



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

00551 20



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Análisis molecular del sinergismo entre las δ -endotoxinas
Cry11A y Cyt1A de *Bacillus thuringiensis* subespecie
israelensis”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A
QFB. CLAUDIA DOLORES PÉREZ ORTEGA

DOCTORA DE TESIS
DRA. ALEJANDRA BRAVO DE LA PARRA

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

DEDICATORIAS

Los sueños están hechos de esperanzas, las cuales, con tesón y coraje, pueden convertirse en hermosas realidades.

Dedico este trabajo a mis padres, Juan y Lolita, no sólo por el hecho de darme la vida, sino porque gracias a sus enseñanzas, cuidados y apoyo, he logrado más de lo que llegué a imaginar. Gracias por las idas y venidas a Cuernavaca, por los sacrificados fines de semana, por el cansancio, las llamadas constantes, los desvelos y todos y cada uno de los momentos que han compartido a mi lado. Son los mejores padres que alguien puede tener y me siento inmensamente bendecida de que estén a mi lado. Los quiero mucho y les prometo seguir adelante siempre, con la frente muy en alto y siguiendo su ejemplo de lucha incansable y dedicación extrema. Todo lo que soy es gracias a ustedes, y por ustedes es que mi vida es tan feliz. ¡Gracias por ser todo lo que una hija puede desear!. Los amo profundamente.

A mis hermanos, Vero y Juan, que siempre han estado a mi lado, ya sea cerca o lejos, pero siempre presentes en mi corazón. Todos los recuerdos que guardo de ustedes son maravillosos... cada juego... cada anécdota... cada tarde compartida, todo se reduce a un amor intenso que los convierte en los mejores amigos que puedo tener. Gracias por ser un ejemplo perfecto de fortaleza y decisión, porque cada uno a su modo, me ha enseñado a ser valiente, alegre y optimista... a no dejarme vencer y aprender a afrontar los problemas de la vida con el mejor humor. Tal vez sea la hermana pequeña de la familia, pero ustedes me han hecho sentir grande. Los quiero muchísimo.

A mis tias-mamás Esperanza, Angelina e Irma, a mis primos Hugo y Paqui, a mis abuelitos Rafael y Liborio, y en general, a todos mis tíos y primos, quienes me apoyaron en este viaje que emprendí al salir de casa. Cada uno a su modo, me brindó el apoyo necesario para no sentirme sola. Les agradezco de corazón su cariño y palabras de aliento.

Derramé muchas lágrimas a lo largo de estos dos años, pero Dios, ahora comprendo que tanto sacrificio valió la pena. Gracias por brindarme diariamente tus bendiciones y por ser el apoyo más fuerte que soporta mi alma. Cuando descubrí la maravillosa familia que me diste, lo afortunada que era al estar sana y la suerte que tuve de encontrar las amistades que tengo, supe que existías, pero hoy, me doy cuenta que no solo estás a mi alrededor, sino dentro de mí, cuidándome todo el tiempo. Cada día que pasa, creo y confío más en ti.

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue posible gracias a la colaboración y la asesoría de muchas personas, sin las cuales, no se hubiera podido realizar.

Primero que nada, mil gracias a la *Dra. Alejandra Bravo*, por brindarme un lugar en su laboratorio y apoyarme tanto en el aspecto académico, como en el personal. Gracias por ser parte de mi formación profesional y enseñarme a ser crítica y emprendedora.

Al *Dr. Mario Soberón*, por el apoyo constante, las ideas atinadas y los comentarios pertinentes para el enriquecimiento del trabajo.

A los doctores *Humberto Lanz y Mario Zurita*, miembros del comité tutorial, porque gracias a sus comentarios y observaciones, logramos redondear muchas ideas del proyecto.

Al *Dr. Jorge Luis Folch*, que de manera entusiasta y activa participó en parte importante de la realización experimental de este trabajo. Jordi, mil gracias por tus consejos, comprensión y paciencia.

A los doctores *Mario Henry Rodríguez, Gloria Saab, Martha Vázquez y Jorge Luis Folch*, miembros del jurado de examen, por sus aportaciones para enriquecer el documento de tesis.

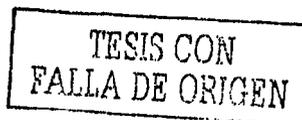
A los doctores *Juan Miranda, Isabel Gómez, Raúl Miranda, Carlos Muños, Carolina Raussell y Jiang Guang Sun*, porque cada uno me brindó un poco de su experiencia y me ayudó a superar obstáculos a lo largo del trabajo experimental. Gracias especiales a Carol, porque no solo es una excelente profesional, sino una incomparable persona. ¡Gracias por ser mi amiga!

Al *Biol. Jorge Sánchez*, por su paciencia y amabilidad, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y estar siempre dispuesto a ayudarme a resolver cualquier problema.

A la *M. en C. Ma. Luisa Tabche*, por su ayuda en todo lo relacionado a biología molecular y por ser una persona maravillosa siempre dispuesta a ayudar. Mary, tu sensibilidad y sinceridad son cualidades inigualables. Me siento muy orgullosa de contar contigo en todo momento y bajo cualquier circunstancia. Tu amistad es un regalo extraordinario y estoy feliz de tenerla. Gracias por la confianza que has depositado en mí, por ser mi confidente, por consolarme y animarme hasta en los peores momentos. ¡Eres un verdadero sol!. Te quiero mucho.

A la *Biol. Lizbeth Cabrera*, por su impresionante apoyo técnico, pues sin su ayuda en el cuidado de los insectos, nada sería posible en el laboratorio. Querida Liz, cuando uno sale de casa y se encuentra por primera vez sola, el sentimiento de incertidumbre que experimentas es horrible, pero cuando encuentras a una persona como tú, la vida de pronto

C



vuelve a ser color de rosa. Jamás olvidaré lo amable que fuiste al abrirme las puertas de tu casa y tampoco el cariño desinteresado y sincero que recibí por parte tuya y de tu familia. Con nada puedo pagarte todo lo que me has ayudado en este tiempo, tu paciencia, apoyo, consejos, palabras de aliento, sonrisas y momentos agradables. ¡Gracias por dejarme entrar en tu corazón y ser como mi segunda mamá!. Que Dios te bendiga hoy y siempre.

A **Claudia Morera** y **Oswaldo López**, porque cada uno en su momento, me brindó ayuda en el aspecto técnico. **Clau**, eres una chica extraordinaria y estoy feliz de contar con tu amistad.

A mis compañeros de laboratorio **Lupe, Juan, Omar, Idalia, Iván, Luisa, Giovanni** y **Fidel**. Todos son personas extraordinarias y me siento muy afortunada de contar con ustedes. **Lupe**, tus consejos, experiencia y amor por el trabajo son cualidades que admiro mucho de ti. Gracias por compartir conmigo un poco de tus conocimientos. **Juanito**, ¿qué te puedo decir?, eres un chico brillante en toda la extensión de la palabra. Sé bien que llegarás muy lejos, porque tienes determinación e inteligencia para lograrlo. ¡Gracias por ser mi amigo!. **Luisa**, aunque tengo poco tiempo de conocerte, eso no me impide admirarte como persona y como estudiante. Eres una chica extraordinaria y espero aprender mucho más de ti. **Iván**, gracias por ser tan amable siempre y ayudarme cuando se me cierra el mundo. ¡Eres increíble!.

A **Mayra Cabrera, Itzel Benítez** y **Georgina Hernández**, que aunque ya no están en el laboratorio, fueron soporte importante tanto en el aspecto técnico como en el personal. Chicas, sé bien que estén donde estén, siempre serán unas triunfadoras, porque son excelentes. Las quiero.

A **Sergio Blancas** y **Alejandro Uribe**, por su impresionante apoyo a nivel técnico. ¡No sé que haríamos sin ustedes en el laboratorio!. Gracias por ser siempre tan amables.

A **Graciela Domínguez**, que aunque no lo sabe, es maga y siempre nos arregla el mundo en cuestiones administrativas. Chelita, eres una persona increíble. Gracias por ser siempre paciente y dulce conmigo. ¡Eres divina!.

A **Jenny, Karina, Susana, Ángeles, Nuria** y **Adriana**, mis compañeras de generación, con quienes inicié esta aventura y compartí momentos de tensión, tristeza y alegría.

A la **Unidad de síntesis del IBT** por la realización de los oligos para este trabajo.

Al departamento de docencia, comandando por el **Ing. Julil, Gloria** y **Maribel**, por todo su apoyo y guía en las cuestiones administrativas y de trámites.

A **CONACyT** y **DGEP-UNAM**, por la ayuda económica otorgada durante la realización de este trabajo.

①

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra.

E

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

	No. de página
Índice general	1
Índice de figuras	5
Índice de tablas	8
Abreviaturas.....	10
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN.....	13
2.1 Antecedentes.....	13
2.2 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	15
2.3 Clasificación de las δ -endotoxinas de Bt	17
2.4 Proteínas Cry	19
2.4.1 Estructura de las toxinas Cry	19
2.4.2 Mecanismo general de acción de las toxinas Cry.....	20
2.4.2.1 Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry.....	21
2.4.2.2 Unión de las toxinas Cry al receptor	21
2.4.2.3 Inserción en membrana y formación de poro de las toxinas Cry.....	23
2.4.2.4 Citólisis.....	24
2.5 Proteínas Cyt	25
2.5.1 Estructura de Cyt1A	25
2.5.2 Inhibición de toxicidad inducida por lípidos.....	27
2.5.3 Canales selectivos a cationes, segmentos de toxina y modelo de formación de poro	27
2.5.4 Cyt como detergente.....	29
2.6 Genes <i>cry</i>	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.7 Subespecies de Bt con actividad mosquitocida	31
2.8 <i>Bacillus thuringiensis</i> subespecie <i>israelensis</i>	31
2.9 Sinergismo entre toxinas Cry y Cyt de Bti	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo general.	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAL Y MÉTODOS	37
4.1 Cepas	37
4.2 Aminoácidos.....	37
4.3 Selección de antibiótico.....	37
4.4 Purificación y procesamiento de proteínas Cry	38
4.5 Purificación de vesículas de membrana de microvellosidad apical (VMMAs).....	39
4.6 Determinación de actividad de aminopeptidasa	40
4.7 Determinación de concentración de proteína total	40
4.8 Bioensayos con larvas de <i>Aedes aegypti</i>	40
4.9 Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	41
4.10 Biotinilación de proteínas.....	42
4.11 Ensayo de unión con VMMAs en suspensión	42
4.12 Ensayo de unión a ligando (ligand blot).....	43
4.13 Ensayos de formación de poro	43
4.14 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	47
4.15 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	47
4.16 Recuperación de DNA a partir de fragmentos de gel de agarosa	47
4.17 Purificación de DNA plasmídico.....	47
4.18 Digestión con enzimas de restricción	47
4.19 Ligación de fragmentos de DNA <i>in vitro</i>	48

4.20 Geles de agarosa	48
4.21 Diseño de oligonucleótidos	48
4.22 Amplificación de DNA.....	49
4.23 Sistema de dos híbridos en levadura	49
4.24 Transformación de levadura	53
4.25 Extracción de DNA plasmídico a partir de levadura.....	54
4.26 Prueba cualitativa de expresión de β -galactosidasa en levadura (ensayo de filtro).....	54
5. RESULTADOS	56
5.1 Bioensayos y pruebas de sinergismo entre Cry11A y Cyt1A	56
5.2 Ensayos de unión y formación de poro de Cry11A y Cyt1A usando VMMA de <i>A. aegypti</i>	64
5.2.1 Producción de δ -endotoxinas que serán ingeridas por el insecto blanco	64
5.2.2 Solubilización de protoxina.....	65
5.2.3 Activación proteolítica	65
5.2.4 Unión a toxina a la microvellosidad apical del intestino medio del insecto blanco	67
5.2.5 Ensayos de formación de poro	76
5.3 Ensayos para determinar la posible interacción proteína/proteína entre Cry11A y Cyt1A	79
5.3.1 Interacción entre toxinas Cry11A y Cyt1A por ensayo tipo ligand blot.....	79
5.3.2 Interacción de proteínas Cry11A y Cyt1A por sistema de dos híbridos	80
5.3.3 Interacción proteína-proteína por detección de toxinas marcadas con FITC (microscopía de fluorescencia) en intestino de <i>A. aegypti</i>	84
6. DISCUSIÓN.....	86

7. CONCLUSIONES.....	95
8. PERSPECTIVAS	97
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
10. ANEXO	106
10.1 Medios de cultivo.....	106
10.1.1 Medio LB (Luria-Bertani)	106
10.1.2 Medio mínimo SP.....	106
10.1.3 Medio YPDA.....	107
10.1.4 Medio mínimo SD.....	108
10.2 Bases del análisis Probit.....	109

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE FIGURAS

	No. de página.
Figura 1. <i>Aedes aegypti</i>	13
Figura 2. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	16
Figura 3. Árbol filogenético de las toxinas Cry	18
Figura 4. Estructura de las toxinas Cry	20
Figura 5. Mecanismo general de acción de las toxinas Cry	21
Figura 6. Modelos de inserción de las toxinas Cry	24
Figura 7. Estructura de la toxina Cyt2Aa1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> subesp. <i>kyushuensis</i>	26
Figura 8. Modelos de acción hipotéticos de la toxina Cyt1A.....	30
Figura 9. Esquema de los ensayos de fluorescencia para determinar el potencial de membrana en las VMMA de <i>A. aegypti</i>	44
Figura 10. Gráfica de potencial de K ⁺ contra % ΔF (unidades arbitrarias de fluorescencia) para valinomicina.	46
Figura 11. Representación esquemática del sistema de dos híbridos en levadura.....	50
Figura 12. Plásmidos usados en el ensayo de dos híbridos	51
Figura 13. Representación esquemática de las diferentes construcciones de Cyt1A	53
Figura 14. Análisis Probit de la respuesta de la toxina Cyt1A contra larvas del 4º estadio de <i>A. aegypti</i>	57
Figura 15. Análisis Probit de la respuesta de la toxina Cry11A contra larvas del 4º estadio de <i>A. aegypti</i>	59
Figura 16. Análisis Probit de la respuesta de Bti contra larvas del 4º estadio de <i>A. aegypti</i>	60

Figura 17. Curva de dosis respuesta de Cry11A y Cyt1A en combinación contra larvas de <i>A. aegypti</i>	61
Figura 18. Curva logarítmica dosis respuesta de la combinación de Cry11A + Cyt1A vs. larvas de <i>A. aegypti</i>	62
Figura 19. Análisis Probit comparativo de las curvas de toxicidad de Cry11A, Cyt1A, Bti y Cry11A+Cyt1A contra larvas del 4º estadio de <i>A. aegypti</i>	63
Figura 20. Patrones de solubilización y activación de las proteínas Cry11A y Cyt1A en SDS-PAGE al 12%.....	66
Figura 21. Gel de SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie que muestra el patrón de proteínas de VMMA's de <i>A. aegypti</i>	68
Figura 22. Competencia homóloga. Unión de Cry11A biotinilada a VMMA's de <i>A. aegypti</i> en presencia y ausencia toxina de Cry11A fría.....	69
Figura 23. Afinidad de Cry11A biotinilada en presencia de competidor (Cry11A fría).....	70
Figura 24. Competencia heteróloga. Unión de Cry11A biotinilada a VMMA's <i>A. aegypti</i> en presencia y ausencia de competidor.....	70
Figura 25. Afinidad de Cry11A biotinilada en presencia de competidor (Cyt1A fría).....	71
Figura 26. Competencia homóloga. Unión de Cyt1A biotinilada a VMMA's de <i>A. aegypti</i> en presencia y ausencia de competidor.....	72
Figura 27. Afinidad de Cyt1A biotinilada a VMMA's de <i>A. aegypti</i> en presencia Cyt1A fría como competidor.....	73
Figura 28. Competencia heteróloga. Unión de Cyt1A biotinilada a VMMA's de <i>A. aegypti</i> en presencia y ausencia de competidor.....	73
Figura 29. Afinidad de Cyt1A biotinilada a VMMA's de <i>A. aegypti</i> en presencia Cry11A fría como competidor.....	74
Figura 30. Ensayo de unión secuencial. Unión de Cry11A biotinilada a VMMA's de <i>A. aegypti</i> preincubadas con 10 nM de Cyt1A	

fría.....	75
Figura 31. Ensayo de unión secuencial. Unión de Cyt1A biotinilada a VMMA de <i>A. aegypti</i> preincubadas con 10 nM de Cry11A fría.....	75
Figura 32. Ligand blot de Cry11A biotinilada a VMMA de <i>A. aegypti</i>	76
Figura 33a. Permeabilidad a K ⁺ a través de VMMA de <i>A. aegypti</i> para las toxinas Cry11A y Cyt1A.....	78
Figura 33b. Permeabilidad a K ⁺ a través de VMMA de <i>A. aegypti</i> para las toxinas Cry11A y Cyt1A en combinación	78
Figura 34. Ensayo tipo ligand blot. Interacción de 10 nM de Cry11A biotinilada con ella misma y otras toxinas Cry.....	79
Figura 35. Ensayo tipo ligand blot. Interacción de 10 nM de Cyt1A biotinilada con ella misma y otras toxinasCry.....	80
Figura 36. Selección en placa (His ^r) de interactuantes positivas.....	82
Figura 37. Interactuantes positivas por ensayo de β-galactosidasa.....	83
Figura 38. Intestino control	84
Figura 39. Intestino con Cry11A ^{FITC}	84
Figura 40. Intestino con Cry11A ^{FITC} + Cyt1A	85
Figura 41. Relación teórica entre la dosis de un agente tóxico y la Mortalidad causada en una población de insectos.....	110
Figura 42. Dispersión de la desviación estándar dentro de una Distribución normal, y las áreas que cubren cada una de ellas en la Curva	111
Figura 43. Comparación gráfica entre los datos originales y transformados de una relación Dosis-mortalidad, y la línea recta resultante	112
Figura 44. Representación gráfica de los límites fiduciales de la línea de regresión dosis-mortalidad.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

	No. de página.
Tabla 1. Concentraciones de antibiótico usado en medios de cultivo	38
Tabla 2. Análisis de datos de permeabilidad a K^+ por acción de valinomicina en VMMA de <i>A. aegypti</i>	45
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos usados para amplificar fragmentos de Cyt1A	48
Tabla 4. Toxicidad de Cyt1A contra larvas de <i>A. aegypti</i>	57
Tabla 5. Toxicidad de Cry11A contra larvas de <i>A. aegypti</i>	58
Tabla 6. Toxicidad de Bti contra larvas de <i>A. aegypti</i>	59
Tabla 7. Toxicidad de las combinaciones de Cry y Cyt contra larvas de <i>A. aegypti</i>	61
Tabla 8. Valores de LC_{50} obtenidos para Cry, Cyt y Bti	63
Tabla 9. Condiciones de solubilización para los cristales de Cry11A y Cyt1A.....	65
Tabla 10. Condiciones de procesamiento proteolítico para Cry11A y Cyt1A.....	66

Tabla 11. Datos de área de las bandas en competencia homóloga entre Cry11A biotinilada y Cry11A fría.....	69
Tabla 12. Datos de área de las bandas en competencia heteróloga entre Cry11A biotinilada y Cyt1A fría.....	71
Tabla 13. Datos de área de las bandas en competencia homóloga entre Cyt1A biotinilada y Cyt1A fría	72
Tabla 14. Datos de área de las bandas en competencia heteróloga entre Cyt1A biotinilada y Cry11A fría.....	74
Tabla 15. Construcciones realizadas en pYESTrp2 de los diferentes fragmentos de Cyt1A.....	81

ABREVIATURAS

<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
AMP	Ampicilina
BSA	Albúmina sérica bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
Dis-C ₃ -(5)	3,3'-dipropiltiodiocarbocianina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	N,N,N',N'-ácido tetra acético etilenglicol-bis-(β-aminoetil éter)
E _{k+}	Potencial de equilibrio de potasio
ERM	Eritromicina
FITC	Fluoresceína isotiocianato
g	gramos
hr.	Hora
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etano sulfónico
ℓ	litro
LC ₅₀	Dosis letal media
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MeGluCl	Cloruro de metilglucamina
min.	Minuto
ON	Over night (toda la noche)
PEG	Polietilenglicol
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fenil metanosulfonil fluoruro.
Probit	Unidades de probabilidad
PVDF	Membrana de polivinilideno difluoruro
SAPO	Estreptavidina acoplada a peroxidasa
SC	Medio mínimo para levadura
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes
SP	Medio mínimo para esporulación de Bt
STET	Buffer sacarosa – Tris – EDTA – tritón x100
TA	Temperatura ambiente
TAE	Buffer Tris – Ácido bórico – EDTA 0.2
TE	Buffer Tris 10mM pH 8.0 – EDTA 1 mM
TTN	Buffer Tris – triton x100 - NaCl 300
VMMA _s	Vesículas de membrana de microvellosidad apical
YPDA	Medio rico para levadura
ZEO	Zeocina

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta y ubicua. Durante su ciclo de vida cuenta con dos fases principales: la de crecimiento vegetativo, en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min, y la fase de esporulación, la cual es un estadio de diferenciación de bacteria a espora que se dispara cuando Bt se encuentra en limitación de nutrientes y en la cual es capaz de producir inclusiones cristalinas con actividad insecticida clasificadas en dos grandes grupos: proteínas Cry y proteínas Cyt.

De entre todas las subespecies de Bt, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), es una de las más importantes, por su amplio uso en el control de insectos del orden Diptera, especialmente mosquitos como *Aedes aegypti*, vector de la enfermedad llamada Dengue. Las δ -endotoxinas que produce Bti en mayor proporción son: Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A. Estas toxinas, individualmente, tienen la capacidad de inducir muerte en larvas de *A. aegypti*, pero su efecto tóxico no es tan eficaz como cuando se utiliza el cuerpo paraesporal completo. Por ello es que se ha propuesto que existe un efecto sinérgico entre las diferentes toxinas que produce Bti, el cual, a la fecha, solo ha sido documentado a través de bioensayos, de ahí el interés del estudio de las bases moleculares que podrían estar involucradas en dicho sinergismo.

En el presente trabajo, determinamos la LC_{50} para las toxinas Cry11A y Cyt1A. Demostramos que a pesar de que Cyt1A aplicada individualmente no es tan activa como Cry11A, en combinación, su efectividad aumenta contra larvas del 4º estadio de *A. aegypti*. También demostramos que ambas toxinas tienen la capacidad de unirse a vesículas de membrana de la microvellosidad apical (VMMAs) del intestino medio de larvas del 4º estadio de *A. aegypti*, pero con la diferencia de que la unión de Cry11A es específica (unión a proteínas de 65 y 62 kDa), mientras que la unión de Cyt1A es totalmente inespecífica. Sin embargo, cuando las VMMAs son preincubadas con toxina Cyt1A, la unión de Cry11A se incrementa notablemente, lo que indica que Cyt1A es capaz de favorecer la unión de

Cry11A en VMMA. Por otro lado, también observamos que ambas toxinas son capaces de inducir la formación de poros iónicos en VMMA de *A. aegypti* a través de mediciones de cambios en potencial de K^+ en membrana, pero no llegamos a establecer una cooperatividad en dicho efecto cuando ambas toxinas se usan en combinación.

Por ensayos de unión en suspensión se observó una mejora en la unión de Cry11A a VMMA preincubadas con Cyt1A. Por ensayos de tipo ligand blot, comprobamos que ambas toxinas son capaces de reconocerse en su forma desnaturalizada. Usando la técnica de sistema de dos híbridos en levadura, demostramos que Cry11A es capaz de interactuar con Cyt1A, incluso, cuando sólo se ocupan pequeños fragmentos de la toxina Cyt. Por microscopía de fluorescencia, comprobamos que la toxina Cyt1A en contacto con el intestino de *A. aegypti*, es capaz de favorecer la unión en membrana de Cry11A marcada con FITC. Todo lo anterior indica que Cry11A y Cyt1A, tienen la capacidad de interactuar una con otra, y que Cyt1A favorece la unión de Cry11A. Este es un primer paso para un análisis detallado del proceso sinérgico ejercido por las toxinas Cry11A y Cyt1A.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes.

Los insectos del orden Díptera, como mosquitos, son vectores de muchas enfermedades infecciosas de amplia distribución mundial, entre ellas malaria, dengue y filariasis. El dengue constituye un problema de salud pública, debido a que es endémica en más de 100 países tropicales y el número de individuos infectados se ha incrementado durante los últimos años (Ghiteko *et al.*, 2000; Rutstein, 2000). El dengue es transmitido mediante la picadura del mosquito *Aedes aegypti* (figura 1, panel a), un antropofílico estricto que se ha adaptado a vivir en áreas urbanas, por lo que se le cataloga como un mosquito doméstico. Las hembras mantienen el ciclo infectante y sus hábitos de alimentación son diurnos. *A. aegypti* necesita de temperaturas templadas y de aguas estancadas para la oviposición y eclosión de los huevecillos, así como para el desarrollo de las larvas. Los nichos característicos de este insecto en etapa larvaria (figura 1, panel b) son: recipientes varios, latas, cestos, macetas, llantas desechadas, etc. (Kumate *et al.*, 1998).

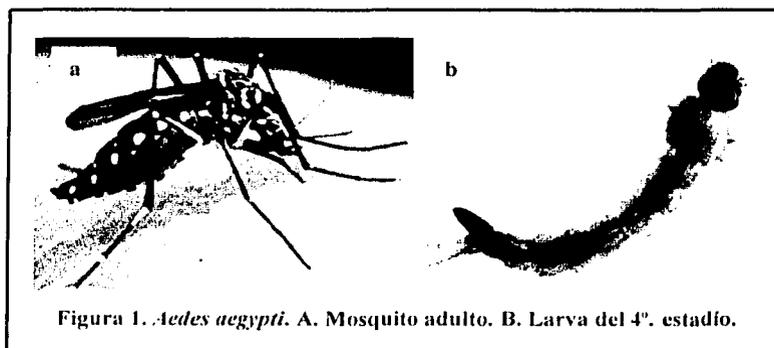


Figura 1. *Aedes aegypti*. A. Mosquito adulto. B. Larva del 4º. estadio.

El mosquito adquiere el virus del dengue cuando se alimenta de una persona infectada y transmite la enfermedad a otros individuos durante la succión de sangre por el resto de su vida (Briceño *et al.*, 1996). El ciclo de infección que sigue el virus del Dengue una vez que ha sido adquirido por el mosquito hembra de *A. aegypti* es el siguiente: el virus

infecta las células epiteliales del intestino medio del mosquito, se disemina a través de la lámina basal hacia la circulación y termina por infectar las glándulas salivales. El virus establece una infección persistente y se replica en grandes cantidades en estas células. Posteriormente las glándulas lo secretan a la saliva. Tras picar al hospedero, la hembra del mosquito regurgita su saliva llena de virus hacia la sangre de su víctima. El virus circula en forma libre por el plasma y entra en contacto con células susceptibles, como las células endoteliales de los capilares, macrófagos, monocitos y demás células del sistema retículo endotelial. El virus del dengue se replica en células de la médula ósea, hígado, tejido linfóide, bazo y piel (Navarro y Gómez, 1995). Las manifestaciones clínicas asociadas con la infección por el virus del dengue más comunes son: cefalea, dolor retroorbital, mialgias, artralgias y exantema. (Bricceño *et al.*, 1996; Navarro y Gómez, 1995; World Health Organization Technical Report, 271, 1986).

El dengue es producido por cuatro serotipos de virus de la familia *Flaviviridae*. Desde el punto de vista epidemiológico, el dengue comprende cuatro variantes: enfermedad febril no específica, fiebre de dengue clásico (DF), fiebre de dengue hemorrágico (DHF), síndrome de choque por dengue (DSS) y otros síndromes severos de dengue (encefalopatía asociada a dengue, cardiomiopatía y hematuria macro y microscópica). No obstante, las formas clínicas más comúnmente observadas en América Latina y que están perfectamente bien definidas son la DF y la DHF, en presencia o ausencia de DSS (Isturiz *et al.*, 2000). La fiebre de dengue hemorrágico (DHF), puede ser fatal y es hoy en día una causa de mortalidad en niños. En 1998, hubo más de 600,000 casos de dengue en América Central y en Sudamérica, de los cuales 11,000 casos fueron DHF. Esto es el doble de casos registrados en la misma región en 1995 (Martínez, 1995; Rico-Hesse *et al.*, 1997). En 1962, como parte del programa de erradicación de la fiebre amarilla, la Secretaría de Salud Pública en México reportó la eliminación del mosquito *A. aegypti*. Sin embargo, a partir de 1978 el dengue clásico reapareció en el país cuando se introdujo el serotipo 1 a través de la frontera sur. Al año siguiente se diseminó rápidamente por los estados de Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán. En 1980 se presentó una de las mayores epidemias registradas hasta el momento con 51,406 casos. En 1982 se detectó la transmisión de los serotipos 1 y 4 en los estados de Oaxaca, Tamaulipas, Sinaloa, Guerrero y Puebla. Entre 1994 y 1998 se registraron 155,011 casos de DF con una media anual de 31,000 casos

(Dirección General de Epidemiología, México, 1997; Norma Oficial Mexicana de Emergencia, 1999).

Desgraciadamente, a la fecha no existen vacunas ni medicamentos que puedan prevenir o curar la enfermedad, por lo que el mejor método para controlar el dengue es combatir al mosquito vector *A. aegypti* (Baird, 2000). El control de estos vectores se hace principalmente con insecticidas químicos, pero su uso ha comenzado a decaer debido a los altos costos que involucran, su escasa biodegradabilidad, el desarrollo de resistencia que varias poblaciones blanco han registrado contra ellos y los riesgos visibles hacia el medio ambiente y la salud humana que producen (Federici, 1995). Por ejemplo, la utilización mundial de DDT tuvo éxito en controlar mosquitos solo durante 8 años, después de esto, los mosquitos desarrollaron resistencia a este insecticida (Baird, 2000). Debido a lo anterior se ha desarrollado un interés creciente en la investigación sobre nuevos agentes para el control de vectores, siendo el uso de bacterias entomopatogénicas, la alternativa viable para llevar a cabo dicho control. Entre estas bacterias la más importante es *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti). (Lacey y Lacey, 1990).

2.2 Generalidades de *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Bacillus thuringiensis (Bt) (figura 2) es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta y ubicua, pues ha sido aislada de diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, entre muchos otros (Schnepf *et al.*, 1998). Durante su ciclo de vida cuenta con dos fases principales: la de *crecimiento vegetativo*, en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min, y la fase de *esporulación*, que es un programa de diferenciación de bacteria a espora que consta de siete fases y que se dispara cuando Bt se encuentra en limitación de nutrientes. La *fase I* (7 horas) es aquella donde se induce la formación del filamento axial de Bt. En la *fase II* (de 7 a 8 horas) se forma el septo espora de división asimétrica que involucra mesosomas. En la *fase III* (de 8 a 9 horas) inicia la síntesis del cristal insecticida, se dan cambios a nivel de membrana y citoplasma y se forma la espora. En las *fases IV a VI* (9 a 12 horas) se forma el exosporio, la pared celular primordial, la corteza y las capas de protección de la espora. Por último, en la *fase VII*

(evento posterior a las 12 horas) se da la maduración de la espora y la síntesis de enzimas líticas que liberan a los cristales insecticidas (Bechtel *et al.*, 1976).

Como mencionamos antes, durante las fases III a VI del ciclo de esporulación, Bt es capaz de producir uno o más cristales paraesporales de carácter proteínico ó δ -endotoxinas que se pueden clasificar en dos grandes grupos: **Cry** y **Cyt** (Bechtel *et al.*, 1976). Las proteínas Cry (70 ó 130 kDa) han sido definidas como cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún insecto y que pueda ser comprobable por bioensayos. Por su parte, las proteínas que se definen como Cyt (30 kDa), son todas aquellas inclusiones paraesporales de Bt que muestran actividad hemolítica y tienen similitud con la secuencia de las toxinas Cyt (Crickmore *et al.*, 1998). A la fecha se han clonado y secuenciado más de 160 genes *cry* y 16 genes *cyt*. Los órdenes de insectos contra los que muestran actividad tóxica son: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera (Beegle, *et al.*, 1992), Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga (Feitelson, 1993), así como nemátodos y protozoarios (Feitelson *et al.*, 1992).

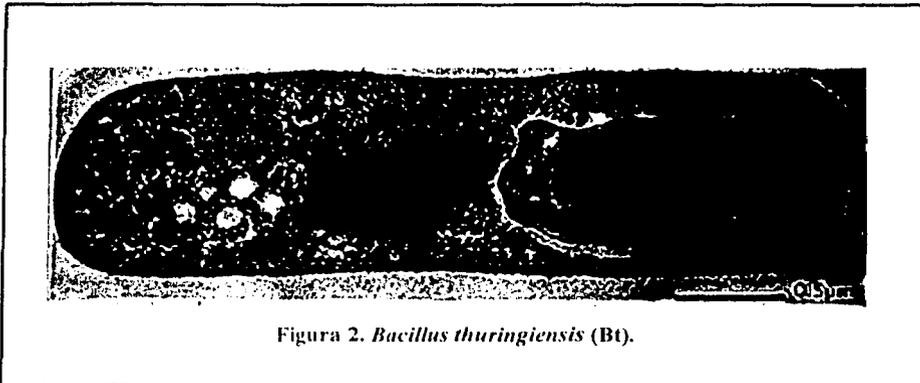


Figura 2. *Bacillus thuringiensis* (Bt).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3 Clasificación de las δ -endotoxinas de Bt.

