



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“SILENCIAMIENTO DE Bt - RI Y AMINOPEPTIDASA
N DE *Manduca sexta*, POR MEDIO DE RNA DE DOBLE
CADENA Y SU PAPEL COMO RECEPTORES DE LAS
TOXINAS *Cry de Bacillus thuringiensis*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

IDALIA LOPEZ GOROSTIETA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. ALEJANDRA BRAVO ESTEBANOS

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD DE CHILE
BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Silenciamiento de Bt-R1 y Aminopeptidasa N de Manduca sexta, por medio de RNA de doble cadena y su papel como receptores de las toxinas Cry de Bacillus thuringiensis".

realizado por Idalia López Gorostieta

con número de cuenta 09723984-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Ma. Alejandra Bravo de la Parra

Propietario

Dr. Mario Soberón Chávez

Propietario

Dr. Carlos F. Arias

Suplente

Dr. José Luis Puente

Suplente

Biol. Alfonso Vilchis Peluyera

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Idalia López
Gorostieta

FECHA: 18 - Mayo - 2004

FIRMA: 

“Silenciamiento de Bt-R₁ y Aminopeptidasa N de *Manduca sexta*, por medio de RNA de doble cadena y su papel como receptores de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*”.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Microbiología Molecular en el laboratorio y bajo la dirección de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Por Idalia López Gorostieta

Dedico este trabajo:

A mi madre la Sra. Herlinda Gorostieta, mi gran ejemplo y fuente de fortaleza y voluntad para seguir siempre hacia adelante. Gracias por estar Mamá.

A mi padre el Sr. Gaspar López, por su amor y buenos deseos silenciosos

A todos mis hermanos Gisela, Heriberto, José Luis, Medin, Aaron, Miriam y en especial a mi hermana Lili, por su apoyo incondicional y presencia en los momentos precisos y a Laura por sus consejos y experiencia brindada, gracias.

A mi amiga y hermana Mayte, no tengo palabras para decirte gracias por compartir media vida de experiencias únicas e inolvidables y por ser mi ejemplo para no voltear atrás y continuar luchando siempre ante las adversidades.

A todos mis amigos de la Facultad en especial a Nancy, Miriam, Mariana, Laura, Mariel, Anita, Emmanuel, Andrés, Iván David, Ileri, Irma, imposible olvidar todos los momentos divertidos que compartimos en infinidad de ocasiones.

A Iván Arenas, por compartir su tiempo y enseñarme a ser paciente pero sobre todo por estar a mi lado en esta etapa de mi vida.

Agradezco:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a sus dependencias, la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología, por la preparación académica, espacio y recursos necesarios brindados para la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, toda mi admiración y respeto, una investigadora excepcional. Gracias por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y el tiempo dedicado a este trabajo.

Al Dr. Mario Soberón, a la Dra. Isabel Gómez, al Dr. Carlos Muñoz, Oswaldo López, al Dr. Juan Miranda y al Dr. Raúl Miranda por sus sugerencias y colaboración en la realización de este trabajo.

A todas las personas que intervinieron en mi formación académica a lo largo de la carrera, Ricardo Noguera, Aquiles Bernal, Aliesha, Saúl Cano, Julio Prieto, Arturo Becerra, Erwin, Luis, René, Julio Prieto, Jaime Jiménez Pilar Segarra, Carmen, Alfonso Vilchis, Miguel Ángel Santollo, etc.

A la Dra. Patricia Joseph, y al Dr. José Luis Puente por su apoyo y paciencia para todo lo que involucra la organización del taller de Biología de las Macromoléculas y la excelente aportación académica de los investigadores que forman parte de él.

A los integrantes de la comisión revisora de tesis: Dra. Alejandra Bravo, Dr. Mario Soberón, Dr. Carlos F. Arias, Dr. José Luis Puente, Biol. Alfonso J. Vilchis Peluyera por sus valiosos comentarios.

A mis compañeros de laboratorio, Claudia Pérez, Cristopher Padilla, Omar Toribio, Juan Conde, Luisa Fernández, María Luisa, Lupe, Gustavo, Claudia Morera, Nuria y Sabino por los consejos aportados a este trabajo y los momentos agradables compartidos. En especial agradezco a Liz por su insustituible colaboración en el cuidado y dieta tanto de las *Manducas* como mía.

Al Biol. Jorge Sánchez y a Sergio Blancas por su colaboración técnica y su motivación hacia el deporte.

A Chela por alentarnos día con día a trabajar y por su colaboración administrativa.

Índice	Página
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
1.0 Resumen.....	10
2.0 Introducción.....	12
2.1 <i>Manduca sexta</i> como modelo de análisis.....	14
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
2.3 Toxinas insecticidas.....	18
2.4 Toxinas Cry.....	15
2.5 Receptores de las toxinas Cry.....	22
2.6 Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	27
2.7 Insecticiana.....	28
2.8 RNA de interferencia.....	29
3.0 Objetivos.....	34
4.0 Metodología.....	35
4.1 Insectos y aislamiento de intestinos.....	35
4.2 Aislamiento del RNA total.....	35
4.3 Diseño de oligonucleótidos.....	35
4.4 RT-PCR.....	36
4.5 PCR.....	36
4.6 Clonación en el vector pLITMUS (28i o 38i).....	37
4.7 Transformación.....	38
4.8 dsRNA.....	39
4.9 Digestión de dsRNA con DICER.....	41
4.10 Cuantificación de RNA.....	43
4.11 Microinyección.....	43
4.12 Disección de larvas.....	44
4.13 Ensayos de actividad de APN.....	45
4.14 Cuantificación de proteína.....	45
4.15 Western blot.....	45
4.16 Análisis de la generación F1.....	46
4.17 Bioensayos.....	46
5.0 Resultados y discusión.....	47
5.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento del gen de Bt-R ₁ , APN e InsA.....	47
5.2 Amplificación de los fragmentos de DNA de Bt-R ₁ , APN e InsA.....	49

5.3 Restricción de los fragmentos de DNA y de los vectores.....	50
5.6 Preparación del DNA templado para la síntesis de dsRNA.....	52
5.7 Microinyecciones:	55
5.7.1 Análisis de la microinyección de dsRNA de Bt-R1 y APN en.....	55
larvas de L2.	
5.7.1.I Disección de larvas.....	56
5.7.1.II Cuantificación de proteína.....	56
5.7.1.III Análisis de la actividad específica de APN en larvas.....	56
microinyectadas con dsRNA de APN y Bt-R ₁	
5.7.1.IV Análisis de la expresión de las proteínas APN y Bt-R ₁	57
por inmunodetección en larvas inyectadas con dsRNA.	
5.7.2 Expresión de Bt-R ₁ en la generación F1 de las larvas silenciadas....	58
con dsRNA de Bt-R ₁ .	
5.7.3 Análisis de la microinyección de dsRNA en huevos.....	60
5.7.4 Análisis de la expresión de APN en la generación F1 de.....	63
individuos microinyectados con dsRNA de APN en estadio de huevo.	
5.7.5 Análisis de la microinyección de siRNA Bt-R ₁ y APN (digestión...)	64
del dsRNA con la enzima DICER a fragmentos de 22 pb) en huevos	
5.7.6 Análisis de la microinyección de larvas L1 con dsRNA y siRNA....	66
de APN y Bt-R ₁ y selección en placas con dieta más toxina Cry1Ab.	
5.7.7 Análisis de la microinyección de huevos y larvas en L1 y L2 con...)	69
dsRNA de InsA	
6.0 Conclusiones.....	71
7.0 Perspectivas.....	72
8.0 Anexos.....	74
1: Protocolo para purificación de DNA	
2: Protocolo para la purificación de DNA (plásmidos) a partir de cultivos en medio LB líquido.	
3: Preparación de células competentes con CaCl ₂	
4: Purificación de esporas-cristales de proteínas Cry	
9.0 Referencias.....	76

Índice de figuras

- Figura 1. Ciclo de vida de *Manduca sexta*
- Figura 2. Micrografía de *Bacillus thuringiensis*
- Figura 3. Relación filogenética entre diferentes toxinas insecticidas
- Figura 4. Relación filogenética entre las toxinas Cry de tres dominios
- Figura 5. Longitud relativa de las protoxinas Cry y la posición de los cinco bloques conservados.
- Figura 6. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa.
- Figura 7. Representación esquemática de la Aminopeptidasa N
- Figura 8. Representación esquemática de Bt-R₁ (Caderina E)
- Figura 9. Mecanismo de acción de las toxinas Cry
- Figura 10. Mutante de *M. sexta* en la hormona juvenil
- Figura 11. Mecanismo de RNAi
- Figura 12. *lin-4*, un microRNA que es procesado de su precursor transcripcional por la enzima DICER
- Figura 13. Vector pLITMUS
- Figura 14. Representación gráfica de la preparación del DNA templado y la síntesis del dsRNA
- Figura 15. Actividad de DICER en el procesamiento de los dsRNAs a siRNAs
- Figura 16. Representación gráfica de la región amplificada de los genes que codifican para las proteínas Bt-R₁, APN e InSA.
- Figura 17. Alineamiento de la secuencia codificante de las isoformas a y b del gen de la insecticianina
- Figura 18. Productos de reacción de PCR de Bt-R₁, APN e InSA purificados.
- Figura 19. Vectores pLITMUS 28 y 38i y fragmentos de DNA amplificados de cada gen (Bt-R₁, APN e InSA), digeridos con las enzimas correspondientes.
- Figura 20. DNA de la colonia candidata para tener el vector pLITMUS 38i más el inserto de Insecticianina de 324 pb. Digestión del DNA de la clona candidata de InSA con *Hind* III. Vector pLITMUS 38i y DNA de la clona de InSA digeridos con *Hind* III y *Sal* I.
- Figura 21. Digestión de la clona de InSA con *Hind* III y *Sal* I en reacciones separadas para la preparación del templado de la transcripción *in vitro*.
- Figura 22. Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA clonados de cada proteína empleando oligo T7 y Taq polimerasa para la preparación del templado de la transcripción *in vitro*.
- Figura 23. Productos de la transcripción *in vitro*.
- Figura 24. Gráfica de Actividad de APN en larvas L3 que fueron microinyectadas en L2 con dsRNA de APN y Bt-R₁
- Figura 25. Inmunoblot del homogenizado de intestino de larvas L3 microinyectadas con dsRNA de APN y Bt-R₁ en L2.
- Figura 26. Gráfica de actividad específica de APN de larvas en L2 cuyos padres fueron microinyectados con dsRNA de Bt-R₁.
- Figura 27. Inmunoblot para la identificación de la expresión de Bt-R₁ en larvas F1 cuyos padres fueron tratados con dsRNA de Bt-R₁.
- Figura 28. Actividad de APN en larvas L2 microinyectadas con dsRNA de APN en estadio

- Figura 28. Actividad de APN en larvas L2 microinyectadas con dsRNA de APN en estadio de huevo.
- Figura 29. Actividad de APN en larvas L3 microinyectadas con dsRNA de APN en estadio de huevo.
- Figura 30. Inmunoblot para la identificación de la expresión de APN en larvas L2 y L3 microinyectadas con dsRNA de APN en estadio de huevo.
- Figura 31. Actividad de APN de larvas F1 en L2 cuyos padres fueron tratados con dsRNA de APN.
- Figura 32. Inmunoblot para la identificación de la expresión de la proteína APN de larvas L2 cuyos padres fueron microinyectados con dsRNA de APN.
- Figura 33. Inmunoblot para identificar la expresión de Bt-R₁ y APN en larvas disectadas en L2 microinyectadas en huevo con siRNA de Bt-R₁ y siRNA de APN respectivamente.
- Figura 34. Inmunoblot para identificar la expresión de APN en larvas L2 microinyectadas con dsRNA de APN en L1 y sobrevivientes al reto con toxina Cry1Ab.
- Figura 35. Inmunoblot para identificar la expresión de APN en larvas L2 microinyectadas con siRNA de APN en L1 y sobrevivientes al reto con toxina Cry1Ab.

Índice de Tablas

- Tabla 1. Mezcla de reacción de RT-PCR para la síntesis de cDNA
- Tabla 2. Mezcla de reacción para el PCR con Vent- polimerasa
- Tabla 3. Reacción de ligación
- Tabla 4. Reacción de transformación
- Tabla 5. Reacción de PCR para la síntesis del templado de la Transcripción *in vitro*
- Tabla 6. Reacción de transcripción *in vitro*
- Tabla 7. Reacción de digestión de dsRNA con la enzima DICER a fragmentos de 22 pb
- Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los tres fragmentos de DNA (Bt-R₁, APN e InsA).
- Tabla 9. dsRNA de Bt-R₁ y APN microinyectado en larvas L2
- Tabla 10. Cuantificación de proteína de larvas microinyectadas en L2 con dsRNA de Bt-R₁ y APN y disectadas en L3
- Tabla 11. Datos de la actividad específica de APN en larvas L3 microinyectadas con dsRNA de Bt-R₁ y APN en L2
- Tabla 12 Actividad específica de APN de larvas L2 cuyos padres fueron tratados con dsRNA de Bt-R₁
- Tabla 13 Datos de actividad específica de APN en larvas L2 de APN en estadio de huevo
- Tabla 14 Datos de actividad específica de APN en larvas L3 de APN en estadio de huevo
- Tabla 15 Datos de actividad específica de APN en larvas F1 en L2 (padres microinyectados con dsRNA de APN en estadio de huevo.
- Tabla 16 siRNAs microinyectados en huevos de *M. sexta*, número de huevos eclosionados y de larvas disectadas en L2.
- Tabla 17. Larvas L2 microinyectadas en L1 con dsRNA y siRNA de APN y Bt-R₁ y selección con toxina Cry1Ab.
- Tabla 18. Huevos y larvas L1 y L2 microinyectadas con dsRNA de InsA.

Abreviaturas

Aminopeptidasa N	APN
Caderina de <i>Manduca sexta</i>	Bt-R ₁
Caderina de <i>Bombix mori</i>	Bt-R ₁₇₅
Anticuerpo anti Aminopeptidasa N	Ab-anti APN
Anticuerpo anti Bt-R ₁	Ab-anti Bt-R ₁
Insecticianina A	InsA
Vesículas de microvellosidad apical media	BBMV
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido ribonucleico	RNA
Ácido ribonucleico mensajero	mRNA
Ácido ribonucleico de doble cadena	dsRNA
Ácido ribonucleico de doble cadena interferente pequeño	siRNA
Ácido ribonucleico micro	miRNA
Isopropil-b D-tiogalactopiranosico	IPTG
Solución amortiguadora de fosfatos	PBS
Revoluciones por minuto	rpm
Electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes	SDS-PAGE
Fluoruro de fenilmetilsulfonil	PMSF
Albúmina sérica bovina	BSA
Nucleótidos	nt
Pares de bases	pb
Región no traducida	UTR
Ejemplo	Ej.
Dimetil formamida	DMF
5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido	X-gal
Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	IPTG
Desoxirribonucleótidos	dNTPs

1.0 Resumen

En el mecanismo de acción de las toxinas Cry en el epitelio intestinal de insectos susceptibles, la unión de estas proteínas a su receptor presente en las microvellosidades apicales de las células epiteliales intestinales es fundamental para la especificidad y la toxicidad.

Por lo tanto, la interacción de las toxinas Cry con los receptores es en la actualidad ampliamente estudiada a fin de entender su participación en el mecanismo de toxicidad sobre diversos insectos plaga. En el caso de las toxinas Cry1A, específicas contra insectos lepidópteros como *Manduca sexta* se ha descrito que las proteínas Aminopeptidasa N (APN) y Caderina (Bt-R₁), funcionan como receptores. Se propone una participación secuencial de cada una de estas moléculas en el proceso de unión e inserción de la toxina a la membrana apical del intestino del insecto. La toxina en forma monomérica tiene una gran afinidad por Bt-R₁ y esta la interacción dispara la oligomerización de la toxina formando un tetrámero. A su vez el tetrámero posee gran afinidad por APN; la cual como segundo receptor funciona como acarreador del oligómero a una región de membrana plasmática denominada microdominio de membrana (raft) donde la toxina se inserta para formar poros iónicos que provocan la muerte de la célula.

En este trabajo se silenció la expresión de las proteínas APN y Bt-R₁ empleando el mecanismo de RNA de interferencia, que consiste en la microinyección intrahemocélica (a huevos y larvas de *Manduca sexta*) de fragmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) sintetizados *in vitro* que poseen una secuencia homóloga a la del RNAm de las proteínas receptoras (APN y Bt-R₁). Este dsRNA al aparearse con su secuencia homóloga desencadena el mecanismo de destrucción del RNAm mediado por el complejo enzimático DICER que produce moléculas de RNAs interferentes pequeños (siRNAs) de 21-25 nucleótidos y el complejo de nucleasas RISC que induce la degradación del RNAm homólogo a los siRNAs. De esta manera se evita la síntesis de la proteína codificada por ese RNA.

También se ha descrito que existe un proceso de amplificación del mecanismo de silenciamiento específico en el que participa una polimerasa dependiente de RNA (RdRP), que permite prolongar el silenciamiento de la proteína específica, inclusive hasta la siguiente generación.

Los dsRNAs diseñados específicamente para silenciar APN y Bt-R₁, fueron microinyectados en huevos y larvas de *M. sexta*. En el siguiente estadio de desarrollo (posterior a la microinyección), se disectó el intestino de las larvas y con el homogenizado se analizó la expresión de las proteínas (APN y Bt-R₁) midiendo la actividad específica de APN y detectando a las proteínas mediante inmunoblot con anticuerpos específicos para cada una.

Se obtuvo el silenciamiento específico de las proteínas APN y Bt-R₁ de *M. sexta*. En el caso de APN el silenciamiento se obtuvo en huevos y larvas de segundo y tercer estadio de desarrollo (inyectadas con dsRNA de APN) y se mantuvo en algunas larvas hasta la generación F1; la ausencia de la señal de la proteína en inmunoblot coincidió con una disminución en la actividad específica de APN.

La eficiencia de los silenciamientos obtenidos para el caso de APN fue baja, aproximadamente del 50%, es decir, sólo el 50% de las larvas inyectadas con dsRNA de APN estuvieron afectadas en la síntesis de esta proteína.

En el caso de Bt-R₁ el silenciamiento de la proteína se observó por inmunoblot sólo en larvas de tercer estadio de desarrollo (inyectadas en el segundo estadio con dsRNA de Bt-R₁) y no se mantuvo hasta la generación F1. De acuerdo al análisis de Inmunoblot, la eficiencia de silenciamiento obtenido de esta proteína fue del 100%.

2.0 Introducción

Con el objetivo de tratar de elucidar claramente la participación secuencial de las proteínas receptoras de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt-R₁ y APN), en el mecanismo de acción sobre los insectos susceptibles, se plantea evitar la expresión de dichas proteínas y observar de que manera se afecta la interacción con las diferentes estructuras de la toxina (monómero u oligómero) involucradas en la toxicidad sobre el insecto sobre larvas que carezcan de APN o Bt-R₁^{28, 37}.

2.1 *Manduca sexta* como modelo de análisis

Taxonomía:

Nombre científico: *Manduca sexta*, Linnaeus, 1763

Nombre común: Cachudo del tabaco

Orden: Lepidóptera

Familia: Sphingidae, Latreille, 1802

Familia común : Hawk moths

Subfamilia: Sphinginae, Latreille, 1802

Tribu: Sphingini, Latreille, 1802

Genero: *Manduca*, Hubner, 1807

Especie: *sexta sexta*, Butler, 1877

Comida: La larva puede ser peste de la papa, tomate y tabaco.

Estatus: Es una especie común

Características generales:

M. sexta es un insecto con desarrollo holometabólico, es decir, que pasa por un cambio metabólico completo durante su ciclo de vida, por lo que los adultos son muy diferentes a las larvas y pupas. En estados larvales tiene un tamaño entre 0.5 a 10 cm., con bandas laterales oblicuas blancas y negras y poseen una especie de prominencia en la parte posterior, similar a un cuerno de color rojizo.

El ciclo de vida (Figura 1) comienza en el huevo, del cual emerge la larva de primer estadio que durante el desarrollo, se alimenta y crece rápidamente; de un estadio de desarrollo a otro cambia de cutícula 4 veces. La larva de 5^{to} estadio se convierte en pupa, en donde sufre una reorganización extensiva y completa del plan corporal. En su ambiente natural, las larvas de *M. sexta* excavan cámaras bajo la tierra para pupar, esto les ofrece protección. Posteriormente emerge como un adulto y se reproduce.

La comida normal de este insecto son las hojas del tomate (de las que ingiere los pigmentos amarillos de carotenoides), el color de la larva sería normalmente el de la hoja, pero en su sangre poseen una proteína azul llamada insecticianina, entonces, los pigmentos amarillos ligan a las proteínas azules y esto crea el color verde. Sin embargo, en el laboratorio la ausencia de carotenoides en la dieta artificial provoca que las larvas mantengan un color azulado.

Interesantemente, a pesar de la nicotina presente en la hoja que es normalmente tóxica, las larvas no son dañadas, ya que poseen un mecanismo para separarla selectivamente y secretarla.

Distribución:

Se distribuye en una gran variedad de hábitats, desde el norte de Estados Unidos, hasta Argentina

Sintomatología y daños:

El daño que ocasiona es consecuencia del consumo muy rápido de tejido verde de la planta, en corto tiempo dejan sólo las nervaduras de las hojas y los tallos. Pueden consumir toda la planta, incluso los frutos.

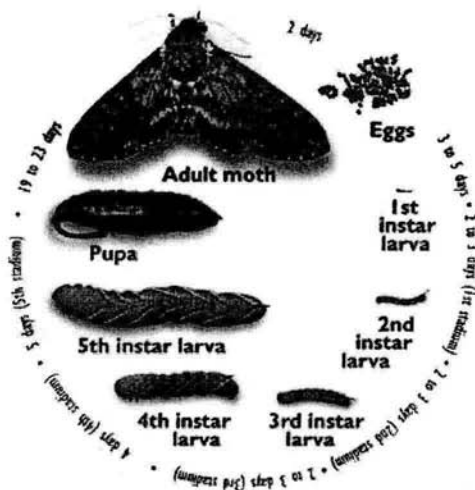


Fig. 1. Ciclo de vida de *Manduca sexta*, obtenido de <http://insected.arizona.edu/manduca/Activities.html>
05 de Noviembre de 2003

2.2 *Bacillus thuringiensis*

Las bacterias entomopatógenas Gram-positivas han recibido gran atención debido a su utilidad para el control de insectos plaga importantes para la agricultura e insectos vectores de enfermedades humanas.

Una de las primeras bacterias entomopatógenas descubiertas fue *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), una bacteria aislada de suelo, granos almacenados, cadáveres de insectos y superficies de plantas que ha sido descrita como patógeno facultativo^{27, 28, 37}.

Bt es una bacteria Gram-positiva formadora de endoespora (células reproductoras asexuales que le permiten sobrevivir en condiciones adversas), durante la fase de esporulación de su ciclo de desarrollo produce inclusiones cristalinas (hasta de 1µm de largo, ver figura 2) que contienen una o más proteínas insecticidas (proteínas Cry o Cyt)^{10, 37, 53}. Estas proteínas son tóxicas para ciertos insectos cuando son ingeridas, debido a su acción en las células epiteliales del intestino medio³⁷. Esta actividad toxigénica ha permitido el desarrollo de bioinsecticidas basados en *Bt* esporulada para el control de ciertas especies de insectos pestes en la agricultura, en especial de los órdenes Lepidóptera, Díptera, Coleóptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera, Mallofaga así como contra nemátodos y protozoarios²⁸. Los insecticidas derivados de *Bt* constituyen el ejemplo más importante de productos para el control de plagas y ocupan la mayor parte del mercado mundial de bioinsecticidas. Estos productos se han utilizado comercialmente por muchos años y han sido aceptados como productos biodegradables y seguros para los vertebrados y el ambiente, ya que *Bt* no es tóxico para los humanos ni animales. Recientemente se han usado formulaciones de *B. thuringiensis* subespecie *israelensis* (*Bti*) y *Bacillus sphaericus* (*Bsp*) para el control de mosquitos acarreadores de enfermedades.

