta un panorama general de la singular fisiología de este tejido, con la finalidad de entender mejor el mecanismo de acción de estas proteínas.

### 6.1 El orden Lepidoptera.

El estadio larvario es el período de vida de mayor voracidad de los insectos; el lugar donde se lleva a cabo la mayor parte del proceso digestivo y de absorción de nutrientes es la región media del intestino. Esta región se caracteriza por tener una muy alta alcalinidad (pH 9 a 12) y concentración de iones de potasio ( $K^+$ ) en el lumen *versus* la hemolinfa.

El intestino medio larvario es un epitelio tubular simple constituido por dos tipos principales de células (Figura 5): las células columnares que poseen una microvellosidad apical, y las células caliciformes, que se caracterizan por una cavidad grande unida en la región apical por una válvula que se cierra en forma de cremallera. Estos dos tipos de células están unidas y acopladas química y eléctricamente mediante uniones estrechas y desmosomas. La absorción de nutrientes y la regulación del transporte de  $K^+$  son las funciones que se han atribuido a cada tipo celular, respectivamente (Dow, 86). Una membrana denominada peritrófica, compuesta de quitina y glicoproteínas, bordea el intestino, separando su contenido del epitelio (Crawford y Harvey, 88).

La fisiología del intestino medio larvario está determinada de forma importante por el transporte electrogénico de  $K^+$  de la hemolinfa al lumen. La diferencia de potencial transepitelial característica de este tejido es de más de 150 mV (positivo en el lumen). Se ha propuesto que esta gran diferencia de potencial se debe principalmente a la actividad de una ATPasa tipo V localizada en la membrana apical de las células caliciformes (Harvey, 92). Esta ATPasa y un intercambiador  $H^+/K^+$ , en conjunto se denominan "bomba de  $K^+$ ". Esta bomba mantiene un ciclo fútil de  $H^+$  que proporciona la energía necesaria para que el  $K^+$  pase del interior de las células caliciformes a la cavidad de las mismas y de allí a través de la válvula apical al lumen intestinal. Se sabe que existe transporte activo y pasivo de  $K^+$  de la membrana basal al interior de ambos tipos celulares (Knowles, 94).



**Figura 5.-** Representación esquemática de los dos tipos de células del epitelio del intestino medio larvario. A la izquierda se señalan los gradientes de pH y de concentración de  $K^+$  particulares de este tejido. Las flechas representan los flujos iónicos más importantes. Las principales bombas y canales involucrados en dichos flujos son: a) ATPasa-V; b) intercambiador  $K^+/nH^+$ ; c) cotransportador  $K^+/a.a.$ ; d) unión estrecha; e) canales de  $K^+$  de la membrana basal; f) válvula apical.

## 6.2 Orden Diptera.

Al igual que los lepidópteros, este tipo de organismos se caracterizan por tener un pH intestinal muy alcalino, en el que predominan las serino proteasas. El epitelio intestinal de los dípteros es un tejido cuboidal que no posee células caliciformes. Al contrario de los lepidópteros, los dípteros tienen una relación  $K^+/Na^+$  muy baja en la hemolinfa (Dow, 86).

## 6.3 Orden Coleoptera.

El epitelio intestinal de los coleópteros también carece de células caliciformes (Dow, 86). Se han reportado especies susceptibles de dos subórdenes: los crisomélidos o escarabajos que se alimentan de hojas y los escarabeidos que se alimentan de raíces. Estos grupos poseen una fisiología muy diferente. Los crisomélidos tienen un pH intestinal de neutro a ácido en donde predominan las cisteíno y aspártico proteasas (Koller *et al*, 92). Los escarabeidos, al igual que los lepidópteros, tienen un pH intestinal alcalino, donde predominan las serino proteasas. Ambos subórdenes son similares en cuanto a la alta relación  $K^+/Na^+$  de la hemolinfa (Knowles, 94).

## 7 Mecanismo de acción de las $\delta$ -endotoxinas.

Los síntomas que se observan en las larvas de insectos cuando ingieren las proteínas Cry son: cese de la ingesta, parálisis del intestino y tracto alimenticio, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Aronson *et al*, 86; Van Rie, 92). Estos efectos empiezan a observarse desde un minuto después de la administración de las  $\delta$ -endotoxinas (Gupta *et al*, 85). Los estudios histopatológicos han mostrado que las células columnares son las estructuras afectadas inicialmente y en particular la microvellosidad apical de las mismas, la cual se destruye totalmente (Ebersold *et al*, 78; Mathavan *et al*, 89). Los efectos en las células caliciformes son más lentos, pero en este caso también se ha observado citólisis (Gupta *et al*, 85; Bravo *et al*, 92<sub>a</sub>).

El hecho de que los rápidos efectos de la acción de las proteínas Cry estén confinados a cambios estructurales del epitelio del intestino medio y la aparente ausencia de un período de latencia, sugieren que las  $\delta$ -endotoxinas no necesitan internalizarse. La evidencia experimental que apoya este planteamiento proviene de estudios inmunocitoquímicos *in vivo* sobre la

localización de estas proteínas en el intestino de larvas de lepidópteros y coleópteros intoxicadas, en las que se demostró que las toxinas se unen a la microvellosidad apical de las células epiteliales del intestino medio y nunca se internalizan durante todo el síndrome patológico (Bravo *et al*, 92<sub>a</sub>).

En la Figura 6 se representan de forma esquemática las diferentes etapas de que consta el mecanismo de acción de las proteínas Cry: 1) ingestión del cristal proteico por el organismo plaga y solubilización de mismo; 2) procesamiento de las protoxinas liberadas por acción de las proteasas presentes en el intestino; 3) unión de las formas activas a los receptores presentes en la microvellosidad apical de las células columnares; 4) inserción en la membrana y 5) formación de poros, lo cual conduce a la citólisis (6).

### 7.1 Solubilización.

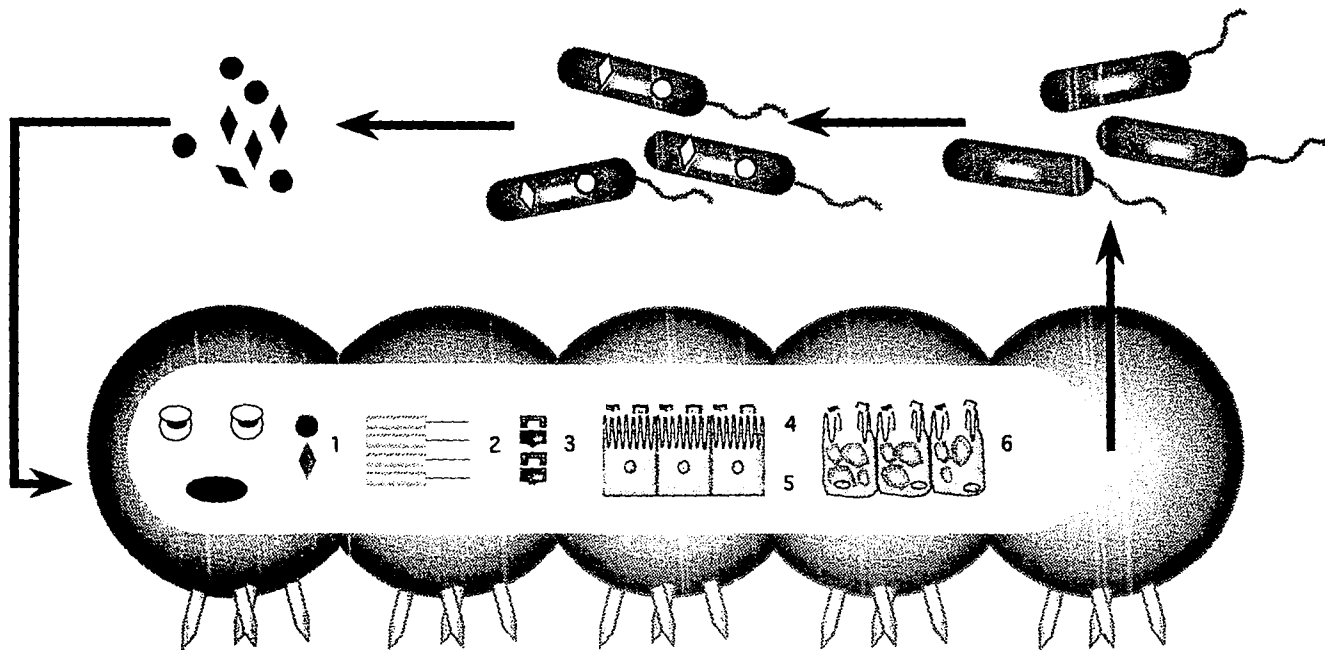
Los cristales producidos por las diversas cepas de *Bt* son insolubles, excepto a pH alcalino (Gringorten *et al*, 92). Tal como se describió en la sección 6, el intestino medio de la mayor parte de los insectos susceptibles se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras, requerimientos indispensables para la pronta disolución de las  $\delta$ -endotoxinas.

La estructura de la toxina CryIIIA reportada por Li y colaboradores (91) reveló que existen por lo menos cuatro puentes salinos intercatenarios que estabilizan dicha estructura. Esto podría explicar las propiedades de solubilidad de la toxina, la cual se disuelve tanto a pH ácido (3.9 a 4.2) como a pH alcalino (9.5 a 11.3) (Koller *et al*, 92).

Se ha observado que la solubilidad de los cristales depende de su composición específica de protoxinas, y que éste es un factor que puede ser importante para la actividad tóxica de las  $\delta$ -endotoxinas (Aronson *et al*, 91).

### 7.2 Procesamiento.

La mayoría de las  $\delta$ -endotoxinas se producen como productos inmaduros (protoxinas) que para ser activos deben ser procesados por las proteasas del intestino de los insectos. Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas CryI se da por el corte de los primeros veintiocho residuos del extremo N-terminal y de los últimos quinientos del extremo C-terminal.



N-terminal C-terminal



Sitio de proteólisis

- 1 Solubilización del cristal
- 2 Procesamiento de la protoxina
- 3 Unión al receptor
- 4 Inserción a la membrana
- 5 Formación de poros
- 6 Citólisis

**FIGURA 6.- MECANISMO DE ACCION DE LAS  $\delta$ -ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis***

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Cry (Höfte y Whiteley, 89) reveló que las proteínas de 70 kDa (CryII, CryIII y CryIVD) pueden considerarse como formas truncadas de las proteínas de 130 a 140 kDa.

Se han descrito sitios posibles de procesamiento que mapean en las asas entre las hélices  $\alpha$ -3 y  $\alpha$ -4 (CryIIIA y CryIIA) y entre  $\alpha$ -5 y  $\alpha$ -6 (CryIVA y B). Las proteínas procesadas *in vitro* en estos sitios retienen su actividad *in vivo*; posiblemente ésto se deba a que el fragmento N-terminal permanece estrechamente asociado al resto de la toxina después del corte (Knowles, 94). Se desconoce si *in vivo* se presenta el mismo fenómeno, pero este hecho puede estar relacionado con la inserción de la proteína en la membrana.

El procesamiento de las proteínas Cry es un factor que puede contribuir en la determinación de su especificidad. Un ejemplo ilustrativo de ésto es el reportado por Haider y Ellar (87) en el caso de CryIA(b) proveniente de *Bt* var. *aizawai* cepa IC1, la cual es tóxica para los lepidópteros (*Pieris brassicae*) cuando se procesa con tripsina, y activa para los dípteros (*Aedes aegypti*) cuando se trata con jugo gástrico de éstos.

### 7.3 Unión al receptor.

Siguiendo diferentes metodologías se ha confirmado que las proteínas Cry, después de penetrar la membrana peritrófica, se unen a sitios específicos (receptores) localizados en las microvellosidades de las células columnares del intestino medio de los lepidópteros (Hofmann y Lüthy, 86; Hofmann *et al*, 88<sub>a</sub>), coleópteros (Bravo *et al*, 92<sub>a</sub>) y dípteros (Ravoahangimalala *et al*, 93) que se han usado como modelo.

La unión al receptor es la etapa determinante de la alta especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas (Van Rie, 1992); por ésto, diversos grupos de investigación han dedicado mucho esfuerzo a entender este proceso. A continuación se describen algunos de los resultados más relevantes que se han obtenido al estudiar la cinética de unión *in vitro* de estas proteínas a vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA) preparadas a partir de intestino medio de diversas especies de insectos (Tabla 8).

TABLA 8.- ESTUDIOS DE UNION DE <sup>125</sup>I-TOXINAS EN VMMA DE DIFERENTES ESPECIES DE INSECTOS

TOXINA	INSECTO	CL <sub>50</sub>	K <sub>d</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (pmol/mg)	REFERENCIA
CryIA(b)	<i>Manduca sexta</i>	6.8 ng/cm <sup>2</sup>	0.43	4.3	Hofmann <i>et al.</i> (88) <sub>a</sub>
CryIA(b)	<i>Pieris brassicae</i>	0.9 µg/ml	3.20	13.6	
CryIB	<i>Pieris brassicae</i>	2.8 µg/ml	4.70	18.8	
CryIA(a)	<i>Manduca sexta</i>	20 ng/cm <sup>2</sup>	1.10	9.9	Van Rie <i>et al.</i> (89) <sub>a</sub>
CryIA(b)		20 ng/cm <sup>2</sup>	0.20	7.9	
CryIA(c)		9 ng/cm <sup>2</sup>	0.20	6.3	
CryIA(a)	<i>Heliothis virescens</i>	157 ng/cm <sup>2</sup>	0.80	3.7	
CryIA(b)		7 ng/cm <sup>2</sup>	0.40	21.0	
CryIA(c)		2 ng/cm <sup>2</sup>	0.40	62.3	
CryIA(b)	<i>Manduca sexta</i>	N.D.	0.24	7.7	Hendrickx <i>et al.</i> (89)
CryIA(a)	<i>Manduca sexta</i>	20 ng/cm <sup>2</sup>	1.48	19.9	Van Rie <i>et al.</i> (90)
CryIC		111 ng/cm <sup>2</sup>	0.41 y 7.05	8.95 y 9.44	
CryIE		73 ng/cm <sup>2</sup>	0.092 y 216	2.97 y 283	
CryIA(a)	<i>Spodoptera littoralis</i>	> 1,350 ng/cm <sup>2</sup>	N.U.	N.U.	
CryIC		93 ng/cm <sup>2</sup>	0.18 y 13.9	2.04 y 38.9	
CryIE		88 ng/cm <sup>2</sup>	1.18 y 352	4.73 y 230	
CryIA(a)	<i>Heliothis virescens</i>	157 ng/cm <sup>2</sup>	1.16	3.47	
CryIC		> 2,700 ng/cm <sup>2</sup>	22.4	37.9	
CryIE		> 2,700 ng/cm <sup>2</sup>	N.U.	N.U.	
CryIA(b)	<i>Lymantria dispar</i>	1.08 ng/cm <sup>2</sup>	19.80	2.70	Wolfersberger (90) <sub>a</sub> <sub>b</sub>
CryIA(c)		425 ng/cm <sup>2</sup>	2.03	3.69	
CryIA(c)	<i>Manduca sexta</i>	4.51 ng/cm <sup>2</sup>	1.58	20.2	Garczynski <i>et al.</i> (91) <sub>c</sub>
	<i>Heliothis virescens</i>	2.26 ng/cm <sup>2</sup>	2.09	38.0	
	<i>Helicoverpa zea</i>	464 ng/cm <sup>2</sup>	5.66	44.4	
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	> 2,000 ng/cm <sup>2</sup>	0.68	4.5	



CryIA(b) CryIA(c)	<i>Heliothis virescens</i> sensible	0.21 µg/ml 0.11 µg/ml	5.92 1.29	0.37 0.37	Macintosh <i>et al.</i> (91)
CryIA(b) CryIA(c)	<i>Heliothis virescens</i> resistente	15.0 µg/ml 1.8 µg/ml	9.48 4.93	2.14 1.40	
CryIA(a) CryIA(c)	<i>Bombyx mori</i>	0.002 µg/larva 0.421 µg/larva	3.50 50.35	7.95 2.85	Lee <i>et al.</i> (92)
CryIA(a) CryIA(b)	<i>Bombyx mori</i>	1.9 µg/g 27.8 µg/g	0.89 1.46	7.68 5.22	Ihara <i>et al.</i> (93) <sub>d</sub>
CryIA(b)	<i>Manduca sexta</i>	7.5 ng/cm <sup>2</sup>	1.075	3.162	Vadlamudi <i>et al.</i> (93)
CryIA(b) CryIA(c) CryIB	<i>Ostrinia nubilalis</i>	50.0 ng/cm <sup>2</sup> 531.2 ng/cm <sup>2</sup> 105.8 ng/cm <sup>2</sup>	0.66 7.38 N.U.	4.75 3.30 N.U.	Denolf <i>et al.</i> (93) <sub>e</sub>
CryIA(b) CryIA(c)	<i>Trichoplusia ni</i>	480 ng/cm <sup>2</sup> 320 ng/cm <sup>2</sup>	3.6 4.7	0.64 0.79	Estada y Ferre' (94)
CryIIIA	<i>Tenebrio molitor</i>	21 µg/cm <sup>2</sup>	17.5	304.0	Belfiore <i>et al.</i> (94)
CryIC	<i>Spodoptera littoralis</i> <i>Bombyx mori</i>	73 ng/cm <sup>2</sup> 10 ng/cm <sup>2</sup>	10.5 10.3	9.0 8.0	Sanchis <i>et al.</i> (94) <sub>f</sub>

Notas:

- N.D. No determinado.  
N.U. No hay unión.  
CL<sub>50</sub> Concentración necesaria para causar la muerte al 50% de la población. Generalmente se reporta como dosis de toxina aplicada sobre superficie o peso de dieta (ng/cm<sup>2</sup> ó µg/g). En otros casos se reporta como concentración de toxina de la solución en la que se "bañan" discos de hoja de la planta hospedera del insecto correspondiente (µg/ml). También en algunos casos se alimenta a las larvas directamente para lo que se reporta la dosis de toxina aplicada a cada individuo (µg/larva).  
K<sub>d</sub> Constante de afinidad.  
B<sub>a</sub> Concentración de sitios de unión (receptores) por mg de proteína de vesículas.  
a<sub>max</sub> Usando la toxina CryIA(b) en VMMA de *M. sexta* se demostró que la UNION ES IRREVERSIBLE.  
b Este es el primer estudio en el que se demostró que NO EXISTE CORRELACION DIRECTA ENTRE AFINIDAD DE UNION/NUMERO DE RECEPTORES Y TOXICIDAD IN VIVO. En este caso incluso dicha relación es inversa.  
c En este estudio se mostró que CryIA(c) la cual tiene una muy baja actividad para *S. frugiperda* se une saturablemente y con alta afinidad a las vesículas de dicho insecto. Este hecho sustenta la idea de que LA UNION ES NECESARIA, PERO INSUFICIENTE PARA LA TOXICIDAD IN VIVO.  
d Primer estudio en el que se muestra que la UNION de CryIA(b) al tejido de *B. mori* es REVERSIBLE.  
e En este estudio se demostró que los análisis de competencia usando toxinas marcadas con yodo en VMMA y aquellos en los que se emplean toxinas marcadas con biotina en cortes de tejido arrojan resultados cualitativamente comparables.  
f Se demostró que la UNION de CryIC al tejido de *B. mori* es REVERSIBLE.

### 7.3.1 Estudios cinéticos y de competencia.

Se ha demostrado en forma contundente la unión específica y saturable de toxinas marcadas con  $^{125}\text{I}$  en las VMMA de larvas de lepidópteros y coleópteros. De los resultados obtenidos en los estudios de competencia homóloga con proteínas CryI, puede generalizarse que la constante de afinidad ( $K_d$ ) del complejo toxina-receptor es del orden de 0.2 a 20.0 nM y que la concentración de sitios de unión ( $B_{\text{max}}$ ) va de 2 a 62 pmoles/mg de proteína de vesículas (ver Tabla 8). Sólo se ha reportado un estudio de este tipo con VMMA de coleópteros usando la toxina CryIII A; para este caso se determinó que la  $K_{d\text{es}}$  de 17.5 nM y la  $B_{\text{max}}$  de 304 pmoles/mg de proteína de vesículas.

Los estudios de competencia heteróloga han revelado que la unión al receptor no es un proceso simple, ya que una misma toxina puede tener más de un sitio de unión en el mismo insecto o bien varias toxinas pueden competir por el mismo sitio de unión. Un ejemplo que ilustra esta complejidad es el del lepidóptero *Heliothis virescens* en el que la proteína CryI A(c) se une a varios receptores, diferentes de aquél por el que compiten CryI A(a) y CryI A(b) (Van Rie et al, 89; MacIntosh et al, 91), dos proteínas muy relacionadas a ésta (la similitud de la secuencia de aminoácidos entre estas tres toxinas es mayor del 80%).

Van Rie y colaboradores (89) fueron los primeros en analizar la cinética del desplazamiento de una toxina marcada por su homólogo "frío"; en dicho estudio se encontró que esta cinética es bifásica, donde el componente mayoritario es irreversible. Varios autores confirmaron la irreversibilidad de la unión de las toxinas a sus receptores (Garczynski et al, 91; Lee et al, 92; Belfiore et al, 94). Dos estudios recientes presentan excepciones a ésto. Ihara y colaboradores (93) trabajando con VMMA de *Bombyx mori* y las proteínas CryI A(a) y CryI A(b) encontraron que esta última es quince veces menos tóxica y que esta menor actividad no se debe a diferencias en  $K_d$  ni en  $B_{\text{max}}$ , sino a que el componente mayoritario de la cinética de desplazamiento es reversible. En fecha reciente se demostró que la unión de CryI C a VMMA de este mismo insecto también es reversible (Sanchis et al, 94). La reversibilidad de la unión de la toxina a su receptor es entonces un factor importante para la actividad de estas proteínas *in vivo*.

Son varios los casos en los que se ha encontrado correlación entre la afinidad/concentración de sitios de unión y toxicidad *in vivo* (ver Tabla 8), pero ésto no puede generalizarse. En la literatura se encuentran varias excepciones

a este respecto. CryIC es una proteína prácticamente inactiva para *Heliothis virescens* y sin embargo se une específicamente a las VMMA de este insecto (Van Rie et al, 90). Otro ejemplo similar es el de la toxina CryIA(c) en las VMMA de *Spodoptera frugiperda* (Garczynski et al, 91). Wolfersberger (90<sub>a</sub>) reportó que en el caso de las toxinas CryIA(b) y CryIA(c) la correlación entre  $K_d/B_{max}$  y toxicidad *in vivo* para *Lymantria dispar* es incluso inversa.

Esta evidencia experimental sustenta la idea de que la unión es un evento indispensable para la toxicidad, pero no el único. Los insectos en los que no se ha encontrado correlación entre actividad tóxica y unión, son candidatos para usarse como modelo en estudios sobre los pasos siguientes a la unión, es decir, la inserción en la membrana y la alteración de la permeabilidad de la misma.

### 7.3.2 Naturaleza bioquímica del receptor.

Desde 1987 se han hecho importantes esfuerzos dirigidos a identificación, purificación y caracterización de la(s) molécula(s) que sirve(n) de receptor(es) a las  $\delta$ -endotoxinas en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio (Tabla 9). La metodología más empleada ha sido incubar las VMMA de algún insecto con la toxina específica para el mismo y analizar este complejo en electroforesis en gel de poli(acrilamida) en condiciones desnaturalizantes; posteriormente las proteínas son transferidas a un filtro de nitrocelulosa, donde la unión específica de la  $\delta$ -endotoxina a alguna(s) de las bandas, se revela primeramente con un anticuerpo antitoxina y después con un segundo anticuerpo dirigido contra el primero. Es discutible que la toxina y su receptor conserven su estructura nativa y puedan interactuar específicamente en estas condiciones, pero al parecer así ocurre.

Usando este tipo de experimentos se ha encontrado que para la mayoría de las toxinas CryI estudiadas, las moléculas a las que se unen con alta afinidad son glicoproteínas (Knowles y Ellar, 84; Haider y Ellar, 87; Oddou et al, 91; Garczynski et al, 91; Indrasith y Hori, 92; Oddou et al, 93).