En 1989, Höfte y Whiteley propusieron una nomenclatura para las δ -endotoxinas Cry basada en la especificidad de la actividad insecticida. Sin embargo, esta primera clasificación pronto resultó inadecuada, pues se empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes pero con especificidad diferente, ó toxinas Cry con actividad dual hacia dos distintos órdenes de insectos, lo que creó una gran confusión en la nomenclatura. Fue por ello que se estipuló una nueva forma de clasificación, que fuera más sistemática y basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria (Crickmore *et al.*, 1998). Esta nomenclatura estipuló el cambio de números romanos por arábigos, la agrupación de las toxinas en grupos y subgrupos y el establecimiento de los límites de identidad que marcarían las diferencias entre categorías. De esta manera quedó establecido que el número arábigo que lleva el nombre de la toxina, se designa con la primera fila que corresponde hasta el 45% de identidad en secuencia primaria entre toxinas Cry; la segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78%; la tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95%; y la última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad (figura 3).

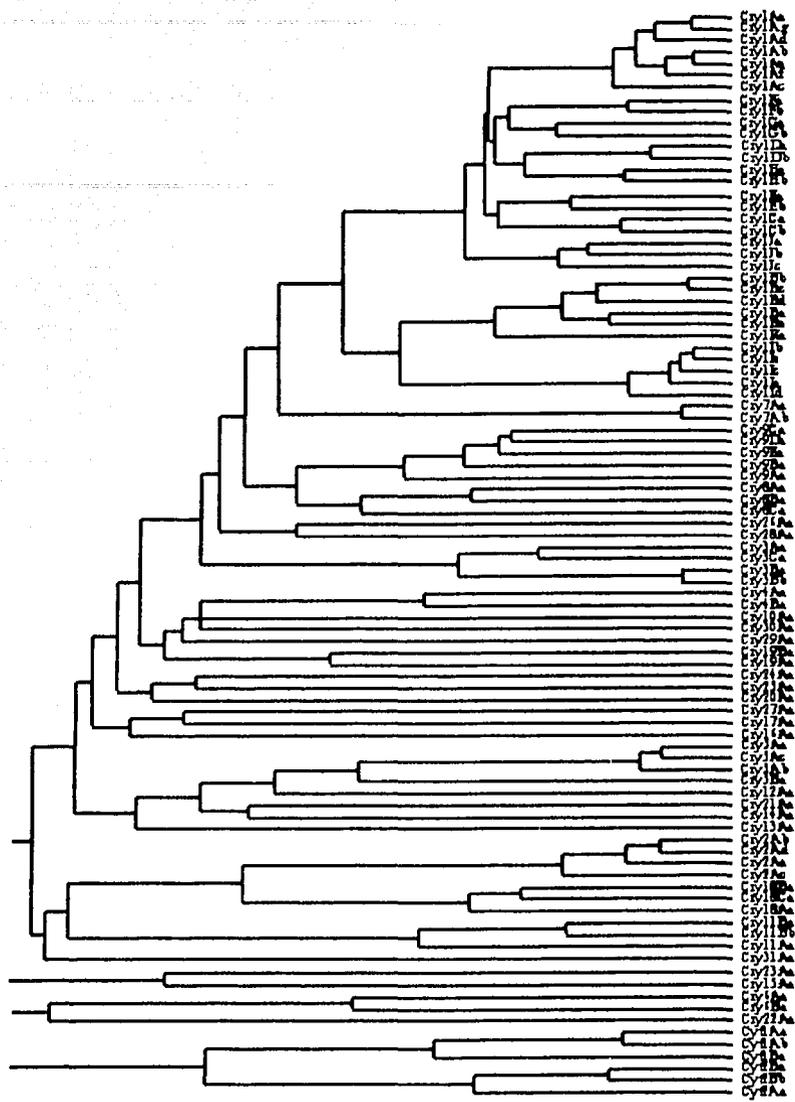


Figura 3. Árbol filogenético de las toxinas Cry. Tomado de Crickmore *et al.*, 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.4 Proteínas Cry.

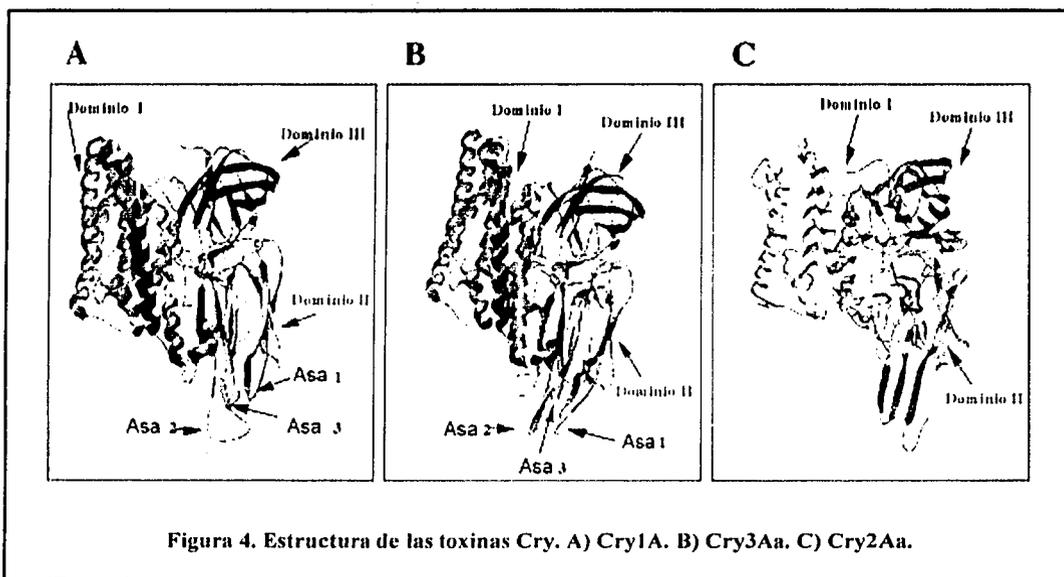
La sintomatología que presentan las larvas de insectos susceptibles por efecto de los cristales y esporas de Bt son: cese de ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Aronson *et al.*, 1986). La larva inerte presenta un color negro característico de la enfermedad. Por estudios histopatológicos se ha demostrado que las células columnares del intestino medio son las estructuras afectadas inicialmente, y en particular la microvellosidad apical, que se destruye en su totalidad (Ebersold *et al.*, 1978; Percy *et al.*, 1983).

Las proteínas Cry son sintetizadas como protoxinas inactivas, las cuales, después de ser ingeridas por el insecto blanco, son solubilizadas en su intestino medio y activadas por proteasas digestivas. Las toxinas activadas se unen a receptores específicos de la membrana de la microvellosidad apical de las células del intestino (Bravo *et al.*, 1992), creando poros transmembranales que causan el rompimiento de la célula por un proceso de lisis osmótica (Knowles y Ellar, 1987).

2.4.1 Estructura de las toxinas Cry.

A la fecha se ha elucidado la estructura cristalográfica de cuatro toxinas Cry: Cry3A (Li *et al.*, 1991) y Cry3Bb1 (Galitsky *et al.*, 2001) con especificidad hacia coleópteros, Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995) con especificidad hacia lepidópteros y Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001) activa contra dípteros (figura 4). Estas estructuras difieren en algunas regiones a detalle, pero muestran un plegamiento común consistente de tres dominios globulares constituidos cada uno por cerca de 200 aminoácidos. El dominio I es un racimo de siete α -hélices antiparalelas y anfipáticas, donde seis de ellas rodean a la α -hélice 5. Este dominio es el responsable de la inserción en la membrana y la formación del poro iónico (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995). El dominio II es un prisma de tres hojas β -plegadas antiparalelas, que está involucrado en unión a receptor y especificidad hacia el insecto blanco (Ge *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1990; Smith y Ellar, 1994; Smedley y Ellar, 1996; Morse *et al.*, 2001). Por su parte, el dominio III consiste de dos láminas β antiparalelas formando un β -sandwich. Este dominio también participa en la determinación de la especificidad (Lee *et al.*, 1995; de Maagd *et al.*, 1996; Burton *et al.*, 1999) y posiblemente

en la regulación de actividad de canales iónicos (Chen *et al.*, 1993; Wolfersberger *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1997). A la fecha, no se han resuelto las estructuras de las toxinas Cry producidas por Bti, sin embargo, ya se han logrado purificar y obtener cristales de la toxina Cry4B quimiotripsinada (Boonserm *et al.*, 2003). Los alineamientos de secuencia de aminoácidos entre diferentes toxinas Cry, ha comprobado que Cry4B tiene los cinco bloques conservados (Höfte y Whiteley, 1989; Hodgman y Ellar, 1990) que forman el núcleo estructural de las toxinas Cry (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995), y datos preliminares sugieren que su estructura tendría un plegamiento similar y por lo tanto un mecanismo de acción semejante. (Boonserm *et al.*, 2003)



2.4.2 Mecanismo general de acción de las toxinas Cry.

El mecanismo de acción por el cual actúan las δ -endotoxinas Cry está dividido en varios pasos: solubilización del cristal, procesamiento de las protoxinas, unión al receptor, inserción en la membrana, formación de poro y citólisis (figura 5).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

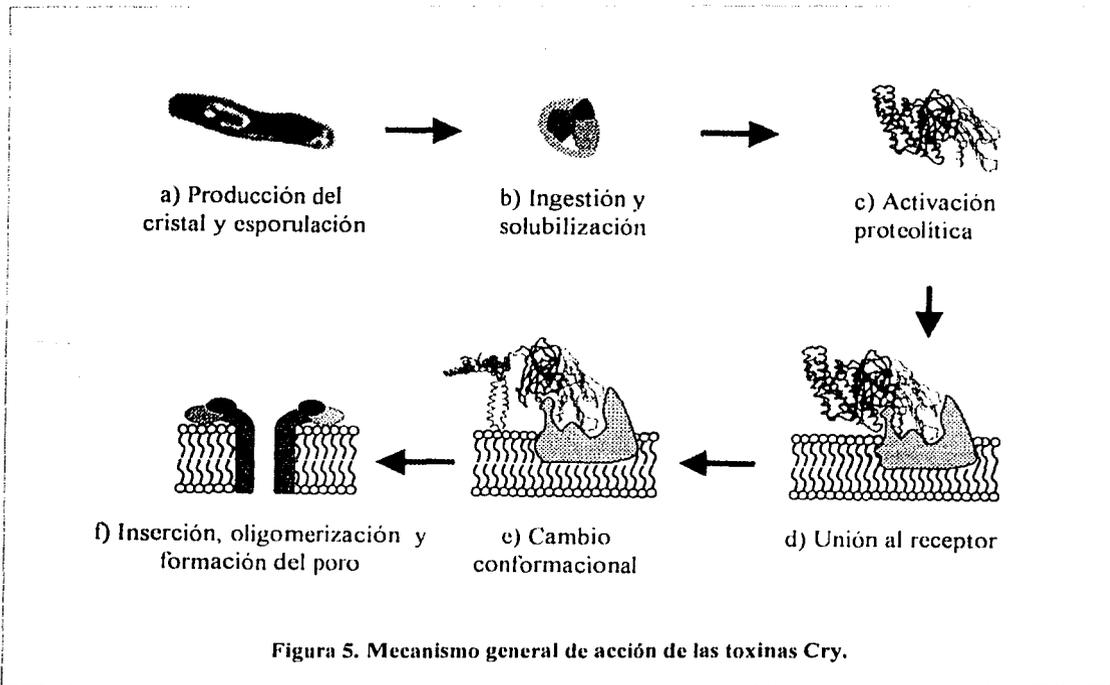


Figura 5. Mecanismo general de acción de las toxinas Cry.

2.4.2.1 Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry

Los cristales producidos por *Bt* se solubilizan a pH alcalino liberando a la protoxina en un medio reductor (Gringorten *et al.*, 1992). Las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas, deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos. El procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros 28 residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado (Bravo *et al.*, 2002) y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, obteniéndose un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que es la toxina activa. La posición del sitio de corte en el extremo C-terminal no es constante en todas las toxinas Cry sino que se localiza en la región entre los residuos 609 y 630 (Wabiko *et al.*, 1986; Martens *et al.*, 1995; Strizhov *et al.*, 1996).

2.4.2.2 Unión de las toxinas Cry al receptor

Las toxinas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad apical de las células columnares del intestino medio de larvas de insectos susceptibles (Hofmann

et al., 1988; Bravo *et al.*, 1992). Dicha unión es determinante para la toxicidad, y gracias a estudios con larvas de lepidópteros y toxinas de tipo Cry1 (Pietrantonio *et al.*, 1996), y a estudios con Cry3A y el coleóptero *Tenebrio molitor* (Belfiore *et al.*, 1994), se ha mostrado que la cinética de unión de las toxinas Cry a vesículas de membrana en la microvellosidad apical (VMMA) de los insectos susceptibles es bifásica, compuesto de un paso reversible y otro irreversible (Van Rie *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*, 2000). Las regiones de la toxina que participan en la interacción con el receptor se localizan en los dominios II y III. Estas regiones han sido identificadas por medio de análisis de mutantes sitio-dirigidas (Lee *et al.*, 1996), y en el dominio II son: el asa de la α -hélice 8 de dominio I que une con dominio II y las asas 1 (entre $\beta 2$ y $\beta 3$), 2 (entre $\beta 6$ y $\beta 7$) y 3 ($\beta 10$ y $\beta 11$). Se ha visto que algunas mutaciones afectan la etapa inicial de la interacción con el receptor (unión reversible) produciendo proteínas con menor afinidad y con menor toxicidad, como las realizadas en el asa 1 de la toxina Cry3A (Wu *et al.*, 1996) o en el asa 2 de la toxina Cry1Ac (Dean *et al.*, 1996). Otras mutaciones causan cambios en la segunda etapa de la interacción con el receptor (unión irreversible) conduciendo también a una baja toxicidad, como las realizadas en el asa 1 de Cry1Ac (Smedley y Ellar, 1996). La mutagénesis del dominio II también ha generado toxinas con mejor capacidad de unión y que por consiguiente resultaron ser más tóxicas, como en el caso de la Cry1Ab N372A-A282G-L283S (en los loops 1 y 2 de dominio II), que presenta una afinidad 18 veces mayor y 36 veces mayor toxicidad que la forma silvestre (Rahamojan *et al.*, 1996). Por su parte, el dominio III también participa en la determinación de la especificidad (Caramori *et al.*, 1991). La construcción de proteínas quiméricas entre Cry1C y Cry1Ea mostró que el dominio III de la primera era determinante para la especificidad hacia *Spodoptera exigua* y *Mamestra brassicae* (de Maagd *et al.*, 1996). Inclusive, la quimera entre las proteínas Cry1Ab y Cry1C resultó en una proteína 10 veces más tóxica hacia *S. exigua* que la Cry1C (de Maagd *et al.*, 1996).

La mayoría de las toxinas Cry1A se unen con alta afinidad a glicoproteínas de dos tipos: uno perteneciente a la familia de las aminopeptidasas de tipo N unida a membrana mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol GPI (Garczynski y Adang, 1995) con peso molecular cercano a 120 kDa, y la otra es un miembro de la familia de las caderinas (*cadherine-like*) con un peso de 210 kDa (Vladamudi *et al.*, 1995).

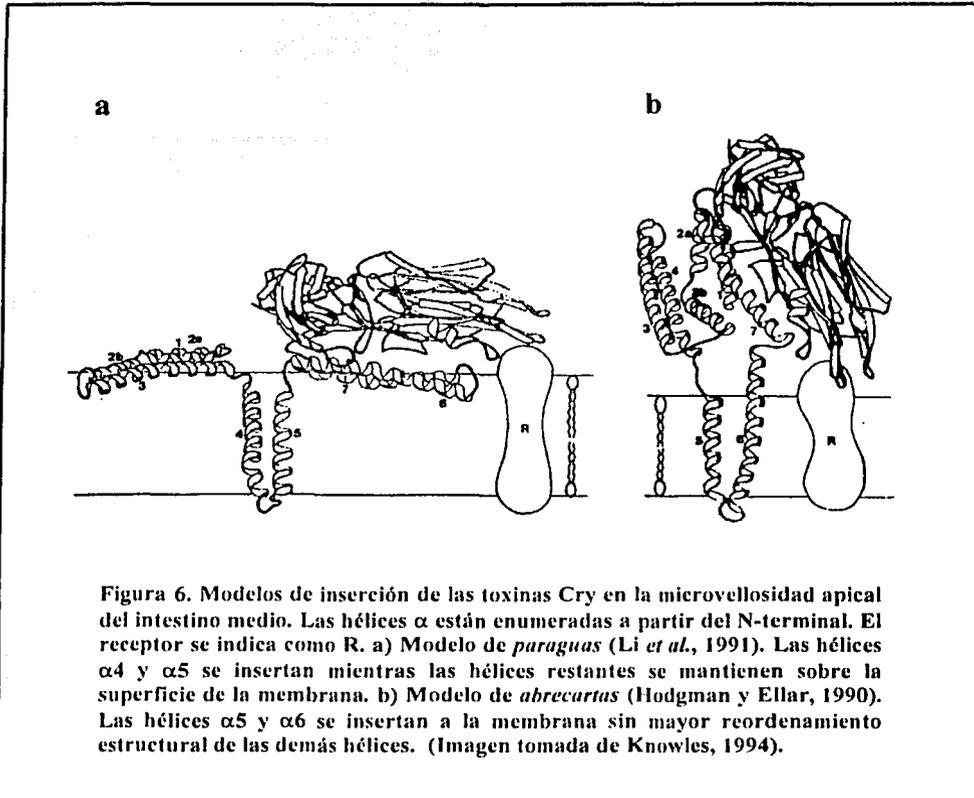
2.4.2.3 Inserción en membrana y formación de poro

La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que éstas se insertan en la membrana para luego causar la destrucción del tejido intestinal de las larvas de insectos susceptibles (Van Rie *et al.*, 1989; Jenkins *et al.*, 2000). Se ha demostrado que a dosis de micromolar las toxinas Cry son capaces de interactuar con membranas lipídicas artificiales en ausencia de receptor e insertarse en las mismas, formando canales permeables principalmente a cationes (English *et al.*, 1991), pero también a aniones y solutos neutros (Yunovitz y Yawetz, 1988; Schwartz *et al.*, 1993; Lorence *et al.*, 1995), aunque a concentraciones fisiológicamente relevantes (pM-nM), las proteínas Cry no se insertan de manera espontánea en membranas artificiales (Knowles, 1994; Lorence *et al.*, 1995).

Con base en el conocimiento que se tiene acerca de la inserción de otras toxinas bacterianas formadoras de poro, se han propuesto dos modelos de inserción de toxinas Cry en membrana. El primer modelo, llamado de "abrecartas" (figura 6, panel b), propone que las α -hélices 5 y 6 se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional regulado por el receptor, sin mayor participación de las hélices y dominios restantes. El otro modelo, denominado de "paraguas" (figura 6, panel a), plantea que después de la unión con el receptor, se inserta la región de las hélices $\alpha 4$ - $\alpha 5$, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica exponiendo hacia ella su cara hidrofóbica (Knowles, 1994). Hasta el momento, más evidencias sustentan el modelo de paraguas (Schwartz *et al.*, 1997; Masson *et al.*, 1999).

Experimentos de protección osmótica demuestran que después de unirse a membrana e insertarse en ella, las toxinas Cry forman poros con un diámetro de 1 a 2 nm (Knowles y Ellar, 1987). El tamaño de estos poros aunado a la aparición frecuente de múltiples estados de conductancia en los estudios de la actividad de las proteínas Cry en bicapas lipídicas planas (Slatin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1993; Grochulski *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997) son evidencias de la formación de agregados de las δ -endotoxinas. De hecho, se postula que se requieren de cuatro toxinas Cry para formar un poro en donde

las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ se encuentran insertadas en la membrana (Schwartz *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2002).



2.4.2.4. Citólisis

Las toxinas Cry causan la muerte de las células epiteliales por citólisis osmótica. Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto genera que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que un efecto devastador en este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya

que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células se destruyen, las esporas de Bt tienen acceso al hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias de la hemolinfa desemboca en la muerte de las larvas por inanición y septicemia (Knowles y Ellar, 1987).

2.5 Proteínas Cyt.

Como ya se había mencionado con anterioridad, las proteínas Cyt son un subgrupo de las δ -endotoxinas cristalinas producidas por Bt que deben su nombre al hecho de poseer una actividad citolítica *in vitro* contra varios tipos de células, como eritrocitos, linfocitos y fibroblastos (Knowles y Ellar, 1987; Thomas y Ellar, 1983). Una variedad de diferentes toxinas Cyt han sido encontradas en cepas con actividad tóxica contra mosquitos *in vivo*, y los genes de muchas de ellas han sido identificados y secuenciados; estos son Cyt1Aa1 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, Cyt1Aa2 de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* cepa PG14 (Earp y Ellar, 1987; Waalwijk *et al.*, 1985), Cyt2Aa1 de *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* (Koni *et al.*, 1993), que también ha sido encontrada en *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73-E10-2 y el gen que codifica para la toxina Cyt1C en *B. thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* (Yu *et al.*, 1991).

2.5.1. Estructura de Cyt1A.

El primer intento para modelar la estructura tridimensional de Cyt1A fue descrita en una publicación de 1988 (Ward *et al.*, 1988). Este modelo capturó algunas características de la estructura, como abundancia de láminas β y dos ramilletes de α -hélices antiparalelas, pero no pudo proveer de una descripción del arreglo tridimensional de los elementos de la estructura secundaria. La predicción de la estructura de Cyt1A llegó a ser posible solo después de que Li *et al.*, en 1996, determinaron la estructura en rayos X de la toxina Cyt2Aa1, antes nombrada CytB (figura 7). Al igual que Cyt2Aa1, Cyt1Aa1 parece consistir de dos horquillas α -helicoidales externas (hélices A-B y C-D) flanqueando un núcleo de hojas β (láminas 1 a 7).

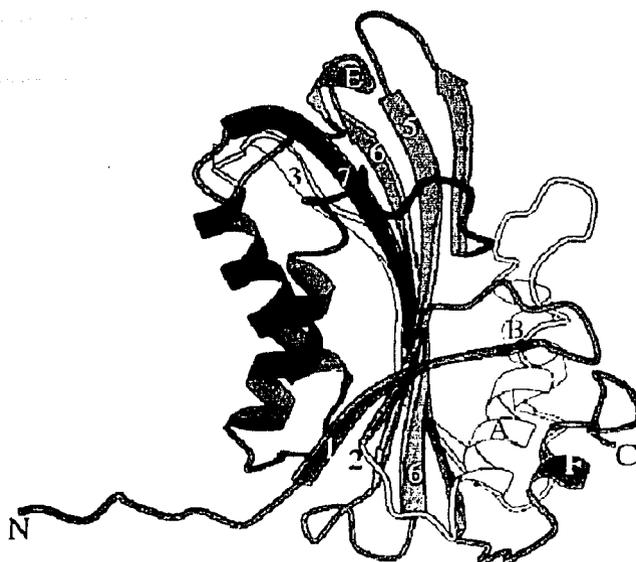


Figura 7. Estructura de la toxina Cyt2Aa1 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*.
Imagen extraída de Li *et al.*, 1996.

Cuando las secuencias de aminoácidos de Cyt1Aa1 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*), Cyt1Aa3 (*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni*), Cyt1Ab1 (*B. thuringiensis* subsp. *medellin*), Cyt1Ba1 (*B. thuringiensis* subsp. *neoleoensis*), Cyt2Ba1 (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) y Cyt2Aa1 (*B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis*) fueron alineadas (Butko, P. 2003), se observó la presencia de 4 bloques con alto grado de similitud y significancia estadística:

- 1) la hélice A (⁷⁹YILQAIQLANAFQGDLP⁹⁶).
- 2) el asa después de la hélice D más la lámina β4 (¹⁷⁴TFTNLNTQKDEAWIFW¹⁸⁹),
- 3) las láminas β5 y 6 (²¹²TNYYYNVLFQIQTGGVMACVPIGFE²³⁹) y
- 4) la hoja β6a y el asa subsiguiente hacia αE (²⁵⁴LFFTIKDSARY²⁶⁴).

Ward *et al.*, en 1988, fueron los primeros en desarrollar mutagénesis sistemática de la toxina Cyt1A. Este grupo reemplazó residuos cargados (los cuales están usualmente expuestos sobre la superficie de las proteínas) por alanina, observándose que de 13 mutantes, solo cinco (154, 163, 164, 213 y 225) tuvieron efectos importantes en cuanto a toxicidad y unión a lípidos. El hecho de que estas mutantes se encontraran en las asas entre α D- β 4, β 4- β 5, β 6- α E y α E- β 7, sugiere que dichas regiones son de vital importancia en la actividad *in vivo* de Cyt.

2.5.2 Inhibición de toxicidad inducida por lípidos.

En 1983, Thomas y Ellar, mostraron que la preparación de toxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) pierde su actividad bajo incubación con lípidos. Al mismo tiempo, demostraron que las determinantes importantes para la unión de toxina eran las cabezas polares de los lípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina) y la presencia de cadenas de ácidos grasos insaturados. Haider y Ellar, a su vez, en 1989, encontraron que la adición de toxinas de Bti a una suspensión de vesículas multilamelares causa un incremento inmediato en turbidez, el cual fue atribuido a la reorganización de los lípidos, los cuales incluyen vesicularización y agregación y/o fusión. Usando liposomas multilamelares (Drobniowski y Ellar, 1988; Haider y Ellar, 1989) y bicapas lipídicas (Knowles *et al.*, 1989) se ha demostrado que la acción citolítica de Cyt1A es mediada por la interacción toxina-lípido (Butko, 2003).

2.5.3. Canales selectivos a cationes, segmentos de toxina y modelo de formación de poro.

En 1989, Knowles *et al.*, reportaron que Cyt1A forma canales en bicapas lipídicas planas, pero solo a un pH de 9.5. Un análisis más exhaustivo de los canales de Cyt2Aa1 (*B. thuringiensis* var. *kyushuensis*) (Knowles *et al.*, 1992) probó inequívocamente la presencia de canales de potasio después de la incorporación de la toxina activada en bicapas lipídicas planas. Estos autores también observaron que la incorporación de la toxina induce la liberación total de glucosa en liposomas previamente cargadas con dicho azúcar.

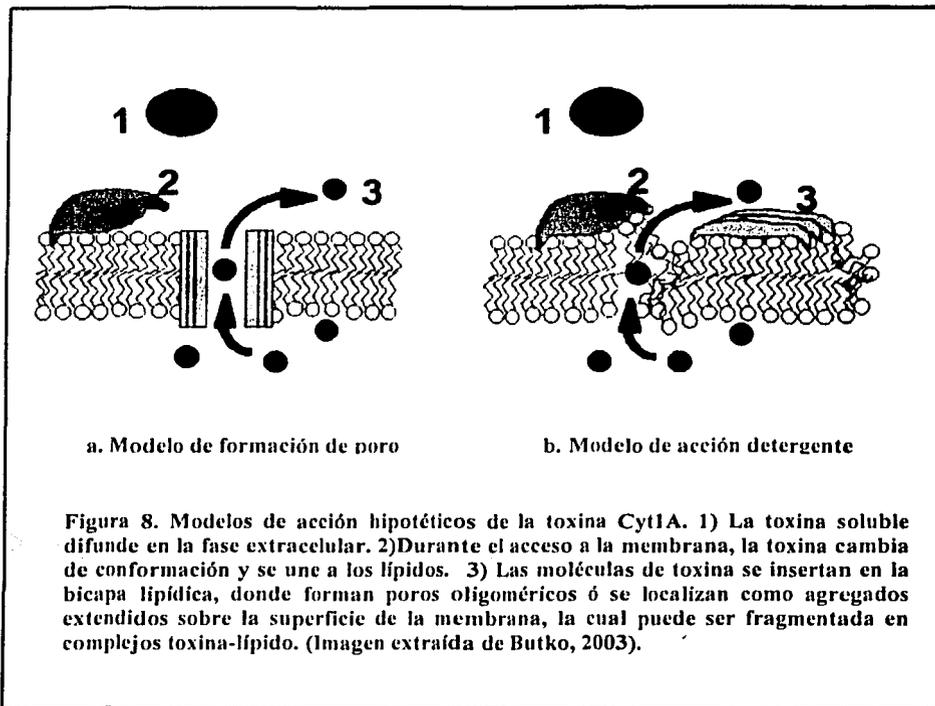
Los resultados anteriores apoyan la idea del mecanismo de lisis coloide-osmótica de Cyt1A-mediado por daño celular (Knowles y Ellar, 1987); es decir, que el proceso de equilibrio en las concentraciones de cationes a través de membrana resulta en un movimiento osmótico de agua con subsecuente hinchazón y eventual ruptura de la célula. Sin embargo, aunque estos resultados podrían ser un fuerte indicio de que la toxina Cyt1A se inserta en la membrana, se ha visto que las cuatro α -hélices de Cyt1Aa1 que contienen de 11 a 15 aminoácidos, son demasiado cortas para cruzarla (Butko *et al.*, 1997). De ahí que Li *et al.*, en 1996, sugiriera que las hojas β antes que las α -hélices estarían implicadas en unión a membrana, inserción y formación del poro.

Un modelo hipotético propuesto para el poro formado por Cyt consiste de 6 moléculas de toxina ensambladas como un sombrilla abierta. El asa de la sombrilla comprende las cadenas β 5 a 7, atravesando la membrana lipídica, mientras que en la parte alta de la sombrilla se localizan las α -hélices desplegadas sobre la superficie (Promdonkoy, 1999; Promdonkoy y Ellar, 2003). Por otro lado, la agregación de Cyt1A en la membrana parece jugar un papel importante en la hipótesis de formación de poro. Cuando el poro transmembranal es formado, a menudo diversas moléculas de toxina se ensamblan para crear la alineación del poro, como en la toxina de ántrax (Falnes y Sandvig, 2000). En 1997, Gazit *et al.*, mostraron que las moléculas de Cyt1A pueden interactuar una con otra vía las hélices A y C, esto gracias a los resultados que observaron con péptidos sintéticos que mimetizaban dichas regiones y que fueron analizados por espectros de fluorescencia. No obstante, solo hay un reporte publicado sobre el aislamiento físico de agregados de Cyt1A por gradiente de sacarosa, en el cual, Chow *et al.*, 1989, estudiaron la unión de Cyt1A marcada con ^{125}I a eritrocitos y células de *A. albopictus* y *Choristoneura fumiferana*. Una limitante de este estudio es que la composición de los agregados es incierta, debido al uso de las células completas, por lo que Cyt1A podría estar unida a un gran número de proteínas de membrana y no consigo misma. Como los canales o poros están usualmente formados por pequeñas subunidades proteicas ensambladas entre sí con una mayor o menor constante estequiométrica, la hipótesis del poro solo podrá ser soportada encontrando oligómeros de bajo número de subunidades (Butko, 2003).

2.5.4 Cyt1A como detergente.

La escasa información que se tiene para poder determinar la veracidad de los poros que forma la toxina Cyt1A *in vivo*, ha generado la idea de otro mecanismo de acción diferente al ya planteado. Dicho mecanismo podría estar basado en la posibilidad de que los agregados de Cyt1A puedan destruir completamente la membrana en la forma que lo haría un detergente, resultando en la completa ausencia de una vesícula (Butko, 2003). Esta observación está sustentada por el trabajo de Butko *et al.*, en 1996, en el cual se observó que Cyt1A opera por un mecanismo de todo o nada, p. ejem., las células o vesículas después de estar en contacto con la toxina están ó intactas ó completamente rotas; no se encontraron vesículas que solo tuvieran pérdida parcial de su contenido. Lo que es más importante, la acción de detergente no requiere ni ensamblaje estequiométrico de la toxina ni penetración estable de ella a través de la bicapa lipídica, por lo que podría ser más factible que Cyt1A actuase de este modo.

Sea cual sea el mecanismo de lisis celular de la toxina Cyt1A, es importante mencionar que el modelo de formación de poro (figura 8, panel a) y de detergente (figura 8, panel b) no son mutuamente excluyentes. Cada uno puede operar a diferentes concentraciones de toxina o sobre diferentes escalas de tiempo. Mientras a bajas concentraciones la toxina puede formar poros oligoméricos, a altos radios toxina/lípido, la membrana puede no ser capaz de acomodar el gran número de moléculas de toxina asociadas y, por lo tanto, romperse completamente por un mecanismo detergente (Butko, 2003).



2.6 Genes *cry*.

El genoma de las cepas de Bt abarca entre 2.4 y 5.7 millones de pb (Carlson *et al.*, 1994). La diversidad remarcable de las toxinas Cry de Bt se debe al alto grado de recombinación que presentan sus genes, los cuales residen en plásmidos móviles (González *et al.*, 1981), comúnmente flanqueados por estructuras compuestas que incluyen elementos móviles genéticos como transposones (Kronstad *et al.*, 1984; Lereclus *et al.*, 1984). Se ha sugerido la co-evolución de genes *cry* con las diferentes especies de insectos blanco. Estudios filogenéticos apoyan esta idea de evolución a partir de un origen común, y además, sustentan que la alta diversidad de estas proteínas pudo ser generada por divergencia en secuencia y por recombinación homóloga, lo que permite posibles intercambios de dominios estructurales entre las diferentes toxinas (Bravo, 1997; de Maagd *et al.*, 1999). Lo anterior sugiere que podría haber una amplia distribución de los genes *cry* en la naturaleza directamente relacionados con la localización de diferentes especies de

insectos. Meadows *et al.*, en 1993, analizó tres nichos hipotéticos y prevalentes para Bt en el ambiente:

- 1) como entomopatógeno, en su forma vegetativa;
- 2) como filófago, residente en materia orgánica en descomposición, también en su forma vegetativa;
- 3) y como un microorganismo de suelo, en su forma esporulada.