En cuanto a filogenia, existe un parentesco filogenético entre *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *Bacillus anthracis* cuyas características distintivas son los genes codificados por los plásmidos que contiene cada especie del género *Bacillus*.

Los genes que codifican para las proteínas insecticidas se localizan en plásmidos transmisibles y generalmente están flanqueados por elementos transponibles (dos grupos de secuencias invertidas repetidas)^{27, 28}; de esta manera, la diversidad de cepas de *Bt* está dada en gran parte por un alto grado de plasticidad genética²⁸. En consecuencia, cabe destacar que el factor importante en la determinación de la especificidad contra los insectos y algunos no insectos (Ej. nemátodos), invadidos por estos entomopatógenos son las proteínas insecticidas contenidas en los cristales parasporales.

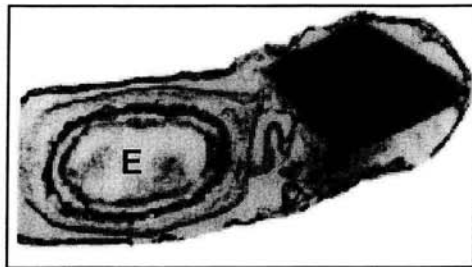


Fig. 2. Micrografía de *Bacillus thuringiensis*, donde se muestra la endoespora (E) y el cristal (C) que contiene las proteínas insecticidas.

2.3 Toxinas insecticidas

Toxinas Cry

Actualmente se ha podido dividir a las proteínas cristalinas o δ -endotoxinas en diferentes grupos de homología, el grupo más grande contiene las llamadas proteínas Cry (por Cristal) de 3-dominios producidas por *Bt*. Este grupo está formado por 30 familias diferentes. El mecanismo de acción propuesto para estas proteínas es la interacción secuencial con dos proteínas receptoras y la posterior formación de un poro lítico en microdominios de membrana plasmática de las células intestinales del insecto blanco.

Toxinas Cyt

Un grupo más de las toxinas cristal producidas por *Bt* son las proteínas Cyt (porque poseen actividad citolítica general *in vitro*) de un solo dominio, con tres láminas alfa-beta y una masa molecular de aproximadamente 20 kDa. Se han propuesto dos mecanismos de acción para estas toxinas: en la primera se plantea que multímeros de la toxina forman un poro estructurado dentro de la membrana y en el segundo se propone que estas toxinas ejercen su efecto a través de una acción detergente menos específica. Sin embargo, estos modelos no son excluyentes uno del otro. Un aspecto bien establecido es que las toxinas Cyt sinergizan la actividad de ciertas toxinas Cry contra un número de insectos blanco, facilitando la unión y quizás la internalización de las toxinas Cry con las que sinergizan³⁷.

Toxinas binarias

Otro grupo son las proteínas cristalinas de *Bsp*, que son toxinas binarias (Bin, se requieren las dos para tener actividad insecticida) que matan mosquitos; los cristales se componen de dos proteínas separadas y homólogas llamadas BinA (42 kDa) y BinB (51 kDa). Estas toxinas binarias de *Bsp* (igual que las toxinas Cry de *Bt*) son solubilizadas y activadas por proteólisis en el intestino del insecto blanco y se unen a receptores específicos del epitelio del intestino³⁷.

Miembros de las familias de toxinas Cry34 y Cry35 de *Bt* forman toxinas insecticidas binarias (Figura 3) que actúan en el epitelio medio de insectos coleópteros. Las proteínas Cry34 no están relacionadas con ninguna proteína cristal de *Bt*; sin embargo, las proteínas Cry35 son homólogas a las proteínas binarias de *Bsp*, con un 26 a 29% de identidad de secuencia a la mayoría de las secuencias. Las proteínas Cry35 probablemente tienen un doblamiento similar a las proteínas binarias de *Bsp*. Además, la toxina Cry36 de *Bt* (activa contra insectos coleópteros), tiene cierta identidad con los componentes de la toxina binaria *Bsp* por lo que se piensa que aunque esta toxina solamente posee actividad contra insectos coleópteros puede formar parte de una toxina binaria aún no caracterizada³⁷.

Las proteínas Cry37 y Cry23 también forman una toxina binaria y son parte de un grupo de homología diverso que incluye las proteínas cristal de *Bt* y dos toxinas Mtx (específicas contra mosquitos) de *Bsp* debido a la similitud que presentan³⁷.

La proteína Cry15Aa producida por *Bt* es tóxica para el lepidóptero *M. sexta* y ha sido encontrada en cristales con una toxina de 40 kDa. La toxina de 40 kDa no posee por sí misma ninguna actividad insecticida⁵⁵; sin embargo, aumenta la toxicidad de la toxina Cry15Aa (la relación entre estas toxinas está representada en la figura 3)³⁷.

Toxinas Mtx

A diferencia de las toxinas ya descritas, las proteínas Mtx son producidas en *Bt* y *B. cereus* como proteínas solubles durante el crecimiento vegetativo. Las toxinas Mtx2 (32 kDa) y Mtx3 (36 kDa) están ampliamente distribuidas en las cepas de *Bsp* consideradas de alta toxicidad contra mosquitos e íntimamente relacionadas una con otra y más distantemente a proteínas cristal de *Bt*. Mtx1 (100 kDa) es la proteína activa principal de las cepas de *Bsp* consideradas de baja toxicidad la cual se produce durante el estado vegetativo³⁷.

Las toxinas Cry15, Cry33, Cry23 y Cry38Aa también presentan homología con las toxinas Mtx (Figura 3).

Toxinas Vip

Una selección de cultivos de *B. cereus* y *Bt* permitió el descubrimiento de nuevas toxinas secretadas como proteínas solubles durante el crecimiento vegetativo de diferentes cepas. Estas nuevas toxinas no forman cristal y no son homólogas a ninguna proteína cristal conocida y se les ha dado el nombre de toxinas Vip (proteínas insecticidas vegetativas).

Se requiere la actividad de dos proteínas Vip 1 (52 kDa) y Vip 2 (100 kDa), producidas por *B. cereus* para ser activas contra algunos coleópteros, por lo que son consideradas toxinas binarias. Ambas contienen una secuencia señal para la secreción en el extremo N-terminal; la proteína Vip1Aa es posteriormente procesada en ese extremo para dar una proteína de 80 kDa. Extensas búsquedas de similitud de secuencia sugieren que el complejo Vip1/Vip2 es una toxina binaria típica del tipo A+B, donde Vip2 es el dominio-A citotóxico y parte de Vip1 contiene el dominio-B de unión al receptor y posiblemente un dominio de translocación.

La proteína Vip 3 (88.5 kDa) producida por *Bt* es activa contra algunos lepidópteros; a diferencia de Vip 1 y Vip 2, ésta no contiene secuencia señal de N-terminal, no es procesada durante la secreción y no posee homología de secuencia con ninguna proteína conocida. En el intestino de las larvas susceptibles, esta proteína es procesada por proteasas en diferentes sitios dando un fragmento activo de 33 kDa. Finalmente, la unión de Vip 3 al epitelio del intestino de las larvas susceptibles causa muerte celular³⁷.

En este trabajo, vamos a emplear únicamente las proteínas de tres dominios o Cry, en específico la toxina Cry1Ab que posee actividad insecticida específica contra insectos Lepidópteros como *M. sexta*.

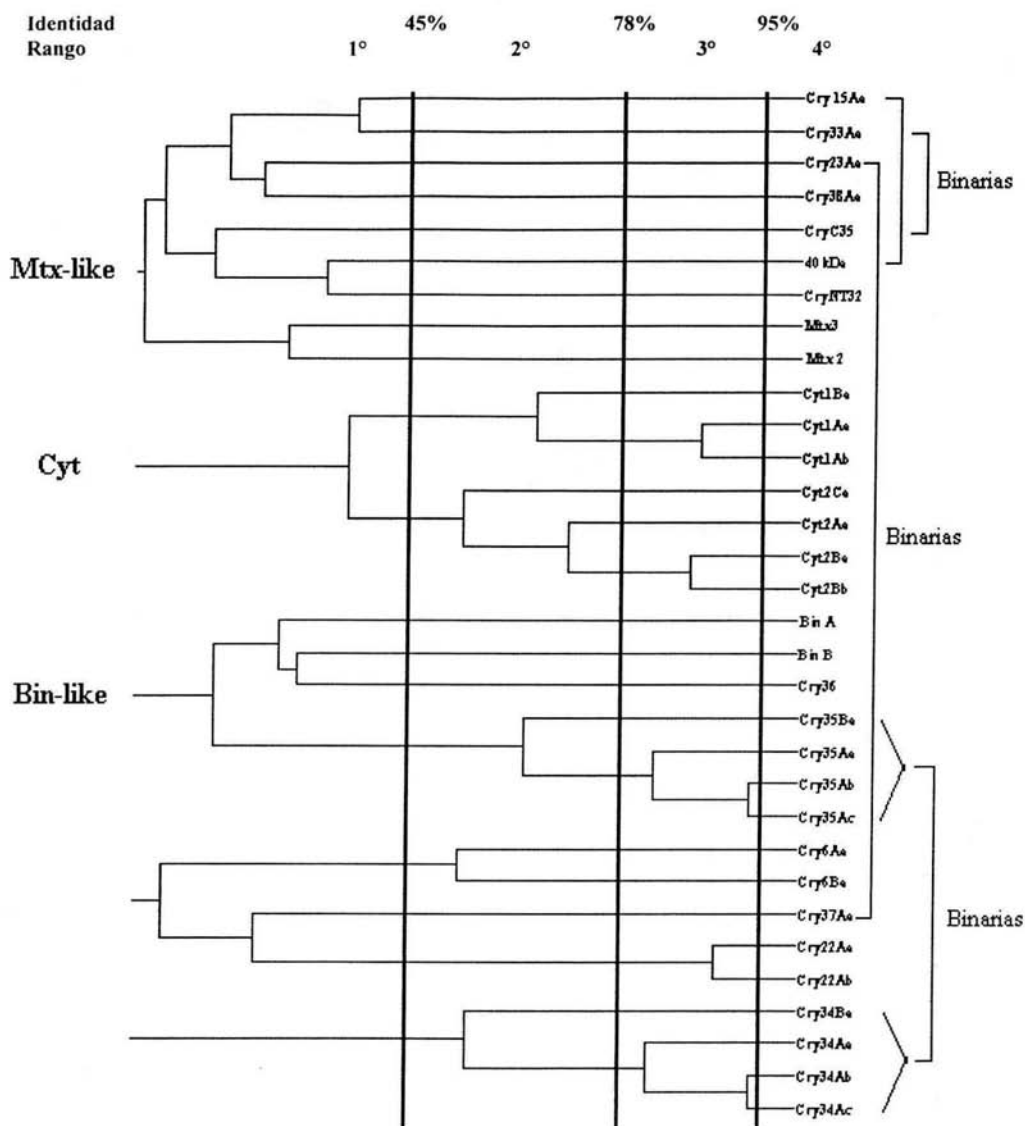


Figura 3. Esta figura muestra un dendrograma de la relación filogenética entre diferentes toxinas insecticidas. Se representa el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre diferentes toxinas Cry y los rangos jerárquicos que permiten nombrarlas, el rango primario con números, el rango secundario con letras mayúsculas, el rango terciario con letras minúsculas y el cuaternario con números⁵⁵. Se observa el grupo de las toxinas que comparten identidad con las toxinas Mtx, a las cuales se les ha llamado proteínas tipo Mtx (Mtx-like); también se observan las toxinas Cyt y al final las toxinas Cry que comparten identidad con las toxinas binarias, por lo que se les ha llamado Bin-like. Con los corchetes del lado derecho se une a las toxinas binarias. Tomado y modificado de http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, 02 de Marzo de 2004.

2.4 Toxinas Cry

Generalidades

Dentro de la familia de las toxinas Cry de tres dominios, existen proteínas con pesos desde 60 hasta 130 kDa denominadas protoxinas; la extensión del extremo C-terminal de las protoxinas más largas no es necesaria para la toxicidad pero se cree que es indispensable para la formación del cristal dentro de la bacteria^{27, 28, 37}. Las inclusiones cristalinas ingeridas por larvas susceptibles se disuelven en el ambiente del intestino, posteriormente las protoxinas solubilizadas son procesadas en el extremo N-terminal, donde se cortan de 20 a 50 aminoácidos y en el extremo C-terminal (cuando está presente) se cortan hasta 600 aminoácidos por proteasas (tipo tripsina y quimiotripsina) presentes en el lumen intestinal del insecto, dando lugar a un fragmento resistente a proteasas de aproximadamente 60 kDa (toxina activa)³⁷.

En cuanto a la nomenclatura, cada protoxina adquirió un nombre mnemónico Cry y cuatro rangos jerárquicos con números, letras mayúsculas, letras minúsculas y números⁵⁵. Las proteínas con menos del 45% de identidad difieren en el rango primario y se denominan con números (Ej. Cry1, Cry2, Cry3, etc.), menos del 78% y 95% de identidad constituyen el rango secundario y terciario y se denominan con letras mayúsculas (Ej. Cry1A, Cry1B, Cry1C, etc.) y minúsculas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.) respectivamente (Figura 4). Proteínas con el mismo rango primario afectan el mismo orden de insectos por Ej.: las protoxinas codificadas por los genes *Cry1* son proteínas tóxicas contra insectos lepidópteros, las protoxinas codificadas por los genes *Cry2* son proteínas tóxicas contra insectos dípteros y lepidópteros, las protoxinas codificadas por los genes *Cry3* codifican proteínas tóxicas contra insectos coleópteros, las protoxinas codificadas por los genes *Cry4* codifican proteínas contra insectos dípteros, etc. (Figura 5)⁵⁵.

Las proteínas Cry están clasificadas en base a la similitud de sus secuencias de aminoácidos; alineamientos de toxinas Cry realizados por de Maagd, Bravo y Crickmore (2001), revelaron la presencia de cinco bloques comunes de secuencia conservados para la mayoría de las proteínas (Figura 5)²⁷ por lo que se propone que las toxinas Cry que poseen estos bloques podrían tener estructuras similares³⁷.

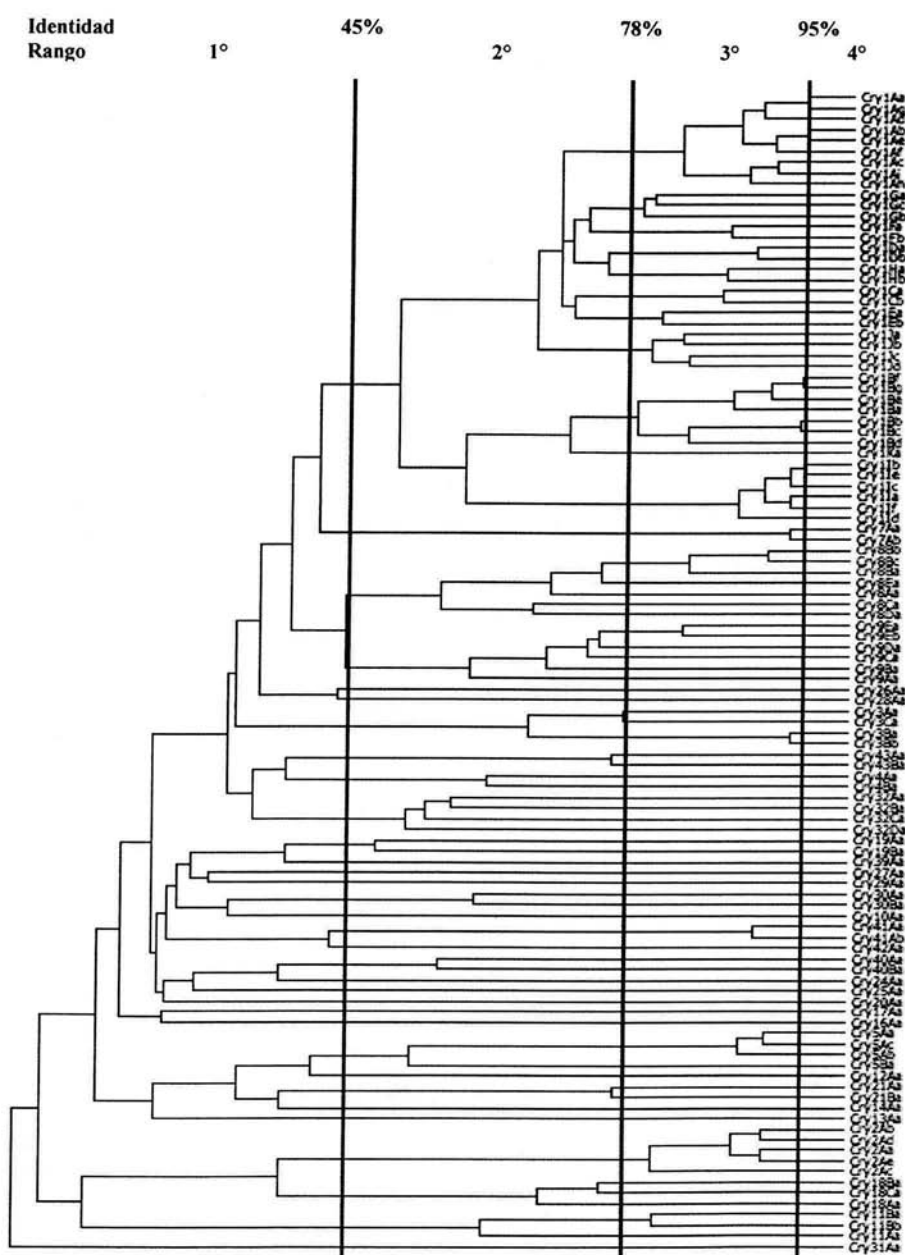


Figura 4. Relación filogenética entre las toxinas Cry de tres dominios. Se representa el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre las diferentes toxinas Cry y los rangos jerárquicos que permiten nombrarlas, el rango primario con números, el rango secundario con letras mayúsculas, el rango terciario con letras minúsculas y el cuaternario con números.

Tomado de http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ 11 de Febrero de 2004

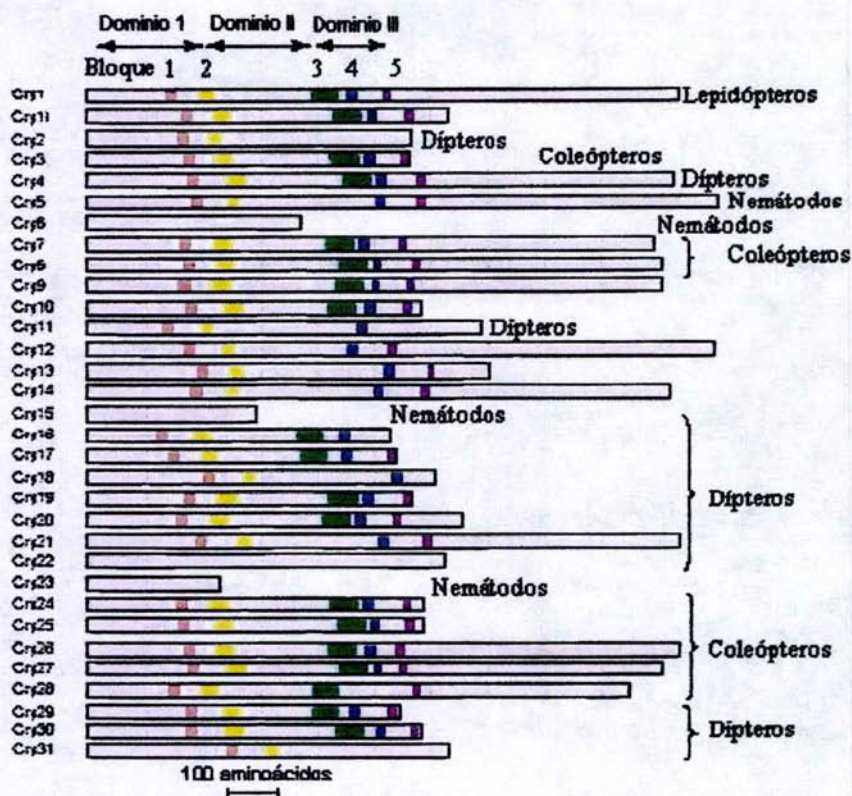


Fig. 5. Se muestra la longitud relativa de las protoxinas Cry y la posición de los cinco bloques conservados (si están presentes). Se observa que no todas las toxinas Cry poseen todos los bloques conservados característicos, por lo que esas toxinas no forman parte de la familia de proteínas Cry de tres dominios ya que no tienen ninguna homología. Sin embargo, todas son producidas por *B. thuringiensis* en forma de inclusiones cristalinas y poseen actividad insecticida contra otros organismos como los nemátodos. La posición de los tres dominios de la toxina activada está indicada para la toxina Cry1 y varía de acuerdo a la posición de los bloques 2 y 3 para otras toxinas. También se representa la especificidad que poseen las protoxinas sobre ciertos organismos. Tomada y modificada de De Maagd, R., Bravo, A. y Crickmore, N. (2001).

Estructura tridimensional de las toxinas Cry

Uno de los grandes avances en el análisis de las toxinas Cry, fue la obtención de su estructura cristalográfica. Gracias a la aplicación de la cristalografía de rayos X, se han resuelto algunas estructuras de toxinas Cry: la toxina Cry1Aa específica para insectos lepidópteros, la Cry3A y Cry3Bb1 específicas para insectos coleópteros y la Cry2Aa específica para insectos dípteros y coleópteros (Figura 6). Ahora se sabe que a pesar de la diversidad de secuencia y especificidad existente entre ellas su arreglo topológico es muy semejante, lo que hace pensar en estructuras tri-dimensionales conservadas y mecanismos de acción similares. Cada uno de los tres dominios que poseen tiene sus particularidades, por lo que gracias a un extenso número de análisis a cada uno se le ha atribuido una función relacionada con el mecanismo de acción de las toxinas:

El **dominio I** se localiza en el extremo N- terminal, por su constitución de siete α -hélices (seis hélices anfipáticas alrededor de una hélice central) este dominio está involucrado en la inserción de la toxina a la membrana y en la formación de poro⁵³; presenta similitudes estructurales con otras toxinas bacterianas formadoras de poro como son la hemolisina E, colicina Ia y N, y el dominio de translocación de membrana de la toxina de la difteria³⁷.

El **dominio II** tiene 3 láminas plegadas antiparalelas formando un β -prisma y 4 asas, con una topología de llave griega; es en estas regiones donde se localiza la mayor variabilidad de las toxinas Cry. Por estudios de mutagénesis en las regiones hipervariables de éste dominio, se propone que juega un papel muy importante en el reconocimiento y unión al receptor⁵³. Posee una alta identidad topológica a algunas proteínas de unión a carbohidratos como la vitelina y la lectina^{37,53}.

El **dominio III** se localiza en el extremo C-terminal, consiste de dos láminas- β antiparalelas formando un β -sandwich. A este dominio se le relaciona con la unión al receptor⁵³ y adicionalmente se le ha atribuido un papel en la formación de poro en la membrana^{27, 28, 37}. Gracias a la construcción de proteínas híbridas en el dominio III entre diferentes toxinas Cry1 realizadas por de Maagd, *et al.*, 1999 y 2000, en los que empleó como modelo blanco a *M. sexta* y *Spodoptera exigua*, se demostró que el dominio III tiene efectivamente un papel muy importante en la unión al receptor, ya que el intercambio de este dominio entre las toxinas modificó la especificidad del insecto blanco.

La estructura del dominio III se parece a dominios de proteínas que unen carbohidratos, como son los dominios de unión a celulosa de la 1-4- β -glucanasa, de la galacto-oxidasa, de la sialidasa, de la β -glucuronidasa, también a dominios de unión a carbohidratos como los de la xilanasasa U y la β -galactosidasa. También se han identificado parecidos estructurales entre dominios III de toxinas Cry y otras toxinas bacterianas: como el dominio H_{CN} de la toxina del tétanos y el dominio P20 involucrado en la formación del heptámero del antígeno PA de la toxina del ántrax. Finalmente, también posee similitud con el dominio 4 de la aerolisina, el cual está involucrado en el mantenimiento de la estabilidad del complejo tóxico heptamérico³⁷.