Fue hasta el año pasado cuando después de solubilizar las VMMA obtenidas del lepidóptero *Manduca sexta* y hacer pasar el solubilizado por una columna de afinidad a la que previamente se unió la protoxina CryIA(c), que se purificó y secuenció una glicoproteína de 120 kDa que aparentemente es la molécula que sirve de receptor a la proteína mencionada. Esta glicoproteína es altamente homóloga a las secuencias previamente reportadas de aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) de otras fuentes (Knight et al, 94<sub>a</sub>). Un análisis más exhaustivo de

**TABLA 9.- RECEPTORES PUTATIVOS PARA LAS PROTEINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis***

PROTEINA	ORGANISMO	RECEPTOR	REFERENCIA
CryIA(b)	Línea celular CF1 de <i>Choristoneura fumiferana</i>	Glicoproteína de 68 kDa	Haider y Ellar (87)
CryIA(a) CryIA(b) CryIA(c)	<i>Heliothis virescens</i>	Glicoproteína 170 kDa, Glicoproteína 170 kDa, Proteínas 120 y 140 kDa	Oddou <i>et al.</i> (91)
CryIA(c)	<i>Manduca sexta</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa zea</i> <i>Spodoptera frugiperda</i>	Glicoproteína 120 kDa Proteínas 155 kDa y 120, 103, 90, 81 y 63 kDa Proteínas 150 kDa, 120, 103, 90 y 63 kDa Proteína 148 kDa	Garczynski <i>et al.</i> (91)
CryIA(a) CryIA(b)	<i>Bombyx mori</i> <i>Spodoptera litura</i>	Glicoproteínas 220, 150 y 130 kDa Glicoproteína 160 kDa	Indrasith y Hori (92)
CryIA(b)	<i>Manduca sexta</i>	Proteína 205 kDa, pI 5.5 ± 0.1	Vadlamudi <i>et al.</i> (93)
CryIA(a) CryIA(b) CryIA(c) CryIC	<i>Heliothis virescens</i>	Glicoproteína 170 kDa Glicoproteína 170 kDa Proteínas 140 y 120 kDa Proteína 40 kDa	Oddou <i>et al.</i> (93)
CryIA(a) CryIA(b) CryIA(c) CryIC	<i>Heliothis zea</i>	Glicoproteína 170 kDa Glicoproteína 170 kDa Proteínas 150, 140 y 120 kDa N.D.	Oddou <i>et al.</i> (93)
CryIA(a) CryIA(b) CryIA(c) CryIC	<i>Spodoptera littoralis</i>	Proteína 160 kDa Proteína 160 kDa Proteínas 125 y 115 kDa Proteína 40 kDa	Oddou <i>et al.</i> (93)
CryIA(a) CryIA(b) CryIA(c) CryIC	<i>Spodoptera exigua</i>	Proteínas 200 y 180 kDa Proteínas 200 y 180 kDa Proteínas 130 y 115 kDa Proteína 40 kDa	Oddou <i>et al.</i> (93)
CryIA(a) CryIA(b) CryIA(c) CryIC	<i>Spodoptera litura</i>	Proteína 150 kDa Proteína 150 kDa Proteína 125 kDa Proteína 40 kDa	Oddou <i>et al.</i> (93)
CryIC CryIA(c)	<i>Spodoptera littoralis</i>	Proteína 40 kDa, Proteína 40 kDa	Sanchis y Ellar (93)
CryIA(c)	<i>Manduca sexta</i>	Proteína 120 kDa (AMINOPEPTIDASA N) Proteína 65 kDa (FOSFATASA)	Sangadala <i>et al.</i> (94)
CryIA(c)	<i>Manduca sexta</i>	Glicoproteína 120 kDa (AMINOPEPTIDASA N)	Knight <i>et al.</i> (94)
CryIA(a) CryIA(b) CryIA(c)	<i>Manduca sexta</i>	Proteína 210 kDa, Proteína 210 kDa, Proteína 210 kDa	Martínez-Ramírez <i>et al.</i> (94)
CryIA(c)	<i>Heliothis virescens</i>	Proteínas 140, 120, 90 y 60 kDa (Actividad de AMINOPEPTIDASA N <sub>2</sub> )	Cowles <i>et al.</i> (94)
CryIIIA	<i>Tenebrio molitor</i>	Proteína 144 kDa	Belfiore <i>et al.</i> (94)

Notas: N.D. no determinado.

a CryIA(a) y CryIA(b) se unen a la misma glicoproteína; los experimentos de competencia sugieren que se unen a sitios diferentes.

b CryIC se une también en menor grado a otra proteína de 65 kDa.

c CryIA(a), CryIA(b) y CryIA(c) se unen a la misma proteína.

d No se identificó cuál de las proteínas es la que tiene actividad de aminopeptidasa N.

esta molécula mostró que contiene abundantes grupos N- y O-glicanos. El tratamiento con peryodato, que destruye los carbohidratos sin alterar el esqueleto de la proteína, elimina la interacción específica de CryIA(c) y su presunto receptor (Knight *et al*, 94<sub>b</sub>). Lo anterior demuestra que, por lo menos para este caso, la presencia del carbohidrato es importante para la unión entre la toxina y su receptor.

Los resultados anteriores coinciden con los reportados por Sangadala y colaboradores (94), quienes prepararon anticuerpos monoclonales contra una banda de 120 kDa proveniente de las VMMA de *Manduca sexta* a la que se unió específicamente la toxina CryIA(c). Dichos anticuerpos se usaron luego para purificar por inmunoafinidad el presunto receptor a partir de vesículas solubilizadas. En este caso resultó ser una mezcla de dos proteínas, una de 120 kDa y otra de 65 kDa, lo que constituye el receptor. La secuenciación parcial de la proteína de 120 kDa reveló que ésta es altamente homóloga a las aminopeptidasas N reportadas previamente en el banco de secuencias de proteínas. Por ensayos enzimáticos comprobaron además que la mezcla de proteínas de 120/65 kDa tiene actividad de fosfatasa; los autores sugieren que la proteína responsable de esta actividad es la de menor peso molecular. Este mismo grupo de investigación reportó después (Adang *et al*, 1994<sub>b</sub>) que la proteína de 120 kDa está unida a la membrana por medio de un ancla de glicosilfosfatidilinositol, en forma similar a como se ha reportado en *Bombyx mori* (Takesue *et al*, 92).

Es interesante mencionar que algunos coronavirus que infectan células intestinales de cerdos (Delmas *et al*, 92) y humanos (Yeager *et al*, 92) también usan como receptor a las ectoenzimas dependientes de zinc, aminopeptidasas N.

### 7.3.3 Unión y desarrollo de resistencia.

Hasta hace unos años se pensaba que los insectos no desarrollarían resistencia a las  $\delta$ -endotoxinas, debido a que a pesar de que éstas han sido usadas comercialmente desde hace más de tres décadas, no se tenían reportes de aparición de poblaciones resistentes en el campo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la aparición de poblaciones silvestres resistentes de *Plutella xylostella* en Hawaii, Florida, Nueva York, Filipinas, Tailandia y Malasia (Whalon y McGaughey, 93; Tabashnik, 94). Asimismo, se han aislado poblaciones de laboratorio resistentes a las proteínas Cry de al menos diez especies de lepidópteros, dos especies de coleópteros y cuatro especies de dípteros. De estas diez especies de lepidópteros, cinco (*Trichoplusia ni*,

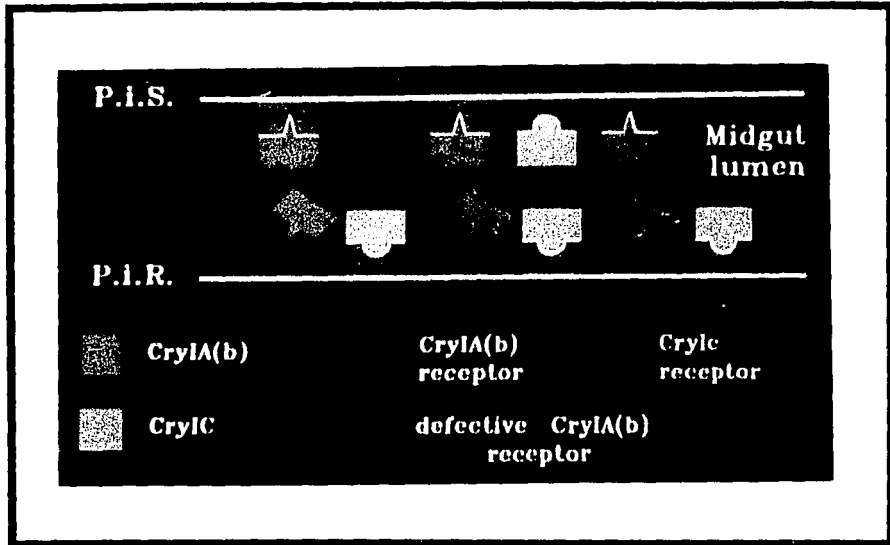
*Plutella xylostella*, *Heliiothis virescens*, *Spodoptera exigua* y *Plodia interpunctella*) han desarrollado un alto nivel de resistencia. Estos cinco lepidópteros representan tres familias del orden *Lepidoptera* (*Noctuidae*, *Plutallidae* y *Pyalidae*), lo que sugiere que la capacidad de desarrollar resistencia a *Bt* está ampliamente diseminada en este orden de insectos.

La reducción de la unión de las  $\delta$ -endotoxinas a su receptor se ha identificado como el mecanismo primario para el desarrollo de resistencia en *Plodia interpunctella* (Van Rie, 91) y *Plutella xylostella* (Ferré et al, 91) (ver Figura 7) .

En contraste con estos estudios, dos investigaciones independientes en *Heliiothis virescens* no encontraron una relación clara entre los cambios en la unión de la toxina y la resistencia a CryIA(b) y CryIA(c). Uno de los grupos (MacIntosh et al, 91; ver Tabla 8) encontró que las larvas resistentes tuvieron una  $K_d$  de dos a cuatro veces mayor y una  $B_{max}$  seis veces mayor comparado con las larvas susceptibles. El otro grupo (Gould et al, 92) encontró disminución de  $K_d$  y  $B_{max}$ . De estos resultados se concluye que el mecanismo de resistencia en este caso es diferente al descrito para los dos insectos antes citados.

El hecho de que no en todos los casos la resistencia se deba a cambios en los parámetros de unión de las proteínas Cry a sus receptores, apoya la idea de que puede existir otro tipo de mecanismos de resistencia. Dichos mecanismos pudieran ser la disminución de la solubilización del cristal insecticida, la alteración de las proteasas responsables de la activación de las protoxinas o bien, la reducción de la sensibilidad a los eventos posteriores a la unión, como la inserción en la membrana y la formación de poros.

Recientemente Oppert y colaboradores (94) han encontrado evidencia que apoya este planteamiento, ya que demostraron que la aparición de resistencia en una cepa de *Plodia interpunctella* se debió a alteración en la activación de una protoxina específica para dicho insecto.



**Figura 7.-** Mecanismo de resistencia propuesto para las toxinas Cry en *Plodia interpunctella*. Los insectos pueden adquirir resistencia hacia estas proteínas al cambiar las características de unión a los receptores del intestino medio. La unión menos eficiente debida a la disminución de la afinidad del receptor de CryIA (b) causa resistencia a CryIA(b). La cepa resistente es, sin embargo, más susceptible a CryIC comparada con la cepa sensible por el incremento en la concentración de sitios de unión para CryIC. Abreviaturas: PiS, *Plodia interpunctella*, cepa sensible; PiR, *Plodia interpunctella*, cepa resistente.

Tomada de Van Rie, J. (1991). Insect control with transgenic plants: resistance proof?. TIBTECH 9: 81-83

#### 7.4 Inserción en la membrana.

La aparente irreversibilidad de la unión de las  $\delta$ -endotoxinas a sus receptores observada en los experimentos de desplazamiento antes descritos, suele considerarse como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana para luego causar como consecuencia final la citólisis del tejido blanco (Van Rie et al, 89).

Se ha demostrado que a dosis muy altas ( $\mu\text{M}$ ), las proteínas Cry son capaces de interactuar *per se* con membranas lipídicas artificiales e insertarse en las mismas, haciéndolas permeables a cationes y solutos neutros relativamente pequeños (ver Tabla 10) (Yunovitz y Yawetz, 88; Haider y Ellar, 89<sub>b</sub>; English et al, 91<sub>a</sub> y <sub>b</sub>).

En un estudio recién publicado se comprobó que la capacidad de la toxina CryIC para interactuar con la membrana y disipar el potencial transmembranal aumenta de forma sustantiva al disminuir el pH ( $\text{pH} < 5$ ), y que ésto está correlacionado con el aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la molécula (Butko et al, 94). Estos datos sugieren que en estas condiciones *in vitro*, la proteína sufre un cambio conformacional que la lleva a un estado competente para la inserción; es posible que *in vivo* se logre una transición a un estado conformacional similar, por ejemplo, por la unión al receptor o por el procesamiento proteolítico del complejo toxina-receptor.

Es importante señalar que a concentraciones fisiológicamente relevantes (nM-pM), las  $\delta$ -endotoxinas no parecen insertarse espontáneamente en las membranas biológicas que carecen de los receptores específicos para ellas (Knowles, 94).

#### 7.5 Formación del poro.

Angus (1968) fue el primero en proponer que las toxinas de *Bt* podrían actuar alterando la permeabilidad selectiva de la membrana de las células blanco. En la actualidad se ha confirmado sin lugar a dudas que esta alteración es lo que conduce a la citólisis, alteración de la integridad del intestino y finalmente la muerte del insecto (Knowles, 94).

Para entender cómo las  $\delta$ -endotoxinas afectan la permeabilidad de las membranas se han usado gran diversidad de enfoques (Tablas 10 y 11). La



TAHIA 10.- ENSAYOS IN VITRO QUE HAN SIDO USADOS PARA ESTUDIAR EL MODO DE ACCION DE LAS  $\delta$ -ENDOTOXINAS DE Bacillus thuringiensis

<b>MEMBRANAS ARTIFICIALES</b>			
* Liberación de $^{14}\text{C}$ -sacarosa	CryIC activada (10 $\mu\text{M}$ )	Vesículas de FC:C	Yunovitz y Yawetz (88)
* Unión a la membrana * Incremento de la dispersión de la luz * Liberación de $^3\text{H}$ -alanina y $^3\text{H}$ -uracilo	CryIA(b) activada (50 $\mu\text{g}$ )	Liposomas de FC:DiffFC:C:DIF	Haider y Ellar (89) <sub>b</sub>
* Incremento del influjo y eflujo de $^{86}\text{Rb}^+ - \text{K}^+$ * Incremento de la permeabilidad al agua * Ningún efecto en la permeabilidad a Cl	CryIA(c) activada ( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ lípido)	Vesículas de FC	English <u>et al.</u> (91) <sub>a</sub>
* Alteración de la permeabilidad * Inserción a la membrana * Agregación de monómeros dentro de la membrana * Actividad hemolítica en eritrocitos humanos	$\alpha$ -hélice 5 CryIIIA (0.01:1 - 0.2:1, proporción molar toxina:lípido)	Vesículas de FC:FS	Gazit y Shai (93)
* Unión a la membrana * Coensamblamiento con $\alpha$ -hélice 5 de CryIIIA	$\alpha$ -hélice 7 CryIIIA (idem que el anterior)	N.D.	Shai y Gazit (94)
* ESTUDIOS EN BICAPAS LIPIDICAS PLANAS (TABLA 11)			
<b>CELULAS EN CULTIVO</b>			
* Unión a receptor (glicoproteína) * Citotoxicidad * Efecto protector N-acetil-galactosamina y ácido N-acetil-neuramínico	Toxinas activadas cepa HD-1 <sub>a</sub> (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ células)	Línea celular CF1 de <u>Choristoneura fumiferana</u>	Knowles y Ellar (84)
* Inhibición de la ATPasa $\text{H}^+/\text{K}^+$ sensible a vanadato	Toxina 68 kDa de var. <u>kurstaki</u>	Línea celular CHE de <u>Manduca sexta</u>	English y Cantley (86)
* Liberación de marcadores intracelulares en función de su peso molecular (tamaño) * Protección osmótica del efecto de la toxina por rafinosa y sacarosa * Estimación del tamaño del poro (0.5-1.0 nm) * Hipótesis citólisis osmótica como mecanismo general de acción de las proteínas Cry	CryIA(a), CryIA(b) y CryIA(c) activadas (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; $1-2 \times 10^6$ células/ml)	Línea celular CF1	Knowles y Ellar (87)
* Citotoxicidad diferencial de acuerdo al tipo de procesamiento * Unión a proteína de membrana de 68 kDa en CF1	CryIA(b) activada (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ células $1-2 \times 10^6$ células/ml)	Líneas celulares CF1 y de <u>Aedes albopictus</u>	Haider y Ellar (87)

<ul style="list-style-type: none"> <li>* Patch clamp</li> <li>* Formación de canales aniónicos (configuración "inside-out")</li> <li>* Aumento de la concentración intracelular de <math>Ca^{2+}</math></li> </ul>	CryIC activada	Línea celular SF9 de <u>Spodoptera frugiperda</u>	Schwartz <u>et al.</u> (91)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Aumento de la permeabilidad de la membrana a <math>H^+</math>, <math>K^+</math> y <math>Na^+</math></li> </ul>	CryIC activada	Línea celular SF9	Vachon <u>et al.</u> (94)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Citotoxicidad</li> </ul>	$\alpha$ -Hélice 5 CryIIIA	Línea celular SF9	Shai y Gazit (94)
<b>INTESTINO MEDIO AISLADO</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inhibición total de la corriente de corto circuito (Icc)</li> </ul>	Protoxinas cepa HD-1 <sub>a</sub> (60 $\mu$ g/larva)	<u>M. sexta</u>	Griego <u>et al.</u> (79)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inhibición parcial de Icc (efecto irreversible)</li> <li>* Disminución de la resistencia de la membrana</li> </ul>	Toxinas activadas cepa HD-1 <sub>a</sub>	<u>M. sexta</u>	Harvey y Wolfersberger (79)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inhibición total de Icc</li> <li>* Protección y reversión del efecto por <math>Ba^{2+}</math> (4 mM) y <math>Ca^{2+}</math> (5 mM)</li> </ul>	Protoxinas CryIA(a), CryIA(b) y CryIA(c) (5-50 nM)	<u>M. sexta</u>	Crawford y Harvey (88)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inmunolocalización de toxina unida en larvas alimentadas</li> <li>* Daño histológico</li> </ul>	CryIA(b) activada (5 $\mu$ g/larva) CryIB activada (5 $\mu$ g/cm <sup>2</sup> ) CryIIIA activada (1 $\mu$ g/ml)	<u>M. sexta</u> <u>Plutella xylostella</u> <u>Leptinotera</u> <u>dececlinata</u>	Bravo <u>et al.</u> (92 <sub>a</sub> )
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Unión específica <u>in vitro</u> a cortes de tejido</li> </ul>	CryIA(b) activada CryIB activada CryIIIA activada (2.5 $\mu$ g/laminilla)	<u>M. sexta</u> <u>P. xylostella</u> <u>L. dececlinata</u>	Bravo <u>et al.</u> (92 <sub>b</sub> )
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Idem que los dos anteriores</li> <li>* Competencia homóloga y heteróloga en cortes de tejido</li> </ul>	CryIC, CryID	<u>S. frugiperda</u>	Sánchez-Quintana (94)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inhibición total de Icc (toxina silvestre)</li> <li>* Pérdida de la capacidad de inhibición de Icc (mutantes)</li> </ul>	CryIA(a), CryIA(a) R526K y CryIA(a) R532K (0.11 $\mu$ g/ml)	<u>Bombyx mori</u>	Chen <u>et al.</u> (93)
<b>VIRIA</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inhibición acumulación de histidina/<math>K^+</math></li> <li>* No aumenta la permeabilidad a <math>Na^+</math> y <math>H^+</math></li> </ul>	Toxine var. <u>kurstaki</u> cepa 4432	<u>Pieris brassicae</u>	Sacchi <u>et al.</u> (86)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inhibición de fosfatasa alcalina sensible a vanadato</li> </ul>	Toxina activada (60 kDa) cepa EG 2042	<u>Heliothis virescens</u>	English y Reddy (89)
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Inhibición de acumulación de alanina/<math>K^+</math> o <math>Na^+</math></li> <li>* Aumento de permeabilidad a alanina</li> </ul>	CryIA(b) activada (0.1 $\mu$ g/ml)	<u>M. sexta</u>	Hendrickx <u>et al.</u> (90)

* Inhibición de acumulación de fenilalanina/K <sup>+</sup> o Na	CryIA(c) activada	<u>M. sexta</u>	Wolfersberger (90 <sub>b</sub> )
* Aumento en velocidad de encogimiento (medido como cambios en la dispersión de la luz) * Aumento de permeabilidad a <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> -K <sup>+</sup>	CryIA(c) activada (ng toxina/μg lípido)	Vesículas híbridas FC:VMMA <i>M. virescens</i>	English <u>et al.</u> (91 <sub>a</sub> )
* Inhibición de acumulación de fenilalanina/K <sup>+</sup> * Correlación directa capacidad de inhibición acumulación a.a./K <sup>+</sup> y toxicidad in vivo	CryIA(b) y CryIA(c) activadas (8.7 pmol/mg proteína membrana)	<u>Lymantria dispar</u>	Wolfersberger (91)
* Inhibición preferencial de acumulación de leucina/K <sup>+</sup> vs aspártico/K <sup>+</sup> * Interacción directa con el cotransportador	CryIA(c) activada (1.6 μg/mg proteína vesículas)	<u>M. sexta</u>	Reuveni y Dunn (91)
* Inhibición de acumulación de leucina/K <sup>+</sup> (proteína silvestre) * Pérdida de la capacidad de inhibición de acumulación de a.a./K <sup>+</sup> (mutantes)	CryIA(c) activada CryIA(c) mutantes en la α-hélice 5 (introducción de residuos cargados o prolina)	<u>M. sexta</u>	Wu y Aronson (92)
* Alteración del potencial de membrana * Aumento de la permeabilidad a cationes mono y divalentes	CryIA(a) activada (10 nM/20 μg proteína vesículas)	<u>B. mori</u>	Uemura <u>et al.</u> (92)
* Cambios del volumen vesicular (monitoreo de cambios en la dispersión de la luz) * Aumento de la permeabilidad a aniones, cationes y solutos neutros	CryIA(c) activada (3.75 pmol/mg proteína vesículas)	<u>M. sexta</u>	Carrol y Ellar (93)
* Inhibición de acumulación de lisina/K <sup>+</sup> e histidina/K <sup>+</sup> * Interacción directa e inhibición no competitiva del cotransportador de histidina	CryIA(b), CryIC y CryID activadas Ki 3.84 μg/mg proteína vesículas	<u>B. mori</u>	Giordana <u>et al.</u> (93)
* Aumento de la permeabilidad a <sup>86</sup> Rb <sup>+</sup> -K <sup>+</sup>	CryIA(c) activada (0.02-10 nM/2.5 μg proteínas 120/65 kDa)	Aminopeptidasa N: fosfatasa de <u>M. sexta</u> (120/65 kDa) reconstituidas en vesículas de FC	Sangadea <u>et al.</u> (94)
* ENSAYOS CUANTITATIVOS DE UNION (TABLA B)			

Notas:

C	colesterol.
Dif	dicetilfosfato.
DiffC	difitanoil-fosfatidilcolina.
FC	fosfatidilcolina.
FS	fosfatidilserina.
VMMA	Vesículas de membrana de la microvellosidad apical.
a	La cepa HD-1 contiene las proteínas CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIIA y CryIIB.
b	Son permeables aniones pequeños (Cl <sup>-</sup> y SCN <sup>-</sup> ), cationes (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> y TEA <sup>+</sup> ), aniones de mayor tamaño (gluconato <sup>-</sup> ) y solutos neutros (sacarosa).

interpretación de los resultados no es simple, ya que por ejemplo, los efectos que se han observado en ausencia de sus receptores, no necesariamente correlacionan con lo que sucede *in vivo*. Otro aspecto que complica la interpretación de dichas observaciones, es que la naturaleza propia de algunos sistemas empleados no permite conocer cuál es el efecto inicial de las proteínas Cry en el tejido blanco, por lo que la información que dan está relacionada principalmente con fenómenos que pueden considerarse consecuencia del efecto primario.

Los dos sistemas experimentales que más se han empleado para caracterizar la naturaleza de la acción de las proteínas CryI son el monitoreo de los cambios: a) en la corriente de corto circuito ( $I_{cc}$ ) de intestinos medios aislados y b) de la acumulación de aminoácidos dependiente del gradiente de  $K^+$  en preparaciones de VMMA.

La  $I_{cc}$  es una medida indirecta del transporte activo de iones de la hemolinfa al lumen (Chen *et al*, 93); al agregar toxinas del lado luminal del intestino medio de *Manduca sexta*, diversos autores han observado que después de 5 a 60 minutos la  $I_{cc}$  cae total o parcialmente como respuesta a la formación de una vía de permeabilidad adventicia (Griego *et al*, 79; Harvey y Wolfersberger, 79; respectivamente). La evidencia que sustenta que esta vía de permeabilidad es selectiva al  $K^+$  es la obtenida por Crawford y Harvey (88), quienes demostraron que el  $Ba^{2+}$  (4 mM), un bloqueador general de canales de  $K^+$ , es capaz de proteger y revertir el efecto de dosis fisiológicamente relevantes (5 a 50 nM) de las protoxinas CryIA(a, b y c) en intestinos aislados de este mismo insecto.

La toma de aminoácidos a través del epitelio del intestino medio larvario depende de la existencia de las diferencias de potencial eléctrico transmembranal. Esta toma se lleva a cabo por un mecanismo de simporte dependiente de voltaje, localizado en la membrana apical de las células columnares que permite el transporte de  $K^+$  y aminoácidos al citoplasma. El  $K^+$  puede reemplazarse por otros cationes monovalentes para el transporte de aminoácidos *in vitro*. Se han identificado seis sistemas independientes de transporte de aminoácidos en el epitelio del intestino medio de los lepidópteros (Gill *et al*, 92).

Usando VMMA de algunos lepidópteros a las que se incubaba en un medio que contenga alguna sal de  $K^+$  impermeable, y exponiendo éstas a la acción de concentraciones fisiológicamente relevantes de  $\delta$ -endotoxinas en su forma

activa, varios grupos de investigación han obtenido evidencia que indica que sólo la proteína CryI selectiva contra el insecto del que se obtuvieron las vesículas, aumenta la permeabilidad a cationes de la membrana.

Una mezcla de toxinas CryIA's aumentó la permeabilidad al  $K^+$  pero no la de  $Na^+$  y  $H^+$  de las VMMA de *Pieris brassicae* al igual que el ionóforo específico de  $K^+$ , valinomicina (Sacchi *et al*, 86). Un análisis similar en vesículas de *Manduca sexta* mostró que la toxina CryIA(c) aumenta las permeabilidades de  $K^+$  y  $Na^+$  (Wolfersberger, 90<sub>b</sub>). Hendrickx y colaboradores (90), trabajando con este mismo insecto, encontraron evidencia que concuerda con ésta última, al mostrar que CryIA(b) también aumenta las permeabilidades al  $K^+$  y  $Na^+$ , pero además parece también hacer lo mismo para el aminoácido alanina.

Estos dos últimos trabajos coinciden en que el  $Ba^{2+}$  no tiene ningún efecto sobre la inhibición de la toma de aminoácidos inducida por las toxinas CryIA(c) y CryIA(b). Se ha sugerido que las diferencias entre estos resultados y los obtenidos en intestinos medios aislados, se deben a que la protección y reversión de la acción de las  $\delta$ -endotoxinas por el  $Ba^{2+}$  es un efecto sobre las uniones estrechas entre las células columnares y caliciformes y no un efecto directo sobre la vía de permeabilidad formada por las  $\delta$ -endotoxinas (Hendrickx *et al*, 90).

Trabajando con VMMA de *Lymantria dispar* que es el insecto en el que se ha reportado una relación inversa entre afinidad de unión/número de sitios de unión y toxicidad *in vivo*, Wolfersberger (91) demostró que existe una relación directa entre la capacidad de inhibición de la acumulación de fenilalanina/ $K^+$  y la actividad biológica para las toxinas CryIA(b) y CryIA(c). Este resultado apoya la idea de que los pasos subsecuentes a la unión al receptor determinan de manera importante la toxicidad *in vivo* de estas proteínas.