2.7 Subespecies de Bt con actividad mosquitocida.

Por 40 años, los ensayos serológicos han sido ocupados como un sistema de clasificación para Bt. Estas pruebas se basan en la determinación del antígeno flagelar descrito por de Barjac y Bonnefoi en 1962. Las reacciones de aglutinación que se observan con el antígeno flagelar H son un fuerte indicio de la enorme diversidad genética entre las diferentes subespecies de Bt que han sido aisladas. Gracias a ello se ha establecido una clasificación de subespecies de *B. thuringiensis* que producen inclusiones tóxicas hacia dípteros, como *israelensis* (Goldberg *et al.*, 1977), *morrisoni* (Padua *et al.*, 1984), *fukuokaensis* (Yu *et al.*, 1991), *darmstadiensis* (Padua *et al.*, 1980) y *kyushuensis* (Ohba *et al.*, 1979). Recientemente se han identificado otras cepas de Bt con actividad mosquitocida (Ragni *et al.*, 1996). De entre estas, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* y *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* son las más prometedoras, pues ambas producen proteínas de alta actividad contra mosquitos como: Cry11Ba1 y Cry11Bb1.

2.8 *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*.

La primera subespecie de Bt identificada con actividad contra larvas de mosquito fue *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti), que además es la que produce las inclusiones cristalinas más tóxicas. Esta bacteria fue descubierta en Israel por Goldberg y Margalit en el año de 1977. Bti ha mostrado ser tóxica para dípteros del suborden Nematocera, incluyendo mosquitos de las familias Culicidae, Simuliidae, Tipulidae y Chironomidae, así como para insectos del género *Aedes sp* (agente vector de Dengue), *Culex sp* (vector de filariasis), *Mansonia sp*, *Anopheles sp* (vector de malaria) y *Simulium sp* (Federici BA., 1995). Las inclusiones cristalinas que produce Bti son principalmente cuatro: Cry4Aa1, Cry4Ba1, Cry11Aa1 y Cyt1Aa1. Bti alberga plásmidos que abarcan

rangos de tamaño de entre 3 a 135 MDa (González *et al.*, 1984). Uno de estos plásmidos, con tamaño de 75 MDa, es el responsable de la actividad tóxica contra larvas de mosquitos, ya que contiene los genes Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A, que codifican para proteínas de aproximadamente 134, 128, 72 y 27 kDa, respectivamente. (de Barjac *et al.*, 1990; Delcluse *et al.*, 1991; Porter *et al.*, 1993). En este plásmido también se encuentra mapeado el gen regulatorio que codifica para un polipéptido de 20 kDa (proteína *helper*), el cual se requiere para la producción eficiente de las proteínas. (Adams *et al.*, 1989; Höfte *et al.*, 1989).

Btí es una bacteria que se ha ocupado con gran éxito en programas operacionales de control de vectores. Bioinsecticidas comerciales realizados a base de esta cepa han sido exitosamente aplicados en campo como agentes de control biológico de mosquitos y moscas en diversas regiones del mundo, y Bti ha probado ser una alternativa práctica al control químico (Kurtak *et al.*, 1989). Parte de la aceptación que tiene el uso de Bti como insecticida biológico es su alta y específica actividad larvicida contra insectos del orden díptero. Dicha especificidad tóxica es sumamente importante, pues no conlleva ningún tipo de efecto adverso sobre otros organismos en el ambiente (Georghiou *et al.*, 1997), incluyendo seres humanos. No obstante, el uso de Btí a nivel mundial es aún limitado, debido a la baja eficacia que algunas de las preparaciones comerciales han mostrado. Las principales razones de lo anterior son:

- 1) hundimiento de la muestra en el fondo del agua (Rashed *et al.*, 1989).
- 2) absorción de la muestra en materia orgánica (Margalit *et al.*, 1984; Ohana *et al.*, 1987).
- 3) consumo de la muestra por otros organismos para los cuales no es tóxica (Blaustein *et al.*, 1991).
- 4) inactivación por radiación solar (Cohen S., 1991; Pusztai *et al.*, 1991).

Una manera de superar las anteriores limitantes es clonar los genes que codifican para la toxinas de Bti (a partir de la tecnología de DNA recombinante) en organismos capaces de habitar ambientes acuáticos propios para el crecimiento de las larvas de mosquitos y que además puedan servir como fuente de alimentación para las mismas, como

lo hicieron Wu *et al.*, en 1997 con *Anabaena*, ó realizando análisis exhaustivos sobre formulaciones adecuadas de la preparación insecticida, como los que generaron la creación de VectoBac y Tecknar, preparaciones efectivas en costo y almacenamiento, fabricados por Valent Bio-Sciences y Certis respectivamente, y de amplio uso en Estados Unidos por su resistencia a la luz UV, su estabilidad en agua y nula precipitación (Federici, 1995).

2.9 Sinergismo entre toxinas Cry y Cyt de Bti.

Wu y Chang, en 1994, fueron los primeros en observar que cuando las proteínas del cristal de Bti eran mezcladas y probadas contra larvas de *A. aegypti*, la actividad de algunas de estas combinaciones era mayor que lo que se esperaría de la suma de actividad de las proteínas individuales. Lo que estos investigadores hicieron fue expresar diversas combinaciones de los genes de las toxinas de Bti en la cepa acristalífera 4Q7, con el fin de poder expresar por separado las diferentes proteínas Cry y Cyt. Sus conclusiones muestran que la presencia simultánea de Cyt1A y Cry11A resulta en una toxicidad de cuatro a cinco veces más alta que la de las proteínas solas. Este es un dato importante que soporta la idea de un proceso sinérgico entre Cyt1A y Cry11A (Chang *et al.*, 1993; Ptitsyn *et al.*, 1990; Wu y Federici, 1994) y de la participación de Cyt1A en el vencimiento de la resistencia de insectos a las toxinas Cry (Wirth *et al.*, 1997). Por consiguiente, se reconoce la importancia de la potencia de Cyt1A en mezclas sinérgicas de *Bti* y en su actividad contra la resistencia que generan los insectos a dichas toxinas.

Otros reportes posteriores (Angsuthanasombat *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993; Chilcott *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1995; Delécluse *et al.*, 1993; Poncet *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1994) confirmaron interacciones sinérgicas entre las toxinas de Bti. Sin embargo, evaluar estos estudios y establecer con precisión cuál es la contribución de cada proteína a la toxicidad global de la inclusión nativa resulta difícil. Parte del problema es la gran variación reportada en cuanto a las toxicidades obtenidas para las toxinas de forma individual, probablemente, debido a las diferencias en las condiciones experimentales en que se realizan los bioensayos. Algunos de los factores que también complican la observación son: diferencias en la especie de larvas usadas (aparentemente las toxinas no matan igual a un género de mosquito que a otro); tamaño, calidad y solubilidad de los

cristales; variación en las condiciones del bioensayo, incluyendo tipo de dieta, temperatura, pH y salinidad; variación natural en las poblaciones de insectos (uso de insectos en diferentes fases de desarrollo); inactivación potencial (o, posiblemente, activación accidental por impurezas con proteasas) durante procedimientos de purificación por cromatografía; complejidad inmune en las especies de mosquitos; diferentes condiciones de cría de los insectos y diferencias en las formulaciones de Bti con que se alimenta a las larvas (esporas intactas, cristales solubilizados, cristales reprecipitados, y/o esporas encapsuladas o cristales) (Schnepf *et al.*, 1998).

Un estudio de Crikmore *et al.*, en 1995, intentó resolver un poco los problemas anteriores estableciendo constantes experimentales de bioensayo. Fue así que usando larvas del 4º. estadio de *A. aegypti* a una temperatura de 25°C, se observó que la potencia en las actividades relativas de las toxinas de forma individual contra dicho insecto son, de la más a la menos activa: Cry11A, Cry4B, Cry4A y Cyt1A, esto tomando en cuenta los valores de dosis letal media LC₅₀ (Schnepf *et al.*, 1998). Al mismo tiempo se demostró la existencia de interacciones sinérgicas con todas las combinaciones posibles de toxinas, aunque el alcance de esta interacción fue dependiente de la combinación. Sin embargo, ninguna combinación fue tan activa como el cuerpo de inclusión completo de Bti. Una de las razones para explicar la observación anterior, es que quizás el cristal nativo de Bti se ingiriera mejor y se solubilizara más fácilmente en el intestino medio del insecto que los cristales provenientes de cepas recombinantes. Adicionalmente, la presencia de las cuatro toxinas en un solo cristal puede de alguna manera ser más eficiente que la mezcla de dichas toxinas en un bioensayo. (Schnepf *et al.*, 1998)

Una alternativa para estudiar las contribuciones relativas de las toxinas de Bti fue construir cepas en las cuales el gen de *cry11A* ó el de *cyt1A* fueran genéticamente inactivados. El efecto de la inactivación de *cry11A* (Poncet *et al.*, 1995) redujo a la mitad la toxicidad. En contraste, la inactivación del gen *cyt1A* (Delécluse *et al.*, 1991) produjo una cepa con toxicidad similar a la cepa nativa, sugiriendo que la toxina Cyt1A no es esencial para la actividad mosquitocida. Sin embargo, este dato debe interpretarse con precaución ya que recientemente se ha reportado que Bti también contiene genes que codifican para las

proteínas Cyt1Aa2, Cyt1Aa5, Cyt2Ba1, Cyt2Ba2 y Cyt2Ba9, por lo que el efecto de la ausencia de la toxina Cyt1A puede verse compensado por la presencia de estas otras proteínas Cyt.

Ben-dov *et al.*, en 1995, también demostraron las interacciones sinérgicas, mediante la clonación de los genes que codifican para las proteínas Cry4A, Cry11A y la proteína *helper* de 20 kDa, en siete posibles combinaciones dentro de dos vectores de expresión en *E. coli* (pUHE y pT7). Las cuatro combinaciones que contenían Cry4A mostraron altos niveles de actividad larvicida. La toxicidad mostrada por la combinación de Cry4A y Cry11A fue siete veces mayor de la que mostraba Cry4A sola, lo cual, muestra nuevamente un efecto sinérgico entre toxinas de Bti.

No obstante todas las pruebas de la interacción sinérgica ya mencionadas, aun no se ha reportado ningún trabajo que explique el mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo el sinergismo entre estas toxinas. Una comparación de curvas de dosis-respuesta para las toxinas individuales de Bti (Crickmore *et al.*, 1995) muestra una clara diferencia entre la acción de las toxinas Cry y la toxina Cyt1A. Por consiguiente, se puede postular que Cyt1A actúa de forma distinta a como lo hacen las toxinas Cry. Si analizamos esta situación, veremos que esto no es tan extraño de pensar, pues de hecho la toxina Cyt1A tiene una estructura completamente diferente al de las toxinas Cry (Li *et al.*, 1996) y parece interactuar con la membrana apical de forma muy diferente (Thomas *et al.*, 1983).

En este trabajo de investigación se analizaron las bases moleculares del sinergismo entre las toxinas Cry11A y Cyt1A utilizando VMMA de *A. aegypti*, insecto vector del Dengue, para estudiar su comportamiento individual y también en combinaciones.

La hipótesis que sustenta el proyecto es la siguiente: *El efecto sinérgico entre las toxinas Cry11A y Cyt1A de Bti, se debe a interacciones intermoleculares entre estas proteínas. La toxina Cyt puede facilitar la unión e internalización de la toxina Cry11A en la membrana.*

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el mecanismo de acción de las δ -endotoxinas Cry11A y Cyt1A de Bti en larvas de *Aedes aegypti*, considerando los diferentes pasos del mecanismo de acción, y utilizando para el análisis a dichas toxinas de manera individual y en mezclas que ayuden a entender el sinergismo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar la toxicidad de las toxinas Cry11A y Cyt1A contra larvas del 4° estadio de *A. aegypti*, de forma individual y en combinaciones.
- 2) Determinar la interacción de estas toxinas con su receptor por medio de ensayos de unión y ligand blot a vesículas de membranas de microvellosidad apical (VMMA) del intestino medio de *A. aegypti*.
- 3) Analizar la actividad formadora de poro de Cry11A y Cyt1A en VMMA de *A. aegypti*, tanto de forma individual como conjunta.
- 4) Determinar la posible interacción entre las proteínas Cry11A y Cyt1A a través de ensayo tipo ligand blot y sistema de dos híbridos en levadura.
- 5) Analizar la interacción de Cry11A y Cyt1A *in vivo* con el intestino de *A. aegypti*, utilizando a las toxinas marcadas fluorescentemente por medio de estudios de microscopía.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Cepas.

Las cepas utilizadas para la realización de este trabajo fueron:

- *Bacillus thuringiensis* CG6, que contiene el plásmido pWF26 (resistente a eritromicina) que expresa la proteína Cry11A.
- *Bacillus thuringiensis* 4Q7 que contiene el plásmido pWF45 (resistente a eritromicina) que expresa la proteína Cyt1A.
- *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* HD916.
- *Saccaromyces cerevisiae* L40. Genotipo: MATa *his3Δ200 trp1-90l leu2-3112 ade2 LYS2::(AlexAop-HIS3)URA3::(8lexAop-lacZ)GAL4*. Fenotipo: His⁻, Trp⁻, Leu⁻, Ade⁻. Fuente: Kit Hybrid Hunter, Invitrogen.
- *Escherichia coli* XL-10 gold. Genotipo: EndA⁻, LacI^q, episoma F['], Rec A⁻. Fuente: Stratagene.

4.2 Aminoácidos.

Las soluciones de aminoácidos fueron esterilizadas ocupando filtros milipore de 0.2 μm desechables; triptófano, leucina y adenina fueron ocupados en una concentración de 100 μg/ml; la histidina a 50 μg/ml.

4.3 Selección de antibiótico.

Las concentraciones estándar de antibióticos que se usaron a lo largo de este trabajo se presentan en la siguiente tabla. Dichas concentraciones se usaron tanto en medio líquido como en sólido.

Tabla 1. Concentraciones de antibiótico usado en medios de cultivo

Antibiótico	Stock	Concentración final
Ampicilina	100 mg/ml	100 µg/ml
Eritromicina	10 mg/ml	25 µg/ml (Bt CG6) 10 µg/ml (Bt 4Q7)
Zeocina	100 mg/ml	100 µg/ml (<i>E. coli</i> XL-10 Gold) 300 µg/ml (<i>S. cerevisiae</i> L40)

4.4 Purificación y procesamiento de proteínas Cry.

La cepa de Bt CG6, clonada con el plásmido pWF26 que expresa la proteína Cry11A, y la cepa de Bt 4Q7 con el plásmido pWF45 clonada para expresar la proteína Cyt1A, se colocaron en medio mínimo líquido SP (con su respectiva concentración de eritromicina) para favorecer su esporulación y producción de inclusiones cristalinas.

Una vez que el medio se encontró 100% esporulado (chequeo por microscopio), se recuperó el cultivo centrifugando a 10000 rpm por 10 minutos (centrífuga Beckman J2-HS, rotor JA-20), eliminando el sobrenadante. Se resuspendió y lavó la pastilla en una solución de 0.3 M de NaCl y 0.01 M de EDTA pH 8.0. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se sometió al pellet al mismo proceso anterior por 2 veces más. Se resuspendió y lavó la pastilla en una solución de PMSF 1 mM. Se centrifugó 10 min a 10000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se volvió a resuspender el pellet en buffer TTN (Tris 20 mM, tritón x-100 0.1%, NaCl 300 mM, pH 7.2 ajustado con HCl) y se sonicó dando tres pulsos de 60" a 20 watts x 1' de descanso para luego someter a la suspensión a un gradiente de sacarosa utilizando las siguientes concentraciones: 84%, 79%, 72% y 67%. Cada una de las concentraciones de azúcar llevaban adicionalmente los siguientes reactivos: 400 µl de tritón 1%, 2 ml Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 80 µl de NaCl 5 M. Se centrifugó a 23000 rpm, 20' a 15°C (ultracentrífuga Beckman L-80, rotor SW28) y luego se recuperó la fracción donde se encuentran los cristales (que para ambas proteínas es

entre 79 y 72%) y se eliminó la sacarosa lavando tres veces con tritón x-100 al 0.01% y centrifugando a 10000 rpm por 10 min. Finalmente se resuspendió la pastilla en una solución de PMSF 1 mM y Tris 50 mM pH 8.0 y se guardó la muestra de cristales a 4°C para su conservación.

Los cristales de Cry11A se solubilizaron en una solución de NaOH 0.01 M a 4°C por 60'. Se recuperó el sobrenadante centrifugando a 14000 rpm por 10' (centrífuga Eppendorf 5415 C). Posteriormente se activaron los cristales con tripsina marca SIGMA en una proporción enzima/protoxina de 1:50, a 37°C por 30'. Por su parte, los cristales de Cyt1A se solubilizaron en buffer carbonatos 0.05 M (stock de Na₂CO₃ 0.5 M y NaHCO₃ 0.5M) en presencia de 0.01 M de DTT a 37°C por 60'. El sobrenadante se recuperó centrifugando a 14000 rpm por 10' (centrífuga Eppendorf 5415 C). Posteriormente se activaron los cristales con proteinasa K marca SIGMA en una proporción enzima/protoxina de 1:20, a TA por 30'.

4.5 Purificación de vesículas de membrana de microvellosidad apical (VMMA's).

Se realizó la disección de aproximadamente 1000 larvas del 4º. estadio de *A. aegypti*. Los intestinos obtenidos se homogenizaron en presencia de buffer MET (300 mM de manitol/ 5 mM de EGTA / 200 mM de Tris-HCl pH 7.4) y MgCl₂ 24 mM. Se agitó, se dejó en hielo por 20' y posteriormente se centrifugó a 3000x g, recuperando el sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más, solo que una velocidad de 2000x g. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones, se juntaron y sometieron a un nuevo proceso de centrifugación por 10' a 100000x g (Ultracentrífuga Optima™ Beckman, rotor MLA 130). Se desechó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 100 µl de buffer MET. Las VMMA's se guardaron a -70°C, no sin antes verificar su patrón de proteínas por medio de un gel de SDS-PAGE al 10% y checar su actividad de aminopeptidasa. (Houk *et al.*, 1986)

4.6 Determinación de actividad de aminopeptidasa.

En una celda de poliestireno de 1 ml se mezclaron: 445 μ l de agua MQ, 200 μ l de tris-HCl 1 M pH 8.0, 250 μ l de NaCl 1 M y 5 μ l de VMMAAs (volumen final 900 μ l). Se adicionaron 100 μ l de un stock 10 mM de L-leucina-p-nitroanilida (SIGMA; 2.88 mg en 1 ml de H₂O MQ). Se agitó perfectamente y se siguió la cinética de la reacción durante tres minutos en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraspec II) a la longitud de onda (λ) de 405 nm.

4.7 Determinación de concentración de proteína total.

La determinación de la concentración de proteína total de VMMAAs y toxinas activadas se realizó por método de Bradford. En un volumen de 790 μ l de agua, se agregaron 10 μ l de la muestra a medir. Se agitó perfectamente bien y luego se adicionaron 200 μ l de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se tomó la lectura de absorbancia a λ de 595 nm ocupando un espectrofotómetro (Pharmacia LKB Ultraspec II) y los valores se interpolan a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones de 1 a 20 μ g/ml.

4.8 Bioensayos con larvas de *A. aegypti*.

Los bioensayos se realizaron con larvas de 4o. estadio de *A. aegypti* utilizando esporas/cristales de Cry11A y Cyt1A. Los ensayos fueron desarrollados en un volumen de aproximadamente 100 ml de agua desclorada, donde se colocaron 10 larvas de *A. aegypti*. Por método de Bradford se determinó la concentración total de proteína de las diferentes muestras de esporas/cristales y con este dato se calculó la dosis requerida como se muestra en el siguiente ejemplo:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Concentración de esporas cristales de HD916: 1.72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Dosis a aplicar: 10 ng/ml.

Cantidad de nanogramos que se requieren para obtener una dosis de 10 ng/ml en 100 ml de agua desclorada:

10 ng ----- 1 ml

x ng ----- 100 ml = 1000 ng ó 1 μg .

Cantidad de esporas/cristales a agregar a partir de un stock de esporas/cristales HD916 a una concentración de 1.72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

1.72 μg ----- 1 μl

1 μg ----- x μl = 0.58 μl .

Por lo tanto, de un tubo de esporas/cristales HD916 con una concentración de 1.72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se tomaron *0.58 μl o 58 μl de una dilución 1:100* del concentrado (stock HD916:agua), y se agregaron al volumen de final de 100 ml de agua desclorada, que contenía las diez larvas de mosquitos. La mortalidad presentada en el bioensayo se analizó después de 24 y 48 hrs. de agregar la dosis. Como control positivo se utilizó la cepa de Bti (HD916) en una dosis de 25 ng/ml, mientras que como control negativo se ocupó únicamente agua desclorada. Los datos de mortalidad fueron analizados por la prueba Probit de log dosis contra porcentaje de mortalidad (Finney, 1971). Las LC_{50} se obtuvieron utilizando el programa POLO de LeOra. Para mayor información acerca del análisis Probit revisar la sección de Anexos (página 109).

4.9 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El SDS-PAGE para analizar el patrón de bandeo de las proteínas solubilizadas, activadas y en unión con VMMA, se llevó a cabo en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10 ó 12% con un gel stacking al 5% como se describe por Laemmli *et al.*,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1970. El gel se tiñó con colorante Coomassie (Bio-Rad). Los marcadores de peso molecular Bio-Rad fueron utilizados como estándares.

4.10 Biotinilación de proteínas.

Se empacó una columna con sephadex G25 o G50 (del reactivo sephadex G25 ó G50 (SIGMA) se tomó 1 g y se resuspendió en 4-6 ml de PBS 1x preparado según Maniatis *et al.*, 1992). Se lavó la columna con al menos 15 ml de buffer PBS 1x para equilibrarla. Posteriormente, se colocó la columna en un tubo de ensayo de vidrio y éste dentro de un tubo Falcon de 15 ml. Se centrifugó la columna a 2000x g por 2' para eliminar el excedente de buffer PBS 1x. La proteína previamente dializada en buffer de boratos (ácido bórico 0.05M; NaOH 0.05M; NaCl 0.15 M pH 8.6 ajustado con HCl) se incubó con un éster de biotina (Amersham) por 45' a TA. (por cada 0.6 mg/ml de proteína a marcar, se agregaron 20 µl de reactivo de biotinilación). La muestra incubada con biotina se colocó en la columna de sephadex y se centrifugó a 2000 rpm por 2' para recuperar la muestra biotinilada. La concentración de proteína total obtenida después del marcaje se determinó por método de Bradford. Se corrió un gel de SDS page al 12% con 5 µl de la muestra marcada, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa ECL (Amersham) utilizando cámara húmeda por 45' a 350 mA (buffer de transferencia: stock sin SDS 10x, metanol al 20%) y se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (SAPO) para posteriormente detectar la señal dada por la toxina utilizando reactivos quimioluminiscentes (Pierce).

4.11 Ensayo de unión clásico con VMMA en suspensión.

Se descongelaron las VMMA de *A. aegypti*. Se tomaron 10 µg de vesículas y se incubaron con 10 nM de toxina marcada con biotina por 60' a TA (volumen final de reacción: 100 µl en buffer binding (BB): PBS 1x, BSA 0.1% y tween 0.1%). Se centrifugó a 14000 rpm. por 10' (centrífuga Eppendorf 5415 C). Se recuperó el pellet y se volvió a resuspender en 100 µl de BB por tres veces. La última resuspensión se hizo en 15 µl de PBS 1x. Se desnaturalizaron las proteínas en un gel de SDS al 12%. Se transfirió a una membrana de nitrocelulosa ECL (Amersham) utilizando cámara húmeda por 45' a 350 mA (buffer de transferencia: stock sin SDS 10x, metanol al 20%). Se renaturalizó la membrana en buffer PBS 1x por 15'. Se bloqueó la membrana con 50 ml de buffer PBS 1x + tween 20

2% por 60' ó toda la noche (ON). Se bloqueó la membrana con 40 ml de buffer PBS 1x + tween 20 0.05% por 5', dos veces. Se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (SAPO) (Amersham) en 50 ml de buffer PBS 1x + tween 20 0.05% (radio 1:6000) por 60'. Se lavó con agua MQ y con buffer PBS 1x+ tween 20 0.05% (de 5 a 10 lavados con 30 ml cada vez) para retirar el exceso de SAPO. Se lavó con 40 ml de buffer PBS 1x + tween 20 0.05% por 10', dos veces. Se lavó con 40 ml de buffer PBS 1x por 10'. La señal obtenida se reveló con reactivos quimioluminiscentes (Pierce).

4.12 Ensayo de unión a ligando (ligand blot).

Se descongelaron las VMMA de *A. aegypti*. Se tomaron 10 µg de vesículas y se colocan en un gel de SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P (Milipore) utilizando cámara húmeda por 45' a 350 mA. Se renaturalizó la membrana por 15' en PBS 1x. Se enjuagó con PBS 1x + tween 0.1% por 15 min. Se bloqueó toda la noche (ON) con PBS 1x + BSA 1% + tween 0.1%. Se enjuagó dos veces con PBS 1x + tween 0.1%. Se incubó tres veces con 40 ml de PBS 1x + tween 0.1% por 15 min. Se incubó 10' con 0.5 ml de buffer de incubación (PBS 1x, 0.2% BSA, 0.1% tween 20). Se incubó 120' con la toxina en buffer de incubación. Se enjuagó con PBS 1x + 0.01% tween 20. Se incubó tres veces con PBS 1x + 0.1% tween 20 por 15 min. Se incubó con SAPO en concentración 1:6000 por 60'. Se enjuagó exhaustivamente con agua MQ y luego cuatro veces con PBS 1x + tween 0.1 %. Se incubó con PBS 1x por 15' dos veces. La señal obtenida se reveló con reactivos quimioluminiscentes (Pierce).

4.13 Ensayos de formación de poro.

El potencial de membrana en las VMMA de *A. aegypti* se obtuvo monitoreando la partición del colorante fluorescente cargado positivamente 3-3'-dipropil-tiodiocarbocianina [dis-C3-(5)] (SIGMA) a una concentración final de 1.2 µM. Las VMMA fueron dializadas toda la noche (ON) contra buffer KCl 150 mM, EGTA 2 mM, EDTA 0.5 mM y HEPES 10 mM a pH 7.4. La fluorescencia fue medida a λ 620/670 nm excitación/emisión. Los ensayos se realizaron en un volumen de 900 µl de buffer de cloruro de N-metil-D-glucamina 150 mM, HEPES 10 mM pH 7.4, a 25°C con agitación constante. Se adicionó cianina (1.2 µM), después 10 µg de VMMA de *A. aegypti*, esperando a que el colorante

alcance el equilibrio (1 min). Posteriormente, se agregó la valinomicina o toxina, que produjo una hiperpolarización debido a la salida de iones K^+ del interior de las vesículas. Esto provocó la entrada del colorante tipo cianina en las VMMA's generando un decremento en el índice de fluorescencia. La depolarización produjo el efecto contrario. La calibración del colorante y la determinación del potencial de membrana restante se desarrollaron en presencia de valinomicina (2 mM) por adiciones sucesivas de KCl (3.3, 6.7, 13.3, 26.7, 53.3, 106.7 y 213.3 mM) a las VMMA's (10 μ g) suspendidas en buffer de cloruro de N-metil-D-glucamina (MeGluCl) 150 mM, 10 mM de HEPES pH 7.0.

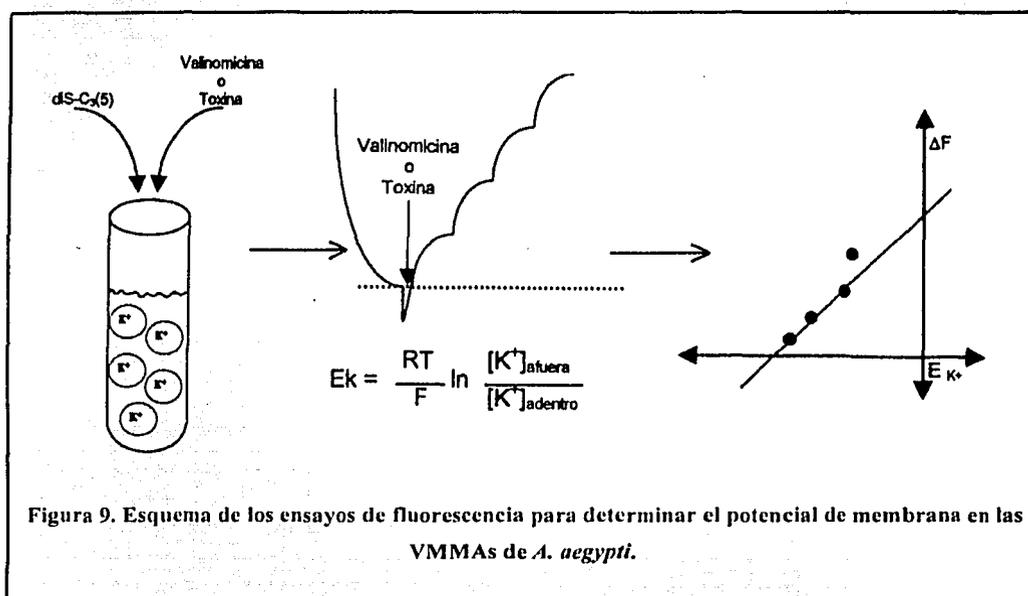


Figura 9. Esquema de los ensayos de fluorescencia para determinar el potencial de membrana en las VMMA's de *A. aegypti*.

Para analizar los datos proporcionados por el fluorómetro y obtener la pendiente de la recta obtenida de graficar potencial de K^+ contra incremento en fluorescencia por acción de valinomicina se realizó lo siguiente:

Volumen de buffer de cloruro de N-metil-D-glucamina = 900 μ l

Volumen de VMMA's correspondientes a 10 μ g (stock 1.56 μ g/ μ l) = 6.4 μ l

Volumen de cianina = 1 μ l

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Volumen final de reacción = 907.4 μ l

A partir del volumen final de 907.4 μ l, se determinó cómo se incrementó el volumen de reacción conforme se agregó KCl 3 M. Así mismo, se determinó el cambio en concentración de K^+ externo inducido por valinomicina tomando en consideración la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$. Con esos datos se determinó el E_K ($E_K=25.69 \cdot \ln [K^+]_e/[K^+]_i$) y el porcentaje de incremento en fluorescencia ($\% \Delta F=(F_n - F_o) \cdot 100$). La tabla 2 resume los datos obtenidos.

Tabla 2. Análisis de datos de permeabilidad a K^+ por acción de valinomicina en VMMA de *A. aegypti*.

Volumen en μ l de KCl 3 M agregado	Volumen final de reacción en μ l	$[K^+]_e$ mM	E_K	F_n	$\% \Delta F$
0	907.4	1	-128.72	1.78	10
1	908.4	4	-93.10	1.90	22
2	910.4	10	-69.56	2.00	32
4	914.4	23	-48.17	2.14	46
8	922.4	49	-28.74	2.31	63
16	938.4	100	-10.41	2.52	84
32	970.4	198	7.13	2.71	103
64	1034.4	383	24.08	2.92	124

- El valor de $[K^+]_e$ es siempre 150 mM, pues se cargaron las VMMA de *A. aegypti* con dicha concentración de KCl.
- Los valores de F_n y F_o son proporcionados por el fluorómetro. F_o es la fluorescencia inicial con la que se comenzó el ensayo y se mantiene constante. En este caso F_o tuvo un valor de 1.68.

La gráfica obtenida para valinomicina (control positivo) se muestra a continuación:

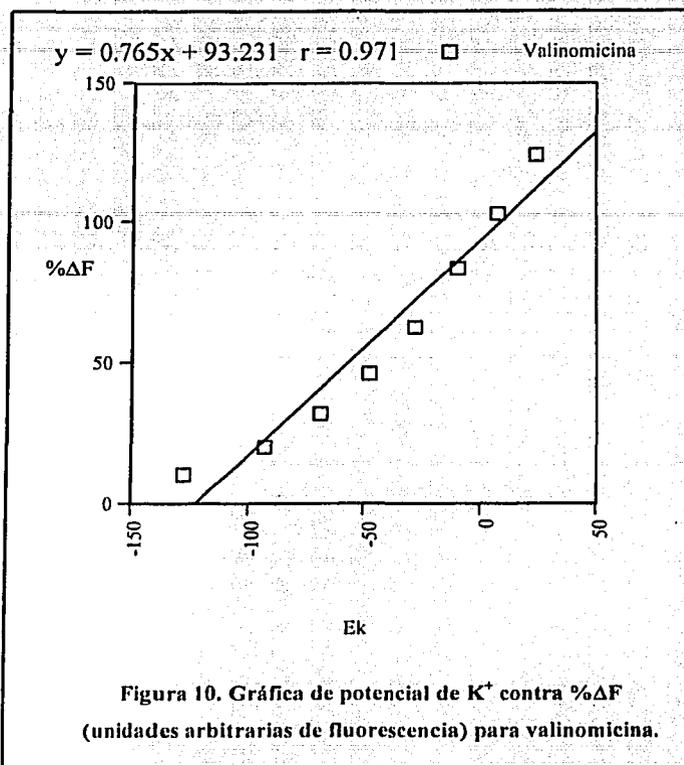


Figura 10. Gráfica de potencial de K^+ contra $\% \Delta F$ (unidades arbitrarias de fluorescencia) para valinomicina.