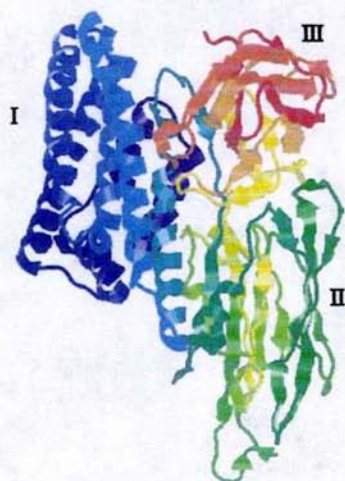


Fig. 6. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa. Se observan los tres dominios estructurales. El Dominio I (representado en azul) está involucrado en la inserción a la membrana y la formación de poro. El Dominio II (representado en verde) y el Dominio III (representado en rojo y amarillo), están involucrados en el reconocimiento y unión al receptor. El bloque conservado 1, está en la hélice central del Dominio I, el bloque 2 está en la interfase del Dominio I y II, el bloque 3 está localizado entre los dominios II y III, el bloque 4 está en la cadena β -17 en el centro del Dominio III y el bloque 5 que corresponde a la cadena β -23 localizada también en el centro del Dominio III forma puentes salinos con la β -17. Tomada de De Maagd, R., Bravo, A. y Crickmore, N. (2001).

El blanco de las proteínas insecticidas es la membrana apical de las células del intestino medio de la larva, ahí se localizan los receptores específicos de alta afinidad con los que interaccionan las toxinas Cry y que son factores clave en la especificidad de las toxinas⁴⁰.

En el caso de insectos Lepidópteros (sensibles a toxinas Cry1A) se han identificado diferentes proteínas glicosiladas como receptores de las toxinas Cry1A de Bt, una proteína tipo Caderina (Bt-R₁) y la Aminopeptidasa N (APN)^{37,40}.

2.4 Receptores de las toxinas Cry

La interacción de patógenos con sus células blanco involucra, en el caso de toxinas la unión a receptores específicos que aumentan su asociación a la membrana o la internalización celular a través de microdominios de membrana. En el caso de los virus, la unión secuencial a receptores se ve aumentada por cambios conformacionales en las proteínas unidas, para algunas toxinas (ántrax, aerolisina, difteria) se requiere la participación de más de una molécula receptora^{43,49,50}.

Para el caso de las toxinas Cry, se propone la participación secuencial de dos moléculas receptoras localizadas en las células blanco (Bt-R₁ y APN) que interaccionan con diferentes

estructuras de las toxinas Cry (monómero u oligómero) involucradas en la toxicidad sobre el insecto^{28, 37, 53}.

Por lo tanto la identificación de las moléculas receptoras de las toxinas Cry y su función secuencial es fundamental para la elucidación del mecanismo de acción de manera que se logre el control de insectos resistentes en el campo.

◇ Aminopeptidasa N

La aminopeptidasa N de *M. sexta* es una proteína de membrana (ectoenzima dependiente de Zinc⁺)³⁸ con una masa molecular de 120 kDa. Fue la primera molécula identificada como una proteína que une toxinas Cry con una constante de disociación (K_D) de 100 nM por lo que ha sido extensamente estudiada como receptor^{5, 38}.

Además de de la hidrólisis de péptidos en el intestino, posee diferentes funciones biológicas ya que en membranas de vellosidad apical de intestino de insectos tiene un papel de transporte de amino ácidos dependiente de K⁺³⁸.

Se sabe que todos los receptores APN de las toxinas Cry1A están anclados a la membrana en el C-terminal por medio de un puente glicosil fosfatidil inositol (GPI) y el resto de la proteína correspondiente al extremo N-terminal es extracelular (Figura 7)¹³; además están selectivamente incluidos en microdominios de membrana, cuya característica es la composición lipídica diferente y su distribución espacial en las membranas celulares. Los microdominios de membrana también están involucrados en la transducción de señales y transporte de proteínas a través de la membrana plasmática, además de que funcionan como sitio de unión o entrada para diferentes toxinas bacterianas^{13, 37}. Por ejemplo, en el caso de toxinas formadoras de poro, la asociación de sus receptores con microdominios de membrana es un paso crucial para su oligomerización e inserción en la membrana³⁷.

Recientemente se ha demostrado que la APN de *M. sexta* y *Heliothis virescens* está localizada en microdominios de membrana y que la integridad de estos microdominios es esencial para la actividad de formación de poro de la toxina Cry1A⁹.

A la fecha se han descrito diecisiete aminopeptidasas aisladas de diferentes insectos, tres de ellas en *Plutella xylostella*, una en *Spodoptera litura*, tres en *Helicoverpa punctigera*, una en *Epiphyas posvittana*, dos en *Lymantria dispar*, dos en *H. virescens*, una en *Plodia interpunctella*, dos en *M. sexta* y dos en *Bombyx mori*¹⁰; la mayoría han sido reportadas como proteínas que unen toxinas Cry1A. En *L. dispar*, la APN descrita une toxinas Cry1Ac, en *Bombyx mori* une toxinas Cry1Aa, en *M. sexta* se ha descrito una APN que sirve como molécula de unión para la toxina Cry1Ac¹⁰.

Para *H. virescens*, se ha descrito una APN de 170 kDa (Receptor A) que une toxinas Cry1A con una alta afinidad e interviene en la actividad de formación de poro en vesículas de fosfolípidos *in vitro*. En este organismo también se ha descrito una APN de 120 kDa que une la toxina Cry1Ac (BTBPI) en este insecto⁴⁰.

Empleando la secuencia codificante de los genes de insectos que codifican APNs que han sido descritas como proteínas que unen toxinas Cry1A, se han realizado dendogramas que permiten agruparlas en cinco grupos de homología. La APN de *S. litura* y la APN2 de *Helicoverpa punctigera* presentan 67% de identidad a las otras aminopeptidasas y forman

el quinto grupo. Sin embargo, se ha observado que a pesar de la identidad que existe entre ellas, responden a diferentes clases de toxinas Cry¹⁰.

Se ha identificado además, que la región de la toxina involucrada en la interacción con APN incluye tanto regiones del dominio II como del III²⁸. Se sabe que las asas que sobresalen del dominio II de la toxina, principalmente el asa 2, son regiones importantes involucradas en los contactos proteína-proteína con los receptores³⁷.

A la fecha existen reportes en los que se ha clonado y expresado genes que codifican para aminopeptidasas en cultivos de líneas celulares de insectos heterólogos.

En dos de estos estudios la APN fue expresada en la superficie de las células. Se demostró la interacción toxina-receptor por ensayos de unión al ligando (ligand-blot), pero no se pudo demostrar la unión a la APN expresada por dichas células¹⁰.

En otro análisis se expresó la APN de *S. litura* en la línea celular Sf21 de *Spodoptera frugiperda*, y por análisis de inmunofluorescencia se demostró la unión de la toxina Cry1C a la APN recombinante en la superficie de las células Sf21. Sin embargo, no se observó el efecto insecticida de las toxinas sobre estas células¹⁰.

Posiblemente, la APN al ser expresada en otros insectos cambia el patrón de glicosilación, aspecto que puede ser importante para la especificidad de las toxinas.

Posteriormente, la APN de *M. sexta* y la de *Plutella xylostella* se expresaron en la línea celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda*, sin embargo, sólo se consiguió una unión no específica entre la toxina y la APN y no se confirmó susceptibilidad a la toxina Cry1Aa en forma monomérica¹⁷.

Los experimentos de unión mencionados anteriormente de toxinas Cry con diferentes Aminopeptidasas N, muestran un grado de especificidad que les atribuye a estas proteínas el papel de receptores de toxinas Cry responsables de la sensibilidad que poseen ciertos insectos.

La importancia de APN en la actividad insecticida de las toxinas Cry, está documentada también, con la construcción de mutantes de toxinas Cry1A afectadas en la unión a APN que también están afectadas en la toxicidad. Además la presencia de APN en membranas artificiales induce la formación de poro de la toxina. Así mismo, en un estudio realizado por Lorence, Darszon y Bravo (1997), en el que se hizo el corte *in vitro* del puente GPI que ancla a la APN en membranas de microvellosidad apical del intestino utilizando fosfolipasa C, se demostró una disminución en la actividad formadora de poro de la toxina Cry1Ac.

Finalmente, estudios de inmunoprecipitación realizados en el laboratorio, demostraron que la unión inicial de la toxina es a la proteína Bt-R₁ y posteriormente a la proteína APN y que el oligómero interactúa preferentemente con la APN. Este dato va de acuerdo con el incremento de 200 veces en la afinidad de unión del oligómero de Cry1Ab por la APN ($K_D = 0.75$ nM) a diferencia de la afinidad del monómero ($K_D = 165$ nM).

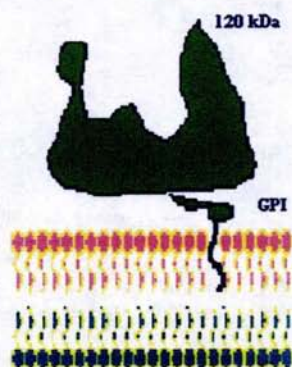


Fig. 7. Representación esquemática de la Aminopeptidasa N. Es una proteína de membrana con una masa molecular de 120 kDa, anclada a la membrana en el C-terminal por un puente de glicosil-fosfatidil inositol (GPI) y un dominio N-terminal extracelular. Une toxinas Cry con una constante de disociación (K_D) de 100 nM.

◇ Bt-R₁

Bt-R₁ representa un nuevo tipo de caderina de insectos con un 20-40% de identidad con proteínas miembros de la superfamilia de las caderinas^{15, 54}; se sabe que se expresa específicamente en el epitelio del intestino medio durante el crecimiento y desarrollo de las larvas de *M. sexta*¹⁵, pero no se ha identificado su función; a pesar de que se le involucra en eventos apoptóticos que resultan en la muerte celular programada⁵⁴ o en el transporte de membrana¹⁵. Es una proteína transmembranal con un ectodominio de 11 ó 12 módulos de secuencias repetidas; un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático; su masa es de 210 kDa y un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.5 (Figura 8)^{14, 40, 41}.

Esta proteína une al monómero de toxinas Cry1 con una K_D de 1 nM^{15, 39} similar a la K_D de la toxina a vesículas de microvellosidad apical (BBMV). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la afinidad de unión de la toxina monomérica a la APN es del orden de 100nM, lo cual sugiere que la unión a Bt-R₁ es el primer evento de la interacción de la toxina Cry1A con membranas.

La interacción con Bt-R₁ es necesaria para la activación de la toxina, ya que su unión en forma de monómero a esta proteína induce el corte de la hélice α -1, lo cual conduce a la oligomerización de la toxina por la exposición de regiones hidrofóbicas y, como consecuencia, se favorece la formación de una estructura preporo considerada como intermediario importante en la formación del poro⁵¹.

Datos del laboratorio también demostraron que el oligómero se inserta eficientemente a vesículas sintéticas de membrana contrario a lo que sucede con el monómero, esto sugiere que el oligómero es un intermediario durante la inserción de la toxina a membranas⁴⁶.

Por otro lado cuando Bt-R₁ de *M. sexta* se expresó en la superficie de células de humano COS-7, HEK-293 y en las líneas de insecto Sf21, unió a la toxina Cry1Ab con una alta afinidad pero no confirió susceptibilidad¹⁵. Esto quiere decir que no es el único elemento necesario para la actividad insecticida de las toxinas Cry.

Por otra parte, Bt-R₁ fue expresada en células Sf9 del lepidóptero *Spodoptera litura* y les confirió susceptibilidad a la toxina Cry1Aa. Sin embargo al cuantificar los niveles de toxicidad se observó que sólo el 14% de las células transfectadas con la proteína Bt-R₁ se morían por efecto de la toxina, y que se requerían concentraciones de toxina cien veces mayores.

Cuando se expresó Bt-R₁₇₅ de *Bombix mori* en la superficie de células de insecto, se observó la unión de la toxina Cry1Aa y provocó la lisis celular.

Por lo tanto, un aspecto importante en el análisis del mecanismo de acción de las toxinas Cry es la propuesta de una función secuencial entre los receptores Bt-R₁ y APN para la formación de poro en la membrana del insecto⁹.

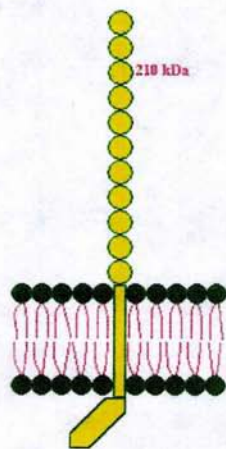


Fig. 8. Representación esquemática de Bt-R₁ (Caderina E). Es una proteína transmembranal de 210 kDa que posee un ectodominio con 11 ó 12 módulos, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. Se expresa específicamente en el epitelio del intestino medio durante el crecimiento y desarrollo de las larvas de *M. sexta*. Une a las toxinas Cry1 con una K_D de 1 nM.

2.6 Mecanismo de acción de las toxinas Cry

Entender el mecanismo de acción de las toxinas de *Bt* y el desarrollo de resistencia de los insectos susceptibles es fundamental para el uso racional de las proteínas Cry en el manejo de plagas.

De acuerdo al modelo que se propone para el mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bt* (Figura 9), después de que una larva susceptible ingiere los cristales que produce la bacteria, éstos se solubilizan debido al ambiente alcalino y reductor del intestino. Lo anterior da como resultado el rompimiento de los puentes disulfuro que le dan estabilidad, de tal manera que las proteínas cristal insecticidas son liberadas de los cristales como protoxinas de 130 kDa. Las protoxinas liberadas son procesadas por proteasas que están presentes en el intestino del insecto para dar lugar a toxinas activas de 60 kDa^{9, 54}. Las toxinas activas posteriormente interactúan con el receptor Bt-R₁, localizado en la membrana apical de las células columnares del intestino del insecto; dicha interacción es determinante para la especificidad de las proteínas cristal insecticidas¹⁰.

La unión con el primer receptor favorece un cambio conformacional en la toxina que provoca el corte de la hélice α -1, por lo que se exponen regiones hidrofóbicas de la toxina que conducen a su oligomerización en un tetrámero (preporo)^{9, 51, 42}. Datos del laboratorio han demostrado que el oligómero presenta una mayor afinidad por el receptor APN ($K_D=0.7$ nM), por lo tanto se propone que una vez que se forma el oligómero, éste es acarreado hacia los microdominios de membrana donde se da la interacción con el segundo receptor y posteriormente se inserta en la membrana de las células epiteliales del intestino y forma poros líticos o canales no específicos que provocan un desbalance iónico y conducen a la lisis osmótica celular y parálisis intestinal, por lo que la larva cesa la alimentación. Posteriormente, y producto de una septicemia provocada por la multiplicación de la bacteria ocurre la muerte de las larvas, las cuales se toman flácidas y con un exudado lechoso^{9, 10, 13}.

El mecanismo de desarrollo de resistencia que se ha observado con mayor frecuencia es una alteración en la habilidad de unión y/o un decremento en la población de moléculas receptoras, las cuales unen a la toxina de *Bt* en el intestino medio del insecto⁵.

La caracterización de los receptores de toxinas Cry en *M. sexta* podría conducirnos a evaluar el mecanismo de acción a nivel molecular y entender el mecanismo de desarrollo de resistencia de los insectos a estas toxinas. En general ese conocimiento podría facilitar el diseño y uso racional de biopesticidas que no afecten el ambiente y combatir los insectos plaga y el desarrollo de resistencia a las toxinas de *Bt*.

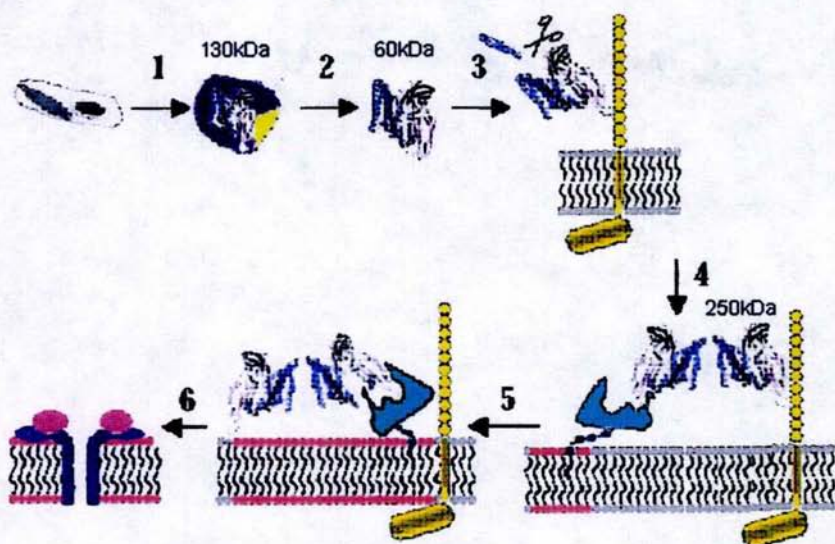


Fig. 9. Se muestra el mecanismo de acción de las toxinas Cry. Se propone que una vez que la larva susceptible ingiere el cristal, éste se solubiliza por el ambiente alcalino y reductor del intestino de la larva liberando la protoxina (130 kDa) que posteriormente es procesada por proteasas específicas del jugo gástrico para dar lugar a la toxina activa (60 kDa).

La toxina activada interacciona con el receptor Bt-R₁; esta unión provoca cambios conformacionales en la toxina que permiten el corte de la hélice α -1 y se favorece la oligomerización a un tetrámero (preporo), que se vuelve más afin a la APN (localizada en los microdominios de membrana), el segundo receptor. Finalmente, la toxina se inserta en la membrana del intestino del insecto, preferentemente en los microdominios de membrana y forma un poro lítico que permite que el potencial de membrana se altere y las células se lisen provocando que el insecto muera por inanición y septicemia.

2.6 Insecticianina

La insecticianina es una biliproteína azul (apoproteína) localizada en la epidermis y la hemolinfa de las larvas, pupas y adultos de *M. sexta*^{18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 48}. La función específica de esta proteína es proveer camuflaje para la protección de las larvas durante el desarrollo⁴⁸.

Es sintetizada en muchas formas isoelectricas y almacenada en gránulos de pigmento en la epidermis^{22, 48}, se ha identificado como el isómero gama de la biliverdina. Posee una masa molecular de 21,387 Da (189 amino ácidos, 1 péptido señal de 17 amino ácidos y dos puentes disulfuro), su estructura está conformada por un barril β -antiparalelo de ocho cadenas flanqueado de un lado por un α -hélice. La subunidad tiene alta identidad con los motivos estructurales de la β -lactoglobulina y a la proteína humana de unión a retinol²³. Se ha identificado que las subunidades oligomerizan para formar un tetrámero¹⁹. En huevos maduros, esta proteína se ha localizado en una concentración de 29.6 μ M²⁰.

Dentro de las diferentes isoformas en las que se produce la insecticianina, las más importantes son la forma A y la B (Ins-A e Ins-B)^{21, 22, 24, 48}, que son codificadas por genes diferentes (con 13 amino ácidos diferentes y con 4 exones interrumpidos por 3 intrones en la misma posición). Tienen 93% de identidad nucleotídica. La caja TATA y la CAAT están completamente conservadas en la región promotora de ambos genes, por lo que se infiere que estos genes son producto de duplicación génica²⁴.

Estudios previos han mostrado que en una mutante de la hormona juvenil la insecticianina deja de expresarse, por lo tanto la epidermis pierde los gránulos de pigmento azul característicos de los organismos silvestres, resultando en una coloración negra de las larvas (Figura 10)^{21, 48}.



Fig. 10. Comparación de una larva mutante de *M. sexta* en la hormona juvenil de color negro en la que la síntesis de la insecticianina está afectada (A), con respecto a una larva control con las características de color normales (B), tomado de Li y Riddiford, (1996).

En este trabajo se propone emplear el gen de la insecticianina como gen reportero para seleccionar fenotípicamente las larvas en las que ocurrió silenciamiento de Bt-R₁ y/o APN.

2.8 RNA de interferencia

En los últimos años el RNA de interferencia (RNAi) ha sido reconocido como un mecanismo de silenciamiento genético postranscripcional^{1, 5, 8, 56, 58}. Es una tecnología que se aprovecha del hecho de que el RNAi es un mecanismo biológico natural para el silenciamiento de genes en muchas de las células de una gran variedad de organismos complejos, como una respuesta de defensa contra la invasión de virus y elementos transponibles^{2, 26}.

Es un mecanismo de silenciamiento basado en RNA, conservado entre las especies de diferentes reinos (hongos, plantas y animales), y actúa como el “sistema inmune” del genoma. Este sistema fue inicialmente descubierto y estudiado independientemente en diferentes organismos, antes de ser reconocido como un mecanismo que actúa idénticamente en algún nivel^{56, 58}. El silenciamiento genético postranscripcional (PTGS) y

co-supresión, así como la resistencia a virus mediada por RNA en plantas, la interferencia por RNA en animales (descubierto inicialmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans*) y el fenómeno de “quelling” (supresión) en hongos (*Neurospora crassa*) y algas, están todos basados en el mismo mecanismo²⁶. La conclusión anterior está basada en el descubrimiento de elementos comunes del mecanismo [como son los RNAs interferentes pequeños (siRNAs)] y en la homología entre genes cuya expresión es requerida para que este mecanismo funcione en plantas, animales, hongos y algas^{26, 52}.

El mecanismo de RNAi ha sido estudiado principalmente en plantas, en *C. elegans*^{56, 58}, en hongos, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, en mamíferos, así como en tripanosomas, planarias, hidras, mosquitos y oocitos de ratón^{1, 2, 5, 8, 12, 45}. Consiste en la degradación de una secuencia específica de RNAm gracias a la interacción de un RNA de doble cadena (dsRNA) de secuencia homóloga. De esta manera se produce el silenciamiento específico de la expresión de la proteína correspondiente a la secuencia del dsRNA que se introduce a la célula^{1, 5, 56}.

Los dsRNA pueden ser sintetizados *in vitro* e introducidos a la célula (por inyección, por alimentación o empapando las células u organismos con ese dsRNA), o pueden ser expresados dentro del núcleo de la célula a partir de precursores de los dsRNA o de RNA de cadena simple [(ssRNA), transfectando plásmidos que expresen dichos precursores]^{2, 4, 30, 45}.

La aplicación de esta prueba está limitada en mamíferos, porque la introducción de dsRNAs más largos de 30 nt induce una respuesta interferón (una pequeña molécula que funciona de manera autócrina o paracrina y que induce que las células resistan la replicación viral) secuencia-no específica conduciendo a la inhibición global de la traducción de mRNA^{45, 56, 58}.

De acuerdo al modelo que prevalece, el dsRNA es procesado a siRNAs de 21-25 nucleótidos, dependiendo de las especies², gracias a un complejo enzimático designado como DICER (endonucleasa, miembro de la familia de las RNAsas tipo III) dependiente de ATP^{4, 30, 32, 45, 56, 58}.

Uno de los requerimientos estrictos para los siRNAs es que estén fosforilados en el extremo 5'; esto lo hace una cinasa endógena⁴⁵. Los duplex de siRNAs son posteriormente incorporados a un multicomponente de nucleasas llamado RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA) inicialmente identificado en *D. melanogaster*, que es la responsable de mediar el desenrollamiento (gracias a la actividad de una helicasa) para convertirlos a ssRNA^{1, 2, 26, 31, 32, 45}. Estos ssRNA (unidos a proteínas) son degradados a menos que reconozcan a su blanco de mRNA homólogo presente en la célula y se unan a él²⁶, por lo que la cadena antisentido de los siRNAs guía a RISC a su blanco de mRNA homólogo^{45, 58}.