La inhibición preferencial del transporte de leucina/ $K^+$  vs aspártico/ $K^+$  observada por Reuveni y Dunn (91) en las VMMA de *Manduca sexta*, sugiere que la toxina CryIA(c) interactúa directamente con el cotransportador. Giordana y colaboradores (93) encontraron resultados similares en las VMMA de *Bombyx mori* que permiten proponer que la toxina CryIA(b) es un inhibidor no competitivo del sistema de cotransporte histidina/ $K^+$ . Sin embargo, éste no parece ser un mecanismo general de acción de las  $\delta$ -endotoxinas (Carrol, 94).

La principal crítica que se ha hecho a los resultados obtenidos al analizar el efecto de las proteínas Cry en la inhibición tanto de la  $I_{cc}$  como del cotransporte de aminoácidos/ $K^+$ , es que la información obtenida es tendenciosa, debido a que ambos sistemas están íntimamente ligados al transporte de este ion (Carrol y Ellar 93; Carrol, 94). Por esta razón, diversos autores han diseñado y/o adaptado nuevos sistemas de análisis del mecanismo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas que permitan determinar la naturaleza de su efecto en el tejido blanco.

Un primer enfoque consistió en analizar la alteración del potencial de membrana (medido como el cambio de la fluorescencia de un colorante sensible a dichos cambios de potencial) causada por la toxina CryIA(a) en VMMA de *Bombyx mori* (Uemura et al, 92). Usando este sistema los autores encontraron que después de incubar las vesículas 60 minutos con la toxina, ésta aumenta la permeabilidad de la membrana, aparentemente tanto para los cationes monovalentes como para los divalentes.

En 1993 Carrol y Ellar, usando un sistema de monitoreo de los cambios en la dispersión de la luz debidos a cambios en el volumen vesicular, demostraron que la toxina CryIA(c) después de estar en contacto una hora con las VMMA de *Manduca sexta*, causa aumento en la permeabilidad de la membrana para aniones ( $Cl^-$  y  $SCN^-$ ), cationes ( $K^+$ ,  $Na^+$  y tetraetilamonio $^+$ ), y en menor medida también para aniones de mayor tamaño (gluconato $^-$ ) y solutos neutros (sacarosa).

Los resultados de estos dos últimos sistemas deben considerarse con cuidado, ya que ambos muestran el efecto que las proteínas Cry causan en la membrana biológica después de una hora de interacción, por lo que es discutible que el efecto observado corresponda a la acción primaria de estas toxinas en el tejido blanco.

#### 7.5.1. ¿Cuál es el papel del receptor en la formación del poro ?.

Se han propuesto varios modelos sobre las funciones que podría tener el receptor en la formación del poro (Knowles y Dow, 93). Una primera posibilidad es que el receptor *per se* sea un canal transmembranal que se activa al unirse la toxina. En este caso se esperaría ver una correlación directa entre unión y formación de poro, pero como se citó antes, ésto no sucede para todas las proteínas Cry.

Otra posibilidad es que la toxina y el receptor, en conjunto, formen un poro. Wolfersberger (comunicación personal en Knowles y Dow, 93) ha reportado que los canales formados por CryIA(c) en bicapas lipídicas planares a las que previamente se incorporaron las VMMA de *Manduca sexta* son muy diferentes en tamaño y cinética de aquéllos formados por esta misma toxina en ausencia del supuesto receptor. Esta evidencia experimental es incipiente, pero hace pensar que es probable que el receptor participe en la formación del poro.

El receptor podría también catalizar la asociación e inserción de la toxina en la membrana, sin participar en la formación del poro. Dicha catálisis podría consistir en aumentar la concentración efectiva de toxina en la superficie de la membrana, o bien, en inducir un cambio conformacional que conduzca a la toxina a un estado competente de inserción.

En el primer caso, se esperaría que la toxina a altas concentraciones fuera capaz de formar poros en ausencia del receptor. La evidencia experimental que sustenta esta propuesta es la obtenida por diversos grupos de investigación que han estudiado la formación de canales iónicos por las proteínas Cry en bicapas lipídicas planares (Tabla 11).

Usando este sistema, se han analizado proteínas de las clases CryI y CryIII; ambos tipos forman canales catiónicos, aunque para una de ellas se ha demostrado que la selectividad de los canales varía con el pH (Schwartz *et al*, 93<sub>a</sub>). Las conductancias de los canales formados por las  $\delta$ -endotoxinas de las clases I y III van desde 50 a 4000 pS; en todos los casos se han observado varios niveles de conductancia. No se ha hecho un análisis fino de los registros obtenidos para ninguna de las toxinas, por lo que no puede discernirse si dichos niveles de conductancia corresponden a la actividad de un sólo canal con subestados, o bien a la actividad de varios canales. Un rasgo característico de todos los registros mostrados es que los canales no son cuadrados; lo más frecuente es observar canales en forma de espiga.

Otra evidencia que también apoya la idea de que el receptor funciona aumentando la concentración efectiva de toxina en la membrana, es la obtenida por English y colaboradores (91<sub>a</sub>), quienes demostraron que la presencia de membrana de la microvellosidad apical de *Heliothis virescens* reduce en tres órdenes de magnitud la concentración de CryIA(c) necesaria para aumentar la permeabilidad a  $^{86}\text{Rb}^{+}$ -K<sup>+</sup> de vesículas sintéticas de fosfatidilcolina.

TABLA II.- ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD DE LAS PROTEINAS Cry DE *Bacillus thuringiensis* EN BICAPAS LIPIDICAS PLANAS

TOXINA	DOSIS µg/ml	LIPIDO	pH	CONDUCTANCIA (pS)	SELECTIVIDAD	REFERENCIA
CryIA(c)	32	A	9.7	600 <sup>a</sup> varios niveles de conductancia	Cationes P <sub>K</sub> :P <sub>Cl</sub> 25:1	Slatin <i>et al.</i> (91)
CryIIIA	23	A:C 2:1	9.7	4000 <sup>a</sup> varios niveles de conductancia	Cationes P <sub>K</sub> :P <sub>Cl</sub> 25:1	Slatin <i>et al.</i> (91)
CryIC	2.5-15.0 6 0.25 <sup>b</sup>	FE:FC:C 7:2:1	9.5	100-200 <sup>c</sup> varios niveles de conductancia 169, 101 y 52 <sup>d</sup>	Cationes Cationes	Schwartz <i>et al.</i> (93 <sub>a</sub> )
CryIC	2.5-15.0 6 0.25 <sup>b</sup>	FE:FC:C 7:2:1	6.0	25-35 <sup>e</sup> varios niveles de conductancia 25 <sup>f</sup>	Cationes <sup>f</sup> Aniones <sup>h</sup>	Schwartz <i>et al.</i> (93 <sub>a</sub> )
CryIAC	3	DiffFC	9.5	1.5-6.0 <sup>j</sup> varios niveles de conductancia	Cationes <sup>k</sup>	Walters <i>et al.</i> (93)
Dominio I CryIA(c)	3	DiffFC	9.5	> 600 varios niveles de conductancia	Cationes <sup>k</sup>	Walters <i>et al.</i> (93)
CryIA(c)	N.D.	N.D.	N.D.	500 varios niveles de conductancia <sup>l</sup>	Cationes	Schwartz <i>et al.</i> (94 <sub>a</sub> )
CryIA(c) P52R	N.D.	N.D.	N.D.	850 <sup>m</sup> varios niveles de conductancia <sup>l</sup>	Cationes	Schwartz <i>et al.</i> (94 <sub>a</sub> )
CryIA(c) R526G	N.D.	N.D.	N.D.	730 <sup>n</sup> varios niveles de conductancia <sup>l</sup>	Cationes	Schwartz <i>et al.</i> (94 <sub>a</sub> )
CryIIB2	N.D.	A ó DiffFC	9.5	80-1000 <sup>o</sup> varios niveles de conductancia	Cationes P <sub>K</sub> :P <sub>Cl</sub> 2-3:1	Von Tersch <i>et al.</i> (94)
Dominio I CryIIB2	N.D.	A ó DiffFC	9.5	80-1000 <sup>o</sup> varios niveles de conductancia	Cationes P <sub>K</sub> :P <sub>Cl</sub> 2-3:1	Von Tersch <i>et al.</i> (94)
α-hélice 5 CryIA(c)	0.18 <sup>p</sup>	FE ó FE:FC 3:1	4.0 7.0	60 <sup>q</sup> Conductancia única N.D. <sup>r</sup> Estado abierto "ruidoso" que impidió estimar algún nivel de conductancia	Cationes Cationes	Cummings <i>et al.</i> (94 <sub>b</sub> )
CryIA(a)	N.D.	N.D.	N.D.	438 ± 30 <sup>s</sup>	Cationes	Dean <i>et al.</i> (94 <sub>c</sub> )
CryIA(a) R526K	N.D.	N.D.	N.D.	583 ± 29 <sup>s</sup>	Cationes	Dean <i>et al.</i> (94 <sub>c</sub> )
CryIA(a) R532K	N.D.	N.D.	N.D.	747 ± 79 <sup>s</sup>	Cationes	Dean <i>et al.</i> (94 <sub>c</sub> )



Notas:

A Asolectina; C Colesterol; FE Fosfatidiletanolamina; FC Fosfatidilcolina; DififC Difitanoilfosfatidilcolina.

N.D. No disponible.

a Condiciones simétricas de  $K^+$  (300 mM KCl, 5 mM CAPS, 5 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mM EDTA, pH 9.7). No se observaron canales a pH 7.0.

b Se usaron 2.5-15.0  $\mu$ g/ml para la incorporación espontánea de la toxina o bien 0.25  $\mu$ g/ml para la incorporación inducida, esta última con la finalidad de aumentar la eficiencia de formación de canales por CryIC.

c Condiciones simétricas de  $K^+$  (150 mM KCl, 5 mM Tris, pH 9.5).

d Condiciones simétricas de  $K^+$  (150 mM Kgluconato, 5 mM Tris, pH 9.5).

e Condiciones simétricas de  $K^+$  (150 mM KCl, 5 mM MES pH 6.0).

f Canales catiónicos con una razón de permeabilidades  $P_K:P_{Cl}$  menor que la de la de los canales observados a pH 9.5.

g Condiciones simétricas de colina (150 mM ColinaCl, 5 mM MES, pH 6.0).

h 1 mM  $Zn^{2+}$  disminuye en forma evidente la probabilidad de apertura ( $P_a$ ) de los canales a voltajes negativos. Estos canales son similares a los observados en estudios de patch-clamp del efecto de la toxina CryIC en la línea celular SF-9 en cuanto a su selectividad y comportamiento cinético.

i Generado por procesamiento de la toxina (55 kDa) con jugo gástrico de Spodoptera frugiperda (fragmento de 24.5 kDa) o bien por solubilización alcalina (100 mM KOH, 37 °C, 17 días) (fragmento de 21.5 kDa).

j Condiciones simétricas de  $K^+$  (300 mM KCl, 50 mM CAPS, 5 mM  $CaCl_2$ , pH 9.5).

k La razón de permeabilidades  $P_K:P_{Cl}$  de los canales formados por la toxina completa es mayor que la de los canales formados por el fragmento N-terminal (dominio I).

l El comportamiento cinético y la presencia de diferentes niveles de conductancia de los canales formados por las mutantes son similares a la de los canales formados por la proteína silvestre.

m Menos tóxica que la toxina silvestre para la línea celular CF1 de Choristoneura fumiferana.

n Toxicidad comparable a la de la toxina silvestre para la línea celular CF1.

o Condiciones simétricas de  $K^+$  (300 mM KCl, 5 mM  $CaCl_2$ , 0.5 mM EDTA, 5 mM CAPS, pH 9.5). La eficiencia de formación de canales resultó extremadamente baja. No se observaron transiciones bien definidas, sino estados abiertos "ruidosos".

p Cuando se usaron concentraciones más altas de toxina se pudieron observar canales a los pocos minutos de adicionar ésta al compartimiento cis, sin embargo para ver corrientes unitarias hubo que disminuir la dosis de proteína y esperar de 30-60 min para observar la presencia de canales.

q Condiciones simétricas de  $K^+$  (150 mM KCl, 50 mM citrato, pH 4.0).

r Condiciones simétricas de  $K^+$  (150 mM KCl, 5 mM TES, pH 7.0).

s El comportamiento cinético de los canales formados por las proteínas mutantes es diferente de aquel correspondiente a la proteína silvestre. La  $P_a$  disminuyó para ambas mutantes; este comportamiento fue más evidente en la mutante R532K.

Resultados similares fueron obtenidos por Sangadala y colaboradores (94), quienes reportaron la purificación y posterior reconstitución en vesículas lipídicas sintéticas de una mezcla de proteínas (receptor) provenientes de las VMMA de *Manduca sexta*. Se observó que con esta mezcla de proteínas (120/65 kDa; aminopeptidasa N y fosfatasa, respectivamente), pudieron reproducirse los resultados descritos en el párrafo anterior.

La segunda posibilidad, es decir, si la función del receptor es causar un cambio conformacional en la estructura de las toxinas para conducirlos a un estado competente de inserción, es una cuestión que aún no ha sido aclarada.

### 7.7 Citólisis.

Independientemente de la información obtenida acerca de la naturaleza de la lesión causada por las  $\delta$ -endotoxinas en los diversos sistemas *in vitro* usados, el efecto de la formación o apertura de poros en la membrana biológica depende principalmente del medio ambiente celular (Gill *et al*, 92; Knowles y Dow, 93; Knowles, 94).

Se ha propuesto que las  $\delta$ -endotoxinas causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH (Wolfersberger, 92) o por citólisis osmótica (Knowles y Ellar, 87).

La evidencia que sustenta la primera hipótesis es aquella que señala que, de alguna manera, las proteínas Cry aumentan la permeabilidad a los cationes de la membrana de las células columnares, la cual en condiciones fisiológicas se considera poco permeable al  $K^+$ . Al alterarse la permeabilidad selectiva de esta membrana, se colapsa la diferencia de potencial (DP); ésto causa la pérdida de la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular y permite la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Varios autores consideran que la consecuencia más devastadora de la falta de la DP, es la pérdida de la energía de mantenimiento del gradiente de mil veces de actividad de  $H^+$  del citoplasma *versus* el lumen (Harvey, 92; Wolfersberger, 92). Al perderse el gradiente de pH, el citoplasma se alcaliniza, y ésto interfiere con el metabolismo celular normal, causando como consecuencia final los efectos histopatológicos antes descritos y la eventual muerte de la larva.

La hipótesis de la citólisis osmótica está avalada por la evidencia que sugiere que la lesión formada por las  $\delta$ -endotoxinas permite no sólo el paso de

iones, sino también de agua y moléculas de mayor tamaño (p. ej. alanina y sacarosa). Es importante señalar que esta hipótesis fue formulada a partir de los resultados obtenidos al trabajar con algunas toxinas CryI en células de insecto en cultivo que no son de origen intestinal, por lo que es discutible que el receptor se encuentre en la membrana de dichas células; sin embargo, una observación constante ha sido que el hinchamiento celular siempre precede a la citólisis.

El esclarecimiento de cuál es el efecto inicial de las  $\delta$ -endotoxinas en la membrana donde está contenido el receptor, permitirá conocer más finamente el mecanismo molecular de acción de las proteínas Cry.

## 8 Relación estructura-función.

Como se mencionó en la sección 5, el corazón o parte central de las toxinas Cry está formado por cinco bloques de aminoácidos altamente conservados en la mayor parte de las  $\delta$ -endotoxinas. Tomando como referencia la estructura tridimensional de la proteína CryIIIa, cada uno de los bloques mapearía en las siguientes regiones: el bloque 1 en la  $\alpha$ -hélice central ( $\alpha$ -5) en el dominio I; el bloque 2 está formado por la segunda mitad de la  $\alpha$ -6 y la  $\alpha$ -7 del primer dominio y la primera  $\beta$ -plegada del dominio II; la última parte de la  $\beta$ -11 y el asa que conecta los dominios I y II constituyen el bloque 3; los bloques 4 y 5 abarcan las tres hebras enterradas de la lámina antiparalela central del dominio III (Li et al, 91).

La función que se ha adjudicado al dominio constituido por las  $\alpha$ -hélices anfipáticas, algunas de las cuáles tienen la longitud necesaria para atravesar la membrana, es la formación del poro.

La evidencia que sustenta esta proposición es diversa. Los experimentos de mutagénesis dirigida que consistieron en reemplazar residuos hidrofóbicos de la  $\alpha$ -5 (bloque 1) de la toxina CryIA(c) por residuos cargados o residuos de prolina, dieron como resultado proteínas mutantes que perdieron su toxicidad contra tres insectos altamente sensibles a la proteína nativa (*Heliothis virescens*, *Trichoplusia ni* y *Manduca sexta*), pero cuya capacidad de unión al receptor quedó inalterada (Wu y Aronson, 92). Además se demostró que las mutantes fueron incapaces de inhibir la acumulación de leucina dependiente del gradiente de  $K^+$  en las VMMA de *Manduca sexta*. Estos resultados en conjunto

sugieren que las sustituciones introducidas causaron que estas proteínas sean incapaces de insertarse y formar poros.

Dos grupos de investigación independientes obtuvieron resultados que demuestran más directamente que el dominio I de las toxinas CryIA(c) (Walters *et al*, 93) y CryIIIb2 (Von Tersch *et al*, 94) *per se* es capaz de formar canales catiónicos en bicapas planas (ver Tabla 11). Las diferencias en la conductancia y selectividad observadas entre los canales formados por el dominio I y los formados por la toxina completa, sugieren que otras regiones de ésta participan en la modulación de los canales (Slatin *et al*, 94).

Recientemente Gazit y Shai (93) obtuvieron evidencia que apoya la hipótesis de que la  $\alpha$ -5 (bloque 1) es un componente estructural de los poros formados por las  $\delta$ -endotoxinas. Sus experimentos consistieron en sintetizar la región  $\alpha$ -5 de CryIIIA, así como un derivado que contiene un residuo de prolina (P $\alpha$ -5). Se demostró por dicroísmo circular que en un ambiente hidrofóbico (metanol), el contenido de  $\alpha$ -hélice del péptido  $\alpha$ -5 es de 58%, mientras que el de P $\alpha$ -5 es de 24%; al marcar ambos péptidos con sondas fluorescentes e incubarlos con vesículas sintéticas, se encontró que el N-terminal de  $\alpha$ -5 y P $\alpha$ -5 se localiza dentro de la membrana; las isotermas de unión respectivas sugieren que sólo  $\alpha$ -5 se agrega dentro de la bicapa. También se demostró que  $\alpha$ -5 pero no P $\alpha$ -5 es capaz de disipar el potencial transmembranal de vesículas de fosfolípidos zwitteriónicos y ácidos y que además tiene actividad hemolítica y citolítica para una línea celular proveniente del ovario de un lepidóptero (Sf-9) (Shai y Gazit, 94).

Cummings y colaboradores (94b) sintetizaron la región  $\alpha$ -5 de la proteína CryIA(c) y por experimentos de dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear, demostraron que este péptido tiene estructura de  $\alpha$ -hélice en medio hidrofóbico (metanol) y estructura no periódica (*random-coil*) en agua. Haciendo experimentos en bicapas planas también demostraron que a pH ácido (4.0) pero no a pH alcalino,  $\alpha$ -5 forma canales unitarios (60 pS) selectivos a cationes. Dichos resultados concuerdan con los de Shai y Gazit.

Las primeras evidencias que sugirieron que el dominio II es la región de las  $\delta$ -endotoxinas que interactúa directamente con el receptor, fueron las obtenidas por Schnepf y colaboradores (90). Sus experimentos consistieron en el intercambio de las regiones menos conservadas (hipervariables) entre los

genes de tres toxinas que entre sí son más de 80% similares: CryIA(a), CryIA(b) y CryIA(c), pero que cada una es más potente para una especie de insecto. El intercambio de dichas regiones resultó en el intercambio de especificidades.

Usando este tipo de experimentos se ha determinado que los "dominios de especificidad" para las toxinas CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIC y CryIIA son como se indica en la Tabla 12. En la mayor parte de los trabajos se han intercambiado regiones muy grandes que abarcan una o dos de las tres láminas  $\beta$  de las que está constituido el dominio II.

Son dos grupos de investigación los que han logrado un análisis más fino de las regiones que determinan la especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas Smith y Ellar (94) comprobaron que la región que probablemente interactúa con el receptor en CryIC es la formada por los residuos que mapean en las asas 1 (G<sub>317</sub>, R<sub>318</sub>, N<sub>319</sub> y F<sub>320</sub>) y 2 (Q<sub>374</sub>, P<sub>375</sub>, W<sub>376</sub> y P<sub>377</sub>). Coincidentemente, Lu y colaboradores (94) encontraron que al sustituir por alaninas los residuos 365-371 (asa 1) de CryIA(a), o bien al quitarlos, la proteína mutante resultó tres órdenes de magnitud menos tóxica para *Bombyx mori*. Estos datos constituyen la confirmación de la hipótesis planteada por Li y colaboradores que desde 1991 sugirieron que las asas localizadas en el vértice de la molécula, de forma reminiscente a la de las regiones determinantes de la complementariedad de las inmunoglobulinas, podrían ser regiones importantes para la especificidad de las  $\delta$ -endotoxinas.

Wu y Aronson (92) demostraron, por experimentos de mutagénesis en los residuos A<sub>92</sub> y R<sub>93</sub> del dominio I de la toxina CryIA(c), que la conservación de la carga positiva en el residuo 93 también es importante para la especificidad, como lo sugiere el hecho de que CryIA(c) A<sub>92</sub>D no es capaz de competir con la toxina silvestre por el receptor en las VMMA de *Manduca sexta* y que lo hace muy débilmente en las VMMA de *Heliothis virescens*.

Este mismo grupo (Aronson et al, 94) siguiendo una metodología similar, obtuvo evidencia que sugiere que los residuos de serina 503 y 504 de CryIA(c), también son importantes para la especificidad. Lo anterior se indujo de observar que la toxina mutante perdió la capacidad de unirse al receptor único que tiene en *Manduca sexta* y a dos de los cinco receptores presentes en *Heliothis virescens*; ésto concuerda con la pérdida de toxicidad observada en bioensayo para *M. sexta* y la disminución de la potencia en *H. virescens*.

TABLA 12.- DOMINIOS DE ESPECIFICIDAD DE LAS PROTEINAS Cry DE Bacillus thuringiensis

	CryIA(a)	CryIA(b)	CryIA(c)	CryIC	CryIIA
<i>Aedes aegypti</i>					307-382 <sup>a</sup>
<i>Bombyx mori</i>	332-450 <sup>b</sup> 332-428 +428-450 <sup>c</sup> 365-371 <sup>d</sup>				
<i>Heliothis virescens</i>			332-772 <sup>e</sup> A92D, R93X <sup>f</sup>		
<i>Mamestra brassicae</i>					
<i>Manduca sexta</i>		A92D <sup>f</sup>	429-447 <sup>e</sup> A92D, R93X <sup>f</sup> S503I, S504I <sup>g</sup>		
<i>Spodoptera exigua</i>				454-630 <sup>h</sup> loops 1 y 2 <sup>i</sup>	
<i>Trichoplusia ni</i>	A92D <sup>f</sup>		332-447 <sup>e</sup> A92D <sup>f</sup>		

Notas:

a Widner y Whiteley (90).

b Ge et al. (89)

c Lee et al. (92)

d Lu et al. (94). Cuando se sustituyeron los residuos 365-371 de esta proteína por residuos de alanina o cuando se hizo la delección de esta misma región, la proteína modificada resultó 1000 veces menos tóxica para la plaga señalada. Al hacer un alineamiento de CryIA(a) con CryIIIA esta modificación mapea en el loop 2 de la lámina β 2 del dominio II.

e Schnepf et al. (90)

f Wu y Aronson (92). De los experimentos de mutagénesis de los residuos 92 y 93 de las proteínas CryIA(a), CryIA(b) y CryIA(c) se concluye que la conservación de la carga positiva en el residuo 93 es importante para la actividad tóxica. La mutante CryIA(c) A92D no es capaz de competir con la toxina silvestre por el receptor en VMA de M. sexta y lo hace muy débilmente en las VMA de H. virescens.

g Aronson et al. (94).

h Bosch et al. (94).

i Smith y Ellar (94). Haciendo un alineamiento de las proteínas CryIA(c) vs CryIIIA las regiones analizadas en este estudio mapean en los loops 1 y 2 del dominio II: loop 1 (G317, R318, M319 y F320), loop 2 (Q374, P375, M376 y P377). De los experimentos de mutagénesis de estas dos regiones se concluye que ambas son muy importantes para la especificidad de esta toxina para S. exigua y/o A. aegypti; el loop 2 es particularmente sensible a la introducción de residuos cargados.

Se ha sugerido que el bloque 2 (región comprendida entre la segunda mitad de la  $\alpha$ -6 y la  $\beta$ -1) podría funcionar transmitiendo, del dominio II al dominio I, la señal generada por la unión al receptor necesaria para que el dominio I alcance un estado conformacional competente para la inserción y la posterior formación del poro (Li *et al*, 91).