Los datos para evaluar la permeabilidad a K^+ inducida por acción de Cry11A y Cyt1A en VMMA de *A. aegypti*, tanto de forma individual, como conjunta, se analizaron de la misma forma antes mostrada para valinomicina. Las gráficas que muestran las pendientes obtenidas con dichas toxinas se muestran en el apartado de Resultados (página 78).

4.14 Preparación de células competentes de *E. coli*.

Un cultivo de doce horas de *E. coli* XL-10 Gold fue subcultivado en medio LB y crecido a 37°C hasta conseguir una DO₆₀₀ de 0.5. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000x g por 5'. El pellet fue lavado en CaCl₂ 50 mM frío antes de la resuspensión en 20 ml de la misma solución. La mezcla fue incubada en hielo por 30'. Las células fueron precipitadas y resuspendidas con cuidado en 1 ml de CaCl₂ 50 mM frío, antes de la transformación. De manera alternativa, las células fueron resuspendidas en 1 ml de CaCl₂ 50 mM frío con 15% de glicerol y almacenadas a -70°C para subsecuentes transformaciones.

4.15 Transformación de células competentes de *E. coli*.

El DNA (10 µg) se mezcló con las células competentes (200 µl) y se incubó en hielo por 30'. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron a 42°C durante 2' e inmediatamente se colocan en hielo por 10' más. Se agregó entonces 0.8 ml de LB y se incubó a 37°C durante 30', con el objeto de permitir que se expresen los genes de resistencia. Posteriormente las células se plataron en medios selectivos y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

4.16 Recuperación DNA a partir de fragmentos de gel de agarosa.

Se utilizó el kit de extracción de DNA Genomics (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante en todos los pasos.

4.17 Purificación de DNA plasmídico.

Se utilizó el kit de extracción de DNA plasmídico Wizard® Plus SV Minipreps (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante en todos los pasos.

4.18 Digestión con enzimas de restricción.

La digestión del DNA requerido se realizó con las enzimas KpnI y SphI (Biolabs) usando el buffer 1 (Biolabs). Al menos 1 unidad de enzima fue adicionada por 1 µg de DNA. El volumen de enzima adicionada fue un décimo del volumen total de reacción. Las

digestiones fueron incubadas por 1-1.5 h a 37°C. Los fragmentos fueron analizados por gel de agarosa y posteriormente purificados.

4.19 Ligación de fragmentos de DNA *in vitro*.

Las reacciones de ligación fueron desarrolladas de acuerdo a Maniatis *et al.*, 1982 en 1X de buffer de ligación (USB) por 12-16 hr. a 14°C. La mezcla contuvo dos unidades de T4 DNA ligasa (USB) por 200 ng de DNA en un volumen total de 20 µl.

4.20 Geles de agarosa.

Los geles de agarosa para DNA fueron realizados de acuerdo con Maniatis *et al.*, 1982. Un gramo de agarosa (SIGMA) se agregó a 100 ml de buffer TAE 1X (8.9 mM Tris base, 8.9 mM de ácido bórico y 0.2 mM de EDTA, pH 8.0). La agarosa se disolvió por calentamiento. Se dejó enfriar un poco y se añadió bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Posteriormente se colocó en una cámara para geles y se dejó solidificar, para después proceder a cargar las muestras y llevar a cabo la electroforesis a voltaje constante (80 V). Después de la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador (Ultra Lum) a 260 nm, y se tomó una fotografía usando equipo Sony adaptado al equipo. El marcador de peso molecular ocupado fue ladder 100 (Biolabs).

4.21 Diseño de oligonucleótidos.

Se diseñaron oligos de entre 30 y 40 bases de longitud utilizando el programa OLIGO 4. Posteriormente se mandaron a sintetizar en la "Unidad de síntesis" de IBT.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos usados para amplificar fragmentos de Cyt1A.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
F1d	GGG GTA CCG AAA ATT TAA ATC ATT GTC CAT TAG AAG AT
F1r	ACA TGC ATG CAC CCA TCG GTG TAA TTG TGT TTG C
F2d	GGG GTA CCA ATA ACC AAG TAA GTG TTA TGA TTA ATA AAG TC
F2r	ACA TGC ATG CGA GGG TTC CAT TAA TAG CGC TAG T

F3r	ACA AGC ATG CCA TTT TGG ATT GCA AAC AGG ACA TT
F4d	GGG GTA CCG CAA ACA CAA TTA CAC CGA TG
F4r	ACA TGC ATG CAC TTG AGC TAA CTA ATG GTT GTG C
F5r	ACA TGC ATG CTG CTT CAT TTT TTT GAG TAT TTA ATT T
F6d	GGG GTA CCA CAA ATA CGT TTA CAA ATT TAA ATA CTC AA

4.22 Amplificación de DNA.

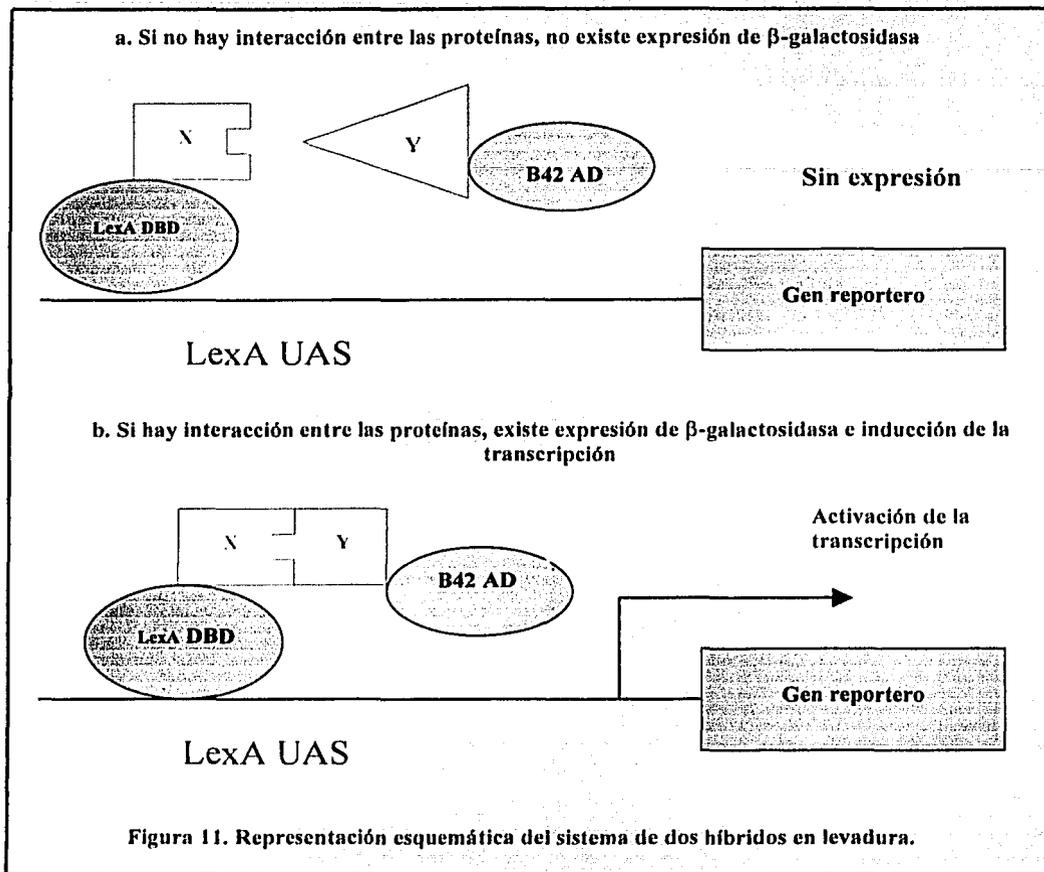
Fue desarrollada en un termociclador (Perkin Elmer). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando dNTPs y enzima Taq (Biolabs). El programa de PCR ocupado fue el siguiente:

- 1 ciclo de 2 min a 98°C
- 30 ciclos de: 1 min a 98°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C
- 1 ciclo de 5 min a 72°C

4.23 Sistema de dos híbridos en levadura.

El sistema de dos híbridos en levadura es una técnica molecular ampliamente utilizada para comprobar la interacción entre dos proteínas (Golemis *et al.*, 1996; Gyrus, *et al.*, 1996). En esta metodología se construyen proteínas híbridas (quiméricas) compuestas por un dominio de unión a DNA (DNA Binding Domain) o el dominio de activación (Activation Domain) de un factor de transcripción fusionados a una o dos proteínas que interactúan entre sí, y que son denominadas como el dominio anzuelo "bait" y el dominio presa "prey". Si células de levadura se someten a transfección con genes codificadores de ambos híbridos, las porciones carnada y pez de las proteínas quiméricas interactúan entre sí para producir un activador transcripcional funcional (figura 11, panel b). Un extremo de este complejo proteico se fija a la secuencia de activación corriente arriba (UAS) de un gen de prueba (por ejemplo, el gen HIS3); el otro extremo, compuesto por el dominio de activación, estimula el ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción en el promotor. En el caso de que las proteínas quiméricas no interactúen entre sí, no habrá

expresión de actividad transcripcional que desencadene ningún ensamblaje (figura 11, panel a).



Básicamente el sistema de dos híbridos que nosotros montamos involucró cuatro pasos principales:

1. Construcción del plásmido anzuelo, que involucró clonar en el plásmido pHyBLex/Zeo dos construcciones:

- C7: proteína Cry11A completa.
- C10: dominios II y III de Cry11A. Dado que el dominio I está involucrado en el proceso de formación de poro, se decidió hacer una construcción donde solo los

dominios II y III, involucrados en el proceso de unión, fueran clonados. De esta manera, se intentaría ver la posible interacción con la toxina Cyt1A basándonos únicamente en su interacción con dominio II y III.

2. *Construcción del plásmido presa*, que en nuestro caso involucró clonar en el plásmido pYESTrp2 la proteína Cyt1A completa y fragmentos pequeños de la misma (figura 13), esto último con el fin de identificar la región mínima de interacción de Cyt1A con la proteína Cry11A completa y con los dominios II y III.

3. *Cotransformación de ambos plásmidos en levadura.*

4. *Detección de interacciones positivas por selección en placa y determinación de expresión de β -galactosidasa.*

Las dos construcciones del plásmido anzuelo con la toxina Cry11A completa y los dominios II y III fueron realizadas en colaboración con el Dr. Jiang Guang Sun, usando el plásmido pHybLex/Zeo (figura 12).

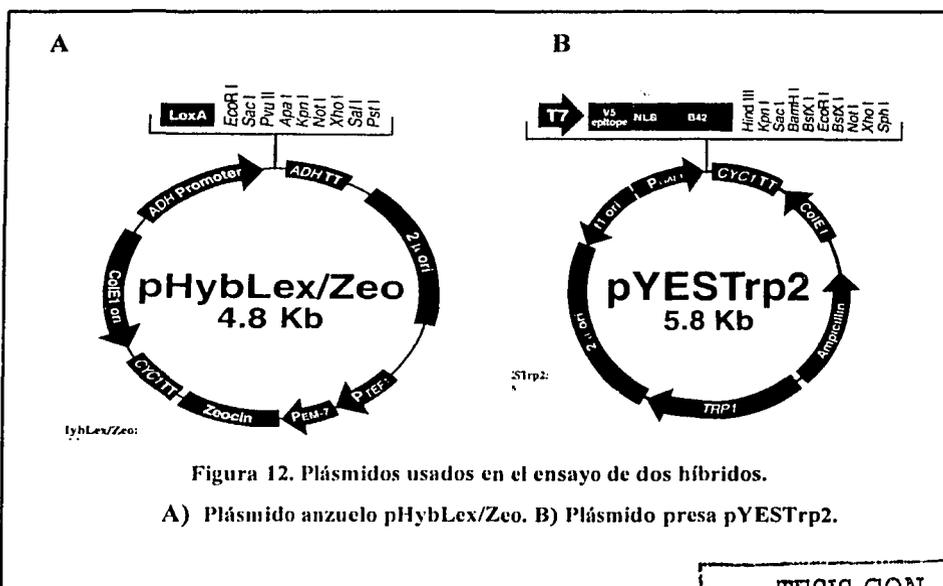
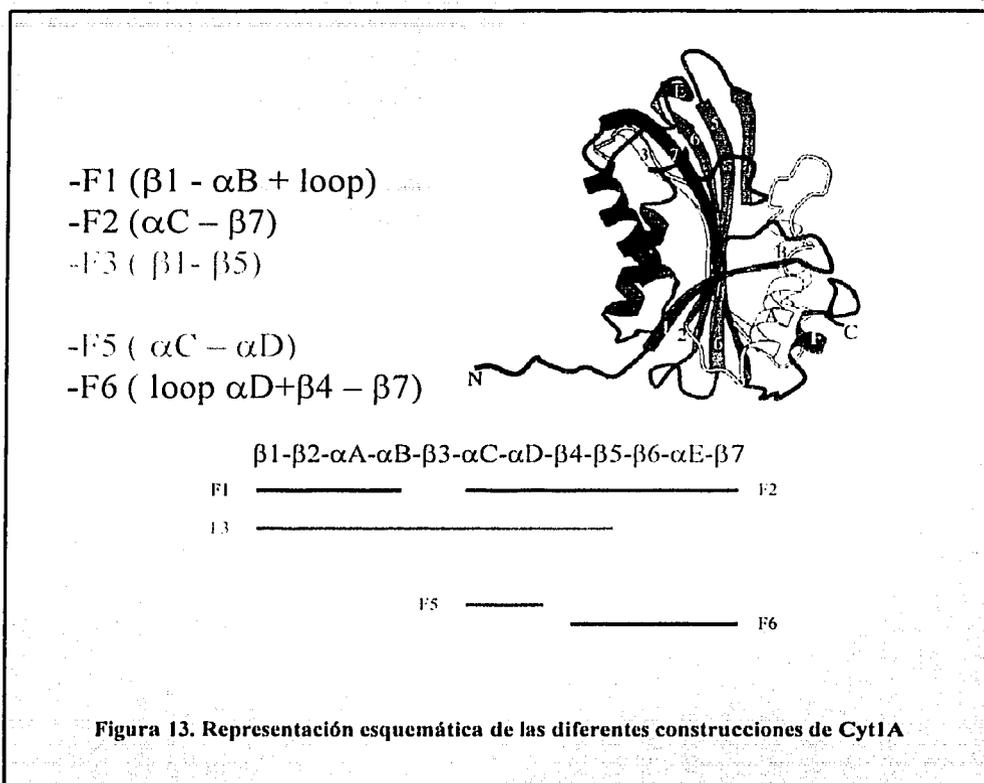


Figura 12. Plásmidos usados en el ensayo de dos híbridos.
 A) Plásmido anzuelo pHybLex/Zeo. B) Plásmido presa pYESTrp2.

Por otro lado, para llevar a cabo las construcciones que involucran el plásmido presa se desarrolló la siguiente estrategia. El vector pYESTrp2 (figura 12) se purificó y digirió ocupando las enzimas de restricción KpnI y SphI. Simultáneamente, por PCR se amplificaron los diferentes fragmentos de Cyt1A (figura 13), para posteriormente purificarlos y digerirlos con las enzimas KpnI y SphI (Biolabs). Los fragmentos puros y digeridos de la toxina Cyt1A se clonaron en el plásmido pYESTrp2, y con esta construcción se procedió a transformar la cepa XL-10gold de *E. coli*, bajo selección de ampicilina. Las clonas positivas fueron recuperadas en medio LB ampicilina (100 µg/ml) para posteriormente extraer su DNA, el cual fue nuevamente digerido por KpnI y SphI, para asegurar la presencia de los fragmentos deseados.

A partir de este momento, se trabajó con el DNA de las clonas confirmadas como positivas, y con éste y el proveniente de las construcciones C7 y C10 se cotransformó la cepa de levadura *S. cerevisiae* L40, que en su forma silvestre, requiere de los aminoácidos histidina, leucina, triptofano y de la base nitrogenada adenina, para poder crecer. Por ello es que las transformantes positivas se seleccionaron en placa mediante uso de zeocina (300 µg/ml), His⁻ y Trp⁻. El antibiótico zeocina es el marcador de resistencia del plásmido anzuelo, la histidina es el marcador de auxotrofia determinado para la levadura L40 y el triptofano es el marcador de resistencia del plásmido presa. Solo si las colonias son capaces de crecer en ausencia de triptofano y en presencia de zeocina, se puede asegurar que se logró la incorporación de los dos plásmidos en la levadura. Sin embargo, esto no basta para que las colonias sean consideradas como candidatas positivas de interacción. Solo si las transformantes son capaces de crecer en ausencia del marcador de auxotrofia Histidina y por ensayo de β-galactosidasa generan coloración azul (por activación de la transcripción), se podrá considerar a las transformantes como candidatas positivas de interacción.



4.2.4 Transformación de levadura.

Un cultivo de doce horas de *S. cerevisiae* L40 fue subcultivado a ($DO_{600}=0.07$) en medio YDPA y crecido a 30°C hasta conseguir una DO_{600} de 0.5. Posteriormente se recuperó el cultivo centrifugando a $3000 \times g$ por 1'. Se agregó al pellet de células los siguientes reactivos: 240 μl de PEG-3350 al 50%, 36 μl de LiAc 1.0 M, 50 μl de ss-DNA (2 mg/ml), 10 μl del DNA deseado (0.1-5.0 μg) y 24 μl de agua MQ estéril. Se agitó vigorosamente para resuspender. Se incubó 30' a TA y posteriormente se dio un choque térmico a las células en un baño de agua a 42°C por 30'. Se centrifugaron las células a la

velocidad máxima de una microcentrífuga por 1 min y se removió la mezcla de transformación. Se agregaron 500 µl de medio YPDA y resuspendieron suavemente con micropipeta. Se pasó esta mezcla a un tubo de vidrio, al cual se le agregaron 1.5 ml más de YPDA. Se dejó incubar 3 hr. a 30°C. Se centrifugó en microcentrífuga a máxima velocidad por 1' y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió suavemente con micropipeta en 500 µl de agua estéril. Se platearon cinco cajas en el medio de selección SC con los aminoácidos y antibiótico correspondientes. En una 200 µl, en dos 100 µl y en las dos restantes 50 µl, esto con el fin de elegir aquella en donde se observaran colonias aisladas. Se incubó a 30°C durante 4 a 6 días. (Agatep *et al.*, 1998).

4.25 Extracción de DNA plasmídico a partir de levadura.

Se creció la levadura *S. cerevisiae* L40 en 1.5 ml de medio YPDA por 12 horas. Se recuperaron las células por centrifugación, 5000x g, por 5'. Después se resuspendió en 100 µl de buffer STET (8% de sacarosa, 50 mM de Tris pH 8.0, 50 mM de EDTA, 5% de triton X-100) y se agregaron 0.2 g de perlas de vidrio de 0.45 mm. Se agitó vigorosamente por 5'. Después se adicionaron 100 µl más de STET, volviendo a agitar brevemente con vórtex y se colocó en un baño de agua hirviendo por 3'. Se enfrió en hielo por unos segundos y se centrifugó 10' a 4°C. Se transfirieron 100 µl del sobrenadante a un tubo que contenía 50 µl de 7.5 M de acetato de amonio, precongelado a -20°C por 1 hr., y se centrifugó por 10' a 4°C. Se agregaron 100 µl del sobrenadante a 200 µl de etanol precongelado y se recuperó el DNA por centrifugación. Se lavó con 70% de etanol y se recuperó el DNA por centrifugación. Se seca el pellet obtenido y se resuspende en 200 µl de buffer TE. De dicho DNA, se usaron 10 µl para transformar células competentes de *E. coli*.

4.26 Prueba cualitativa de expresión de β-galactosidasa en levadura (ensayo de filtro).

Se agregó nitrógeno líquido a un contenedor. Se colocó un trozo de membrana de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham) sobre las colonias de levaduras a probar. Se preparó una caja petri con 3.5 ml de buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.0) y 350 µl de X-gal 20 mg/ml. Se mezcló bien y luego se colocó

cuidadosamente papel filtro Whatman #1 sobre la solución de buffer Z y X-gal tratando de evitar la formación de burbujas. Se removió cuidadosamente la nitrocelulosa que está sobre las colonias y se colocó dentro del contenedor con nitrógeno líquido. Se dejó flotar sobre papel aluminio por 30" y posteriormente se hundió por 5". Se retiró la nitrocelulosa y se esperó a que el filtro se descongelara. Posteriormente se colocó cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa sobre el papel filtro (siempre con las colonias viendo hacia arriba) evitando hacer burbujas. Se cubrió la caja petri con aluminio y luego se incubó a 30°C y se esperó a que se muestre la coloración azul característica de la prueba, la cual puede darse en los primeros 30' ó hasta 12 horas después, dependiendo la intensidad de la interacción.

5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación involucran tres secciones:

- Bioensayos y pruebas de sinergismo entre Cry11A y Cyt1A
- Ensayos de unión y formación de poro de Cry11A y Cyt1A usando vesículas de membrana de microvellosidad apical (VMMAs) de *A. aegypti*.
- Ensayos para la determinación de posibles interacciones proteína/proteína a partir de experimentos tipo ligand blot, sistema de dos híbridos en levadura y detección de toxinas marcadas con FITC por microscopía de fluorescencia en intestino de *A. aegypti*.

Los dos primeros apartados se relacionan directamente con el análisis detallado del mecanismo de acción de las δ -endotoxinas Cry y Cyt de manera individual y en forma conjunta. El último apartado, por su parte, está más enfocado a demostrar y soportar la hipótesis presentada en el trabajo sobre la interacción proteína-proteína que puede llevarse a cabo entre estas dos δ -endotoxinas de Bti, y que de alguna manera, pudiera favorecer el sinergismo que se atribuye a esta combinación de toxinas.

5.1 Bioensayos y pruebas de sinergismo entre Cry11A y Cyt1A.

Los bioensayos se realizaron con larvas de 4º estadio de *A. aegypti* utilizando esporas/cristales, protoxina solubilizada y toxinas de Cry11A, Cyt1A y Bti (control positivo). Los datos obtenidos con esporas/cristales arrojaron resultados positivos (mortalidad de las larvas) además de ser reproducibles, a diferencia de los resultados obtenidos con protoxina solubilizada y toxina activada con proteasas, en donde no hubo indicio de mortalidad. Posiblemente las protoxinas y toxinas solubles son poco estables en agua y por ello pierden su actividad tóxica.

Para cada toxina de manera individual, se determinó su dosis letal media (LC₅₀) que se define como la dosis a la cual se produce la muerte del 50% de los individuos de la población total tratada. En las tablas y figuras subsecuentes, se muestran los datos obtenidos en los diferentes bioensayos para Cyt1A, Cry11A y Bti (HD916).

Dosis (ng/ml)	Ensayo 1 No. de muertos	Ensayo 2 No. de muertos	Ensayo 3 No. de muertos	Ensayo 4 No. de muertos	Total de muertos	% mortalidad promedio
5000	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100
4500	10/10	10/10	9/10	10/10	39/40	97.5
4000	9/10	9/10	8/10	8/10	34/40	85
3500	6/10	7/10	9/10	8/10	30/40	75
3000	6/10	5/10	5/10	5/10	21/40	52.5
2500	5/10	4/10	3/10	5/10	17/40	42.5
2000	3/10	3/10	3/10	5/10	14/40	35
1500	1/10	2/10	2/10	2/10	7/40	17.5
1000	2/10	1/10	1/10	1/10	5/40	12.5
500	1/10	0/10	0/10	2/10	3/40	7.5

Tabla 4. Toxicidad de Cyt1A contra larvas de *A. aegypti*

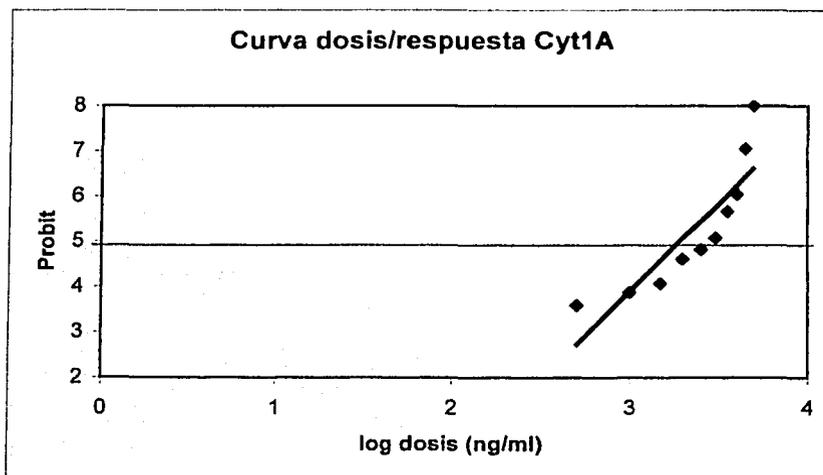


Figura 14. Análisis Probit de la respuesta de la toxina Cyt1A contra larvas del 4º. estadio de *A. aegypti*.

A partir de los datos de la tabla 4 y distribuyéndolos en una curva dosis respuesta basada en la prueba Probit, donde el porcentaje de mortalidad se establece ahora como unidades Probit y la unidad Probit 5 corresponde al 50% de la población muerta (figura 14), se determinó por el programa POLO de LeOra para Windows, que la LC₅₀ para la toxina Cyt1A fue de 2268.70526 ng/ml (límites: 1665.777 a 2923.978), cantidad que en comparación con las dosis letal de otras toxinas Cry activas contra mosquitos (LC₅₀ Cry4B=467 ng/ml, Crickmore *et al.*, 1995) es muy elevada, por lo que se puede concluir que esta toxina es prácticamente inocua contra larvas del 4° estadio de *A. aegypti*. Los valores estadísticos arrojados por el programa POLO para los bioensayos con Cyt1A se muestran esquematizados a detalle en el apartado de Anexos (página 115).

La LC₅₀ para Cry11A tomando en consideración los datos de la tabla 5, la curva de análisis Probit de la figura 15 y el resultado arrojado por el programa POLO sería de 468.60784 ng/ml (límites: 366.426 a 579.272). Este valor es 5 veces menor que la LC₅₀ de Cyt1A, por lo que se puede concluir que la toxina Cry11A es más tóxica que la Cyt1A. El desplazamiento de la curva de 3.3 log dosis para Cyt1A a 2.6 log dosis para Cry11A apoya la afirmación anterior. Los valores arrojados por el programa POLO para los bioensayos con Cry11A se muestran esquematizados a detalle en el apartado de Anexos (página 117).

Dosis (ng/ml)	Ensayo1 No. de muertos	Ensayo2 No. de muertos	Ensayo3 No. de muertos	Ensayo4 No. de muertos	Total de muertos	% mortalidad promedio
1000	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100
900	9/10	8/10	10/10	10/10	37/40	92.5
800	7/10	9/10	9/10	9/10	34/40	85
700	7/10	7/10	6/10	5/10	30/40	75
600	5/10	5/10	4/10	5/10	19/40	47.5
500	4/10	4/10	3/10	4/10	15/40	37.5
400	4/10	2/10	5/10	2/10	13/40	32.5
300	2/10	3/10	3/10	2/10	10/40	25
200	1/10	2/10	1/10	1/10	5/40	12.5
100	1/10	0/10	0/10	1/10	2/40	5

Tabla 5. Toxicidad de Cry11A contra larvas de *A. aegypti*

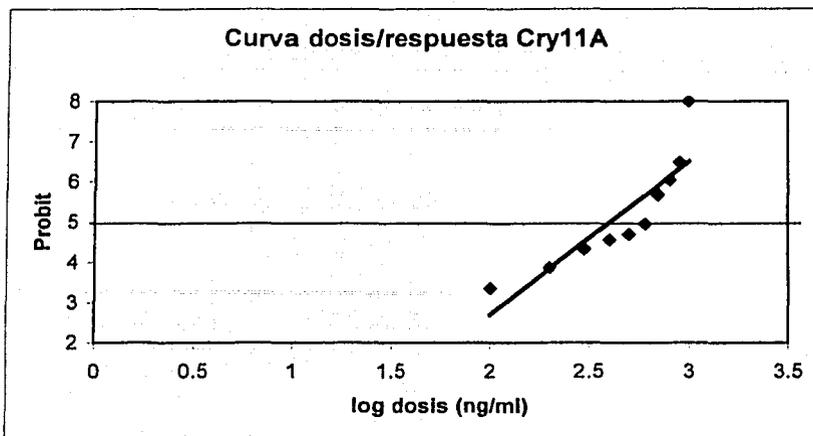


Figura 15. Análisis Probit de la respuesta de la toxina Cry11A contra larvas del 4º. estadio de *A. aegypti*.

En el caso de Bti, que es la cepa nativa que contiene las toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A, el efecto tóxico fue más elevado, lo cual es de esperarse, pues se trata del cristal paraesporal completo. Los altos porcentajes de mortalidad obtenidos a dosis bajas (25 ng/ml), se muestran en la tabla 6.

Dosis (ng/ml)	Ensayo1 No. de muertos	Ensayo2 No. de muertos	Ensayo3 No. de muertos	Ensayo4 No. de muertos	Total de muertos	%mortalidad promedio
25	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100
22.5	10/10	10/10	10/10	9/10	39/40	97.5
20	9/10	9/10	9/10	9/10	36/40	90
17.5	9/10	9/10	8/10	9/10	35/40	87.5
15	8/10	8/10	9/10	7/10	32/40	80
12.5	7/10	7/10	6/10	5/10	25/40	62.5
10	5/10	5/10	5/10	5/10	20/40	50
7.5	4/10	5/10	4/10	4/10	17/40	42.5
5	3/10	4/10	4/10	3/10	14/40	35
2.5	2/10	4/10	2/10	2/10	10/40	25

Tabla 6. Toxicidad de Bti contra larvas de *A. aegypti*

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

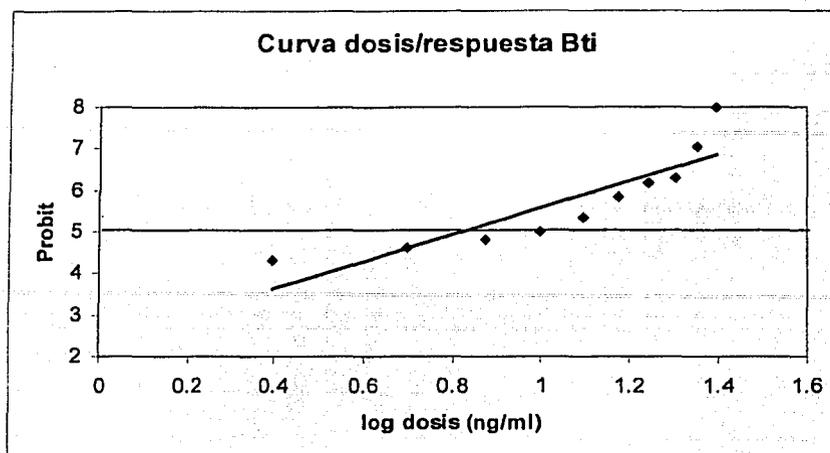


Figura 16. Análisis Probit de la respuesta de Bti contra larvas del 4º. estadio de *A. aegypti*.

El desplazamiento de la curva normalizada para Bti a un valor de 0.8 log dosis (figura 16) fue considerable en comparación al mostrado por Cry11A (log dosis 2.6) y Cyt1A (log dosis 3.3), mostrando así el alto grado de toxicidad de la cepa nativa. En este caso la LC_{50} determinada por el programa polo fue de 7.001 ng/ml (límites: 4.874 a 8.953), casi 300 veces más toxica que la proteína Cyt1A y 60 veces más toxica que Cry11A. Los valores estadísticos arrojados por el programa POLO para los bioensayos con Bti se muestran esquematizados a detalle en el apartado de Anexos (página 118).

Con el fin de investigar el posible efecto sinérgico entre Cyt1A y Cry11A, se realizaron bioensayos con mezclas de ambas toxinas. Ocupando larvas del 4º estadio de *A. aegypti* y tomando en cuenta los porcentajes de mortalidad ya mencionados, se efectuó un nuevo experimento, en el cual se inició con una dosis (150 ng/ml) que individualmente proporcionaba aproximadamente el 10% de muerte con Cry11A, y a partir de dicho punto, se agregaron dosis crecientes de la toxina Cyt1A, que de manera individual, son totalmente inocuas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7 y gráfica 17:

Dosis (ng/ml) Cry:Cyt	Ensayo1 No. de muertos	Ensayo2 No. de muertos	Ensayo 3 No. de muertos	Ensayo4 No. de muertos	Total de muertos	% mortalidad promedio
150:0	2/10	1/10	1/10	1/10	5/40	12.5
150:50	4/10	5/10	5/10	3/10	17/40	42.5
150:100	5/10	6/10	5/10	5/10	21/40	52.5
150:150	5/10	7/10	7/10	7/10	26/40	65
150:200	9/10	8/10	10/10	10/10	37/40	92.5
150:250	10/10	10/10	10/10	10/10	40/40	100

Tabla 7. Toxicidad de las combinaciones de Cry y Cyt contra larvas de *A. aegypti*

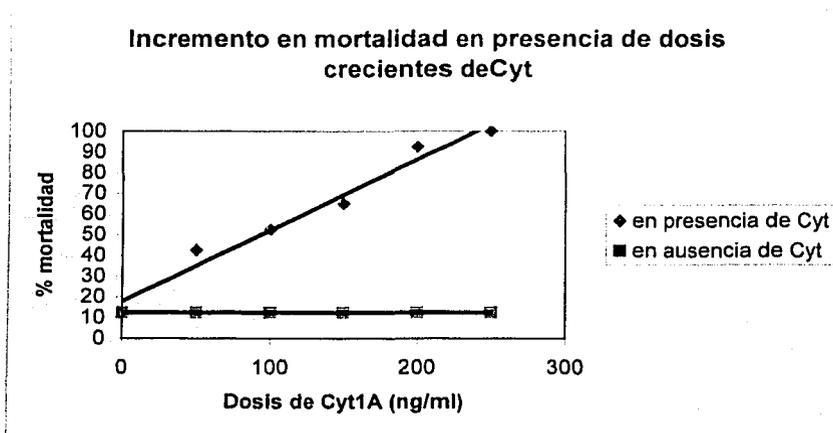


Figura 17. Curva de dosis respuesta de Cry11A y Cyt1A en combinación contra larvas de *A. aegypti*.