Una vez que se da la unión de la cadena antisentido de los siRNAs con el mRNA, pueden ocurrir varios procesos: la degradación específica de ese mRNA gracias al corte realizado por una endoribonucleasa presente en RISC (distinta a la de DICER)^{30, 58}, la amplificación del proceso de silenciamiento y la inhibición de la traducción (Figura 11).

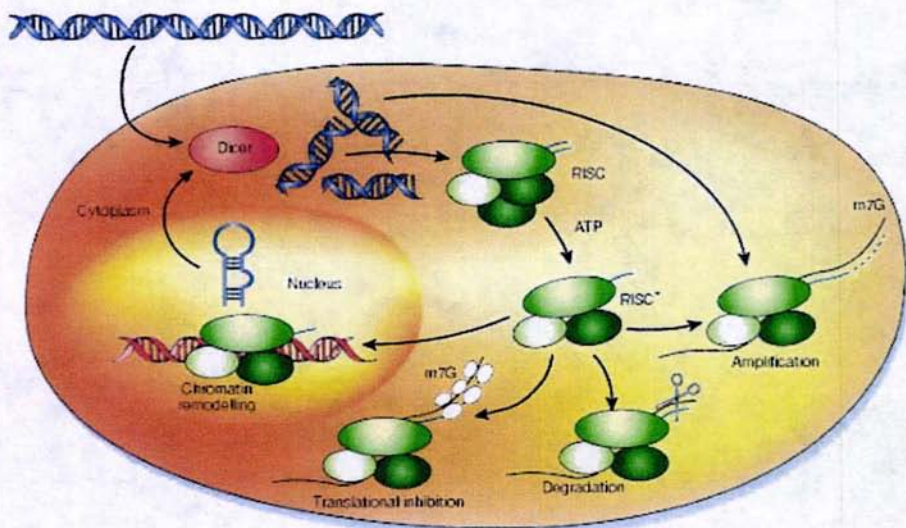


Fig. 11. Mecanismo del RNAi. Se representan las diferentes vías que puede desencadenar la interferencia por dsRNA, en el citoplasma, el proceso de amplificación de la señal de interferencia, la degradación del mRNA, la inhibición de la traducción; en el núcleo, el remodelamiento de la cromatina. Imagen obtenida de Hannon, (2002).

En el proceso de degradación del mRNA, una vez que RISC se une a la cadena antisentido de los siRNAs y localiza la secuencia homóloga del mRNA debe ser activada por ATP para cortarlo; el corte es aparentemente endonucleotídico y ocurre sólo en la región homóloga al ssRNA^{4, 30}. El mRNA blanco es cortado en un solo sitio en el centro de la región duplex que forman el siRNA guía y el mRNA blanco, 10 nucleótidos (nt) a partir del extremo 5' del siRNA⁴⁵. De esta manera, los siRNAs actúan como una guía para restringir a RISC para que corte sólo los RNAs complementarios a la cadena antisentido de dichos siRNAs^{30, 56}. El mRNA cortado puede ser reconocido por la célula como aberrante por lo tanto es degradado de manera específica por exonucleasas celulares^{1, 2, 58}. Es así como el RNAi previene que un gen produzca una proteína funcional porque el intermediario molecular (el RNAm) es destruido².

El proceso de amplificación del silenciamiento se ha identificado en algunos organismos con mecanismo de RNAi endógeno (Ej. Hongos, plantas, gusanos y mamíferos), en él interviene la enzima RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP). Se propone que el dsRNA exógeno es cortado por DICER para producir siRNAs "primarios" y posteriormente los ssRNAs (cortados por RISC) se unen a su mRNA blanco de manera específica y sirven como primer para la polimerización de un nuevo dsRNA realizada por la RdRP. De tal manera que la síntesis es catalizada por la RdRP usando como templado para la transcripción el mRNA blanco^{26, 30, 31} y es así como se va produciendo el dsRNA que DICER corta en fragmentos pequeños y continuamente el mRNA es degradado.

En plantas, por ejemplo, el mRNA aberrante que resulta del corte mediado por RISC, puede también servir como templado para la RdRP y sintetizar una nueva molécula de dsRNA. Este proceso es considerado como síntesis de RNA sin primer en el que el mRNA aberrante es usado como templado.

Es por esto que el proceso de amplificación en el que interviene la RdRP es muy importante para mantener el silenciamiento de la proteína específica incluso en algunos individuos hasta la siguiente generación de los inicialmente silenciados.

En la inhibición de la traducción, los microRNAs (miRNAs) juegan un papel fundamental. Los miRNAs son una clase de reguladores negativos de la expresión genética, que se transcriben como precursores endógenos largos de un tamaño entre 60 y 90 nt con una estructura imperfecta de RNA en tallo-asa (los siRNAs pueden ser endógenos o exógenos); son procesados por la enzima DICER y se producen pequeños transcritos de aproximadamente 22 nt (Figura 12)^{45, 56, 58}.

Durante la regulación del desarrollo, se expresan pequeños genes que producen estos RNAs pequeños no codificantes reguladores⁵⁶.

Estos miRNAs son muy diversos en secuencia y patrones de expresión, se han extendido evolutivamente, esto sugiere que pueden participar en un amplio rango de vías genéticas reguladoras^{34, 56}. Se han identificado cerca de 135 miRNAs en *C. elegans* (*lin-4* y *let-7*), *D. melanogaster* y humanos y ninguno ha sido totalmente complementario a ninguna secuencia de mRNA en estos organismos, esto sugiere que los miRNAs no funcionan en la vía de RNAi, porque este mecanismo requiere la complementariedad total entre los siRNAs y el mRNA blanco^{33, 56, 58}. Sin embargo, se piensa que los miRNAs se unen a sitios que tienen una secuencia parcialmente complementaria en la región no traducida 3' (UTR) de su mRNA blanco, causando la represión de la traducción y la síntesis de la proteína⁴⁵ sin degradar al mRNA.

Hutvágner y Zamora (2002), proponen que los siRNAs y los miRNAs actúan en diferentes vías bioquímicas. En su modelo, las proteínas específicas asociadas con un siRNA, miRNA, o un precursor de miRNA determinan la vía en la que funciona un RNA pequeño. Las características únicas de los miRNAs o sus precursores podrían conducirlos a asociarse con una proteína específica, de tal manera que la secuencia o estructura de un miRNA o su precursor favorece que este funcione como un represor traduccional (Figura 12) y no como un potenciador del RNAi.

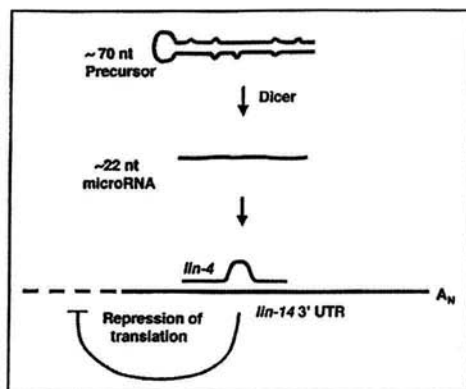


Fig. 12. Se representa a *lin-4*, un microRNA identificado en *C. elegans*, que es procesado de su precursor transcripcional de aproximadamente 70 nt por la enzima DICER, y su acoplamiento en el UTR 3' de la secuencia complementaria; en este caso, el mRNA de *lin-14* favorece la inhibición de la traducción. Obtenida de Ambros, (2001).

Este mecanismo de RNAi puede llevar a consecuencias adversas para el organismo y en ocasiones llega a ser evidente por un fenotipo aberrante, lo cual permite que la función del gen pueda ser identificada^{3, 8}.

En *Spodoptera litura* (insecto lepidóptero), se ha demostrado la interacción entre la APN (*slapn*) con la proteína Cry1C⁵. Recientemente, se demostró que la microinyección de dsRNA de *slapn* a larvas de *S. litura* reduce la expresión de esta proteína. El fenotipo observado fue una disminución en la sensibilidad de estas larvas a la toxina Cry1C. Estos resultados involucran directamente la APN del intestino medio larval como receptor de las proteínas insecticidas de Bt⁵. Sin embargo, en ese estudio se utilizaron larvas de 5º estadio de desarrollo (previamente inyectadas con el dsRNA) para probar la sensibilidad a la toxina Cry1C y de acuerdo a otros análisis de toxicidad, en estadios de desarrollo más tempranos la susceptibilidad a las dosis de toxina es mucho mayor que en los estadios larvarios más avanzados.

Finalmente, observaron también que el silenciamiento del gen de la APN se mantuvo durante el desarrollo y se transmitió a la siguiente generación aunque con un efecto reducido, es decir, las larvas F1 conservan cierta sensibilidad a la toxina Cry1C.

En este estudio se plantea utilizar huevos y larvas de *M. sexta* para la microinyección del dsRNA homólogos a un fragmento de la secuencia de DNA de Bt-R₁, APN, e Insecticianina (InSA).

3.0 Objetivos

Objetivo general:

- Estudiar el papel funcional de la proteína Bt-R1 y de la APN de *M. sexta* en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, mediante su silenciamiento con RNA de doble cadena.

Objetivos particulares:

- Obtener RNA de doble cadena (dsRNA) de un fragmento del gen de Bt-R1 y uno del de APN.
- Microinyectar los dsRNA de Bt-R₁ y APN en huevos y larvas de *Manduca sexta* y observar el fenotipo.
- Determinar la expresión de los receptores Bt-R₁ y APN.
- Analizar la susceptibilidad de los insectos sin Bt-R₁ o sin APN a la toxina Cry1Ab.

4.0 Materiales y métodos:

4.1 Insectos y aislamiento de intestinos

La producción de larvas de *Manduca sexta* se llevó a cabo en el insectario del laboratorio, donde se mantuvieron a una temperatura de 25°C, con humedad relativa del 70% con un fotoperiodo de 12h de luz y 12 h de oscuridad y dieta artificial.

Larvas de 4^o estadio de desarrollo fueron incubadas en hielo por 15 min. y se disectaron para extraer el tejido del intestino. La larva se disectó longitudinalmente, se extrajo el intestino y se removió la membrana peritrófica. El tejido se lavó con solución amortiguadora (PBS 1X, PMSF 0.5mM) y fue almacenado a -4°C, para extraer posteriormente el RNA total.

4.2 Aislamiento del RNA total

El aislamiento del RNA total del intestino de *M. sexta* se realizó mediante el protocolo reportado por Chomczynski, *et al.*, (1986)¹¹. Este método consta de cinco pasos principalmente:

1. Extracción: Solución D (Tiocianato de guanidina 4 M, Citrato de sodio 25mM pH 7.0, Sarcosil 0.5% y 2-mercapto etanol 0.1 M), Acetato de sodio 0.2 M pH 4.0, fenol y cloroformo a una proporción (1:0.1:1:0.2).
2. Precipitación: Un volumen de isopropanol.
3. Reprecipitación: Solución D y un volumen de isopropanol.
4. Lavado: Etanol al 75%
5. Solubilización: SDS al 0.5%

4.3 Diseño de oligonucleótidos

Para hacer el diseño de los oligonucleótidos se emplearon los programas Oligo 4 y Gene Works. Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la APN y Bt-R₁, tienen la siguiente secuencia: para APN apn-der 5'GCT CTA GAG CAA TAC CAC CTG GGG TCT CAT CAC AAG G 3' y apn-rev 5'GGA ATT CCA CGG CTC GTG ATG GTG TTC AGC GG 3' que ya incluyen los sitios de restricción *Xba* I y *Eco*R I unidos al sitio 5' de cada oligonucleótido respectivamente; para Bt-R₁ cad-der 5'GCT CTA GAG CTG CCT TCC TGC TGG TGT TTA 3' y cad-rev 5'GGA ATT CCT CCA CGC GCA CAT TGA ACA T 3' que incluyen los sitios de restricción *Xba* I y *Eco*R I unidos al sitio 5' de cada oligonucleótido respectivamente (los oligonucleótidos para Bt-R₁ fueron diseñados por la Dra. Isabel Gómez y el Dr. Mario Soberón); para la insecticiana A (InsA) ins-der 5'TCC AAG CTT GGG GGC AAG AAG GCT TCC GTC 3', ins-rev 5'AGG TGG GAG AAG GTC TTG AGG 3' que incluye los sitios de restricción *Hind* III y *Sal* I respectivamente.

4.4 RT-PCR

Los cDNAs se sintetizaron usando los oligos: apn-rev, cad-rev e ins-rev de APN, Bt-R₁ e InsA, respectivamente, y el RNA total aislado del intestino de larvas de *M. sexta*. La síntesis de cDNA, fue realizada empleando el estuche para RT-PCR (AMV) [First Strand cDNA synthesis. Kit for RT-PCR (AMV), Roche, Germany] y la mezcla de reacción se representa en la tabla 1.

Tabla 1. Mezcla de reacción de RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) para la síntesis de cDNA

REACTIVO	VOLÚMEN (µl)
Agua	4.7
Buffer 10X	2.0
MgCl ₂ (25mM)	4.0
dNTPs 10X	2.0
Oligo reverso de la proteína correspondiente	1.0
Inhibidor de RNasa	1.0
Enzima AMV	0.8
RNA total	3.5 (1µg)

Las condiciones de la reacción fueron: 25°C por 10min. (temperatura de alineamiento), 42°C por 60min. (transcripción), 99°C por 5min. (desnaturalización de la transcriptasa reversa) y 4°C por 5min.

4.5 PCR

Los productos obtenidos en la reacción de RT-PCR fueron tomados como templado para una reacción de PCR, utilizando los oligos correspondientes de APN, Bt-R₁ e InsA (apn-der, apn-rev, cad-der, cad-rev, ins-der e ins-rev). La mezcla de reacción para el PCR, se representa en la tabla 2.

Tabla 2. Mezcla de reacción para el PCR con Vent- polimerasa

REACTIVO	VOLÚMEN (µl)
Agua	7.5
Buffer 10X	2.0
dNTPs 10X	0.5
Oligo derecho de la proteína correspondiente	2.0 (10 pmol)
Oligo reverso de la proteína correspondiente	2.0(10 pmol)
cDNA	4.0
Vent-polimerasa	2.0
Volumen total	20

Las condiciones de incubación para el PCR fueron las siguientes: 32 ciclos de 1 minuto a 94°C (temperatura de desnaturalización), 40 segundos a 60°C (temperatura de alineamiento), y 2 minutos a 72°C (temperatura óptima de extensión de la polimerasa), después se mantuvo a 4°C. El DNA producto de la amplificación se checó en un gel de agarosa 1% para verificar el peso; posteriormente se purificaron usando el estuche de purificación de PCR (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Qiagen^R GmbH, Germany). Para consultar protocolo ver anexo 1.

4.6 Clonación de los fragmentos del gen de Bt-R₁, APN e InsA

El vector empleado para la clonación de los fragmentos de los genes de APN y Bt-R₁ fue el pLITMUS 28i (Logical *In vitro* Transcription, Multiple Unique Sites, HiScribeTM RNAi Transcription Kit, USA) y el vector pLITMUS 38i para clonar el fragmento del gen de la InsA.

Este vector tiene la particularidad de que posee un sitio múltiple de clonación flanqueado por promotores opuestos para la polimerasa T7 y contiene además el origen de replicación del vector pUC para una alta producción de DNA plasmídico, un origen M13 para la producción de un templado de cadena simple para secuenciación o mutagénesis, produce un alto número de copias y confiere resistencia a ampicilina. Además, el sitio múltiple de clonación está insertado en el marco del fragmento α de *lacZ*, que permite una selección de color (blanco/azul) por α -complementación para los insertos clonados (Figura 13).

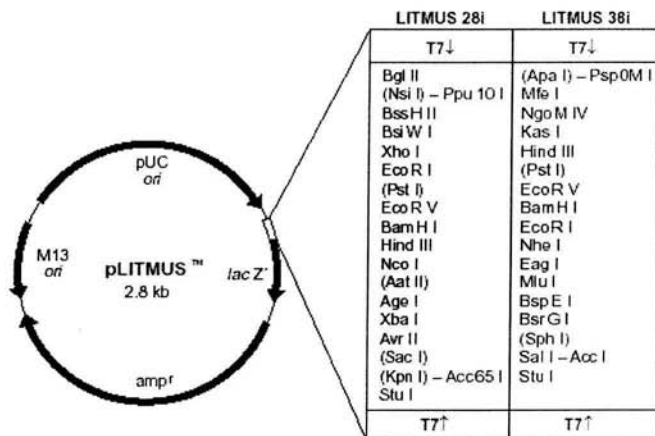


Figura 13. Vector pLITMUS, tomado de HiScribeTM RNAi Transcription Kit.

El vector pLITMUS 28i se digirió con *Xba* I y *EcoR* I para clonar el fragmento de Bt-R₁ y con las mismas enzimas para clonar el de APN, el vector 38i se cortó con *Hind* III y *Sal* I para clonar InsA.

Cada uno de los fragmentos de DNA (de Bt-R₁, APN e InsA) también fueron digeridos con las dos enzimas correspondientes, para obtener los extremos cohesivos en el sitio que se requiere para insertarse en el vector. En un gel de agarosa al 1% se verificaron las reacciones de digestión de los fragmentos de DNA y los vectores. Posteriormente fueron purificados empleando el estuche de purificación de PCR (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany), para consultar protocolo ver anexo 1. Los productos de la digestión finalmente se verificaron en un gel de agarosa al 1% después de ser purificados.

Para la clonación se realizó la reacción de **ligación** (con T4-DNA ligasa) de los fragmentos del gen de la APN, de la Bt-R1 y de InsA con el vector correspondiente. El tiempo de incubación de la reacción fue 2 h a temperatura ambiente. En la tabla 3, se observa la mezcla de reacción de ligación.

Tabla 3. Reacción de ligación

REACTIVO	VOLÚMEN (μl)
Buffer 10X de la enzima ligasa T4	3
Fragmento de DNA previamente digerido	21
Vector pLITMUS previamente digerido	5
Enzima ligasa T4	1
Volumen total	30

4.7 Transformación

La cepa bacteriana que fue empleada para la **transformación** con las clonas obtenidas fue *Escherichia coli* XL1-blue. Esta cepa tiene la membrana debilitada debido a la ausencia de sales en el medio en el que se desarrolló, esta característica permite la entrada eficiente del DNA a la célula, además posee resistencia a tetraciclina pero no a ampicilina, característica que favorece la posterior selección de las colonias transformantes en medio sólido LB. En la tabla 4 se observa la mezcla de reacción de transformación.

Tabla 4. Reacción de transformación

REACTIVO	VOLÚMEN (μl)
Medio LB líquido	1,000
Células XL1-blue	200
Reacción de ligación (ligasa)	20

Las células fueron incubadas 10 min. en hielo y después se incubaron 1h a 37°C con agitación a 250 rpm.

Después de la incubación, se tomaron 100 µl de la mezcla de transformación y se sembraron en placas de agar LB, con ampicilina (100 µg/ml), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración final de 80 µg/ml [preparada en dimetil formamida (DMF)], además de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 20 mM (preparado en agua estéril).

Las placas se incubaron a 37°C toda la noche para la selección de color blanco/azul, aquellas colonias que contienen los plásmidos con el inserto permanecen blancas y las colonias que tienen los plásmidos sin el inserto son azules.

Después de la incubación, con un palillo se tomaron colonias blancas individuales y se inocularon en tubos falcon de 15 ml con 5 ml de medio LB líquido con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm.

Posteriormente se hizo la purificación del DNA de las colonias transformantes (con las clonas de los fragmentos de los genes correspondientes, APN, Bt-R₁ e InsA) siguiendo el protocolo del estuche de purificación de DNA plasmídico de Quiagen^R (QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany). Para consultar protocolo ver anexo 2.

4.8 Síntesis del dsRNA

Para la síntesis del dsRNA usando el estuche de transcripción HiScribeTM (HiScribeTM, RNAi Transcription Kit, USA), se proponen dos tipos de protocolo para la preparación del templado, en este caso se probaron los dos:

A) Linearización de la clona (por restricción):

Se hicieron dos reacciones por separado para la linearización de la clona, es decir, cada una con una enzima de restricción diferente correspondientes a las que flanquean el fragmento de DNA insertado. En un gel de agarosa al 1% se verificó la restricción de las clonas. El DNA se purificó y posteriormente se hizo la reacción de alineamiento por incubación a 65°C durante 5 min.

Estas cadenas de DNA alineadas son el templado para la reacción de transcripción.

B) Reacción de PCR con el oligo T7

Empleando los oligos específicos de los promotores T7, la enzima Taq-polimerasa y la clona de cada una de las tres proteínas como templado, se hizo una reacción de PCR para amplificar los fragmentos de interés. La mezcla de reacción del PCR se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Reacción de PCR para la síntesis del templado de la Transcripción *in vitro*

REACTIVO	VOLÚMEN (μ l)
H ₂ O	66
dNTPs	10 (2mM)
DNA	2 (dilusión 1:5=100 ng)
Buffer 10X de la enzima	10
MgCl ₂	10
Enzima Taq-polimerasa	1
Volumen total	100

Las condiciones de incubación fueron las siguientes: 3 minutos a 94 °C, 25 ciclos, en donde cada ciclo consta de tres segmentos, el primero de 30 segundos a 94 °C, el segundo de 30 segundos a 50 °C y el tercero de 30 segundos a 72 °C. Finalmente 5 min. a 72 °C.

Los fragmentos amplificados se verificaron en gel de agarosa al 1%. Posteriormente se purificaron usando el estuche de purificación de PCR (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany). Para consultar protocolo ver anexo 1.

Para la reacción de transcripción *in vitro* (tabla 6), se uso la T7-RNA polimerasa y los dos tipos de DNA templado de cada una de las tres proteínas.

Se probaron diferentes condiciones de incubación de la reacción, se varió la temperatura en un rango de 37 a 42°C y el tiempo de incubación de 1 a 5 h. Finalmente, la incubación se estandarizó a 37°C durante 3h. En la tabla 6 se representa la reacción más óptima de transcripción *in vitro*.

En la figura 14 se representa gráficamente el procedimiento de preparación del DNA templado para la reacción de transcripción *in vitro*.

Tabla 6. Reacción de transcripción *in vitro*.

REACTIVO	VOLÚMEN (μ l)
H ₂ O	145
dNTPs	20 (2 mM)
DNA	5
Buffer 10X de la enzima	20
Enzima T7-polimerasa	10
Volumen total	200

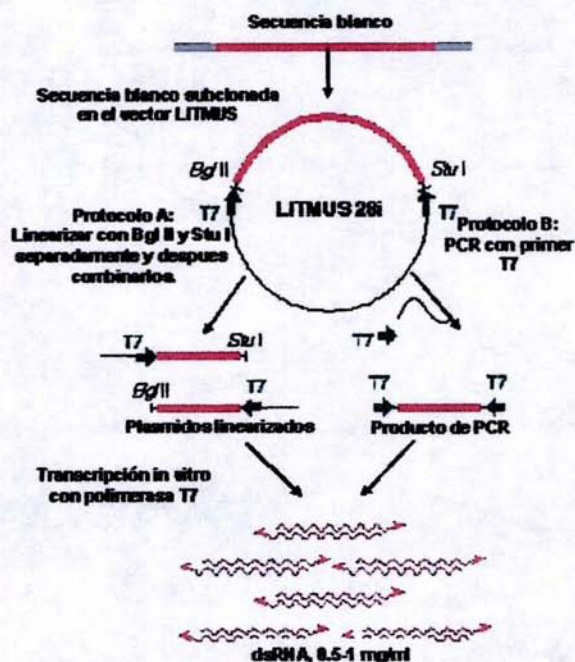


Fig. 14. Representación gráfica de la preparación del DNA templado y la síntesis del dsRNA. Tomada y modificada de HiScribe™ RNAi Transcription Kit.

4.9 Digestión del dsRNA con DICER

Estudios *in vitro* en los que se emplearon lisados de *D. melanogaster*, revelaron que RNAs interferentes pequeños de 21-25 nt eran los mediadores del silenciamiento genético. Estos RNAs son el resultado del procesamiento del dsRNA por una enzima del tipo de las RNAsas tipo III llamada DICER²⁹.