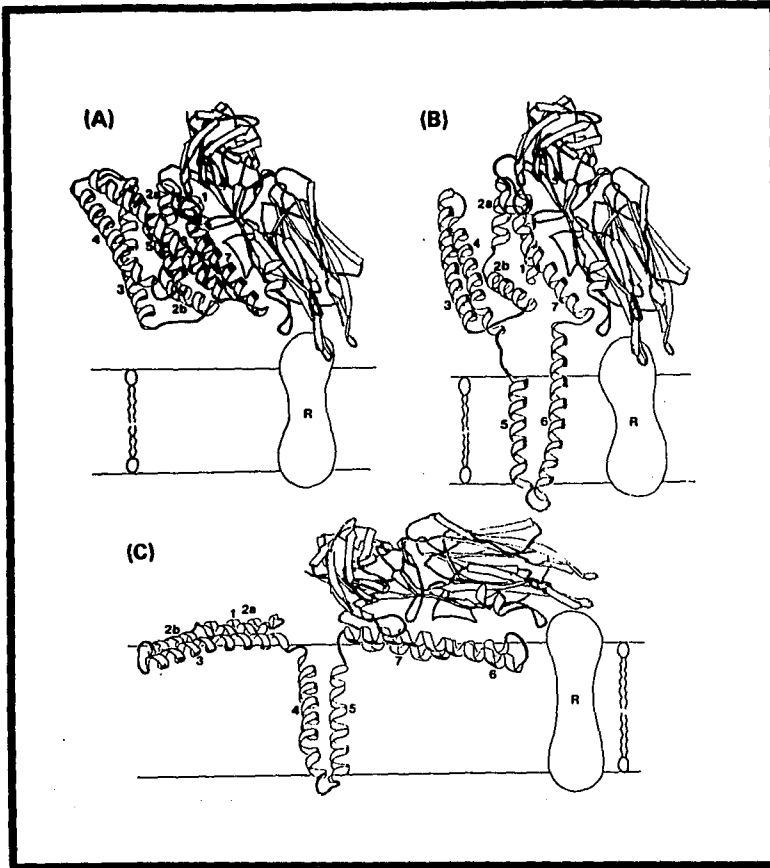
La función que se ha asociado al dominio III es la de mantener la integridad de la proteína, ya que las toxinas mutantes en esta región son sumamente inestables al tratamiento con proteasas (Li *et al*, 91).

Recientemente se ha abundado más en el esclarecimiento de la función de los bloques conservados presentes en el dominio III (bloques 4 y 5).

Chen y colaboradores (93) realizaron experimentos de mutagénesis dirigida en los residuos de arginina presentes en el bloque 4 (esta región mapea en la  $\beta$ -17 del dominio III) de CryIA(a) (R<sub>526</sub>, R<sub>528</sub>, R<sub>530</sub> y R<sub>532</sub>). Las proteínas mutantes en R<sub>528</sub> y R<sub>530</sub> se expresaron muy pobremente en *Escherichia coli*, probablemente debido a alteraciones estructurales. Las mutantes en R<sub>526</sub> y R<sub>532</sub> perdieron la capacidad de la toxina silvestre para inhibir la I<sub>cc</sub> de intestinos medios aislados de *Bombyx mori*; los autores demostraron que dicha pérdida no se debió ni a alteraciones en la estructura de la proteína ni a la pérdida de la capacidad de unión al receptor. Se ha sugerido que estos residuos podrían estar involucrados con aspectos regulatorios de los canales que forman las proteínas Cry.

Los resultados de experimentos de mutagénesis dirigida de los diez residuos que forman parte del bloque 5 de CryIVA, señalan que esta región es un elemento importante para la estabilidad de la estructura proteica pero no para su toxicidad, como lo sugieren la mayor susceptibilidad a la acción de la tripsina y la termolisina en las proteínas mutantes, y que en bioensayo la concentración letal media de las proteínas silvestre y mutantes resultó muy similar (Nishimoto *et al*, 94).

Knowles (94) ha propuesto recientemente dos modelos posibles de la inserción a la membrana y formación del poro de las  $\delta$ -endotoxinas (Figura 8), con base en el conocimiento que se tiene actualmente acerca de las posibles funciones de cada uno de los dominios y por comparación con otras proteínas transmembranales que son canales iónicos (Kamb *et al*, 87) y con otras toxinas formadoras de poro (Li, 92; Parker y Pattus, 93).



**Figura 8.-** Modelos de inserción de las proteínas Cry en la membrana plasmática del insecto basados en la estructura de CryIIIA. Las  $\alpha$ -hélices del dominio I están numeradas a partir del N-terminal. El receptor se indica como R.

(A) Posible orientación de la toxina al unirse al receptor. Un cambio conformacional disparado por la unión puede transmitirse del dominio II al dominio I vía la  $\alpha$ -hélice 7, iniciando la inserción en la membrana de dos o más hélices. (B) El modelo del abrecartas modificado de Hodgman y Ellar (1990): las hélices  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  se insertan en la membrana como un "hairpin" helicoidal. (C) El modelo del paraguas modificado de Li *et al.* (1991): las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  se introducen a la membrana plasmática como un "hairpin" helicoidal, y las otras hélices se aplanan sobre la superficie de la membrana con las caras hidrofóbicas hacia la misma. En ambos modelos, la inserción del par de hélices debe estar acompañada por la formación de un poro en forma de barril con un canal central acuoso.



La evidencia obtenida por Shai y Gazit (94) favorece el modelo del paraguas. Después de sintetizar los péptidos correspondientes a las  $\alpha$ -hélices 5 y 7 del dominio I de la toxina CryIIIA, por dicroísmo circular se demostró que ambos adoptan estructura de  $\alpha$ -hélice en un ambiente hidrofóbico (58 y 60% respectivamente). Al marcar éstos con sondas fluorescentes y ponerlos a interactuar con vesículas de fosfolípidos sintéticos, se encontró que sólo  $\alpha$ -5 es capaz de penetrar al interior de la membrana, mientras que  $\alpha$ -7 se coloca en la superficie de la misma. También se encontró que  $\alpha$ -5 pero no  $\alpha$ -7 tiene actividades hemolítica y citotóxica para la línea celular Sf-9.

## 9 Diferentes estrategias de búsqueda de nuevas $\delta$ -endotoxinas.

El creciente uso de *Bt* (Feitelson *et al*, 92) aunado al gran interés en el manejo preventivo de la resistencia a las  $\delta$ -endotoxinas ha incrementado los esfuerzos por encontrar nuevas toxinas que permitan un espectro mayor de acción y especificidad contra plagas no sensibles a las proteínas hasta ahora identificadas (Carozzi *et al*, 91).

Algunos de los métodos que se han empleado para caracterizar y determinar el espectro de acción de las proteínas Cry (o los genes que las codifican) provenientes de las cepas de *Bt* que se aíslan de muestras de suelo, granos almacenados, hojas de árboles o de insectos muertos (Smith y Couche, 91) son: bioensayos (Dulmage *et al*, 71; Gallegos, 90), Southern (Kronstad y Whiteley, 86), anticuerpos poli y monoclonales (Höfte *et al*, 88), PCR (Carozzi *et al*, 91; Cerón *et al*, 94) y unión de toxinas marcadas con biotina a cortes de tejido (Denolf *et al*, 93).

Detectar por bioensayo una  $\delta$ -endotoxina activa contra un blanco determinado partiendo de una amplia colección de cepas es un proceso confiable, pero lento y caro. Esto se debe a la gran cantidad de individuos que es necesario criar para poder hacer un análisis estadístico confiable del efecto de dichas toxinas sobre la tasa de mortalidad de la población.

Es importante resaltar que la principal desventaja de los métodos antes citados, a excepción del bioensayo, es que sólo pueden identificarse genes o proteínas ya conocidos.

Con los sistemas basados en la inmunodetección, se requiere tener las proteínas puras a fin de producir los anticuerpos policlonales que permitan diferenciar las diferentes clases de proteínas Cry; para poder identificar los diferentes subgrupos, además se requiere producir anticuerpos monoclonales, lo cual es excesivamente caro y laborioso (Carozzi et al, 91).

Con los sistemas que detectan el tipo de  $\delta$ -endotoxina (clase y subclase) por hibridación, es necesario tener el gen o la secuencia correspondiente para diseñar la sonda específica. También se requiere conocer la secuencia del gen (o de algún gen muy relacionado), para diseñar los oligonucleótidos que se utilizarían en el sistema basado en PCR.

El uso de estudios de unión de  $\delta$ -endotoxinas marcadas con biotina a cortes de tejido como metodología para la detección de proteínas con actividad potencial hacia un organismo determinado, tiene la desventaja de dar falsos positivos, ya que como se ha discutido en las secciones anteriores, la unión no en todos los casos correlaciona con la actividad *in vivo*; además de que no se puede garantizar que el receptor en las muestras de tejido fijadas sea funcional.

En los casos en los que se obtienen resultados negativos en cuanto a qué gen posee, o qué proteínas Cry produce una cepa determinada, no se sabe para qué es tóxica ésta, además de que sí en una cepa se encuentra un gen (o su producto) ya conocido junto con uno nuevo, éste último no se detectaría, usando las metodologías antes citadas.

Dado que en todos los casos hasta el momento conocidos la capacidad de alterar la permeabilidad de la membrana blanco es una propiedad que sólo poseen las proteínas que por bioensayo se ha comprobado son activas, una buena alternativa para detectar nuevas  $\delta$ -endotoxinas con actividad hacia un insecto determinado, sería tener un sistema que de alguna manera permita monitorear el(los) efecto(s) causados por éstas en la permeabilidad de la membrana donde se encuentra localizado el receptor.

# OBJETIVOS

El auge en el descubrimiento de cepas de *Bt* con actividad biológica novedosa que se ha presentado desde la segunda mitad de los años 80 (Feitelson, 93), es una razón importante por la que mundialmente se siguen realizando importantes esfuerzos encaminados a encontrar  $\delta$ -endotoxinas con actividad hacia plagas de importancia comercial que hasta el momento no son susceptibles. La gran diversidad biológica de algunos países, como es el caso de México, es un incentivo adicional para buscar en ellos cepas de *Bt* con nuevas actividades.

El interés del presente estudio es diseñar un sistema de detección de  $\delta$ -endotoxinas de *Bt* con actividad potencial contra insectos plaga que no han sido controlados con las proteínas hasta ahora descritas.

Considerando que la capacidad de alterar la permeabilidad de la membrana blanco es una propiedad que sólo poseen las proteínas que por bioensayo son activas, proponemos como un buen sistema de detección el monitoreo de los cambios que las  $\delta$ -endotoxinas producen en la permeabilidad de la membrana que contiene al receptor.

Este monitoreo podría llevarse a cabo en intestinos medios aislados o en preparaciones de vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMA). Como se muestra en la Tabla 10 las VMMA han sido una buena herramienta para hacer estudios *in vitro* del(os) efecto(s) que las proteínas Cry producen en la membrana blanco y avanzar en el entendimiento del mecanismo de acción de estas proteínas.

Desde fines de los años 70 se ha hecho uso extensivo de las sondas (colorantes) que responden ópticamente al potencial transmembranal. Estas constituyen una herramienta no destructiva que permite medir cambios en la diferencia del potencial eléctrico a través de la membrana de células, organelos y vesículas (Bashford y Smith, 79; Waggoner, 79). De acuerdo con el tipo de sonda que se elija, los tiempos de resolución logrados oscilan entre microsegundos y segundos, para los colorantes rápidos (p. ej. merocianina) y lentos (p. ej. cianinas y oxonoles) respectivamente.

Hemos elegido usar una de las cianinas (3,3-dipropiltiodicarbocianina o dis-C<sub>3</sub>-(5)) como herramienta para hacer el monitoreo antes citado.

Diversos autores, usando preparaciones de membrana de otro tipo de organismos han mostrado la gran utilidad de esta molécula para estimar el potencial de reposo de la membrana, así como para conocer si ésta experimenta una hiperpolarización o depolarización como respuesta a algún estímulo. También ha sido posible usarla para hacer estudios de selectividad y bloqueo, y combinar su uso con el de otros agentes que permiten por ejemplo, estudiar en paralelo cambios en el pH o en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelulares (Reynaudet *al*, 93).

Es también de nuestro interés aprovechar las propiedades de esta molécula para contribuir al entendimiento del mecanismo de acción de estas proteínas, por ejemplo esclareciendo la naturaleza del efecto inicial que éstas producen en la membrana blanco.

Hemos elegido como modelo experimental el lepidóptero *Spodoptera frugiperda* el cual es una importante plaga del maíz en diversas regiones de nuestro país. Las toxinas a las que sabemos este insecto es sensible son CryIC y CryID. Se usarán como controles negativos dos proteínas a las que el insecto no es sensible: CryIA(c) y CryIII A.

# RESULTADOS

La descripción detallada de los materiales y métodos usados para llevar a cabo el presente trabajo, así como de los resultados obtenidos está contenida en el artículo que a continuación se presenta.

Dicho artículo fue sometido a revisión a la revista FEBS Letters con fecha 5 de agosto de 1994. La versión corregida del mismo, fue aceptada para publicación el 16 de enero del presente año.

**$\delta$ -Endotoxins Induce Cation Channels in *Spodoptera frugiperda* Brush Border  
Membranes in Suspension and in Planar Lipid Bilayers**

**Argelia Lorence, Alberto Darszon, Claudia Díaz, Arturo Liévano,  
Rodolfo Quintero and Alejandra Bravo.**

*Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3,  
Cuernavaca 62271, Mor., México.*

**Keywords:**  $\delta$ -endotoxins; mode of action; ionic channels; (*Bacillus thuringiensis*)

Correspondence address: A. Bravo, Instituto de Biotecnología/UNAM. Apdo. Postal 510-3,  
Cuernavaca 62271, Mor., México.

Telephone number 5273 114900, ext. 227.

Fax number 5273 172388.

E-mail bravo@pbr322.ceingebi.unam.mx.



## ABSTRACT

Membrane potential measurements using a fluorescent dye indicate that two specific toxins active against *Spodoptera frugiperda* larvae (CryIC and CryID) cause immediate permeability changes in midgut epithelial brush border membrane vesicles (BBMV). The initial response and the sustained permeability change are cationic, not very  $K^+$  selective, and occur at the *in vivo* lethal doses (nM). The toxin response has a different ion selectivity and is more sensitive to  $Ba^{2+}$  than the intrinsic cation permeability of BBMV. Experiments incorporating BBMV into planar lipid bilayers (PLB) demonstrate that these vesicles contain cation channels (31, 47 and 76 pS). A 2-40 fold conductance increase was induced by nM toxin in PLB containing BBMV. Cationic single channel transitions of 50, 106, 360 and 752 pS were resolved. Thus, *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins induce an increase in cation membrane permeability involving ion channels in BBMV containing functional receptors.

## 1. INTRODUCTION

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is a Gram positive bacterium that during sporulation produces crystalline inclusions formed by proteins called  $\delta$ -endotoxins or insecticidal crystal proteins (ICP), which are toxic to the larvae of various insects, many of which are disease vectors or major crop pests. Numerous ICP genes have been cloned, sequenced and classified into five groups and several subgroups on the basis of sequence homology and toxicity spectra [1].

ICP are synthesized in the form of inactive protoxins, that are solubilized and proteolytically activated in the insect gut. The activated toxin binds to specific receptors located in the apical microvilli of epithelial cells in the insect's midgut. After binding, the toxin inserts irreversibly into the cell plasma membrane [2] and forms a pore or lesion that allows net uptake of ions and water, leading to midgut-cell swelling and eventual lysis. It has been proposed that K<sup>+</sup>-selective pores are involved in this process [3-7].

The purified ICP have the ability to induce ion leakage in synthetic phospholipid vesicles [8, 9]. In the absence of specific receptors CryIA(c), CryIIIA, CryIIIB2 and CryIC toxins form cation-selective channels at alkaline pH and CryIC also forms anion-selective channels at pH 6.0 in planar bilayers [10-13]. The toxin concentrations needed to exert these effects are at least 1000 times higher than the *in vivo* biocide concentration. It has been proposed that the receptor functions as a binding protein to increase the local concentration of the toxin in the vicinity of the membrane [11]. Recently the receptor for CryIA(c) toxin in *Manduca sexta* has been identified as a metalloprotease aminopeptidase N [14].

Recent *in vitro* assays using brush border membrane vesicles (BBMV) have shown permeability changes induced by Cry toxins at physiological concentrations (nM) [15, 16]. However, the toxin effects were recorded after 1 h of incubation with the vesicles, missing the initial response produced by the toxin once it interacts with its receptor.

Here we show that nM ICP cause an immediate change in membrane potential, measured with a potential-sensitive fluorescent dye, in BBMV isolated from the midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae. Two specific toxins active against this insect (CryIC and CryID) and two nontoxic ICP (CryIIIA and CryIA(c)) were used. We studied the ionic basis of the toxin-induced membrane potential changes and explored their pharmacology. Having found specific toxin responses in these BBMV, we incorporated them into planar bilayers where they displayed

intrinsic single channel cation conductances mainly of 31, 47 and 76 pS. A 2-40 fold conductance increase was observed when nM toxin was added to bilayers containing BBMV. The toxin-induced conductance increase was cationic and single channel transitions of 50, 106, 360 and 752 pS could be resolved. These results indicate that the toxin receptor is fundamental for efficient toxin-induced cation pore formation.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Preparation of the brush border membrane vesicles

BBMV from 5<sup>th</sup> instar *S. frugiperda* larvae were prepared as reported [17]. The vesicles were dialyzed overnight against 400 volumes of 150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM EDTA, 10 mM HEPES-HCl pH 7.5 (Sigma, St. Louis, MO) and sonicated for six 30 sec periods at 25 °C (BRANSON 1200 sonic bath, Danbury, CT) in the same solution. The BBMV used in the planar lipid bilayer experiments were loaded overnight with 1.26 M sucrose at 0 °C and stored at -70 °C until used.

BBM enrichment was estimated according to the alkaline phosphatase (AP) to cytochrome-*c* oxidase activity ratio (9.5-12.5-fold increase/mg protein relative to the initial homogenate), which were measured as reported [18,19]. Vesicle orientation was determined from the AP activity in the presence and absence of 0.02% Triton X-100 (Sigma).

Receptor concentration in the vesicles and the homogenate was measured after CryIC binding using monoclonal antibody 20A6E9 against the toxin (supplied by Dr. M. Peferoen, Plant Genetic Systems; Gent, Belgium) and a second antibody coupled to peroxidase (data not shown).

### 2.2 Preparation of insecticidal crystal proteins

*Escherichia coli* recombinant strains containing the *cry IC* and *cry ID* genes, derived from *Bt* var. *entomocidus* and  *aizawai*, respectively, were kindly supplied by Dr. M. Peferoen. The inclusion bodies were solubilized, activated and purified as in [20]. Crystals from *Bt* var. *tenebrionis* strain BTS1, containing the CryIIIA protein, and from *Bt* var. *kurstaki* strain HD-73, containing CryIA(c) protein, were produced and purified as described in [21]. Toxins were dialyzed against 200 volumes of 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.6 (buffer A) and maintained at 4 °C at most for a month. Activated toxin purity was examined by SDS-PAGE [22]

and by Western-blot [23]. The CryIC and CryID toxins were denatured by boiling them for 30 min in 90 mM NaOH and then neutralized with HCl. The denatured toxins lost their insecticidal activity for *S. frugiperda*. Insect toxicity was assayed with 1<sup>st</sup> instar *S. frugiperda* larvae according to [24]. Protein was measured as described in [25] using BSA as standard (New England BioLabs, Beverly, MA).

### 2.3 Fluorescence measurements

Membrane potential was monitored with the fluorescent positively charged dye, 3,3'-dipropylthiadicarbocyanine (Dis-C<sub>3</sub>-(5), Molecular Probes, Eugene, OR.; 1.5  $\mu$ M final, 1 mM stock in DMSO). Fluorescence was recorded at the 620/670 nm excitation/emission wavelength pair using a Hansatech system (Norfolk, England), as in [26]. Hyperpolarization causes dye internalization into the BBMV and fluorescence decrease; depolarization causes the opposite effect. Dye calibration and determination of resting membrane potential were performed in the presence of valinomycin (2  $\mu$ M) by successive additions of KCl to BBMV (20  $\mu$ g) suspended in various media (700  $\mu$ l). Neither carbonyl cyanide *m*-chloro phenyl hidrazone (FCCP, 1  $\mu$ M, Calbiochem), a mitochondrial uncoupler nor oligomycin (0.5  $\mu$ M, Sigma), an ATPase inhibitor, altered the membrane potential measurements, indicating that there is no mitochondrial contribution to the recorder signals (data not shown). All determinations were made at 30 °C with constant stirring. Time 0 ( $t_0$ ) was considered when BBMV were added, and the KCl additions were made after 9 min. Membrane potential determinations were done 10 times with 4 different vesicle batches under the different experimental conditions used. Cation substitutions in the incubation buffer were made by replacing the *N*-methyl-D-glucamine chloride (MeGluCl) by the indicated salt(s) (mole per mole), maintaining the osmolarity (~150-160 mOsm). Cl<sup>-</sup> was substituted with methanesulfonate-

K<sup>+</sup>-channel blockers Ba<sup>2+</sup> and Cs<sup>+</sup> were from J.T. Baker, Phillipsburg, N.J., tetraethylammonium chloride (TEA) and 4-aminopyridine (4-AP) from Alomone Labs, Jerusalem, Israel.

### 2.4 Planar lipid bilayer experiments

Planar lipid bilayers (PLB) were made by the Müller and Rudin method [27], as in [28], with diphtanoyl-phosphatidyl choline (diPPC) (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL., 20 mg/ml in *n*-decane). Typical bilayer capacitance values were between 150 and 250 pF. Buffer solution

(300  $\mu$ l of 150 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) was added to each of the cell compartments. Once the bilayer was formed, a transmembrane salt gradient was established rising [KCl] to 550 mM in *cis*, the compartment where sucrose loaded BBMV (0.2-3.7  $\mu$ g protein) were added for fusion; *trans* was held at virtual ground. Vesicle incorporation was assayed after application of a 50-mV holding potential across the PLB. Toxin (0.6-10.6 nM) was added to the *cis* compartment. All experiments were performed at room temperature.

Single channel currents were recorded with a Dagan 3900A patch-clamp amplifier (Dagan Corp., Minneapolis, MN) as in [28]. Currents were filtered at 200 or 500 Hz and digitized on-line at 1 or 2 KHz, respectively and analyzed on a personal computer using a Digidata 1200 interface and Axotape and pClamp software (Axon Instruments, Foster City, CA).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 *The resting membrane potential of BBMV.*

The resting membrane potential of BBMV loaded with 150 mM KCl, and assayed with the membrane potential-sensitive fluorescent dye Dis-C<sub>3</sub>-(5), is not far from the K<sup>+</sup> equilibrium potential ( $E_K$ ) calculated by the Nernst equation. In the presence of external 10 mM KCl, 130 mM NaCl the measured resting membrane potential was  $-59 \pm 3$  mV ( $n=13$ ) and  $-99 \pm 5$  mV ( $n=38$ ) in external 140 mM MeGluCl (Fig. 1C). The calculated  $E_K$  were  $-71$  and  $-108$  mV respectively. This suggests that in the BBMV of *S. frugiperda*, K<sup>+</sup> permeability contributes significantly to the resting membrane potential. K<sup>+</sup>-additions experiments without valinomycin indicate that the vesicles have intrinsic channels permeable to K<sup>+</sup> (Fig. 1A and 1B, control traces).

#### 3.2 *Effect of $\delta$ -endotoxins.*

The CryIC toxin was about two fold more active than CryID toxin against *S. frugiperda* larvae (LD<sub>50</sub>'s of 31.2 ng/cm<sup>2</sup> with a 18-48 Cl<sub>95</sub> and 77.6 ng/cm<sup>2</sup> with a 17-147 Cl<sub>95</sub>, respectively), whereas the CryIA(c) and CryIIIA toxins showed no activity.

Addition of 100 nM of either of the active toxins (approximately 2.5 pmol toxin/ $\mu$ g BBMV protein) to BBMV suspended in 140 mM MeGluCl produced a fast hyperpolarization. After toxin exposure, the vesicles also increased their response to KCl additions, when compared to the

control in which the same amount of buffer was added (Fig. 1Aa). Experiments in the absence of BBMV with an equivalent concentration of fluorescent dye, showed that both toxins induce a fast fluorescence decrease, smaller than the hyperpolarization seen with the vesicles (Fig. 1Ab). This artifact, which may result from electrostatic interaction of the toxins with the dye, was determined under each ionic condition and subtracted in all subsequent experiments (Fig. 1Aa-b). The hyperpolarization ( $9 \pm 3$  mV,  $n=23$ ) and the higher sensitivity of the vesicles to external  $K^+$  are consistent with a toxin-induced increase in  $K^+$  permeability possibly mediated by ion channel opening.

### 3.3 Ion Selectivity and Specificity.

It has been reported that CryIA(a) toxin increases cation permeability non-selectively, even for divalents, in BBMV from *Bombyx mori* [15]. To explore the selectivity of CryIC and CryID responses in *S. frugiperda* BBMV, MeGluCl was replaced by NaCl in the external media. Under this condition which is more physiological, both CryIC and CryID toxins induced a depolarization, even though the toxin addition artifact decreases fluorescence (Fig. 1B). This response is due to the electrogenic uptake of  $Na^+$  and suggests that the toxin-induced permeability pathway is not very selective among monovalent cations.

As mentioned above, the cation permeability of BBMV increases after toxin addition (100 nM CryID, see Fig. 1A). In this condition ion selectivity can be estimated from the ratio of the slope of the fluorescence rises which result from additions of increasing concentration of a certain cation vs that of  $K^+$  ( $m_{X^+}/m_{K^+}$ ). Since BBMV have intrinsic cation permeabilities, the response to serial additions of each cation was determined in the absence of toxin, as described earlier, and the slope subtracted from those obtained in its presence. Table 1 shows the selectivity series for the intrinsic permeability of BBMV ( $NH_4^+ > Cs^+ > K^+ > Li^+ > Rb^+ = Na^+$ ) and for that induced by the toxin ( $K^+ > NH_4^+ > Na^+ > Rb^+ > Li^+ > Cs^+$ ). As the initial response triggered by the toxin, the sustained permeability change is cationic, although not very  $K^+$  selective.

Osmotic swelling experiments in BBMV from *Manduca sexta* have indicated that CryIA(c) toxin increases anion permeability [16]. Experiments where MeGluCl was substituted by MeGlu-methanesulfonate in the incubation buffer showed that the toxin does not induce anion permeability changes, but a hyperpolarization ( $8 \pm 2$  mV,  $n=3$ ) due to  $K^+$  efflux (as in Fig. 1A). However, intrinsic anionic channels may exist in these vesicles.

The coleopteran-specific toxin (CryIIIA) and the non-toxic lepidopteran-specific toxin (CryIA(c)) were used to determine the specificity of the effect. Neither toxin affected BBMV intrinsic permeability, even at higher concentrations (500 nM and 200 nM, respectively). In addition, the CryIC and CryID toxins lost their insecticidal activity and their capacity to change the permeability of the vesicles when boiled.

Although the CryIC toxin is two fold more toxic to *S. frugiperda* than CryID toxin, it is less potent to induce permeability changes on the BBMV. However, the toxicity assays were performed with 1<sup>st</sup> instar larvae, in contrast to the permeability assays which were performed with BBMV purified from last instar. In BBMV isolated from the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> instar we have found that CryIC and CryID have similar effects (data not shown). It is possible that the CryIC and CryID receptor density in BBMV varies during larval development.