Como se puede observar en la tabla 7 y gráfica 17, manteniendo una dosis constante de Cry11A de 150 ng/ml, que causa el 12.5% de mortalidad, y adicionando dosis crecientes de Cyt1A (que teóricamente no rebasan el 6% de mortalidad a la máxima concentración), la actividad tóxica hacia larvas del 4º estadio de *A. aegypti* se incrementó notablemente. Por ejemplo, en el caso de la combinación de 150 ng/ml de Cry11A (12.5% mortalidad) y 100 ng/ml de Cyt1A (2.3% mortalidad), teóricamente tendríamos un valor de 14.8% de mortalidad. Sin embargo, en el bioensayo se obtuvo un 52.5% de mortalidad (tabla 7). El efecto anterior no podría ser de ningún modo aditivo, pues la mortalidad que se obtiene para ambas toxinas (52.5%) supera en mucho la suma teórica de 14.8%, lo cual demuestra

el sinergismo existente entre las toxinas Cry11A y Cyt1A a partir de bioensayos, incluso a dosis que son inocuas de manera individual.

La curva de normalización por Probit (figura 18) de la combinación obtenida con Cry11A y Cyt1A muestra que la recta de la combinación de Cry+Cyt está desplazada hacia la izquierda de lo que se observaba con las toxinas de forma individual, llegando a un valor de 1.8 log dosis. No obstante, su desplazamiento no es tan pronunciado como el que mostró Bti (0.8 log dosis), por consiguiente, se confirma el hecho de que las toxinas Cry11A y Cyt1A de Bti actúan sinérgicamente cuando se encuentran juntas, pero no presentan un efecto superior al observado usando el cristal nativo completo, que además contiene las toxinas Cry4A y Cry4B

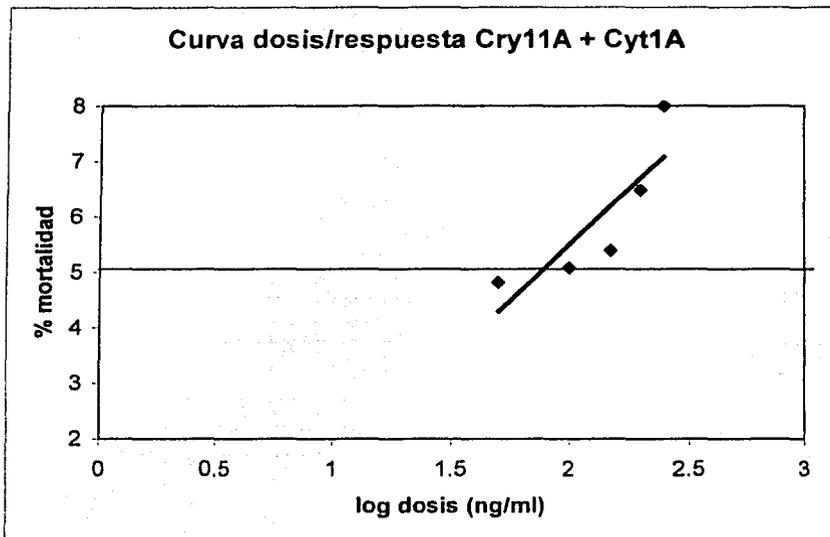


Figura 18. Curva logarítmica dosis respuesta de la combinación de Cry11A + Cyt1A contra larvas de *A. aegypti*.

En resumen, la actividad individual de Cry11A y Cyt1A contra larvas del 4º. estadio de *A. aegypti* en comparación a lo que se observa con el cristal paraesporal completo de Bti, fue significativamente menor. La toxina Cry fue más tóxica que la Cyt, y usadas en

combinación, generan un efecto sinérgico entre estas dos toxinas, mostrando una efectividad muy elevada (tabla 8 y figura 19).

Esporas/Cristales	Dosis letal media (ng/ml)
Cyt1A	2268.7
Cry11A	468.6
Bti	7.0

Tabla 8. Valores de LC₅₀ obtenidos para Cry, Cyt y Bti

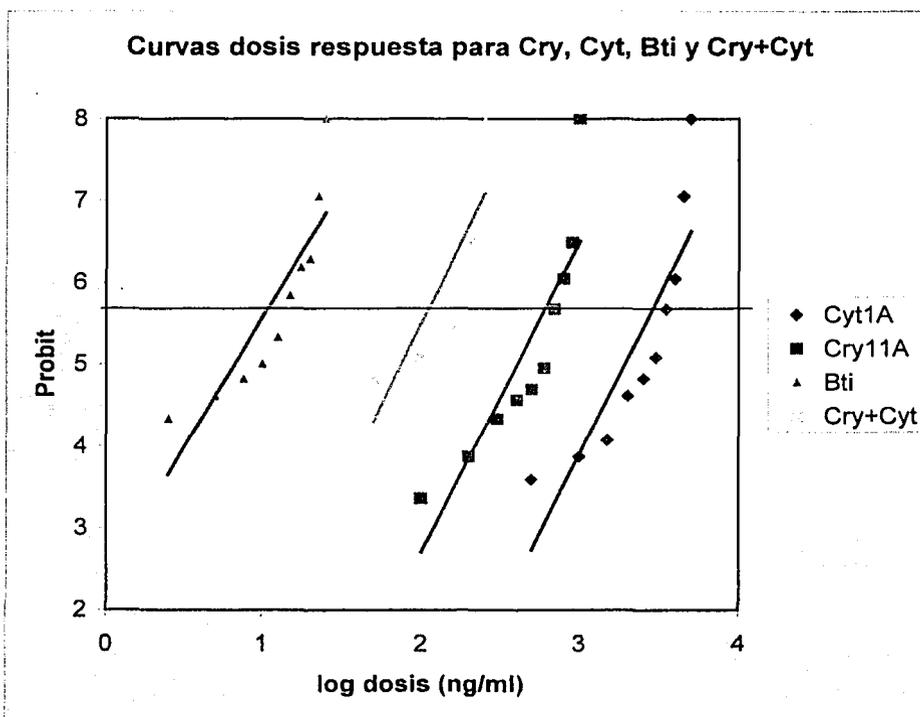


Figura 19. Análisis Probit comparativo de las curvas de toxicidad de Cry11A, Cyt1A, Bti y Cry11A+Cyt1A contra larvas del 4º. estadio de *A. aegypti*.

5.2 Ensayos de unión y formación de poro de Cry11A y Cyt1A en VMMA de *A. aegypti*.

El objetivo de estos ensayos fue estudiar *in vitro* los diferentes pasos en el mecanismo de acción general de las toxinas Cry. Es importante recordar, que en la actualidad, la mayoría de los avances en los estudios sobre mecanismo de acción de dichas toxinas se debe a estudios de toxinas tipo Cry1 activas contra insectos lepidópteros, siendo el área de toxinas contra dípteros, poco estudiada. De ahí la importancia de la realización de este tipo de pruebas experimentales.

Como se mencionó en la introducción, el mecanismo de acción general de las δ -endotoxinas Cry abarca cinco pasos principales:

- 1. Producción de δ -endotoxinas que serán ingeridas por el insecto blanco.**
- 2. Solubilización de protoxina.**
- 3. Procesamiento para la obtención de proteína activa.**
- 4. Unión de toxina a la parte apical del intestino medio del insecto blanco.**
- 5. Formación de poro.**

5.2.1. Producción de δ -endotoxinas.

Como primer punto importante, se requirió producir las toxinas de interés a partir de Bt para posteriormente purificarlas y procesarlas, a fin de ser útiles en los ensayos. Para ello se hizo uso de las cepas de Bt que producen las δ -endotoxinas Cry11A (Bt CG6 pWF26) y Cyt1A (Bt 4Q7 pWF45). Se favoreció su esporulación, así como la producción de cristales inoculando las cepas en medio mínimo SP, que contiene sales minerales como $MgSO_4$, $MnCl_2$, KCl , $FeSO_4$ y $CaCl_2$. Posteriormente los cristales se purificaron por gradiente de sacarosa según protocolo de Thomas y Ellar, 1983. Las muestras se observaron al microscopio y también por gel de acrilamida al 12% (dato no mostrado) para verificar la presencia de las proteínas deseadas. Una vez realizado lo anterior, se llevó a cabo el procesamiento de las proteínas, que consta de dos pasos importantes: solubilización y activación proteolítica.

5.2.2. Solubilización de protoxina.

Por experiencia previa en el trabajo con toxinas del grupo Cry1, se comenzó a trabajar con buffer carbonatos para lograr la solubilización de las toxinas, pero dicho proceso solo fue adecuado para la toxina Cyt1A, mientras que para Cry11A se tuvo que utilizar NaOH 0.01M (figura 20). Las condiciones específicas a las cuales se solubilizó cada una de las protoxinas se resumen en la tabla 9.

TOXINA	BUFFER	TEMPERATURA	TIEMPO
Cry11A	NaOH 0.01M	4°C	60'
Cyt1A	Carbonatos 0.05 M + 0.01 M DTT	37°C	60'

Tabla 9. Condiciones de solubilización para los cristales de Cry11A y Cyt1A

La protoxina de Cry11A también puede ser solubilizada en NaOH 200 mM, 5 min a TA (temperatura ambiente), pero el rendimiento fue mucho menor. La concentración de DTT reportada para Cyt1A varía entre 1-15 mM, pero los resultados idóneos en cuanto a rendimiento se obtuvieron con la concentración de 10 mM.

5.2.3. Activación proteolítica.

El procesamiento proteolítico de las toxinas se optimizó para cada caso en particular. Por medio de la realización de curvas de procesamiento con la proteasa específica se pudo llegar a una proporción de enzima:proteína óptima para la obtención de la toxina activa. En el caso de Cry11A, a una relación de 1:50, enzima:proteína, ocupando tripsina, se obtuvieron los fragmentos esperados de 36 y 32 kDa (figura 20), los cuales forman un heterodímero activo (Dai y Gill, 1992). En el caso de Cyt1A, se utilizó proteinasa K, en una relación 1:20, enzima:protoxina, que generó un fragmento activo de aproximadamente 25 kDa (figura 20). Las condiciones específicas de procesamiento proteolítico se resumen en la tabla 10.

TOXINA	Proporción enzima/ptox	TEMPERATURA	TIEMPO	ENZIMA
Cry11A	1:50	37°C	30 min	Tripsina
Cyt1A	1:20	TA	30 min	proteínasa K

Tabla 10. Condiciones de procesamiento proteolítico para Cry11A y Cyt1A.

La toxina Cyt1A puede activarse con tripsina en una relación de 1:50, enzima:proteína, a 37°C durante 30 min, sin embargo, con dicha enzima solo se obtiene procesamiento en la región N-terminal, lo cual, no basta para su completa activación. Por ello, es recomendable trabajar con proteínasa K, que corta tanto el extremo N como el C-terminal. (Said *et al.*, 1995)

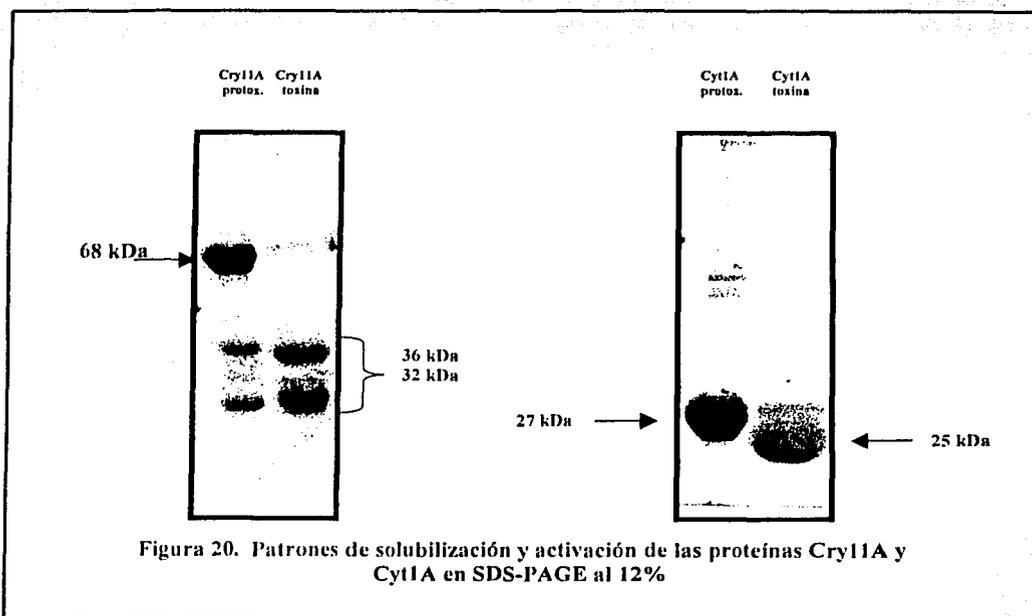


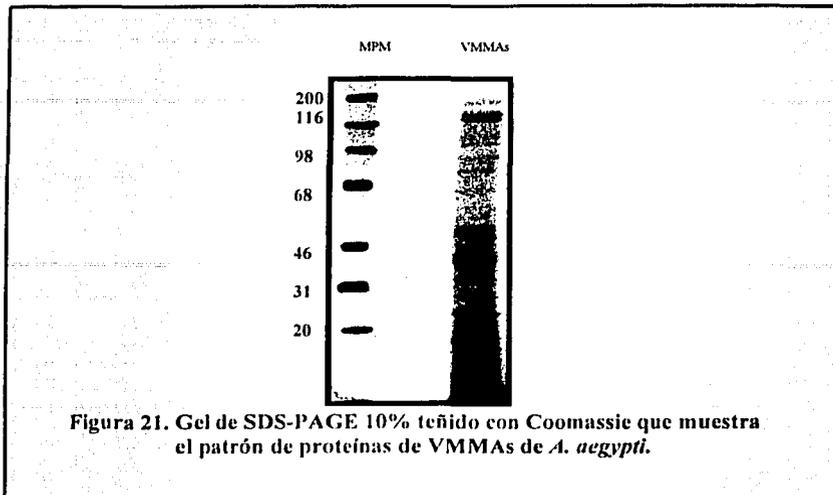
Figura 20. Patrones de solubilización y activación de las proteínas Cry11A y Cyt1A en SDS-PAGE al 12%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.4. Unión de toxina a la microvellosidad apical de la membrana del intestino medio de *A. aegypti*.

Para analizar la unión de las toxinas Cry11A y Cyt1A a las VMMA de *A. aegypti* y estudiar si ambas proteínas pueden competir la unión a sus receptores naturales, se utilizó el ensayo de unión en suspensión. Dicho ensayo permite observar la interacción entre las toxinas Cry o Cyt con proteínas presentes en las VMMA de *A. aegypti*. El experimento consistió en incubar las VMMA con la toxina Cry o Cyt previamente marcadas con biotina en presencia o ausencia de excesos molares de toxinas sin marcar. Una competencia homóloga se define como el ensayo donde se utiliza como competidor la misma toxina sin marcar. La competencia heteróloga, por su parte, es el ensayo donde se usa como competidor una toxina diferente a la marcada. La toxina que no se unió, y que por lo tanto quedó en suspensión, se separó mediante centrifugación, en donde solo precipitan las VMMA. La toxina unida a las VMMA de *A. aegypti* se visualizó después de separar por SDS-PAGE al 12% y transferir el complejo de proteínas a una membrana de nitrocelulosa, que fue incubada con estreptavidina acoplada a peroxidasa (SAPO) para que la señal obtenida pueda detectarse por reactivos quimioluminiscentes. (Bosch *et al.*, 1994)

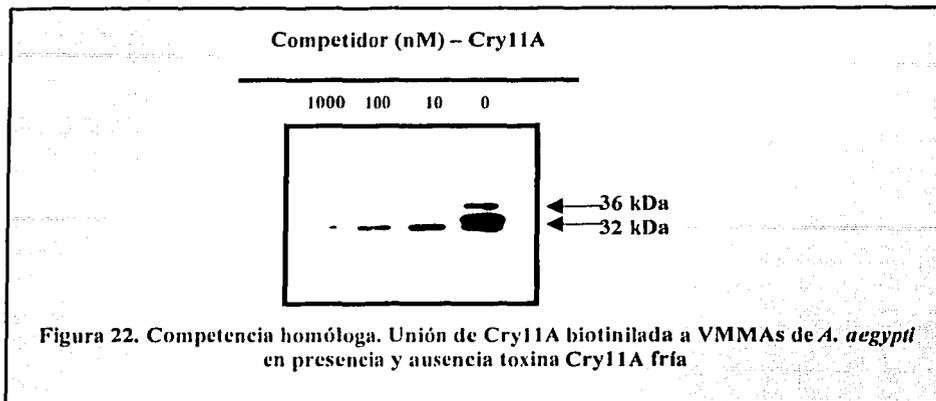
Para la realización de estos ensayos se requirió de VMMA obtenidas a partir de intestinos de *A. aegypti* en su fase larvaria. El patrón de proteínas que se obtuvo de las vesículas en un gel de SDS-PAGE al 10% presenta un gran número de proteínas, tanto de alto como de bajo peso molecular (figura 21).



Diez microgramos de VMMA de *A. aegypti* se incubaron con cada una de las toxinas biotiniladas durante 60 min, en una concentración de 10 nM, observándose unión tanto de Cry11A (figura 22) como de Cyt1A (figura 26). Al mismo tiempo, se realizaron experimentos de competencia homóloga y heteróloga con el fin de poder determinar si la interacción de las toxinas es específica y si ambas toxinas interactúan con un mismo receptor.

Los experimentos de competencia homóloga para la toxina Cry11A demostraron que la unión de Cry11A biotinilada a VMMA de *A. aegypti* fue desplazada conforme la concentración de toxina Cry11A fría aumentó (figura 22). Lo anterior nos permite concluir que la unión de la toxina Cry11A a VMMA de *A. aegypti* es altamente específica.

TESIS CON
FECHA DE ORIGEN



Con el programa Kodak 1D para análisis de imágenes, se determinó el área ocupada para cada una de las bandas mostradas en la figura 22. Al área de 3929 pixeles² que representa la unión de 10 nM de toxina Cry11A biotinilada en ausencia de Cry11A fría (competidor) se le asignó un porcentaje de 100% de unión a VMMA. A partir de dicho valor, se calculó el porcentaje de unión correspondiente en cada caso en particular (tabla 11) y se concluyó que el porcentaje de unión de 10 nM de Cry11A biotinilada disminuye conforme se incrementa la concentración de Cry11A fría (figura 23).

Concentración de Cry11A biotinilada (nM)	Concentración competidor Cry11A fría (nM)	Área de la banda (pixeles ²)	% unión
10	0	3929	100
10	10	1320	33.6
10	100	754	19.2
10	1000	260	6.6

Tabla 11. Datos de área de las bandas en competencia homóloga entre Cry11A biotinilada y Cry11A fría

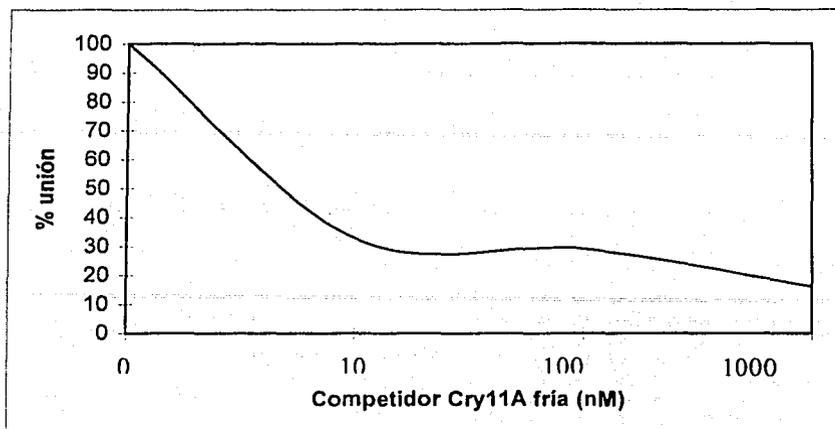


Figura 23. Afinidad de Cry11A biotinilada en presencia de competidor (Cry11A fría)

Cuando realizamos la competencia heteróloga de Cry11A biotinilada utilizando concentraciones crecientes de Cyt1A sin marcar como competidor (10, 100 y 1000 nM), se demostró que la unión de Cry11A biotinilada a VMMA de *A. aegypti* es desplazada conforme se incrementó la concentración molar de competidor (toxina Cyt1A fría), por lo que se concluye que la toxina Cyt interfiere en la unión de Cry11A a su receptor natural (figura 24). Lo anterior también está apoyado por los valores de área de las bandas arrojados por el programa Kodak 1D (tabla 12 y figura 25).

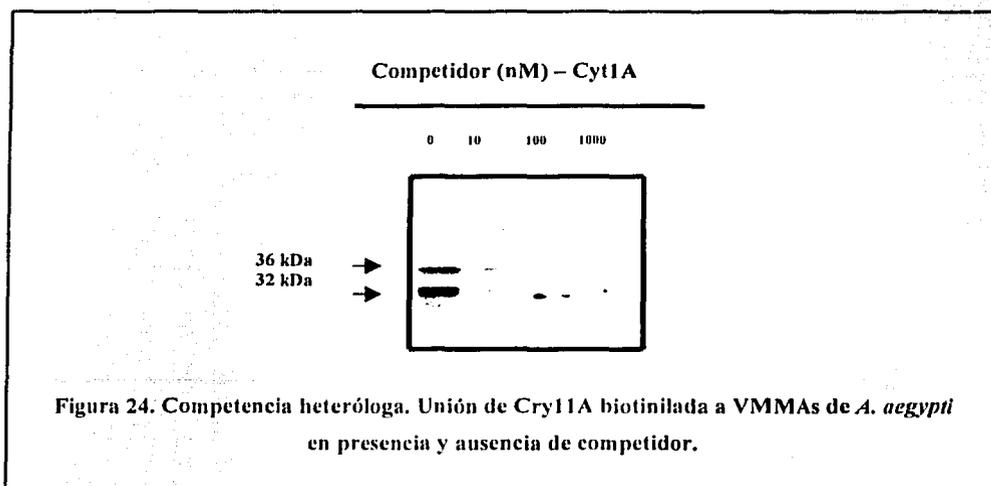


Figura 24. Competencia heteróloga. Unión de Cry11A biotinilada a VMMA de *A. aegypti* en presencia y ausencia de competidor.

Concentración de Cry11A biotinilada (nM)	concentración competidor Cyt1A fría (nM)	Área de la banda (pixeles ²)	% unión
10	0	2764	100
10	10	910	32.9
10	100	806	29.2
10	1000	447	16.2

Tabla 12. Datos de área de las bandas en competencia heteróloga entre Cry11A biotinilada y Cyt1A fría

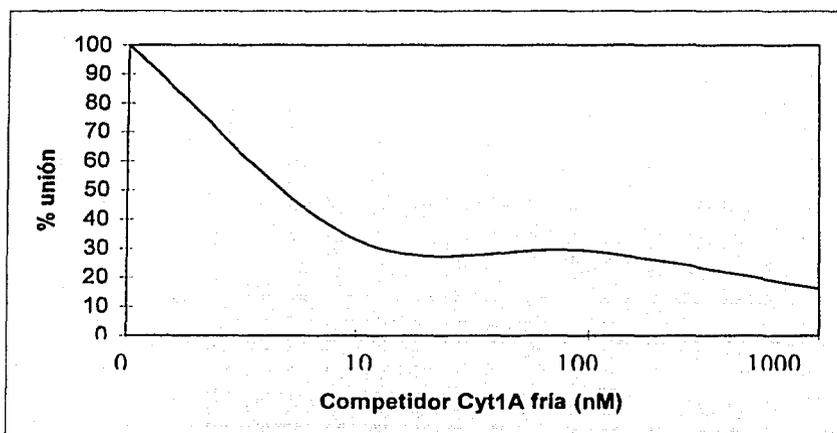
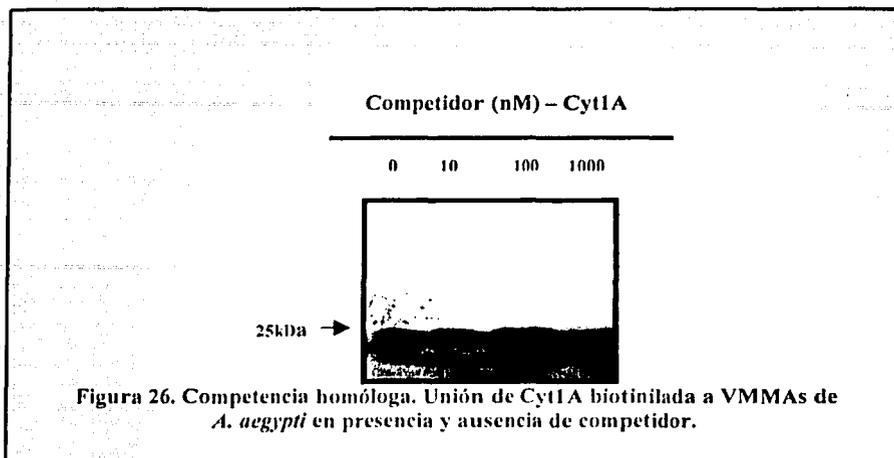


Figura 25. Afinidad de Cry11A biotinilada en presencia de competidor (Cyt1A fría)

Por otro lado, experimentos similares utilizando Cyt1A biotinilada en competencia homóloga (Cyt1A fría como competidor), se observó que la unión de Cyt1A marcada a VMMA de *A. aegypti* no fue desplazada conforme aumenta la concentración molar de toxina Cyt1A fría (figura 26), por lo que se concluye que la unión de esta toxina es inespecífica y que se está uniendo a un sitio no saturable abundante en las VMMA.



Los datos de área de las bandas confirman la afirmación anterior, y demuestran que incluso, en el caso en que se ocupa 100 nM de toxina Cyt1A fría como competidor, el área de la banda se incrementó notablemente, rebasando el valor inicial estipulado como 100% (tabla 13 y figura 27), lo que pudiera indicar agregación entre la toxinas Cyt1A.

Concentración de Cyt1A biotinilada (nM)	concentración competidor Cyt1A fría (nM)	Área de la banda (píxeles ²)	% unión
10	0	4400	100
10	10	3567	81.1
10	100	5184	117.8
10	1000	3534	80.3

Tabla 13. Datos de área de las bandas en competencia homóloga entre Cyt1A biotinilada y Cyt1A fría

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

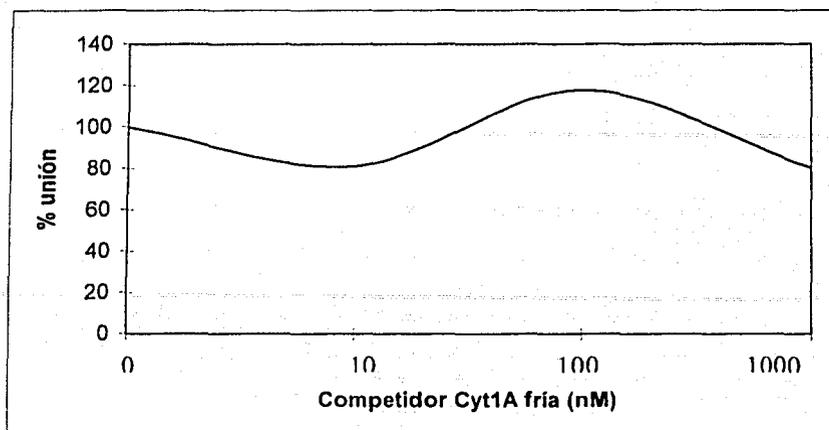


Figura 27. Afinidad de Cyt1A biotinilada a VMMA de *A. aegypti* en presencia Cyt1A fría como competidor

En el caso de los experimentos de competencia heteróloga de Cyt1A biotinilada utilizando Cry11A fría como competidor, se encontró un resultado muy similar al de la competencia homóloga, ya que la unión de Cyt1A marcada a VMMA de *A. aegypti* no fue desplazada conforme aumentó la concentración molar de la toxina Cry11A fría (competidor), por lo que se concluye que Cry11A no fue capaz de interferir en la unión de Cyt1A (figura 28). Esto mismo se demuestra con el análisis de área de las bandas (tabla 14 y figura 29).

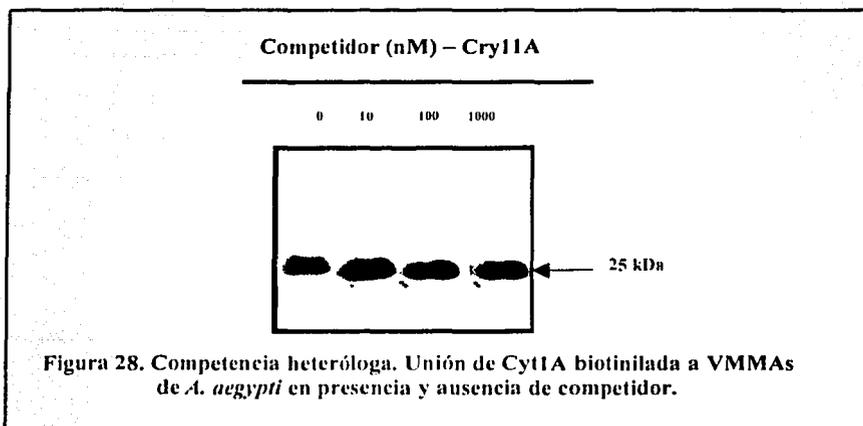


Figura 28. Competencia heteróloga. Unión de Cyt1A biotinilada a VMMA de *A. aegypti* en presencia y ausencia de competidor.

Concentración de Cyt1A biotinilada (nM)	concentración competidor Cry11A fría (nM)	Área de la banda (píxeles ²)	% unión
10	0	6570	100
10	10	6373	97.0
10	100	5727	87.2
10	1000	5808	88.4

Tabla 14. Datos de área de las bandas en competencia heteróloga entre Cyt1A biotinilada y Cry11A fría

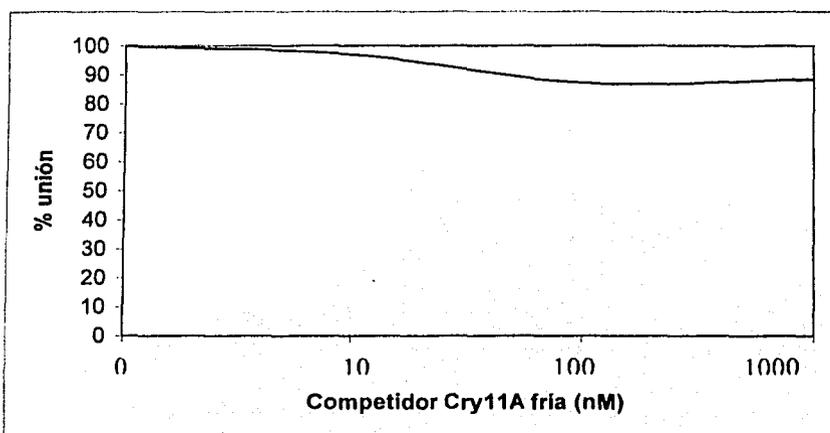
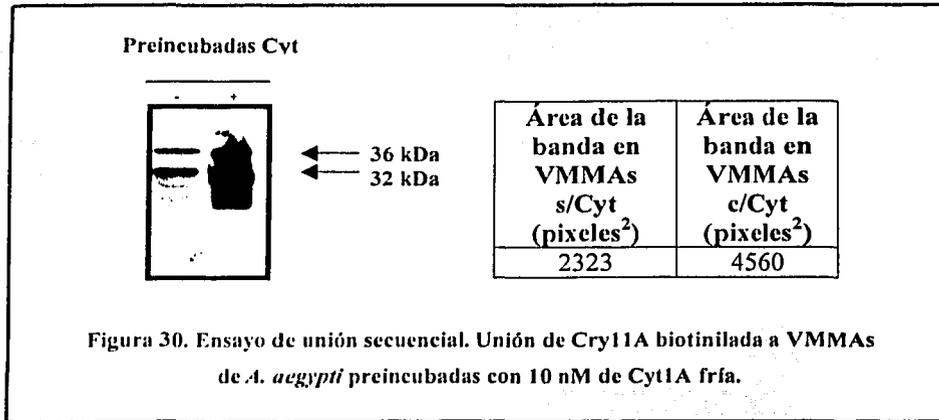


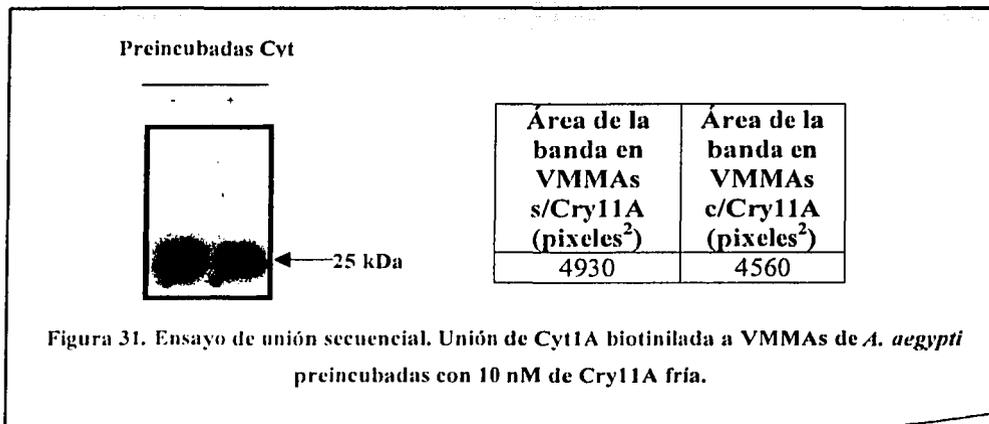
Figura 29. Afinidad de Cyt1A biotinilada a VMMA de *A. aegypti* en presencia Cry11A fría como competidor

Los resultados anteriores sugieren que existe un sitio de unión específico para la toxina Cry11A a las proteínas de la VMMA y que la toxina Cyt1A puede interferir en dicha unión. Se decidió hacer un ensayo de unión secuencial, con la finalidad de observar si el pegado de la toxina Cyt en la membrana facilita la interacción de la toxina Cry11A o la interfiere. Se preincubaron las VMMA de *A. aegypti* con 10 nM de toxina Cyt1A fría por 60', se removió la toxina no unida mediante centrifugación de las membranas, para luego observar el patrón de unión de 10 nM de toxina Cry11A biotinilada a dichas membranas. En el caso de la VMMA preincubadas con Cyt1A fría, se observó que la unión de Cry11A

se incrementó notablemente, comparando con lo que se había observado con la VMMA sin preincubar (figura 30).