Recientemente, diferentes grupos han empleado la RNasa tipo III de *E. coli* o la enzima humana recombinante DICER, para cortar *in vitro* los dsRNAs largos a siRNAs⁴⁵.

El estuche de producción de siRNAs que se empleó para este ensayo (DICER siRNA Generation Kit, Gene Therapy Systems, Inc., USA), contiene la enzima humana recombinante DICER (endonucleasa específica de dsRNA) para cortar templados de dsRNA transcritos *in vitro* a fragmentos de siRNAs de 22 pb (Figura 15). Esta enzima tiene la capacidad de cortar más del 95% del dsRNA templado dentro de las 12 h de incubación en las condiciones óptimas.

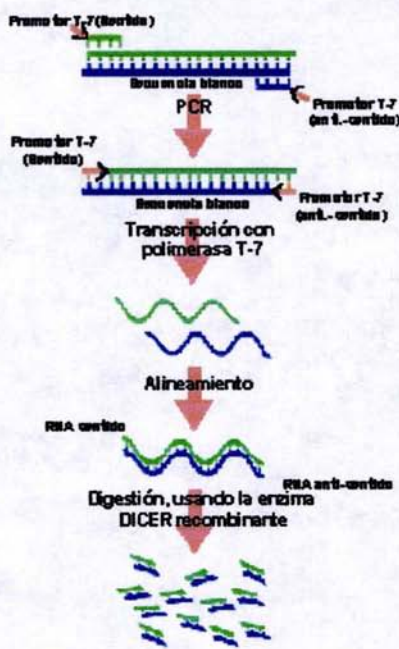


Figura 15. Actividad de DICER en el procesamiento de los dsRNAs a siRNAs. La enzima humana DICER recombinante, mimetiza el proceso natural de RNAi, se acopla al dsRNA transcrito *in vitro* y lo corta en fragmentos pequeños de 22 pb (siRNAs). Tomada y modificada de DICER siRNA Generation Kit.

Los fragmentos de dsRNAs de Bt-R₁ y APN fueron cortados con la enzima DICER para obtener fragmentos de 22 pb que posteriormente fueron microinyectados en huevos y larvas de *M. sexta*, la mezcla de esta reacción se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Reacción de digestión de dsRNA con la enzima DICER a fragmentos de 22 pb

REACTIVO	VOLÚMEN (µl)
H ₂ O libre de nucleasas	2.5 (x)
dsRNA (1µg)	x
10mM ATP	1
50mM MgCl ₂	0.5
Buffer de reacción de DICER	4
Enzima DICER Recombinante (1Unidad)	2

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 18 h y se detuvo al agregar 2 µl de la solución stop de DICER.

En un gel de agarosa al 3% (TAE) se verificó la reacción de corte del dsRNA a fragmentos pequeños de RNA (siRNAs) de 22 pb (datos no mostrados).

4.10 Cuantificación del RNA

La cuantificación del dsRNA es un paso crucial después de la transcripción *in vitro*; para realizarla se emplea un estuche de cuantificación de RNA (Ribogreen RNA Quantitation kit, Molecular Probes, USA) y un fluorómetro (Bio Rad). Se preparó una curva estándar con RNA ribosomal (RNAr) en ng/µl y las muestras de dsRNA, que posteriormente se leyeron en el fluorómetro. La lectura obtenida está expresada en Unidades de Fluorescencia (UF). Una vez obtenidos los valores de absorbancia de las muestras de dsRNA y a partir de los valores de pendiente y ordenada al origen de la curva estándar se calculó la concentración del RNA.

4.11 Microinyección

Los experimentos de microinyección de huevos y larvas de *M. sexta* se desarrollaron usando un micromanipulador (Brinkmann, Germany), un microdispensador (VWR^R Digital Microdispenser, VWR Scientific, San Francisco, CA, USA) y pipetas capilares de vidrio (Custom glass tubing, Brummond Scientific, USA).

MICRODISPENSADOR

El microdispensador es un aparato con el que se controla el volumen de la solución que será microinyectada. Tiene una capacidad máxima de 10µl y graduada cada 10 nl.

MICROMANIPULADOR

En este dispositivo se monta el microdispensador y permite controlar el movimiento fino del mismo durante la inyección.

CAPILARES PARA MICROINYECCIÓN

Los capilares de vidrio tienen que ser previamente ajustados con la longitud (11 cm.) y el diámetro requeridos (el diámetro del capilar se ajustó entre 46-56µm) utilizando un "puller" (Sutter Instrument Co. Made in USA, Model P-87. Flaming/brown micropipette puller) de tal manera que su penetración haga el menor daño del cigoto o la larva durante la inyección.

ACEITE MINERAL

El aceite mineral libre de RNAsa se emplea como fase entre el émbolo del microdispensador y la solución que se va a inyectar y que está dentro del capilar para evitar la entrada de aire y la contaminación con RNAsas.

HUEVOS Y LARVAS DE *M. sexta*

Se emplearon huevos y larvas de *M. sexta*, los huevos fueron colectados en las primeras horas de la mañana ya que es cuando están recién ovopositados y tienen la membrana más suave (esto facilita la microinyección); se desinfectaron con cloro al 6% durante 3min. Las larvas en L1 se inyectaron dentro de las primeras 12 horas después de la eclosión, para las larvas que se inyectaron en estadios posteriores se procuró que estuvieran dentro de las siguientes 12 h después de cambiar de estadio.

PROCEDIMIENTO DE MICROINYECCIÓN:

El aceite mineral se introdujo al capilar con la ayuda de una jeringa de aguja larga (12cm), con la que se inyectó lentamente y simultáneamente se fue sacando la jeringa del capilar hasta llenarlo. En la punta del émbolo del microdispensador se aplicó una gota del aceite mineral (que debe fusionarse con el aceite del capilar) y entonces se introdujo al capilar, asegurándose de que no quede ninguna burbuja de aire dentro. En el microdispensador se montó en el micromanipulador. El volumen de la solución a inyectar se colocó sobre papel parafilm (PARAFILM "M"[®], LABORATORY FILM, American National Can[™], Chicago, USA) y con la punta del microdispensador tocándola, se cubre con aceite mineral, posteriormente, la solución se carga dentro del capilar.

En el caso de la microinyección de huevos, estos fueron colocados en una caja de micropozos para restringir su movimiento al momento de la microinyección.

Con el micromanipulador se colocó la punta del microdispensador en la superficie del huevo y se introdujo el capilar, se inyectó el volumen deseado de cada RNA de APN, Bt-R₁ o InsA. Los huevos microinyectados se mantuvieron en cajas petri con un algodón húmedo y sellados con papel parafilm para evitar la desecación y posteriormente las larvas que eclosionaron se alimentaron con dieta artificial hasta el estadio en el que fueron disectadas.

En el caso de la microinyección de las larvas, estas fueron previamente incubadas en hielo durante 5 min. y después se microinyectaron intrahemocélicamente en la parte ventral media del intestino. Posteriormente se mantuvieron en condiciones de laboratorio con dieta artificial hasta el segundo o tercer estadio de desarrollo en los que fueron disectadas (para el caso de las inyectadas con RNAs de Bt-R₁ o APN) para hacer el análisis del silenciamiento de las proteínas; y se mantuvieron hasta el cuarto estadio de desarrollo para el caso de la proteína InsA en la que el análisis del silenciamiento sólo fue la selección por fenotipo, es decir, cambio en la coloración de la larva.

4.12 Disección de larvas

Después de la inyección del dsRNA de Bt-R₁ y APN en huevos y larvas de primer estadio de desarrollo de *M. sexta*, estas se dejaron crecer hasta el segundo y tercer estadio de desarrollo (justo después del cambio de cabeza) para disectar el intestino.

Para la disección, las larvas se incuban en hielo durante 5 min. posteriormente se disecta el intestino medio que después es homogenizado en solución amortiguadora PBS 1X, y PMSF 0.5mM, por intervalos de 1min. de incubación en hielo y un minuto de sonicación (con un sonicador Branson 1200, USA).

4.13 Ensayos de actividad de APN

Con el homogenizado de intestino de las larvas se analizó la actividad específica de APN y empleando como control la actividad de larvas que fueron microinyectadas solamente con agua. Los ensayos de actividad de APN se hicieron utilizando como sustrato la L -Leucin p -nitroanilida (Sigma) y midiendo contra tiempo la liberación de para-nitroanilida. La cinética de la reacción se siguió en intervalos de 10 seg. durante dos minutos en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Ultrospect II, Pharmacia, USA) a una longitud de onda de 405 nm. Con los datos de absorbancia se calculó la actividad específica de APN empleando el software de Sigma-plot (Sigma plot, versión 8.0). Al final la actividad de APN se expresa con el coeficiente de extinción molar de la p -Nitroanilida a 405 nm en nmol/min* μ g de proteína.

4.14 Cuantificación de proteína

Con el homogenizado de intestino de cada una de las larvas disectadas, se determinó la concentración de proteína siguiendo el protocolo del método de Lowry^{35,36}. Se midió en el espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Ultrospect II, Pharmacia, USA) la absorbancia de una pequeña muestra del homogenizado de intestino a una longitud de onda de 750 nm, se emplearon los reactivos de ensayo de proteína de BIO-RAD (D_c Protein assay, BIO-RAD, USA). La curva de referencia se hizo con albúmina sérica bovina (BSA).

4.15 Western blot

Para la detección de proteína, se utilizaron 10 μ g del homogenizado del intestino, las muestras se separaron en una electroforesis en gel de dodecyl sulfato de sodio-poliacrilamida al 9% (SDS-PAGE), a 8 mA durante 1 h y a 16 mA durante 2 h más. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas PVDF (Millipore, ImmobilonTM-P, Transfer Membranas, USA) a 350mA en una cámara de transferencia semi seca por 1 h a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó durante 1h con PBS 1X-Tween 20 0.05%, leche descremada al 5%; una vez bloqueada se lavó con buffer PBS-Tween 0.05%, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Ab anti-Bt-R₁ 1:500 o Ab anti-APN 1:10,000) por 2 h y se lavó cinco veces más como se mencionó anteriormente; finalmente se incubó 10 min. con solución de PBS 1X. Se incubó con el segundo anticuerpo anti- IgG de conejo acoplado a peroxidasa para inmunodetectar a las proteínas. Para revelar con los reactivos luminiscentes, la membrana fue incubada con el sustrato del estuche de SuperSignal (SuperSignal Chemiluminescent Substrate, Pierce, USA) y la señal emitida se detectó con película fotográfica para quimioluminiscencia (HiperfilmTM, Amersham Biosciences, England).

4.16 Análisis de la generación F1

Para el análisis del silenciamiento de las proteínas en la generación F1 se requirió mantener los huevos y/o larvas que fueron microinyectados con algún dsRNA hasta el estadio de pupa, las pupas se mantuvieron en una jaula de metal (50 cm. x 50 cm. de área) con las condiciones ambientales descritas anteriormente hasta la eclosión del adulto, es decir, alrededor de 60 días. Después del apareamiento de los adultos, los huevos fueron colectados diariamente, lavados con cloro al 6% y depositados en cajas petri con un algodón húmedo para evitar la desecación hasta la eclosión de las larvas. Las larvas F1 se mantuvieron con dieta artificial hasta el estadio de disección y análisis de las proteínas APN y Bt-R1 (de la misma forma en la que ya se mencionó), además de evaluar su susceptibilidad a la toxina Cry1Ab en los bioensayos.

4.17 Bioensayos

Se realizaron bioensayos, en los que se emplearon diferentes dosis de esporas más cristales de Cry1Ab para determinar el efecto en la actividad de la toxina.

Para hacer los bioensayos, se usaron cajas de plástico con 24 pozos de 2 cm² (Corning), las cuales se llenaron con dieta artificial aproximadamente a la mitad (1 cm²). Las cajas se incubaron con luz ultravioleta durante 15 min. y posteriormente, en cada pozo se depositó la dosis de esporas-cristal de la toxina Cry1Ab y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, en cada pozo de la caja de bioensayo se colocó una larva y la caja se selló totalmente con plástico. Las cajas de bioensayo se mantuvieron a temperatura ambiente durante siete días.

5.0 Resultados y discusión

5.1 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de un fragmento del gen de Bt-R₁, APN e InsA.

Los oligonucleótidos diseñados para amplificar el fragmento de DNA seleccionado de las proteínas APN, Bt-R₁ e InsA, se presentan en la tabla 8.

En el caso de la APN, se seleccionaron los oligos para amplificar por PCR un fragmento de 806 pb del extremo 3' de la secuencia del gen (Figura 16). La elección de este fragmento se hizo considerando la región empleada por Rajagopal, R., *et al.* (2002) en el silenciamiento con dsRNA de la APN de *Spodoptera litura*; quienes amplificaron un fragmento de 756 pb que va del nucleótido 1827 al 2583 del gen de la APN. Tomando esto como referencia, nosotros elegimos un fragmento que va del nucleótido 1826 al 2600 que corresponde a la misma región.

Para Bt-R₁ se eligió un fragmento que va del nucleótido 24 al 445 del extremo 5' de la secuencia del gen (Figura 16) para ser amplificado por PCR y tiene un tamaño de 421 pb. Se eligió esta región porque fue la que pudo ser amplificada después de que se probaron diferentes oligonucleótidos diseñados para la síntesis de un fragmento de este gen.

Para la proteína InsA se eligió un fragmento del extremo 3' de la secuencia del gen (Figura 16). Los oligos diseñados amplificaron un producto de 324 pb que va del nucleótido 202 al 526. Esta región del gen corresponde a la más conservada entre las dos isoformas del gen de la insecticiana, por lo tanto, se amplifica el mismo fragmento en ambos genes. En la figura 17 se muestra el alineamiento entre la secuencia codificante de las isoformas a y b del gen de la insecticiana.

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los tres fragmentos de DNA (Bt-R₁, APN e InsA).

PROTEÍNA	NOMBRE DEL OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	SITIO DE RESTRICCIÓN
Bt-R ₁	Cader-der	5'GCT CTA GAG CTG CCT TCC TGC TGG TGT TTA 3'	<i>Xba</i> I
	Cader-rev	5'GGA ATT CCT CCA CGC GCA CAT TGA ACA T 3'	<i>Eco</i> R I
APN	APNder	5' GCT CTA GAG CAA TAC CAC CTG GGG TCT CAT CAC AAG G 3'	<i>Xba</i> I
	APNrev	5' GGA ATT CCA CGG CTC GTG ATG GTG TTC AGC GG 3'	<i>Eco</i> R I
InsA	InAder	5' TCC AAG CTT GGG GGC AAG AAG GCT TCC GTC 3'	<i>Hind</i> III
	InsArev	5' AGG TGG GAG AAG GTC TTG AGG 3'	<i>Sal</i> I

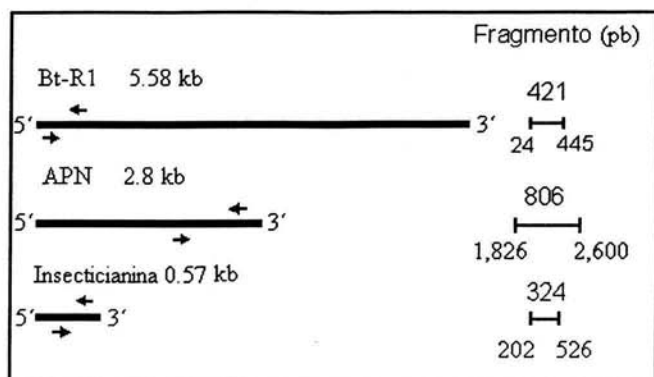


Figura 16. Representación gráfica de la región amplificada de los genes que codifican para las proteínas Bt-R₁, APN e InsA. Se indica la posición de los oligonucleótidos diseñados para cada caso.

```

Ins-A      ATGCAGAGGTTCTAGTCTTCACCATTGTGGCCGTGGCCACCCGAGCTGCCGGGGACATA
Ins-B      ATGCAGAGATTCTTGTCTTCACCATTGTGGCCGTGGCCACCCGAGCTGCCGGGGACATC
*****  *****

Ins-A      TTTTACCCTGGATACTGCCCCGAAGTTAAACCCGTAGATGACTTCGACCTGAGTGCTTTC
Ins-B      TTTTACCCTGGATACTGCCCCGATGTTAAGCCCGTGAGCAGATTCGACCTCAGCGCTTTC
*****  *****

Ins-A      GCTGGAGCTTGGCAGCAAATCGCCAAACTGCCCTTGAAAAACGAGAACGAAGGAAAATGT
Ins-B      GCTGGAGCATGGCAGCAGATCGCCAAACTGCCCTTGAAAAACGAGAACCAGGAAAATGT
*****  *****

Ins-A      ACCGTTGCTGAATACAAGTATGACGGCAAGAAGGCTTCCGCTTACAACCTTTTTGTCATC
Ins-B      ACCATCGCTGAATACAATACGACGGCAAGAAGGCTTCCGCTTACAACCTCGTTTTCGCTC
*****  *****

Ins-A      AATGGAGTCAAGGAATACATGGAGGGTGACTTAGAAATCGCTCCTGATGCTAAACTCACC
Ins-B      AACGGAGTCAAGGAATACATGGAGGGTGACTTAGAAATCGCTCCTGACGCCAAATACACC
** *****

Ins-A      AAGCAAGGCAAATACGTCATGACCTTCAAGTTCGGACCAAGGGTAGTCGTCAGGTACCA
Ins-B      AAGCAAGGCAAATACGTCATGACCTTCAAGTTCGGACAGAGGGTAGTGAACCTGGTCCCA
*****

Ins-A      TGGGTTTTGGCCACTGACTACAAGAACTACGCCATCAACTACAAC'TGAACTACCACCTT
Ins-B      TGGGTTTTGGCCACTGACTACAAGAACTACGCCATCAACTACAAC'TGAACTACCACCTT
*****

Ins-A      GACAAGAAGGCCACAGCATCCACGCCTGGGTCTGTCCAGGAACAAGGTCTTGGAAAGGC
Ins-B      GACAAGAAGGCCACAGCATCCACGCCTGGATCCTGTCCAAGAGCAAGGTCTTGGAAAGGA
*****

Ins-A      AACACCAAGGAAGTTCGTCGACAACGTCTCAAGACCTTCTCCACCTGATCGATGCCTCC
Ins-B      AACACCAAGGAAGTTCGTCGACAACGTCTCAAGACCTTCTCCACCTGATCGATGCCTCC
*****

Ins-A      AAATTCATGTCCAACGAATTCTCCGAAGCTGCCTGCCAATACTCCACCACATACAGCCTT
Ins-B      AAATTCATCTCCAACGACTTCTCCGAAGCTGCCTGCCAGTACTCCACCACATACAGCCTT

```

```

*****
Ins-A      ACCGGCCCTGACAGGCATTGA-----
Ins-B      ACTGGCCCTGACAGGCATTGAAATAAAGGAAAGGTTTTTACATACTTTTATGTTATTATT
          ** *****
Ins-A      -----
Ins-B      TACATACTTTAGTTTTTTAGAGAACTTTAATGGTAAAAGTTACTAAGTATTAATGTCAAC

Ins-A      -----
Ins-B      AGAAATT

```

Figura 17. Alineamiento de la secuencia codificante de los genes que codifican para las isoformas a y b del gen de la insecticiana. Se sabe que estos genes son producto de duplicación génica, difieren solamente en 13 aminoácidos. Los oligonucleótidos diseñados para amplificar un fragmento de DNA de cada uno de estos genes se sitúan en las regiones más conservadas con el objetivo de silenciarlos a ambos y en la figura están señalados con sombreado gris.

5.2 Amplificación de los fragmentos de DNA de Bt-R₁, APN e InsA.

Los oligonucleótidos ya mencionados, se utilizaron para sintetizar el cDNA de cada una de las tres proteínas (Bt-R₁, APN e InsA) por medio de una reacción de RT-PCR en la que se utilizó como templado el RNA total, extraído de *M. sexta*.

Una vez obtenidos los tres cDNAs, estos se emplearon como templado para sintetizar la cadena complementaria de DNA de los fragmentos seleccionados de cada proteína por medio de una reacción de PCR, y posteriormente fueron purificados tal como se explicó en materiales y métodos (Figura 18).

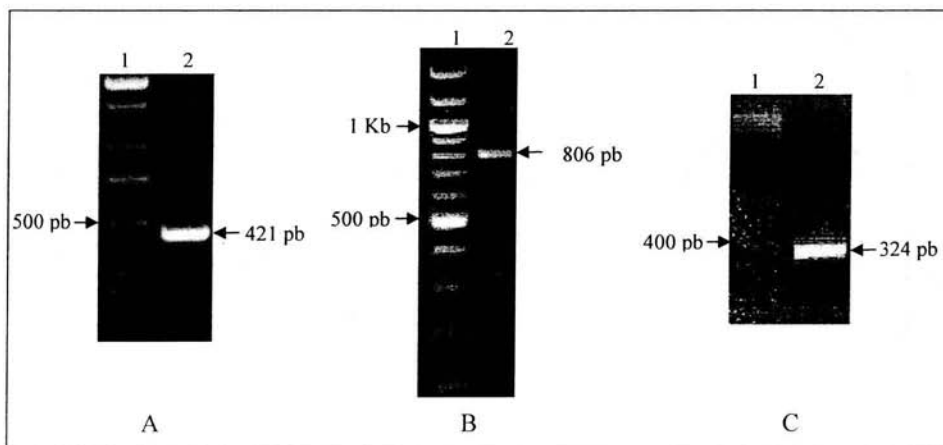


Figura 18. Gel de agarosa al 1% en donde se representan los productos de reacción de PCR de Bt-R₁, APN e InsA purificados. A, Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM), carril 2: Producto de la reacción de PCR del fragmento de Bt-R₁ de 421 pb purificado. B, Carril

1: MPM, carril 2: Producto de la reacción de PCR del fragmento de APN de 806 pb. C, Carril 1: MPM, carril 2: Producto de la reacción de PCR del fragmento de InsA de 324 pb.

5.5 Restricción de los fragmentos de DNA y de los vectores

Los fragmentos de DNA correspondientes a Bt-R₁, APN e InsA y los vectores en los que fueron clonados, fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes indicadas en materiales y métodos (Tabla 8).

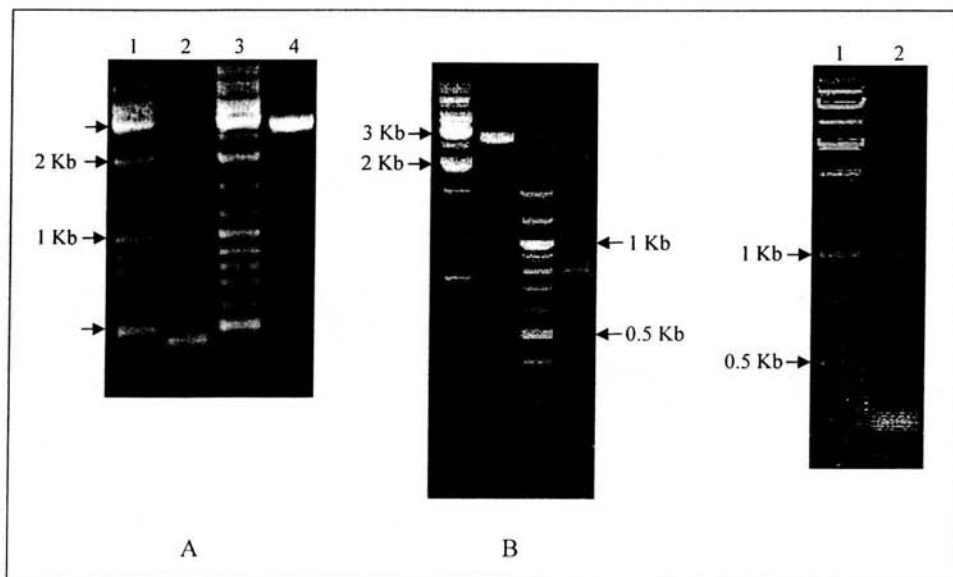


Figura 19. Geles de agarosa al 1%, en donde se representan los vectores y los fragmentos de DNA amplificados de cada gen digeridos con las enzimas correspondientes. A, Carril 1: MPM, carril 2: fragmento de DNA de Bt-R₁ de 421 pb digerido con las enzimas *Xba* I y *EcoR* I, carril 3: MPM, carril 4: vector pLITMUS 28i (2.8 Kb) digerido con *Xba* I y *EcoR* I. B, Carril 1: MPM, carril 2: vector pLITMUS 28i digerido con *Xba* I y *EcoR* I, carril 3: MPM, carril 4: fragmento de DNA de APN de 806 pb digerido con *Xba* I y *EcoR* I. C, Carril 1: MPM, carril 2: fragmento de DNA de InsA de 324pb digerido con *Hind* III y *Sal* I.

Posterior a la digestión, los vectores y los fragmentos de DNA de Bt-R₁, APN e InsA fueron purificados empleando el estuche de purificación de PCR como se indica en materiales y métodos.

Después, **cada fragmento de DNA se clonó** en el vector correspondiente empleando la enzima T4-DNA ligasa.

La cepa *Escherichia coli* XL1-blue se transformó con el producto de la reacción de ligación de cada una de los fragmentos de DNA de Bt-R₁, APN e InsA y su vector correspondiente. Posteriormente, se seleccionaron colonias blancas de cada una de las transformaciones, lo que las caracterizaba como candidatas para poseer el vector con el inserto de DNA correspondiente de cada proteína (Bt-R₁, APN e InsA). Después de crecerlas en medio LB líquido más ampicilina, el DNA se recuperó empleando el estuche de purificación DNA de Quiagen (protocolo en el anexo 2). En un gel de agarosa al 1 % se verificó la purificación del DNA de cada una de las colonias candidatas para tener el vector con el inserto del gen correspondiente (Bt-R₁, APN o InsA).

En la figura 20 panel A, se muestra el DNA de la clona candidata seleccionada de la transformación en *E. coli* para tener el inserto del gen de la InsA.

Para verificar que la colonia candidata tuviera el vector con el inserto de InsA se realizó una digestión del DNA de esa colonia con la enzima *Hind* III y como control se tomó el vector pLITMUS 38i digerido también con esa enzima. En la figura 20 panel B, se observa que la banda que corresponde al vector pLITMUS 38i con un peso de 2.8 Kb (línea 2) claramente está por debajo de la banda de 3 kb, el DNA de la colonia con el inserto (línea 3) está por arriba de la banda que corresponde al marcador de 3 Kb (línea 1).

Posteriormente, el DNA de la clona candidata y el vector (previamente digeridos con *Hind* III) también fueron digeridos con *Sal* I para eliminar el fragmento insertado y el fragmento de DNA intermedio para el caso del vector. En la figura 20 panel C, se observa que el DNA del vector y el de la clona tienen el mismo tamaño (aproximadamente 2.8 Kb), y se observa también la banda del inserto de InsA (de 324 pb) por arriba de la banda de 250 pb del marcador de peso molecular. Este resultado indica que la clona candidata posee el inserto de InsA.

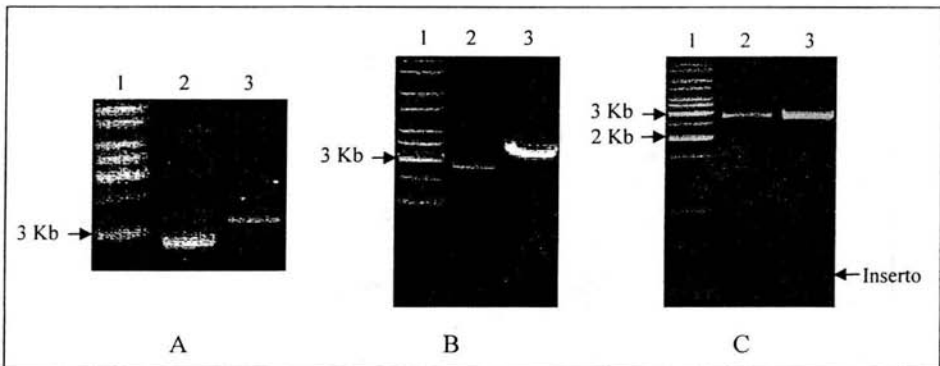


Figura 20. Geles de agarosa al 1%. A, DNA de la colonia candidata para tener el vector pLITMUS 38i más el inserto de Insecticiana de 324 pb. Carril 1: MPM, carril 2: vector pLITMUS 38i (2.8 Kb), carril 3: clona de InsA (3.1 Kb). B, Digestión del DNA de la clona candidata con *Hind* III. Carril 1: MPM, carril 2: vector pLITMUS 38i (2.8 Kb) digerido con *Hind* III, carril 3: DNA de la clona digerido. C, Digestión del DNA de la clona

candidata de InsA (previamente digerido con *Hind* III) con la enzima *Sal* I. Carril 1: MPM, carril 2: vector pLITMUS 38i digerido con *Hind* III y *Sal* I, carril3: DNA de la clona de InsA digerido con *Hind* III y *Sal* I.

Las colonias que tenían el vector con el inserto de cada proteína (Bt-R₁, APN e InsA) seleccionadas, se crecieron en medio LB líquido con ampicilina y posteriormente se purificó el DNA de cada una (ver materiales y métodos).

Por lo tanto, se construyeron clonas de un fragmento del gen de Bt-R₁, APN (en el vector LITMUS 28i) e Insecticiana (en el vector LITMUS 38i) en vectores de síntesis de dsRNA.

5.6 Preparación del DNA templado para la síntesis de dsRNA

Una vez obtenidas las clonas con los insertos de DNA que corresponden a Bt-R₁, APN, e InsA se hizo la preparación del templado para la reacción de transcripción del dsRNA.

Se prepararon dos tipos de templado:

- A) Se linearizó el DNA de la clona de cada proteína (Bt-R₁, APN, e InsA) con cada una de las dos enzimas de restricción correspondientes (tabla 8) en reacciones separadas. Posteriormente se hizo la reacción de alineamiento o combinación de los DNAs (ver figura 13 de materiales y métodos).

En la figura 21 se esquematizan las clonas de InsA linearizadas en reacciones por separado con una de las dos enzimas de restricción *Hind* III y *Sal* I.

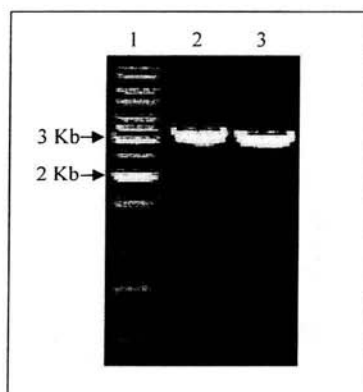


Figura 21. Digestión de la clona de InsA con *Hind* III y *Sal* I en reacciones separadas para la preparación del templado de la transcripción *in vitro*. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: DNA de la clona de InsA linearizada con *Hind* III, carril 3: DNA de la clona de InsA linearizada con *Sal* I.

B) Se amplificaron los fragmentos de DNA de interés de cada proteína a partir de la clona correspondiente, en una reacción de PCR empleando oligo T7 y Taq-polimerasa.

En esta reacción se emplearon dos enzimas para la síntesis de los fragmentos de DNA, la enzima Vent-polimerasa y la enzima Taq-polimerasa, se probaron diferentes condiciones de reacción y la cuantificación del DNA reveló que el fragmento de APN se sintetizaba con la misma eficiencia con las dos enzimas, sin embargo para el caso de de Bt-R₁ e InsA, la síntesis tuvo un mejor resultado con la enzima Taq-polimerasa (no se muestran los datos). Por lo tanto la reacción se estandarizó empleando la enzima Taq-polimerasa.

En la figura 22 se muestra el fragmento de DNA amplificado para cada una de las proteínas (Bt-R₁, APN e InsA) empleando oligo T7 y la enzima Taq-polimerasa. El fragmento de DNA amplificado de Bt-R₁, se localiza por arriba de la banda de 500 pb del marcador de peso molecular, el fragmento de DNA amplificado de APN, se localiza a la altura de la banda de 900 pb y el fragmento de DNA amplificado de InsA se localiza entre la banda de 300y 400 pb.

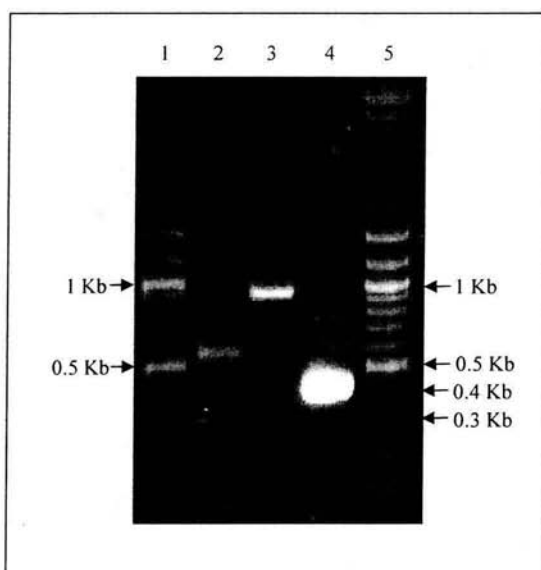


Figura 22. Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA clonados de cada proteína empleando oligo T7 y Taq polimerasa para la preparación del templado de la transcripción *in vitro*. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: fragmento de DNA de Bt-R₁, carril 3: fragmento de DNA de APN, carril 4: fragmento de DNA de InsA, carril 5: marcador de peso molecular.

Las siguientes reacciones de amplificación de los fragmentos de DNA de Bt-R₁, APN, e InsA se hicieron empleando el oligo T7 y la enzima Taq-polimerasa.

Una vez obtenidos los fragmentos de DNA templado de cada una de las proteínas, se hicieron las reacciones de **transcripción *in vitro***, empleando la polimerasa T7.

Las transcripciones *in vitro*, se hicieron en volúmenes pequeños para optimizar las condiciones de reacción para la producción de dsRNA de Bt-R₁, APN, e InsA.

Se observó que el dsRNA producto de la transcripción *in vitro*, se sintetizó con mayor eficiencia (datos comprobados por cuantificación de RNA) cuando se usó como templado para la transcripción el fragmento de DNA amplificado por PCR a partir de la clona.

Por esta razón se decidió emplear solamente este templado para las sucesivas reacciones de transcripción.

En el protocolo inicial de la reacción de transcripción se indica que es necesario agregar 500 ng de templado, de 1 a 3 h de incubación a una temperatura entre 37 y 42°C. Sin embargo, de acuerdo a los datos de cuantificación, cuando se agregan 150 ng se obtiene la misma cantidad de dsRNA que cuando se agregaron 500 ng de DNA templado. Además, la máxima cantidad de dsRNA se obtiene a las 3 h de incubación de la reacción, después de ese tiempo el producto disminuye. Finalmente, la temperatura óptima es a los 37°C. Por lo tanto las condiciones de reacción de transcripción se estandarizaron como sigue: 150 ng de DNA templado, 3 h de incubación a 37°C.

La eficiencia en la producción de dsRNA con el estuche de transcripción de RNAi, resulto ser más baja de lo indicado, por lo que fue necesario concentrar los productos hasta diez veces para obtener aproximadamente 400 µg/ml.

En la figura 23 panel A, se esquematiza el dsRNA de APN (806 pb) producto de la transcripción *in vitro*, se observa que la banda del transcrito de APN (carril 1) se localiza a la altura de la banda de 800 pb con respecto al marcador de peso molecular (carril 3) y que es más pequeño que el DNA templado que se observa en el carril 2 de la figura. En la figura 23 panel B, se esquematiza el dsRNA de InsA producto de la transcripción *in vitro*, se observan dos bandas, una a la altura de la banda de 400 pb del marcador de peso molecular que corresponde al templado y la otra a la altura de la banda de 300 pb que corresponde al producto de la transcripción (dsRNA de InsA de 324 pb).

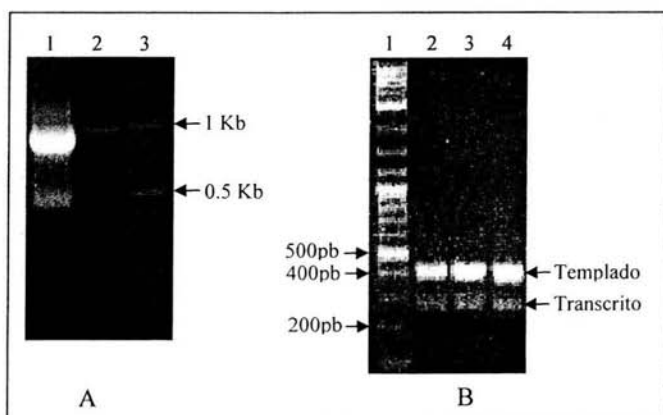


Figura 23 Geles de agarosa al 1% en donde se representan los productos de la transcripción *in vitro*. A, dsRNA de APN, carril 1: productos de la transcripción del fragmento de APN, carril 2: fragmento de DNA de APN amplificado por PCR a partir de la clona, carril 3: MPM. B, dsRNA de InsA, carril 1: MPM, carril 2, 3 y 4: productos de la transcripción del fragmento de InsA.

Por lo tanto, se sintetizó RNA de doble cadena de secuencia homóloga a los fragmentos de los genes clonados de Bt-R₁, APN e InsA.

Se realizó la cuantificación del dsRNA de cada una de las reacciones de transcripción, este procedimiento permitió determinar la eficiencia en la producción de dsRNA en cada una de las condiciones de reacción analizadas y de esta manera establecer las condiciones de incubación óptimas.

En la reacción de transcripción óptima (tabla 6 de materiales y métodos), se obtuvieron aproximadamente 40 µg/ml de dsRNA y después de la concentración se obtuvo aproximadamente 400 µg/ml.

5.7 Microinyecciones:

Se microinyectaron huevos y larvas de diferentes estadios de desarrollo de *M. sexta* con diferentes concentraciones de dsRNA de Bt-R₁, APN, e InsA. Los individuos microinyectados con algún tipo de dsRNA se alimentaron con dieta artificial y se mantuvieron en las condiciones del laboratorio ya descritas en materiales y métodos.

5.7.1 Análisis de la microinyección de dsRNA de Bt-R₁ y APN en larvas de L2

Se microinyectaron larvas de segundo estadio de desarrollo (L2) con un volumen total de 100 nl (0.4 µg) de dsRNA (de Bt-R₁ o APN) y como control de la expresión de las proteínas, se microinyectó el mismo número de larvas con H₂O.

Para verificar el silenciamiento de las proteínas Bt-R₁ y APN las larvas microinyectadas se disectaron en el tercer estadio de desarrollo (L3) y al homogenizado del intestino se le cuantificó la cantidad de proteína, la actividad específica de APN y se verificó la expresión de la proteína por inmunodetección.

En la tabla 9 se muestran los tipos de dsRNA microinyectados y la relación de sobrevivencia en L3.

Tabla 9. dsRNA de Bt-R₁ y APN microinyectado en larvas L2

Sustancia inyectada	Estadio de inyección	Nº de individuos inyectados	Nº de individuos sobrevivientes en L3	Estadio de disección	Nº de individuos disectados
H ₂ O	L2	50	45	L3	2
dsRNABt-R ₁	L2	50	33	L3	2
dsRNAAPN	L2	50	34	L3	2

5.7.1 I Disección de larvas

De las larvas microinyectadas en L2 (ver tabla 9) se disecó el intestino de 2 larvas en L3 de cada una de las condiciones, es decir, de las inyectadas con dsRNA de APN, de las inyectadas con dsRNA de Bt-R₁ y de las inyectadas con H₂O y se hizo el homogenizado del intestino de cada una por separado.

5.7.1 II Cuantificación de proteína

Se hizo la cuantificación de proteína de cada uno de los homogenizados de intestino de las larvas disectadas tal cómo se describió en materiales y métodos.

Este paso de cuantificación de proteína, es crucial para el posterior análisis de las proteínas presentes en el intestino de las larvas por inmunodetección, por lo que se hizo por triplicado.

Como se observa en la tabla 10, la cantidad de proteína entre las larvas control (microinyectadas sólo con H₂O) y las microinyectadas con algún tipo de dsRNA, es muy similar.

Tabla 10. Cuantificación de proteína de larvas microinyectadas en L2 con dsRNA de Bt-R₁ y APN y disectadas en L3

Muestra de intestino de larva	Cantidad de proteína (µg/µl)
H ₂ O	1.95
	1.32
Inyectada con dsRNA APN	2.06
	1.87
Inyectada con dsRNA Bt-R ₁	1.80
	1.68

5.7.1 III Análisis de la actividad específica de APN en larvas L3 microinyectadas con dsRNA de Bt-R₁ y APN en L2.

Al homogenizado del intestino de cada larva se le midió la actividad específica de APN como se explicó en materiales y métodos.

Tomando en cuenta los datos de las larvas control analizadas (microinyectadas solo con H₂O), la actividad de APN en las larvas microinyectadas con dsRNA de Bt-R₁ y de APN, no se vio afectada en ninguno de los casos (Figura 24) Los datos de actividad específica de APN están representados en la tabla 11 adjunta.

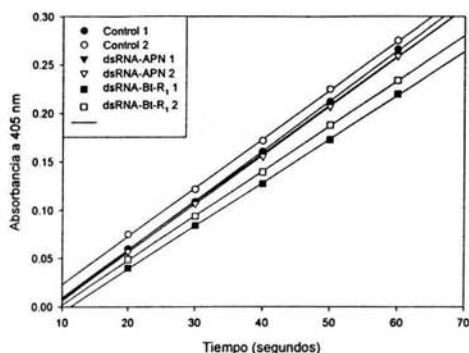


Figura 24. Gráfica de Actividad de APN en larvas L3 que fueron microinyectadas en L2 con dsRNA de APN y Bt-R1.

Tabla 11. Datos de la actividad específica de APN en larvas L3 microinyectadas con dsRNA de Bt-R₁ y APN en L2.

Muestra de intestino de larva	Actividad de APN (nmol min. ⁻¹ µg ⁻¹)
H ₂ O	310
	313
Inyectada con dsRNA APN	264
	258
Inyectada con dsRNA Bt-R ₁	264
	273

5.7.1 IV Análisis de la expresión de las proteínas Bt-R₁ y APN por inmunodetección en larvas inyectadas con dsRNA

Se emplearon 10 µg de proteína del homogenizado del intestino de cada larva analizada en un SDS-PAGE al 9%, posteriormente se transfirió a membrana PVDF y se incubó con Ab-anti Bt-R₁ o Ab-anti APN (ver procedimiento en materiales y métodos).

En la figura 25 se observa el inmunoblot de las larvas microinyectadas en L2 con el dsRNA correspondiente. Se observa que en las dos larvas control, están presentes las dos proteínas (Bt-R₁ y APN). En las larvas que fueron microinyectadas con dsRNA de APN está presente la proteína Bt-R₁ y también la proteína APN; esto indica que el dsRNA de APN microinyectado en estas larvas no tuvo ningún efecto sobre la inhibición de la traducción del mRNA de estas proteínas.

Por el contrario, en el caso de las larvas que fueron microinyectadas con dsRNA de Bt-R₁ se observa que está presente la proteína APN, pero no la proteína Bt-R₁, esto indica que el dsRNA de Bt-R₁ microinyectado en estas larvas afectó la expresión del mensajero de esta proteína y que por lo tanto se obtuvo el silenciamiento específico.

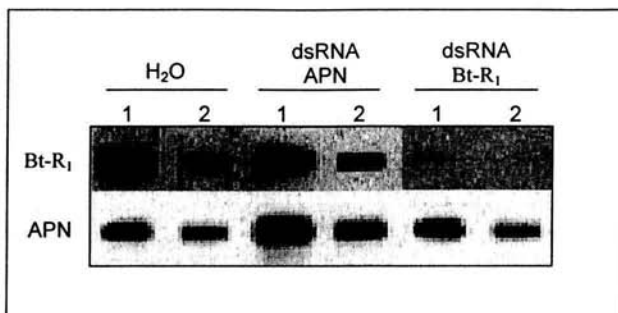


Figura 25. Inmunoblot del homogenizado de intestino de larvas L3 microinyectadas con dsRNA de APN y Bt-R₁ en L2. Detección con anticuerpo anti- Bt-R₁ y anti-APN.

5.7.2 Expresión de Bt-R₁ en la generación F1 de las larvas silenciadas con dsRNA de Bt-R₁

Las larvas que fueron microinyectadas con dsRNA de Bt-R₁ y las microinyectadas con H₂O, se conservaron hasta el estadio adulto y, posteriormente, se analizó la expresión de Bt-R₁ en larvas de estadio L2 de la generación F1 (ver materiales y métodos).

Para este análisis, se designaron 30 larvas que fueron microinyectadas en L2 con dsRNA de Bt-R₁ para obtener la segunda generación, de las cuales 12 llegaron al estadio de pupa. Finalmente, sólo nacieron 9 individuos adultos, es decir, hubo una eficiencia del 30% en la viabilidad de las larvas microinyectadas a la generación F1. Los huevos ovopositados por estos individuos se colectaron y se mantuvieron en las condiciones ambientales ya descritas en materiales y métodos, hasta obtener larvas en L2.

Se disectaron tres larvas control (F1 de las inyectadas solamente con H₂O) y tres larvas F1 de padres inyectados con dsRNA de Bt-R₁ en L2. Se hizo el mismo análisis de cuantificación de proteína, actividad específica de APN e inmunoblot para analizar la expresión de Bt-R₁.

En la figura 26 se representa la gráfica de las actividades específicas de APN de las larvas F1 tratadas con dsRNA de Bt-R₁ disectadas en L2, en donde se observa que no existe gran diferencia con respecto a las larvas control. Los datos de actividad específica de APN se representan en la tabla 12.

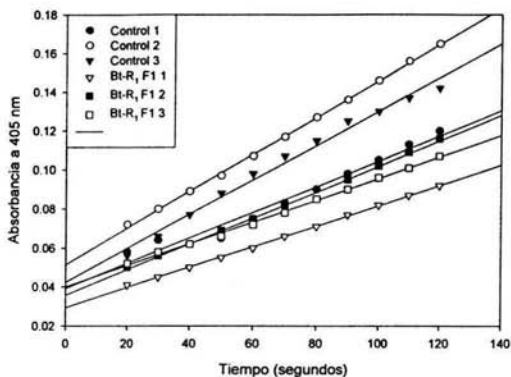


Figura 26. Gráfica de actividad específica de APN de larvas en L2 cuyos padres fueron tratados con dsRNA de Bt-R₁.

Tabla 12. Actividad específica de APN de larvas L2 cuyos padres fueron tratados con dsRNA de Bt-R₁

Muestra de intestino de larva	Actividad de APN (nmol min. ⁻¹ μg ⁻¹)
H ₂ O	908
	1231
	1348
Larvas F1 de las microinyectadas con dsRNABt-R ₁	696
	963
	739

En el análisis de inmunoblot representado en la figura 27, se observa la presencia de Bt-R₁ en las tres larvas de padres microinyectados con dsRNA de Bt-R₁ y la expresión es la misma a la de las larvas control (inyectadas solamente con H₂O), esto indica que el efecto del silenciamiento ocurrido en la generación parental de estas larvas, no se mantuvo hasta la generación F1.

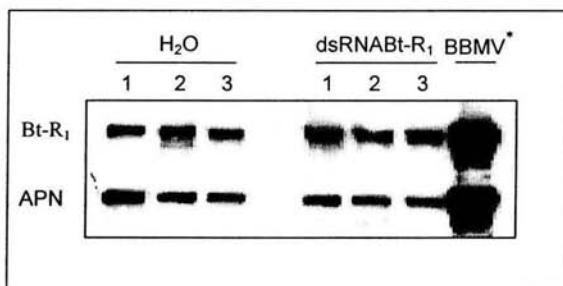


Figura 27. Inmunoblot (10 μg de proteína-SDS-PAGE 9%) para la identificación de la expresión de Bt-R₁ en larvas F1 de las silenciadas con dsRNA de Bt-R₁. Detección con anticuerpo anti- Bt-R₁ y anti-APN.