**Table 1.** Relative ion permeability

Cation	BBMV intrinsic permeability ( $m_{X^+}/m_{K^+}$ )	CryID induced permeability ( $m_{X^+}/m_{K^+}$ )*
K <sup>-</sup>	1.00	1.00
Na <sup>-</sup>	0.83	0.70
Li <sup>-</sup>	0.98	0.56
Cs <sup>-</sup>	1.15	0.32
Rb <sup>-</sup>	0.83	0.65
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1.25	0.79

Calculations were as described in section 3.3;  $m_{X^+}$ , slope of the fluorescence changes induced by different XCl additions to BBMV.  $X^+$ , different monovalent cations;  $m_{K^+}$ , slope for KCl additions.  $(m_{X^+}/m_{K^+})^*$ , estimated relative permeability of the toxin CryID induced-pores after subtracting the intrinsic channel relative permeability. All standard deviations were less than 5% (n = 5).

### 3.4 Pharmacological characterization

Previously it was reported that the CryIAs-induced permeability increase is very sensitive to external Ba<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> [3]. Table 2 compares the effect of some K<sup>+</sup> channel blockers and Ca<sup>2+</sup> on the intrinsic channels of BBMV and on their response to CryID toxin. The intrinsic channels are more sensitive to Ca<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>, TEA<sup>+</sup> and 4-AP, while less sensitive to Ba<sup>2+</sup>. The distinct ion selectivity and sensitivity towards various blockers of the intrinsic and the CryID-induced permeability changes suggest that they are different.

**Table 2.** Effect of K<sup>+</sup> channel blockers and Ca<sup>2+</sup> on the *in vitro* activity of the CryID toxin.

K <sup>+</sup> channel blocker	Intrinsic channels		CryID channels	
	A	B	A	B
Ba <sup>2+</sup>	400 ± 45 μM (50%)		200 ± 20 μM (50%)	
Ca <sup>2+</sup>	400 ± 40 μM (50%)		600 ± 40 μM (50%)	
Cs <sup>+</sup>	10 ± 2.5 mM (50%)		100 ± 10 mM (0%)	
TEA	30 ± 5.0 mM (50%)		200 ± 20 mM (26%)	
4-AP	4 ± 0.5 mM (50%)		30 ± 5 mM (0%)	

Column A, channel blocker concentration (± S.D., n=5). Column B, % of K<sup>+</sup> permeability inhibition. IC<sub>50</sub> were determined from dose-response curves.

### 3.5 Toxin responses of planar lipid bilayers containing BBMVs.

The previous results suggest that cation channels mediate the toxin effects. Thus, toxin induced single channel activity was examined in planar bilayers. Figure 2A illustrates the most frequent single channel transitions detected in PLB to which BBMVs were fused (see methods). These experiments were performed having a 3.7 fold higher KCl concentration in *cis* than in *trans*. Single channel conductances of 31, 47 and 76 pS were calculated from I-V curves of these transitions which have reversal potentials of ~ -20 mV, indicating that these channels are cation-selective with a P<sub>K<sup>+</sup></sub>/P<sub>Cl<sup>-</sup></sub> ~ 5.7 (Fig. 2B).

The endogenous BBMVs channels washout, lasting only 1-2 min. This makes their characterization difficult; however, in 2/3 experiments made in 100 mM CsCl *cis* /100 mM KCl *trans*, no single channel activity was detected after BBMVs addition, although channels appeared after nM toxin addition. These preliminary results suggest that the endogenous channels are blocked by Cs<sup>+</sup> while those induced by the toxin are not, in agreement with the membrane potential experiments.

It has been shown that the purified toxins alone can induce single channel activity in PLB [10- 13]. We repeated these experiments and never saw channel activity (n=25), unless > 5 μM toxin was used. The single channel transitions observed with μM toxin were cationic and similar to those described earlier [10- 13].



The response to CryIC of PLB containing BBMV was tested. Two types of toxin responses are illustrated in Fig. 3: one involving few channels (Fig. 3A, C), and a macroscopic conductance increase (Fig. 3B) where some large single channel transitions can be resolved. I-V curves of the toxin-induced single channel events (Fig. 3D) or from macroscopic responses (Fig. 3D insert, 1.9 nS curve) measured under a 3.7 fold KCl gradient indicate that the toxin-activated channels are cationic. Toxin-responses were observed in 15/17 experiments where the conductance increase ranged from 2 to 40 fold. The time to induce a response in bilayer experiments depended on toxin concentration. Low concentrations (0.6-3 nM) required up to 45 min (n=13), while at higher concentrations (5-10.6 nM), the response was seen after 0-10 min (n=3). Figure 3C shows examples of the toxin-induced single channel transitions 752, 360, 106 and 50 pS in bilayers containing BBMV. The symbol on the left side of each current record correspond to the I-V curve for that channel (Fig. 3D).

This work presents additional evidence that BBMV contain a functional *Bt* toxin receptor. Both, in vesicles and in PLB, ICP after interacting with their receptors, induce an increase in cation membrane permeability involving ion channels. The responses were observed at toxin concentrations (nM) which correlate with the *in vivo* lethal doses and with the range needed to inhibit aminoacid uptake into BBMV of others insects [7]. The results indicate that midgut cell lysis results from receptor mediated toxin-induced cation pore formation.

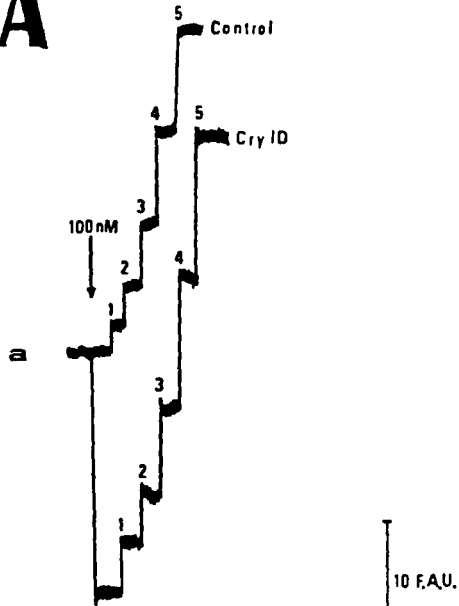
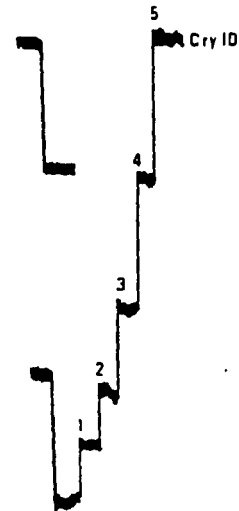
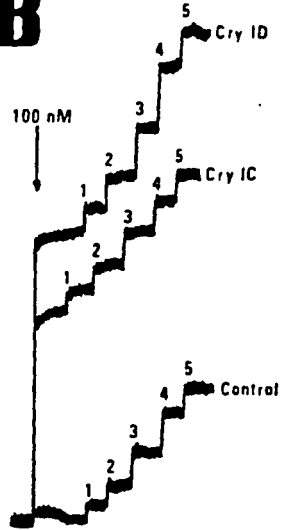
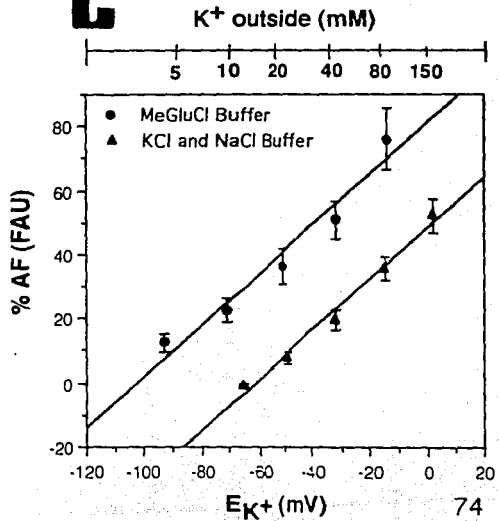
#### *Acknowledgements*

We thank M.C. Felipe Espinosa for technical assistance, Dr. M. Peferoen for providing monoclonal antibodies and *E. coli* strains, M.C. Eduardo Aranda and Laura Lina for performing the bioassays. This work was partially supported by DGAPA and CONACyT. AD is an International Scholar of the Howard Hughes Medical Institute.

## REFERENCES

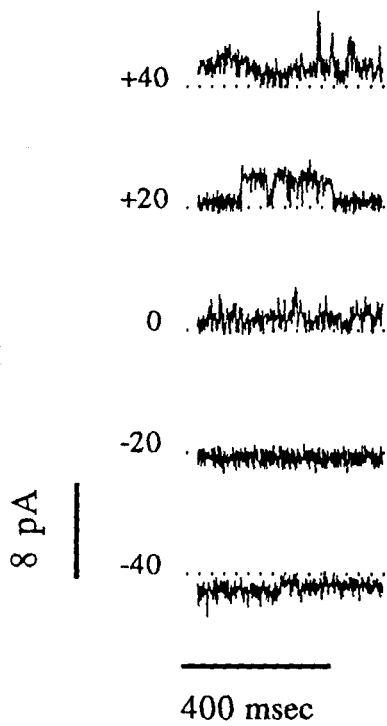
1. Höfte, H. and Whiteley, H.R. (1989). *Microbiol. Rev.* 53, 242-255.
2. Van-Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van-Mellaert, H. (1989). *Eur. J. Biochem.* 186, 239-247.
3. Crawford, D.N. and Harvey, W.R. (1988). *J. Exp. Biol.* 137, 277-286.
4. Giordana, B., Tasca, M., Villa, M., Chiantore, C., Hanozet, G.M. and Parenti, P. (1993). *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 403-407.
5. Griego, V.M., Moffett, D. and Spence, K.D. (1979). *J. Insect. Physiol.* 25, 283-288.
6. Harvey, W.R. and Wolfersberger, M.G. (1979). *J. Exp. Biol.* 83, 293-304.
7. Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G. M., Giordana, B., Lüthy, P. and Wolfersberger, M. G. (1986). *FEBS Lett.* 204, 213-218.
8. Haider, M. Z. and Ellar, D. J. (1989). *Biochim. Biophys. Acta.* 978, 216-222.
9. Yunovitz, H. and Yawetz, A. (1988). *FEBS Lett.* 230, 105-108.
10. Schwartz, J. L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. and Rousseau, E. (1993). *J. Membrane Biol.* 132, 53-62.
11. Slatin, S. L., Abrams, C. K. and English, L. H. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 169, 765-772.
12. Walters, F.S., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. and English, L.H. (1993). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 196, 921-926.
13. Von Tersch, M.A., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. and English L.H. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3711-3717.
14. Knight, P. J. K., Crickmore, N. and Ellar, D. J. (1994). *Mol. Microbiol.* 11, 429-436.
15. Uemura, T., Ihara, H., Wadano, A. and Himeno, M. (1992). *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1976-1979.
16. Carroll, J. and Ellar, D.J. (1993). *Eur. J. Biochem.* 214, 771-778.
17. Wolfersberger, M., Lüthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F. V., Giordana, B. and Hanozet, G.M. (1987). *Comp. Biochem. Physiol.* 86A, 301-308.
18. Harlow, E. and Lane, D. (1988). In: *Antibodies. A laboratory manual* pp 597, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
19. García-Soto, J., González-Martínez, M., De la Torre, L. and Darszon, A. (1988). *Biochim. Biophys. Acta* 944, 1-12.

20. Höfte, H., Grave, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., VanMontagu, M., Zabeau, M. and Vaek, M. (1986). *Eur. J. Biochem.* 161, 272-280.
21. Mahillon, J. and Delcour J. (1984). *J. Microbiol. Methods* 3, 69-76.
22. Laemmli, U.K. and Favre, M. (1973). *J. Mol. Biol.* 80, 575-599.
23. Towbin, H.T., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
24. Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. and Bravo, A. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 353-356.
25. Marwell, M. A. K., Haas, S. M., Vieber, Z. Z. and Tolbert, N. E. (1978). *Anal. Biochem.* 87, 206-210.
26. Reynaud, E., De la Torre, L., Zapata, O., Liévano, A. and Darszon, A. (1993). *FEBS Lett.* 329, 210-214.
27. Müller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T. and Westcott, W. C. (1962). *Nature* 194, 979.
28. Liévano, A., Vega-Saenz de Miera, E. and Darszon, A. (1990). *J. Gen. Physiol.* 95, 273-296.

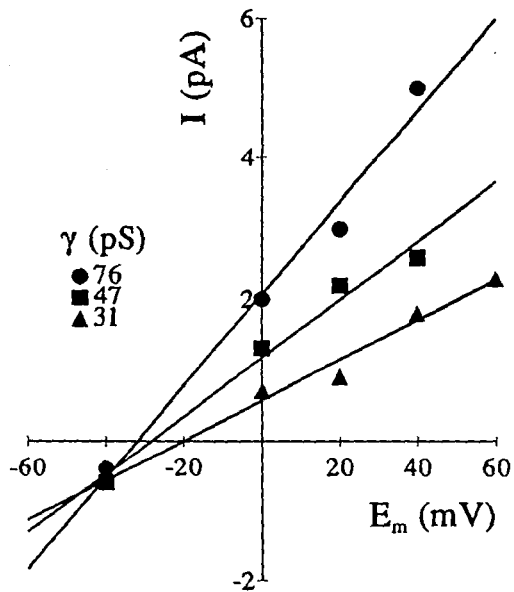
**A****b****a-b****B****C**

**Figure 1.-** Effect of the CryIC and CryID toxins on the membrane potential in *Spodoptera frugiperda* midgut brush border membrane vesicles. Membrane potential of BBMV (20  $\mu$ g) loaded with (mM) 150 KCl, 2 EGTA, 0.5 EDTA, 10 HEPES-HCl pH 7.5 were recorded as described in section 2. Pre-equilibration with 1.5  $\mu$ M Dis-C<sub>3</sub>-(5) (9 min) and the effect of 0.5  $\mu$ M oligomycin are not shown. An upward deflection indicates a membrane potential depolarization. The arrow on top of the traces corresponds to the time of toxin or buffer A addition. F.A.U. = fluorescence arbitrary units. (1A) CryID response of BBMV suspended in 140 mM methylglucamine chloride, 10 mM HEPES-HCl pH 7.5. (a) Final K<sup>+</sup> concentrations were (mM): 1= 4; 2=13; 3=30; 4=64 and 5=133. In the control, buffer A was added instead of toxin. (b) Interaction of the CryID toxin with the dye in absence of BBMV. (1B) CryIC and CryID effects upon substitution of methylglucamine chloride incubation buffer by 10 mM KCl, 130 mM NaCl, 10 mM HEPES-HCl pH 7.5 buffer. Final K<sup>+</sup> concentration were (mM): 1=23; 2=44; 3=85; 4=165; 5=367. The control trace was obtained with buffer A addition, as well as with CryIIIA, CryIA(c) and boiled CryIC and CryID toxins additions. (1C) Resting membrane potential was determined as described in section 2.3 from a  $\Delta F$  (%) vs E<sub>K<sup>+</sup></sub> (mV) curve. In the presence of external 10 mM KCl, 130 mM NaCl the measured resting membrane potential was  $-59 \pm 3$  mV (n=13) and  $-99 \pm 5$  mV (n=38) in external 140 mM MeGluCl .

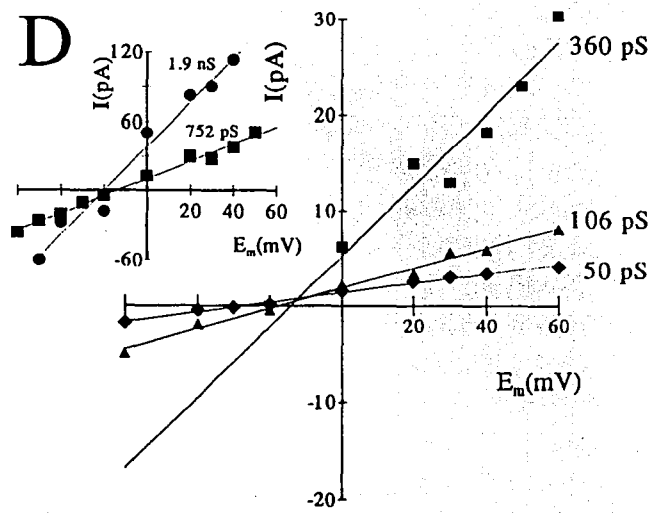
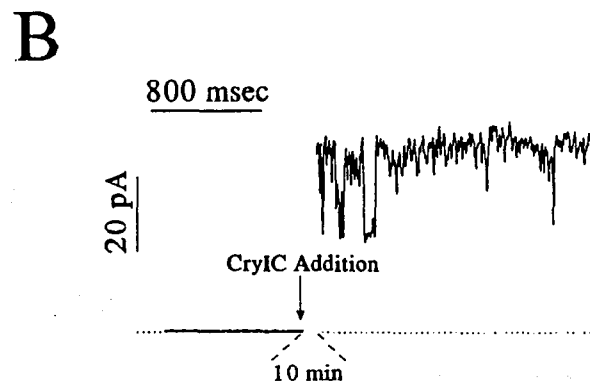
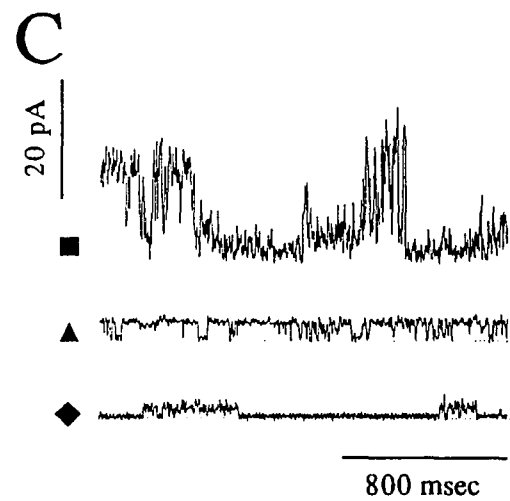
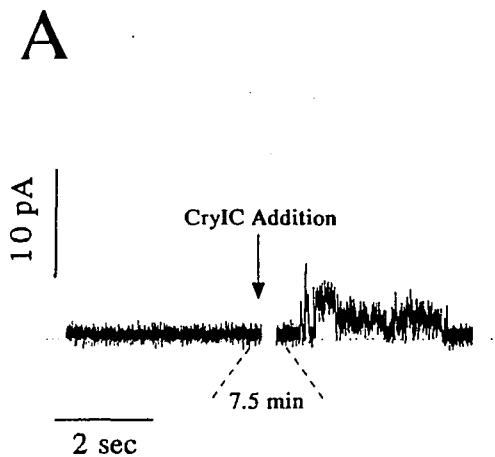
# A



# B



**Figure 2.-** Representative single channel records (A) and I-V curves from the most common current transitions (B) of BBMV from *S. frugiperda* fused to a diPPC lipid bilayer. Records were obtained in 550 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0, *cis*; 150 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0, *trans*. Holding potentials in mV are indicated on the left of each record. Zero current level is indicated by dashed lines.  $E_R$  was around -20 mV.





**Figure 3.-** Cation channels formed by CryIC toxin in bilayers with fused BBMV. Ionic conditions were as in Fig. 2. (A) single channel transitions observed 7.5 min after 10.6 nM CryIC addition. (B) macroscopic response observed at 10 min with the same toxin concentration. (C) representative single channel transitions at 0 mV from bilayers containing BBMV exposed to 1.3-10.6 nM CryIC toxin. The dotted lines indicate the zero current level.  $E_R$  were close to -20 mV, indicating that these channels are cationic. (D) I-V plot of the single channel transitions presented in figure C. The insert in the left side shows also the I-V curve of a macroscopic response ( $\gamma = 1.9$  nS).

## DISCUSION

## 1 Purificación y caracterización de las VMMA de *S. frugiperda*.

Se han descrito diversos métodos de purificación de la membrana de la microvellosidad apical (MMA) de las células epiteliales de varias especies de lepidópteros y coleópteros (Giordana *et al*, 82; Santos *et al*, 86; Wolfersberger *et al*, 87). De éstos, el método basado en la precipitación diferencial con  $Mg^{2+}$ -EGTA desarrollado por Wolfersberger y colaboradores es el que sin requerir de equipo sofisticado y sin consumir mucho tiempo, da como resultado preparaciones con un buen nivel de enriquecimiento. Por esta razón decidimos estandarizar el proceso de purificación de la MMA del intestino medio de *S. frugiperda* usando dicho protocolo.

El resultado de los análisis enzimáticos llevados a cabo para los cuatro diferentes lotes de VMMA que se emplearon en el presente estudio, mostró que el enriquecimiento de la MMA de la preparación final *versus* el homogenado inicial (9.5 a 12.5 veces/mg de proteína), es similar al reportado para preparaciones del mismo tipo obtenidas de otros lepidópteros (Sacchi *et al*, 86; Wolfersberger *et al*, 87; Hendrickx *et al*, 90; Giordana *et al*, 93; Carrol y Ellar, 93). Esto comprueba la reproducibilidad de los resultados que pueden obtenerse usando dicho método.

La única diferencia importante en el procedimiento de purificación de las VMMA respecto del original, fue la adición de una mezcla de inhibidores de proteasas a la solución amortiguadora con la que se lavaron los intestinos medios extraídos de larvas de *S. frugiperda*; ésto con la finalidad de evitar la degradación de las proteínas presentes en el tejido por acción de las abundantes proteasas características del intestino de los insectos.

La fosfatasa alcalina (FA) es una proteína transmembranal prácticamente exclusiva de la membrana apical de las células epiteliales que al igual que el receptor para las toxinas Cry se encuentra orientada hacia la luz del lumen (Wolfersberger, 84). El monitoreo de la actividad específica de FA en presencia y ausencia de detergente (0.02%, Tritón X-100) permitió determinar que más del 90% de la población de vesículas presenta una orientación positiva; en otras palabras, una gran parte de la población de las VMMA presenta los receptores orientados hacia afuera.

Con el ensayo tipo *dot-blot* descrito en la sección de resultados en el cual se detectó la presencia de toxina CryIC unida a su receptor con un anticuerpo antitoxina y después con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, se

comprobó cualitativamente el aumento de la concentración específica de sitios de unión (receptores) en las preparaciones finales de vesículas, comparada con la de los homogenados respectivos.

El aumento en la concentración específica de receptores y su correcta orientación en las vesículas fueron requisitos fundamentales para garantizar la utilidad de estas preparaciones para estudiar el efecto inicial de las  $\delta$ -endotoxinas en la membrana blanco.

## 2 Purificación, solubilización, procesamiento y almacenamiento de las $\delta$ -endotoxinas empleadas.

Las propiedades de las proteínas Cry con base en las que se han desarrollado los diversos protocolos de purificación son: su solubilidad a pHs extremos (alcalino para las toxinas CryI y CryIII y ácido para las toxinas CryII) y su resistencia al tratamiento con proteasas (Li *et al*, 91; Koller *et al*, 92). Sin embargo, es importante señalar que los diferentes tipos de toxinas pueden presentar diversos grados de resistencia a la acción de las proteasas. Por ejemplo, los resultados de la purificación y posterior ensayo de la actividad biológica de las toxinas empleadas, demostraron que CryIC es la toxina más susceptible a la acción de la tripsina (1:20, incubada a 37 °C toda la noche) comparada con las otras tres proteínas usadas en el presente estudio (CryID, CryIA(c) y CryIIIA). En las condiciones de activación con tripsina ya citadas, CryIC pierde su actividad biológica; el análisis respectivo en gel de poliacrilamida-SDS, muestra claramente la presencia de dos bandas de peso molecular muy parecido (datos no mostrados) y cercano a aquél reportado por otros autores para la forma activa de esta proteína (Honée *et al*, 88). Al parecer es la banda superior la que conserva la actividad biológica. Para obtener preferencialmente esta forma fue necesario usar condiciones de activación más suaves (1:50 tripsina, incubando a 37 °C durante 3 horas).

La presencia de por lo menos 150 mM de KCl o NaCl en la solución amortiguadora donde se almacenó la toxina CryID fue indispensable para evitar su precipitación, aún a concentraciones de proteína relativamente bajas (0.5 mg/ml). Esto pudiera deberse a asociación de las moléculas de toxina, ya que su punto isoelectrico:  $pI=8.2$  (valor determinado por Leopoldo Güereca en un experimento de enfoque isoelectrico) es muy cercano al pH del medio de almacenamiento (pH 8.6).

### 3 Condiciones óptimas de ensayo para el monitoreo del potencial de membrana de las vesículas.

El colorante elegido para monitorear el potencial de la MMA de *S. frugiperda* es una molécula que a pH neutro posee una carga positiva deslocalizada (Bashford y Smith, 79). La presencia de un grupo ionizable débil en cada uno de los dos heterociclos de que consta, implica que el pH del medio puede modificar su distribución dentro y fuera de la membrana en función del potencial. Por esta razón se decidió usar soluciones amortiguadoras intra y extravesiculares con pH cercano al neutro.

Se prefirió usar HEPES-HCl en la composición del medio intra y extravesicular ya que esta molécula se considera prácticamente impermeable para las membranas biológicas. Por ésto puede despreciarse la contribución del HEPES al aumento o disminución de la fluorescencia debida al movimiento de los iones.

Para encontrar las condiciones óptimas de ensayo, es decir, la concentración de colorante y de proteína de vesículas más adecuados para monitorear los cambios en el potencial de la MMA se hicieron curvas  $\Delta F(\%)$  vs  $E_K$  (como las mostradas en la Figura 1C) manteniendo fija una de las variables y modificando la otra. Aquella condición con la que se obtuvo la pendiente más grande y el coeficiente de correlación más alto es la que se consideró más adecuada.

Las concentraciones de colorante y de proteína de vesículas que se determinaron como óptimas para este ensayo (1.5  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{g}$ , respectivamente) coinciden con las reportadas por Uemura y colaboradores (92) para un ensayo similar; ésto pone de manifiesto la reproducibilidad de los resultados obtenidos usando este tipo de sistema.