Por el contrario, la preincubación de las vesículas con 10 nM de la toxina Cry11A no incrementó o modificó en absoluto la unión de la toxina Cyt1A biotinilada (figura 31) en comparación con el patrón de unión observado en vesículas sin preincubar (figura 31), por lo que se concluye que Cry11A ni interfirió, ni favoreció la unión de Cyt1A a VMMA de *A. aegypti*.



Los resultados anteriores, muestran que la toxina que interacciona específicamente con su receptor es únicamente Cry11A, y que la interacción de Cyt1A con la membrana es inespecífica. Sin embargo, la toxina Cyt1A puede favorecer la unión de Cry11A a la membrana.

Se intentó determinar el peso molecular del receptor de Cry11A a partir de un ensayo de unión a ligando o ligand blot. Este ensayo consistió en separar electroforéticamente las proteínas de las VMMA's en un gel SDS-PAGE al 10% y transferirlas a membrana PVDF (floruro de polivinilideno), para luego incubar dicha membrana con la toxina Cry11A biotinilada (Garczynski *et al.*, 1991). El resultado que obtuvimos fue que la toxina Cry11A se une a dos proteínas de las VMMA's de *A. aegypti*, una de 65 kDa y otra de 62 kDa (figura 32).

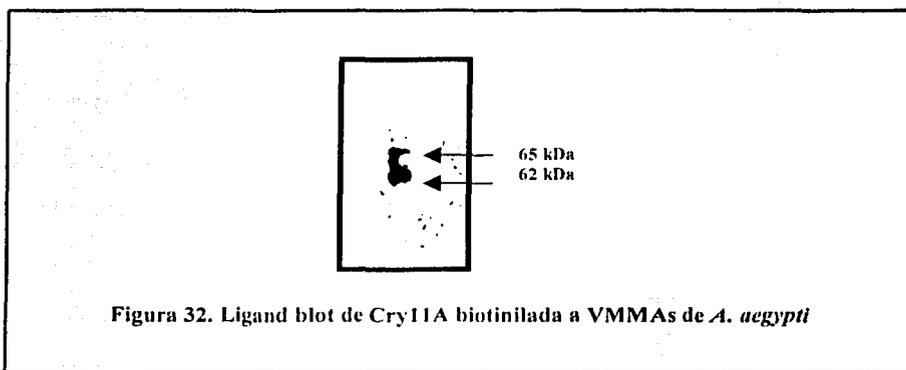


Figura 32. Ligand blot de Cry11A biotinilada a VMMA's de *A. aegypti*

5.2.5. Ensayos de formación de poro.

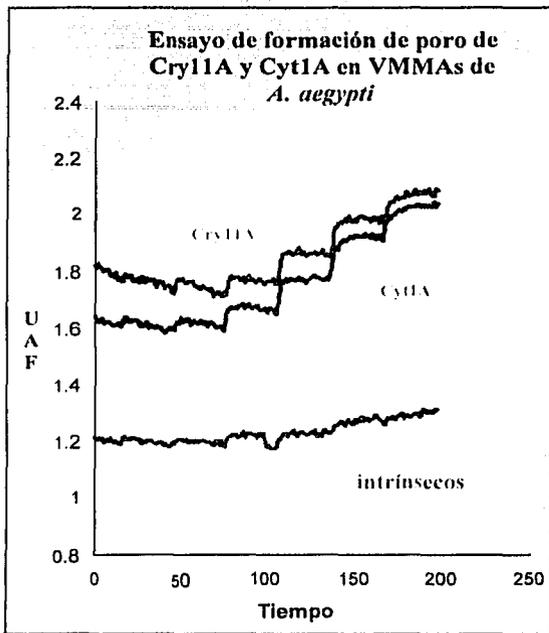
En este tipo de ensayos, la determinación de la permeabilidad a K^+ es analizada en base a cambios de fluorescencia de un colorante sensible a potencial de membrana (cianina Dis C3-5). Los cambios de potencial se producen por apertura de canales iónicos. Aunque es una medida indirecta del proceso de formación de poro, esta forma de análisis ha permitido analizar la actividad de las toxinas Cry1 contra insectos lepidópteros (Lorence, *et*

al., 1995), por ello el interés de desarrollar la técnica con toxinas activas hacia mosquitos, como Cry11A y Cyt1A.

Los ensayos se realizaron en un volumen de 900 μ l de buffer de cloruro de metilglucamina 150 mM, HEPES 10 mM a pH 7.4, 25°C con agitación constante. Posteriormente se adicionó la cianina (1.2 μ M), después 10 μ g de VMMA de *A. aegypti*, esperando a que el colorante alcance el equilibrio (1 min). Enseguida se agregó la toxina (Cry o Cyt) a una concentración de 100 nM, lo que generó una hiperpolarización desencadenada por la salida de iones K^+ del interior de la VMMA. Esta hiperpolarización induce la entrada de colorante a la vesícula y la disminución en la fluorescencia. Posteriormente se realizan adiciones crecientes de KCl (4 mM a 383 mM), que provocan depolarizaciones por la entrada de K^+ a las VMMA y movilización del colorante al exterior de la vesícula, por consiguiente aumento en la fluorescencia.

La figura 33a muestra el patrón de formación de poro para Cry11A y Cyt1A de forma individual, utilizando una concentración de 100 nM de toxina. Tanto Cry11A como Cyt1A, fueron capaces de formar poros en VMMA de *A. aegypti*. La pendiente para Cry11A (0.505) resulta mayor que la de Cyt1A (0.452), y ambas fueron mayores que el control de canales intrínsecos (0.050), lo que permite concluir que ambas toxinas forman poros en VMMA de *A. aegypti*.

Por otro lado, para inferir el efecto de las toxinas de manera conjunta, se intentó determinar la concentración a la cual Cry11A induce una actividad baja. Se probaron concentraciones de 0.1 nM de Cry11A y 0.01 nM de Cyt1A, pero aun en estas diluciones, las pendientes obtenidas eran apreciables (Cry11A=0.305; Cyt1A=0.399). Por lo tanto, aunque observamos que en combinación ambas toxinas inducen formación de poro (pendiente 0.489) en VMMA de *A. aegypti*, no podemos atribuir el efecto a un evento sinérgico entre las toxinas (figura 33b). Los cálculos para determinar las pendientes que forman las toxinas individualmente y en combinación se realizan de la misma forma en que se muestra en el apartado de Material y Métodos para valinomicina.



$$y = 0.050x + 1.675 \quad r = 0.712 \quad \square \quad \text{Int}$$

$$y = 0.452x - 6.494 \quad r = 0.951 \quad \diamond \quad \text{Cyt } 100\text{nM}$$

$$y = 0.505x + 2.927 \quad r = 0.964 \quad \circ \quad \text{Cry11 } 100\text{nM}$$

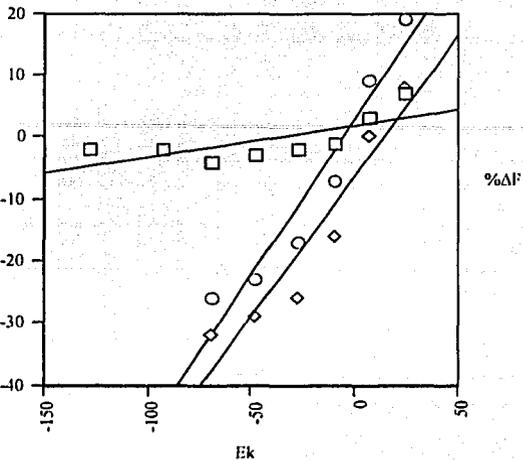
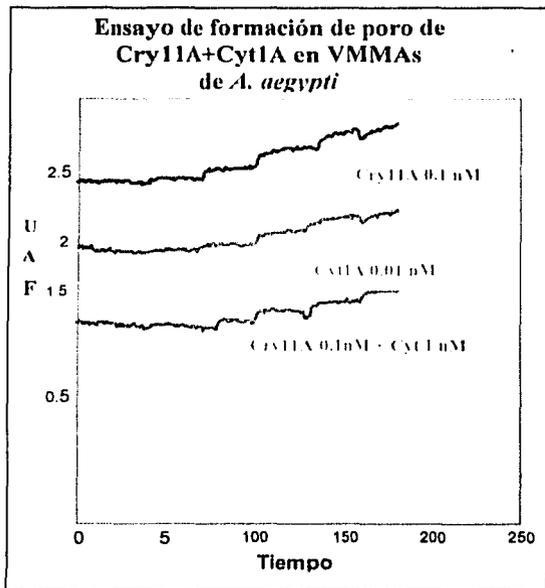


Figura 33a. Permeabilidad a K^+ a través de VMMA de *A. aegypti* para las toxinas Cry11A y Cyt1A



$$y = 0.305x + 1.305 \quad r = 0.967 \quad \square \quad \text{Cry11 } 0.1 \text{ nM}$$

$$y = 0.399x - 7.421 \quad r = 0.959 \quad \diamond \quad \text{Cyt } 0.01 \text{ nM}$$

$$y = 0.489x + 22.445 \quad r = 0.974 \quad \circ \quad \text{Cry11 } 0.1 \text{ nM} + \text{Cyt } 1 \text{ nM}$$

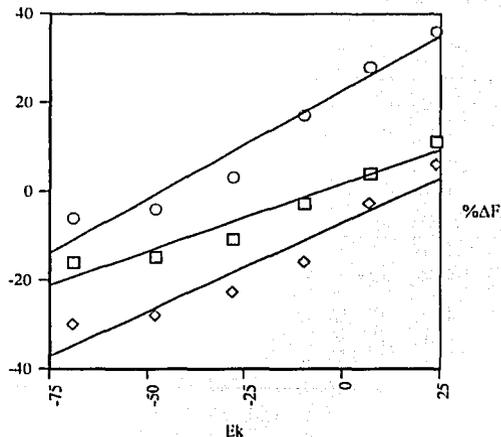


Figura 33b. Permeabilidad a K^+ a través de VMMA de *A. aegypti* para las toxinas Cry11A y Cyt1A en combinación

5.3 Ensayos para determinar la posible interacción proteína/proteína entre Cry11A y Cyt1A.

La afinidad que Cyt1A presenta por la membrana apical es considerablemente alta. Además, el reporte de Gazit, *et al.*, 1997, sobre la capacidad que tiene la toxina Cyt de interactuar con ella misma, soporta la posibilidad de que las toxinas Cry y Cyt, se reconozcan e interactúen de manera importante, induciendo el sinergismo en la toxicidad. Por ello, se diseñaron experimentos que demostraran la interacción entre estas dos toxinas.

5.3.1 Interacción entre toxinas Cry11A y Cyt1A por ensayo tipo ligand blot.

El siguiente ensayo se realizó para visualizar la posible interacción entre las toxinas Cry11A y Cyt1A en ausencia de vesículas. En un gel de SDS-PAGE al 12% se colocaron 10 µg de las toxinas Cry11A, Cyt1A, Cry1Ab y Cry1Ac (controles positivos). Las toxinas Cyt1A y Cry11A biotiniladas en una concentración de 10 nM, se incubaron con la membrana de PVDF durante 60 min. La toxina que no se unió se lavó y la unida se reveló con estreptavidina acoplada a peroxidasa (SAPO). Se observó que la toxina Cry11A biotinilada es capaz de unirse a sí misma, a otras toxinas tipo Cry y también a la toxina Cyt1A. La interacción que establece la toxina Cry11A con la toxina Cyt1A fue la más evidente, aun más que con ella misma (figura 34). Por su parte, la toxina Cyt1A biotinilada, también es capaz de unirse a sí misma y a otras toxinas tipo Cry como la Cry11A (figura 35), pero la interacción consigo misma nuevamente vuelve a ser la más importante.

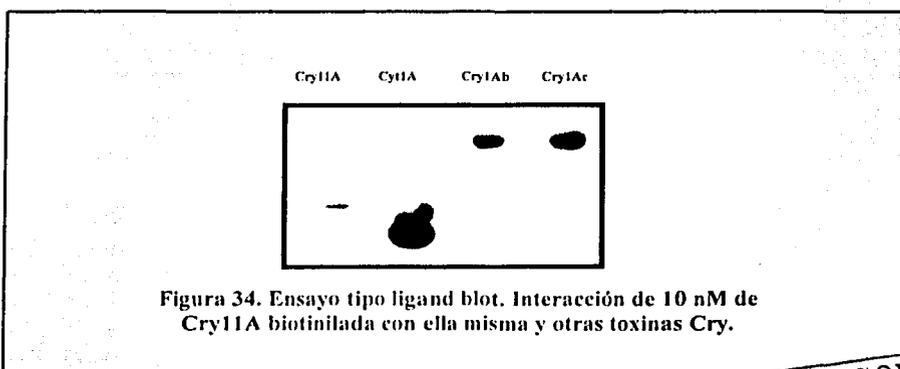


Figura 34. Ensayo tipo ligand blot. Interacción de 10 nM de Cry11A biotinilada con ella misma y otras toxinas Cry.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

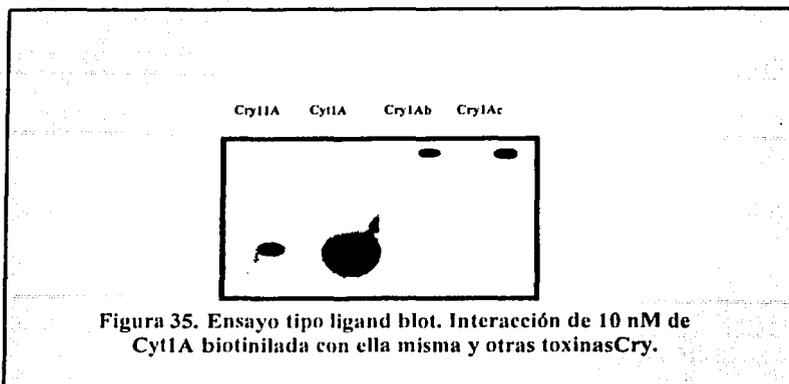


Figura 35. Ensayo tipo ligand blot. Interacción de 10 nM de Cyt1A biotinilada con ella misma y otras toxinasCry.

Estos ensayos muestran que tanto Cry11A como Cyt1A son capaces de unirse a sí mismas en su forma desnaturalizada. Sin embargo, dicha interacción también se lleva a cabo con otro tipo de toxinas Cry, como Cry1Ab ó Cry1Ac, lo que indica que el reconocimiento entre éstas toxinas no es altamente específico. Sin embargo, las toxinas Cry11A y Cyt1A biotiniladas no mostraron interacción con las proteínas de marcador de peso molecular (Bio-Rad) y BSA (dato no mostrado), por lo que concluimos que el reconocimiento toxina-toxina entre Cry y Cyt, puede ser un fenómeno importante en las interacciones sinérgicas de las proteínas de Bti.

5.3.2 Interacción de proteínas Cry11A y Cyt1A por sistema de dos híbridos.

Los experimentos tipo ligand blot mostrados anteriormente sugieren que las toxinas de Cry y Cyt de Bti pueden interactuar aún en ausencia de VMMA, lo que involucraría un reconocimiento proteína-proteína entre ambas toxinas. Por ello, para sustentar o descartar esta idea, se montó un sistema de dos híbridos clonando en los plásmidos pHybLex/Zeo y pYESTrp2 a las toxinas Cry11A y Cyt1A, respectivamente, y probando su interacción en un modelo de levadura (*S. cerevisiae* L40).

Los resultados obtenidos por el uso de esta técnica fueron los siguientes: la transformante construida con los plásmidos que codifican para las proteínas Cyt1A y Cry11A completas (CP13) fue positivo (crecimiento en His⁻ y coloración azul en ensayo β-galactosidasa), lo que indica que las toxinas pueden interactuar una con otra (figuras 36 y

37). Sin embargo, cuando sólo están presentes los dominios II y III de Cry11A y la toxina completa de Cyt1A (CP14), no hay interacción positiva (figuras 36 y 37). Una posible explicación sería que debido a un mal arreglo en la estructura de los dominios II y III, no se observa interacción con toxina Cyt1A completa ó que forzosamente se requiere del dominio I para observar interacción. En cuanto a los fragmentos de Cyt1A que se muestran de manera esquemática en la figura 13 y se enlistan en la tabla 15, todas las construcciones de fragmentos de Cyt1A con la secuencia de Cry11A completa fueron positivas (figura 36 y 37), mientras que las que tenían solo los dominios II y III de Cry11A, no presentaron el mismo esquema. Solo CP4 (F2 + DII y III de Cry11A) y CP12 (F6 + DIII y III de Cry11A) positivas.

Nombre de la construcción	Plásmidos que contiene	Interacción
CP1	F1/C7	Positiva
CP2	F1/C10	Negativa
CP3	F2/C7	Positiva
CP4	F2/C10	Positiva
CP5	F3/C7	Positiva
CP6	F3/C10	Negativa
CP7	F4/C7	Positiva
CP8	F4/C10	Negativa
CP9	F5/C7	Positiva
CP10	F5/C10	Negativa
CP11	F6/C7	Positiva
CP12	F6/C10	Positiva
CP13	Cyt1A/C7	Positiva
CP14	Cyt1A/C10	Negativa

Tabla 15. Construcciones realizadas en pYESTrp2 de los diferentes fragmentos de Cyt1A

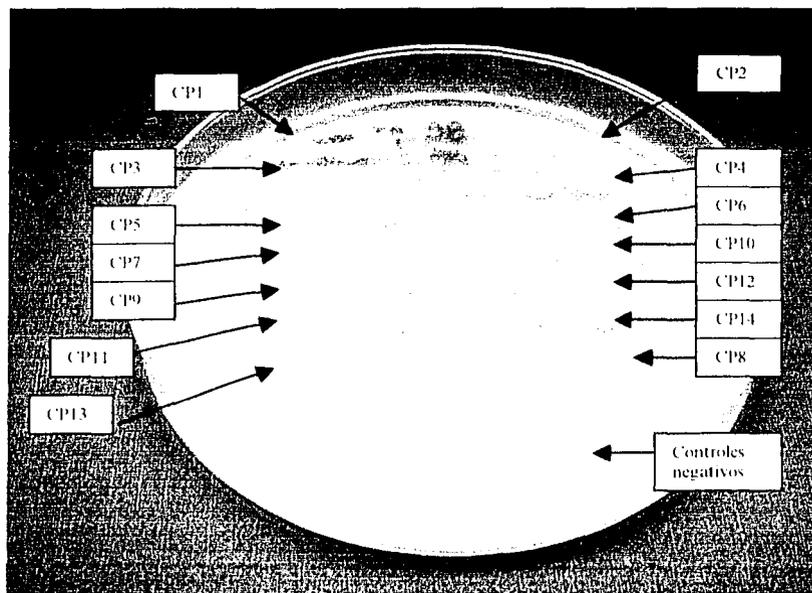
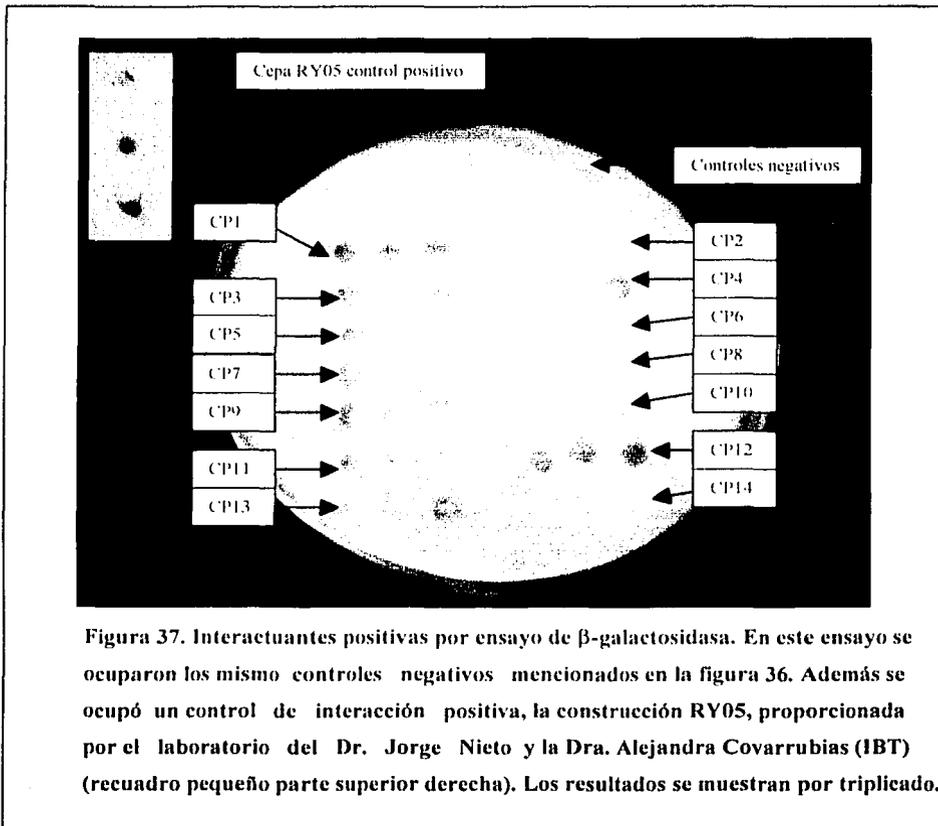


Figura 36. Selección en placa (His^r) de interactuantes positivas. Se contó con seis construcciones como controles negativos: 1) Levadura L40 transformada solo con el plásmido pYESTrp2; 2) Levadura L40 transformada con el plásmido pYESTrp2+Cyt1A completa; 3) Levadura L40 transformada solo con el plásmido pHybLex/Zeo; 4) Levadura L40 transformada solo con el plásmido pHybLex/Zeo+ Cry11A completa; 5) Levadura L40 cotransformada con los plásmidos pYESTrp2 y pHybLex/Zeo; 6) Levadura L40 nativa. Los resultados se muestran por triplicado.

Las construcciones que llevan la toxina Cry11A completa pueden interactuar con Cyt1A completa y con los diferentes fragmentos en selección en placa (figura 36). La coloración en ensayo de β -galactosidasa, fue observada sobre todo con la construcción CP1 (figura 37). No obstante, resulta interesante ver que existen dos construcciones que contienen los dominios DII y DIII de Cry11A que también muestran un resultado positivo (CP4 y CP12) tanto en selección en placa como en ensayo de β -galactosidasa, lo que podría

significar que quizá la zona de unión es muy pequeña, y requiere de cierto plegamiento para poder desarrollarse. Eso explicaría la causa por la cual las demás construcciones no presentan reacción colorida en ensayo de β -galactosidasa.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3.3 Interacción proteína-proteína por detección de toxinas marcadas con FITC (microscopía de fluorescencia) en intestino de *A. aegypti*.

Otra manera de visualizar interacción proteína/proteína entre Cry y Cyt, puede ser simulando el ambiente *in vivo* e intentando visualizar qué ocurre en presencia de las proteínas y lípidos de la parte apical del intestino medio de la larva. Para este propósito, se desarrolló un experimento de localización de la toxina Cry11A marcada fluorescentemente en el intestino de *A. aegypti*. La toxina Cry11A marcada con FITC fue proporcionada por el Dr. Raúl Miranda Casoluengo. Con esta toxina se alimentó a larvas del 4o. estadio de *A. aegypti* por un lapso no mayor de 2 horas, a una dosis de 400 ng/ml. Posteriormente se extrajo el intestino y se visualizó el patrón de fluorescencia.

El intestino disectado que estuvo en contacto con Cry11A^{FITC}, mostró un patrón de fluorescencia básicamente en la zona anterior (caeca) y posterior del intestino (figura 39), en comparación con el control en ausencia de toxina (figura 38).



Figura 38. Intestino control



Figura 39. Intestino con Cry11A^{FITC}

Como se ve en la figura 39, la zona que mayor fluorescencia en verde bajo la presencia de Cry11A^{FITC} fue básicamente la parte anterior (caeca) y la parte posterior del intestino. Para observar el efecto de la presencia de Cyt1A en la unión de Cry11A^{FITC}, se alimentaron larvas con ambas toxinas (Cry11A marcada y Cyt1A fría) en dosis equimoleculares de ambas (400 ng/ml). Se observó que la fluorescencia incrementó notablemente y que se podía observar a lo largo de todo el intestino (figura 40), por lo que podemos concluir que la toxina Cyt1A favorece la unión de Cry11A al intestino de *A. aegypti*, resultado que correlaciona perfectamente bien con los datos de unión en suspensión, y los resultados de unión secuencial de Cyt1A y Cry11A a VMMA's previamente mostrados.



Figura 40. Intestino con Cry11A^{FITC} + Cyt1A

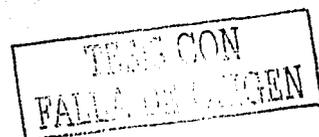
Los resultados de microscopía de fluorescencia, en conjunto con los mostrados en sistema de dos híbridos y ensayos de tipo ligand blot, apoyan la idea de que las toxinas Cry11A y Cyt1A, tienen una alta capacidad de interacción. La interacción entre las toxinas Cry11A y Cyt1A podría ser un paso clave en el mecanismo sinérgico observado entre éstas toxinas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6. DISCUSIÓN

Wu y Chang, en 1985, fueron los primeros en demostrar que no bastaba la presencia de una sola de las δ -endotoxinas de Bti para tener una alta actividad mosquitocida. Años más tarde, en 1994, Wu en colaboración con Federici, clonó y expresó los genes que codificaban para Cry11A y Cyt1A en cepas acristalíferas de Bt. De esta manera, lograron determinar las LC₅₀ para cada toxina de forma individual, y luego en combinaciones en las cuales se usaban ratios de proporciones distintas, que iban desde cantidades equimoleculares hasta excesos 10 veces mayores de una toxina con respecto a la otra. En todos los casos, observaron que existía un efecto sinérgico marcado cuando se utilizaban a las dos toxinas en conjunto. Un año más tarde, Crickmore *et al.*, 1995 y Poncet *et al.*, 1995, también realizaron experimentos de este tipo, pero además incluyeron combinaciones de las otras dos δ -endotoxinas de amplia proporción en Bti: Cry4A y Cry4B. Con esto fueron capaces de establecer dosis letales medias para las diversas toxinas de Bti en combinación, y demostrar que de todas las mezclas posibles, una de las más tóxicas siempre resultaba la de Cry11A+Cyt1A, sobre todo para *A. aegypti*. Por nuestra parte, los bioensayos realizados en este trabajo, además de apoyar aun más el proceso de sinergismo, también demuestran que a dosis totalmente inocuas de una y otra toxina, se ejerce un incremento notable en toxicidad, pues la combinación de Cry+Cyt es 10 veces más tóxica que la de la toxina Cyt1A sola y 2 veces más tóxica que la de Cry11A sola, lo cual fue la observación inicial para el desarrollo del resto del trabajo.

Por otro lado, analizando el comportamiento de las proteínas en cuanto a su mecanismo de acción, corroboramos que el procesamiento de la toxina Cry11A por medio de tripsina genera fragmentos de 36 y 32 kDa (figura 20), aproximadamente. Estos dos fragmentos están asociados conjuntamente, formando un heterodímero (Dai y Gill, 1993), que por ensayos de unión con VMMA de *Culex pipiens*, demostró ser biológicamente activo y capaz de unirse a la membrana (Yamagiwa *et al.*, 2002). Esto mismo observamos nosotros con el uso de VMMA de *A. aegypti* (figuras 22 y 26). Por otra parte, la activación de la protoxina soluble de Cyt1A genera fragmentos de aproximadamente 25



kDa (figura 20). Por análisis de SDS-PAGE y secuenciación del amino N-terminal, Said *et al.*, en 1995, observaron que la toxina Cyt1A se procesa de forma similar en ambos extremos cuando se ocupa proteinasa K o jugo gástrico de mosquito. La tripsina, por el contrario, procesa a Cyt1A predominantemente solo en el N-terminal. Este procesamiento no basta para la completa activación, pues en ensayos citolíticos *in vitro* sobre líneas celulares de *A. aegypti* y ensayos hemolíticos contra eritrocitos de rata, se demostró que la toxina Cyt1A procesada por ambos extremos era la forma más activa (Said *et al.*, 1995). Esto mismo observamos en este trabajo, pues la toxina Cyt1A tripsinada no se unió reproduciblemente a VMMA de *A. aegypti* (dato no mostrado), a diferencia de la toxina Cyt1A activada con proteinasa K (figuras 22 y 26). Lo cual concuerda con observaciones previas de que Cyt1A debe ser perfectamente procesada por ambos extremos (amino y carboxilo) para que pueda ejercer su actividad *in vitro*.

A la fecha, hay dos modelos propuestos para explicar la acción de las toxinas Cyt. En uno de ellos se propone la formación de monómeros discretos de la toxina que forman una estructura de poro dentro de la membrana (Promdonkoy y Ellar, 2003). En el segundo modelo se propone que las toxinas Cyt ejercen su efecto a través de una acción tipo detergente menos específica, en donde agregados de Cyt1A destruyen completamente la membrana (Butko *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos a través de ensayos de unión en suspensión, demuestran que la toxina Cyt1A no se une específicamente a VMMA de *A. aegypti*, por lo que la presencia de un receptor de membrana para Cyt no es sostenible. Aparentemente la toxina Cyt1A presenta una enorme afinidad por membranas. Lo anterior explicaría la total inespecificidad obtenida en los ensayos de competencia homóloga de Cyt1A (figura 26) y heteróloga (figura 28) utilizando como competidor a Cry11A.

La idea de que las toxinas tipo Cyt, son altamente afines a lípidos fue propuesta desde 1989, cuando Knowles *et al.*, demostraron la formación de canales selectivos a cationes en bicapas lipídicas planas. Este dato fue posteriormente sustentado por Butko *et al.*, en 1996 y 1997. Esto explicaría el porqué, al realizar competencias de unión homóloga (figura 26) y heteróloga (figura 28), Cyt no muestra desplazamiento por toxina fría. Esta toxina no se une específicamente a algún receptor proteínico de las VMMA de *A. aegypti*,

sino más bien, es capaz de interactuar con algún componente de membrana de amplia distribución, como podría ser algún lípido, lo que conllevaría a la explicación de que aun y con excesos de toxina fría (Cry o Cyt), Cyt1A podría unirse a la membrana.