Con respecto a este dato es importante tomar en cuenta que probablemente, la expresión de Bt-R₁ es importante para la fertilidad o el desarrollo de los individuos de *M. sexta* en alguno de los estadios de desarrollo posteriores al estadio de microinyección, por lo que sólo se seleccionaron los individuos que tenían esta proteína.

* Vesículas de microvellosidad apical (BBMV)

En un análisis realizado por Midboe, Candas y Bulla Jr. (2003) acerca de la expresión de Bt-R₁ durante el desarrollo de *M. sexta*, se observó que conforme al desarrollo y crecimiento de las larvas se da un incremento espectacular en el número de moléculas de Bt-R₁. Se argumenta que Bt-R₁ pudiera ser esencial no sólo para mantener las funciones fisiológicas vitales del intestino, sino para preservar la organización y la integridad epitelial durante la rápida proliferación celular, diferenciación y también crecimiento del tejido⁴¹.

Sin embargo, en un estudio realizado por Gahan, Goulg y Heckel (2001) con *H. virescens*, se aisló una población resistente a la toxina Cry1Ac por selección con dieta impregnada con toxina. La población resistente a la toxina es la homociga recesiva, ya que la población heterocigota es susceptible a la toxina. Al gen responsable de la susceptibilidad a la toxina lo nombraron HevCaLP (Proteína tipo caderina de *H. virescens*). Ellos determinaron que la función de esta proteína no es esencial para la sobrevivencia de *H. virescens* (a pesar de que no se conoce su función fisiológica), ya que la población resistente (“nockout natural”) es viable y fértil bajo las condiciones de laboratorio⁴⁰.

5.7.3 Análisis de la microinyección de dsRNA de APN en huevos

Se hicieron nuevas microinyecciones con dsRNA de APN (100 nl de dsRNA = 400ng), ahora empleando huevos de *M. sexta*.

En la tabla 12 se representa el número de huevos microinyectados y el número de individuos sobrevivientes en L2.

Tabla 12. Relación del número de huevos microinyectados con dsRNA de APN y número de sobrevivientes

Sustancia microinyectada	Estadio de la microinyección	Nº de individuos microinyectados	Nº de individuos sobrevivientes	Estadio de disección
H ₂ O	Huevo	60	29	L2 y L3
dsRNA-APN	Huevo	60	26	L2 y L3

De los huevos microinyectados con dsRNA de APN se disectó el intestino de dos larvas y de dos larvas control en L2 y se realizó la cuantificación de proteína, actividad específica de APN e inmunoblot para analizar la expresión de APN.

Como se observa en la figura 28 la actividad de APN registrada por las dos larvas control es más del 60% mayor que la que presentan las larvas previamente inyectadas con dsRNA de APN. Los datos de la actividad específica de APN se presentan en la tabla 13 adjunta, en ella se corrobora que la actividad de APN de las larvas con tratamiento de dsRNA de APN es menor que la de las larvas control.

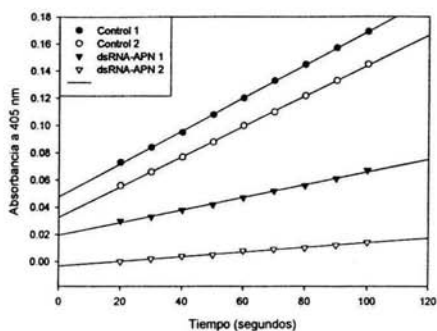


Figura 28. Representación gráfica de la actividad de APN en larvas L2 microinyectadas con dsRNA de APN en estadio de huevo.

Tabla 13. Datos de actividad específica de APN en larvas L2 de APN en estadio de huevo

Sustancia microinyectada	Actividad de APN (nmol min. ⁻¹ μg ⁻¹)	
	Larva 1	Larva 2
H ₂ O	368	408
dsRNA-APN	253	134

En la figura 29 se representa la gráfica de la actividad específica de APN de las larvas microinyectadas en huevo con dsRNA de APN y disectadas en L3. Se observa que una de las dos larvas tratadas con dsRNA de APN en huevo tiene una actividad de APN aproximadamente del 12% en comparación con las larvas control. Estos datos de actividad específica de APN se corroboran en la tabla 14 adjunta.

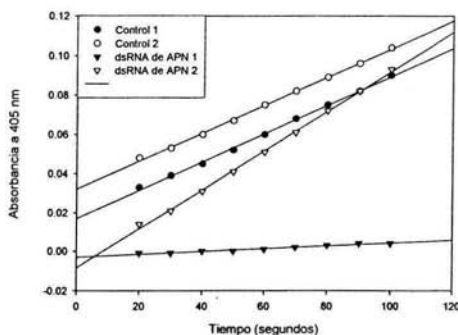


Figura 29. Representación gráfica de la actividad de APN en larvas L3 microinyectadas con dsRNA de APN en estadio de huevo.

Tabla 14. Datos de actividad específica de APN en larvas L3 de APN en estadio de huevo.

Sustancia microinyectada	Actividad de APN (nmol min. ⁻¹ μg ⁻¹)	
	Larva 1	Larva 2
H ₂ O	409	355
dsRNA-APN	51	376

Para análisis de la expresión de las proteínas en el SDS-PAGE (10 μg de proteína, en SDS-PAGE 9%) se corrió una muestra de vesículas de microvellosidad apical media de intestino de larvas L5, como control de la expresión de las proteínas Bt-R₁ y APN.

En el inmunoblot se identificó que una de las larvas en L2 y una de las dos larvas en L3 (Figura 30), no expresan APN. Estos datos corresponden con los de actividad específica de APN, es decir, en los casos en los que se obtiene una actividad específica de APN baja, no se detecta la expresión de la proteína en el inmunoblot. Además, en la figura 30 también se observa que la expresión de Bt-R₁ no se afectó.

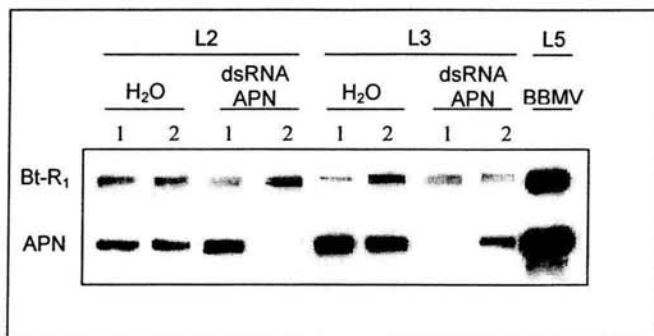


Figura 30. Inmunoblot (10 µg de proteína- SDS-PAGE 9%) para la identificación de la expresión de APN en larvas L2 y L3 microinyectadas en huevo con dsRNA de APN. Detección con anticuerpo anti- Bt-R₁ y anti-APN.

Por lo tanto, la microinyección de dsRNA de APN a huevos de *M. sexta*, si resultó en el silenciamiento de esta proteína, ya que el análisis de actividad específica de APN y el inmunoblot, revelaron que en larvas de segundo y tercer estadio de desarrollo la proteína APN no estaba presente. Por lo tanto hubo silenciamiento específico de la proteína. Sin embargo, el silenciamiento de APN resultó ser poco eficiente, ya que sólo el 50% de las larvas analizadas presento la proteína silenciada. Esto representa un problema en el análisis de la expresión porque se carece de un sistema de selección de las larvas que tuvieron silenciamiento de la proteína, de entre las que no lo presentaron.

En los ensayos de actividad específica de APN realizados a los homogenizados de intestino de larvas microinyectadas con dsRNA de APN (en estadio de huevo o larva L1 o L2) y que por inmunoblot se identificó el silenciamiento específico de APN, no presentaron una actividad específica de APN que fuera cero. Posiblemente esta actividad específica de APN, pudiera estar dada por la actividad de otras aminopeptidasas presentes en el intestino de estos individuos.

5.7.4 Análisis de la expresión de APN en la generación F1 de individuos microinyectados con dsRNA de APN en estadio de huevo

De los individuos que fueron microinyectadas con dsRNA de APN y con H₂O en estadio de huevo, se conservaron las larvas hasta el estadio adulto y se analizó la expresión de APN de la generación F1 en L2 (ver materiales y métodos).

Para este análisis, se designaron 23 larvas que eclosionaron de los huevos microinyectados con dsRNA de APN para obtener la segunda generación, de las cuales 12 larvas de 5^{to} estadio larvario llegaron al estadio de pupa y de las cuales sólo nacieron 6 individuos adultos. Es decir, hubo una eficiencia de 26% en la viabilidad de las larvas microinyectadas a la generación F1. Los huevos ovopositados por estos individuos se colectaron y se mantuvieron en las condiciones ambientales ya descritas en materiales y métodos, hasta obtener larvas en L2.

Se disectó el intestino de una larva control y tres de las larvas F1 (padres inyectados con dsRNA de APN). Se hizo el análisis de cuantificación de proteína, actividad específica de APN e inmunoblot para analizar la expresión de APN.

En la figura 31, se representa gráficamente la actividad de APN de las larvas disectadas en L2, claramente se observa que la actividad de una de las larvas F1 cuyos padres fueron inyectados con dsRNA de APN es menor que las de las larvas control. Estos datos van de acuerdo con los de actividad específica de APN que se presentan en la tabla 15 adjunta, en donde se corrobora una disminución ligeramente menor de la actividad específica de APN de la misma larva.

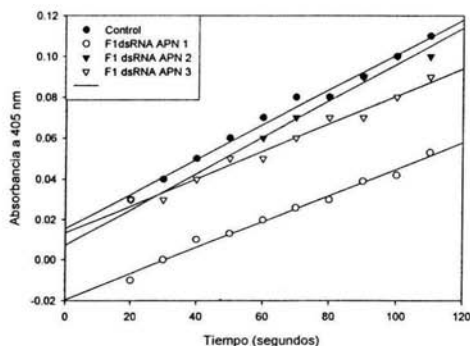


Figura 31. Actividad de APN de larvas F1 en L2 cuyos padres fueron tratados con dsRNA de APN

Tabla 15. Datos de actividad específica de APN en larvas F1 en L2 (padres microinyectados con dsRNA de APN en estadio de huevo).

Muestra de intestino de larva	Actividad de APN (nmol min. ⁻¹ µg ⁻¹)
H ₂ O	435
Larvas F1 de las microinyectadas con dsRNA de APN	272
	409
	356

Posteriormente, se realizó el análisis de la expresión de las proteínas por inmunoblot (10 µg de proteína, en SDS-PAGE 9%) representado en la figura 32. Se observa que la larva que tuvo una actividad específica de APN menor que la control, no presenta APN.

Por lo tanto este dato indica que el silenciamiento de la APN en la generación parental se mantuvo hasta la siguiente generación al menos en una de las larvas analizadas en L2. Esto posiblemente se debe a que la generación F1 pudiera ser una mezcla de larvas silenciadas y silvestres (es decir, de aquellas larvas microinyectadas con dsRNA pero que no presentaron silenciamiento de la proteína).

El resultado de este experimento muestra que el silenciamiento genético mediado por dsRNA es heredable, estable y puede ser potencialmente aplicado a varios organismos.

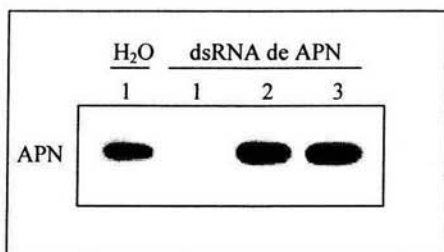


Figura 32. Inmunoblot (10 µg de proteína-SDS-PAGE 9%) para la identificación de la expresión de la proteína APN de larvas L2 cuyos padres fueron microinyectados con dsRNA de APN. Detección con anticuerpo anti-APN.

Hasta este momento los dsRNAs utilizados para las microinyecciones en huevos y larvas de *M. sexta*, fueron los fragmentos de dsRNA inicialmente diseñados para cada proteína. Sin embargo, la efectividad de silenciamiento fue muy baja (podríamos decir que aproximadamente del 30 al 50%). Por lo tanto, se decidió cortar esos RNAs a fragmentos pequeños de 22 pb empleando la endonucleasa DICER del estuche de generación de siRNAs (ver materiales y métodos) para realizar nuevas microinyecciones.

5.7.5 Microinyección de siRNA de Bt-R₁ y APN (digestión del dsRNA con la enzima DICER a fragmentos de 22 pb) en huevos

Los dsRNAs de Bt-R₁ y APN se cortaron en fragmentos pequeños de 22 pb (siRNAs), el tamaño de los dsRNAs se verificó en un gel de agarosa al 1%.

Por lo tanto, los fragmentos de RNA de doble cadena de Bt-R₁ y APN inicialmente sintetizados, también fueron cortados a RNAs interferentes pequeños de 22 pares de bases empleando la enzima DICER.

Posteriormente se microinyectaron huevos de *M. sexta* con y siRNA de Bt-R₁ y siRNA de APN. Se microinyectaron dos concentraciones diferentes de RNA (200 y 400 ng). En la tabla 16 se ordena el tipo y cantidad de siRNAs microinyectados, se presenta también el número de huevos eclosionados y se observa que es muy bajo, es decir, la viabilidad de los huevos microinyectados es muy baja.

Para analizar la expresión de las proteínas, se disectaron tres larvas en L2 de cada una de las condiciones y con el homogenizado de intestino se cuantificó la cantidad de proteína, se midió la actividad específica de APN y la señal de las proteínas por inmunoblot.

En el análisis de actividad específica de APN (no se muestran los datos), no se observó ninguna diferencia entre las larvas control con respecto a las tratadas con algún tipo de siRNA.

En la figura 33, se representa el inmunoblot para identificar la expresión de las proteínas Bt-R₁ y APN (10 µg de proteína en SDS-PSGE 9%). En el panel A, se observa que Bt-R₁ está presente en todas las larvas L2 analizadas, esto indica que no hubo silenciamiento específico. En el panel B de la misma figura se observa que APN también está presente en todas las larvas L2 analizadas. Por lo tanto, no hubo silenciamiento específico de ninguna de las dos proteínas.

Tabla 16. siRNAs microinyectados en huevos de *M. sexta*, número de huevos eclosionados y de larvas disectadas en L2.

Sustancia microinyectada	Volumen (nl)	Nº de huevos microinyectados	Nº de huevos eclosionados	Larvas disectadas en L2
H ₂ O	50	43	15	1
	100	33	8	1
siRNA de APN	50 (200 ng)	35	9	3
	100 (400 ng)	43	8	3
siRNA de Bt-R ₁	50 (200 ng)	45	7	3
	100 (400 ng)	44	6	3

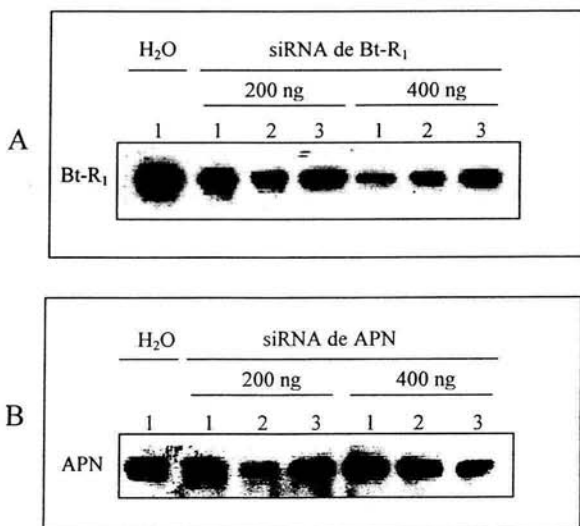


Figura 33. Inmunoblot (10 µg de proteína-SDS-PAGE 9%) para identificar la expresión de Bt-R₁ (Panel A, detección con anticuerpo anti- Bt-R₁) y APN (Panel B, detección con anticuerpo anti-APN) en larvas disectadas en L2 microinyectadas en huevo con siRNA de Bt-R₁ y siRNA de APN, respectivamente.

Para descartar la posibilidad de que los resultados negativos del silenciamiento de las proteínas hayan sido por la degradación del siRNA, se verificó el tamaño de las muestras de RNAs que fueron manipuladas y aquellas que no en un gel de agarosa al 3%. En este gel se observaron las bandas de 22 pb correspondientes al siRNA de cada proteína, lo que indica que no hubo degradación.

Por lo tanto, la microinyección de siRNA de Bt-R₁ y APN a huevos de *M. sexta*, no aumenta la eficiencia del silenciamiento de las proteínas Bt-R₁ y APN.

5.7.6 Microinyección de larvas L1 con dsRNA y siRNA de Bt-R₁ y APN y selección en placas con dieta más toxina Cry1Ab.

Se hicieron nuevas microinyecciones, ahora de los 4 tipos de RNAs (dsRNA de APN, siRNA de APN, dsRNA de Bt-R₁ y siRNA de Bt-R₁) en larvas L1 de *M. sexta* (100 nl = 400 ng).

Las larvas microinyectadas se alimentaron con una dieta a la que se le agregó una dosis de 400 ng/cm² de esporas-cristal de la toxina Cry1Ab (ver materiales y métodos y protocolo de preparación de esporas-cristal de la cepa Cry1Ab en el anexo 4), con el objetivo de seleccionar las larvas resistentes a la toxina ya que probablemente, gracias a la microinyección de los RNAs correspondientes, no tendrían Bt-R₁ o APN.

Se usó como control de estos bioensayos, larvas previamente inyectadas únicamente con agua.

Las larvas que sobrevivieron (después de siete días) a la dosis de toxina fueron disectadas. Con el homogenizado de intestino se cuantificó proteína, se analizó la actividad específica de APN y la señal de las proteínas por inmunoblot.

En la tabla 17 se muestran los datos de las microinyecciones; se observa que el número de larvas sobrevivientes al reto con esporas cristal de la toxina Cry1Ab fue muy bajo y que no existe gran diferencia entre el número de las larvas control sobrevivientes y las tratadas con algún tipo de dsRNA.

Tabla 17. Larvas microinyectadas en L1 con dsRNA y siRNA de APN y Bt-R₁ y selección con toxina Cry1Ab.

Sustancia microinyectada	Nº de larvas L1 microinyectadas	Nº de larvas sobrevivientes a 400 ng de toxina Cry1Ab	Nº de larvas disectadas
H ₂ O	40	8	2
dsRNA de Bt-R ₁	40	9	6
siRNA de Bt-R ₁	60	8	6
dsRNA de APN	60	12	10
siRNA de APN	60	6	6

De acuerdo a los datos del análisis de la actividad específica de APN de cada una de las larvas analizadas (no se muestran estos datos), las larvas tratadas con algún tipo de dsRNA no presentan diferencias notables con respecto a las larvas control.

Sin embargo, de acuerdo al análisis de inmunoblot para identificar la expresión de APN, de las once larvas disectadas (microinyectadas en L1 con dsRNA de APN y que sobrevivieron a la dosis de 400 ng/cm² de esporas-cristal de la toxina Cry1Ab), se observó el silenciamiento de APN en al menos cuatro de ellas (carriles 2, 3, 5 y 10 de la figura 34). Este resultado indica directamente que en esas larvas que sobrevivieron a la dosis con toxina Cry1Ab, la proteína APN está silenciada.

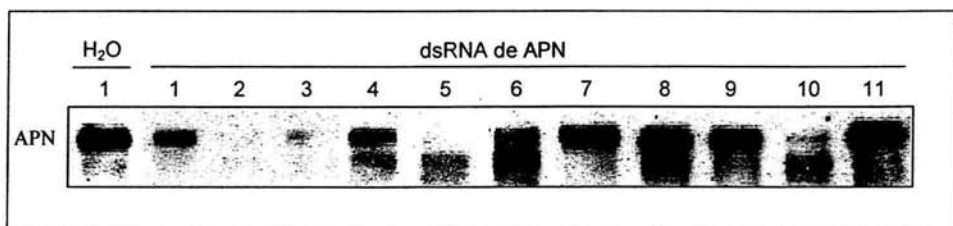


Figura 34. Inmunoblot (10 µg de proteína-SDS-PAGE 9%) para identificar la expresión de APN en larvas microinyectadas con dsRNA de APN en L1 y sobrevivientes al reto con toxina Cry1Ab. Detección con anticuerpo anti-APN.

En las larvas microinyectadas con siRNA de APN, no se identificó por inmunoblot ninguna que tuviera silenciamiento específico de APN (Figura 35).

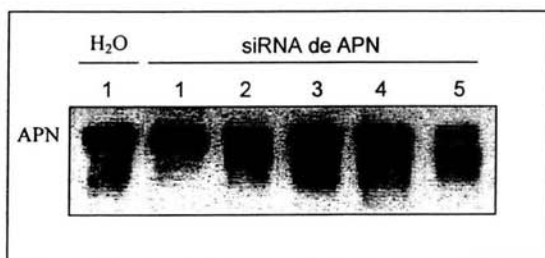


Figura 35. Inmunoblot (10 µg de proteína-SDS-PAGE 9%) para identificar la expresión de APN en larvas L2 microinyectadas con siRNA de APN en L1 y sobrevivientes al reto con toxina Cry1Ab. Detección con anticuerpo anti-APN.

El reto con toxina Cry1Ab al que se sometió a las larvas L1 microinyectadas con dsRNA y siRNA de APN, no funcionó correctamente. De acuerdo a datos de bioensayos previamente realizados con larvas L1 y diferentes dosis de toxina, se esperaba que con esa dosis de toxina (400 ng/cm²) se murieran todas las larvas control. Sin embargo, no hay una gran diferencia entre el número de larvas control sobrevivientes y las que fueron microinyectadas con algún tipo de dsRNA de APN. Por lo tanto, el reto con toxina no permitió seleccionar las larvas que tuvieran silenciada a la APN. Este resultado pudo estar dado por degradación de la proteína.

El silenciamiento de Bt-R₁ no pudo ser identificado por análisis de inmunoblot debido a que se agotó el lote del anticuerpo inicialmente utilizado y la nueva muestra presentó poca especificidad por Bt-R₁.

Finalmente, es importante analizar que la heterogeneidad del silenciamiento entre las larvas analizadas pudiera estar dada por la degradación de los dsRNAs microinyectados, por baja eficiencia de entrada del dsRNA a las células o por una nula selección de las larvas silenciadas.

Por ejemplo, en otros sistemas en los que se ha utilizado el silenciamiento de proteínas por la aplicación del mecanismo de RNAi, el silenciamiento de las proteínas blanco, también ha sido parcial.

En un análisis reportado por Déctor, *et al.* (2002) realizado con rotavirus, se lipofectó siRNA que corresponde al gen VP4 a células de riñón de mono y posteriormente se infectaron con el virus. Determinaron que una gran proporción de las células infectadas no tenían la proteína VP4 (volviéndose menos infecciosas) y también observaron disminución de la progenie viral. Sin embargo la eficiencia del silenciamiento de la proteína no fue del 100%, por análisis densitométrico, analizaron la señal producida por la proteína en inmunoblot, con anticuerpos específicos anti-VP4, y determinaron que la síntesis de la proteína se redujo 75%. Además, con estudios de fluorescencia se cuantificó el número de partículas virales para analizar la eficiencia de lipofección. Se determinó que en células lipofectadas con siRNA de VP4, la progenie viral se redujo al 75% con respecto al control.

La eficiencia del silenciamiento, pudiera también depender del ciclo de vida del organismo que se analiza y relacionarse con el grado de traducción del mRNA. Es decir, si el mensajero de Bt-R₁⁴¹ y APN se producen en grandes cantidades que incluso van en aumento conforme se avanza en el desarrollo larvario, entonces el mecanismo de silenciamiento de las proteínas debe ser más rápido y eficiente. Con respecto a esto, Dykxhoorn, Novina y Sharp (2003) en su última revisión documentan que el silenciamiento de una proteína está determinado por el crecimiento celular y la dilución del dsRNA bajo un nivel de umbral crucial que es necesario para mantener la inhibición de la expresión del gen. Sin embargo, hay que considerar que una sola molécula de siRNA puede dirigir múltiples rondas de corte del mRNA³⁰ en el proceso de amplificación del silenciamiento.

5.7.7 Microinyección de huevos y larvas en L1 y L2 con dsRNA de InsA

Se hicieron repetidas microinyecciones de huevos y larvas en estadio de desarrollo L1 y L2 con diferentes concentraciones de dsRNA de InsA para silenciar las proteínas que le dan el color a las larvas de *M. sexta*.

Se esperaba obtener larvas afectadas en el color, y posteriormente microinyectar simultáneamente (co-inyectar)⁴⁵ los RNAs de InsA y Bt-R₁ o de InsA y APN, para seleccionar fenotípicamente aquellas larvas en las que ocurriera silenciamiento de Bt-R₁ o APN.

En la tabla 18 se observa la relación del número de individuos microinyectados con dsRNA de InsA y el número de individuos sobrevivientes a la microinyección en el siguiente estadio de desarrollo. Como control de eclosión, se designó un número de huevos sin ningún tratamiento igual al de los huevos microinyectados. En la tabla, se observa que el número de huevos microinyectados que eclosionaron fue similar al de los huevos sin ningún tratamiento y que el número de huevos microinyectados con H₂O que eclosionaron, fue similar al de los inyectados con dsRNA de InsA. Por lo tanto, la viabilidad de los huevos eclosionados no se ve modificada por la microinyección de dsRNAs.

Tabla 18. Huevos y larvas L1 y L2 microinyectadas con dsRNA de InsA

Muestra microinyectada	Instar de desarrollo	Volumen (nl)	Nº de individuos microinyectados	Nº de larvas eclosionadas sobrevivientes
Control de eclosión	Huevo	---	60	17
H ₂ O	Huevo	100	60	13
dsRNA de InsA	Huevo	100 (200 ng)	60	15
dsRNA de InsA	Huevo	100 (400 ng)	60	18
Control de eclosión	Huevo	---	60	17
H ₂ O	Huevo	100	60	16
dsRNA de InsA	Huevo	100 (200 ng)	60	17
dsRNA de InsA	Huevo	100 (400 ng)	60	15
dsRNA de InsA	Huevo	100 (800 ng)	60	14
dsRNA de InsA	L1	100 (200 ng)	60	34
dsRNA de InsA	L1	100 (400 ng)	60	35
dsRNA de InsA	L1	100 (800 ng)	40	26
dsRNA de InsA	L1	150 (1.2 µg)	40	23
dsRNA de InsA	L1	200 (1.6 µg)	40	22
dsRNA de InsA	L2	100 (800 ng)	40	33
dsRNA de InsA	L2	150 (1.2 µg)	40	31
dsRNA de InsA	L2	200 (1.6 µg)	40	30

Los individuos microinyectados con dsRNA de InsA se mantuvieron en observación hasta el quinto instar de desarrollo, se alimentaron con dieta artificial bajo las condiciones del insectario ya descritas en materiales y métodos.

Finalmente, no se observó ningún cambio significativo en la coloración de las larvas microinyectadas con dsRNA de InsA.

Por lo tanto, la microinyección de dsRNA de InsA en huevos y larvas de *M. sexta*, no resultó en un fenotipo claro que permitiera la selección de las larvas en las que ocurrió silenciamiento de esta proteína. Posiblemente porque la coloración se mantuvo debido a la expresión de otras isoformas de esta proteína, o porque solamente se silenció una de las dos isoformas más importantes de la proteína, ya sea la A o la B.

La coloración de las larvas de *M. sexta* está dada por la expresión de varias isoformas de la insecticianina, en donde además de la isoforma A y la B (producto de duplicación génica) que son las más importantes, se presentan otras isoformas.

Por lo tanto, a pesar de que se hayan silenciado las dos isoformas principales de la insecticianina (A y B, a las que iba dirigido el dsRNA microinyectado), pudiera ser que baste la presencia de al menos una de las demás isoformas que no fueron silenciadas para dar la coloración a las larvas; por esta razón la microinyección del dsRNA de InsA no afectó la coloración.

Otra opción, es que posiblemente el dsRNA de InsA microinyectado, únicamente afectó la expresión de una de las isoformas de la proteína, por lo tanto la coloración de las larvas no se vio afectada porque se expresó la otra isoforma importante de esa proteína.

A este respecto, se requiere explicar que cuando se diseñaron los oligos que serían empleados para amplificar una región de DNA de la insecticianina A y de la B, se eligieron regiones que fueran conservadas en ambas secuencias. El fragmento amplificado por PCR (de 324 pb) se clonó en el vector pLITMUS 38i. De las clonas obtenidas, probablemente el 50% era con el fragmento del gen de la insecticianina A y 50% con el fragmento de la insecticianina B. Entonces, después de la transformación, el 50% de las colonias transformantes probablemente tuvieron el inserto que corresponde a la isoforma A y el resto el de la B. Por lo tanto, cuando se eligió una colonia que tuviera el vector con el inserto, no sabemos si elegimos el de la isoforma A o el de la B. Sin embargo, se esperaba que los dsRNAs sintetizados *in vitro* a partir de ese DNA templado, al entrar a las células y ser digeridos por DICER generarían moléculas de siRNAs que tendrían una secuencia homóloga a la de ambos mRNAs (tanto de Ins-A como de Ins-B), por lo que los dos genes serían silenciados.

Es importante destacar que el mecanismo de silenciamiento de RNAi es tan específico que a pesar de la posibilidad de ocurrencia de lo anteriormente expuesto, los siRNAs generados por DICER en el interior de la célula, solamente afectaron el RNAm de una de esas dos proteínas y dicho silenciamiento no fue suficiente para observar fenotípicamente el cambio en la coloración de las larvas.

6.0 Conclusiones

Se obtuvo silenciamiento específico de la proteína Bt-R₁ en larvas de segundo estadio de desarrollo microinyectadas con dsRNA de Bt-R₁ en estadio de huevo.

El silenciamiento de la proteína Bt-R1 no se mantuvo hasta la generación F1.

Se obtuvo silenciamiento específico de la proteína APN en larvas de segundo y tercer estadio de desarrollo, microinyectadas con dsRNA de APN en huevo

El silenciamiento de la proteína APN se mantuvo hasta la generación F1 por lo tanto, con estos resultados podemos decir que el silenciamiento genético mediado por dsRNA es heredable, estable y puede ser potencialmente aplicado a varios organismos.

La microinyección de siRNAs en larvas en primer estadio de desarrollo no aumenta la eficiencia en el silenciamiento de las proteínas Bt-R₁ y APN.

No se identificó diferencia en el silenciamiento con respecto al estadio de microinyección de los dsRNAs en individuos de *M. sexta*.

Sin embargo, la población de larvas microinyectadas con algún tipo de dsRNA, no se silenció homogéneamente al 100%. La eficiencia de silenciamiento obtenida fue aproximadamente del 50%. Esto representa un problema en el análisis de la expresión porque se carece de un sistema de selección de las larvas que tuvieron silenciamiento de la proteína, de entre las que no lo presentaron.

La microinyección de dsRNA de InsA, no resultó en una coloración diferente de las larvas que pudiera ser identificada fenotípicamente para atribuir el silenciamiento de la proteína insecticiana al efecto del dsRNA.

Finalmente, la inhibición de la expresión genética por dsRNA, ofrece el potencial para analizar la función de diferentes genes y proteínas de una gran variedad de organismos como en el caso de *M. sexta*, siempre y cuando se desarrolle el método eficiente para administrar *in vivo* los dsRNAs y para su análisis.

7.0 Perspectivas

Optimizar la selección de larvas silenciadas

Aplicar nuevamente la selección de las larvas que tengan silenciamiento de Bt-R₁ y APN con el reto de toxina Cry1Ab, utilizando concentraciones mayores de toxina en donde se muera el 100% de las larvas control.

Buscar otra proteína que nos permita hacer una selección fenotípica clara de las larvas en las que hubo silenciamiento de Bt-R₁ y APN y que no afecte la sobrevivencia del insecto.

Optimizar la entrada del dsRNA

Microinyectar el dsRNA envuelto en liposomas (vesículas de lípidos que se fusionan con la membrana celular)^{4, 45}. Este método, sin embargo, tiene varias desventajas, incluyendo el hecho de que la eficiencia de lipofección, es decir el número de células a las que se introduce el dsRNA, es relativamente bajo y variable.

Estudiar el efecto del silenciamiento de Bt-R₁ y APN alimentando a las larvas o suplementando la dieta con el dsRNA específico para estas proteínas, tal como se ha hecho para el nemátodo *Caenorhabditis elegans*⁴.

Analizar la posibilidad de utilizar un virus de RNA como vector para insertar el dsRNA al insecto⁴. Diferentes grupos han reportado el uso de retrovirus como vector para liberar los siRNAs a las células. Se han usado dos tipos de retrovirus como sistemas de liberación de genes: los vectores de oncoretrovirus basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV) o el virus de células troncales murinas (MSCV), y los lentivirus que son derivados del virus 1 de la inmunodeficiencia humana (HIV-1)^{31, 45}.

Estudiar el efecto del silenciamiento alimentando las larvas de *M. sexta* con bacterias *E. coli* que expresen el dsRNA a partir de un plásmido o en forma de precursores de miRNAs con estructura de tallo-asa^{4, 30}.

Para la transfección de siRNAs sintetizados químicamente a la célula, diferentes grupos han desarrollado vectores de DNA que expresen substratos que puedan ser convertidos en siRNAs *in vivo*⁴⁵.

Las ventajas de este sistema de acuerdo al análisis realizado por Dykxhoorn, Novina, y Sharp (2003), es que el DNA plasmídico puede ser regenerado, la duración del silenciamiento se puede extender. A diferencia de la transfección de dsRNA que funciona en algunos casos con un silenciamiento pasajero y que puede no funcionar en genes que codifican proteínas con una vida media larga, el silenciamiento basado en plásmidos es la mejor opción.

Sin embargo, la transfección del dsRNA en líneas celulares es más eficiente que la transfección de DNA plasmídico, además, con la transfección de dsRNA el silenciamiento genético se da en un mayor número de células. Se sabe también que la iniciación del silenciamiento en células transfectadas con dsRNA es inmediata y las estrategias basadas

en plásmidos requieren transcripción y en el caso de RNA con estructura de tallo-asa, requiere del procesamiento de DICER⁴⁵.

Anexo 1

Protocolo para purificación de DNA

La purificación del DNA se hizo bajo el protocolo del kit para purificación de productos de PCR (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany) de 100pb a 10 Kb.

El sistema QIAquick combina la tecnología de una columna para centrifugación, con las propiedades de unión selectiva de una membrana de silica-gel. Las soluciones amortiguadoras especiales permiten optimizar la recuperación eficiente del DNA (ya sea a partir de una solución acuosa o de gel de agarosa) y remover los contaminantes. El DNA es absorbido por la membrana de silica-gel en presencia de un alto contenido de sal y los contaminantes pasan a través de la columna (a cada columna se pueden unir hasta 10 µg de DNA), después las impurezas se lavan eficientemente y el DNA puro se eluye con buffer Tris o agua. La absorción del DNA a la membrana de silica-gel también depende del pH. Típicamente la absorción es del 95% si el pH es ≤ 7.5 , y se reduce drásticamente si el pH es más alto

En 1 tubo eppendorf de 1.5ml y de acuerdo al volumen de la muestra, se agregó el equivalente a 5 volúmenes de Buffer de unión (hidrocloruro de guanidina e isopropanol). Se mezcló y se decantó en la columna (con la membrana de silica-gel), se centrifugó a 14,000 rpm (revoluciones por minuto) de 30 a 60 seg., el contenedor de la columna se descargó (decantando el volumen centrifugado). Se agregó a la columna 750 µl de Buffer de lavado (contiene etanol) y se centrifugó de 30-60 seg. La columna se descargó y se centrifugó 2 min. más para eliminar los restos de etanol. Posteriormente la columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml limpio, se agregaron 50 µl de Buffer de elusión (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5) en el centro de la columna, se incubó 4 min. y se centrifugó 1 min. (opcionalmente, se repitió el paso de elusión con 30 µl más del buffer).

Anexo 2

Protocolo para la purificación de DNA (plásmidos) a partir de cultivos en medio LB líquido

El volumen de cultivo se decantó en un tubo eppendorf de 1.5 ml o falcon de 50 ml, se centrifugó a 14,000 rpm, durante 10 min. y se decantó el sobrenadante. Se agregaron 250 µl del reactivo P1 (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; EDTA 10 mM; RNasa A 100 µg/ml) para resuspender la pastilla. Se agregaron 250 µl del reactivo P2 (NaOH 0.2 M y SDS al 1%) para lisar las células, el tubo se mezcló y se incubó 4 min. Se agregaron 350 µl del reactivo N3 (Acetato de potasio 1.32 M, pH 4.8) para neutralizar la reacción, se mezcló y se incubó 4 min. Se centrifugó a 14,000 rpm 10min. El sobrenadante se pasó a la columna (decantando o con la pipeta) y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 1 min. La columna se decantó y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min. Se decantó la columna [Opcional: Agregar 500 µl de PB (para lavar la columna) y centrifugar de 30-60 seg.]. Se

agregaron 750 μ l del buffer PE (Acetato de potasio 80 mM; Tris-HCl 8.3 mM, pH 7.5; EDTA 40 μ M) para lavar y se incubó 2 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min., nuevamente se la columna se decantó y se repitió la centrifugación. Finalmente la columna se pasó a un tubo eppendorf nuevo y se incubó a 42°C por 5 min. para eliminar el etanol y después se agregaron 35 μ l del buffer EB (Tris-Cl, pH 8.5) para eluir el DNA y se incubó 4 min., se centrifugó a 14,000 rpm por 30 seg. El paso de la elusión se repitió con 40 μ l de buffer EB. El DNA se almacenó a 4°C.

Anexo 3

Preparación de células competentes con CaCl₂

Para la preparación de células competentes por CaCl₂ se prepararon las siguientes soluciones:

CaCl₂ 500 mM 100ml (7.35g CaCl₂ aforar con H₂O a 100ml) = SOL. 1

CaCl₂ 50 mM (180ml H₂O +20ml SOL.1) = SOL. 2

CaCl₂ 50 mM- 20% glicerol 50ml (35ml H₂O + 5ml SOL.1 +10ml glicerol) = SOL. 3

Las tres soluciones se esterilizaron y se preenfriaron en hielo.

Se preparó un precultivo de la cepa E. coli T10 F'; en 3ml de medio LB líquido y tetraciclina (10ug/ml) se agrego una asada de cepa y se incubo toda la noche a 37°C con agitación de 250 rpm.

En un matraz erlenmayer de 250 ml con 100 ml de medio LB líquido, se inoculo 1ml de precultivo y se incubo 3 h a 37°C con agitación de 250 rpm.

Para la recuperación de la biomasa de células del precultivo, se preenfriaron los matraces y los tubos de centrifuga (rotor JA20) en hielo. El volumen del precultivo se distribuyo en los tubos de centrifuga y se centrifugó 5 min. a 4,000 rpm. La pastilla se resuspendió en 75 ml de la SOL. 2, se incubo a 4°C durante 20 min. Se centrifugo durante 5 min. a 4,000 rpm. La pastilla (que corresponda a 100 ml de cultivo) se resuspendió en 1ml de SOL. 3. se hicieron alícuotas de 100 μ l de las células recuperadas en tubos eppendorf (preenfriados) y se almacenaron a -70°C.

Anexo 4

Purificación de esporas-cristales de proteínas Cry

Se creció la cepa que expresa la toxina Cry1Ab en medio de cultivo HCT sólido con ampicilina (100 μ g/ml) a 30°C toda la noche. La cepa se resembró en medio de cultivo HCT líquido y se incubo a 30°C con agitación a 250 rpm hasta que el cultivo este en la fase de esporulación (de 3 a 4 días).

El cultivo celular se recupero por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. la biomasa que se obtuvo se resuspendió en NaCl 0.4 M + EDTA 0.01 M, pH 8.0 y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min.; el proceso de lavado se repitió 3 veces. Finalmente la pastilla se resuspendió en un volumen de 1 a 5 ml de agua.

8.0 Referencias:

1. Donze, O. and Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.* **30** (10): e46.
2. Carmichael, G. G. (2002). Medicine: Silencing viruses with RNA. *Nature.* **418**:379-80.
3. Bass, B. L. (2001) RNA interference. The short answer. *Nature.* **411**(6836):428-9.
4. Hannon, G. J. (2002) RNA interference. *Nature.* **418**(6894):244-51.
5. Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P. and Bhatnagar, R.K. (2002) Silencing of midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.* **277**(49):46849-51.
6. Caplen, N. J., Fleenor, J., Fire, A. and Morgan, A. R. (2000) dsRNA-mediated gene silencing in culture *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference, *Int. J. Genes.* **252**(1-2):95-105
7. Malhotra, P., Dasaradhi, P., Kumar, A., Mohamed, A., Agrawal, N., Bhatnagar, R. K. and Chauhan, V. S. (2002) Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and-2) of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.* **45**(5):1245-54.
8. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, KL., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, RH., Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell.* **107**(4):465-76.
9. Miranda, R., Muñoz, G. C., Sánchez, J., Morera, C., Cabrera, L., Zhuang, M., Gill, S. S., Soberón, M. and Bravo, A. Active role of *Manduca sexta* Aminopeptidase N in driving the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to plasma membrane microdomains, Sometido a FEBS Letters.
10. Agrawal, N, Malhotra, P. and Bhatnagar, R. K. (2002). Interaction of gene cloned and insect cell expressed Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Applied. Env. Microbiol.* **68**(9):4583-92.
11. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** (1): 156-9.
12. Fire, A. 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genetics.* (15)9:358-63.
13. Knight, P. J. K., Knowles, B. H. and Ellar, D. 1995. Molecular cloning of an insect Aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) toxin. *J. Biol. Chem.* **270**(30):17765-70.
14. Candas, M., Francis, B. R., Griko, N. B., Midboe, E. G., Bulla, L. A. Jr. (2002). Proteolytic cleavage of the developmentally important cadherin Bt-R₁ in the midgut epithelium of *Manduca sexta*. *Biochemistry.* **41**(46): 13717-24.
15. Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H., Bulla, L. A. Jr. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**(10), 5490-4.
16. Keeton, T. P., and Bulla, L. A. Jr. (1997). Ligand specificity and affinity of BT-R₁, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *App. Env. Microbiol.* **63**(9):3419-25.

17. Denolf, P., Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J. (1997). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut Aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **248**(3):748-61.
18. Saito, H., Shimoda, M. (1997). Insecticyanin of *Agrius convolvuli*: purification and characterization of the biliverdin-binding protein from the larval hemolymph. *Zool Sci.* **14**(5): 777-83.
19. Kang, Y. Ziegler, R., van Antwerpen, R., Law, J. H. (1997). Characterization of the solubilized oocyte membrane receptor for insecticyanin, a biliprotein of the hawkmoth, *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1324**(2): 285-95.
20. Kang, Y., Kulakosky, P. C., van Antwerpen, R., Law, J. H. (1995). Secuestation of insecticyanin, a blue hemolymph protein, into the egg of the hawkmoth, *Manduca sexta*. Evidence for receptor-mediated endocytosis. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **25**(4):503-10.
21. Li, WC, Riddiford, LM. (1994). The two duplicated insecticyanin genes, ins-a and ina-b are differentially expressed in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Nucleic Acids Res.* **22**(15):2945-50.
22. Schmidt, FS., Skerra, A. (1994). The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur. J. Biochem.* **219**(3):855-63.
23. Holden, H. M., Rypniewski, W. R., Law, J. H., Rayment, I. (1987). The molecular structure of insecticyanin from the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. at 2.6 Å resolution. *Embo J.* **6**(6):1565-70.
24. Li, W., Riddiford, LM. (1992). Two distinct genes encode two major isoelectric forms of insecticyanin in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Eur. J. Biochem.* **205**(2):491-9.
25. Riddiford, L. M., Palli, S.R., Hiruma, K., Li, W., Green, J., Hice, R. H., Wolfgang, W. J., Webb, B. A. (1990). Developmental expression, synthesis, and secretion of insecticyanin by the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **14**(3):171-90.
26. Plasterk, R. H. (2002). RNA silencing: The genome's Immune system. *Science.* **296**(5571):1263-5.
27. de Maagd, R., Bravo, A. y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genet.* **17**(4):193-9.
28. Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **62**(3):775-806.
29. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. G., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* **409**:363-6.
30. Zamore, P. D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science.* **296**:1265-9.
31. Ahlquist, P. (2002). RNA-Dependent RNA Polymerases, Viruses, and RNA Silencing. *Science.* **296**:1270-3.
32. Caplen, N. J. (2002). A new approach to the inhibition of gene expression. *TRENDS in Biotech.* (20)2:49-51.

33. Hutvagner, G. and Zamore, P. D. (2002). A micro RNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. **297**:2056-60.
34. Ambros, V. (2001). microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell*. **107**:823-6.
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-75.
36. Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* **100**, 201-20.
37. de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet.* **37**:409-33.
38. Sangadala, S., Walters, F. S., English, L. H., Adang, M. J. (1993). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K⁺ efflux in vitro. *J. Biol Chem.* **269**(13):10088-92.
39. Vadlamudi, R. K., Ji, T. H., Bulla, L. A. Jr. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. berliner. *J Biol Chem.* **268**(17):12334-40.
40. Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D. G. (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. **293**: 857-60.
41. Medboe, E. G., Candas, L. and Bulla, Jr. (2003). Expression of a midgut-specific cadherin Bt-R₁ during the development of *Manduca sexta* larva. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* **135**: 125-37.
42. 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**: 242-6.
43. Déctor, MA., Romero, P. López, S., Arias, CF. (2002). Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep.* **3**(12):1175-80.
44. Hua, G, Tsukamoto K, Taguchi R, Tomita M, Miyajima S, Ikezawa H. (1998). Characterization of aminopeptidase N from the brush border membrane of the larvae midgut of silkworm, *Bombyx mori* as a zinc enzyme. *Biochem Biophys Acta.* **1383**:301-10.
45. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**(6):457-67.
46. Rausell C, Garcia-Robles I, Sanchez J, Munoz-Garay C, Martinez-Ramirez AC, Real MD, Bravo A. (2004). Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochem. Biophys Acta.* **1660**(1-2):99-105.
47. Rausell C, Munoz-Garay C, Miranda-CassoLuengo R, Gomez I, Rudino-Pinera E, Soberon M, Bravo A. (2004). Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. *Biochemistry.* **43**(1):166-74.
48. Li, WC. Riddiford, LM. (1996). Differential expression of the two duplicated Insecticynin genes, ins-a and ins-b, in the black mutant of *Manduca sexta*. *Archiv. Biochem. Biophys.* **300**(1):65-70.
49. Collier, RJ., Young, JA. (2003). Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**:45-70.

50. Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, SH., van der Goot, FG. (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol.* **160**(3):321-8.
51. Gomez I, Sanchez J, Miranda R, Bravo A, Soberon M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**(2-3):242-6.
52. Williams, RW. and Rubin, GM. (2002). Argonaute 1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *PNAS.* **99**(10):6889-94.
53. Burton, S. L., Ellar, D. J., Li, J. and Derbyshire, D. J. (1999). N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain III lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J Mol Biol.* **287**(5):1011-22.
54. Keeton, T. P. and Bulla, L. A. Jr. (1997). Ligand specificity and affinity of BT-R1, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *Appl Environ Microbiol.* **63**(9):3419-25.
55. Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH.(1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**(3):807-13.
56. López, S and Arias, CF. (2004). Preface. *Virus research.* **102**(1):1-2.
57. Banks, D. J., Hua, G. and Adang, M. J. (2003). Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kda aminopeptidaseN and expression in *Drosophila* S2 cells. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **33**: 499-508.
58. Cullen, B. R. (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus research.* **102**(1):3-9.