### 4 Determinación del potencial de reposo de la membrana de las vesículas.

El potencial de reposo es el parámetro que nos permite conocer cuál es la permeabilidad principal de una membrana (Hille, 92). Tal como se citó en la sección de resultados, el potencial de reposo calculado para la MMA de *S. frugiperda* ( $-59 \pm 3$  mV ( $n=13$ )) en el medio de incubación con NaCl 130 mM, KCl

10 mM y  $-99 \pm 5$  mV ( $n=38$ ) en el medio con cloruro de *n*-metil-D-glucamina (MeGluCl) 140 mM) es muy cercano al potencial de equilibrio del  $K^+$  determinado con la ecuación de Nernst ( $-71$  y  $-108$  mV, respectivamente). Esto significa que en el reposo, la permeabilidad más importante de la membrana de las vesículas es al  $K^+$  y no a los otros iones presentes ( $Cl^-$  y MeGlu $^+$  o  $Na^+$ ), en las condiciones experimentales usadas.

En concordancia con lo anterior se observó que la membrana estudiada es permeable al  $K^+$  en ausencia de valinomicina (trazos control mostrados en la Figura 1).

Otros autores que han analizado la permeabilidad endógena de VMMA obtenidas de otros lepidópteros (Uemura *et al*, 92; Carrol y Ellar, 93) o bien de vesículas híbridas compuestas de MMA y lípidos sintéticos (English *et al*, 91<sub>a</sub>) también han observado que dichas vesículas son permeables al  $K^+$ .

Esta evidencia parecería estar en contraposición con la encontrada por diversos autores quienes han descrito que en condiciones fisiológicas la MMA es muy poco permeable al  $K^+$  (Harvey, 92; Wolfersberger, 92). Esta divergencia en los resultados del análisis de la permeabilidad intrínseca de la MMA puede explicarse con los siguientes argumentos.

1) En las VMMA se ha perdido completamente la estructura original del tejido y por lo tanto la regulación del transporte iónico del mismo. Como se citó antes el potencial de reposo de la MMA de las vesículas es mucho más positivo que el potencial de reposo fisiológico, el cual en algunas especies es mayor de  $-150$  mV. En esta nueva condición es probable que algunos canales que fisiológicamente no están activos ahora si lo estén.

2) El  $K^+$  pudiera estar pasando por vías de permeabilidad que *in vivo* son selectivas para otros cationes.

En la Tabla 1 pueden verse resultados que son consistentes con este planteamiento. En esa tabla se muestra la secuencia de selectividad relativa para las vías de permeabilidad intrínsecas de las vesículas ( $NH_4^+ > Cs^+ > K^+ > Li^- > Na^+ = Rb^+$ ). Esta serie de selectividad refleja la heterogeneidad de la población de canales iónicos presentes en las membranas biológicas, en este caso la MMA de *S. frugiperda*. Dicha heterogeneidad explica porqué esta serie de selectividad dista mucho de las obtenidas para los canales de  $K^+$  típicos (Hille, 92).

3) No puede descartarse que en la preparación de VMMA estén presentes otras porciones de la membrana de las células epiteliales que sí son permeables al  $K^+$ , como lo son la membrana basal de las células columnares y la mayor parte de las membranas que conforman las células caliciformes.

## 5 Efecto inicial de las $\delta$ -endotoxinas en la MMA.

En todas las soluciones amortiguadoras usadas las toxinas interactúan directamente con el colorante, al parecer de forma electrostática, ya que dicha interacción puede separarse con la adición de sales de cationes monovalentes y más marcadamente con las de divalentes. Este fenómeno que hemos denominado artefacto siempre se observa en la misma dirección, es decir, en todos los medios de incubación empleados siempre observamos disminución de la fluorescencia al agregar una alícuota de toxina al medio que contiene el colorante en ausencia de vesículas (ver Figura 1Ab). Dicho artefacto es reproducible y desigual para cada toxina, probablemente reflejando diferencias de la carga superficial entre éstas.

A continuación se discute el efecto causado por las toxinas después de corregir los trazos obtenidos con los artefactos correspondientes.

Esta metodología nos permitió determinar que en el medio de incubación compuesto por MeGluCl, el efecto inmediato causado por CryID en la MMA es una hiperpolarización ( $9 \pm 3$  mV,  $n=23$ ), es decir, una disminución de la fluorescencia debida a la salida del  $K^+$  de las vesículas en favor de su gradiente de concentración. También se observó un subsecuente aumento de la permeabilidad al hacer las adiciones de KCl.

Ambos efectos, es decir, la hiperpolarización inmediata y el aumento en la permeabilidad a KCl subsecuente, son congruentes con la idea de que la alteración de la permeabilidad de la MMA se debe a que la toxina induce la formación o apertura de un poro.

Cuando en el medio externo el MeGluCl, una sal de un catión de gran volumen, se sustituyó con una sal de un catión que puede considerarse más fisiológico (NaCl), el efecto inmediato causado por CryIC y CryID en la MMA resultó completamente opuesto al antes descrito (Figura 1B), es decir, en este caso observamos una depolarización. Este aumento de la fluorescencia se debe

entonces a que el catión de menor volumen ( $\text{Na}^+$ ) es capaz de pasar (entrar a las vesículas en favor de su gradiente de concentración) por la vía de permeabilidad inducida por estas proteínas. Esto apunta con claridad hacia que dicha vía no es muy selectiva entre los cationes monovalentes presentes en el medio intra y extravésicular ( $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , respectivamente).

## 6 Especificidad de la respuesta observada.

Los resultados obtenidos al medir la actividad biológica de las diferentes toxinas hacia larvas neonatas de *S. frugiperda* mostraron que la proteína más potente es CryIC. Sin embargo, en los ensayos de fluorescencia con VMMA obtenidas del último *instar* larvario, se encontró que la toxina que causa mayor alteración en la permeabilidad de la MMA es CryID (Figura 1B). Al estudiar el efecto en este mismo sistema con VMMA obtenidas de larvas en el segundo y tercer estadio, se observó un efecto similar con ambas toxinas (CryIC y CryID). Esto podría explicarse proponiendo que cada toxina se une a una población de receptores diferente, y que éstos se expresan diferencialmente durante el desarrollo larvario.

Sánchez-Quintana (94), al hacer estudios de competencia heteróloga en cortes de tejido de *S. frugiperda* con CryIC y CryID marcadas con biotina, demostró que CryIC no es capaz de competir con CryID por los sitios de unión, pero que CryID sí compite con CryIC. Con base en esto el autor propuso que cada toxina se une a diferentes poblaciones de receptores pero que CryID puede unirse también a la población a la que se une CryIC.

La determinación de la constante de afinidad ( $K_d$ ) y la concentración de sitios de unión ( $B_{max}$ ) en experimentos de competencia homóloga y heteróloga de la unión de  $^{125}\text{I}$ -CryIC y  $^{125}\text{I}$ -CryID a las VMMA obtenidas de los diferentes estadios de desarrollo de *S. frugiperda* permitirá esclarecer si esta propuesta es correcta.

Se comprobó que al hervir CryIC y CryID en las condiciones descritas previamente, éstas pierden su actividad biológica. Consistentemente, se observó que también perdieron su habilidad para causar cambios inmediatos en la permeabilidad de la MMA, usando el sistema desarrollado en el presente trabajo.



Garczynski y colaboradores (91) reportaron que CryIA(c), una proteína prácticamente inactiva para *S. frugiperda*, se une saturablemente y con alta afinidad ( $K_d$  0.68 nM y  $B_{max}$  4.5 pmol/mg proteína) a las VMMA obtenidas de dicho insecto. Al analizar el efecto de CryIA(c) en el potencial de la MMA, se demostró que esta toxina es incapaz de causar alteración alguna en la permeabilidad. Esto sugiere que los resultados obtenidos con este sistema son el reflejo de la unión a los receptores y la posterior inserción y formación de poros en la membrana.

En concordancia con lo anterior, usando esta misma metodología se encontró que una proteína específica para coleópteros (CryIIIA) también es incapaz de causar alteración en el potencial de la membrana estudiada.

El hecho de que las únicas toxinas capaces de alterar la permeabilidad de la MMA *S. frugiperda* sean las que tienen actividad tóxica *in vivo*, es decir, el que con esta metodología se puedan diferenciar las proteínas que se unen, insertan en la membrana y forman poro, de aquéllas que sólo se unen, es lo que hace a este sistema una herramienta valiosa para la detección de  $\delta$ -endotoxinas con actividad potencial hacia organismos hasta el momento considerados no susceptibles y también para estudios del mecanismo molecular de acción de las  $\delta$ -endotoxinas.

Aunque esta metodología no se ha aplicado aún para detectar la(s) proteína(s) Cry con capacidad de alterar la permeabilidad de vesículas obtenidas de algún insecto no susceptible, se pueden citar varias limitantes del uso de este sistema para estos fines.

Una primera limitante es el tamaño del insecto del que se obtiene la membrana donde se supone está concentrado el receptor para la toxina. Recientemente MacIntosh y colaboradores (94) han adaptado el protocolo desarrollado por Wolfersberger para purificar MMA partiendo de insectos completos en vez de intestinos medios aislados. Esta herramienta puede permitir hacer extensivo el uso del sistema de monitoreo del potencial de la MMA de vesículas purificadas a partir de insectos de diversos órdenes.

Otra limitante es el grado de pureza requerido de la toxina cuando ésta proviene de alguna cepa de *Escherichia coli*. Hemos observado que proteínas de esta bacteria que también son solubles a pH alcalino y resistentes al tratamiento con tripsina (las cuales se observan en el gel de poliacrilamida como bandas contaminantes) son capaces de alterar la permeabilidad de la

membrana de las vesículas de *S. frugiperda* (resultados no mostrados). Este fenómeno no se ha observado cuando se han utilizado preparaciones de toxina obtenidas creciendo cepas de *Bt* hasta la esporulación y la posterior solubilización de los cristales y activación con tripsina de las protoxinas liberadas de los mismos.

## 7 Selectividad de la vía de permeabilidad inducida por CryID.

El efecto inicial en la MMA causado por las toxinas específicas para el insecto del que fueron obtenidas las vesículas, es causar una hiperpolarización o depolarización inmediata, dependiendo del tipo de catión presente en el medio extravesicular (MeGlu<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>, respectivamente). Considerando ésto, se propuso caracterizar con mayor detalle la selectividad de la vía de permeabilidad inducida por CryID, la toxina que produce mayor alteración en la permeabilidad de la membrana.

Como puede verse en la Tabla 1 la serie de selectividad para la vía de permeabilidad inducida por CryID (K<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup>) es diferente de la obtenida para las vías de permeabilidad intrínsecas de las VMMA. Esto sugiere que se trata de vías de permeabilidad independientes.

La pobre distinción que la vía de permeabilidad inducida por CryID hace entre los diferentes cationes monovalentes probados contrasta notoriamente con la de los canales de K<sup>+</sup> clásicos, los cuáles son notablemente permeables a Tl<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y varios órdenes de magnitud menos permeables a Cs<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> (Hille, 92).

Usando un sistema similar Uemura y colaboradores (92), encontraron que la secuencia de selectividad de la vía de permeabilidad intrínseca de las VMMA de *Bombyx mori* (Li<sup>+</sup> > Mg<sup>2+</sup> = Ca<sup>2+</sup> > Na<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > K<sup>+</sup>) también es diferente de aquélla obtenida para la vía de permeabilidad inducida por CryIA(a) en dicha membrana (Ca<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> >> Li<sup>+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> = Rb<sup>+</sup>). También en este caso ambas series de selectividad son muy diferentes de las obtenidas para los canales de K<sup>+</sup> típicos.

Las diferencias entre las series de selectividad encontradas para las vías de permeabilidad intrínsecas e inducidas por las toxinas específicas en *S. frugiperda* y *B. mori* podrían deberse a que:

1) En el caso de *B. mori* no se estudió el efecto inmediato de CryIA(a), sólo se analizó el efecto que produce después de incubarla durante una hora con las vesículas.

2) La forma de calcular la selectividad en ambos trabajos es diferente. Para el caso de *S. frugiperda* estos datos fueron estimados al comparar la pendiente de las curvas  $\Delta F(\%)$  vs  $E_{x^+}$  (similares a la presentada en la Figura 1C) obtenidas al hacer adiciones sucesivas de las diferentes sales (KCl, NaCl, etc). En el trabajo de los autores citados, la serie de selectividad se obtuvo al comparar el  $\Delta F$  producido por una sólo adición de la sal correspondiente. Una desventaja importante de esta última forma de estimar la permeabilidad relativa a los diferentes cationes, es que se desprecia el efecto de éstos en el potencial de superficie. Dicho efecto es particularmente importante para los cationes divalentes (Hille, 92).

3) Los resultados también pudieran reflejar diferencias reales de la selectividad relativa de las vías de permeabilidad inducidas por CryIA(a) y CryID. Esto no sería extraño; de hecho, en estudios de formación de canales iónicos en bicapas lipídicas planas por acción de las proteínas CryIC (una proteína parecida a CryID) y CryIA(a) se ha encontrado que la selectividad de dichos canales es diferente (Schwartz et al, 93<sub>b</sub>).

Usando experimentos de hinchamiento osmótico Carrol y Ellar (93) encontraron que CryIA(c) aumenta la permeabilidad de la MMA de *Manduca sexta* no sólo para cationes ( $K^+$ ,  $Na^+$  y tetraetilamonio (TEA)) sino también para aniones ( $Cl^-$ ,  $SCN^-$  y gluconato $^-$ ). Con base en estos resultados dichos autores proponen que los poros inducidos por las  $\delta$ -endotoxinas no son catiónicos.

Con la finalidad de analizar si el cloro, un anión de volumen pequeño, es capaz de pasar por la vía de permeabilidad inducida por CryID en la MMA de *S. frugiperda* se llevaron a cabo experimentos donde en el medio extravésicular el MeGluCl fue sustituido por metanosulfonato de MeGlu $^+$ . Se demostró que CryID no induce cambios en la permeabilidad a aniones, ya que el efecto inmediato producido por ésta en la membrana, en estas condiciones fue una hiperpolarización ( $8 \pm 2$  mV,  $n=3$ ) o disminución de la fluorescencia debida a la salida del  $K^+$  de las vesículas.

La divergencia en los resultados obtenidos por Carrol y Ellar y los del presente estudio pueden explicarse si se considera que en el caso de los experimentos en VMMA de *Manduca sexta* se analizó el efecto que CryIA(c)

produce en esa membrana después de una hora de estar en contacto con ella, por lo que el efecto observado no puede considerarse como el inicial. Estas diferencias también pueden deberse a que las propiedades intrínsecas de la permeabilidad de las VMMA de los dos insectos sean desiguales. Tampoco puede descartarse la posibilidad de que la selectividad de los canales formados por CryIA(c) y CryID sea diferente.

La caracterización fina de los canales intrínsecos de las VMMA y de aquéllos formados por CryIC en bicapas lipídicas planas, llevada a cabo por la Biol. Claudia Díaz Camino son congruentes con los resultados antes descritos, es decir, tanto los canales intrínsecos de las vesículas como los inducidos por la toxina en presencia del receptor son catiónicos.

## 8 Distinción farmacológica de las vías de permeabilidad intrínseca e inducida por CryID.

Como se dijo anteriormente los resultados de la determinación de las series de selectividad de las vías de permeabilidad intrínseca e inducida por CryID sugerían que dichas vías son independientes. Con la finalidad de esclarecer este punto se hicieron experimentos con bloqueadores generales de canales de  $K^+$  y  $Na^+$ . Este tipo de estrategia ha sido una herramienta ampliamente utilizada para el estudio y caracterización de los diversos tipos de canales iónicos conocidos hasta el momento (Hille, 92).

La Tabla 2 muestra evidencia que apoya la idea de que los canales intrínsecos son diferentes de aquél que la toxina induce en presencia de su receptor. En esta tabla puede verse que las vías de permeabilidad intrínsecas de las VMMA son más sensibles a  $Ca^{2+}$ ,  $Cs^+$ , TEA y 4-aminopiridina (4-AP) y menos a  $Ba^{2+}$  que aquélla inducida por la toxina. Los resultados relativos a las rutas endógenas pueden explicarse por la gran heterogeneidad de los canales presentes en las membranas biológicas. Aunque varios bloqueadores generales de canales de  $K^+$  ( $Ba^{2+}$ , TEA, 4-AP) tienen actividad sobre la vía de permeabilidad inducida por la toxina, las dosis requeridas para observar dicho efecto son muy superiores a las usadas para dichos canales (Hille, 92). La amilorida, un bloqueador de canales de  $Na^+$  de células epiteliales (Benos, 82; Benos *et al*, 87), tampoco fue efectiva para cerrar la vía de permeabilidad inducida por CryID (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren que CryID induce una vía de permeabilidad con propiedades farmacológicas generales diferentes de las de los canales de  $K^+$  o  $Na^+$  típicos.

De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 2, el Cs<sup>+</sup> y la 4-AP son dos agentes que pueden utilizarse en estudios más finos que permitan caracterizar los canales formados por las  $\delta$ -endotoxinas, debido a que éstos sólo bloquean las vías de permeabilidad endógenas de las vesículas. Los resultados preliminares obtenidos en el sistema de bicapas lipídicas planas, donde a una membrana de difitanoilfosfatidilcolina preformada se fusionaron VMMA de *S. frugiperda* en presencia de 100 mM CsCl *cis* /100 mM KCl *trans*, sugieren que los canales endógenos de las vesículas se bloquean por Cs<sup>+</sup>, mientras que los inducidos por dosis nM de CryIC no. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de monitoreo del potencial.

## 9 Resultados del presente estudio en el contexto del mecanismo molecular de acción de las $\delta$ -endotoxinas.

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten proponer que el efecto inicial de las  $\delta$ -endotoxinas es inducir una vía de permeabilidad selectiva a cationes en la MMA del intestino de los insectos susceptibles.

Los diferentes autores que han analizado el mecanismo de acción de las proteínas Cry desde el punto de vista de la fisiología del intestino de los insectos (Harvey, 92; Wolfersberger, 92; Knowles y Dow, 93), coinciden en que el aumento de la permeabilidad de la membrana de las células columnares a los cationes, provoca que se pierdan la diferencia de potencial y la energía que mantiene el gradiente de pH. La consecuente alcalinización del citoplasma interfiere entonces con el metabolismo celular, lo que incluye el funcionamiento de la ATPasa V de las células caliciformes y causa a la postre, que se pierda la integridad del epitelio. En estas condiciones, las esporas tienen acceso a la hemolinfa en la que germinan y todo ésto, en conjunto, causa la muerte de la larva por inanición y septicemia. Se ha observado que este efecto de las esporas es particularmente importante cuando el insecto ingiere dosis subletales de toxina (Miyasono *et al*, 94).

La diferente selectividad y propiedades farmacológicas de las vías de permeabilidad intrínsecas e inducida por CryID favorecen la idea de que la toxina participa directamente en la formación del poro.

Usando este mismo sistema, recientemente hemos obtenido evidencia adicional que sustenta esta proposición. Encontramos que CryIA(c), una proteína altamente activa contra *Trichoplusia ni* y *Heliothis virescens*, causa un efecto inmediato similar en la MMA purificada a partir de dichos insectos al causado por CryID en la MMA de *S. frugiperda*.

Estos resultados no permiten inferir si el receptor también forma parte del poro. Los experimentos que serían de gran utilidad para aclarar este punto podrían consistir en analizar con la metodología de monitoreo del potencial de membrana el efecto de la porción comprendida entre los dominios II y III (que es la región que interactúa con el receptor) de alguna toxina en la MMA del insecto susceptible a la misma.

La evidencia que sugiere que el receptor participa en la formación del canal modulando de alguna manera su actividad, y no sólo aumentando la concentración efectiva de toxina en la membrana para permitir su inserción, es la obtenida por Wolfersberger (comunicación personal en Knowles, 94) y por la Biol. Claudia Díaz Camino usando bicapas lipídicas planas. Ambos autores han encontrado diferencias en el tamaño y el comportamiento cinético de los canales iónicos formados por CryIA(c) en presencia MMA de *Manduca sexta* y por CryIC en presencia de MMA de *S. frugiperda*, respectivamente.

Los análisis de formación de canales en bicapas lipídicas planas a las que se incorporen receptores putativos purificados o bien, en *patch clamp* en células epiteliales en cultivo, podrían ser herramientas que permitan aclarar cuál es la participación del receptor en la formación del poro.

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento del efecto inicial producido por las proteínas Cry en la membrana de las células columnares, sería interesante hacer experimentos en los que se analicen conjuntamente los cambios que éstas inducen en el potencial de la membrana y el pH y/o concentración de  $Ca^{2+}$  intracelulares. Las células epiteliales en cultivo o las VMMA y las sondas fluorescentes pudieran ser herramientas útiles para conseguir estos fines.

# CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos usando el sistema de monitoreo del potencial de la MMA de *Spodoptera frugiperda* se puede concluir que el efecto inmediato exclusivo de las toxinas altamente activas contra dicho insecto (CryIC y CryID) es inducir una vía de permeabilidad selectiva para cationes.

La diferente selectividad y propiedades farmacológicas de las vías de permeabilidad endógena e inducida por CryID en la membrana estudiada, sugiere que ambas rutas son independientes.

La poca distinción que la vía de permeabilidad inducida por CryID hace de los diferentes cationes monovalentes indica que el poro formado por esta toxina a los pocos segundos de estar en contacto con la membrana que contiene al receptor, es solo pobremente selectivo para K<sup>+</sup>.

La vía de permeabilidad inducida por la toxina CryID en las VMMA de *S. frugiperda* no se bloquea por las dosis comúnmente empleadas de bloqueadores generales de los canales de K<sup>+</sup> más comunes (Hille, 92). Lo anterior sugiere que el canal inducido por la toxina en presencia de su receptor es diferente de los canales de K<sup>+</sup> clásicos.

En este sistema, sólo aquellas toxinas capaces de unirse al receptor, intercarse en la membrana y formar poro, son las que alteran el potencial de la membrana estudiada y por ende su permeabilidad. Esta es la característica fundamental que valida el uso de esta metodología para detectar  $\delta$ -endotoxinas con actividad potencial hacia plagas hasta el momento no susceptibles.

Otras características que hacen de este sistema una herramienta útil para los fines antes citados son que: a) es aplicable para cualquier organismo del que pueda hacerse una preparación de membranas donde esté contenido el receptor; b) es un ensayo fácil de hacer; c) toma poco tiempo (cada trazo consume aproximadamente 15 minutos); d) se gastan pocos reactivos (el volumen final de trabajo es de 700  $\mu$ l) y e) es susceptible de automatización.

Podemos citar como una desventaja de esta metodología la interacción observada entre la toxina y el colorante usado en ausencia de las vesículas (artefacto). Este artefacto implica la necesidad de corregir cada trazo. Sería interesante explorar en un futuro la posibilidad de usar un colorante que funcione con base en el mismo principio, pero con el que no se presente ese artefacto.



Como otros sistemas *in vitro* con los que se ha analizado el efecto que las  $\delta$ -endotoxinas producen en la membrana blanco, el presentado aquí sólo es aplicable para proteínas que previamente se han purificado y activado. Lo anterior es también un inconveniente, ya que el procesamiento llevado a cabo por la tripsina (la proteasa que usualmente se emplea para obtener la forma activa), puede ser diferente del producido por las proteasas presentes en el intestino de los insectos.

Otra desventaja es que no se ha encontrado correlación cuantitativa entre la actividad obtenida con este sistema y los resultados del bioensayo. Este es otro aspecto que sería interesante explorar en el futuro.

## REFERENCIAS

**Adang, M.J., Staver, M.J., Rockeleau, T.A., Leighton, J., Barker, R.F. y D.V. Thompson (1985).** Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. Gene **36**:289-300.

**Adang, M.J. (1991).** *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins gene structure, action and utilization. En "Biotechnology for biological control of pests and vectors". K. Maramorosch (editor). CRC Press. U.S.A. p. 3-24.

**Adang, M.J., Brody, M.S., Cardineau, G., Eagan, N., Roush, R.T., Shewmaker, C.K., Janes, A., Oakes, J.V. y K.E. McBride (1993).** The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIA* gene in protoplast and potato plants. Plant. Mol. Biol. **21**: 1131-1145.

**Adang, M.J., Sangadala, S., Lu, Y-J., Garczynski, S.F. y K. Luo (1994<sub>a</sub>).** Molecular features of *Bacillus thuringiensis* CryI toxin receptors. The II<sup>nd</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings **1**: 10-15.

**Adang, M.J., Sangadala, S., Lu, Y., Garczynski, S. y K. Luo (1994<sub>b</sub>).** Molecular features of *Bacillus thuringiensis* CryIA(c)  $\delta$ -endotoxin receptors. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C., 17-21 October. Abstracts, p. 17.

**Angsuthanasombat, C. y S. Panyim (1989).** Biosynthesis of 130-kilodalton mosquito larvicide in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. Appl. Environ. Microbiol. **55** (9):2428-2430.

**Angus, T.A. (1968).** Similarity of effect os valinomycin and *Bacillus thuringiensis* parasporal protein in larvae of *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. **11**: 145-146.

**Aranda, E. (1995).** Comunicación personal.

**Aronson, A.I., Beckman, W. y P. Dunn (1986).** *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. **50**: 1-24.

**Aronson, A.I. y W. Beckman (1987).** Transfer of chromosomal genes and plasmids in *Bacillus thuringiensis* Appl. Environ. Microbiol. **53** (7): 1525-1530.

**Aronson, A.I., Han, E-S., McGaughey, W. y D. Johnson (1991).** The solubility of inclusion protein from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 981-986.

**Aronson, A.I. (1993).** The two faces of *Bacillus thuringiensis*: insecticidal proteins and post-exponential survival. Mol. Microbiol. **7** (4):489-496.

**Aronson, A.I., Wu, D. y C. Zhang (1994).** Mutagenesis of specificity and toxicity regions of a *Bacillus thuringiensis* protoxin gene. En prensa.

**Barton, K.A., Whiteley, H.R. y N-S. Yang (1987).** *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. Plant Physiol. **85**: 1103-1109.

**Bashford, C.L. y J.C. Smith (1979).** The use of optical probes to monitor membrane potential. Methods in Enzymology **LV**: 569-587.