Por experimentos tipo ligand blot, Fons *et al.*, en 1995, demostraron que la proteína Cry11A se une a proteínas de 148 kDa en *Anopheles stephensi* y a una de 78 kDa en *Tipula oleracea*, además de mostrar alta interacción con proteínas de 48 a 100 kDa de especies de lepidópteros como *Manduca sexta*. Sin embargo, en su forma tripsinada, no se observó absolutamente ningún patrón de unión a VMMA's por ligand blot. Sin embargo, Krieger *et al.*, en 1999, y posteriormente Buzdin *et al.*, en 2002, demostraron que la toxina Cry11A activada en el heterodímero previamente descrito, es capaz de unirse a proteínas de 65 y 62 kDa de VMMA's de *A. aegypti*. Estas evidencias concuerdan con nuestro ensayo de ligand blot (figura 32), ya que nosotros también observamos unión de Cry11A activada con tripsina a dos proteínas de 62 y 65 kDa de *A. aegypti*. La razón de un cambio de patrón de unión tan marcado de la misma toxina entre una especie de mosquito y otra, podría deberse a la alta diversidad que presentan los diferentes mosquitos entre sí, lo cual sugiere la posible presencia de distintos receptores en las diferentes especies de mosquitos. Esto explicaría el porque se ha observado que las toxinas Cry no matan igual a *Aedes sp.* que a *Anopheles sp.* ó *Culex sp.* en bioensayos. De manera similar otras toxinas mosquitocidas como las Bin de *B. sphaericus*, tienen fuerte acción insecticida solo contra *Culex sp.*, siendo prácticamente inocuas para *Aedes sp.*

Por otro lado, y comparando con las toxinas Cry activas contra lepidópteros, los receptores reportados para dichas toxinas son principalmente dos: la aminopeptidasa (120 kDa) y la caderina (210 kDa). En el caso de dípteros, y concretamente de *A. aegypti*, estaríamos hablando de proteínas poco relacionadas con las de lepidópteros, lo que sin duda es importante, pues podría significar que en el caso de toxinas de Bti, la interacción con el receptor dentro del mecanismo de acción varía significativamente. Además, es interesante observar que aunque Cyt tiene una gran afinidad por membranas, no hay reportes de que ejerza sinergismo con otras toxinas Cry activas contra lepidópteros ó coleópteros. De hecho, no hay reportes de que la toxina Cyt se una a VMMA's obtenidas a partir de

intestinos de dichos insectos. No obstante, podemos pensar que no sería extraño que Cyt1A tenga la capacidad de unirse a membranas de insectos fuera del orden Diptera, pero eso demostraría que no basta con que Cyt se una a membrana para que ejerza su papel tóxico y cooperativo con otras toxinas Cry.

Una de las principales características de todas las subespecies de Bt que matan mosquitos, como Bti, es que siempre cuentan con una proteína tipo Cyt en su cuerpo paraesporal (Crickmore *et al.*, 1998). ¿Sería posible entonces pensar que la presencia de receptores específicos para Cry11A, son fundamentales para que Cyt ejerza su actividad?, ¿sólo los receptores de mosquitos desencadenan la acción de Cyt? ¿por eso Cyt no ejerce sinergismo con toxinas tipo Cry1A activas contra lepidópteros? ¿les falta a estos insectos algún componente importante que desencadene la acción de Cyt y que nunca falte en membranas de mosquitos?. Es difícil contestar las preguntas anteriores, y más si pensamos que el cristal producido por Bti está conformado por varias proteínas insecticidas, y no solo por las que aquí hemos trabajado. Pero nuestros resultados dan idea de que la relación de Cry y Cyt va más allá de su mera presencia en Bti, y que incluso, posiblemente, los componentes de membrana apical del intestino medio de mosquitos estén involucrados en ayudar al sinérgico. Lo anterior es una buena forma de comenzar a disectar el amplio panorama que involucra el estudio molecular del sinergismo.

Otros datos de unión de toxinas de acción mosquitocida, fueron publicados por Krieger *et al.*, en 1999, en donde se observó que tanto Cry11A como Cry4B se unen con alta especificidad a VMMA de *A. aegypti*, y además, son capaces de competir entre ellas por los sitios de unión en VMMA. Este resultado, aunado a los que se obtienen en este trabajo con Cry11A (figuras 22 y 24), demuestran claramente que la especificidad de unión está dada por las toxinas Cry, siendo Cyt, altamente inespecífica.

Los experimentos de unión secuencial, en donde existe una clara diferencia entre el patrón de unión que muestra Cry11A biotinilada en VMMA preincubadas con toxina Cyt1A fría y sin preincubar (figura 30), indican que efectivamente, la toxina Cyt tiene la facultad de facilitar la unión de la toxina Cry11A. Además, si la toxina Cyt es capaz de

unirse inespecíficamente a lípidos, una vez inmersa en la membrana, podría ser capaz de ayudar a las toxinas Cry a internalizarse, lo que explicaría el porqué en presencia de Cyt el fenómeno de resistencia a toxinas Cry es revertido en *Culex quinquefasciatus* (Wirth *et al.*, 1997), y también explicaría el porqué el patrón de unión de Cry11A^{FITC} se incrementa notablemente cuando alimentamos a las larvas con toxina Cry11A marcada en presencia de toxina Cyt1A sin marcar (figura 40). De esta manera, somos el primer grupo que presenta datos conclusivos en experimentos de unión en suspensión y de microscopía de fluorescencia que apoyan la hipótesis de que Cyt1A facilita la unión de Cry11A en VMMA de *A. aegypti*.

En cuanto al proceso de formación de poro, es importante mencionar que la determinación de cambios de potencial de membrana que se realiza con el colorante fluorescente dis-C3-(5) en VMMA de *A. aegypti*, está basado en cambios provocados debido a apertura de canales iónicos. El cambio de potencial de membrana es mayor si el poro que se abre es altamente específico y solo transporta un tipo de iones (positivos ó negativos), por ejemplo, las toxinas tipo Cry1 activas contra lepidópteros son principalmente catiónicos. Sin embargo, si ambos tipos de iones son transportados al mismo tiempo por un canal, el cambio de potencial sería poco significativo de la capacidad de transporte, de ese canal. De ahí que los cambios de permeabilidad a K⁺ registrados por la técnica del potencial de membrana, sean una medida indirecta del proceso de formación de poro y puedan arrastrar falsas interpretaciones del efecto de la toxina.

En nuestro caso, se observó que tanto Cry11A como Cyt1A son capaces de ejercer un cambio en el potencial de membrana a una concentración de 100 nM (figura 33a). El valor de la pendiente que generó Cry11A fue de 0.505, mientras que para Cyt1A fue de 0.452. La combinación de ellas, a dosis mucho menores (0.1 nM de Cry11A y 1 nM de Cyt1A), genera un nivel parecido de formación de poro (cercano al de 100 nM) con una pendiente de 0.489 (figura 33b). Sin embargo, aunque este es un claro indicio de que existe un proceso de permeabilización provocado por las toxinas y que la combinación Cry+Cyt es efectiva, no permite demostrar el efecto sinérgico, pues individualmente, Cry11A a una dosis de 0.1 nM es capaz de inducir la formación de poro, generando una pendiente de

0.305, mientras que Cyt1A a una dosis de 0.01 nM genera una pendiente de 0.399. Si el efecto de potencial de membrana fuera lineal respecto a la concentración de la toxina aplicada y la combinación de Cry+Cyt fuera sinérgica, tendríamos que observar que la pendiente resultante rebasara la suma teórica de 0.704, lo cual, no fue observado.

A la fecha, no se tienen reportes de ensayos de formación de poro con Cry11A, pero sí con Cyt. En 1996, Butko *et al.*, observaron que la toxina Cyt1A es totalmente inespecífica cuando actúa sobre liposomas sintéticos, pues es capaz de liberar el contenido total de las mismas. Tomando en cuenta lo anterior, es que proponemos que en estudios posteriores, se adopte otro tipo de determinación de canales iónicos para estudiar el efecto de dichas toxinas, como podría ser el uso del sistema de liberación de calceína, propuesto por el mismo Butko (1996) ó el análisis de inserción de las toxinas Cry11A y Cyt1A en bicapas planas. Estos métodos son mucho más específicos que el utilizado en este trabajo, pues tienen la ventaja de determinar la formación de poro en correlación directa con la liberación de calceína ó con la corriente registrada en el momento de apertura de un canal.

En cuanto a los datos de interacción entre Cry11A y Cyt1A, se ha reportado que las mutaciones que suprimen la toxicidad de Cyt *in vivo* y la unión a fosfolípidos *in vitro*, mapean en las asas que unen a $\beta 4$ con $\beta 5$, $\beta 6$ con αE , αE con $\beta 7$ y αD con $\beta 4$ (figura 7), esto a través de mutaciones que hacen a las asas menos hidrofílicas (cambiando aminoácidos cargados por alanina) ó más rígidos (incorporando prolinas). Por lo tanto, se propone que el mecanismo de formación de poro de las toxinas Cyt involucra un movimiento de bisagra de las hélices αC y αD alrededor de las asas, seguido de la inserción de las largas cadenas β anfílicas ($\beta 5$, $\beta 6$ y $\beta 7$) dentro de la bicapa, dejando a las hélices expuestas sobre la superficie de membrana, listas para poder interactuar con otra toxina Cyt disponible (Ward *et al.*, 1988).

Nosotros demostramos que Cry11A puede interactuar con Cyt1A en ensayos tipo ligand blot (figuras 34 y 35), por lo que diseñamos experimentos para sustentar esta interacción. La primera estrategia fue el sistema de dos híbridos en levadura, en donde se observó que las construcciones de Cyt1A F2 y F6 interactúan positivamente con los DII y

III de Cry11A (figuras 36 y 37), por lo que podemos deducir que la parte importante en el proceso de unión Cry-Cyt, se encuentra en la región que une a la α D con la β 7, pues en la construcción que solo contenía la porción α C- α D, sin asas (CP10) no hay interacción positiva. En cambio, las construcciones CP4 (DII y III de Cry11A + fragmento F2 de Cyt1A) y CP12 (DII y III de Cry11A + fragmento F6 de Cyt1A) que si llevan estas asas son las que presentan interacción positiva.

La construcción CP8 también lleva el asa entre α D y β 4 pero no interaccionó. Es importante mencionar que esta construcción incluye a la hoja β 3, que en la toxina nativa se aparea con puentes de hidrógeno con la β 7. El hecho de que la hoja β 3 se encuentre en el extremo N-terminal en este fragmento y esté fuera del contexto de proteína entera, podría resultar en una estructura alterada que no fuera capaz de interactuar con los dominios II y III de Cry11A. Lo mismo ocurriría con la construcción CP6, que contiene de β 1 a β 5 de Cyt1A y DII y III de Cry11A. Esta construcción también lleva el asa entre α D y β 4, pero por razones similares a CP8 su interacción fue nula, ya que la β 3 no tendría pareja para interactuar y estructurarse. Esto podría apoyar la idea, de que efectivamente, las hojas β 5 a 7 se insertan en la membrana, mientras que el asa que conecta a α D con β 4, quedaría expuesto en la membrana y disponible para la unión con el DII y III de Cry11A, aunque no hay que descartar que las otras asas, hacia el C-terminal, como la que une β 4- β 5, la que une β 6- α E y la que une α E- β 7, también puedan ser sitios importantes de interacción proteína-proteína, e incluso, podrían considerarse más representativos que el asa entre α D y β 4, pues solo en aquellas construcciones en donde estaban presentes dichas asas siempre hubo interacción. La importancia que pudieran llegar a tener cada uno de las asas en el proceso de interacción proteína-proteína, solo podrá confirmarse haciendo construcciones aun más pequeñas de las asas y clonaras en los plásmidos correspondientes para intentar un nuevo sistema de dos híbridos ó elaborando péptidos sintéticos que mimeticen las asas entre α D y β 4, entre β 4- β 5, entre β 6- α E y entre α E- β 7, para luego ocuparlos en ensayos de unión en suspensión o de unión de ligando y verificar los cambios obtenidos en competencias homólogas y heterólogas en la unión a VMMA.

Sin embargo, aunque los resultados involucrando DII y DIII son muy claros, existe todavía el hecho de que todas las construcciones de fragmentos de Cyt1A cuando interactúan con la toxina Cry11A completa, resultaron positivas. Posiblemente, en este caso, pudiera pensarse que el sitio de interacción entre el asa α D y β 4, no es el único capaz de interactuar, y que probablemente existan más sitios de unión a Cry11A que involucren al dominio I, lo cual no sería nada raro, pues ya se tienen reportes de que las toxinas Cry1A interactúan con 2 diferentes receptores: aminopeptidasa tipo N (Garczynski *et al.*, 1995) y caderina (Vladamudi *et al.*, 1995), y que la interacción puede ser muy compleja. Por ejemplo, la toxina Cry1Ab se une a caderina en VMMA de *Manduca sexta* a través de dos diferentes sitios: la α 8 y el asa 2 de dominio II (Gomez *et al.*, 2003). Además, no debemos pasar por alto, el hecho de que las construcciones de fragmentos de Cyt1A cuando interactúan con la toxina Cry11A completa, en el ensayo de β -galactosidasa, no reproducen su patrón de coloración de manera palpable, por lo que no hay que descartar que posiblemente algunas de estas construcciones pudiera ser artefactos de ensayo. En dado caso, sería conveniente realizar nuevas construcciones de Cry11A incluyendo solo el dominio I y clonarlo en levadura para visualizar si existe interacción con los diferentes fragmentos de Cyt1A. Así mismo, se podría continuar con la fragmentación de la región de Cyt1A que determinamos como interactuante ó sintetizar péptidos sintéticos de la región señalada para realizar ensayos de unión en suspensión y ligand blot con el fin de visualizar posible competencia. Otra opción viable sería la realización de mutaciones puntuales en las asas de β 4 a β 5, de β 6 a α E, α E a β 7 y principalmente, de α D a β 4 para su posterior análisis por ensayos de toxicidad, de unión e incluso ensayos de formación de poro.

La inmunolocalización de Cry11A y Cyt1A realizada en 1993 por Ravoahangimalala *et al.*, utilizando como sustrato al insecto vector a *Anopheles gambiae* demostró que tanto una como otra toxina, se unen con mayor afinidad a la caeca gástrica y a la parte posterior del intestino, pero Cyt1A también presentaba unión en la parte media del intestino. Sin embargo, estos investigadores no realizaron estudios de unión secuencial o mezclas de toxinas para observar el efecto conjunto de las mismas. Nuestros ensayos de microscopía de fluorescencia, por su parte, muestran que efectivamente la toxina Cry11A individualmente se une a la parte anterior y posterior del intestino de manera específica

(figura 39), pero que dicho patrón de fluorescencia se incrementa notablemente a todo lo largo del intestino cuando se alimenta a las larvas con Cry11A marcada en presencia de Cyt1A fría (figura 40). Lo que sustenta el hecho de que Cyt favorece la unión de Cry11A.

El proceso de agregación tanto de las toxinas Cyt (Promdonkoy y Ellar, 2003), como de las Cry ha sido documentado (Soberón *et al.*, 2000; Güereca *et al.*, 1999). Sin embargo, no se sabe aun de la posible formación de agregados entre Cry-Cyt, que pudieran tener algún efecto importante sobre el mecanismo de acción. Los ensayos de ligand blot y de dos híbridos que muestra este trabajo, podrían ser el primer indicio de que dichas formaciones pueden ser posibles. Un experimento que proporcionaría información sobre la existencia de un complejo Cry-Cyt, es la inmunoprecipitación de las proteínas nativas. En este experimento se incubaría ambas toxinas y se inmunoprecipitarían con un anticuerpo, por ejemplo anti-Cry11A. Posteriormente se determina la cantidad de toxina Cyt que fue coprecipitada de Cry11A, por medio de ensayos tipo Western blot utilizando anticuerpos específicos. Al mismo tiempo, podría hacerse un experimento en el que se incorpora Cyt1A a las VMMA de *A. aegypti* ó con liposomas. Ambas membranas se incubaría con Cry11A y finalmente se solubilizarían con CHAPS al 0.5% para inmunoprecipitar Cyt y analizar la coprecipitación de Cry11A. De esta manera, se podría tener información sobre con qué Cyt interactúa mejor Cry11A, con la nativa soluble o con la nativa incorporada en membranas.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se llegó a partir del trabajo experimental se enlistan a continuación:

1. Por bioensayos con larvas del 4º estadio de *A. aegypti* se comprobó la capacidad sinérgica entre Cry11A y Cyt1A.
2. Tanto Cry11A como Cyt1A son capaces de unirse a VMMA de *A. aegypti*. La diferencia es que la primera se une de manera específica (a proteínas de PM de 62 y 65 kDa) y la segunda de manera totalmente inespecífica.
3. La preincubación de VMMA de *A. aegypti* con Cyt1A, favorece la unión de la toxina Cry11A, al mismo tiempo que compite con esta toxina por su sitio de unión, lo que de manera inversa no ocurre. Por lo tanto, la especificidad está dada por Cry11A.
4. Por sistema de dos híbridos y ensayos tipo ligand blot se determinó que las toxinas Cry11A y Cyt1A son capaces de interactuar entre sí. Sin embargo, también se vio que esta interacción proteína-proteína no es altamente específica, pues la toxina Cry11A es capaz de reconocer a otras toxinas Cry, lo mismo que a la Cyt1A, y viceversa. Esto puede deberse a la alta afinidad estructural existente entre todas las δ -endotoxinas producidas por Bt, lo cual, sería indicio de que no basta el reconocimiento proteína-proteína para llevar a cabo el efecto sinérgico, sino que hace falta el análisis de muchos otros acontecimientos dentro del mecanismo de acción, como la formación de poro ó la posible oligomerización de las toxinas.
5. Cuando larvas del 4º estadio de *A. aegypti* son alimentadas con Cry11A^{FITC} se observó un patrón de fluorescencia primordialmente en la parte anterior (caeca) y posterior del intestino. Sin embargo, cuando se alimentaron larvas del 4º estadio de *A. aegypti* con ambas toxinas (Cry11A^{FITC} y Cyt1A fría) el nivel de fluorescencia

cambió considerablemente, situándose a todo lo largo del intestino, por lo que apoyamos la idea de que la toxina Cyt1A ayuda a mejorar la unión de Cry11A.

6. Haciendo uso de la técnica de determinación de cambios en el potencial de membrana a potasio como medida indirecta del proceso de formación de poro, determinamos que tanto Cry11A como Cyt1A son capaces de formar poros iónicos en VMMA de *A. aegypti* a dosis de 100 nM.

8. PERSPECTIVAS

El estudio del mecanismo molecular que involucra el sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt de Bti es extremadamente amplio. Por ello es que se propone continuar con el trabajo en base a las siguientes vertientes:

1. Ensayo de sistema de dos híbridos con nuevas construcciones que involucren solo DI de Cry11A, con el objeto de verificar si la falta de interacción de los dominios II y III de Cry11A con la toxina completa de Cyt1A y sus fragmentos, es por un mal arreglo estructural, o porque la interacción se da específicamente en una región del dominio I.
2. Se realizarán mutaciones sitio-dirigidas sobre la región α C- β 7 (principalmente en asas que conectan a β 4- β 5, β 6- α E, α E- β 7 y α D- β 4) para obtener mutantes que puedan presentar fallas en interacción con Cry11A y en unión y formación de poro ocupando VMMA de *A. aegypti*.
3. Se desarrollarán estudios de permeabilización en membrana en vesículas unilamelares grandes (LUVs) y VMMA de *A. aegypti* cargadas con calceína, para analizar la cooperatividad en el proceso de formación de poro entre Cry11A y Cyt1A, tanto de forma individual, como conjunta, según Butko *et al.*, 1996.
4. Ensayos de inmunoprecipitación entre Cry11A y Cyt1A, con el fin de demostrar la presencia de agregados entre Cry y Cyt.
5. Síntesis de péptidos sintéticos de las asas que unen a β 4 con β 5, a β 6 con α E, a α E con β 7 y a α D con β 4, para trabajar con ellos en ensayos de unión en suspensión y ligand blot. Esto con el fin de reconocer el área mínima que une a Cyt1A con VMMA de *A. aegypti* y también el área de interacción mínima entre Cry-Cyt.

6. Realización de nuevos ensayos de fluorescencia haciendo uso de microscopía confocal y utilizando como marcador fluorescente Alexa Flúor, que permite una mejor observación de unión de toxina marcada. Esto con el objeto de observar la unión de toxina marcada no solo a nivel superficial, sino a través de cortes internos.
7. Ensayos para determinar la sensibilidad de células sF9 y de intestino de *A. aegypti* a Cyt1A y a Cry11A, tanto de manera individual como conjunta, para establecer un nuevo modelo de análisis del sinergismo.
8. Usando anticuerpos policlonales específicos hacia Cry11A y Cyt1A, se analizará por microscopía de luz, el patrón de unión de las toxinas a la microvellosidad apical del intestino medio de *A. aegypti* embebidos en parafina, así como la posible internalización de una de las toxinas ó de ambas. Esto con el fin de identificar la posible cooperatividad entre las toxinas Cry y Cyt.

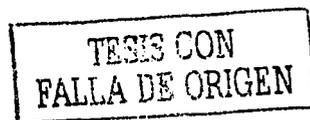
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, L. F., J. E. Visick, and H. R. Whiteley. 1989. A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:521-530.
- Agatep, R., Kirkpatrick R. D., Parchaliuk, D. L., Woods, R. A. and Gietz, R. D. 1998. Lithium acetate single stranded carrier DNA/polyethylenglycol protocol. Department of human genetics. University of Manitoba, Canada. 12-15.
- Angsuthanasombat, C., Crickmore N. and Ellar, D. J. 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.* 94:63-68.
- Aronson, A. I., Beckman, W. and Dunn P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.
- Baird, J. K. 2000. Resurgent malaria at the millennium: control strategies in crisis. *Drugs* 59: 719-43.
- Bechtel, D. B. and L. A. Jr. Bulla. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 127: 1472-1481.
- Beegle, C. C., and T. Yamamoto. 1992. History of *Bacillus thuringiensis berliner* research and development. *Can. Entomol.* 124:587-616.
- 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. Commun.* 200:359-364.
- Ben-Dov, E. Boussiha, S. y Zaritsky, A. 1995. Mosquito Larvicidal Activity of *Escherichia coli* with combinations of Genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 177:2851-2857.
- Blaustein, L. and Margalit, J. 1991. Indirect effects of the fairy shrimp, *Branchipus schaefferi* and two ostracod species on *B. thuringiensis* var. *israelensis* induced mortality in mosquito larvae. *Hydrobiol.* 212:67-76.
- Boonserm, P., D. J. Ellar y Li, J. 2003. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a mosquito-larvicidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Acta Cryst.* 59: 591-594.
- Bosch, D., Schipper, B., der Kleij H., de Maagd, R. A. and Willem, J. S. 1994. Recombinant *Bacillus thuringiensis* crystal/proteins with new properties: possibilities for resistance management. *Biotech.* 12:915-918.
- Bravo, A., Sanchez, J., Kouskoura, T. and Crickmore, N. 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* CryIAc insecticidal toxin. *J. Biol. Chem.* 277(27):23985-23987.
- Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179: 2739-2801.
- Bravo, A., Hendrickx K., Jansens, S. and Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60:247-254.
- Briceño, B, Gómez, D. H., Argett, R. E., Montesano, R., Vázquez Martínez, A. L., Ibáñez, B. S., Madrigal, A. G., Rufz, M. C., Flisser, A. and Tapia, R. 1996. Potential risk for dengue hemorrhagic fever: the isolation of serotype dengue 3 in Mexico. *Emerg. Infect. Diseases*, 2:133-135.
- Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J. and Derbyshire, D. J. 1999. N-acetylglactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Molec. Biol.* 287:1011-1022.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5):2415-2422.
- Butko, P., Huang, F., Pusztai-Carey, M. and Surewicz, W. K. 1997. Interaction of the delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* with lipid membranes. *Biochem.* 36:12862-12868.
- Butko, P., Huang, F., Pusztai-Carey, M. and Surewicz, W. K. 1996. Membrane permeabilization induced by cytolytic delta-endotoxin CytA from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochem.* 35:11355-11360

- Buzdin, A. A., Revina, L. P., Kostina, L. I., Zalunin, I. A. and Chestukhina, G. G. 2002. Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. (Mosc)*. 67(5):540-6.
- Caramori, T., Albertini, A. M. and Galizzi, A. 1991. *In vivo* generation of hybrids between two *Bacillus thuringiensis* insect-toxin-encoding genes. *Gene* 98: 37-44.
- Carlson, C. R., Caugant, D. A. and Kolsto, A. B. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1719-1725.
- Chang, C., Yu, Y. M., Dai, S. M., Law, S. K. and Gill, S. S. 1993. High-level CryIVD and CytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:815-821.
- Chen, X. J., Lee, M. K. and Dean, D. H. 1993. Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 90:9041-9045.
- Chilcott, C. N. and Ellar, D. J. 1988. Comparative study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* 134:2551-2558.
- Chow, E., Singh, G. J. P. and Gill, S. S. 1989. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2779-2788.
- Cohen, S. 1991. Encapsulation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in polymeric formulations that protects the toxic crystals from degradation, radiation and adsorption. M.Sc. thesis. Ben-Gurion University of the Negev, Be'er-Sheva, Israel.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schenepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Rev.* 62:807-813.
- Crickmore, N., Bone E. J., Williams, J. A. and Ellar, D. J. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:249-254.
- Dai, Shu-Mei y Gill SS. 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 23(2):273-283.
- de Barjac, H. and Bonnefoi, A. 1962. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. *Entomoph.* 7:5-31.
- de Barjac, H. and D. J. Sutherland. 1990. Bacterial control of mosquitoes and black flies. Rutgers University Press, New Brunswick, N.J. 1:3-217.
- de Maagd, R. A., Bakker, P. L., Masson, L., Adang, M. J. and Sangadala, S. 1999. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAC is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 31: 463-471.
- de Maagd, R. A., M. S. G. Kwa, H. Van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper, J. M. Vlak, W. J. Stiekema, and D. Bosch. 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543.
- Dean, D. H., Rajamohan, F., Lee, M. K., Wu, S. J., Chen, J., Alcántara, E. and Hussain, S.R. 1996. Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis: a minireview. *Gene* 179:111-117.
- Delécluse, A., S. Poncet, A. Klier, and G. Rapoport. 1993. Expression of *cryIVA* and *cryIVB* genes, independently or in combination, in a crystalnegative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3922-3927.
- Delécluse, A., J.-F. Charles, A. Klier, and G. Rapoport. 1991. Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. *J. Bacteriol.* 173:3374-3381.
- Dirección General de Epidemiología, SSA. Manual simplificado para la vigilancia epidemiológica del dengue. México. 1997.
- Drobniewski, F. A., and D. J. Ellar. 1988. Toxin-membrane interactions of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Biochem. Soc. Trans.* 16:38-40.
- Ebersold, H.R., Readdy, T.L. and A.E. Bastian. 1978. The action of the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: an electron microscope study. *Experientia* 34, 1672.

- English, L.H., Readdy, T.L. y A.E. Bastian. 1991. δ -endotoxin induced leakage of $^{86}\text{Rb-K}^+$ and H_2O from phospholipid vesicles is catalyzed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochem.* 21:177-184.
- Earp, D. J., and D. J. Ellar. 1987. *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* strain PG14: nucleotide sequence of a gene encoding a 27 kDa crystal protein. *Nucleic Acids Res.* 15:3619.
- Falnes, P. O., and K. Sandvig. 2000. Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:407-413.
- Federici, B. A. 1995. The future of microbial insecticides as vector control agents. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.* 11(2): 260-268.
- Feitelson, J. S. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree, p. 63-71. In L. Kim (ed.), *Advanced engineered pesticides*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Feitelson, J. S., J. Payne, and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* 10:271-275.
- Finney, D. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, 50-80.
- Fons, F., Dullemans, A., Cees W. 1995. Binding of the CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7):2601-2605.
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W, English L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57(8):1101-1109.
- Garczynski, S.F. y M.J. Adang. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) δ -endotoxin binding aminopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Insec. Biochem. Molec. Biol.* 25:409-415.
- Garczynski, S. F., Crim, J. W. and Adang, M. J. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2816-2820.
- Gazit, E., N. Burshtein, D. J. Ellar, T. Sawyer, and Y. Shai. 1997. *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin associates specifically with its synthetic helices A and C in the membrane bound state. Implications for the assembly of oligomeric transmembrane pores. *Biochem.* 36:15546-15554.
- Ge, A. Z., Shivarona, N. I. and Dean, D. H. 1989. Location of the *Bombix mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 86:4037-4041.
- Georghiou, G. P., and M. C. Wirth. 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1095-1101.
- Githeko A.G., Lindsay S. W., Confalonieri E.U., Patz J.A. 2000. Climate change and vector borne diseases: a regional análisis. *Bulletin W H O. Internal J. Public Health.* 78(9):1136-1147.
- Goldberg, L. J., and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News.* 37:355-358.
- Golemis, E. A., Gyuris, J. and Brent, R. 1996. Interaction trap/two-hybrid systems to identify interacting proteins. *Curr. Protoc. Molec. Biol.* 20:1-28.
- Gómez, Isabel, Dean DH., Bravo, Alejandra and Soberón, Mario. 2003. Molecular basis of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops α -8 and 2 in Domain II of Cry1Ab toxin. *Biochem.* 42:10482-10489.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. and Soberón, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters.* 513:242-246.
- Gonzalez, J. M., Jr., and B. C. Carlton. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid.* 11:28-38.
- González, J. M., Jr., H. T. Dulmage, and B. C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* 5:351-365.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S. y K. Van Frankenhuyzen. 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* 60:47-62.
- Grochulsky, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. and Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa(a) toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *J. Mol. Biology.* 254:447-464.

- Guerchieff, A., Ugalde R. A. and Rubinstein, C. P. 1997. Identification and characterization of a previously undescribed *cyr* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and Environmental Microbiol.* 63(7):2716-2712.
- Gliereca, L. and Bravo, A. 1999. The oligomeric state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. *Biochim. Biophys. Acta.* 1429:342-350.
- Gyuris, J., Golemis, E. A., Chertkov, H. and Brent, R. 1993. Cdi1, a human G1- and S-phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 75:791-803.
- Haider, M. Z. and Ellar, D. J. 1989. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 978:216-222.
- Hodgman, T. C. and D. J. Ellar. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Seq.* 1:97-106.
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens, and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 85:7844-7848.
- Houk, E. J., Arcus, Y. M. and Hardy, J.L. 1986. Isolation and characterization of brush border fragments from mosquito mesenterons. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 3:135-146.
- Höfte, H. and H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Ibarra, J. E. y Del Rincón, C. 2001. Cuantificación toxicológica de *Bacillus thuringiensis*. En: P. Caballero y J. Ferré. *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas.* Editorial Phytoma. Valencia.
- Ibarra, J. E., and Federici, B. A. 1986. Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:79-84.
- Isturiz, RE., Gubler, DJ. and del Castillo, JB. 2000. Dengue and dengue hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. *Infectious Disease Clinics of North America.* 14(1):121-140.
- Jenkins, J.L., M. K. Lee, A.P. Valaitis, A. Curtiss y D.H. Dean. 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to Gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J. Biol. Chem.* 275:14423-14431.
- Knowles, B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* 24:275-308.
- Knowles, B. H., P. J. White, C. N. Nicholls, and D. J. Ellar. 1992. A broadspectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 248:1-7.
- Knowles, B. H., M. R. Blatt, M. Tester, J. M. Horsnell, J. Carroll, G. Menestrina, and D. J. Ellar. 1989. A cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 244:259-262
- Knowles, B.H. and D.J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta.* 924:509-518.
- Koni, P. A., and D. J. Ellar. 1993. Cloning and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxin. *J. Mol. Biol.* 229:319-327.
- Krieger IV, Revina LP, Kostina LJ, Buzdin AA, Zalunin IA, Chestukhina GG, Stepanov VM. 1999. Membrane proteins of *Aedes aegypti* larvae bind toxins Cry4B and Cry11A of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Biochem. (Mosc).* 64(10):1163-8.
- Kronstad, J. W., and H. R. Whiteley. 1984. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Bacteriol.* 160:95-102.
- Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O. y Santos, JI. 1998. *Manual de Infectología Clínica.* 410-415.
- Kurtak, D. C., C. Back, A. Chalifour, J. Doannio, J. Dossou-Yovo, J. Duval, P. Guillet, R. Meyer, M. Ocran, and B. Wahle. 1989. Impact of *B. t. israelensis* on blackfly control in the Onchocerciasis Control Programme in West Africa. *Isr. J. Entomol.* 23:21-28.
- Lacey, Lawrence A. y Lacey Cynthia M. 1990. The medical importance of Riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides. *Jour. Amer. Mosquito Control Assoc.* 6: 2-74.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(259):680-5.
- Lee, M. K., and D. H. Dean. 1996. Inconsistencies in determining *Bacillus thuringiensis* toxin binding sites relationship by comparing competition assays with ligand blotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:575-580.