**Bechtel, D.B. y L.A. Bulla (1976).** Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. **127**: 1472-1481.

Belfiore, C.J., Vadlamudi, R.K., Osman, Y.A. y L.A.Jr. Bulla (1994). A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **200** (1): 359-364.

Benos, D.L. (1982). Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. Am. J. Physiol. **242** (Cell Physiol. 11): C131-C145.

Benos, D.J., Saccomani, G y S. Sariban-Sohrably (1987). The epithelial sodium channel. J. Biol. Chem. **262** (22): 10613-10618.

Bezdicsek, D.F., Quinn, M.A. y M. Kahn (1991). Genetically engineering *Bacillus thuringiensis* genes into rhizobia to control nodule-feeding insects. USDA CRIS. Report No. 9131200.

Bishop, D.H.L. (1994). Biopesticides. Curr. Opinion Biotec. **5**: 307-311.

Bosch, D., Schipper, B., Van der Kleij, H., De Maagd, R.A. y W.J. Stiekema (1994). Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with new properties: possibilities for resistance management. Bio/Technology **12**: 915-918.

Bosse, M., Masson, L. y R. Brousseau (1990). Nucleotide sequence of a novel crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kenyae*. Nucleic Acids Res. **18**: 7443-7443.

Bradfish, G.A., Michaels, T. y J.M. Payne (1993). Biologically active *Bacillus thuringiensis* isolates. U.S. Patent No. 5,208,017.

Bravo, A., Jansens, S. y M. Peferoen (1992<sub>a</sub>). Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. J. Invertebr. Pathol. **60**: 237-246.

Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. y M. Peferoen (1992<sub>b</sub>). A immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. J. Invertebr. Pathol. **60**: 247-253.

Bravo, A., Lorence, A. y R. Quintero (1992<sub>c</sub>). Perspectivas en la utilización de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida. Biotecnología **2** (5-6): 139-154.

Brizzard, B.L. y H.R. Whiteley (1988). Nucleotide sequence of an additional crystal protein gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. Nucleic Acids Res. **16**: 2723-2724.

Brown, K.L. y H.R. Whiteley (1992). Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. J. Bacteriol. **174**: 549-557.

Brunke, K.J. y R.L. Meeusen (1991). Insect control with genetically engineered crops. TIBTECH **9**: 197-200.

Butko, P., Cournoyer, M., Pusztai-Carey, M. y W.K. Surewick (1994). Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIC. FEBS Lett. **340**: 89-92.

Calogero, S., Albertini, A.M., Fogher, C., Marzari, R. y G. Galizzi (1989). Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene in *B. subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. **55** (2): 446-453.

Carlton, B.C. y C. Gawron-Burke (1993). Genetic improvement of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide development. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc., U.S.A., p. 43-61.

**Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. y M. Koziel (1991).** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3057-3061.

**Carozzi, N.B., Warren, G.W., Desai, N., Jayne, S.M., Lotstein, R., Rice, D.A., Evola, S. y M.G. Koziel (1992).** Expression of a chimeric CaMV 35S *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein gene in transgenic tobacco. Plant Mol. Biol. **20**: 539-548.

**Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W. y M.G. Koziel (1993).** *Bacillus thuringiensis* strains active against coleopteran insects. U.S. Patent No. 5,204,100.

**Carrol, J. y D.J. Ellar (1993).** An analysis of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins action on insect-midgut-membrane permeability using light-scattering assay. Eur. J. Biochem. **214**: 771-778.

**Carrol, J. y D.J. Ellar (1994).** How have insect midgut brush border membrane vesicles advanced our understanding of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin mode of action?. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings I : 215-220.

**Cerón, J., Cavarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L. y A. Bravo (1994).** PCR Analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. **60**(1): 353-356.

**Chak, K.F. y J.C. Jen (1993).** Complete nucleotide sequence and identification of a putative promoter region for the expression in *Escherichia coli* of the *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD-133. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China **17**: 7-14.

**Chambers, J.A., Jelen, A., Gilbert, M.P., Jany, C.S., Johnson, T.B. y M.C. Gawron-Burke (1991).** Isolation and characterization of a novel insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. J. Bacteriol. **173**: 3966-3976.

**Chen, X.J., Lee, M.K. y D.H. Dean (1993).** Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**: 9041-9045.

**Chestukhina, G.G., Tyurin, S.A., Kostina, L.I., Osterman, A.L., Zalunin I.A., Kodova, O.A. y V.M. Stepanov (1990).** Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins N-terminal domains. J. Protein Chem. **9**: 501-507.

**Chungjatupornchai, W., Höfte, H., Seurinck, J., Angsuthanasombat, C. y M. Vaeck (1988).** Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. Eur. J. Biochem. **173**: 9-16.

**Chungjatupornchai, W. (1990).** Expression of the mosquitocidal-protein genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and the herbicide-resistance gene *bar* in *Synechocystis* PCC6803. Curr. Microbiol. **21**: 283-288.

**Cidaria, D., Cappai, A., Vallesi, A. y G. Pirali (1991).** A novel strain of *Bacillus thuringiensis* (NCIMB 40152) active against coleopteran insects. FEMS Microbiol. Lett. **81**: 129-134.

**Cowles, E.A., Francis, V. y S.S. Gill (1994).** Interaction of the CryIA(c) toxin with *Heliothis virescens* midgut proteins. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings I: 191-193.

- Crawford, D.N. y W.R. Harvey (1988). Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* delta-endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. J. Exp. Biol. **137**: 277-286.
- Cummings, C.E. y D.J. Ellar (1994<sub>a</sub>). Chemical modification of *Bacillus thuringiensis* activated  $\delta$ -endotoxin and its effect on toxicity and binding to *Manduca sexta* midgut membranes: Microbiology **140**: 2737-2747.
- Cummings, C.E., Armstrong, G., Hodgman, T.C. y D.J. Ellar (1994<sub>b</sub>). Structural and functional studies of a synthetic peptide mimicking a proposed membrane inserting region of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. Mol. Membr. Biol. **11** (2): 87-92.
- Cunningham, J.C. (1988). Baculoviruses: their status compared to *Bacillus thuringiensis* as microbial insecticides. Outlook on Agriculture **17**: 10-17.
- Dandekar, A.M., McGranahan, G.H., Vail, P.V., Uratsu, S.L., Leslie, C. y J.S. Tebbets (1994). Low levels of expression of wild type *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki cryIA(c)* sequences in transgenic walnut somatic embryos. Plant Science **96**: 151-162.
- Dankocsik, C., Donovan, W.P. y C.S. Jany (1990). Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. Mol. Microbiol. **4**: 2087-2094.
- Dardenne, F., Seurinck, J., Lambert, B. y M. Peferoen (1990). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a *cryIA(c)* gene variant from *Bacillus thuringiensis*. Nucleic Acids Res. **18**: 5546-5546.
- De Barjac y E. Frachon (1990). Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga **35** (2): 233-240.
- Dean, D.H., Chen, X.J., Lee, M.K., Lu, H., Rajamohan, F., Wu, S-J., Potvin, L. y J.L. Schwartz (1994<sub>a</sub>). Mutation in Cry proteins that affect ion channel function and binding. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings **1**: 232-233.
- Dean, D.H., Rajamohan, F., Wu, S-J., Lu, H., Hussain, S.R. y E. Alcantara (1994<sub>b</sub>). Exploration of receptor-binding of *Bacillus thuringiensis* toxins by site-directed mutagenesis. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C., 17-21 October. Abstracts, p. 22.
- Delannay, X., LaVallee, B.J., Proksch, R.K., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Dodson, R.B., Augustine, J.J., Layton, J.G. y D.A. Fischhoff (1989). Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. Bio/Technology **7**: 1265-1269.
- Delmas, B., Gelgi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjöström, H., Norén, O. y H. Laude (1992). Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. Nature **357**: 417-422.
- Denolf, P., Jansens, S., Van Houdt, S.V., Peferoen, M., Degueele, D. y J. Van Rie (1993<sub>a</sub>). Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. **59**(6): 1821-1827.
- Denolf, P., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. y J. Van Rie (1993<sub>b</sub>). Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). Appl. Environ. Microbiol. **59** (6): 1828-1837.

- Donovan, W.P., Dankocsik, C.C., Gilbert, M.P., Gawron-Burke, M.C., Groat, R.G. y B.C. Carlton (1988<sub>a</sub>).** Amino acid sequence and entomocidal activity on the P<sub>2</sub> crystal protein: an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. J. Biol. Chem. **263**: 561-567.
- Donovan, W.P., Gonzalez, J.M.Jr., Gilbert, M.P. y C. Dankocsik (1988<sub>b</sub>).** Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol. Gen. Genet. **214**: 365-372.
- Donovan, W.P., Dankocsik, C. y M.P. Gilbert (1988<sub>c</sub>).** Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol. **170** (10): 4732-4738.
- Donovan, W.P., Rupar, M.J., Slaney, A.C., Malvar, T., Gawron-Burke, M.C. y T.B. Johnson (1992<sub>a</sub>).** Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3921-3927.
- Donovan, W.P., Rupar, M.J. y A.C. Slaney (1992<sub>b</sub>).** *Bacillus thuringiensis* cryIIIc(b) toxin gene and protein toxic to coleopteran insects. PCT International Patent Application No. WO 92/13954.
- Donovan, W.P., Rupar, M.J., Slaney, A.C. y T.J. Johnson (1993).** *Bacillus thuringiensis* cryIIIc gene encoding toxic to coleopteran insects. U.S. Patent No. 5,187,091.
- Donovan, W.P. (1994).** No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).
- Dow, J.A.T. (1986).** Insect midgut function. Adv. Insect Physiol. **19**: 187-238.
- Dulmage, H.T., Coening, O.P., Rahnborg, C.S. y G.D. Hensen (1971).** A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. J. Invertebr. Pathol. **18**: 240-245.
- Earp, D.J. y D.J. Ellar (1987).** *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* PG14: nucleotide sequence of a gene encoding a 27 kDa crystal protein. Nucleic Acids Res. **15**: 3619-3619.
- Ebersold, H.R., Lüthy, P., Geiser, P. y L. Ettliger (1978).** The action of the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. Experientia **34**: 1672.
- Edwards, D.L., Payne, J. y G.G. Soares (1990).** Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. U.S. Patent No. 4,498,734.
- Ellar, D.J. (1994).** Molecular Genetics of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins and toxin receptors. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings I: 10-15.
- English, L.H. y L.C. Cantley (1986).** Delta endotoxin is a potent inhibitor of the (Na,K)-ATPase. J. Biol. Chem. **261**(3): 1170-1173.
- English, L.H. y T.L. Readdy (1989).** Delta endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*. Insect Biochem. **19** (2): 145-152.
- English, L.H., Readdy, T.L. y A.E. Bastian (1991<sub>a</sub>).** Delta-endotoxin induced leakage of <sup>86</sup>Rb-K<sup>+</sup> and H<sub>2</sub>O from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. Insect. Biochem. **21**: 177-184.
- English, L.H. (1991<sub>b</sub>).** Ion channels properties of delta endotoxins. U.S. Patent No. 5,071,654.

English, L.H. y S.L. Slatin (1992). Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. Insect Biochem. Molec. Biol. **22** (1): 1-7.

Estada, U. y J. Ferré (1994). Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. **60** (10): 3840-3846.

Feitelson, J.S. (1991). No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).

Feitelson, J.S., Payne, J. y L. Kim (1992). *Bacillus thuringiensis*. Insects and beyond. Bio/Technology **10**: 271-275.

Feitelson, J.S. (1993). The *Bacillus thuringiensis* family tree. En "Advanced engineered pesticides".. L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc., U.S.A. p. 63-71.

Ferré, J., Real, M.D., Van Rie, J., Jansens, S. y M. Peferoen (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**: 5119-5123.

Fischhoff, D.A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., McCormick, S.M., Niedermeyer, J.G., Dean, D.A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E.J., Rochester, D.E., Rogers, S.G. y R.T. Fraley (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/Technology **5**: 807-813.

Foncerrada, L., Sick, A.J. y J.M. Payne (1992). Novel coleopteran-active *Bacillus thuringiensis* isolate and a novel gene encoding a coleopteran-active toxin. European Patent Application, No. Publicación 498 537 A2.

Frost y Sullivan (1990). Biopesticides. Frost & Sullivan, U.S.A.

Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Kyojuka, J. y K. Shimamoto (1993). Insect resistant rice generated by introduction of a modified  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology **11**: 1151-1155.

Gaertner, F.H., Quick, T. y M.A. Thompson (1993). CellCap<sup>®</sup>: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc. U.S.A. p. 73-83.

Galán-Wong, L.J. (1993). Historia del descubrimiento de *Bacillus thuringiensis*. En "Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*". Luis Galán-Wong (compilador). UNAM-Iztacala, México, D.F. p. 19-21.

Galjart, N.J., Sivasubramanian, N. y B.A. Federici (1987). Plasmid location, cloning, and sequence analysis of the gene encoding a 27.3-kilodalton cytolytic protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morisoni* (PG-14). Curr. Microbiol. **16**: 171-177.

Garczynski, S.F., Crim, J.W. y M.J. Adang (1991). Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by protein blot analysis. Appl. Environ. Microbiol. **57** (10): 2816-2820.

Gawron-Burke, M.C., Chambers, J.A. y J.M. González (1991). *Bacillus thuringiensis cryIF* and *cryIX* genes and proteins toxic to lepidopteran insects. PCT International Patent Application No. WO 91/16434.

Gazit, E. y Y. Shai (1993). Structural and functional characterization of the  $\alpha 5$  segment of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. Biochemistry **32**: 3429-3436.



- Ge, A.Z., Shivarova, N.I. y D.H. Dean (1989). Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**:4037-4041.
- Geiser, M., Schweitzer, S. y C. Grimm (1986). The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the *kurhd1* gene of subsp. *kurstaki* HD-1. Gene **48**: 109-118.
- Geiser, M., Hinnen, A., Brassel, J. y S. Schweitzer-Gruetmacher (1987). Insecticidal proteinaceous substance. European Patent Application, No. Publicación O 238 441-A1.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. y P.V. Pietrantonio (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. **37**: 615-636.
- Giordana, B., Sacchi, V.F. y G.M. Hanozet (1982). Intestinal amino acid absorption in lepidopteran larvae. Biochim. Biophys. Acta **692**: 81-88.
- Giordana, B., Tasca, M., Villa, M., Chiantore, C., Hanozet, G.M. y P. Parenti (1993). *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*  $\delta$ -endotoxin inhibits the K<sup>+</sup>/amino acid cotransporters of lepidopteran larval midgut. Comp. Biochem. Physiol. **106 C** (2): 403-407.
- Gleave, A.P., Hedges, R.J. y A.H. Broadwell (1992). Identification of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* DSIR517 with significant sequence differences from previously described toxins. J. Gen. Microbiol. **138**: 55-62.
- Gleave, A.P., Williams, R. y R.J. Hedges (1993). Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1683-1687.
- González, J.M., Brown, B.J. y B.C. Carlton (1982). Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for  $\delta$ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**: 6951-6955.
- González-Martínez, M.T., Guerrero, A., Morales, E., De la Torre, L. y A. Darszon (1992). A depolarization can trigger Ca<sup>2+</sup> uptake and the acrosome reaction when preceded by a hyperpolarization in *L. pictus* sea urchin sperm. Develop. Biol. **150**: 193-202.
- Gómez-Poyou, A. y C. Gómez-Lojero (1977). The use of ionophores and channel formers in the study of the function of biological membranes. Curr. Topics Bioener. **6**: 221-256.
- Gould, F. (1991). The evolutionary potential of crop pest. American Scientist **79**: 496-507.
- Gould, F., Martínez-Ramírez, A., Anderson, A., Ferré, J., Silva, F.J. y W.J. Moar (1992). Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 7986-7990.
- Griego, V.M., Moffett, D. y K.D. Spence (1979). Inhibition of active K<sup>+</sup> transport in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut after ingestion of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. J. Insect. Physiol. **25**: 283-288.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y K. Van Frankenhuyzen (1992). Suppression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin activity by low alkaline pH. J. Invertebr. Pathol. **60**: 47-52.

Grochulski, P., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Larsson, L. y M. Cygler (1994). 3-D crystal structure of lepidopteran specific  $\delta$ -endotoxin CryIA(a). The 1<sup>st</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings I: p. 502.

Gupta, B.L., Dow, J.A.T., Hall, T.A. y W.R. Harvey (1985). Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions an electrogenic K<sup>+</sup>-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, *in vitro*. J. Cell. Sci. **74**: 137-152.

Haider, M.Z. y D.J. Ellar (1987). Characterization of the toxicity and cytopathic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. Mol. Microbiol. **1**: 59-66.

Haider, M.Z. y D.J. Ellar (1988). Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis aizawai* IC1 entomocidal crystal protein gene. Nucleic Acids Res. **16**: 10927-10927.

Haider, M.Z. y D.J. Ellar (1989<sub>a</sub>). Functional mapping of an entomocidal  $\delta$ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. J. Mol. Biol. **208**: 183-194.

Haider, M.Z. y D.J. Ellar (1989<sub>b</sub>). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxin: interaction with fosfolipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta **978**: 216-222.

Harvey, W.R. y M.G. Wolfersberger (1979). Mechanism of inhibition of active potassium transport in isolated midgut of *Manduca sexta* by *Bacillus thuringiensis* endotoxin. J. Exp. Biol. **83**: 293-304.

Hayvey, W.R. (1992). Physiology of V-ATPases. J. Exp. Biol. **172**: 1-17.

Hefford, M.A., Brousseau, R., Prefontaine, G., Hanna, Z., Condie, J.A. y P.C.K. Lau (1987). Sequence of a lepidopteran toxingene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* NRD-12. J. Biotechnol. **6**: 307-322.

Hendrickx, K., Van Mellaert, H., Van Rie, J. y A. De Loof (1989). Binding of a *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin to the midgut of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). En "Receptors, membrane transport and signal transduction". A.E. Evangelopoulos (editor). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 344-351.

Hendrickx, K., De Loof, A. y H. Van Mellaert (1990). Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. Comp. Biochem. Physiol. **95 C**: 241-245.

Herrnstadt, C., Gilroy, T.E., Sobieski, D.A., Bennet, B.D. y F.H. Gaertner (1987). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. Gene **57**: 37-46.

Hickle, L.A., Bradfish, G.A. y J.M. Payne (1992). Use of a *Bacillus thuringiensis* microbe for controlling lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. U.S. Patent No. 5,098,705.

Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. 2<sup>nd</sup> edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

Hofmann, C. y P. Lüthy (1986). Binding and activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin to invertebrate cells. Arch. Microbiol. **146**: 7-11.

Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. y H. Van Mellaert (1988<sub>a</sub>). Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insects midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**: 7844-7848.

Hofmann, C., Lüthy, P., Huthner, R. y V. Pliska (1988<sub>b</sub>). Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur. J. Biochem. **172**: 85-91.

Höfte, H., de Greve, H., Seurinck, J., Jansens, J., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. y M. Vaeck (1986). Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715. Eur. J. Biochem. **161**: 273-280.

Höfte, H., Seurinck, J., Houtven, A.V. y M. Vaeck (1987). Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. Nucleic Acids Res. **15**: 7183-7183.

Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven, A., Vanderbruggen, H. y M. Vaeck (1988). Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 2010-2017.

Höfte, H. y H.R. Whiteley (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. **53** (2): 242-255.

Höfte, H., Soetaert, P., Jansens, S. y M. Peferoen (1990). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a new Lepidoptera-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. Nucleic Acids Res. **18**: 5545-5545.

Höfte, H.R., Annys, K., Lambert, B., Jansens, S., Soetaert, P. y M. Peferoen (1992). Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2536-2542.

Honée, G.J.E.M., Van der Salm, T.P.M. y L. Visser (1988). Nucleotide sequence of a crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxin highly active against *Spodoptera* species. Nucleic Acids Res. **16**: 6240-6240.

Honée, G. y B. Visser (1993). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. Entomol. Exp. Appl. **69**: 145-155.

Ihara, H., Kuroda, E., Wadano, A y M. Hirano (1993). Specific toxicity of  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. Biosci. Biotech. Biochem. **57** (2): 200-204.

Iizuka, T., Sasaki, J., Asano, S. y H. Bando (1994). Nucleotide sequence analysis of new *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *japonensis* N141 which is similar with Buibui strain. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C., 17-21 October. Abstracts, p. 22.

Indrasith, L.S. y H. Hori (1992). Isolation and partial characterization of binding proteins for immobilized delta endotoxin from solubilized brush border membrane vesicles of the silkworm, *Bombyx mori*, and the common cutworm, *Spodoptera litura*. Comp. Biochem. Physiol. **102 B**: 605-610.

Jingyuan, D., Ling, Y., Bo, W., Xixia, L., Ziniu, Y. y M.M. Lecadet (1994). *Bacillus thuringiensis* subspecies *huazhongensis*, serotype H-40, isolated from soils in Peoples Republic China. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts II : 38.

Johnson, T.B., Lye, B-H. y R-P. Hannan (1994). Control of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, with Raven™ bioinsecticide. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts II: 62.

Juárez-Pérez, V.M., Jacquemard, P. y R. Frutos (1994). Characterization of the type strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *cameroun* serotype H-32. FEMS Microbiol. Lett. **122**: 43-48.

**Kalman, S.S.** (1993). Cloning a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1131-1137.

**Kamb, A., Iverson, L.E. y M.A. Tanouye** (1987). Molecular characterization of *shaker*, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. Cell **50**: 405-413.

**Knight, P.J.K., Crickmore, N. y D.J. Ellar** (1994<sub>a</sub>). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. Mol. Microbiol. **11** (3): 429-436.

**Knight, P., Nicholson, M., Crickmore, N., Van Rie, J. y D. Ellar** (1994<sub>b</sub>). Purification, cloning and characterization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin receptor. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France. 28 August-2 September. Proceedings **1**: 185-189.

**Knowles, B.H. y D.J. Ellar** (1984). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin: lectin-like binding of toxin to *N*-acetyl-galactosamine residues as an initial step in insecticidal action. En "Bacterial protein toxins". Academic Press, London. p. 201-202.

**Knowles, B.H. y D.J. Ellar** (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta. **924**: 509-518.

**Knowles, B. y J.A.T. Dow** (1993). The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. BioEssays **15** (7): 469-476.

**Knowles, B.H.** (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. Adv. Insect Physiol. **24**: 275-308.

**Kotler, C.N., Bauer, L.S. y R.M. Hollingworth** (1992). Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native  $\delta$ -endotoxins crystals. Biochem. Biophys. Res. Commun. **184**: 692-699.

**Kondo, S., Tamura, N., Kunitat, A., Hattori, M., Akashi, A. y I. Ohmori** (1987). Cloning and nucleotide sequencing of two insecticidal delta-endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 DNA. Agric. Biol. Chem. **51**: 455-463.

**Koni, P.A. y D.J. Ellar** (1993). Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. J. Mol. Biol. **229**: 319-327.

**Koziel, M.G., Carozzi, N.B., Currier, T.C., Warren, G.W. y S.V. Evola** (1993<sub>a</sub>). The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: past, present and future uses. Biotechnol. Gen. Engineer. Rev. **11**: 171-228.

**Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., Mcpherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M. y S.V. Evola** (1993<sub>b</sub>). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology **11**: 194-200.

**Kronstad J.W. y H.R. Whiteley** (1986). Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. Gene **43**: 29-40.

**Lambert, B., Theunis, W., Aguda, R., Van Audenhove, K., Decok, C., Jansens, S., Seurinck, J. y M. Peferoen** (1992<sub>2</sub>). Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel coleopteran-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Gene **110**: 131-132.

- Lambert, B.** y M. Peteroen (1992<sub>b</sub>). Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. BioScience **42** (2): 112-122.
- Lambert, B.** (1993). No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).
- Lambert, B.** (1994). No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 24, release 14.0, October 94).
- Lecadet, M.M.,** Frachon, E., Cosmao-Dumanoir, V. y H. De Barjac (1994). An updated version of the *Bacillus thuringiensis* strains classification according to H-serotypes. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts II : 345
- Lee, C.-S.** y A.I. Aronson (1991). Cloning and analysis of delta-endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* subspecies. No publicado. En Genebank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).
- Lee, M.K.,** Milne, R.E., Ge, A.Z. y D.H. Dean (1992). Location of a *Bombyx mori* receptor binding on a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. J. Biol. Chem. **267** (5): 3115-3121.
- Leemans, J.,** Reynaerts, A., Höfte, H., Peteroen, M., Van Mellaert, N. y H. Joos (1990). Insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their use in transgenic crops. En "New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases". Alan R. Liss, Inc., U.S.A. p. 573-581.
- Lereclus, D.,** Bourgooin, C., Lecadet, M.M., Klier, A. y G. Rapoport (1989). Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. En "Regulation of prokaryotic development". I. Smith, R.A. Slepecky y P. Setlow (editors). American Society for Microbiology. Washington, D.C., U.S.A. p. 255-276.
- Li, J.,** Carroll, J. y D.J. Ellar (1991). Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature **353**: 815-821.
- Li, J.** (1992). Bacterial toxins. Curr. Opin. Struct. Biol. **2**: 545-556.
- Lu, H.,** Rajamohan, F. y D.H. Dean (1994). Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. J. Bacteriol. **176** (17): 5554-5559.
- MacIntosh, S.C.,** Stone, T.B., Scott-Jokerst, R. y R.L. Fuchs (1991). Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **88**: 8930-8933.
- MacIntosh, S.C.,** Lidster, B.D. y C.L. Kirkham (1994). Isolation of brush border membrane vesicles from whole diamondback moth (Lepidoptera: *Plutellidae*) larvae. J. Invertebr. Pathol. **63**(1): 97-98.
- Martens, J.W.M.,** Honée, G., Zuidema, D., Van Lent, J.W.M., Visser, B. y J.M. Vlak (1990). Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. Appl. Environ. Microbiol. **56** (9): 2764-2770.
- Martin, P.A.W.** (1994). An iconoclastic view of *Bacillus thuringiensis* ecology. American Entomologist **40** (2): 85-90.
- Martínez-Ramírez, A.,** González-Nebauer, S., Escriche, B. y M.D. Real (1994). Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* CryIA-type ICPs. Biochem. Biophys. Res. Comm. **120** (2): 782-787.
- Masson, L.,** Marcotte, P., Prefontaine, G. y R. Brousseau (1989). Nucleotide sequence of a gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* coding for an insecticidal protein toxic to *Bombyx mori*. Nucleic Acids Res. **17**: 446-446.

- Mathavan, S.**, Sudha, P.M. y S.M. Pechimuthu (1989). Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* on the midgut cells of *Bombyx mori* larvae: a histopathological and histochemical study. J. Invertebr. Pathol. **53**: 217-227.
- Matten, S.R.**, Milewski, E.A., Schneider, W.R. y B.I. Slutsky (1993). Biological pesticides and the U.S. Environmental Protection Agency. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc., U.S.A. p. 321-335.
- McClintock, J.T.**, Schaffer, C.R. y R.D. Sjoblad (1994). Comparative mammalian toxicity of registered *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C., 17-21 October. Abstracts, p. 50.
- McPherson, S.A.**, Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Marrone, P.G., Lavrik, P.B. y D.A. Fischhoff (1989). Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Bio/Technology **6**: 61-66.
- Merryweather, A.T.**, Weyer, U., Harris, M.P.G., Hirst, M., Booth, T. y R.D. Possee (1990). Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta-endotoxin. J. Gen. Virol. **71**: 1535-1544.
- Mettus, A-M.** y A. Macaluso (1990). Expression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin genes during vegetative growth. Appl. Environ. Microbiol. **56** (4): 1128-1134.
- Miyazono, M.**, Inagaki, S., Yamamoto, M., Ohba, K., Ishiguro, T., Takeda, R. y Y. Hayashi (1994). Enhancement of  $\delta$ -endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Invertebr. Pathol. **63**(1): 111-112.
- Moar, W.**, Pusztai-Carey, M., Van Faassen, H., McCollum, R. y S. Clement (1994). Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIC in *Spodoptera exigua*. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts II : 65.
- Müller-Cohn, J.**, Chaufaux, J., Buisson, C., Gilois, N., Sanchis, V. y D. Lereclus (1994). *Spodoptera littoralis* resistance to the *Bacillus thuringiensis* CryIC toxin and cross-resistance to other toxins. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts II : 66.
- Murphy, R.C.** y E. Stevens (1992). Cloning and expression of the *cryIVD* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and its resulting larvicidal activity. Appl. Environ. Microbiol. **58** (5): 1650-1655.
- Murzin, A.G.** (1994). New protein folds. Curr. Opin. Struct. Biol. **4**: 441-449.
- Nakamura, K.** y T. Imanaka (1989). Expression of the insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* in *B. subtilis* and in the thermophile *B. stearothermophilus* by using the  $\alpha$ -amylase promoter of the thermophile. Appl. Environ. Microbiol. **55** (12): 3208-3213.
- Nambiar, M.A.** y V.N. Iyer (1990). Limiting an insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the pigeon pea (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of an entomocidal gene in its root nodules. Appl. Environ. Microbiol. **56** (9): 2866-2869.
- Narva, K.E.**, Payne, J.M., Schwab, G.E., Hickie, L.A., Galasan, T. y A.J. Sick (1991). Novel *Bacillus thuringiensis* microbes active against nematodes and genes encoding novel nematode-active toxins cloned from *Bacillus thuringiensis* isolates. No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).

**Narva, K.E.** y J. Fu (1994<sub>a</sub>). Novel coleopteran-active toxins from *Bacillus thuringiensis*. No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).

**Narva, K.E.**, Payne, J. y J.S. Feitelson (1994<sub>b</sub>). Novel *Bacillus thuringiensis* toxins active against coleopteran larvae. No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).

**Nishimoto, T.**, Yoshisue, H., Ihara, K., Sakai, H. y T. Komano (1994). Functional analysis of block 5, one of the highly conserved amino acid sequences in the 130-kDa CryIVA protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEBS Lett. **348**:249-254.

**Noguchi, H.** (1993). Development of *Bacillus thuringiensis* in Japan. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc., U.S.A. p. 283-291.

**Obukowicz, M.G.**, Perlak, F.J., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E.J. y L.S. Watrud (1986). Integration of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing strains of *Pseudomonas* using Tn5. Gene **45**:327-331.

**Oddou, P.**, Hartmann, H. y M. Geiser (1991). Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. Eur. J. Biochem. **202**:676-680.

**Oddou, P.**, Hartmann, H., Radecke, F. y M. Geiser (1993). Immunologically unrelated *Heliothis* sp. and *Spodoptera* spp. midgut membrane-proteins bind *Bacillus thuringiensis* CryIA(b)  $\delta$ -endotoxin. Eur. J. Biochem. **212**: 145-150.

**Oeda, K.**, Oshie, K., Shimizu, M., Nakamura, K., Yamamoto, H., Nakayama, I. y H. Ohkawa (1987). Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* strain *aizawai* IPL7 and its high-level expression in *Escherichia coli*. Gene **53**: 113-119.

**Ojcius, D.M.** y J. D-E Young (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif?. TIBS **16**: 225-229.

**Oppert, B.**, Kramer, K.J., Johnson, D.E., MacIntosh, S.C. y W.H. MacGaughey (1994). Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **198** (3): 940-947.

**Pang, Y.**, Frutos, R. y B.A. Federici (1992). Synthesis and toxicity of full-length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cell using a baculovirus vector. J. Gen. Virol. **73**: 89-101.

**Parker, M.W.** y F. Pattus (1993). Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. TIBS **18**: 391-395.

**Payne, J.** (1989). Novel coleopteran-active *Bacillus thuringiensis* isolate. European Patent Application, No. Publicación 0 346 114 A1.

**Payne, J.** y A. Sick (1990). Novel *Bacillus thuringiensis* isolates active against lepidopteran pests, and genes encoding novel lepidopteran-active toxins. European Patent Application, No. Publicación 0 401 979.

**Payne, J.** y A. Sick (1991<sub>a</sub>). Novel *Bacillus thuringiensis* isolate active against lepidopteran pests, and genes encoding novel lepidopteran-active toxins. European Patent Application, No. Publicación 0 405 810 A2.

**Payne, J.** y A. Sick (1991<sub>b</sub>). Novel *Bacillus thuringiensis* isolated denoted B.T. PS81F, active against lepidopteran pests, and a gene encoding a lepidopteran-active toxin. U.S. Patent No. 5,039,523.

- Payne, J.**, Sick, A.J. y M. Thompson (1992<sub>a</sub>). Gene encoding a lepidopteran-active toxin from *Bacillus thuringiensis* isolate denoted B.T. PS81GG active against lepidopteran pests. U.S. Patent No. 5,135,867.
- Payne, J.M.**, Kennedy, M.K., Randall, J.B., Meier, H. y H.J. Uick (1992<sub>b</sub>). Novel *Bacillus thuringiensis* isolates active against hymenopteran pests and gene(s) encoding hymenopteran-active toxins. European Patent Application, No. Publicación O 516 306-A2.
- Payne, J.M.**, Cannon, R.J.C. y A.L. Bagley (1992<sub>c</sub>). Novel *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling acarides. PCT International Patent Application No. WO 92/19106.
- Payne, J.M.**, Cummings, D.A. y R.J.C. Cannon (1993). Novel *Bacillus thuringiensis* isolate denoted B.t. PS158C2, active against lepidopteran insects, and genes encoding lepidopteran-active toxins. PCT International Patent Application No. WO 93/05657.
- Pertak, F.J.**, Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T. y D.A. Fischhoff (1990). Insect resistant cotton plants. Bio/Technology **8**: 939-943.
- Pertak, F.J.**, Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L. y D.A. Fischhoff (1991). Modification of the coding sequences enhances plant expression of insect control protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **68**: 3324-3328.
- Pertak, F.J.**, Stone, T.B., Muskopf, Y.M., Petersen L.J., Parker, G.B., McPherson, S.A., Wyman, J., Love, S., Reed, G., Biever, D. y D.A. Fischhoff (1993). Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. Plant. Mol. Biol. **22**: 313-321.
- Poncet, S.**, Delecluse, A., Anello, G., Klier, A. y G. Rapoport (1994). Transfer and expression of the *cryIVB* and *cryIVD* genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in *B. sphaericus* 2297. FEMS. Microbiol. Lett. **117**: 91-96.
- Porter, A.G.**, Davidson, E.W. y J-W. Liu (1993). Mosquitocidal toxins of Bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. Microbiol. Rev. **57** (4): 838-861.
- Prince, R.C.** (1990). At least one *Bacillus thuringiensis* toxin forms ion-selective pores in membranes. TIBS **15**: 2-3.
- Rajendran, N.**, Sivamani, E. y K. Jayaraman (1994). Expression of the insecticidal crystal protein gene from a Gram-positive *Bacillus thuringiensis* in a Gram-negative *Pseudomonas fluorescens* mediated by protoplast fusion. FEMS Microbiol. Lett. **122**: 103-108.
- Ravoahangimalala, O.**, Charles, J.F. y J. Schoeller-Raccaud (1993). Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: *Culicidae*). Res. Microbiol. **144**: 271-278.
- Rennie, J.** (1992). Living togueter. Scientific American **266**: 104-113.
- Reuveni, M.** y P.E. Dunn (1991). Differential inhibition by *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin of leucine and aspartic acid uptake into BBMV from midgut of *Manduca sexta*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **181**(3): 1089-1093.
- Reynaud, E.**, De la Torre, L., Zapata, O., Liévano, A. y A. Darszon (1993). Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by speract in swollen sea urchin sperm. FEBS Lett. **329** (1-2): 210-214.
- Rupar, M.J.**, Donovan, W.P., Groat, R.G., Slaney, A.C., Mattison, J.W., Johnson, T.B., Charles, J-F., Dumanoir, V.C. y H. De Barjac (1991). Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans Appl. Environ. Microbiol. **57** (11): 3337-3344.



Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Lüthy, P. y M.G. Wolfersberger (1986). *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K<sup>+</sup>-gradient dependent-amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. FEBS Lett. **204**: 213-218.

Sánchez-Quintana, J.F. (1994). Estudio comparativo del modo de acción de diferentes  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en un insecto plaga (*Spodoptera frugiperda* Smith). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Tesis de licenciatura.

Sanchis, V. y D.J. Ellar (1993). Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. FEBS Lett. **316** (3): 264-268.

Sanchis, V., Chaufaux, J. y D. Pavron (1994). *In vivo* toxicity and receptor binding properties of the *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombyx mori*. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts II : 45-46.

Sangadala, S., Walters, F.S., English, L.H. y M.J. Adang (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and <sup>86</sup>Rb-K<sup>+</sup> efflux *in vitro*. J. Biol. Chem. **269** (13): 10088-10092.

Santos, C.D., Ribeiro, A.F. y W.R. Terra (1986). Differential centrifugation, calcium precipitation, and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erihnyis elio* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. Can. J. Zool. **64**: 490-500.

Sato, R., Takeuchi, K., Ogiwara, K., Minami, M., Kaji, Y., Suzuki, N., Hori, H., Asano, S., Ohba, M. y H. Iwahara (1994). Cloning heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui toxic to sacarabeid insects. Curr. Microbiol. **28**: 15-19.

Schnepf, H.E., Wong, H.C. y H.R. Whiteley (1985<sub>a</sub>). The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. **260**: 6264-6272.

Schnepf, H.E. y H.R. Whiteley (1985<sub>b</sub>). Delineation of a toxic-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. J. Biol. Chem. **260**: 6264-6272.

Schnepf, H.E., Tomczak, K., Paz-Ortega, J. y H.R. Whiteley (1990). Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. **265** (34): 20923-20930.

Schwartz, J.L., Garneau, L., Masson, L. y R. Brousseau (1991). Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. Biochim. Biophys. Acta **1065**: 250-260.

Schwartz, J.L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. y E. Brousseau (1993<sub>a</sub>). Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. J. Membrane Biol. **132**: 53-62.

Schwartz, J.L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. y R. Laprade (1993<sub>b</sub>). Comparative study of ionic channels formed by CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c) and CryIC *Bacillus thuringiensis* toxins in planar lipid bilayers. Biophys. J. **64** (2): A94.

Schwartz, J.L., Potvin, L., Laflamme, J., Mazza, A., Lasson, L., Brousseau, R. y R. Laprade (1994<sub>a</sub>). Effect of single site mutations on ionic channels formed by CryIA(c) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin. Biophys. J. **66** (2) : A221.

**Schwartz, J.L.** (1994<sub>b</sub>). Ion channel activity and cellular signalling pathways related to the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C., 17-21 October. Abstracts. p. 65.

**Sekar, V.,** Thompson, D.V., Maroney, M.J., Bookland, R.G. y M.J. Adang (1987). Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**: 7036-7040.

**Sen, K.,** Honda, G., Koyama, N., Nishida, M., Neki, A., Sakai, H., Himeno, M. y T. Komano (1988). Cloning and nucleotide sequences of the two 130 kDa insecticidal protein genes of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Agric. Biol. Chem. **52**: 873-878.

**Shai, Y.** y E. Gazit (1994). A combined synthetic and spectroscopic approach to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings 1: 211-213.

**Shevelev, A.B.,** Svarinsky, M.A., Karasin, A.I., Kogan, Y.N., Chestukhina, G.G. y V.M. Stapanov (1993). Primary structure of the *cryX*-the novel delta-endotoxin-related gene from *Bacillus thuringiensis* ssp. *galienae*. FEBS Lett. **336**: 79-82.

**Shin, B.-S.,** Choi, S.-K., Koo, B.-T., Park, S.-H., Lee, S.-T. y J.-I. Kim (1994<sub>a</sub>). No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).

**Shin, B.,** Koo, B., Choi, S., Park, S., Lee, S. y J. Kim (1994<sub>b</sub>). Nucleotide sequence of novel *cryV*-type gene of *Bacillus thuringiensis*. No publicado. En GeneBank 85 (GeneWorks 2.4, release 14.0, October 94).

**Shin, B.S.,** Choi, S.K., Koo, B.T., Park, S.H., Lee, S.T. y J.I. Kim (1994<sub>c</sub>). Nucleotide sequence of a novel *cryV*-type gene isolated from *Bacillus thuringiensis* BP465. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C., 17-21 October. Abstracts, p. 63.

**Shivakumar, A.G.,** Gundling, G.J., Benson, T.A., Casuto, D., Miller, M.F. y B.B. Spear (1986). Vegetative expression of the  $\delta$ -endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *B. subtilis*. J. Bacteriol. **166** (1): 194-204.

**Shivakumar, A.G.,** Vanags, R.I., Wilcox, D.R., Katz, L., Vary, P.S. y J. Lawrence-Fox (1989). Gene dosage effect on the expression of the delta-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in *B. subtilis* and *B. megaterium*. Gene **79**: 21-31.

**Sick, A.,** Gaertner, F. y A. Wong (1990). Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis*. Nucleic Acids Res. **18**: 1305-1305.

**Sick, A.J.** (1991). *Bacillus thuringiensis* genes encoding dipteran-active toxins. European Patent Application, No. Publicación 0457 498-A2.

**Sick, A.J.** y T.E. Gilroy (1991). *Bacillus thuringiensis* gene encoding a coleopteran-active toxin. U.S. Patent No. 4,996,115 y 5,133,962.

**Simizu, M.,** Oshie, K., Nakamura, K., Takada, Y y K. Oeda (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the 135-kDa insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* IPL-7. Agric. Biol. Chem. **52**: 1565-1573.

**Slatin, S.L., Abrams, C.K y L. English (1991).** Delta-endotoxins form cation selective channels in planar lipid bilayers. Biochem. Biophys. Res. Comm. **169**: 765-772.

**Slatin, S.L., Walters, F.S., Von Tersch, M.A. y L. English (1994).** Delta-endotoxin ion channel diversity and modulation by brush border membrane. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Proceedings **1** : 209-210.

**Smith, R.A. y G.A. Couche (1991).** The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 311-315.

**Smith, G.P. y D.J. Ellar (1994).** Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC  $\delta$ -endotoxin affects insecticidal specificity. Biochem. J. **302**: 611-616.

**Smulevitch, S.V., Osterman, A.L., Shevelev, A.B., Kaluger, S.V., Karasin, A.I., Kadyrov, R.M., Zagnitko, O.P., Chestukhina, G.G. y V.M. Stepanov (1991).** Nucleotide sequence of a novel delta-endotoxin gene *cryIG* of *Bacillus thuringiensis* ssp. *galerae*. FEBS Lett. **293**: 25-28.

**Soltes-Rak, E., Kushner, D.J., Williams, D.D. y J.R. Coleman (1993).** Effect of promoter modification on mosquitocidal *cryIVB* gene expression in *Synechococcus* sp. Strain PC6 7942. Appl. Environ. Microbiol. **59** (8): 2404-2410.

**Stock, C.A., McLoughlin, T.J., Klein, J.A. y M.J. Adang (1990).** Expression of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. Can. J. Microbiol. **36**: 879-884.

**Sutton, D.W., Hovstad, P.K. y D.J. Kemp (1992).** Synthetic *cryIIIA* gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression in plants. Transgenic Res. **1**: 228-236.

**Tabashnik, B.E. (1994).** Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis* Annu. Rev. Entomol. **39**: 47-79.

**Taylor, R., Tippett, J., Gibb, G., Pells, S., Pike, D., Jordan, L y S. Ely (1992).** Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol. **6**: 1211-1217.

**Takesue, S., Tokota, K., Miyajima, S., Taguchi, R., Ikezawa, H. y Y. Takesue (1992).** Partial release of aminopeptidase N from larval midgut cell membranes of the silkworm, *Bombyx mori*, by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Comp. Biochem. Physiol. **102 B** (1): 7-11.

**Thanabalu, T., Hindley, J., Brenner, S., Oei, C. y C. Berry (1992).** Expression of the mosquitocidal toxins of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* by recombinant *Caulobacter crescentus*, a vehicle for biological control of aquatic insect larvae. Appl. Environ. Microbiol. **58** (3): 905-910.

**Thompson, M. y F.H. Gaertner (1991).** Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent Application, No. Publicación 0 461 799 A3.

**Thorne, L., Garduño, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., Walfield, A.M. y T.J. Pollock (1986).** Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. "*kurstaki*" and "*israelensis*". J. Bacteriol. **166**: 801-811.

**Timmins, J.G. (1993).** The development of genetically engineered plants. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc., U.S.A., p.293-318.

**Tungpradubkul, S., Settasatien, C. y S. Panyim (1988).** The complete nucleotide sequence of a 130 kDa mosquito-larvicidal delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Nucleic Acids Res. **16**: 1637-1638.

- Turner, J.T., Lampel, J.S., Stearman, R.S., Sundin, G.W., Gunyuzlu, P. y J.J. Anderson (1991).** Stability of the  $\delta$ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. Appl. Environ. Microbiol. **57** (12): 3522-3528.
- Udayasuriyan, V. (1994).** Cloning of a new *cryIA(a)* gene from *Bacillus thuringiensis* strain FU-2-7 and analysis of chimaeric *CryIA(a)* proteins for toxicity. Biosci. Biotech. Biochem. **58**: 830-835.
- Uemura, T., Ihara, H., Wadano A y M. Himeno (1992).** Fluorometric assay of potential change of *Bombyx mori* midgut brush border membrane induced by  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Biosci. Biotech. Biochem. **56** (12): 1976-1979.
- Vachon, V., Paradis M.-J., Marsolais, M., Schwartz, J.-L. y R. Laprade (1994).** pH regulation in the SF-9 insect cell line: ionic permeabilities induced by the *Bacillus thuringiensis* toxin. The 11rd International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts II : 55-56.
- Vadlamudi, R.K., Ji, T.H. y L.A.Jr. Bulla (1993).** A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. J. Biol. Chem. **268** (17): 12334-12340.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beukeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. y J. Leemans (1987).** Transgenic plants protected from insect attack. Nature **328**: 33-37.
- Van der Salm, T., Bosch, D., Honée, G., Feng, L., Munsterman, E., Bakker, P., Stiekema, W.J. y B. Visser (1994).** Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* and *cryIC* genes: a resistance management strategy. Plant Mol. Biol. **26**: 51-59.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. y H. Van Mellaert (1989).** Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. Eur. J. Biochem. **166**: 239-247.
- Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degueele, D. y H. Van Mellaert (1990).** Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. **56** (5): 1378-1385.
- Van Rie, J. (1991).** Insect control with transgenic plants: resistance proof ?. TIBTECH **9**: 81-83.
- Van Rie, J. (1992).** The role of membrane binding of *Bacillus thuringiensis berliner* insecticidal crystal proteins in specificity and resistance. Tesis doctoral. Universiteit Gent, Bélgica. pp. 1-29.
- Van Rie, J. (1994).** Comunicacion personal.
- Van Wordragen, M.F., Honeé G. y H.J. Dohs (1993).** Insect-resistant chrysanthemum calluses by introduction of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. Transgenic Res. **2** (3): 170-180.
- Visser, B., Munsterman, E., Stoker, A. y W.G. Dirkse (1990).** A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. J. Bacteriol. **172**: 6783-6788.
- Von Tersch, M.A., Robbins, H.L., Jany, C.S. y T.B. Johnson (1991).** Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenya*: gene cloning and characterization and comparison with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* *CryIA(c)* toxins. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 349-358.
- Von Tersch, M.A., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. y L.H. English (1994).** Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin *CryIIIb2* and *CryIIIb2* domain I peptide. Appl. Environ. Microbiol. **60** (10): 3711-3717.

- Waalwijk, C., Dullemans, A.M., Van Workum, M.E.S. y B. Visser (1985).** Molecular cloning and the nucleotide sequence of the Mr 28000 crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Nucleic Acids Res. **13:** 8207-8217.
- Waalwijk, C., Dullemans, A. y C. Moat (1991).** Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol. Lett. **77:** 257-264.
- Wabiko, H., Held, G.A. y A.Jr. Bulla (1985).** Only a part of the protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 is necessary for insecticidal activity. Appl. Environ. Microbiol. **49:** 706-708.
- Wabiko, H., Raymond, K.C. y L.A. Bulla (1986).** *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA **5:** 305-314.
- Waggoner, A.S. (1979).** Dye indicators of membrane potential. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **8:** 47-68.
- Walters, F.S., Slatin, S.L., Kulesza, C.A. y L.H. English (1993).** Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. Biochem. Biophys. Res. Comm. **196 (2):** 921-926.
- Ward, E.S. y D.J. Ellar (1984).** Cloning and expression in *Escherichia coli* of the insecticidal  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. FEBS Lett. **175:** 377-382.
- Ward, E.S. y D.J. Ellar (1987).** Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene encoding 130 kDa delta-endotoxin. Nucleic Acids Res. **15:** 7195-7195.
- Whalon, M.E. y W.H. McGaughey (1993).** Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc. U.S.A. p. 215-232.
- Widner, W.R. y H.R. Whiteley (1989).** Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. **171:** 965-974.
- Widner, W.R. y H.R. Whiteley (1990).** Location of the dipteran specificity region in a lepidopteran-dipteran crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. **172 (6):** 2826-2832.
- Wigley, P.J., Broadwell, A-H. y C.N. Chilcott (1994).** Activity of the insecticidal crystal protein, CryIG, from *Bacillus thuringiensis* DSIR 517. The 11<sup>th</sup> International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, 28 August-2 September. Abstracts **II:** 379.
- Williams, S., Friedrich, L., Dincher, S., Carozzi, N., Kessmann, H., Ward, E. y J. Ryals (1992).** Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expression in transgenic plants. Bio/Technology **10:** 540-543.
- Wolfsberger, M.G. (1984).** Enzymology of plasma membranes of insect intestinal cells. Amer. Zool. **24:** 187-197.
- Wolfsberger, M., Lüthy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B. y G.M. Hanozet (1987).** 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. **86 A:** 301-308.
- Wolfsberger, M.G. (1990<sub>a</sub>).** The toxicity of two *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. Experientia **46:** 475-477.
- Wolfsberger, M.G. (1990<sub>b</sub>).** Specificity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to lepidopteran larvae: recent insights from studies utilizing midgut brush border membrane vesicles. En "Invertebrate pathology and microbial control: 1990". D.E. Pinnock (editor). Society for Invertebrate Pathology, Adelaide. p. 278-282.

**Woltersberger, M.** (1991). Inhibition of potassium-gradient-driven phenylalanine uptake in larval *Lymantria dispar* midgut by two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins correlates with the activity of the toxins as gypsy moth larvicides. J. Exp. Biol. **161**: 519-525.

**Woltersberger, M.** (1992). V-ATPase-energized epithelia and biological insect control. J. Exp. Biol. **172**: 377-386.

**Wu, D., Cao, X.L., Bai, Y.Y. y A.I. Aronson** (1991). Sequence of an operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. **81**: 31-36.

**Wu, D. y A.I. Aronson** (1992). Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin involved in toxicity and specificity. J. Biol. Chem. **267** (4): 2311-2317.

**Wu, S.J. y D.H. Dean** (1994). Functional characterization of the loop regions of receptor binding domain on *Bacillus thuringiensis* CryIIIA  $\delta$ -endotoxin. The Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, R.O.C., 17-21 October. Abstracts, p. 21.

**Yamamoto, T., Watkinson, I.A., Kim, L., Sage, M.V., Strafton, R., Akande, N., Li, Y., Ma, D.-P.P. y B.A. Roe** (1988). Nucleotide sequence of the gene coding for a 130-kDa mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Gene **66**: 107-120.

**Yamamoto, T. y G.K. Powell** (1993). *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: recent advances in understanding its insecticidal activity. En "Advanced engineered pesticides". L. Kim (editor). Marcel Dekker, Inc. U.S.A. p. 3-42.

**Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellicchio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T. y K.V. Holmes** (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. Nature **357**: 420-422.

**Yool, A.J. y T.L. Schwartz** (1991). Alteration of ionic selectivity of a K<sup>+</sup>-channel by mutation of the H<sub>5</sub> region. Nature **349**: 700-704.

**Yoshisue, H., Yoshida, K., Sen, K., Sakai, H. y T. Komano** (1992). Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 20-kDa protein on production of the *Bti* 130-kDa crystal protein in *Escherichia coli*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **56**: 1429-1433.

**Yunovitz, H. y A. Yawetz** (1988). Interaction between the  $\delta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* spp. *entomocidus* and liposomes. FEBS Lett. **230**: 105-108.

**Zaritsky, A., Zalkinder, V., Ben-Dov, E. y Z. Barak** (1990). Bioencapsulation and delivery to mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis* H14 toxicity by *Tetrahymena pyriformis*. J. Invertebr. Pathol. **58**: 455-457.