- Lee, M. K., B. A. Young, and D. H. Dean. 1995. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216:306–312.
- Lereclus, D., J. Ribier, A. Klier, G. Menou, and M.-M. Lecadet. 1984. A transposon-like structure related to the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *EMBO J.* 3:2561–2567.
- Li, J., P. A. Koni, and D. J. Ellar. 1996. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* ssp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J. Mol. Biol.* 257:129–152
- Li, J., Carroll, J. and Ellar, D.J. 1991. Cristal Structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821.
- Lorence, A., A. Darszon, C. Diaz, 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.* 360:217–222.
- Maniatis, Sambroose y Fritsch. 1989. *Molecular Cloning 3: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Margalit, J., and H. Bobroglo. 1984. The effect of organic materials and solids in water on the persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ser.H-14. *Z. Angew. Entomol.* 97:516–520.
- Martens, J.W.M., Visser, B., Vlák, J.M. y D. Bosch. 1995. Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* CryIAb(b) protoxin. *Mol. Gen. Genet.* 247:482-487.
- Martínez-Torres E. 1995. Dengue y dengue hemorrágico: aspectos clínicos. *Salud Pública Mex.* 37:29-44.
- Masson, L., B. Tabachnik, Y.-B. Liu, R. Brusseau and J.-L. Schwartz. 1999. Helix 4 of the *Bacillus thuringiensis* CryIAa toxin lines the lumen of the ion channel. *J. Biol. Chem.* 274:31996-32000.
- Meadows, M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment, p. 193–220. Wiley, New York, N.Y.
- Morse, R.J., Yamamoto, T. and Stroud R.M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Struct.* 9:409-417.
- Navarro Robles J y Gómez Dantés H. 1995. El dengue hemorrágico en México. *Salud Pública de México*, 37:113.
- Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-2-001-SSA2-1999) para la vigilancia, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores.
- Ohana, B., J. Margalit, and Z. Barak. 1987. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under simulated field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:828–831.
- Ohba, M., and K. Aizawa. 1979. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 33:387–388.
- Padua, L. E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 44:12–17.
- Padua, L. E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1980. The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 36:180–186.
- Percy, J. and P.G. Fast. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 86-98.
- Pietrantonio, P.V. y S.S. Gill. 1996. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: actino on the insect midgut. En "Biology of the insect midgut". Lehane, M.J. y P.F. Billingsley (eds.) Chapman & Hall, Londres. 353-372.
- Poncet, S., A. Delécluse, A. Klier, and G. Rapoport. 1995. Evaluation of synergistic interactions between the CryIVA, CryIVB and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invertebr. Pathol.* 66:131–135.
- Porter, A. G., E. W. Davidson, and J.-W. Liu. 1993. Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* 57:838–861.
- Promdonkoy, B. 1999. Ph.D. thesis. Cambridge University, Cambridge, United Kingdom.
- Promdonkoy, B y Ellar, DJ. 2003. Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 374:255-259.
- Ptitsyn, O. B., R. H. Pain, G. V. Semisotnov, E. Zerovnik, and O. I. Razgulyaev. 1990. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett.* 262:20–24.
- Pusztai, M., P. Fast, L. Gringorten, H. Kaplan, T. Lessard, and P. R. Carey. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* 273:43–47.
- Ragni, A., I. Thiéry, and A. Delécluse. 1996. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to the H-14 serotype. *Curr. Microbiol.* 32:48–54.

- Rajamohan, F., O. Alzate, J. A. Cottrill, A. Curtiss, and D. H. Dean. 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: mutations at domain II of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity towards gypsy moth larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93:14338-14343.
- Ravoahangimalala, O., J. F. Charles, and 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.
- Rashed, S. S., and M. S. Mulla. 1989. Factors influencing ingestion of particulate materials by mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 26:210-216.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MTR, Nogueira RMR & Travassos da Rosa. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244-251.
- Rutstein S.O. 2000. Factors associated with trends in infant and child mortality in developing countries during the 1900s. *Bulletin WHO, Internal J. Public Health.* 78(10):1256-1270.
- Said, AA and Ellar, DJ. 1995. Maximal toxicity of cloned CytA δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* requires proteolytic processing from both N- and C-termini. *Microbiol.* 141:3141-3148.
- Schnepf, E. Crickmore, N. Van rie J., Lereclus, D. Baum, J. Feitelson, J. Zeigler, DR, and Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62(3):775-806.
- Schnepf, H. E., K. Tomczak, J. P. Ortega, and H. R. Whiteley. 1990. Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930.
- Schwartz, J-L and Laprade, R. 2000. Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. *Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application.* Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 199-217.
- Schwartz, J-L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G., Brousseau, R., and Masson, L. 1997. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* 410:397-402.
- Schwartz, J.-L., L. Garneau, D. Savaria, L. Masson, R. Brousseau, and E. Rousseau. 1993. Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 132:53-62.
- Slatin, S. L., C. K. Abrams, and L. English. 1990. Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169:765-772.
- Smedley, D. P., and D. J. Ellar. 1996. Mutagenesis of three surface-exposed loops of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity, receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiol.* 142:1617-1624.
- Smith, G. P., and D. J. Ellar. 1994. Mutagenesis of two surface-exposed loops of the *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin affects insecticidal specificity. *Biochem. J.* 302:611-616.
- Soberón, M., Pérez, VR., Núñez-Valdéz, ME., Lorence, A., Gómez, Isabel., Sánchez, J. y Bravo, A. 2000. Evidence for intermolecular interaction as a necessary step for pore-forming activity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEMS Microbiol.* 191:221-225.
- Strizhov, N., Sëller, M., Konez-Kálmán, Z., Regev, A., Sneb, B., Schell, J., Konez, C. y A. Zilberstein. 1996. Mapping of the entomocidal fragment of *Spodoptera*-specific *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C. *Mol. Gen. Genet.* 253:11-19.
- Thomas, W. E., and D. J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 60:181-197.
- Thomas, W. E., and D. J. Ellar. 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Lett.* 154:362-368.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji, and L. A. Bulla, Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490-5494.
- Waalwijk, C., A. M. Dullemans, M. E. S. vanWorkum, and 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.
- Wabiko, H., Raymond, K.C. y A.L. Jr. Bulla. 1986. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA* 5:305-314.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ward, E. S., D. J. Ellar, and C. N. Chilcott. 1988. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. *J. Mol. Biol.* 202:527-535.
- WHO. 1986. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis treatment and control. WHO Tech. Rep. Series (721). Geneva.
- Wirth, M. C., G. P. Georghiou, and B. A. Federici. 1997. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 94:10536-10540.
- Wolfersberger, M. G., X. J. Chen, and D. H. Dean. 1996. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:279-282.
- Wu Xiaoliang, S. John Vennison, Liu Huirong, Eitan Ben-dov, Arich Zaritsky and Sammy Boushiba. 1997. Mosquito larvicidal activity of transgenic *Anabaena* strain PCC 7120 expressing combinations of genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12):4971-4975.
- Wu, S.J., and D. H. Dean. 1996. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa δ -endotoxin. *J. Mol. Biol.* 255:628-640.
- Wu, D., J. J. Johnson, and B. A. Federici. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13:965-972.
- Wu, D. and F. N. Chang. 1985. Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDa proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal. *FEBS Lett.* 190:232-236.
- Yamagiwa M, Ogawa R, Yasuda K, Natsuyama H, Sen K, Sakai H. 2002. Active form of dipteran-specific insecticidal protein CryIIA produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66(3):516-22
- Yu, Y.M., M. Ohba, and S. S. Gill. 1991. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1075-1081.
- Yunovitz, H. y A. Yawetz. 1988. Interaction between the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* spp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Lett.* 230:105-108.

10. ANEXOS

10.1 Medios de cultivo.

10.1.1 Medio LB (*Luria-Bertani*)

Medio para sembrar y mantener las cepas de Bt y *E. coli*.

Volumen final: 1 ℓ.

A 950 ml de agua destilada agregar:

Bacto-triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar (solo para medio sólido)	20 g

Disolver los tres primeros reactivos en el agua. Posteriormente ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5 M (\cong 0.2 ml). Aforar el volumen de la solución a 1 ℓ con agua destilada. Agregar el agar (en caso de ser necesario) y esterilizar por autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez que el medio se ha enfriado, puede agregarse el antibiótico correspondiente en la concentración adecuada. Por ejemplo, la concentración de la cepa de Bt CG6 es de 25 µg/ml de eritromicina; mientras que para la cepa de Bt 4Q7 es de 10 µg/ml de eritromicina.

10.1.2 Medio mínimo SP

Medio para favorecer la esporulación de las cepas de Bt.

Volumen final: 1 ℓ

A 950 ml de agua destilada agregar:

Caldo nutritivo	8 g
MgSO ₄	0.25 g
KCl	1 g
Stock 1	1 ml

MnCl₂ · 4 H₂O (disolver 0.198 g en 100 ml de agua)

Stock 2	2 ml
FeSO ₄ · 7 H ₂ O (disolver 9.15 g en 250 ml de agua)	
H ₂ SO ₄ (tomar 7 ml de un stock 1 N para 250 ml de agua)	
Stock 3	1 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O (disolver 9.8 g en 100 ml de agua)	
Bacto-agar (solo para medio sólido)	20 g

Disolver todos los reactivos (a excepción del agar) en el agua. Posteriormente ajustar el pH a 7.0 con KOH 5 M. Aforar el volumen de la solución a 1 ℓ con agua destilada. Agregar el agar (en caso de ser necesario) y esterilizar por autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez que el medio se ha enfriado, puede agregarse el antibiótico correspondiente en la concentración adecuada.

10.1.3 Medio YPDA

Medio para mantener las cepas de levadura.

Volumen final: 1 ℓ

A 600 ml de agua destilada agregar:

Extracto de levadura	10 g
Bacto-peptona	20 g
Bacto-agar	20 g

Disolver todos los reactivos (a excepción del agar) en el agua. Ajustar el volumen de la solución a 890 ml con agua destilada. Agregar el agar (en caso de ser necesario) y esterilizar por autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez que el medio se ha enfriado, agregar 10 ml de stock 100x de adenina (0.5 g de sulfato de adenina en 50 ml de agua destilada) y 100 ml de solución de dextrosa al 20%. Ambas soluciones se deben encontrar previamente esterilizadas. También se puede agregar antibiótico si se requiere.

10.1.4 Medio mínimo SD

Medio para la expresión de posibles candidatas positivas de levadura en sistema de dos híbridos.

Volumen final: 1 ℓ

A 950 ml de agua destilada agregar:

Base de nitrógeno para levadura (YNB)	6.7 g
Dextrosa	20 g
Bacto-agar	20 g

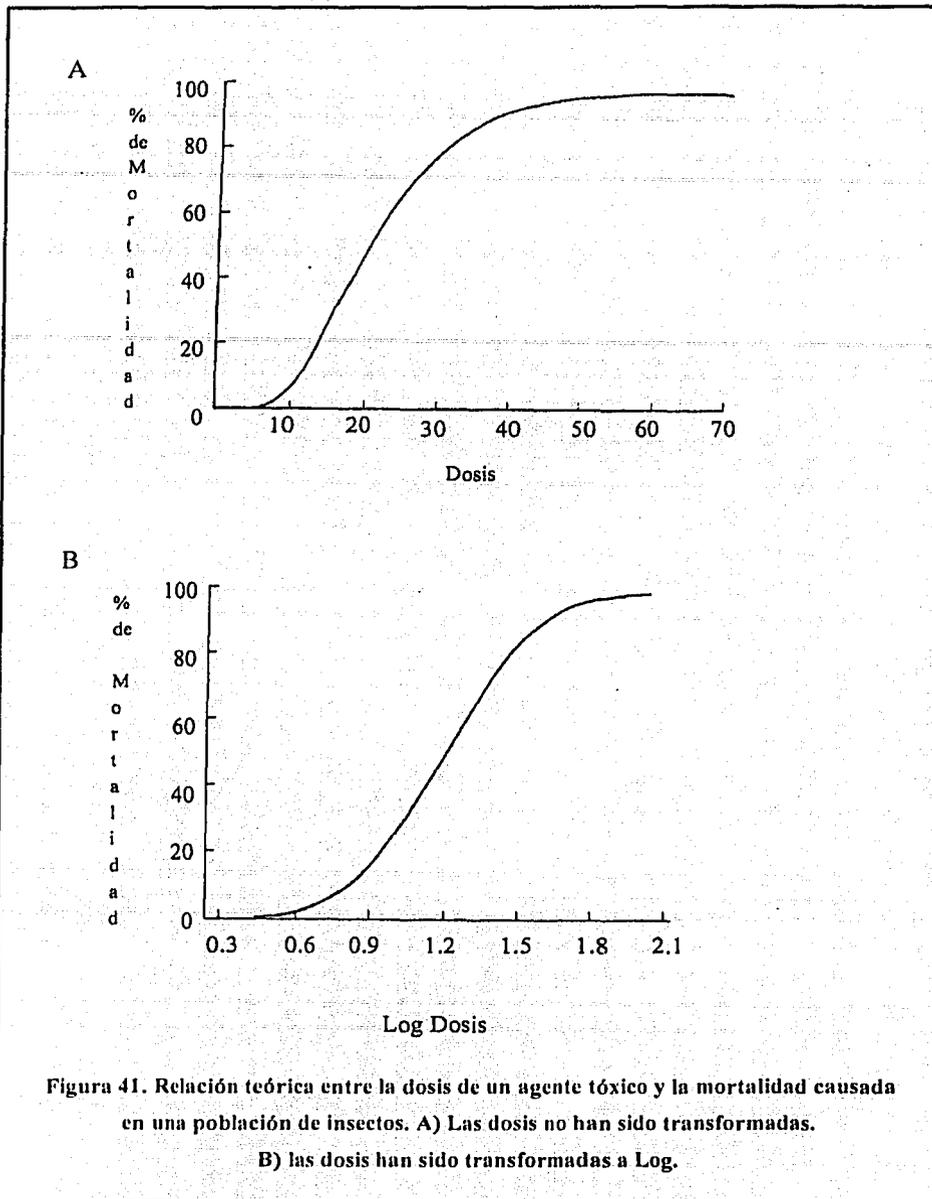
Disolver todos los reactivos (a excepción del agar) en el agua. Ajustar el volumen de la solución a 1 ℓ con agua destilada. Agregar el agar (en caso de ser necesario) y esterilizar por autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez que el medio se ha enfriado, agregar los aminoácidos correspondientes, así como el antibiótico, si se requiere.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10.2 Bases del análisis Probit.

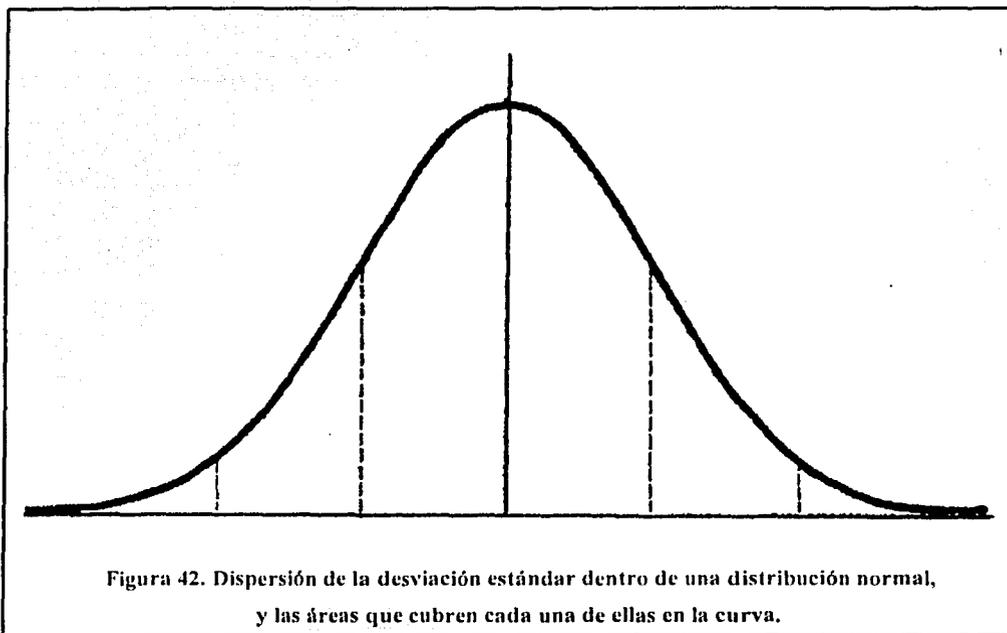
Los bioensayos realizados con *Bacillus thuringiensis* se fundamentan en los siguientes tres postulados básicos: a) un individuo manifestará el efecto esperado al administrarle una dosis determinada de la toxina; b) dicha dosificación variará de un individuo a otro; c) y el efecto sobre una población de individuos mostrará límites mínimos y máximos de dosificación. En otras palabras, el efecto de una dosis sólo podrá ser válido si se mide sobre una población homogénea de individuos. El rango de dosis mostrará un umbral en el que la dosis mínima de ese umbral causará el efecto deseado a un mínimo de la población probada, mientras que la dosis máxima de ese umbral causará el efecto esperado a un máximo de la población. Esto implica que si se desea establecer una relación entre las dosis probadas y la mortalidad causada por las preparaciones de Bt, cada dosis deberá probarse con una población representativa de individuos tal que refleje los efectos reales de la δ -endotoxina. De esta forma, los datos podrán ser analizados estadísticamente y se podrá estimar un parámetro estadístico que represente, con un nivel de probabilidad dado, la toxicidad de la preparación en prueba.

La correlación entre las diferentes dosis de un agente tóxico con sus consecuentes porcentajes de mortalidad no es del tipo lineal, sino una línea sigmoidea extendida; es decir, la sección de la curva correspondiente a las dosis máximas y a las mortalidades máximas se extienden a la derecha, provocando que la curva se muestre asimétrica (figura 41a). Un primer intento de equilibrar la curva se obtiene al transformar las dosis probadas en el bioensayo a logaritmos. Si bien el resultado sigue siendo una curva sigmoidea, ésta se hace asimétrica en sus regiones asintóticas (figura 41b).



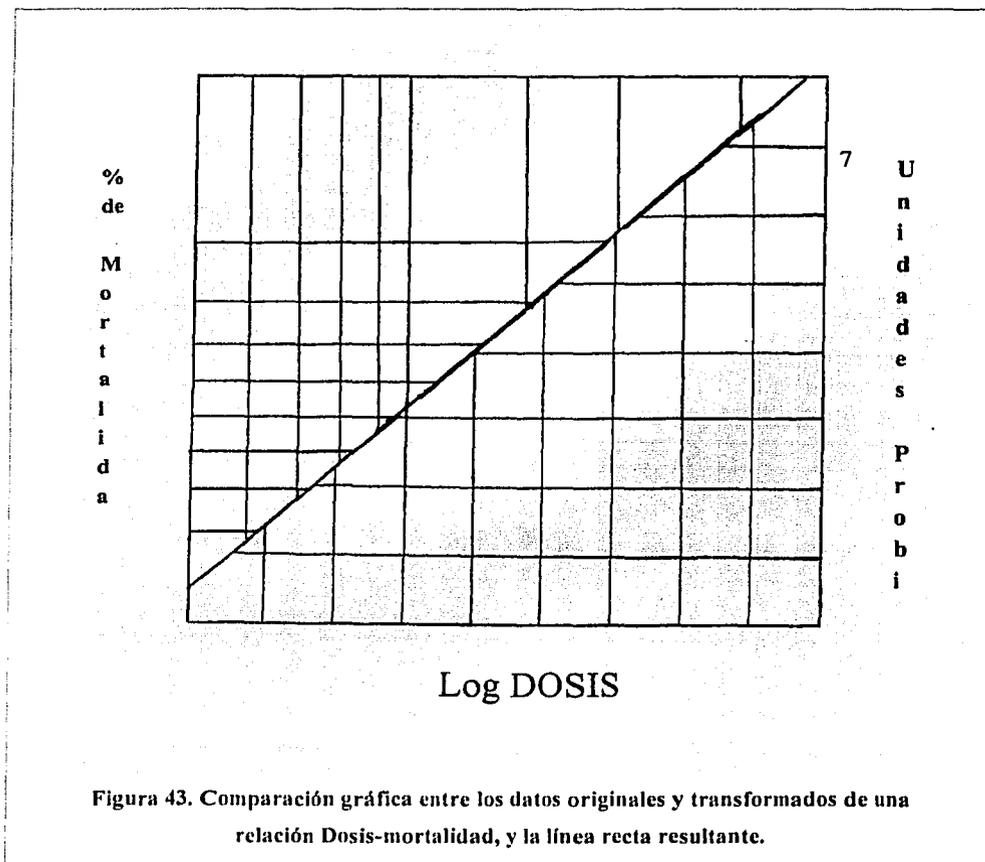
Por otro lado, una curva sigmoidea simétrica también representa la respuesta acumulada de una población con distribución normal. En otras palabras, la distribución de mortalidad de una población puede ahora representarse por el área contenida en una

campana o curva de Gausse, en dónde, el 50% del área (la media) coincide con el punto medio de la curva y con cero unidades de desviación estándar. En una distribución normal, las desviaciones estándar se distribuyen aritméticamente en la abscisa de la curva, representando un área específica. Así, el cero representa 50% del área, el 1 el 84%, el -1 el 15.9%, el 2 el 97.7%, el -2 el 2.3%, y así sucesivamente (figura 42). En otras palabras, si equiparamos la mortalidad con el efecto acumulativo de las desviaciones estándar de una curva normal, entonces podemos representar aritméticamente a los porcentajes de mortalidad, lo cual significa que la curvatura causada por la distribución de la mortalidad puede transformarse en una línea recta si a su vez se transforman los porcentajes en unidades de desviaciones estándar.



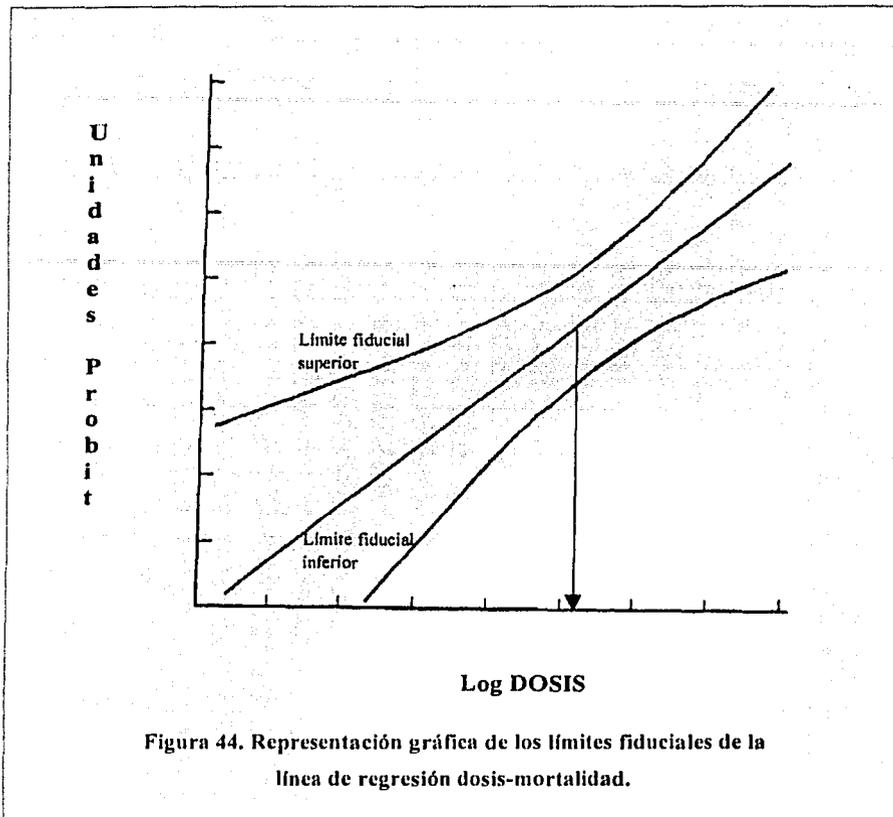
Con esta transformación, el 50% de mortalidad se convertiría en 0, por lo que las mortalidades menores al 50% estarían representadas por unidades negativas. Por esta razón, arbitrariamente se corre la escala 5 unidades, de tal forma que el cero corresponde al 5, el 1 al 6, el 2 al 7, el -1 al 4, el -2 al 3, y así sucesivamente. Con esta modificación,

convenientemente se evita trabajar con números negativos. Estas unidades son las llamadas Probit, y al análisis de regresión entre las dosis transformadas a logaritmos y los porcentajes de mortalidad transformados a unidades Probit, se le conoce como análisis Probit (figura 43), el cual, relaciona las variables mediante la técnica de máxima similitud por pruebas de bondad de ajuste consecutivas, en vez de utilizar la técnica de mínimos cuadrados, propia de un análisis de regresión normal. Esto se debe al hecho de trabajar con unidades discretas (muerto o no muerto), en vez de continuas. Asimismo, la técnica de máxima similitud asegura la obtención de estimadores consistentes (como LC_{50} =dosis que teóricamente mata el 50% de la población bajo ensayo), no está propensa a sesgos y, sobre todo, es eficiente en muestras grandes y pequeñas. De esta forma se establece una relación lineal simple entre log dosis contra mortalidad expresada en unidades Probit (Ibarra y Del Rincón, 2001).



Los principales parámetros resultantes de un análisis Probit son: el estimador medio (LC_{50}), sus límites fiduciales, el valor de ji-cuadrada (χ^2) y la pendiente de la línea de regresión. Al estimador medio generalmente se le conoce como dosis letal media (LC_{50}) o sea la dosis que teóricamente mata el 50% de la población bajo ensayo. Sin embargo, una dosis representa una determinada cantidad del elemento tóxico que es administrado a cada uno de los individuos. Normalmente, ésta no es la técnica que se sigue cuando se prueban productos de Bt, ya que los individuos comúnmente se exponen a concentraciones de toxina, desconociendo la cantidad precisa que ingiere cada individuo. Es por eso que en las pruebas con Bt normalmente se estima la LC_{50} .

La precisión de los estimadores medios en el análisis Probit se refleja en la amplitud de sus límites fiduciales. Estos representan el rango o intervalo del estimador a un determinado nivel de probabilidad (generalmente 95 ó 99%). Entre más estrecho sea este intervalo, más preciso y confiable es el estimador. La gráfica de los límites fiduciales (valores máximos y mínimos) de todos los valores de la línea de regresión no se observa como líneas paralelas de ésta, sino que son arcos que se estrechan exactamente en el punto del estimador medio, y luego divergen en sus extremos (figura 44). En otras palabras, de todos los puntos que conforman la línea de regresión, es la LC_{50} el estimador más preciso, en cuanto que representa los límites fiduciales más estrechos. De ahí que se escoja al estimador medio como el parámetro estadístico que representa el nivel de toxicidad de algún agente, sobre una población y bajo las condiciones probadas. Es por esa razón que las pruebas con Bt tienen como principal objetivo estimar la LC_{50} de cada preparación, como punto de comparación entre cepas, entre productos formulados, entre cristales puros, etc., y es un parámetro el que determina si una cepa es más o menos tóxica que los estándares; si una población de insectos desarrolló o no resistencia a algún producto a base de Bt; o si a un lote de producción debe agregársele mayor o menor cantidad de ingredientes inertes, para estandarizar el nivel de actividad de un lote comercial.



Existen dos parámetros adicionales importantes en el análisis Probit: la χ^2 y la pendiente. La primera es resultado de la técnica de máxima similitud, ya que se basa en una serie consecutiva de pruebas de bondad de ajuste de los datos observados contra los datos esperados, representados por los puntos que conforman la línea de regresión. El valor de la χ^2 refleja el nivel de similitud entre los datos obtenidos del bioensayo y los representados por la línea de regresión ó teóricos. Es evidente que entre mayor sea esta similitud, más confiables serán los estimadores medios provenientes del análisis. Un valor mínimo de χ^2 expresa una máxima similitud. En lo referente al valor de la pendiente de la línea de regresión, éste refleja, adicional a la magnitud del efecto de la variable independiente (log dosis), la utilidad del rango de dosis probada. En otras palabras, si la pendiente es muy baja,

debemos estrechar el rango de dosis en posteriores bioensayos y de esta forma distribuir los diferentes niveles de mortalidad más equilibradamente; por el contrario, si la pendiente es muy alta, esto significa que el efecto está concentrado en un espacio muy pequeño de la gráfica y es necesario ampliar el rango de dosis, con los mismos propósitos descritos anteriormente.

Este razonamiento de prueba Probit es el que nosotros ocupamos para analizar nuestros datos de bioensayo. A partir de la recta proveniente de graficar log de la dosis contra mortalidad en unidades Probit, determinamos qué valor de las abscisas corresponde a la ordenada 5, o sea, el 50% de la población que presentó efecto de muerte. Esa cantidad representa la dosis letal media LC_{50} . Dicha dosis se obtiene por medio del programa POLO de LeOra para Windows. Este programa además de proporcionar el valor de LC_{50} , proporciona un listado detallado de los límites fiduciales obtenidos, el valor de χ^2 y la pendiente de la recta obtenida.

A continuación, se muestran los resultados estadísticos desplegados por el programa POLO de LeOra para los bioensayos con Cyt1A, Cry11A y Bti.

POLO-PC
© Copyright LeOra Software 1987

```
Input file > CLACYT
input: =CLAU
input: *c
input: 5000 40 40
input: 4500 40 39
input: 4000 40 34
input: 3500 40 30
input: 3000 40 21
input: 2500 40 17
input: 2000 40 14
input: 1500 40 7
input: 1000 40 5
input: 500 40 3
```

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
5000.00000	3.698970	40	40	1.000
4500.00000	3.653213	40	39	.975
4000.00000	3.602060	40	34	.850
3500.00000	3.544068	40	30	.750
3000.00000	3.477121	40	21	.525
2500.00000	3.397940	40	17	.425
2000.00000	3.301030	40	14	.350
1500.00000	3.176091	40	7	.175
1000.00000	3.000000	40	5	.125
500.00000	2.698970	40	3	.075

Chi-squared goodness of fit test

Index of significance for potency estimation (g) goodness of fit test

subjects	responses	expected	Deviation	probability	Probit unit
40.	40.	35.779	4.221	.894466	8.00
40.	39.	34.432	4.568	.860793	7.05
40.	34.	32.611	1.389	.815270	6.04
40.	30.	30.148	-0.148	.753692	5.67
40.	21.	26.833	-5.833	.670824	5.08
40.	17.	22.442	-5.442	.561055	4.82
40.	14.	16.837	-2.837	.420932	4.61
40.	7.	10.252	-3.252	.256298	4.07
40.	5.	3.896	1.104	.097401	3.87
40.	3.	0.334	2.666	.008344	3.59

chi-square 40.292	degrees of freedom 8
log(L)=-185.6	slope=3.644+- .330
heterogeneity 5.04	g(.95)=0.219
LD10=1009.491	limits: 425.195 to 1439.856
LD50=2268.705	limits:1665.777 to 2923.978
LD90=5098.631	limits:3747.610 to 10339.985

STOP - Program terminated.

POLO-PC
 © Copyright LeOra Software 1987

Input file > CLACRY

input: =CLAU
 input: *c
 input: 1000 40 40
 input: 900 40 37
 input: 800 40 34
 input: 700 40 30
 input: 600 40 19
 input: 500 40 15
 input: 400 40 13
 input: 300 40 10
 input: 200 40 5
 input: 100 40 2

dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
1000.00000	3.000000	40	40	1.000
900.00000	2.954243	40	37	.925
800.00000	2.903090	40	34	.850
700.00000	2.845098	40	30	.750
600.00000	2.778151	40	19	.475
500.00000	2.698970	40	15	.375
400.00000	2.602060	40	13	.325
300.00000	2.477121	40	10	.250
200.00000	2.301030	40	5	.125
100.00000	2.000000	40	2	.050

Chi-squared goodness of fit test

Index of significance for potency estimation (g) goodness of fit test

subjects	responses	expected	deviation	probability	Probit unit
40.	40.	35.340	4.660	.883494	8.00
40.	37.	33.910	3.090	.847756	6.48
40.	34.	31.999	2.001	.799976	6.04
40.	30.	29.445	.555	.736122	5.67
40.	19.	26.053	7.053	.651322	4.95
40.	15.	21.625	6.625	.540631	4.69
40.	13.	16.066	3.066	.401651	4.56
40.	10.	9.657	.343	.241427	4.07
40.	5.	3.607	1.393	.090174	3.87
40.	2.	.302	1.698	.007543	3.36

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

chi-square 28.900	degrees of freedom 8
log(L)=-189.0	slope=3.623+- .336
heterogeneity 3.61	g(.95)=.165
LD10=207.528	limits: 106.062 to 284.266
LD50=2268.705	limits: 366.426 to 579.272
LD90=5098.631	limits: 802.905 to 1861.181

STOP - Program terminated.

POLO-PC
 © Copyright LeOra Software 1987

Input file > CLABTI

input: =CLAU
 input: *c
 input: 25 40 40
 input: 22.5 40 39
 input: 20 40 36
 input: 17.5 40 35
 input: 15 40 32
 input: 12.5 40 25
 input: 10 40 20
 input: 7.5 40 17
 input: 5 40 14
 input: 2.5 40 10

dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
25.00000	1.397940	40	40	1.000
22.50000	1.352183	40	39	.975
20.00000	1.301030	40	36	.900
17.50000	1.243038	40	35	.875
15.00000	1.176091	40	32	.800
12.50000	1.096910	40	25	.625
10.00000	1.000000	40	20	.500
7.50000	.875061	40	17	.425
5.00000	.698970	40	14	.350
2.50000	.397940	40	10	.250

Chi-squared goodness of fit test

Index of significance for potency estimation (g) goodness of fit test

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

subjects	responses	expected	deviation	probability	Probit unit
40.	40.	36.875	3.125	.921870	8.00
40.	39.	36.131	2.869	.903268	7.05
40.	36.	35.154	.846	.878840	6.28
40.	35.	33.850	1.150	.846247	6.18
40.	32.	32.080	-0.080	.801993	5.84
40.	25.	29.630	-4.630	.740756	5.33
40.	20.	26.174	-6.174	.654362	5.00
40.	17.	21.222	-4.222	.530561	4.82
40.	14.	14.154	-0.154	.353846	4.61
40.	10.	5.027	4.973	.125683	4.33

chi-square 20.592 degrees of freedom 8
 log(L)=-194.2 slope=2.565+-0.256
 heterogeneity 2.57 g(.95)=0.136
 LD10= 2.216 limits: .867 to 3.508
 LD50= 7.001 limits: 4.874 to 8.953
 LD90=22.122 limits:16.392 to 38.171

STOP - Program terminated.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN