

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Papel secuencial de Bt-R₁ y Aminopeptidasa N en el mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*”.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE.
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA:

Idalia López Gorostieta

**Directora de tesis:
Dra. Alejandra Bravo de la Parra**

Jurado de examen:
Dr. Gerardo Corzo Burguete
Dra. Georgina Garza Ramos
Dr. Arturo Guevara García
Dr. Ernesto Méndez Salinas,

Cuernavaca, Mor.

Octubre de 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo:

Como la culminación de un gran esfuerzo y esmero y con todo el amor y respeto que se merecen, a mis Padres.

A mis hermanos, con mucho cariño. Especialmente a Lili y a Laura por estar a mi lado siempre.

Con la alegría de haber dado un paso adelante, a mis amigos. Especialmente a May por su compañía y apoyo incondicional.

A todas las personas que intervinieron en algún momento en mi vida, para ayudarme a lograr mis objetivos.

Agradezco:

Inmensamente, a la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, por el tiempo y espacio brindado para trabajar y aprender a su lado, sobre todo por su confianza y apoyo. Gracias por entenderme y por todo, te aprecio mucho Ale.

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

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

A los integrantes de mi comité tutorial de tesis: Dra. Susana López Carretón y Dr. Humberto Lanz Mendoza por sus valiosos comentarios a lo largo del desarrollo de mi proyecto.

A mi jurado de examen de grado: Dr. Gerardo Corzo Burguete, Dra. Georgina Garza Ramos, Dr. Arturo Guevara García y Dr. Ernesto Méndez Salinas, por sus valiosas discusiones y comentarios para terminar con éxito este trabajo.

A todos mis compañeros por haber hecho divertida mi estancia en el laboratorio durante todo este tiempo. Especialmente a Claudita, a Liz, a Nuria, a Luisa, a Liliana y a Ángeles por su cariño y amistad. A Ivan por los buenos momentos compartidos y a Christopher por sus ocurrencias y consejos.

A Chela, Sergio y Alex cuya ayuda y presencia siempre fue muy valiosa.

A Carlos sin necesidad de palabras.

“Papel secuencial de Bt-R₁ y Aminopeptidasa N en el mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*”.

Este trabajo se desarrollo en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Idalia López Gorostieta

ÍNDICE	Página
LISTA DE ABREVIATURAS -----	1
ÍNDICE DE FIGURAS -----	3
ÍNDICE DE TABLAS -----	4
1.0 RESUMEN -----	5
2.0 INTRODUCCIÓN -----	7
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> -----	7
2.2 Toxinas Cry-----	8
• Estructura de las toxinas Cry-----	11
2.3 Moléculas receptoras de toxinas Cry en insectos susceptibles-----	12
• Aminopeptidasa N-----	12
• Caderina (Bt-R ₁)-----	18
• Fosfatasa alcalina (ALP)-----	20
2.4 Mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry-----	21
3.0 ANTECEDENTES PARTICULARES	
3.1 Interferencia por RNA-----	23
3.2 Interferencia por RNA en insectos-----	24
3.4 <i>Manduca sexta</i> como modelo de estudio para análisis del mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry-----	25
• Taxonomía-----	25
• Características generales-----	25
• Ciclo de vida-----	26
• Distribución-----	26
• Daños al ambiente-----	26
4.0 HIPÓTESIS -----	27
5.0 OBJETIVO -----	27
6.0 OBJETIVOS PARTICULARES -----	27
7.0 MATERIALES Y MÉTODOS -----	28
7.1 Insectos y aislamiento de intestinos-----	28
7.2 Aislamiento del RNA total-----	28
7.3 Purificación de esporas-cristal de toxinas Cry1Ab y Cry1Ac-----	28
7.4 Purificación de cristales por gradiente discontinuo de sacarosa-----	29
7.5 Solubilización de cristales-----	29
7.6 Activación de Protoxina-----	29
7.7 Purificación de VMMA´s sin inhibidores de proteasas-----	30
7.8 Ensayo de cuantificación de proteína-----	30
7.9 Ensayo de actividad específica para APN-----	30
7.10 Ensayo de actividad específica para Fosfatasa alcalina -----	31
7.11 Ensayo de corte de GPI de APN con PI-PLC en VMMA´s-----	31
7.12 Purificación de rafts de VMMA´s por gradiente de Opti-Prep-----	31

7.13	Inmunoblot (Western-blot)	32
7.14	Ensayo de unión de ligando (Ligand-blot)	32
7.15	Diseño de oligonucleótidos	33
7.16	RT-PCR	33
7.17	PCR	33
7.18	Clonación	33
7.19	Transformación	34
7.20	Síntesis de RNA de doble cadena	34
7.21	Inyección de dsRNA a huevos, larvas, pupas y mariposas de <i>Manduca sexta</i>	35
7.22	Ensayo <i>in vivo</i> con toxina Cry1Ab en larvas con tratamiento de dsRNA de Bt-R ₁ y APN	36
7.23	Análisis de expresión de Bt-R ₁ y APN en larvas tratadas con dsRNA	37
8.0	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1	Análisis del papel de Bt-R ₁ y APN1 en la toxicidad de Cry1Ab	38
A.	Inyección de dsRNA de Bt-R ₁ y APN1 en huevos de <i>M. sexta</i>	46
B.	Análisis de la inyección de dsRNA de APN1 en larvas L1 de <i>M. sexta</i>	47
C.	Análisis de la inyección de dsRNA de Bt-R ₁ en larvas de <i>M. sexta</i>	49
D.	Análisis de la inyección de dsRNA de Bt-R ₁ en pupas hembras de <i>M. sexta</i>	52
E.	Análisis de la inyección de dsRNA de Bt-R ₁ en hembras adultas de <i>M. sexta</i>	54
8.2	Liberación de APN de VMMA's mediante tratamiento con PI-PLC y análisis de unión de la toxina Cry1Ab	56
8.3	Análisis de la participación secuencial de Bt-R ₁ y APN1 en el mecanismo de toxicidad de Cry1Ab	58
A.	Unión de la toxina Cry1Ab a VMMA's sin tratamiento y tratadas con PI-PLC y su localización en membrana insoluble o soluble	58
B.	Unión de toxina y su localización en membrana insoluble o soluble al inhibir su unión con APN por competencia con APN soluble	59
C.	Unión de toxina y su localización en membrana insoluble o soluble al inhibir su unión con APN con anticuerpo anti-APN	60
D.	Unión de toxina y su localización en microdominios de membrana al inhibir su unión con Bt-R ₁ con péptidos sintéticos del Dominio II de Cry1Ab o anticuerpo anti-Bt-R ₁	62
9.0	CONCLUSIONES	64
10.0	ANEXO 1	66
	ANEXO 2	66
	ANEXO 3	67
	ANEXO 4	68
11.0	REFERENCIAS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

anti-Bt-R ₁	Anticuerpo policlonal específico para Bt-R ₁
anti-APN1	Anticuerpo policlonal específico para APN
anti- VMMA´s	Anticuerpo policlonal específico para proteínas de VMMA´s
APN	Aminopectidasa N
ALP	Fosfatasa Alcalina
APNs	Aminopectidasas N
APN1	Isoforma 1 de Aminopectidasa N
APN2	Isoforma 2 de Aminopectidasa N
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt-R ₁	Caderina de <i>Manduca sexta</i>
Bt-R ₁₇₅	Caderina de <i>Bombix mori</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
COS-7	Línea celular desarrollada a partir de riñón de mono verde africano
DICER	Complejo enzimático de endonucleasa, miembro de la familia de las RNAsas tipo III
dsRNA	RNA de doble cadena
Ej.	Ejemplo
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
HEK-293	Línea celular desarrollada de riñón de embrión humano
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
K _D	Constante de disociación aparente
LB	Medio de cultivo Luria-Bertanni
L4	Larvas de <i>M. sexta</i> de cuarto estadio de desarrollo
L1	Larvas de <i>M. sexta</i> primer estadio de desarrollo
L3	Larvas de <i>M. sexta</i> tercer estadio de desarrollo
L5	Larvas de <i>M. sexta</i> de quinto estadio de desarrollo
miRNA	Fragmento de dsRNA de 21 nt procesado a partir del pre-miRNA
MPM	Marcador de peso molecular
nt	Nucleótidos
Sf21	Línea celular derivada de ovario de pupa de <i>S. frugiperda</i>
Sf9	Línea celular derivada de ovario de pupa de <i>S. frugiperda</i>
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos 1X, pH 7.2
PI-PLC	Fosfolipasa C de corte específico para GPI
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
pre-miRNAs	Estructuras tallo-asa aproximadamente de 70 nt de RNA
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA,
RdRP	RNA polimerasa dirigida por RNA
rpm	Revoluciones por minuto
RNAi	Proceso de interferencia por RNA
RNA _m	RNA mensajero
SAPO	Estreptavidina acoplada a peroxidasa

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de dodecyl sulfato de sodio-poliacrilamida
SP	Medio de esporulación
S2	Línea celular desarrollada a partir de las células de Scheneider de <i>D. melanogaster</i>
siRNAs	Fragmentos de dsRNA de 21-25 nucleótidos
TA	Temperatura ambiente
VMMA's	Vesículas de membrana de microvellosidad apical de células intestinales
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
2-ME	2-mercapto etanol

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> .-----	8
Figura 2	Longitud relativa de las protoxinas Cry y la posición de los cinco bloques conservados. -----	9
Figura 3	Relación filogenética entre las toxinas Cry de tres dominios.-----	10
Figura 4	Estructura tridimensional de cuatro toxinas Cry de tres dominios específicas par diferentes órdenes de insectos.-----	13
Figura 5	Árbol filogenético derivado del alineamiento de las APNs de lepidópteros con ClustalX.-----	15
Figura 6	Representación esquemática de la secuencia de las isoformas 1 y 2 de APN de <i>M. sexta</i> .-----	16
Figura 7	Árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias de proteínas de las APNs reportadas hasta el momento.-----	17
Figura 8	Mecanismo de toxicidad de las toxinas Cry.-----	22
Figura 9	Ciclo de vida de <i>Manduca sexta</i> .-----	26
Figura 10	Representación gráfica de la síntesis del dsRNA.-----	35
Figura 11	Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de APN1 y APN2 de <i>M. sexta</i> . -----	41
Figura 12	Producto de la reacción de PCR de APN1 purificado.-----	42
Figura 13	Digestión de DNA de de la clona de APN1 con las enzimas EcoR I./ Xba I. -----	43
Figura 14	Digestión del DNA de la clona de Bt-R ₁ con enzimas EcoR I/Xba I.--	43
Figura 15	Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA de Bt-R ₁ y APN1 con oligonucleótido T7 en el vector pLITMUS 28i.-----	44
Figura 16	dsRNA de APN1 y Bt-R ₁ .-----	44
Figura 17	Toxicidad de Cry1Ab sobre larvas L1 de <i>M. sexta</i> inyectadas con agua para determinar la dosis de selección de larvas inyectadas con los dsRNAs. -----	45
Figura 18	Inmunodetección de APN en larvas L1 inyectadas con dsRNA de APN1 que no fueron sometidas a dosis de toxina Cry1Ab.-----	48
Figura 19	Inmunodetección de APN en intestinos de larvas L1 retadas con toxina Cry1Ab. -----	49
Figura 20	Inmunodetección de Bt-R ₁ en intestinos de larvas L3 inyectadas en L1 con dsRNA de Bt-R ₁ y retadas con 20 ng/cm ² de Cry1Ab durante 3 días. -----	51
Figura. 21	Inmunodetección de Bt-R ₁ en intestinos de larvas L3 que son la primera generación de pupas inyectadas y que no fueron retadas con toxina Cry1Ab. -----	53
Figura. 22	Inmunodetección de Bt-R ₁ en intestino de larvas L1 que son la primera generación de adultas inyectadas, retadas con 20 ng/cm ² de toxina Cry1Ab. -----	55
Figura 23	Inmunodetección de APN en VMMA's tratadas con PLC.-----	56
Figura 24	Ensayo de unión (ligand-blot) de Cry1Ab a VMMA's tratadas con PI-PLC. -----	57

Figura 25	Inmunoblot: anti-Cry1Ab (Panel A), anti-APN (Panel B) de VMMA's rasuradas con PI-PLC.- -----	59
Figura 26	Inmunoblot: anti-Cry1Ab (Panel A) y anti-APN (Panel B) de VMMA's más proteínas ancladas por GPI solubles.-----	60
Figura 27	Inmunoblot: anti-Cry1Ab (Panel A) y anti-APN (Panel B) de VMMA's incubadas con anticuerpo anti-APN.-----	61
Figura 28	Inmunoblot: anti-Cry1Ab (panel A) y anti-APN (panel B)) de VMMA's incubadas con una mezcla de péptidos sintéticos de las asas 2 y 3 del Dominio II y con anticuerpo anti-Bt-R ₁ .-----	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Inyección de dsRNAs de Bt-R ₁ y APN en huevos de <i>M. sexta</i> .-----	46
Tabla 2.	Inyección de dsRNAs de APN1 a larvas L1 de <i>M. sexta</i> . -----	47
Tabla 3.	Inyección de diferentes concentraciones de dsRNA Bt-R ₁ a larvas L1 de <i>M. sexta</i> . -----	49
Tabla 4.	Inyección de dsRNA de Bt-R ₁ a larvas L1 de <i>M. sexta</i> . -----	50
Tabla 5.	Inyección de dsRNA de Bt-R ₁ a larvas L1 de <i>M. sexta</i> . -----	50
Tabla 6.	Inyección de dsRNA de Bt-R ₁ a Pupas hembra de <i>M. sexta</i> . -----	53
Tabla 7.	Inyección de dsRNA de Bt-R ₁ a hembras adultas de <i>M. sexta</i> . -----	54
Tabla 8.	Larvas L1 (de madres inyectadas) retadas con toxina Cry1Ab. -----	54

1.0 RESUMEN

B. thuringiensis produce toxinas insecticidas (Cry) con alta especificidad e inocuas para humanos, otros vertebrados y plantas, por lo que son empleadas en el control biológico de insectos. La interacción de las toxinas Cry con sus receptores en el intestino de larvas susceptibles es fundamental para determinar la especificidad hacia los insectos plaga. En el caso de las toxinas Cry1A, específicas contra insectos lepidópteros como *Manduca sexta*, se ha descrito que las proteínas Caderina (Bt-R₁) y Aminopeptidasa N (APN) presentes en el intestino del insecto blanco, funcionan como receptores. Diferentes antecedentes de nuestro grupo de investigación plantean que las diferentes estructuras de la toxina (monómero y oligómero) interaccionan de manera secuencial con cada una de las proteínas receptoras.

En este trabajo se silenció la expresión de las proteínas Bt-R₁ y APN empleando el proceso de RNA de interferencia. Los fragmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) sintetizados *in vitro* específicos para estas proteínas, se inyectaron en individuos de los diferentes estadios de desarrollo de *M. sexta*, tales como huevo, larvas de primer estadio, pupas hembra y mariposas.

Se determinó que la inyección de dsRNA de Bt-R₁ y APN1 a larvas de primer estadio de *M. sexta* resultó más viable que la inyección en huevos en cuanto a niveles de disminución de la expresión de las proteínas blanco y el porcentaje de sobrevivencia al reto con toxina Cry1Ab.

El silenciamiento de las proteínas receptoras en larvas de *M. sexta* inyectadas con dsRNA, se da al menos a las 12 h horas post-inyección, debido a que a ese tiempo ya toleran las altas dosis de toxina Cry1Ab aplicadas por bioensayo, y no se observa la proteína silenciada por inmunoblot.

Se obtuvo disminución de la expresión de la proteína APN1 en larvas L1 inyectadas con dsRNA de APN. Este dato correlacionada con la tolerancia a altas dosis de toxina Cry1Ab por bioensayo, así como disminución en la actividad enzimática específica de APN y la ausencia de la proteína determinada por inmunodetección.

De manera similar, la inyección de 1 µg de dsRNA de Bt-R₁ a larvas L1, resultó en una mayor tolerancia a altas dosis de toxina Cry1Ab en bioensayo y permitió el desarrollo normal de las larvas analizadas. Sin embargo, después de tres días, las larvas inyectadas con esa cantidad de dsRNA de Bt-R₁, fueron incapaces de pasar al siguiente estadio de desarrollo.

Se analizó la inyección de dsRNA de Bt-R₁ a pupas hembra que se aparearon 12 h después de la inyección con machos sin tratamiento. Los niveles de ovoposición y eclosión de huevos no se afectaron. Se observó que la disminución de la proteína Bt-R₁ en las larvas provenientes de esta cruce, fue parcial en algunos casos y total en otros. Sin embargo, es una buena estrategia para la obtención de un alto número de individuos que carezcan o tengan disminuida la proteína de interés con los que se pueda realizar otros análisis relacionados con el estudio del mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry sobre sus insectos blanco.

También se analizó la inyección de dsRNA de Bt-R₁ a hembras adultas. El tratamiento no interfirió en el apareamiento con los machos, ni en el proceso de ovoposición de huevos viables. La progenie de hembras adultas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁ obtuvo tolerancia a altas dosis de toxina Cry1Ab. En este

caso, también se observó una disminución parcial de la proteína Bt-R₁ en algunas de las larvas analizadas que fueron tolerantes a la alta dosis de toxina. La ausencia de las proteínas Bt-R₁ y APN debido a la interferencia de su expresión por dsRNA en individuos de *M. sexta*, resulta en la tolerancia a altas dosis de toxina Cry1Ab. Lo que corrobora la importancia de la participación de los dos receptores en el mecanismo insecticida de las toxinas Cry en este lepidóptero que es plaga de diferentes cultivos importantes para la industria agrícola.

Por otra parte, se analizó la secuencialidad de la unión de la toxina Cry1Ab a las proteínas Bt-R₁ y APN, empleando vesículas de membrana de microvellosidad apical (VMMA's) purificadas de las células intestinales de larvas de tercer estadio (L3) de *M. sexta*. Estas vesículas tienen al receptor Bt-R₁ distribuido en la región soluble de membrana y a la APN en la región insoluble.

Se interfirió la interacción de la toxina Cry1Ab con Bt-R₁, mediante el bloqueo previo del receptor con péptidos sintéticos del dominio II de la toxina o con anticuerpo anti-Bt-R₁. En ambos casos, la unión del monómero a Bt-R₁ se vio afectada y esto resultó en una formación mucho menor de oligómero.

La presencia de la APN es esencial para la localización de la toxina en su forma oligomérica en la región insoluble de la membrana, donde se inserta para formar un poro lítico que conduce a la muerte del insecto. En este trabajo, se trataron VMMA's con fosfolipasa C que corta el puente glicosil fosfatidil inositol con el que esta unida la APN, de tal manera que la libera de la membrana insoluble. Se determinó que al rasurar las membranas con fosfolipasa C, la proporción de oligómero de Cry1Ab disminuye drásticamente en membrana insoluble.

Se analizó, que la APN que fue liberada de las VMMA's sigue uniendo a la toxina Cry1Ab, por lo que se utilizó como competidor para inhibir la interacción del oligómero de Cry1Ab con la APN anclada a las VMMA's. Este experimento resultó en una disminución de la incorporación del oligómero en los microdominios de membrana.

Por otra parte, se interfirió la interacción de Cry1Ab con APN, incubando las VMMA's con anticuerpo anti-APN. Sorprendentemente, este experimento cambió la distribución del oligómero y de APN hacia membranas solubles. El anticuerpo anti-APN también se localizó en membrana soluble. Este dato sugiere que el oligómero se localiza donde se encuentra la APN. Para confirmar esto se deberán realizar más experimentos.

Como conclusiones de este trabajo proponemos que el receptor Bt-R₁ es importante para la correcta activación de la toxina y la formación de oligómero. La localización del oligómero coincide con la ubicación de la APN, por lo que esta proteína es importante para conducir al oligómero a los microdominios de membrana donde se inserta para formar el poro

Estos datos, junto con los de silenciamiento de Bt-R₁ y APN resaltan la importancia de ambas proteínas, así como su papel secuencial en el mecanismo de toxicidad de la proteína Cry1Ab en lepidóptero.

2.0 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales intereses a nivel mundial en la producción de alimentos y en la salud humana, es el control de insectos plaga que afectan la agricultura y de vectores de enfermedades de importancia en la salud pública. Se estima que anualmente un 28% de la producción de alimentos en el mundo es afectada por plagas de insectos ya sea en el campo o durante su almacenamiento. En las últimas décadas el control de estas plagas se ha basado principalmente en el uso de insecticidas químicos; lo que ha provocado una serie de efectos no deseados en el medio ambiente como son: la acumulación de químicos carcinogénicos en los ecosistemas, la contaminación del agua, el desarrollo de resistencia por parte de los insectos y sobre todo la destrucción indiscriminada de otras especies benéficas. En conjunto, todos estos factores han originado la búsqueda de alternativas que no dañen al medio ambiente⁸.

Una alternativa con menor impacto nocivo en los ecosistemas para el control de plagas de diversos cultivos es el uso de bioinsecticidas. Entre los diferentes agentes de control biológico, las bacterias patógenas de insectos han sido de las alternativas más estudiadas. En los últimos años *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ha sido el agente de control biológico comercialmente más probado y utilizado sobre algunas plagas de insectos⁸. Actualmente, los productos basados en *Bt* ocupan la mayor parte del mercado mundial de bioinsecticidas y se han aceptado como productos biodegradables y seguros para los vertebrados y el ambiente.

2.1 *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)

Bt es una bacteria Gram-positiva aislada de suelo, granos almacenados, cadáveres de insectos y superficies de plantas que se ha descrito como patógeno facultativo gracias a su capacidad de producir y almacenar múltiples proteínas insecticidas llamadas δ -endotoxinas o toxinas Cry^{2,11,19}. Estas toxinas se acumulan como inclusiones cristalinas en el proceso de esporulación del ciclo de desarrollo de *Bt*^{19,20}, durante el cual además se produce una endoespora; que es una estructura reproductora asexual que le permiten sobrevivir en condiciones adversas (Figura1).

Con respecto a la filogenia, existe un parentesco entre *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis*, cuyas características distintivas son los genes codificados por los plásmidos que contiene cada especie.

Los genes que codifican para las proteínas insecticidas se localizan en plásmidos y generalmente están flanqueados por elementos transponibles^{19,66}. De esta manera, la diversidad de cepas de *Bt* está dada en gran parte por un alto grado de variabilidad genética⁶⁶.

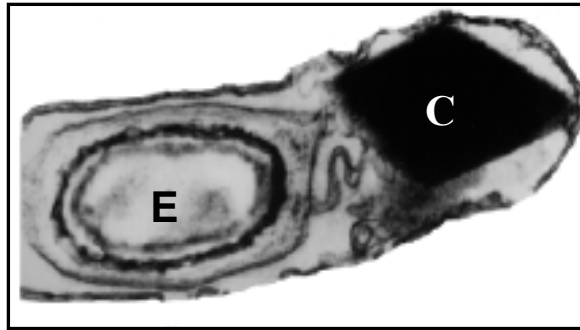


Figura. 1. Micrografía de *Bacillus thuringiensis*, donde se muestra el cristal (C) que contiene las proteínas insecticidas y la endoespora (E).

2.2 Toxinas Cry

Actualmente se ha podido dividir a las proteínas cristalinas o δ -endotoxinas en diferentes grupos en base a la homología de la secuencia de aminoácidos, el grupo más grande contiene las llamadas proteínas Cry de tres dominios estructurales.

Las toxinas Cry (por Cristal) se definen como proteínas paraesporales de *Bt* que muestran un efecto tóxico hacia algún organismo blanco⁸. Tienen actividad insecticida altamente selectiva hacia ciertos insectos en especial de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Himenóptera, Homóptera, Ortóptera, Mallofaga, así como para vectores de enfermedades de importancia en salud pública humana del orden Díptera. También existen algunas toxinas que afectan nemátodos, como *Cahenorhabditis elegans* y a protozoarios^{19,66}.

Estas toxinas son completamente biodegradables e inocuas para humanos, vertebrados y plantas.

Dentro de la familia de las toxinas Cry de tres dominios, existen proteínas con pesos moleculares de 60 a 70 ó de 130 a 140 kDa. Estas proteínas se producen como protoxinas (fragmentos no activos) que deben ser procesados para su actividad. El procesamiento se da principalmente en la extensión del extremo C-terminal, región que no es necesaria para la toxicidad pero que se propone como indispensable para la formación del cristal dentro de la bacteria^{19,20,66}.

En cuanto a la nomenclatura, cada protoxina adquirió un nombre nemónico Cry y cuatro rangos jerárquicos con números, letras mayúsculas, letras minúsculas y números. 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 (Ej. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.) respectivamente (Figura 3). En general, proteínas con el mismo rango primario afectan el mismo orden de insectos por ejemplo la mayoría de las protoxinas codificadas por los genes *cry1* son proteínas tóxicas contra insectos lepidópteros, aunque existen algunas toxinas Cry1 con actividad dual

activas contra insectos dípteros y coleópteros. 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 proteínas codificadas por los genes *cry4* son toxinas específicas contra insectos dípteros¹⁶.

Alineamientos de las toxinas Cry realizados por de Maagd *et al.* (2001)²⁰, revelaron la presencia de cinco bloques de secuencia conservados para la mayoría de las proteínas (Figura 2), de donde se propone que las toxinas Cry que poseen estos bloques podrían tener estructuras similares. 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 Dominio III, forma puentes salinos con la β -17¹⁹. 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 *Bt* en forma de inclusiones cristalinas y poseen actividad insecticida.

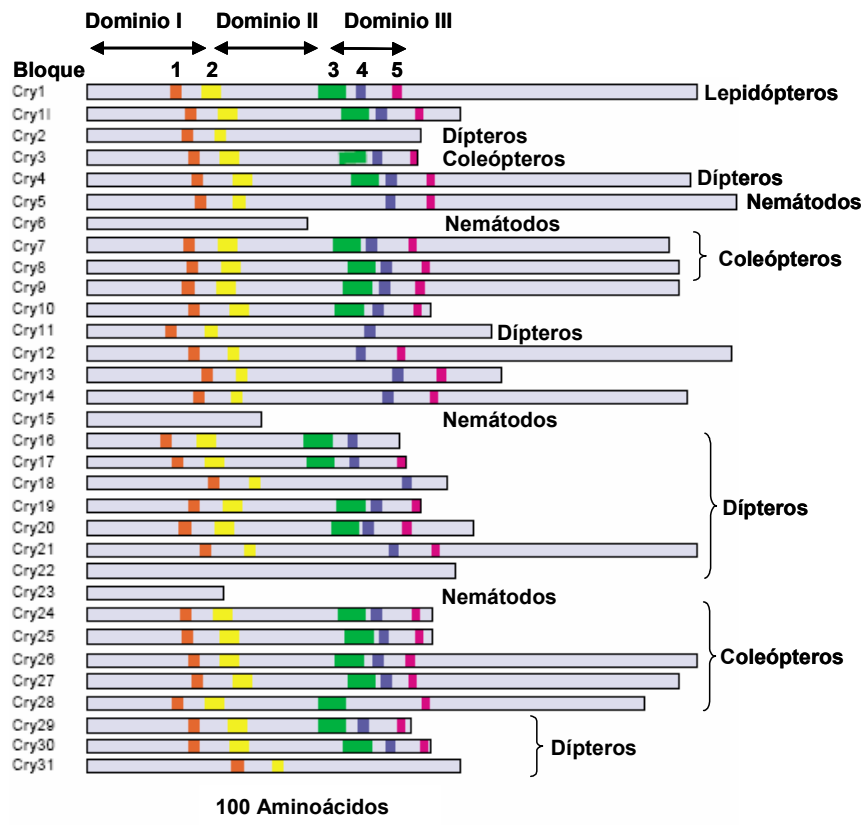


Figura. 2. Longitud relativa de las protoxinas Cry y la posición de los cinco bloques conservados. Se indica la posición de los tres dominios de la toxina activada para la toxina Cry1 y varía de acuerdo a la posición de los bloques 2 y 3 para otras toxinas. También se representa la especificidad que poseen las protoxinas sobre ciertos organismos. Tomada y modificada de De Maagd *et al.* (2001)²⁰.

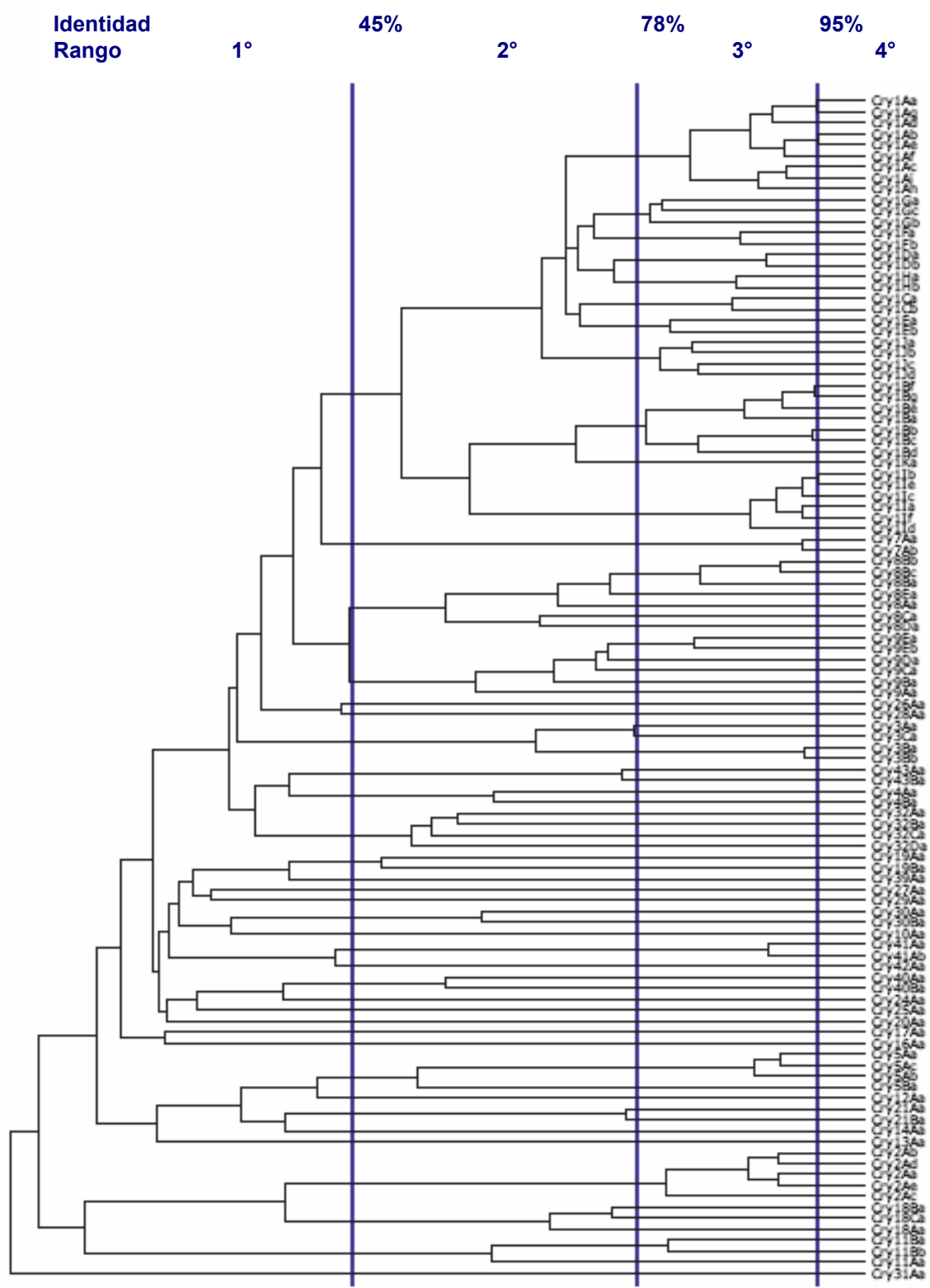


Figura 3. Relación filogenética entre las toxinas Cry de tres dominios. Se representa el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre las diferentes toxinas Cry y los rangos jerárquicos que permiten nombrarlas. Rango primario con números, rango secundario con letras mayúsculas, rango terciario con letras minúsculas y cuaternario con números. Tomado y modificado de http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ 08 de julio de 2006.

- **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 las estructuras de toxinas Cry1Aa³⁶ y Cry1Ac²³, específicas para insectos lepidópteros, Cry3Aa⁴⁸ y Cry3Bb1³¹, específicas para insectos coleópteros, de la protoxina Cry2Aa⁵⁷ específica para insectos dípteros y lepidópteros y más recientemente, de las toxinas Cry4Aa⁹ y Cry4Ba¹⁰, tóxicas para mosquitos de los géneros *Aedes* y *Anopheles* (Figura 4).

Ahora se sabe que a pesar de la diversidad de secuencia y especificidad existente entre las diferentes toxinas Cry, su arreglo topológico es muy semejante, lo que sugiere estructuras tri-dimensionales conservadas y mecanismos de acción similares. Están compuestas por tres dominios estructurales cuyas principales características son:

Dominio I

Localizado en el extremo N- terminal de la proteína, constituido por siete α -hélices (seis hélices anfipáticas alrededor de una hélice central). Se ha propuesto que participa en la inserción de la toxina a la membrana y en la formación de poro¹¹, presenta similitudes estructurales con otras toxinas bacterianas formadoras de poro como son la hemolisina E, colicina y el dominio de translocación de membrana de la toxina de la difteria¹⁹.

Dominio II

Formado por tres láminas plegadas antiparalelas formando un β -prisma y cuatro asas, con una topología de llave griega; es en esta región donde se localiza la mayor variabilidad entre las toxinas Cry. Por estudios de mutagénesis en las regiones hipervariables de éste dominio, se ha descrito que juega un papel muy importante en el reconocimiento y unión al receptor¹¹. Posee una alta identidad topológica a algunas proteínas de unión a carbohidratos como la vitelina y la lectina^{11,19}.

Dominio III

Localizado en el extremo C-terminal, formado por dos láminas- β antiparalelas formando un β -sandwich. A este dominio se le relaciona con la unión al receptor¹¹ y se le ha atribuido un papel en la formación de poro en la membrana^{19,20,66}. Con la construcción de proteínas híbridas donde se intercambié el dominio III entre diferentes toxinas Cry1, realizadas por de Maagd *et al.* en 1999¹⁸ y 2000²¹, empleando como modelos blanco a *M. sexta* y *Spodoptera exigua* respectivamente, se demostró que este dominio tiene efectivamente un papel muy importante en la unión al receptor, ya que intercambio entre las toxinas modificó su especificidad.

La estructura del dominio III se parece a dominios de proteínas que unen carbohidratos, como los de unión a celulosa de la 1-4- β -glucanasa, de la galacto-oxidasa, de la sialidasa, de la β -glucoronidasa, de la xilanasa 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 heptamérico¹⁹.

2.1 Moléculas receptoras de toxinas Cry en insectos susceptibles

El blanco de las proteínas insecticidas es la membrana apical de las células del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles, ahí se localizan los receptores específicos de alta afinidad con los que interaccionan las toxinas Cry y que son factores clave en la especificidad³⁰.

En el caso de insectos Lepidópteros (sensibles a toxinas Cry1A) se han identificado diferentes proteínas glicosiladas como receptores de las toxinas Cry1A de *Bt*.

En *Manduca sexta* se identificó una proteína tipo caderina (Bt-R₁) de 210 kDa⁷¹, una Aminopeptidasa N (APN) de 120 kDa⁴⁴, y recientemente una Fosfatasa Alcalina (ALP) de 65 kDa⁵⁴, localizadas en el epitelio intestinal del insecto como proteínas que intervienen en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A de *Bt*.

Recientemente, en el nemátodo *C. elegans* se identificó a los glicolípidos, cuya glicosilación depende de los genes *bre*, como moléculas receptoras de las toxinas de *Bt*, se demostró que un mecanismo de resistencia de los nemátodos a las toxinas fue precisamente la pérdida o ausencia de glicosilación de éstas moléculas³⁵. En ese reporte también se menciona que dada la conservación que existe entre los glicolípidos dependientes de los genes *bre* en nemátodos e insectos, así como la conservación de las estructuras de las toxinas Cry, la actividad tóxica de estas proteínas podría estar modulada por la función de los glicolípidos como receptores en las células blanco. En algunos reportes se menciona la posible participación de los glicolípidos como receptores en lepidópteros, sin embargo, hasta el momento no se ha descrito claramente ningún reporte en insectos que aporte evidencias al respecto.

- **Aminopeptidasa N (APN)**

La Aminopeptidasa N de *M. sexta* es una proteína de membrana (ectoenzima dependiente de Zinc) con una masa molecular de 120 kDa^{44,64}. Esta proteína une al monómero de las toxinas Cry con una constante de disociación aparente (K_D) de 100 nM por lo que ha sido extensamente estudiada como receptor^{62,64}.

Además de la hidrólisis de péptidos, la APN posee diferentes funciones biológicas ya que en las membranas de microvellosidad apical de intestino de insectos está asociada a un cotransportador de aminoácidos y potasio⁶⁴.

Esta proteína está anclada 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, que está en la región extracelular.

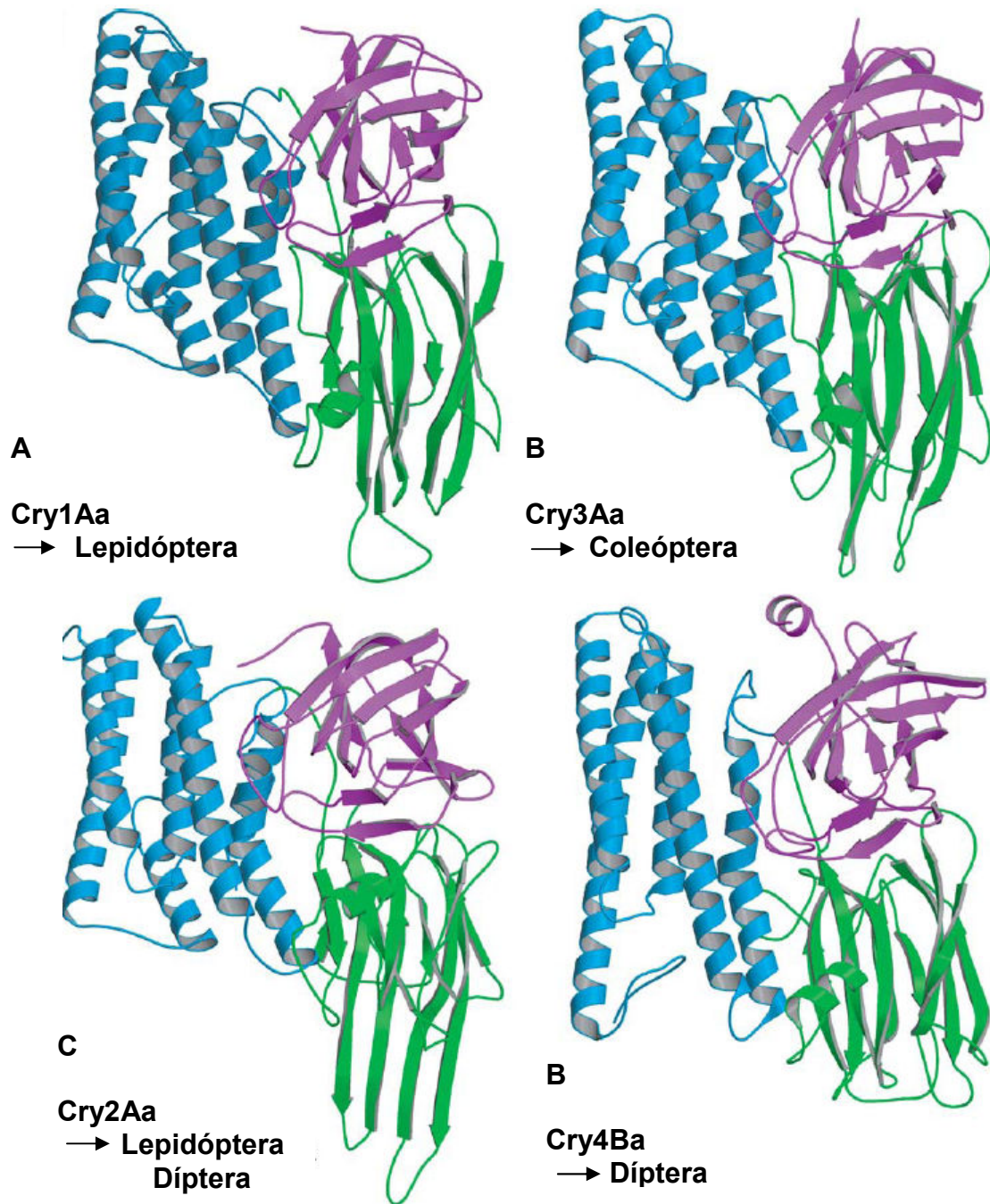


Figura. 4. Estructura tridimensional de cuatro toxinas Cry de tres dominios específicas por diferentes órdenes de insectos. A. Toxina Cry1Aa, específica para insectos lepidópteros. B. Toxina Cry3Aa, específica para coleópteros. C. Toxina Cry2Aa, específica para lepidópteros y dípteros. D. Cry4Ba, específica para dípteros. En cada imagen 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 violeta) están involucrados en el reconocimiento y unión al receptor. Tomada y modificada de Boonserm *et al.* (2006)⁹.

Recientemente, se ha demostrado que la APN de *M. sexta* y la de *Heliothis virescens* están localizadas en microdominios de membrana y que la integridad de estos microdominios, es esencial para la actividad de formación de poro de las toxinas Cry1A⁵³.

Los microdominios de membrana, cuya característica es la composición lipídica enriquecida en glicoesfingolípidos y colesterol y su distribución espacial; están involucrados en la transducción de señales y transporte de proteínas a través de la membrana plasmática. Además, funcionan como sitio de unión o entrada para diferentes toxinas bacterianas^{19,45}. Por ejemplo, en el caso de toxinas formadoras de poro como la Hemolisina E, la asociación de sus receptores en los microdominios es un paso crucial para su oligomerización e inserción en la membrana¹⁹.

En otro estudio realizado por Zhuang *et al.* (2002)⁷⁶, se reportó que la formación de poro de la toxina Cry1Ab se lleva a cabo en los microdominios de membrana. Demostraron que cuando las vesículas de membrana de microvellosidad apical de las células intestinales (VMMA's) o los microdominios purificados son tratados con β -MCD (un reactivo que saca colesterol de la membrana) hay una disminución del 89% en la permeabilidad a K^+ inducida por la toxina Cry1Ab, lo que indica que la composición de los microdominios es importante para la actividad de formación de poro de las toxinas Cry.

En un análisis realizado por Lorence *et al.* (1997)⁵¹, en membranas de microvellosidad apical del intestino de *Trichoplusia ni*, se hizo el corte *in vitro* del puente GPI que ancla a la APN utilizando la enzima Fosfolipasa C (PI-PLC, de corte específico para GPI). Se demostró una disminución en la actividad formadora de poro de la toxina Cry1Ac mediante análisis de permeabilidad a K^+ , lo que sugería hasta ese momento que la presencia de APN era importante para la actividad formadora de poro de las toxinas Cry en membranas de ese insecto.

Por otra parte, estudios de inmunoprecipitación realizados en nuestro laboratorio, demostraron que la APN interactúa preferentemente con el oligómero de la toxina Cry1Ab. Este dato va de acuerdo con el incremento de casi 200 veces en la afinidad de unión del oligómero de Cry1Ab a la APN reportado por Bravo *et al.* (2004)⁶ y cuya K_D es de 0.75 nM en contraste con la K_D de la estructura monomérica a esta proteína receptora que es de 165 nM, indicando una mejor afinidad de APN por la estructura oligomérica.

Un dato relevante de la importancia de la APN como receptor de las toxinas Cry es que la reconstitución de la APN con su puente GPI en membranas de lípidos artificiales, indujo la formación de poro de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac y Cry1C a diferencia de las membranas libres de receptor⁶⁷. Rausell *et al.* (2004)⁶³, demostraron que el oligómero se inserta eficientemente a vesículas sintéticas de membrana formando poros muy estables, contrario a lo que sucede con el monómero. Esto sugiere que el oligómero es un intermediario durante la inserción de la toxina a membranas.

A la fecha se han descrito veinte aminopeptidasas N (APNs) aisladas de diferentes insectos, como *Plutella xylostella*, *Spodoptera litura*, *Helicoverpa punctigera*, *Epiphyas postvittana*, *Lymantria dispar*, *H. virescens*, *Plodia interpunctella*, *M. sexta* y *Bombyx mori*^{2,13}; la mayoría han sido reportadas como proteínas que unen toxinas Cry1A.

Nakanishi *et al.* (2002)⁵⁸, mediante estudios filogenéticos clasificó a las APNs de esos lepidópteros en cuatro clases de homología (Figura 5). Sin embargo, se ha observado que a pesar de la identidad que existe entre ellas, unen diferencialmente a las toxinas Cry².

Hasta el momento no se ha descrito ningún estudio que compare las afinidades de todas las diferentes APNs de algún insecto con una toxina Cry, que permita determinar cual APN es la más importante para el mecanismo de actividad insecticida de las proteínas Cry. Aunado a esto, se piensa que todas las isoformas de las APN tienen una estructura parcial común que permite la unión de las toxinas Cry, así como otros elementos que determinan que toxina se une a cada una de las APNs (tales como glicosilación diferente en cada insecto)⁵⁸.

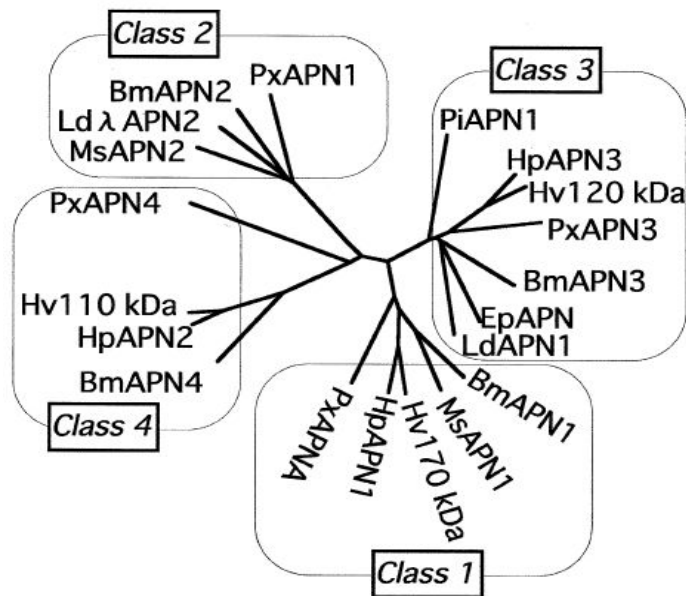


Figura 5. Árbol filogenético derivado del alineamiento de las APNs de lepidópteros con ClustalX. En la clase 1 se agrupa la APN 1 y en la Clase 2 la APN2 de *M. sexta*. Tomado de Nakanishi *et al.* (2002)⁵⁸.

En *M. sexta* se han descrito cuatro isoformas diferentes de Aminopeptidasas N localizadas en el intestino del insecto.

La APN1 caracterizada inicialmente por Knight *et al.* (1995)⁴⁵, quienes combinando el método de cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio aniónico purificaron esta proteína de 120 kDa. Ha sido reconocida como una peptidasa dependiente de Zinc²⁺ remueve residuos del extremo N-terminal.

Esta glicoproteína posee 990 aminoácidos y está anclada a la membrana en su C-terminal por un puente GPI que va del aminoácido 968 al 990. La secuencia del péptido señal hidrofóbico que posteriormente es cortado, abarca del

aminoácido 1 al 15. El polipéptido maduro tiene 934 aminoácidos cuya masa molecular se calcula de 105 kDa, sin embargo, a lo largo de la secuencia hay residuos de Serina y Treonina que podrían ser sitios potenciales de O-glicosilación así como de Asparagina para N-glicosilación, de manera que se obtiene una proteína madura de 120 kDa⁴⁵. En *M. sexta* esta enzima une las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac de *Bt*.

La isoforma 2 de Aminopeptidasa N (APN2) de *M. sexta*, fue caracterizada por Denolf *et al.* (1997)²² quienes emplearon cromatografía de afinidad y experimentos de unión, para aislar la glicoproteína de 942 residuos aminoácidos que posee una secuencia señal de secreción en el N-terminal y la región del C-terminal típica de las proteínas ancladas por un puente GPI. Posee cuatro residuos de cisteínas altamente conservadas entre las APNs de eucariontes y cinco sitios putativos de N-glicosilación, tiene un peso molecular final de 120 kDa y une la proteína Cry1Ab5. Sin embargo, en este estudio no analizan la unión de las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac.

Las APN1 y 2 de *M. sexta* presentan un porcentaje de identidad del 21% a lo largo de la secuencia de aminoácidos. En la Figura 6 se representa esquemáticamente la secuencia de las dos APNs de *M. sexta*, se observan los sitios de glicosilación y la posición de las cisteínas conservadas, así como la firma de las metaloproteasas de zinc que ambas poseen.

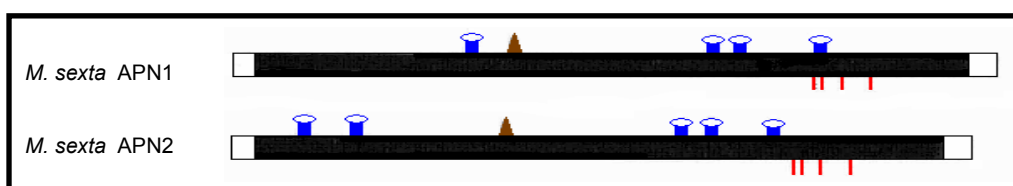


Figura 6. Representación esquemática de la secuencia de las isoformas 1 y 2 de APN de *M. sexta*. Estas proteínas, se caracterizan por un dominio N-terminal hidrofóbico que representa un péptido señal de transporte (el sitio de corte se predice entre la G15 y la N16 (cuadro blanco de la izquierda), un dominio COOH-terminal (23 aminoácidos) que representa un péptido consenso determinado para la adición de un Glicosil Fosfatidil Inositol (cuadro blanco de la derecha), la firma de metaloproteasas de Zinc (triángulo café), los sitios de glicosilación (asas azules) y los cuatro residuos de Cisteína conservados (líneas rojas).

Para el caso de las isoformas 3 y 4 de APNs de *M. sexta*, no se publicó ningún reporte de caracterización ni análisis con toxinas Cry, únicamente se anotó la secuencia de ambas proteínas a la base de datos de GenBank en 2002 por el grupo del Dr. MJ. Adang. En el reporte de las secuencias se describe que el gen de la APN3 tiene una secuencia de 2955pb que codifica para una proteína de 947 aminoácidos y el gen de la APN4 es de 3161 pb que codifica una proteína de 1010 aminoácidos.

Herrero *et al.* (2005)³⁹, reportaron que una colonia de insectos de *S. exigua* que resistente a la toxina Cry1Ca aislada en el laboratorio, no expresaba uno de los cuatro genes que codifican para las 4 APNs en ese insecto. Reportaron que se trataba de la isoforma 1 de Aminopeptidasa N (APN1), por lo que concluyen que la expresión de esa proteína juega un papel importante en el mecanismo de toxicidad de la proteína Cry1Ca en esa colonia de *S. exigua*. Este grupo,

también hizo una clasificación de APNs, en la que se empleó 31 secuencias de APNs de diferentes insectos tomadas de la base de datos de GenBank más las de las 4 APNs de *S. exigua*. Obtuvieron un árbol filogenético que clasifica en 5 Clases a las APNs de insectos lepidópteros (Figura 7). Dentro de esta clasificación, cada una de las 4 APNs de *M. sexta*, está representada en cada una de las 4 Clases principales.

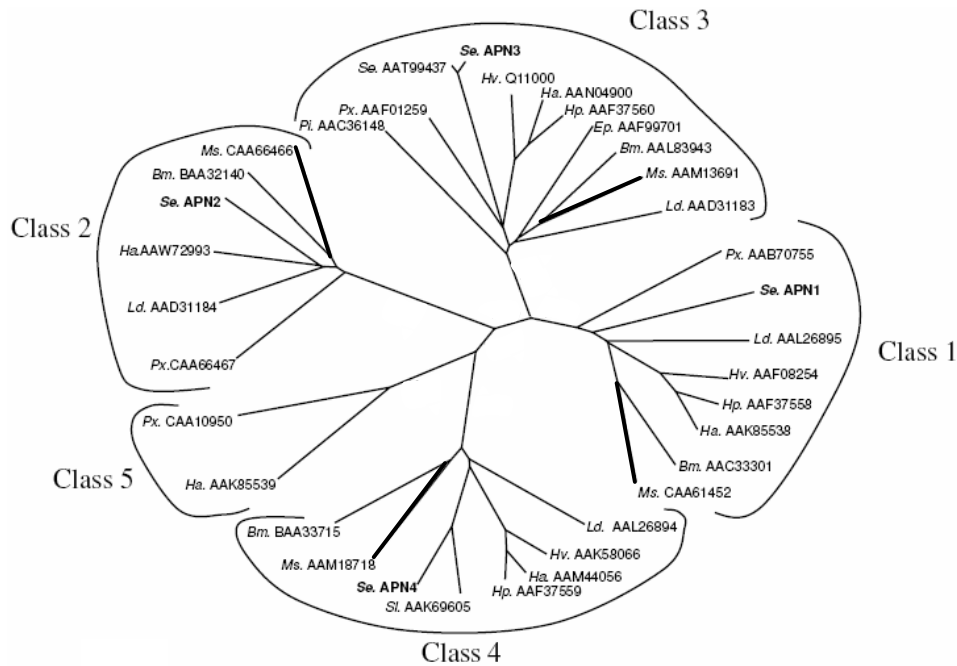


Figura 7. Árbol filogenético derivado del alineamiento de las secuencias de proteínas de las APNs reportadas hasta el momento. Se muestra el nombre de cada especie y el número de acceso a la base de datos de GenBank para cada proteína. Abreviaciones de las especies: Se: *S. exigua*; Ms: *M. sexta*; Ld: *Lymantria dispar*; Hv: *H. virescens*; Ha: *Helicoverpa armigera*; Hp: *H. punctigera*; Bm: *B. mori*; Sl: *S. litura*; Px: *Plutella xylostella*; Pi: *P. interpunctella*; Ep: *E. postvittana*.

Se han publicado diferentes reportes en los que se han clonado y expresado genes que codifican para Aminopeptidasas N en cultivos de líneas celulares de insectos heterólogos. Por ejemplo, la APN de *M. sexta*, se expresó en la línea celular Sf21 (derivada de ovario de pupa de *S. frugiperda*), pero no se reportó ningún análisis de toxicidad con las proteínas Cry⁵³. También, se expresó la APN de *S. litura* en la línea celular Sf21 y por análisis de inmunofluorescencia se demostró la unión de la toxina Cry1C a la APN recombinante en la superficie de esas células. Sin embargo, no se observó mortalidad de la línea celular transformada en presencia de la toxina Cry1C². La APN de *M. sexta* y de *P. xylostella* se expresaron en la línea celular Sf9 (derivada de ovario de pupa de *S. frugiperda*). En el caso de la APN de *M. sexta*, no se identificó ninguna actividad de APN en las células transfectadas y por consecuencia no se evaluó la unión o la toxicidad de Cry1Ab. Para el caso de la APN de *P. xylostella*, esta proteína presentó actividad de APN, sin embargo, en ensayos de unión no se demostró la unión de la toxina Cry1Ab, lo que se atribuyó a problemas de la glicosilación de la APN expresada²².

Hasta este momento sólo se había analizado el papel de la APN como receptor de las toxinas Cry *in vitro*. Para explorar el papel de la APN *in vivo*, se hizo un análisis de la transformación de *Drosophyla melanogaster* con la APN de *M. sexta*, se probó la susceptibilidad de los insectos transgénicos a la toxina Cry1Ac1, los niveles de mortalidad demostraron la importancia de la APN como receptor *in vivo*³².

- **Caderina (Bt-R₁)**

Bt-R₁ representa un nuevo tipo de caderina de insectos con un porcentaje de identidad entre el 20 y 40% con proteínas miembros de la superfamilia de las caderinas^{43,71}; La expresión de Bt-R₁ es específica de la microvellosidad del epitelio del intestino de los estadios larvarios de *M. sexta*^{56,71}. Aún no se ha identificado su función específica en el insecto; aunque se propone que pudiera estar involucrada en el transporte de membrana⁷¹ o en eventos apoptóticos que resultan en la muerte celular programada⁴³.

Es una glicoproteína transmembranal con un ectodominio de doce módulos de secuencias repetidas; un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático; su masa es de 210 kDa y tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.5^{30,56}.

Esta proteína une al monómero de toxinas Cry1 de *Bt* con una K_D de 1 nM^{70,71} similar a la K_D de la toxina a VMMA's. 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 poros iónicos funcionales *in vitro*³⁴.

Por otro lado, con el objetivo de establecer la relación directa entre Bt-R₁ y la citotoxicidad inducida por las toxinas Cry, Bt-R₁ se expresó en cultivos celulares de mamíferos y de insectos heterólogos.

Keeton y Bulla (1997)⁴³, expresaron la proteína Bt-R₁ de *M. sexta* en la superficie de células COS-7 (línea celular desarrollada a partir de riñón de mono verde africano), HEK-293 (línea celular desarrollada de riñón de embrión humano) y en la línea celular Sf21. Obtuvieron una proteína recombinante de 195 kDa expresada en la superficie de las células transformadas con el gen de Bt-R₁ que unió las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, con una alta afinidad, pero no se confirió incremento en la susceptibilidad a las toxinas Cry. En ese reporte no se analiza si las toxinas sufren un procesamiento diferente con la proteína Bt-R₁ de bajo peso que expresan las células transformadas. Mencionan que al menos la glicosilación de la que carece la Bt-R₁ transformante no es necesaria para el proceso de reconocimiento y unión de la toxina. Tampoco se discute que la diferencia de peso entre la proteína expresada y la de 210 kDa sea responsable de la toxicidad de las proteínas Cry, aunque hasta ese momento no se consideraba ninguna otra proteína receptora. Y de manera general, esto podría sugerir que Bt-R₁ no es el único elemento necesario para la actividad insecticida de las toxinas Cry.

Dorsch *et al.* (2002)²⁵, también expresaron Bt-R₁ en células COS-7 y HEK-293, En ese caso, se observó la expresión de la proteína por inmunofluorescencia con anticuerpos marcados y se analizó la toxicidad celular inducida por la toxina Cry1Ab en las células transformadas con la proteína Bt-R₁. Los resultados reportados fueron pérdida de la integridad estructural y finalmente la muerte de las células que expresan Bt-R₁, rechazando también, el papel de la glicosilación para la unión de las toxinas a esta proteína. Sin embargo, no presentan datos de la cantidad de toxina necesaria para observar los daños celulares.

Cuando Bt-R₁ de *M. sexta* fue expresada en células Sf9 se reportó que aún en su forma soluble, tiene una alta afinidad por la toxina Cry1Ab. Por ensayo de competencia con toxina Cry1Ab marcada unida a Bt-R₁ tanto en la forma soluble como en la anclada a membrana. Se demostró que un exceso de 100 veces de Cry1Ab desplaza a la toxina marcada previamente unida. Sin embargo, no se analizaron los niveles de toxicidad de Cry1Ab sobre estas células transformadas con Bt-R₁⁵⁵.

Al expresar Bt-R₁₇₅ (proteína tipo caderina) de *B. mori* en la superficie de células COS-7, se observó la unión de la toxina Cry1Aa y provocó la lisis celular⁶⁹. Este dato aporta una fuerte evidencia de la participación de esta proteína como receptor de las toxinas Cry, al menos en este insecto.

Para analizar la función *in vivo* de Bt-R₁ de *M. sexta* como receptor de las toxinas Cry1, Hua *et al.* (2004)⁴⁰ transformaron la línea celular S2 (desarrollada a partir de las células de Schneider de *D. melanogaster*) con una proteína Bt-R₁ modificada (que difiere por dos aminoácidos de la silvestre) y la co-expresaron con la proteína verde fluorescente, como indicador del porcentaje de transfección al cultivo. En ensayos de unión se observó que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se unían a la proteína transformante y por medio de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, probaron el efecto tóxico de esas proteínas Cry. Se observó que Bt-R₁ se expresó abundantemente, de manera que la cantidad de receptor no es un paso limitante en el mecanismo de toxicidad. Sin embargo, solo se observó mortalidad por efecto de las toxinas Cry en el 14 % de las células S2 que expresaban Bt-R₁ y no hacen una comparación con la toxicidad en células no transfectadas⁴⁰. Por lo tanto, aunque este reporte aporta datos que reafirman la importancia de Bt-R₁ en la toxicidad de las proteínas Cry, los bajos niveles de mortalidad permiten predecir que se requiere la participación de otras moléculas receptoras para la correcta funcionalidad de las toxinas Cry.

- **Fosfatasa alcalina (ALP)**

McNall y Adang (2003)⁵⁴, por medio de geles de electroforesis de dos dimensiones de las proteínas de VMMA's de *M. sexta*, identificaron una nueva proteína que une a la toxina Cry1Ac. Dicha proteína es una fosfatasa alcalina anclada a la membrana con un puente GPI, con un peso molecular de 65 kDa para la forma anclada a membrana y de 62 kDa para la forma soluble. Como las proteínas ancladas por GPI, la ALP se localiza preferentemente en microdominios de membrana⁴².

Recientemente, Chen *et al.* (2005)¹², analizaron la localización celular de las proteínas Bt-R₁, APN1 y ALP en cortes de tejido intestinal de *M. sexta* a través de análisis de inmunohistoquímica realizados en diferentes secciones de las regiones anterior, medio y posterior del intestino.

Se reportó que la APN y la ALP se distribuyen en toda la microvellosidad de las células de la región posterior del intestino y únicamente en la parte apical de la microvellosidad celular en las regiones media y anterior del intestino.

Bt-R₁ se localizó en la base de la microvellosidad en la región anterior, en toda la microvellosidad en la región media y en la base como en el ápice de la microvellosidad de la región posterior.

Empleando las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac marcadas con rodamina se determinó que las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab se unieron de la misma manera en el ápice de la microvellosidad en todas las regiones del intestino. Mientras que la unión de la toxina Cry1Ac fue mucho más fuerte en la región posterior que en la media y anterior. A pesar de que la colocalización no indica necesariamente unión, estos datos sugieren que la toxina Cry1Aa y Cry1Ab se unen preferentemente al sitio donde se localiza Bt-R₁ y la toxina Cry1Ac donde esta la APN y la ALP. Por lo tanto, en este trabajo se estableció la relación entre la localización de los receptores y los sitios dónde se unen las diferentes toxinas Cry1A.

Por otro lado, recientemente se reportó que en el díptero *Aedes aegypti* existe una proteína de 64 kDa con actividad de ALP involucrada en la interacción de la toxina Cry11A a células del intestino medio de este insecto y a su actividad tóxica, ya que cuando se bloquea la interacción de la toxina con ALP por mutagénesis en la toxina o por utilización de péptidos que compiten la unión, se impide la toxicidad de Cry11A²⁹.

2.1 Mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry

Actualmente, nuestro grupo de investigación ha propuesto que el mecanismo insecticida de las toxinas Cry involucra la participación secuencial de dos proteínas receptoras, Bt-R₁ y APN. En este modelo, la interacción de la toxina con cada uno de los receptores depende del estado estructural en el que se encuentre, ya sea como monómero u oligómero (Figura 8)^{6,7,19,66}. A continuación se describen los pasos del mecanismo de toxicidad propuesto:

1. Solubilización: Después de que una larva susceptible ingiere los cristales que produce la bacteria, estos se solubilizan en el intestino debido a su ambiente alcalino y reductor⁷. Lo anterior da como resultado que las proteínas Cry1 sean liberadas de los cristales como protoxinas de 130 kDa⁴⁸.
2. Proteólisis: La protoxina es procesada por serinproteasas (tipo tripsina y quimiotripsina, presentes en el intestino del insecto) 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, dando lugar a un fragmento resistente a proteólisis de aproximadamente 60 kDa, al que se llama toxina activa^{6,7,34}.
3. Interacción con el primer receptor: La toxina activa posteriormente interactúa con la proteína Bt-R₁, localizada en la membrana apical de las células del intestino del insecto, cuya afinidad por el monómero de la toxina es de 1nM; dicha interacción favorece un cambio conformacional en la toxina que provoca el corte de la hélice α -1³⁴. Entonces se exponen regiones hidrofóbicas de la toxina que conducen a su oligomerización formando así la estructura preporo^{6,34}.
4. Oligomerización: En función del peso molecular, se ha propuesto que la estructura oligomérica está conformada por cuatro subunidades y que es resistente a calor y a urea, además de que es la entidad funcional para la formación del poro lítico^{6,34}.
5. Interacción con el segundo receptor: Una vez formada la estructura oligomérica, hay un aumento en la afinidad por la proteína APN ($K_D = 0.75$ nM) a comparación del monómero el cual es casi 200 veces menos afin ($K_D=165$ nM), por lo que se propone que el oligómero interactúa con este segundo receptor⁶.
6. Inserción y formación de poro en membrana: La APN conduce al oligómero hacia los microdominios de membrana en donde se inserta y forma un poro lítico que provoca un desbalance iónico que lleva a la lisis osmótica celular, parálisis intestinal y la muerte de la larva^{2,6,45,66}.

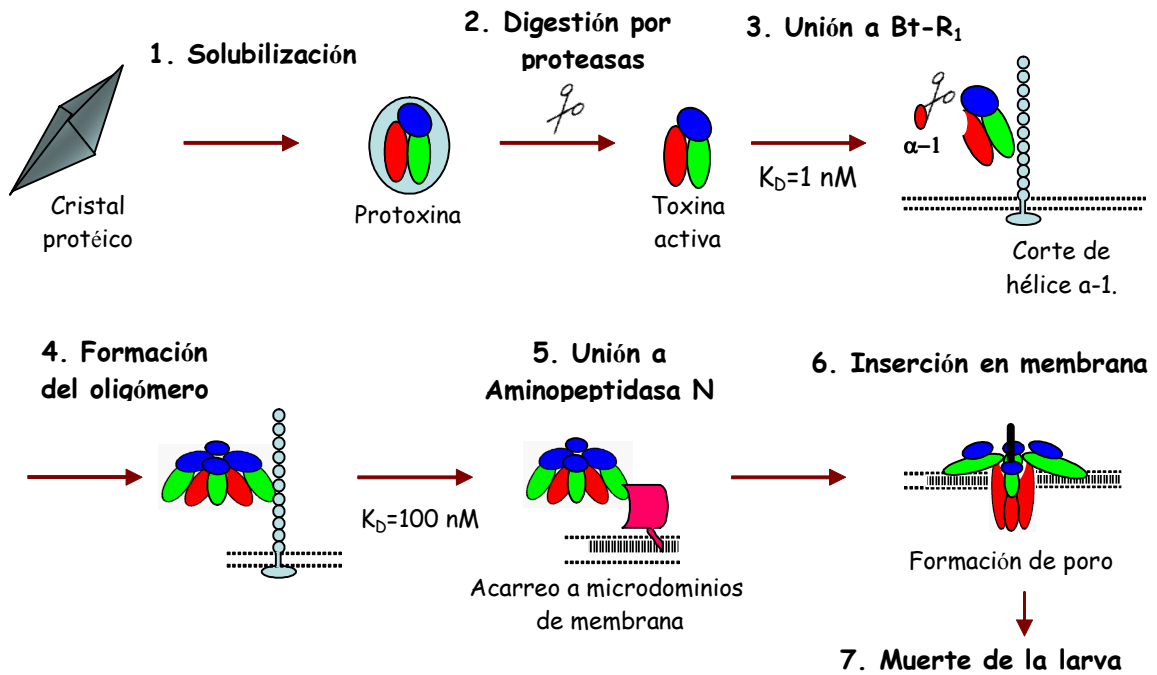


Figura. 8. Mecanismo de acción de las toxinas Cry (detalles explicados en el texto).

Este modelo propone que ambos receptores son importantes con funciones complementarias y secuenciales en el mecanismo de acción de las toxinas Cry. Sin embargo, la unión del monómero y el oligómero a cada una de las proteínas receptoras y el proceso de inserción a membrana son pasos cruciales del mecanismo de acción que aún no se han definido.

3.0 ANTECEDENTES PARTICULARES

3.1 Interferencia por RNA

En los últimos años la interferencia por RNA (RNAi) ha sido reconocida como un proceso de silenciamiento genético postranscripcional^{24,50,65}, que se lleva a cabo de manera natural en muchas de las células de una gran variedad de organismos complejos para el silenciamiento de genes, como una respuesta de defensa contra la invasión de virus y elementos transponibles^{14,60}.

El proceso de RNAi consiste en la degradación específica de un RNA mensajero (RNAm) gracias a la interacción de un RNA de doble cadena (dsRNA) de secuencia homóloga.

De acuerdo al modelo que prevalece, se propone que el dsRNA es procesado a pequeños fragmentos (siRNAs) de 21-25 nucleótidos (nt), dependiendo de las especies¹⁹, gracias a un complejo enzimático designado como DICER (endonucleasa, miembro de la familia de las RNAsas tipo III) dependiente de ATP^{13,17,26,38,50,75}. Posteriormente, los duplex de siRNAs son incorporados a un multicomponente de nucleasas llamado RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA), que es responsable de mediar el desenrollamiento (gracias a la actividad de una helicasa) para convertirlos a RNA de cadena simple (ssRNA)^{1,13,24,26,60}. Estos ssRNA (unidos a proteínas) son degradados a menos que reconozcan a su blanco de RNAm homólogo presente en la célula y se unan a él⁶⁰, por lo que la cadena antisentido de los siRNAs guía a RISC a su blanco de RNAm homólogo^{26, 30}. Una vez que se da la unión de la cadena antisentido de los siRNAs con el RNAm, pueden ocurrir varios procesos. Uno de ellos es la degradación específica de ese RNAm gracias al corte realizado por una endoribonucleasa presente en RISC (distinta a la de DICER) debido a un corte realizado a la mitad de la cadena complementaria^{17,75}. De esta manera, se evita específicamente la expresión de la proteína correspondiente a la secuencia del dsRNA y es a este proceso al que se le llama silenciamiento específico de la expresión genética^{24,50}.

Otro de los eventos es la amplificación del proceso de silenciamiento, debido a la alineación de una de las cadenas de ssRNA al RNAm, seguida por la actividad de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) que usa al RNAm como templado y al ssRNA como oligonucleótido para producir un nuevo RNAm de doble cadena, el cual puede ser nuevamente degradado por DICER y de esta manera amplificar el proceso de silenciamiento. De manera similar, el resultado final de este proceso es que se detiene la síntesis de una proteína específica eliminando el RNAm que la codifica.

Otra de las vías es la inhibición de la traducción, en este proceso se interfiere la función de genes específicos por la acción de estructuras tallo-asa aproximadamente de 70 nt (pre-miRNAs) que regulan sus genes blanco por medio de dos vías principales: el corte del RNAm blanco (principalmente en animales) y la represión traduccional (principalmente en plantas). Los pre-miRNAs son procesados por la actividad de corte de DICER a fragmentos de un tamaño aproximado de 21 nt llamados RNAs micro (miRNAs) capaces de regular cientos o miles de RNAs blanco cuya característica común es la pequeña secuencia que es complementaria a algunas de las seis o siete bases del miRNA.

A partir del proceso de RNAi, ha derivado una tecnología en la que los dsRNAs se sintetizan in vitro, en base a la secuencia del gen de interés y se introducen a la célula directamente (por inyección, por alimentación o empapando las células u organismos con ese dsRNA) o pueden ser expresados dentro del núcleo celular transfecando plásmidos que expresen precursores de los dsRNA^{14,26,38,46,75}.

De manera que, el uso del proceso de RNAi se ha extendido a diversas aplicaciones como el análisis de genomas completos como el del nemátodo *C. elegans*, en terapia génica en la que los principales avances se han dado en posibles tratamientos contra el cáncer y enfermedades virales, entre otras no menos importantes⁴⁶.

3.2 Interferencia por RNA en insectos

El silenciamiento de genes por RNAi a través de un dsRNA es un método poderoso para el análisis funcional de productos de genes específicos en una gran cantidad de organismos, incluyendo diferentes órdenes de insectos como Lepidópteros, Coleópteros y Dípteros.

En cultivos de células neuronales de *M. sexta* se disminuyó la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del receptor de acetilcolina nicotínico al 32 % de los niveles normales por la incubación de dichas células con el dsRNA específico⁷². En *Hyalophora cecropia*, se sabe que la *hemolina* miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas es necesaria para el desarrollo normal del embrión. La inyección de dsRNA específico contra esta proteína a pupas, demostró que su silenciamiento tuvo efectos en los embriones de la siguiente generación⁴. En *B. mori* en el que se analizó el silenciamiento del gen “white” por la inyección de dsRNA en huevos, se observó que el fenotipo es similar al de los mutantes de ese gen⁶¹.

La utilización de la estrategia de RNAi para el estudio de la liberación del esperma en los testículos del lepidóptero *S. littoralis*, permitió observar que la disminución en la cantidad de RNAm de actina en los tejidos testiculares estuvo involucrada en la disminución de la liberación del esperma³⁷. En el lepidóptero *Plodia interpunctella*, se demostró que el silenciamiento de la enzima triptófano oxidasa a través de RNAi durante el desarrollo embrionario resultó en la pérdida de pigmentación del ojo. Sin embargo, menos del 5% de los embriones inyectados con dsRNA desarrolló un fenotipo con coloración del ojo disminuida o sin coloración alguna²⁸.

Estudios más recientes han empleado el RNAi en lepidópteros, por ejemplo, para demostrar la importancia de una proteína de unión a carotenoides en la pigmentación de los capullos de *B. mori*, inyectando dsRNA específico en larvas de quinto estadio de desarrollo⁶⁸. Para investigar el papel de una integrina específica de los hemocitos de *M. sexta* en el proceso de encapsulación de camas de polímero, inyectando los dsRNAs específicos en larvas de cuarto estadio de desarrollo⁴⁷. En otro análisis, la inyección de dsRNA a larvas de quinto estadio de desarrollo de *M. sexta* permitió determinar que el silenciamiento independiente de tres proteínas encargadas de mediar la respuesta inmunológica contra patógenos, incrementa la susceptibilidad del insecto al patógeno *Photobacterium* sp.²⁷.

Con respecto al silenciamiento de las proteínas receptoras de las toxinas Cry en insectos lepidópteros, Rajagopal *et al.* (2002)⁶², demostraron que el silenciamiento de la expresión de la APN4 de *S. litura* por RNAi, a través de la inyección de un fragmento de dsRNA de 756 pb, redujo la sensibilidad de estos insectos a la toxina Cry1Ca. Estos resultados involucran directamente a la APN como receptor de las proteínas insecticidas de *Bt*. Sin embargo, en ese estudio se utilizaron larvas de quinto estadio de desarrollo (previamente inyectadas con el dsRNA) para probar la sensibilidad a la toxina Cry1Ca y la susceptibilidad de estos estadios larvarios es muy baja. Finalmente, también se observó 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. Este trabajo es muy interesante porque demuestra que la técnica de RNAi puede ser utilizada para silenciar los receptores de toxinas Cry y evaluar su papel en el mecanismo de acción de estas toxinas.

3.3 *Manduca sexta* como modelo de estudio

M. sexta se ha convertido en un insecto modelo invaluable para la investigación científica, ha sido el sujeto de años de investigación que van desde estudios de desarrollo, hasta procesos bioquímicos y genéticos. Actualmente es el insecto modelo para estudiar el mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bt* en Lepidópteros.

- **Taxonomía**

Nombre científico: *Manduca sexta*, Linnaeus, 1763

Nombre común: Cachudo del tabaco

Orden: Lepidoptera

Familia: Sphingidae, Latreille, 1802

Subfamilia: Sphinginae, Latreille, 1802

Tribu: Sphingini, Latreille, 1802

Género: *Manduca*, Hubner, 1807

Especie: *sexta sexta*, Butler, 1877

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

- **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. 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 la hemolinfa poseen una proteína azul llamada insecticianina, entonces, los pigmentos amarillos ligan a las proteínas azules creando el color verde. Sin embargo, en el laboratorio la ausencia de carotenoides en la dieta artificial provoca que las larvas mantengan un color azulado. En el caso del consumo de la planta del tabaco, interesantemente, a pesar de que la nicotina presente en la hoja es normalmente tóxica, las larvas no son dañadas, ya que poseen un mecanismo para separarla selectivamente y secretarla.

- **Ciclo de vida**

A partir del huevo, después de 3 a 5 días emerge la larva de primer estadio, que se alimenta y crece rápidamente; de un estadio de desarrollo a otro cambia de cutícula 4 veces y transcurren de 3 a 4 días en cada uno de ellos. La larva de quinto estadio de desarrollo (L5) bajo las condiciones adecuadas 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 (Figura 9).

Es susceptible a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac que produce *Bt*.

- **Distribución**

Este insecto se distribuye en una gran variedad de hábitats, desde el norte de Estados Unidos, hasta Argentina

- **Daños al ambiente**

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.

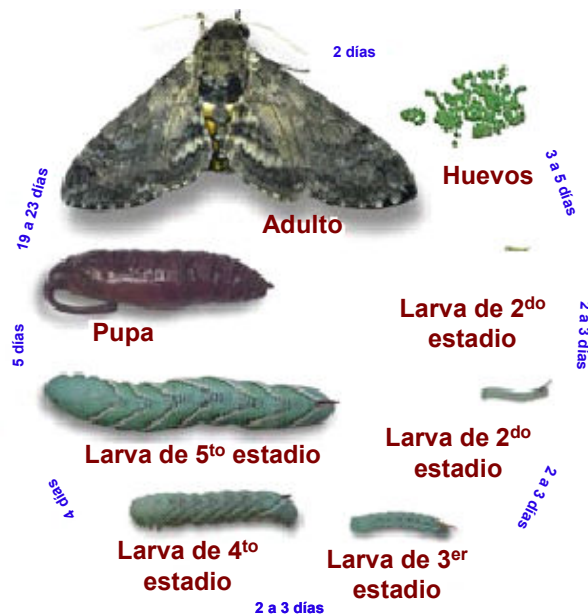


Figura 9. Ciclo de vida de *Manduca sexta*. Tomado y modificado de <http://insected.arizona.edu/manduca/Activities.html>, 07 de junio de 2006

4.0 HIPÓTESIS

Si las proteínas Bt-R₁ y APN actúan de manera secuencial en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A de *B. thuringiensis*, entonces la ausencia de alguna de ellas evitará la acción insecticida de dichas toxinas en el lepidóptero *Manduca sexta*.

5.0 OBJETIVO GENERAL

Validar el modelo de participación secuencial de los receptores Bt-R₁ y APN en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1A en *Manduca sexta*.

6.0 OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Analizar el papel de cada uno de los receptores (Bt-R₁ y APN) de la toxina Cry1Ab en *M. sexta*.

Para esto vamos a silenciar la expresión de los receptores de toxinas Cry utilizando la técnica de RNAi cumpliendo con las siguientes metas.

- A. Seleccionar regiones de los genes de Aminopeptidasa N y Bt-R₁ de *M. sexta* para la síntesis de dsRNA.
- B. Sintetizar los RNAs de doble cadena (dsRNAs).
- C. Inyectar los dsRNAs obtenidos en diferentes estadios de desarrollo de *M. sexta* como huevos, larvas, pupas y adultos
- D. Seleccionar las larvas por resistencia a la toxina Cry1Ab.
- E. Analizar el silenciamiento de las proteínas Bt-R₁ y APN de *M. sexta* por medio de inmunodetección específica para cada una de ellas
- F. Determinar el efecto del silenciamiento de los receptores en la susceptibilidad a la toxina Cry1Ab.

2.- Analizar la unión de la toxina Cry1Ab a VMMA's de intestino de *M. sexta* y determinar su localización en membrana insoluble o soluble.

3.-Analizar la unión y localización de la toxina Cry1Ab a VMMA's que carecen de proteínas ancladas por GPI.

4.- Bloquear la interacción de la toxina Cry1Ab con los receptores Bt-R₁ y APN y analizar el efecto en la localización de la toxina en membrana insoluble o soluble.

7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Insectos y aislamiento de intestinos

Las larvas de *M. sexta* se mantienen en dieta artificial a una temperatura de 25°C, con humedad relativa del 70% y un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Para la disección de intestinos se emplearon larvas de cuarto estadio de desarrollo (L4) que se incubaron en hielo por 15 min. La larva se fijó de los extremos en una placa de unicel con alfileres entomológicos. Se extrajo únicamente la región media del intestino eliminando los tres primeros segmentos cefálicos y dos de los segmentos caudales por corte transversal; se separó el intestino de la cutícula y se hizo un corte longitudinal en la región dorsal para remover la comida y la membrana peritrófica. El tejido se lavó con solución I (Manitol 300 mM, Tris- HCl 17 mM, EGTA 5 mM, DTT 2 mM, Fluoruro de fenilmetilsulfoni (PMSF) 0.5 mM a pH 7.4), se depositó en un tubo falcon de 15 ml y se almacenó a -70°C.

7.2 Aislamiento del RNA total

A partir del tejido de intestinos recuperado de *M. sexta*, se aisló el RNA total siguiendo el protocolo reportado por Chomczynski *et al.* (1986)¹⁵. El cual consta de cinco pasos principales:

1. Extracción en Solución D [(Tiocianato de guanidina 4 M, Citrato de sodio 25mM pH 7.0, Sarcosil 0.5% y 2-mercapto etanol (2-ME) 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 con un volumen de isopropanol.
3. Reprecipitación en solución D y un volumen de isopropanol.
4. Lavado con etanol al 75%
5. Solubilización en SDS al 0.5%

7.3 Purificación de esporas-cristal de toxina Cry1Ab

La cepa de *B. thuringiensis* que expresa la toxina Cry1Ab se activó en medio de esporulación (SP) o medio HCT sólido con 10 µg/µl de eritromicina (Anexo 1), por incubación de 12 h a 30°C.

Posteriormente, se la cepa sembró en medio SP o HCT sólido con eritromicina (10 µg/µl) a 30°C hasta la fase de esporulación (entre 72 y 92 h después).

El cultivo se recuperó con un asa en 30 ml de H₂O Mili Q tridestilada y se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min.

La pastilla se resuspendió y se lavó en 0.3 M NaCl, 0.01 M de EDTA pH 8, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Este lavado se repitió 3 veces eliminando el sobrenadante en cada uno.

Posteriormente se resuspendió y se lavó la pastilla con H₂O y PMSF 1 mM. Por 3 veces a la misma velocidad y el mismo tiempo que los pasos anteriores. Finalmente, la pastilla se resuspendió en H₂O, se hizo la cuantificación de proteína y se distribuyó en alícuotas de 100 µg que se almacenaron a 4°C.

7.4 Purificación de cristales por gradiente discontinuo de sacarosa

La pastilla recuperada en el procedimiento anterior se resuspendió en 5 ml de buffer TTN (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.1% de Triton X-100, pH 7.2) y se sonicó dando tres pulsos de 20 watts durante 50 segundos con un minuto de incubación en hielo entre cada uno.

Para el gradiente discontinuo se prepararon soluciones al 67, 72, 79 y 89% de sacarosa. En tubos de polialómero para ultracentrífuga (Beckman Instruments Inc., Palo alto, CA, USA) se añaden 3 ml de cada solución a partir de la mayor concentración y finalmente se agregó 5 ml de la muestra de esporas-cristal resuspendida en el buffer TTN; los gradientes se centrifugaron a 23, 000 rpm durante 20 min a 4°C. Se recuperó cada una de las fracciones y se lavaron 3 veces con Tritón X-100 0.01% (centrifugando a 10,000 rpm durante 10 min). Las pastillas obtenidas de cada fracción se resuspendieron en Tris-HCl 1M, pH 8.0 y la presencia de los cristales en las diferentes fracciones se determinó por observación al microscopio óptico. Finalmente las fracciones que contenían los cristales se lavaron exhaustivamente con agua milli-Q y para su conservación la pastilla final se resuspendió en agua milli-Q con 1mM de PMSF, se hizo la cuantificación de proteína y se almacenó en alícuotas de 100 µg a 4°C para su uso posterior.

7.5 Solubilización de cristales

Los cristales purificados por gradiente discontinuo de sacarosa se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min, la pastilla se resuspendió en 500 µl de Buffer de solubilización 1X (Na₂CO₃ 0.1M, NaHCO₃ 0.1M, pH 10.5 y 2-ME al 0.02%) y se incubó a 37°C durante 2 h a 60 rpm. Posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm, durante 10 min. El sobrenadante que contiene la protoxina soluble se separo de la pastilla y ambas muestras se analizaron mediante una electroforesis en gel de dodecyl sulfato de sodio-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE).

7.6 Activación de protoxina con VMMA's

Se empleó buffer de carbonatos pH 10.5 con 0.01 % de 2-ME. La protoxina se centrifugó a 14, 000 rpm durante 10 min, posteriormente se mezclaron 10 µg de VMMA's con 100 nM de protoxina solubilizada. Se incubó 15 min a temperatura ambiente (TA) y después se inactivaron las proteasas con PMSF a una concentración final de 1 mM. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se conservaron a 4°C hasta su uso.

Una pequeña muestra de sobrenadante y de la pastilla resuspendida en agua, se resolvieron en un SDS-PAGE para verificar el proceso de activación por inmunoblot con anticuerpo específico anti-toxina.

7.7 Purificación de VMMA's sin inhibidores de proteasas

La purificación de VMMA's a partir del tejido de intestino medio de larvas L3 de *M. sexta* (previamente extraídos sin inhibidores de proteasas), se realizó mediante el protocolo reportado por Wolfesberger *et al.* (1987)⁷³.

1. 3 g de intestinos de *M. sexta* previamente descongelados en hielo se colocaron en el tubo homogenizador estéril y preenfriado a 4°C. Se agregaron 30 ml (dilución a 1:10 p/v) de solución I (Manitol 300 mM, Tris-HCl 17 mM ajustado a pH 7.4).
2. Se montó el émbolo de teflón estéril y preenfriado a 4°C en un taladro eléctrico (Black and Decker U-114 tipo FV). Se dieron 9 repeticiones de 2,250 rpm a los intestinos, que se resuspendieron en 30 ml de MgCl₂ 24 mM.
3. El homogenizado se mezcló 4 veces por inversión; la mezcla se incubó en hielo durante 15 min, empleándose un volumen de 100 µl para hacer las mediciones correspondientes de este primer homogenizado.
4. Posteriormente se centrifugó a 4,500 rpm por 15 min a 4°C (rotor Beckman JA-20 de ángulo fijo) desechándose la pastilla.
5. El sobrenadante se cambió a otro tubo estéril y se centrifugó a 16,000 rpm por 30min a 4°C usando el equipo antes descrito, la pastilla resultante se resuspendió en medio volumen de la solución I preenfriada a 4°C y medio volumen de MgCl₂ 24 mM.
6. Se repitieron los pasos 4 y 5 y la segunda pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de solución I preenfriada a 4°C y diluida (1:1) con agua destilada estéril.

Finalmente, la muestra se almacenó en alícuotas de 100 µg a -70°C.

7.8 Ensayo de cuantificación de proteína

Después del tratamiento de diálisis, se determinó la concentración de proteína de las VMMA's utilizando el método de Lowry⁵².

Se midió en el espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Ultrospect II, Pharmacia, USA) la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm de 3 µl del homogenizado inicial de los intestinos y de las VMMA's obtenidas; se emplearon los reactivos de ensayo de proteína de BIO-RAD (D_c Protein assay, BIO-RAD, Hercules, CA, USA). La curva de referencia se hizo con albúmina sérica bovina (BSA).

7.9 Ensayo de actividad enzimática específica para APN

Para calcular la actividad enzimática específica de APN se empleó como sustrato la L-Leucina p-nitroanilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). La cinética de la reacción se siguió en intervalos de 10 s durante dos minutos en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, DU[®] 650 Spectrophotometer, USA) a una longitud de onda de 405 nm) midiendo contra tiempo la liberación de p-nitroanilina.

Con los datos de absorbancia se calculó la actividad específica de APN, empleando el software de Sigma-plotTM (Sigma plot, versión 8.0) tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar de la p-Nitroanilina a 405 nm ($\epsilon=10,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y considerando una unidad enzimática como la cantidad de proteína necesaria para transformar 1 nmol de p-nitroanilina por minuto.

7.10 Ensayo de actividad enzimática específica para Fosfatasa Alcalina

Se calculó la actividad de fosfatasa alcalina en presencia y ausencia de Triton X-100 para determinar la orientación de la enzima en las VMMA's.

Se prepararon las soluciones: I (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 0.5 mM, se ajustó a pH 9.5), II (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 0.5 mM Tritón X-100 a 0.02 %, se ajustó el pH a 9.5), III (EDTA 250 mM se ajustó a pH 8.0).

El sustrato de la fosfatasa alcalina se preparó a una concentración de 50 mM en solución I y en solución II.

Para la curva de referencia se empleó p-nitrofenol fosfato (Merck) en solución I. Se tomaron 20 µg de proteína de cada muestra (homogenizado inicial y VMMA's) y se completó un volumen de 500 µl con solución I e independientemente con la solución II, se agitó e incubó 15 min. a temperatura ambiente. Se agregaron 500 µl de Sol III para detener la reacción y se agitó y se leyó la absorbancia a 405 nm.

La actividad específica de fosfatasa alcalina, se calculó considerando una unidad enzimática como la cantidad de proteína necesaria para transformar 1nmol de p-nitrofenol fosfato por minuto.

7.11 Ensayo de corte de GPI de APN con PI-PLC en VMMA's

Para cortar las proteínas ancladas a la membrana por GPI se centrifugaron 100 µg de VMMA's a 95, 000 rpm, 1 h a 4°C, se separó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS), se cuantificó proteína y actividad específica de APN (protocolo previamente descrito). Se tomaron 100 µg de proteína total de VMMA's y se trataron con una unidad de enzima PI-PLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se incubó 2 h a 30°C y 50 rpm. Se agregó 1 mM de PMSF, se centrifugó 30 min a 95, 000 rpm a 4°C, se separó el sobrenadante de la pastilla y en ambos se cuantifico proteína y actividad específica de APN y se hizo la inmunodetección de APN.

7.12 Purificación de microdominios de membrana de VMMA's por gradiente de iodixanol

Las VMMA's se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C, se separó el sobrenadante de la pastilla, esta última se solubilizó en 360 µl de Triton X-100 al 1% en buffer TNE (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 7.4, preenfriado), durante 30 min a 4°C.

La muestra de VMMA's solubilizadas se ajustó a 40% de iodixanol con 715 µl de Opti-Prep™ al 60 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y se depositó en un tubo de polialómero de 5 ml para ultracentrifuga (Beckman). Posteriormente, se agregó al tubo 3 ml de Opti-Prep al 30% en TNE (despacio y por la pared del tubo), finalmente, se cubrió con 500 µl de buffer TNE. Los tubos se equilibraron en las camisas del rotor de ángulo libre de la ultracentrifuga. Se centrifugaron a 47,000 rpm durante 2 h a 4°C.

Las fracciones obtenidas del gradiente se separaron de arriba hacia abajo. Se desecharon los primeros 300 µl del TNE, en la siguiente fracción (1) de

aproximadamente 550 μ l se observó una capa blanquecina que es la fracción insoluble de las membranas (las balsas lipídicas o microdominios de membrana de las VMMA's). La siguiente fracción (2) fue de aproximadamente 2 ml (corresponde al 30% de Opti-prep). En la fracción más densa (3) de aproximadamente 1.2 ml, se observó otra ligera capa blanquecina en la interfase del 30 y 60% de Opti-Prep que corresponde a la región soluble de las membranas. Se cuantificó la cantidad de proteína y la actividad de APN a cada fracción.

7.13 Inmunoblot (Western-blot)

Para la detección de proteína por inmunoblot, se utilizaron 10 μ g de proteína total de la muestra a analizar que se separaron mediante SDS-PAGE al 9%, a 8 mA durante 1 h y a 16 mA durante 2 h más. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (HybondTM-ECLTM, Amersham Biosciences, Germany) a 350 mA por 1 h a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó durante 1h con PBS 1X / Tween-20 0.05% y leche descremada al 5%. Una vez que se bloqueó la membrana, se lavó con buffer PBS 1X / Tween-20 0.05%, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Anticuerpo policlonal anti-Bt-R₁ dilución 1:500 o Anticuerpo policlonal anti-APN1 dilución 1:10,000) por 2 h. Posteriormente, la membrana se lavó cinco veces más como se mencionó anteriormente. Finalmente, se incubó 10 min con solución amortiguadora PBS 1X. Se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Sigma Inmuno Chemicals, Sigma) para inmunodetectar a las proteínas. Para revelar con los reactivos luminiscentes, la membrana fue incubada con el sustrato del paquete de SuperSignal (SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA) y la señal emitida se detectó con película fotográfica para quimioluminiscencia (HiperfilmTM, Amersham Biosciences, UK).

7.14 Ensayo de unión de ligando (Ligand-blot)

En un SDS-PAGE al 9% se separaron las VMMA's de interés y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (como se explicó anteriormente). Después, la membrana se incubó en 40 ml de PBS 1X durante toda la noche, posteriormente, se lavó con 40 ml PBS-Tween 20 0.1% durante 15 min, se bloqueó con 50 ml PBS-Tween 20 0.1% y BSA 1% durante 1 h, se lavó 2 veces con 40 ml de PBS-Tween 20 0.1% durante 15 min, se lavó dos veces más con 30 ml de PBS-Tween 20 0.1% durante 5 min y finalmente con 30 ml de PBS-Tween 20 0.1% y BSA 0.2% durante 10 min. Después, se incubó con toxina Cry1A marcada con biotina en el buffer anterior a TA durante 2 h, se enjuagó con PBS-Tween 20 0.1% y se lavó con 40 ml de PBS-Tween 20 0.1% durante 15 min y con 30 ml de PBS-Tween 20 0.1% durante 5 min, se incubó con estreptavidina acoplada a peroxidasa (SAPO) en una proporción 1:3,000) en PBS-Tween 20 0.1% durante 1 h. Finalmente la membrana se enjuagó 4 veces con PBS-Tween 20 0.1%, se lavó con 40 ml PBS 1X durante 15 min y 2 veces con 30 ml PBS 1X durante 5 min para terminar con la detección de la unión con los reactivos de quimioluminiscencia.

7.15 Diseño de oligonucleótidos

Para diseñar los oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del gen de la APN1 y otro de la APN2, primero se hizo el alineamiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Una vez elegidas las regiones, se emplearon los programas Oligo 4 y Gene Works. En los oligonucleótidos diseñados se incluyeron los sitios de restricción (*Xba* I y *EcoR* I) para su clonación en el vector pLITMUS 28i (Logical *In vitro* Transcription, Multiple Unique Sites, HiScribe™ RNAi Transcription Kit, USA, para detalles particular del vector ver anexo 2).

7.16 RT-PCR

Se sintetizó el cDNA empleando los oligonucleótidos específicos previamente diseñados para el gen de APN1 y el RNA total aislado del intestino de larvas L3 de *M. sexta*. La síntesis de cDNA fue realizada empleando un sistema comercial para RT-PCR (AMV) [First Strand cDNA síntesis. Kit for RT-PCR (AMV), Roche, Germany] bajo las instrucciones del fabricante. La clonación del fragmento de APN2 queda pendiente para análisis posteriores.

7.17 PCR

Los productos obtenidos en la reacción de RT-PCR fueron tomados como templados para amplificar los fragmentos deseados mediante PCR, utilizando los pares de oligonucleótidos correspondientes.

Los productos de la amplificación se verificaron en un gel de agarosa al 1% de donde posteriormente se purificaron usando el sistema de purificación de PCR (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany), siguiendo el protocolo del fabricante.

7.18 Clonación

El fragmento amplificado de APN1 se digirió con las enzimas de restricción *Xba* I y *EcoR* I. El vector empleado para la clonación del fragmento del gen de APN1 fue el pLITMUS 28i. Este vector se digirió con las enzimas *Xba* I y *EcoR* I para clonar el fragmento de APN1 y después se purificó empleando el sistema de purificación de PCR (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany), bajo las instrucciones de fabricante.

El producto de la digestión purificado, se verificó en un gel de agarosa al 1%.

Posteriormente, se hizo la reacción de ligación con la enzima T4-DNA ligasa.

Para el caso de Bt-R₁, ya se tenía la clona construida en el mismo vector, conteniendo un fragmento de 441 pb que abarca del nucleótido 219 al 660 del gen que está flanqueado también por los sitios de corte para *Xba* I y *EcoR* I.

7.19 Transformación

La cepa bacteriana que fue empleada para la transformación por electroporación fue *Escherichia coli* XL1-Blue. Se emplearon 50 µl de células y 7 µl de la reacción de ligación; después del electroshock las células se

incubaron en 1ml de medio de cultivo líquido Luria-Bertanni (LB) a 37°C durante 1 h con agitación a 250 rpm.

Después de la incubación, 100 µl de este cultivo líquido se sembraron en placas de cultivo LB, con ampicilina (100 µg/ml), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración final de 20 µg/ml e isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a 20 mM.

Las placas se incubaron a 37°C toda la noche para la selección por complementación α. Las colonias que contenían plásmidos recombinantes permanecieron blancas y las colonias con plásmidos religados fueron azules. Se inocularon 5 colonias blancas individuales 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 siguiendo el protocolo del sistema de purificación de DNA de Quiagen^R (QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany).

Una vez que se obtuvo la clona con el fragmento de DNA de APN1, se hizo una reacción de restricción empleando las enzimas para los dos sitios que flanquean el inserto para verificar el tamaño del fragmento liberado.

7.20 Síntesis de RNA de doble cadena

Para la reacción de transcripción *in vitro*, inicialmente se utilizó como templado la clona con el fragmento de APN1, empleando oligonucleótido T7 específico para los promotores T7 que posee el vector LITMUS 28i, la enzima Vent-polimerasa y en una reacción de amplificación por PCR.

El producto de PCR se purificó usando el sistema de purificación de PCR (QIAquick PCR Purification Kit Protocol, Quiagen^R GmbH, Germany), siguiendo el protocolo del fabricante, verificándose el tamaño en un gel de agarosa al 1%.

EL producto de PCR puro se empleo como templado en la reacción de transcripción *in vitro* con el sistema de transcripción HiScribeTM (HiScribeTM, RNAi Transcription Kit, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 10).

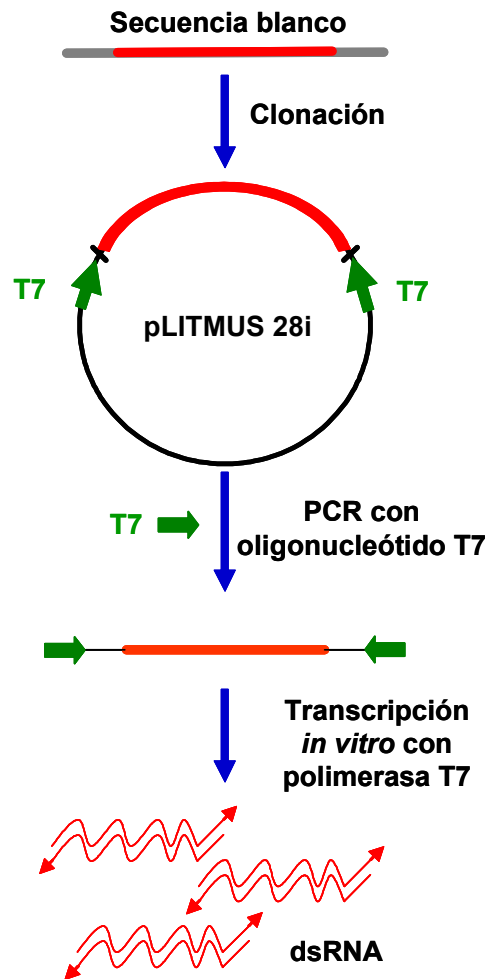


Figura 10. Representación gráfica de la síntesis del dsRNA. Réplica modificada de HiScribe™ RNAi Transcription Kit.

7.21 Inyección de dsRNA a huevos, larvas, pupas y mariposas de *M.*

sexta

Los experimentos de inyección 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) usando un microscopio de disección (Nikon, SM2800, Japan). Los detalles del equipo se describen en el anexo 3.

Para el procedimiento de inyección se llenó el capilar de vidrio con aceite mineral con la ayuda de una jeringa de aguja larga (12 cm.). 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 el capilar, asegurándose de que no quedara ninguna burbuja de aire dentro. El microdispensador se montó en el micromanipulador.

El dsRNA a inyectar se colocó sobre papel parafilm (Parafilm “M”^R, Laboratory Film, American National CanTM, Chicago, USA), se cubrió con aceite mineral ligero, posteriormente y se cargó dentro del capilar.

Para la inyección de huevos de *M. sexta*, éstos fueron colectados en las primeras 4 horas después de la ovoposición, lavados durante 30 segundos en una solución al 6% de cloro y agitación de 70 rpm y enjuagados con agua destilada por 1 min. Empleando un pincel los huevos se colocaron en un recipiente de plástico con hendiduras en las que se depositó cada huevo para ser inyectados con el dsRNA correspondiente, hundiendo el capilar justo después de traspasar el corion (capa sólida de la superficie) del huevo. Los huevos inyectados se conservaron bajo las condiciones del laboratorio hasta su eclosión.

Igualmente, se inyectaron larvas de primer estadio de desarrollo (L1) de *M. sexta* dentro de las primeras doce horas después de la eclosión del huevo. Las larvas se incubaron en hielo 5 min antes de la inyección. Con el micromanipulador se colocó la punta del microdispensador en la superficie de la cutícula de la larva en la región ventral media y se introdujo el capilar hasta el hemocele donde se inyectó cada dsRNA. Las larvas inyectadas se mantuvieron en condiciones de laboratorio con dieta artificial durante las 12 h posteriores a la inyección.

Además, se inyectaron pupas hembras de *M. sexta* durante la primeras horas del proceso de pupación. Las pupas se fijaron por la parte ventral con cinta adhesiva en un portaobjetos. El dsRNA correspondiente se inyectó en el segundo segmento de la región dorso lateral en posición paralela a la de la pupa introduciendo una jeringa para la aplicación de insulina de aguja ultrafina (Becton Dickinson & Co. ^{MR}, ULTRA-FINE ^{MR} II, USA) de 0.5 ml. Después de completar el proceso de metamorfosis (19 a 23 días), las hembras se reunieron con mariposas machos sin ningún tratamiento. Los huevos obtenidos se cuantificaron y se determinó el porcentaje de eclosión con respecto a los obtenidos de padres no tratados. Las larvas se sometieron a diferentes procesos de selección y análisis.

Para la inyección de hembras adultas se emplearon las jeringas ya mencionadas, introduciendo el dsRNA en el tercer segmento de la región dorsal. Después de 12 h de la inyección, se reunieron con mariposas macho sin ningún tratamiento. Se cuantificó el número de huevos ovopositados y las larvas obtenidas fueron sometidas a proceso de selección y análisis.

7.22 Ensayo *in vivo* con toxina Cry1Ab en larvas con tratamiento de dsRNA de Bt-R₁ y APN

Para seleccionar larvas tratadas con dsRNA de Bt-R₁ y APN con efecto sobre la toxicidad de Cry1Ab. Inicialmente se hizo un bioensayo, en el que se probaron diferentes dosis de esporas-cristal de toxina Cry1Ab empleando larvas neonatas inyectadas únicamente con H₂O durante 5 días y se eligió la dosis que matara el 100 % de las larvas. Con dicha dosis se retaron: a) las larvas neonatas que eclosionaron de huevos inyectados, b) las larvas inyectadas con dsRNA en L1 y que sobrevivieron a las 12 h y c) larvas neonatas obtenidas de pupas y adultos hembras tratadas con dsRNA.

Para los bioensayos se emplearon cajas de plástico con 24 pozos de 2 cm² (Corning) que se llenan con dieta artificial aproximadamente a la mitad (1 cm).

Una vez que solidificó la dieta, en cada pozo se depositó la dosis de esporas-cristal de la toxina Cry1Ab en un volumen de 35 μ l y se dejaron secar a TA en la campana de flujo laminar. Finalmente, en cada pozo de la caja de bioensayo se colocó una larva y se selló totalmente con plástico. Las cajas se mantuvieron a TA durante 5 días.

7.23 Análisis de la expresión de Bt-R₁ y APN en larvas tratadas con dsRNA

Todas aquellas larvas que sobrevivieron a la dosis de toxina aplicada, fueron disectadas para extraer el intestino, el cual fue homogenizado como se mencionó anteriormente. A cada muestra de intestino se le cuantificó la cantidad de proteína total por el método de Lowry y se analizó la presencia de la proteína de interés por inmunoblot con los anticuerpos específicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis del papel de Bt-R₁ y APN1 en la toxicidad de Cry1Ab

Para analizar el papel de las proteínas identificadas como receptores de las toxinas Cry1 en lepidópteros y su posible participación secuencial en el mecanismo de acción insecticida, se planteó silenciar la expresión de las proteínas Bt-R₁ y APN del lepidóptero *M. sexta*, empleando la interferencia por RNA, gracias a la inyección de dsRNAs específicos para cada una de estas proteínas.

En el caso de Bt-R₁, ya se contaba con la clona de un fragmento de 441 pares de bases (pb) que va del nucleótido 219 al 660 del extremo 5' de la secuencia del gen.

Para el diseño del dsRNA de la APN, partimos con el conocimiento de que *M. sexta* expresa cuatro APNs diferentes. Sin embargo, sólo se había caracterizado a la APN1 y 2 y se sabía que ambas unen a la toxina Cry1Ab de *Bt*, por lo que se decidió sintetizar dsRNA de APN1 y APN2 para probar el silenciamiento independiente de cada una y determinar cuál de las dos APNs presentes en *M. sexta* funciona como receptor de la toxina Cry1Ab de *Bt* y si sólo una de ellas es suficiente para la actividad insecticida de las toxinas.

Inicialmente, se hizo un alineamiento de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas APN1 y APN2 de *M. sexta*, con el programa ClustalW, determinándose un porcentaje de identidad del 21 % a nivel de secuencia de aminoácidos.

Así mismo, en la secuencia de nucleótidos se identificaron el péptido señal de transporte en el N-terminal, el sitio de inicio de la traducción, el residuo N-terminal de la proteína madura, los sitios de glicosilación, el sitio catalítico y de unión de la actividad enzimática, el péptido consenso de proteínas ancladas por GPI, así como su secuencia de corte y el sitio de unión similar al de la toxina Cry1Aa en *B. mori* (Figura 11). En general, no se ha descrito en que difieren estas dos APNs de *M. sexta*, ya que no se conoce la estructura, y cómo se mencionó anteriormente únicamente se ha descrito que la APN1 une a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac y la APN2 a la toxina Cry1Ab.

Hasta el momento existen dos reportes de silenciamiento de APNs, pero solamente uno de ellos fue con la finalidad de probar la actividad de toxinas Cry en el lepidóptero *S. litura* (Rajagopal *et al.*, 2002)⁶². Los dsRNAs inyectados abarcaban una región del 756 pb del gen de APN, que va del aminoácido 609 al 861 de la proteína⁶². En ese reporte, los insectos que carecían de la proteína seguían siendo viables y fértiles, pero desarrollaron cierta resistencia a la toxina Cry1C. En este estudio se utilizaron larvas de quinto 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 los últimos estadios de desarrollo larvario, la susceptibilidad a la toxina es mucho menor que en los estadios más tempranos. En el segundo reporte se silenció la APN1 de *B. mori*, únicamente como control de silenciamiento de otras proteínas⁶⁸.

Los oligonucleótidos específicos para amplificar una región de la APN1 en *M. sexta*, se diseñaron tomando en cuenta la región correspondiente a la reportada por Yaoi *et al.* (1999)⁷⁴, que une a la toxina Cry1Aa en la APN de *B. mori* y que es la misma región localizada por Nakanishi *et al.* (1999)⁵⁹, que une la toxina Cry1Aa en la APN de *P. xylostella* (64 aminoácidos desde la Isoleucina 135 a la Prolina 198, localizados cerca del amino terminal y que no conforman el sitio de unión a Zinc y el dominio catalítico). Los oligonucleótidos diseñados permiten amplificar una región de 937 pb que van del nucleótido 488 al 1406 en la secuencia nucleotídica de APN1.

Para el caso de APN2, los oligonucleótidos diseñados se hicieron considerando la región con menor identidad entre la APN1 a nivel de nucleótidos, esperando amplificar una región de 481 pb que va del nucleótido 61 al 523 (la secuencia de los oligonucleótidos específicos se representa en la Figura 10, las flechas con líneas punteadas representan los oligonucleotidos de APN2).

APN1	GTTTACCATTCTTGGGGTCGCCCTTCTCCAGGGCGTTCTTACTTTGAGCCCCATACC	60
APN2	-----GCGTCCGAATACATATACAATATGTTACTACTAATATTCTGGC	44
	* * * * *	
APN1	CGTCCCAGAAGAAGAATGGGCCGAATTCTCCAGAATGCTGCGGGACCCGAGCTACCGCCT	120
APN2	--TCTCATCGGAGCGCGTTTGGTGTCCCACTGAGCACC-----AACGAAGACAGCAC-T	96
	* * * * *	
	-----▶	
APN1	GCCTACTACCACCCGGCCAAGACATTACGCTGTGACCCTGACTCCATACTT---TGACG	176
APN2	AGAAACCAAACCTAGCTGCGCTAT-ACGTCCTGCCTCAGACTTCCTACCCGACGTTCTA	155
	* * * * *	
APN1	TGGTACCTGCTGGTGTACGCGCCTTAC--CACCTTCAGCTTTGACGGCGAGGTCACCA	233
APN2	TGACGTCCGTCTCT-TCATCGATCCTGGATACACCGAAGCATTCCATGGAAACGTTTCCA	214
	* * * * *	
APN1	TCTACATATCGCCCACTCAAGCTAATGTTAATGAGATCGTCCTCCACTGCAATGACT-TG	292
APN2	TCAGGATAATCCCCA---ACATCAACATTGATCAGATCACCATCCA-TGCCATGGCTATG	270
	* * * * *	
APN1	ACGATACAGAGTCTGAGGGTAACATATGTTAGTGGTAATAGTGAGGTGGATATCACGGCA	352
APN2	AGAATCGACTCGATCAGAGTTGTCAGTGATGTTAATCCTAATGAGGACTCTTCTCTGAC	330
	* * * * *	
APN1	ACTGGACAAACTTTTACGTGTGAGATGCCTACAGTTTCTCAGAATAAGGACCTCTACG	412
APN2	TTACAGCTGGCTACTGACGACCCCATCTCTTGACTATCAGGCTGACGAGGACACATCACC	390
	* * * * *	
APN1	CCTCTAGTGATGAACCAAGAGTATATTAACAGGAGTACCTTTAGAG-GCAACTTGACAGAC	471
APN2	GCCTTA-----CAACCCATGTTATCCATATTGATTATGTTGCACAATATGCCGA-	440
	* * * * *	
	-----▶	
APN1	TAACATGAGAGGGTTCTACAGAAGTTGGTACGTCGATAGAACCGGAAAGAGATGGATGGC	531
APN2	TGACATGTTGGCGTCTACGTTTCTACTTATGAGGAGAAATGGTAGGACAGTAAACCTCGT	500
	* * * * *	
APN1	TACCACCAATTCCAACAGGACATGCGCGTCAAGCGTTCCCTTGCTACGATGAGCCTGG	591
APN2	GACATCTCAACTGCAGCCTACTTTGCGCCGCGTGCCTTCCCTGCTACGATGAGCCGGC	560
	* * * * *	
	◀-----	
APN1	TTTCAAGGCCACCTTCGACATTACTATGAACAGAGAAGCCGACTTTAGCCCAGCCATATC	651
APN2	TTTAAAGCCGTTTTCAGAACCACCATCTATGCCCCAGCGGCTTACGCCACAGTCAGAAG	620
	* * * * *	
APN1	TAATATGCCTATTAGG-GCCACTACCAGCTCACGAATGGACGATTTCGGAAA---CA	706
APN2	CAACACTCTGAAAGGCGTGATCCCTCAAAC-CTAATGAGCCTGGCTACGTAAGCAGC	679
	* * * * *	
APN1	TTTTTCACCACCTCCCTTGACAT--CCACCTATCTCCTTCGCTTCATAGTCTCTCACTATC	764
APN2	AGTTCGAAGACACCCTGGTCCACCTACCTCATGCGCTACCTGGTCTCCAACCTTTA	739
	* * * * *	
APN1	AGTTCATTCTAACAACAACAATGCAGCACGCCCT-----TTAGAAATCTATGCACGTA	818
APN2	ACTACATCGAGAATTCCGAGAACCCATCTATCTATCCCTTCAGAGTCTACTCTAGGC	799
	* * * * *	
APN1	ATAATGTAGGGAGCCAGGGTGACTGGTCTCTTGAATGGGTGAGAACTGCTATTAGCTA	878

APN2 CTGGTACTCAGAATACCGCTGAGTTGCGCCTTGAGTTTGGCCAGCAAAACATGATTGCTC 859
 * * * * *
 APN1 TGGACAATTATACTTCAATACCTTATTACACGATGGCACAAAACCTTGATATGAAACAAG 938
 APN2 TGGAGGAGTACACCGAATTCCC-----GTACGTTTCCCAAA-----ATCGACAAGG 907

 APN1 CCGCCATTCCCGACTTCTCTGTGCTGTTGATGAAAACCTGGGGTCTCTTGACATACAGGG 998
 APN2 CTGCCGTTCCCTGACTTTGCTGTGTTGCCATGGAGAAGCTGGGGACTGGTTATTTACAGAG 967
 * * * * *
 APN1 AAGCC-CTCATCTTATACGACCCCTCAATTGGAACCATCACTACCGTCAGCGCGTAGCG 1057
 APN2 AGGTAGCCCTTCTCGTAAGGGAAGGTGTGACGACAACGTCGGTGAAG-CAGAACATTGGC 1026
 * * * * *
 APN1 AACATTGTCTCCACGAGATCGCTCACATGTGGTTCGGTAACCTTGTACATGCGCATGG 1117
 APN2 AGGATCATTTGCCACGAAAACCCACATGTGGTTTGGAAACGAAGTCGGACCTATGTCC 1086
 * * * * *
 APN1 TGGGATAACCTTTGGCTGAACGAAGGTTTTCGCGGTTCTCCAATACTACCTTACTGCA 1177
 APN2 TTGACCTACACTTGGCTCAACGAAGGATTCGCTAACCCTTCTTGGAGAAGCTACGCTACTGAT 1146
 *** * * * * *
 APN1 ACGGTCGACCCAGAGCTCGGTTATGAAATTCGTTTCCAGAGCAGCTT-CAAGTGGC 1236
 APN2 TTTGTCAGGCCGCGAG-TGGCGCATGA---TGGATCAGTTTGTGATCGCCATGCAGAAGCT 1202
 *** * * * * *
 APN1 GATGTTCTGTGACTCCGTAGACAGCGCCACGCTTACTGACACCAGTGTTAATGATCC 1296
 APN2 GTTCCAGTCAGACGCTGTTCTAAGTGTCAACCCCATGAC--GCACCG-GTCTATACTCC 1259
 * * * * *
 APN1 TGTGTCTGTGACGCTCACTTCTCAACAATCACTTACGCCAGGGGAGCCGCATCCTCAG 1356
 APN2 TTCCAGATCATCGGTACTTTCACGCGCTCGCTTACCAGAAGTCTGGTTCCGTTATTCCG 1319
 * * * * *
 APN1 AATGACACAGCATTTGTTGAGCTATGACACCTTCGTCAAAGGTCTTAGGCAGTATCTGCG 1416
 APN2 GATGTTGCAGCATTTTCATGACACCTGAGATCTTCAGGAGAGGTCT--GGT--CATCTACA 1375
 *** * * * * *
 APN1 TGCTCGACAATT-TGACGTGCGCAACCCCTACCACCTGTTCTCCGCTTTGGATGCTGC-- 1473
 APN2 TCAAAGCCAACCTCTCGCGCCGCTG--CCGCTCCCTCAGATCTCTACGTTGCCCTCCAGCA 1433
 * * * * *
 APN1 GGCTGCTGAAGACAATGCTCTCGCTGCTACAGAGGCATCACTATTGACGCTTACTTCCAG 1533
 APN2 AGCCCTCGATGAGTCCAGTCACAGAATCCCCAAACCCATCTCGACTATCA-TGACTGAAT 1492
 ** * * * * *
 APN1 GACTTGGTCAGAGAAGGCGGGACATCCCTTCTTTCAGTTACTGTTGATCATGAATCCGG 1593
 APN2 GGAGCACTCAGGAGGCTTCCCTGTCTCACTGTTAGGAGGACGGCGCCCA--ATGCTGA 1550
 * * * * *
 APN1 TCGTATGACTCTCGTTCAGGCAAGATGGGAGCGCAATACCGGTGTGTCTCGATTCCCGGG 1653
 APN2 CTCCGTGTTGTAGCCAGG-AACGTTACCTCACCG-ACCGTCTCTGAC-ATCCACTGA 1607
 * * * * *
 APN1 CTATGGCATATCCCTATCACATGGACAAGGGCTGGAGCCCCAGACTTCCAAAACCTGAA 1713
 APN2 CCGCTGGCACGTGCTGTAACCTGGGTTATATCCTCAAACGTCAACTTCAGTATATCCA- 1666
 * * * * *
 APN1 GCCTCGCAAGTTATGACTG--GACAGTCTTTA-----GTCATGAC--CGTGGTACCA 1763
 APN2 GCCTCAAGCTGATCCTGCCGACCTTCCCCGCCACCGCGTTGACGTTCTGGCCTCT 1726
 ***** * * * * *
 APN1 GAGGACAAGAGTGGGTCTCTTCAACAAGCAAGTATCAGTTTCTACCGTGTCAACTACG 1823
 APN2 CCAATGCTGATTGGTACATCTTCAACAAGCAGCAGACTGGCTACTACCGTGTCAACTACG 1786
 ** * * * * *
 APN1 ATAAATACCACCTGGGGTCTCATCAAGGGCTCTGAGGTCTGCGAACAGGACATTTATTTC 1883
 APN2 ACGTCGAAAACCTGGGTCGCTCTGGCGGAGTCTCAATAACTCTACGAGA---TCATCC 1843
 * * * * *
 APN1 ACGAATTGAGTCGCTCTCAGATAGTAGACGATGTCTTCCAACCTGGCTAGATCCGGCGTGA 1943
 APN2 ATGTCTCAACCGTCTCAGATTGTGACGACGACATTCAACTGGCCAGGAACGGACGTC 1903
 * * * * *
 APN1 TGTACATCAACAGCACTTAAACATTCTGCTCACTTGGAGATTCGAAGACGCGTACGCAC 2003
 APN2 TGCACTACAAAACGCCTTCGAAATCTCAAGATACTTGGAGATGGAAAAAGATTACATCC 1963
 ** * * * * *

APN1 CGTGGTTGTCCGCCATCAGCGGTTCAACTGGGTTCATCAGGAGATTCCGCCATGACGCCG 2063
 APN2 CATGGGTGCTGCCAACCTGCCTTCAACT-----ACTTGACAT-CGTCCTTAGTGGCG 2017
 *

APN1 CCAATT--TACAACTTTACAGA-ACCAAATCATCGGACTGAGCGAAGCTGTGGTGGCTC 2120
 APN2 CCAATTCTACAATCTGTACAGTACTACCTGCTCAACCTTACTTCTCTATGTTTCGAGG 2077
 *

APN1 GGCTTGGCTTACCCGAAGTATCCGGTGGTACTTATATGACCCGACCTCCAGAGTTCATG 2180
 APN2 ACCTTGGCTTGTATGTGAAATCTGGCGAAGAGTTCGTCACCTTACCCACGGAACATTA 2137
 *

APN1 TAATGCAGTTTCTCTGCAATGTGGACATCAGCAGTGCATTGACGCTGGAAGACAGAAT 2240
 APN2 TTCTGGACATTAACGCTGGTGTGGCAACCAGCGGCGATCAGCAG-GGCCAGGAAATC 2196
 *

APN1 TCTTGAAT---GGAGGAACCGGTAGCTTT-TATCCAGC--TAACATGCGTCCATGGGTG 2293
 APN2 CTGCAAGCTTTCAAGAATAACCTTAACCAGCGCCCCAACCTGACATCCAGACCTTGTC 2256
 *

APN1 TACTGCCTGCTTCTGTTACGGCTCTGCTGAGGACTTCAATTAATTCTGGAATCGTTAC 2353
 APN2 TACTGCTCCAGTCTACCGCGCTAACCTGGAGAACTCAACTCCTCTGGAACA--TGT 2314
 *

APN1 ATCGTAGAAGATCTG--TCTAATGAAAAGGTTGTGATGCTCGAAGCGCGGTTGCACGC 2411
 APN2 ATCTAGGCACGTCGACTCCAGCGAGCAGAGCATCTTGCTTAGTGCCTGGGACTGACTA 2374
 *

APN1 GTGACCAGGCCAGCTTGGAGAAGTCTTGAACGCTATCGTTTCTGGCAATGATGACGTC 2471
 APN2 GCAA-----TGCTGAACTCCTAATCTATCTG-AACCAAATCA 2413
 *

APN1 GACCACAGGATCATTCGAGTGCCTGAGCTCAGCTATCACATCCAACGACGTCAACACCA 2531
 APN2 T-CGACGATAACTCTGCACTGC---GAGAGCAGGACAGACACTCAAT--CGCGTCTCCG 2467
 *

APN1 TGAGAGCGTTCGACTGGTTGACCAAGAATGTAGATCAAATTACACGAACTCTTGGTAGTA 2591
 APN2 TCATCAACTCCAGCC--CTGA--AGGCATGAACGTCGCTTTGGAC-----TTTGTCTGTT 2517
 *

APN1 TCACCTCGCCGCTGAACACCATCAGAGCGCTCTCTTGACCCGAGGCACAGATGACTCAGG 2651
 APN2 GAAAACCTCCACAGAATAAACCAGGG-----TCCAGGCTCTTACAGGAACAATAACA 2572
 *

APN1 TACAACCTGGCTTGACGCAAAATCGTAACACCATCGGCGCTGCCTACAACACTGGCG-TG 2710
 APN2 TTCTGAACACCTTT--GCAAGACGACTGACCACAAGCGCTCATAATGAAAAAATCGATG 2629
 *

APN1 AACGGCATCGCCACATCGAGAGCTAATCTCCAGTGGTGGCGAACAAGATGTCTGAGTTC 2770
 APN2 AGCTGGTTCAGGCACACGAGAGC--ATCTTC-----TCAGC---CGGAGAGCGTGCCTCC 2679
 *

APN1 CTGCGCTTCTTCGAACTGGGT-TCGTGACGATGTTCTAGTGAAGCGACTACTGTTGC 2829
 APN2 AT-CGCCGCTATTAGAGAGAATATCGAGCCTCCATCGCT--TGGAGCAA-TAGCAATGC 2735
 *

APN1 GCCCCTGCCGAAACTACGGTACTCCCTTACCTTCCCTCCGACGGTAGCACCCGGCCGAC 2889
 APN2 AGGATCGTCGAAAATGGCTGA-----AAGAGAATTACGGGCCCAC 2776
 *

APN1 TACTCCAGCCCGGCTCAGGAAACATCGCCCGCTTTGAGCCTTGTGACCTCTGCTCCTCGTCAC 2949
 APN2 C-CAGTGGCGCCAAATCCTTAA---CCGCTGGATTACTGTTCTCATCTCTGCTTCTTTG 2831
 *

APN1 ACTTGCCATTAA-CATGGTAGCGTAAATATTATAAGCGTATTTTGTAATA-AATATTTA 3007
 APN2 GGCTATTTCAATCATTAGAATTTACTTATTGTAATTTTATAATTTTATAATAATTT 2891
 *

APN1 TTTAAGTGTATTTTATTTAAAACAAATCCGATTGTGCTCAAAGTCTAAGCAGTTGTTT 3067
 APN2 TACGATAAAATATTT--TTATACTTAAATTTTATAATTTTATACTTAATCTACTAATTTG 2949
 *

APN1 TGTAAATAAATATTTTATAAATGTAA 3095
 APN2 TGTAAATAAATATTTATAATATT--- 2973
 *

Figura 11. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de APN1 y APN2 de *M. sexta*. Para APN1 se señala lo siguiente: Negritas: secuencia para péptido señal de transporte del N-terminal,

rojo negrita: sitio de inicio de traducción, verde subrayado: región de unión a toxina de Cry1Aa en *B. mori*, flecha: APN1 der, cuadrado: sitio consenso para glicosilación de la proteína, azul negrita: firma de metaloproteasa de Zinc, flecha: oligonucleótido APN1 rev y rosa subrayado: péptido consenso para GPI. Para APN2 se señala: rojo negrita: sitio de inicio de la traducción, negritas: péptido señal de transporte del N-terminal, flecha punteada: oligonucleótido APN2 der, cuadrado: sitio consenso para glicosilación, flecha punteada: oligonucleótido APN2 rev, azul negrita: firma de metaloproteasa de Zinc, círculo: cisteínas y rosa subrayado: péptido consenso para GPI. Después de que Herrero *et al.* (2005)³⁹ aislaron una línea de *S. exigua* resistente a la toxina Cry1Ca e identificaron que la resistencia se correlacionaba con la pérdida de la APN1; resaltando que únicamente la ausencia de la APN1 de las cuatro que posee este insecto, provocó la resistencia a la toxina, por lo que en este trabajo se decidió enfocarse únicamente a la APN1 de *M. sexta* dejando el silenciamiento de APN2 para estudios posteriores.

Amplificación del fragmento de DNA de APN1

Los oligonucleótidos se utilizaron para sintetizar el cDNA de APN1 por medio de una reacción de RT-PCR en la que se utilizó como templado RNA total extraído de larvas L3 de *M. sexta*. Se sintetizó la cadena complementaria de DNA por medio de una reacción de PCR y el producto de 937 pb de la reacción obtenido se muestra en la Figura 12.

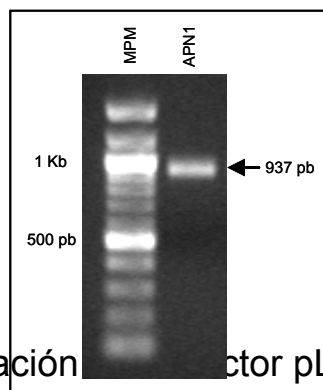


Figura 12. Producto de la reacción de PCR de APN1 purificado. Carril 1: Marcador de peso molecular (MPM), carril 2: Producto de la reacción de PCR del fragmento de APN1 de 937 pb.

Clonación en el vector pLITMUS 28i

El fragmento de DNA de APN1 amplificado y el vector pLITMUS 28i, fueron digeridos con las enzimas de restricción *Xba* I y *EcoR* I, después fueron purificados y puestos a ligar empleando la enzima T4-DNA ligasa. El producto de la reacción de ligación, se usó para transformar la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli*. Las colonias blancas seleccionaron como candidatas para poseer el inserto de APN1. Las clonas de pLITMUS 28i-APN1 se cultivaron en medio LB líquido con ampicilina, el DNA se recuperó empleando el sistema de purificación DNA de Qiagen. La purificación del DNA de las colonias candidatas se verificó en un gel de agarosa al 1 %. Para verificar que la colonia candidata tuviera el vector con el inserto de APN1 se hizo una reacción de digestión doble con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I en el que se liberó el fragmento de 937 pb (Figura 13).

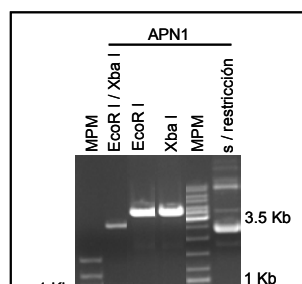


Figura 13. Digestión de DNA de de la clona de APN1 con las enzimas *EcoR* I / *Xba* I. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: fragmento de 937 pb liberado de la digestión doble, carril 3 y 4: digestiones sencillas, carril 5: MPM y carril 6: clona de sin restricción. Gel de agarosa al 1%.

La clona de Bt-R₁ también se verificó con restricciones sencillas y dobles con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I. En la Figura 14 se observa el producto de 441 nt de las digestiones.

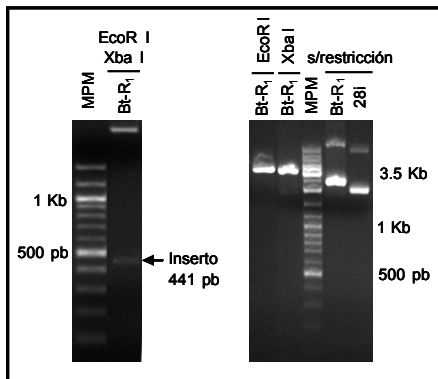


Figura 14. Digestión del DNA de la clona de Bt-R₁ con las enzimas *EcoR* I / *Xba* I. Gel de agarosa al 1% en el que se muestra el fragmento de 441 pb liberado de la digestión doble, las digestiones sencillas, así como la clona de Bt-R₁ y el vector sin restricción (28i).

Con esto se comprobó que las clonas tuvieran los insertos de DNA de los fragmentos de Bt-R₁ y APN1 y se verificó la correspondencia por secuencia.

Síntesis de dsRNA

Para sintetizar el templado para la reacción de transcripción *in vitro*, se hizo una reacción de PCR empleando oligonucleótido T7 y Taq-polimerasa.

En la Figura 15 se muestran los fragmentos de DNA amplificados a partir de las clonas de APN1 y Bt-R₁. El fragmento de DNA de Bt-R₁ tiene un tamaño aproximado de 570 pb, mientras que el de APN1 es de un mayor tamaño a 1 Kb. El aumento en el tamaño de los fragmentos es debido a la amplificación con el oligonucleótido T7. En la misma Figura se muestra un control positivo (28i Mal), amplificado de una clona control del sistema de transcripción comercial, que da un fragmento de 900 pb.

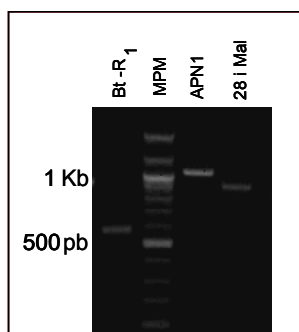


Figura 15 Amplificación por PCR de los fragmentos de DNA de Bt-R₁ y APN1 con oligonucleótido T7 en el vector pLITMUS 28i. Carril 1: fragmento de DNA de Bt-R₁, carril 2: Marcador de peso molecular, carril 3: fragmento de DNA de APN1, carril 4: Control positivo.

Con los fragmentos de DNA de Bt-R₁ y APN1, se hicieron las reacciones de **transcripción *in vitro***, empleando la RNA polimerasa T7, las condiciones de esta reacción se estandarizaron con 150 ng de DNA templado y 3 h de incubación a 37°C.

En la Figura 16 se muestran los dsRNA de APN1 y Bt-R₁ producidos por transcripción *in vitro*. Se observa que la banda del transcrito de APN1 (carril 2) es de más de 1 Kb con respecto y el dsRNA de Bt-R₁ es de más de 500 pb.

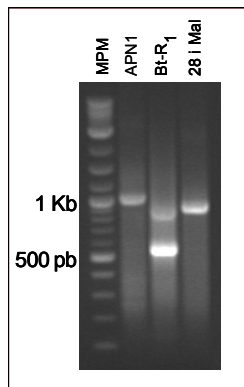


Figura 16. dsRNA de APN1 y Bt-R₁. Gel de agarosa al 1%, donde se observa el dsRNA de APN1 (carril 2) y el de Bt-R₁ (carril 3) y el transcrito control (carril 4).

Bioensayo con toxina Cry1Ab en larvas L1 inyectadas con H₂O

Para la selección de los individuos con silenciamiento de alguna de las proteínas de interés, inicialmente se estandarizó el proceso de selección con un bioensayo de toxicidad para establecer la dosis de toxina mínima para matar al 100% de las larvas. Para ello, se inyectaron larvas en L1 con H₂O que se mantuvieron en condiciones de laboratorio durante 12 h y posteriormente se sometieron a diferentes dosis de toxina durante cinco días. En la Figura 17, se representa la gráfica con los datos de toxicidad obtenidos en el bioensayo con toxina Cry1Ab sobre larvas L1 inyectadas únicamente con agua. A partir de la dosis de 50 ng/cm² se causa más del 96 % de mortalidad y a los 70 ng/cm² ya se obtuvo el 100% de mortalidad. Por lo tanto se decidió aplicar dosis por arriba de los 50 ng/cm² para hacer la selección de larvas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁ y APN.

De manera que aquellas larvas que sobrevivieran al reto con la dosis de toxina a la que las inyectadas con agua no resisten, serían con las que se continuaría el análisis.

Este procedimiento lo aplicamos apostando totalmente a nuestro mecanismo de toxicidad propuesto. De manera que la obtención de un alto número de larvas con alguna de las dos proteínas silenciadas, nos permitiría complementar los pasos del mecanismo al obtener toxicidad empleando las estructuras oligomérica y monomérica de la toxina en los bioensayos. Es decir, si Bt-R₁ es el primer receptor de la forma monomérica de la toxina y esta proteína es quien le permite oligomerizar, entonces, cuando no se expresa en el insecto, se podría complementar el mecanismo de toxicidad sobre el insecto, al alimentarlo con oligómero. Por otro lado, si APN se requiere para conducir a la toxina oligomérica a los microdominios de membrana donde se inserta, entonces cuando el insecto no expresa APN no va a ser susceptible ni al monómero, ni al oligómero de la toxina ya que esta no va a insertarse para formar el poro lítico.

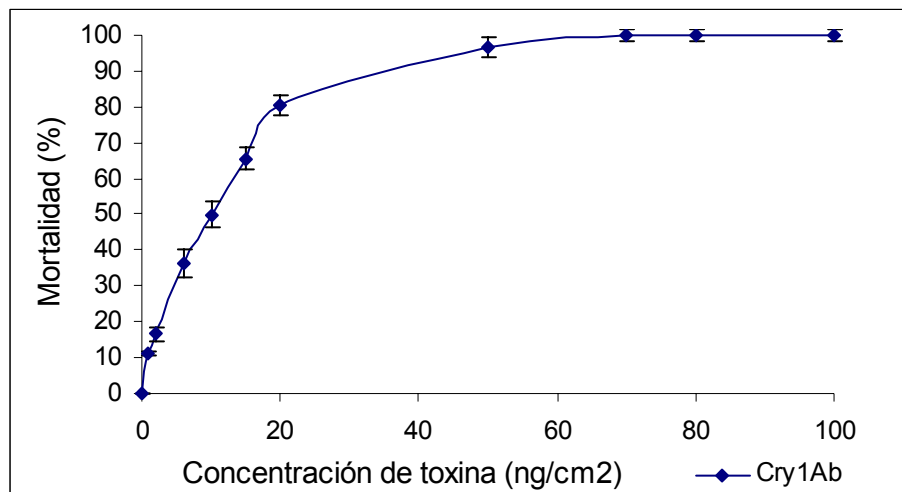


Figura 17. Toxicidad de Cry1Ab sobre larvas L1 de *M. sexta* inyectadas con agua para determinar la dosis de selección de larvas inyectadas con los dsRNAs.

Nota: Ensayo determinado con muestras por triplicado, se muestran las barras de error.

Con los dsRNAs específicos para la proteína Bt-R₁ y APN1 se inyectaron huevos, larvas en L1, de *M. sexta* empleando diferentes concentraciones de dsRNA de Bt-R₁ y APN1. Con dsRNA de Bt-R₁ también se inyectaron pupas hembras y adultas.

A) Inyección de dsRNA de Bt-R₁ y APN1 en huevos de *M. sexta*

El volumen máximo que tolera un huevo de *M. sexta* sin romperse es 100 nl, por tanto, en este ensayo se inyectaron huevos con 100 nl de agua como control o 50 ng de cada dsRNA suspendidos en ese volumen. Para analizar si el proceso de inyección afecta la eficiencia de la eclosión de huevos, se tomó un lote de huevos sin ningún tratamiento para cuantificar el porcentaje de eclosión.

En la Tabla 1 se muestran los datos de la inyección de huevos de *M. sexta* recién ovopositados, los cuales eclosionaron a los 4 días después de la inyección. Del lote de huevos control sólo eclosionó el 42%, mientras que el porcentaje de eclosión de los huevos que se inyectaron con cada dsRNA varió entre 40 y el

44%. De acuerdo a datos del laboratorio, el porcentaje de eclosión de huevos sin ningún tratamiento puede variar de un lote a otro.

En un análisis realizado por Fabrick *et al.* (2004)²⁸, se obtuvo el 7% de eclosión de huevos de *P. interpunctella* inyectados con 100 μ l de H₂O, mientras que el porcentaje de eclosión obtenido de huevos no tratados fue de 38%. Por otro lado, el porcentaje de eclosión de otra cepa del mismo insecto tuvo un porcentaje de eclosión de huevos no tratados del 98%.

A pesar de que en el presente análisis también se tuvo variabilidad en el porcentaje de eclosión en los diferentes lotes de huevos de *M. sexta* empleados, la eficiencia de eclosión siempre fue mayor del 40%.

Por lo tanto, se concluye que la inyección no afecta la eficiencia del proceso de eclosión.

Las larvas que eclosionaron se retaron por 5 días con 50 ng/cm² de esporas-cristal de toxina Cry1Ab. El porcentaje de sobrevivencia de las larvas expuestas a la toxina fue muy bajo y no se observó ninguna diferencia con respecto a las larvas de huevos sin inyección. Debido a este resultado y a la eficiencia en la eclosión se decidió intentar la inyección en larvas de *M. sexta*.

Tabla 1. Inyección de dsRNAs de Bt-R₁ y APN1 en huevos de *M. sexta*

Tratamiento	Concentración de dsRNA (ng/100 nl)	No. de huevos analizados	No. de larvas que eclosionaron	Eclosión (%)	No. de larvas retadas a 50 ng/cm ² de Cry1Ab	No. de sobrevivientes a los 5 días de reto con toxina
Sin inyectar	0	200	83	42	72	2
H ₂ O	0	200	80	44	72	1
dsRNA Bt-R ₁	50	200	80	41	72	1
dsRNA APN1	50	200	88	40	72	3

B) Análisis de la inyección de dsRNA de APN1 en larvas L1 de *M. sexta*

El volumen máximo que tolera una larva L1 de *M. sexta* es de 150 nl, por tanto, la concentración de dsRNA inyectado trató de ajustarse a ese volumen.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la inyección de larvas en primer estadio de desarrollo con diferentes concentraciones de dsRNA de APN1 elegidas al azar de acuerdo a la concentración de dsRNA obtenida en la síntesis. Además, en este experimento se decidió utilizar 50, 100 y 400 ng/cm² de toxina para el bioensayo de selección de las larvas, para determinar efecto de tolerancia a esas dosis de toxina. El porcentaje de larvas que sobrevivió a las 12 h después de la inyección en promedio fue del 93%, concluyéndose que la inyección no las dañó severamente. Posteriormente, las larvas sobrevivientes al reto con las diferentes dosis de toxina se analizaron por inmunoblot para la detección de las proteínas.

Tabla 2. Inyección de dsRNAs de APN1 a larvas L1 de *M. sexta*

Tratamiento	Concentración de dsRNA (ng/150 nl)	No. de larvas inyectadas	Sobrevivientes a las 12 h (%)	No. de larvas retadas con toxina	Dosis de Cry1Ab (ng/cm ²)	Sobrevivientes a los 5 días de reto con toxina (%)	Mortalidad (%)
H ₂ O	0	90	91	58	50	2	97
		15	80	5	100	0	
				5	400	0	
				2	0	2	
dsRNA APN1	50	25	100	10	100	0	
				10	400	0	
				5	0	5	
				5	50	2	
				10	100	1	
				10	400	0	
		2	0	2			

Como se observa en la Tabla 2, las larvas inyectadas con 50 ng de dsRNA de APN1 que se retaron con toxina Cry1Ab, no sobrevivieron. La correlación de este resultado con el mecanismo de toxicidad propuesto, este experimento podría indicar que el dsRNA no disminuyó la cantidad de APN en esas larvas, de manera que fueron sensibles a la toxina.

De este ensayo se analizó la expresión de APN en tres larvas que se inyectaron con 50 ng de dsRNA de APN1 pero que no se retaron con toxina. El resultado de la inmunodetección de APN del intestino de esas larvas se muestra en la Figura 18, en la que se observa que en una de las larvas analizadas se disminuyó la expresión de APN y este resultado coincide con el dato de la actividad específica de APN presentado en la gráfica de la misma (columna 2). Por lo tanto, en esta larva se llevo a cabo el silenciamiento específico de la APN. En las otras dos larvas inyectadas (columna 3 y 4), se observa claramente la presencia la APN indicando que en ellas no hubo silenciamiento de la proteína dirigido por el dsRNA. Así mismo, los resultados de la expresión coinciden con los obtenidos por actividad específica de APN representada en la gráfica (columna 3 y 4).

El número de larvas analizadas fue muy bajo porque la mayoría de las larvas inyectadas con dsRNA de APN1 fueron retadas con toxina y no sobrevivieron. Los datos de las larvas que no se retaron con toxina nos dice que la disminución de la expresión de APN fue muy baja y sólo ocurrió en algunas de las larvas; al menos, cuando se inyectó 50 ng de dsRNA de APN1.

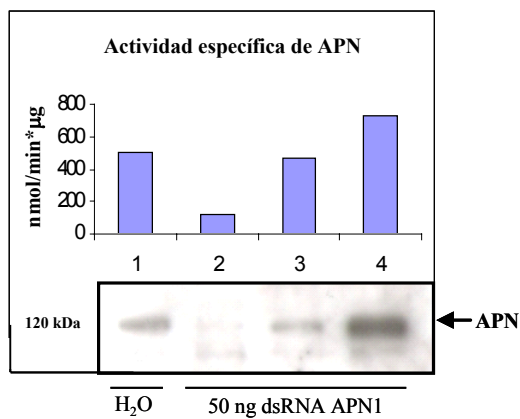


Figura 18. Inmunodetección de APN en larvas L1 inyectadas con dsRNA de APN1 que no fueron sometidas a dosis de toxina Cry1Ab. Se muestra la gráfica de actividad específica de APN de cada una de las larvas analizadas Columna 1: larva inyectada con H₂O, columna 2-4: larvas inyectadas con 50 ng de dsRNA de APN1.

En este experimento también se inyectaron larvas con mayor concentración de dsRNA de APN1. En la Tabla 2 se muestra que al incrementar a 72 y 183 ng el dsRNA inyectado, se logró obtener algunas larvas resistentes a 50 y 100 ng/cm² de toxina. En la Figura 19 se muestra la inmunodetección de APN en el intestino de las tres larvas que sobrevivieron al reto con toxina Cry1Ab, en las columnas 1 y 2 se observa la banda de la APN de dos larvas inyectadas con agua. Las columnas 3 y 4 corresponden a las larvas inyectadas con 72 ng de dsRNA de APN1 y que sobrevivieron al reto con 50 ng toxina Cry1Ab y la columna 5 corresponde a una larva inyectada con 183 ng de dsRNA de APN1 que sobrevivió al reto con 100 ng de toxina. En ninguna de las tres larvas tratadas con dsRNA se observa la banda de la proteína APN lo que indica que se llevó a cabo el silenciamiento debido al dsRNA.

Sin embargo, el porcentaje de resistentes fue extremadamente bajo, entre el 3% y el 10%, estableciéndose que el silenciamiento en larva no está siendo efectivo o no esta dando un efecto que podamos determinar por bioensayo con toxina. Estos resultados probablemente se debieron a las bajas concentraciones de dsRNA inyectadas hasta el momento. Por lo que se decidió inyectar una mayor cantidad de dsRNA en los siguientes experimentos.

Lo que se debe destacar, es que este dato sugiere que la ausencia de APN1 debido al silenciamiento específico del dsRNA para esta proteína, correlaciona con la tolerancia a altas dosis de toxina Cry1Ab. Sin embargo, se requiere incrementar la eficiencia del silenciamiento para obtener un mayor número de larvas resistentes con las que se pueda realizar otros experimentos cuyos resultados sean concluyentes.

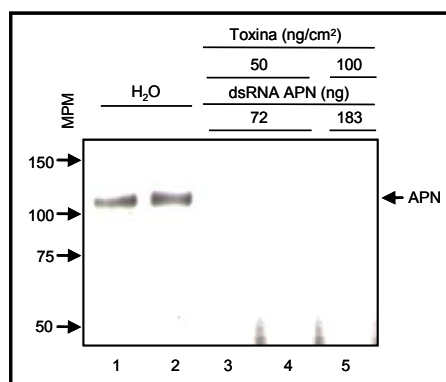


Figura 19. Inmunodetección de APN en intestinos de larvas L1 retadas con toxina Cry1Ab. Columna 1 y 2: larvas inyectadas con H₂O, columna 3 y 4: larvas inyectadas con 72 ng de dsRNA de APN y sobreviviente a 50 ng/cm² de toxina, columna 5: larva inyectada con 183 ng de dsRNA de APN y sobreviviente a 100 ng/cm² de toxina

C) Análisis de la inyección de dsRNA de Bt-R₁ en larvas L1 de *M.*

sexta

La concentración de dsRNA de Bt-R₁ inyectado por larva en este experimento, también se ajustó a 150 nl de volumen total.

En la Tabla 3 se muestran los datos de la inyección de larvas L1 con dsRNA de Bt-R₁. En esta ocasión, las cantidades de dsRNA inyectado fueron: 20, 40 y 60 ng. En general, el porcentaje de sobrevivencia a las 12 h post-inyección siempre fue mayor del 90%. De acuerdo a los resultados del reto con toxina durante cinco días, el porcentaje de mortalidad para las larvas inyectadas con H₂O fue del 92%, del 88% para las inyectadas con 20 ng de dsRNA Bt-R₁, de 75% para las inyectadas con 40 ng de dsRNA Bt-R₁, y de 50 % para las inyectadas con 60 ng de dsRNA Bt-R₁.

Estos resultados indican que parece existir una correlación directa entre la cantidad de dsRNA de Bt-R₁ inyectado y la sobrevivencia de las larvas al reto con toxina.

Tabla 3. Inyección de diferentes concentraciones de dsRNA Bt-R ₁ a larvas L1 de <i>M. sexta</i>						
Tratamiento	Concentración de dsRNA (ng/150 nl)	No. de larvas inyectadas	Sobrevivientes a las 12 h (%)	No. de larvas retadas con 50 ng/cm ² de Cry1Ab	No. de sobrevivientes a los 5 días de reto con toxina	Mortalidad (%)
Sin inyectar H ₂ O	0			24	1	96
	0	79	95	24	2	92
	0	78	95	24	3	88
	0	80	94	24	2	92
dsRNA Bt-R ₁	20	100	99	24	3	85
	40	100	96	24	6	75
	60	100	97	24	12	50

Por este último resultado se decidió inyectar larvas L1 con mayor cantidad de dsRNA de Bt-R₁ (1µg) para analizar, si con esa cantidad podíamos obtener un mayor número de larvas tolerantes a altas dosis de toxina.

Es importante destacar que también se modificó el sitio de inyección, además de la cantidad de dsRNA, haciéndose directamente a la hemolinfa por la región dorsal, en lugar de inyectarlo en el intestino por la región ventral como se hizo previamente.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de este ensayo, en el que la sobrevivencia de las larvas a las 12 h después de la inyección fue de 77 %.

Se observó que a los tres días de bioensayo, el 100% de las larvas toleró el reto a 100 ng/cm² de toxina Cry1Ab y se desarrollaron sanamente (coloración azul-verde) respecto a las larvas inyectadas con H₂O, las cuales se murieron desde el primer día y siempre presentaron coloración amarilla. Sin embargo, a los cinco días de reto con toxina todas las larvas se murieron y no fue posible analizar por inmunoblot a la proteína Bt-R₁. Debido a este resultado, se decidió reducir los días de tratamiento con toxina Cry1Ab a tres días para recuperar larvas tolerantes a la toxina y hacer el análisis de inmunodetección de la proteína.

Tabla 4. Inyección de dsRNA de Bt-R₁ a larvas L1 de <i>M. sexta</i>					
Tratamiento	Concentración de dsRNA (ng/150 nl)	No. de larvas inyectadas	Sobrevivientes a las 12 h (%)	No. de larvas retadas con 100 ng/cm ² de Cry1Ab	Mortalidad a tres días (%)
Sin inyectar	0			24	100
H₂O	0	33	91	24	100
dsRNA Bt-R₁	1000	31	77	24	0

En el siguiente experimento, se inyectó también 1 µg de dsRNA de Bt-R₁ a larvas L1. En los datos de la Tabla 5, se muestra que el porcentaje de sobrevivencia de las larvas a la inyección fue ligeramente menor que en el experimento anterior (74%) pero en este caso, igual para las inyectadas con agua como para las inyectadas con dsRNA.

Tabla 5. Inyección de dsRNA de Bt-R₁ a larvas L1 de <i>M. sexta</i>					
Tratamiento	Concentración de dsRNA (ng/150 nl)	No. de larvas inyectadas	Sobrevivientes a las 12 h (%)	No. de larvas retadas con 100 ng/cm ² de Cry1Ab	Mortalidad a 3 días (%)
H₂O	0	35	74	24	100
dsRNA Bt-R₁	1000	34	74	24	0

Doce horas después de la inyección, las larvas se retaron con 100 ng/cm² de Cry1Ab durante tres días. El 100% de las larvas inyectadas con agua murieron, a diferencia de las inyectadas con dsRNA de Bt-R₁ que toleraron dicha dosis de toxina y que se pasaron a dieta normal para que crecieran hasta el tercer estadio de desarrollo (L3). Sin embargo, sólo se pudo recuperar 7 larvas (29% de las larvas resistentes a Cry1Ab), las cuales se disectaron para detectar por inmunoblot a la proteína Bt-R₁. En la Figura 20, se observa que las larvas inyectadas con H₂O y que no fueron retadas con toxina tienen la proteína Bt-R₁ (210 kDa), mientras que en las larvas tolerantes a la toxina no está presente, lo cual sugiere que Bt-R₁ se silenció totalmente.

En la larva que corresponde al carril 6 de la misma figura, se observa una cantidad muy baja de proteína, lo cual indica que aún con una disminución parcial de la proteína la larva toleró el reto con 20 ng/cm² de toxina por tres días. Como control de la cantidad de proteína cargada en el gel, se presenta la detección de una proteína de aproximadamente 80 kDa de VMMA's (identificada con un anticuerpo anti-VMMA's).

Por lo tanto este experimento permitió comprobar, que cuando Bt-R₁ no esta presente o se encuentra en muy baja proporción debido al tratamiento con dsRNA, las larvas de L1 de *M. sexta*, pueden tolerar altas dosis de toxina Cry1Ab. Este hecho va de acuerdo con el mecanismo de toxicidad propuesto, en el que esta proteína es la que de primera instancia une a la toxina a las membranas y favorece el proceso de oligomerización.

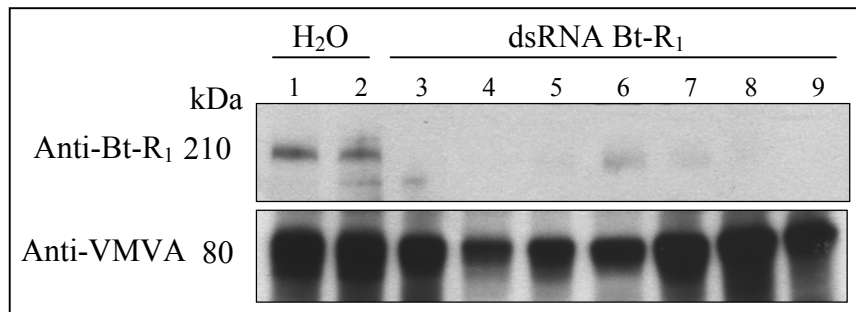


Figura. 20. Inmunodetección de Bt-R₁ en intestinos de larvas L3 inyectadas en L1 con dsRNA de Bt-R₁ y retadas con 20 ng/cm² de Cry1Ab durante 3 días. Columna 1 y 2: larvas inyectadas con H₂O sin reto a toxina, columnas 3 a 9: larvas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁.

Los datos indican que las larvas que sobrevivieron a una exposición de tres días a la toxina Cry1Ab no expresan la proteína Bt-R₁. Sin embargo, el 71% de las larvas que fueron expuestas a la toxina murieron durante el periodo de crecimiento a L3. Este resultado se puede explicar de dos maneras: a) el dsRNA de Bt-R₁ dio un efecto de silenciamiento temporal en las larvas L1 (como el observado en muchos otros organismos silenciados con algún otro dsRNA), en el que después de un tiempo variable la proteína silenciada se recupera y b) que la alta cantidad de dsRNA pudiera estar afectando de alguna manera el desarrollo de las larvas impidiéndoles pasar al siguiente estadio de desarrollo (proceso llamado muda).

Hasta la fecha no se sabe con claridad la función que desempeña este tipo de caderina para las células del intestino del insecto, de nuestros resultados lo que es claro es que aún sin ella las larvas pueden seguir viviendo, al menos hasta alcanzar el siguiente estadio de desarrollo.

En un reporte reciente, Barik (2006)³, habla de la letalidad que puede causar el dsRNA cuando se administra en exceso. En ese trabajo se analiza que la utilización de altas cantidades de dsRNA, provocaron daño en las células del hígado con 36 de 49 dsRNAs empleados y 23 de ellos finalmente condujeron a la muerte al ratón sometido al tratamiento.

En al menos dos reportes más en ratón, se menciona un efecto de saturación de RISC, aunque no lo relacionan precisamente con la toxicidad del dsRNA.

En el primer reporte se dice que *in vitro*, el ensamble del siRNA a RISC puede ser saturable⁷¹ y en el segundo, al incrementar la cantidad de un siRNA se redujo el efecto antiviral de otro, aunque ciertamente no se menciona que haya causado un efecto tóxico⁵.

De manera que después de obtener repetidamente altos índices de mortalidad al inyectar 1 µg del dsRNA de Bt-R₁ a larvas L1, consideramos posible el tener un efecto similar al reportado por Barik (2006)³ y proponemos que en futuros experimentos los dsRNAs deben administrarse a concentraciones menores.

Por otro lado, en algunos reportes de silenciamiento de diferentes proteínas en larvas de *M. sexta* y *B. mori*, el dsRNA se ha inyectado en larvas de L4 y L5 y las concentraciones van desde 100 ng hasta 30 µg por larva^{27,47,68}. Los resultados de

silenciamiento son muy variables, en algunos casos se detecta incluso seis horas después de la inyección y en otros hasta después de tres días. Igualmente, se han obtenido grados variables de silenciamiento y procesos temporales en los que después de cierto tiempo se recupera la acumulación de proteína⁴⁹.

En nuestro caso hemos obtenido efecto inyectando incluso 60 ng de dsRNA por larva en L1 (50% de las larvas no expresan la proteína) y hemos observado que aplicando el reto con toxina 12 h después de la inyección ya se obtienen larvas tolerantes a las altas dosis de toxina. Lo que sugiere un silenciamiento eficiente a ese tiempo en las larvas de *M. sexta*.

D) Análisis de la inyección de dsRNA de Bt-R₁ en pupas de *M. sexta*

Bettencourt *et al.* (2002)⁴ reportaron el silenciamiento de la proteína Hemolina en el lepidóptero *Hyalophora cecropia* inyectando 1 µg del dsRNA en un volumen de 100 µl a pupas hembras, observando efecto en los embriones de la siguiente generación. En ese reporte, las adultas se aparearon normalmente con los machos sin ningún tratamiento y los huevos ovopositados parecen tener porcentajes de eclosión iguales a los de los huevos no tratados (50%). Fenotípicamente los embriones presentaron diferentes grados de malformación y por inmunoblot se demostró silenciamiento parcial de la proteína.

De manera que decidimos probar la estrategia de inyección en pupas para analizar la progenie y su tolerancia a altas dosis de toxina. En la Tabla 6 se presentan los datos de la inyección de 25 µg dsRNA de Bt-R₁ en un volumen de 25 µl a pupas de *M. sexta* antes de la metamorfosis a la etapa adulta. El criterio para elegir la concentración a inyectar fue el volumen que toleró la pupa de *M. sexta* antes de desplazar cualquier contenido de hemolinfa. Los datos de ovoposición y eclosión de larvas L1 se compararon con los del mismo número de pupas no tratadas. Las adultas emergieron a los 17 días de la inyección de las pupas y ese día se juntaron con los machos sin ningún tratamiento.

En nuestro experimento, el porcentaje de eclosión de los huevos de pupas de *M. sexta* sin tratamiento fue del 83%, similar al 80% de eclosión de huevos provenientes de las pupas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁. De manera que la inyección de dsRNA en pupas no afectó ni el porcentaje de ovoposición de las adultas, ni el de eclosión de los huevos.

Las pupas inyectadas con agua tuvieron bajo porcentaje de ovoposición, probablemente debido a problemas de apareamiento más que a daños fisiológicos debidos a la inyección.

Tratamiento	Concentración de dsRNA (µg/25µl)	No. de pupas inyectadas	No. adultas que emergieron	No. de huevos ovopositados	Larvas que eclosionaron (%)	No. de larvas retadas con 20 ng/cm ² de Cry1Ab	Mortalidad a 5 días (%)
Sin inyectar			3	372	83	72	100
H ₂ O	0	3	3	23	74	17	100
dsRNA Bt-R ₁	25	3	3	360	80	72	93

En la Figura 21 se muestra la inmunodetección de Bt-R₁ en el homogenizado de intestino de larvas que no fueron retadas con toxina y que se crecieron hasta L3 y que corresponden a la primera generación de pupas inyectadas con dsRNA de BT-R₁. La señal de Bt-R₁ del intestino de larvas de los carriles 3 y 5 indica que en esas larvas la proteína no se silenció, pero sobrevivieron porque no se les aplicó la selección con toxina. En el carril 6 se observa una señal muy tenue de la proteína, que podría indicar que sólo hubo silenciamiento parcial. En el resto de los carriles no se observa a Bt-R₁ indicando un silenciamiento total de la proteína y demostrando que las larvas pueden sobrevivir sin Bt-R₁, al menos hasta el tercer estadio de desarrollo aunque la proteína no este presente.

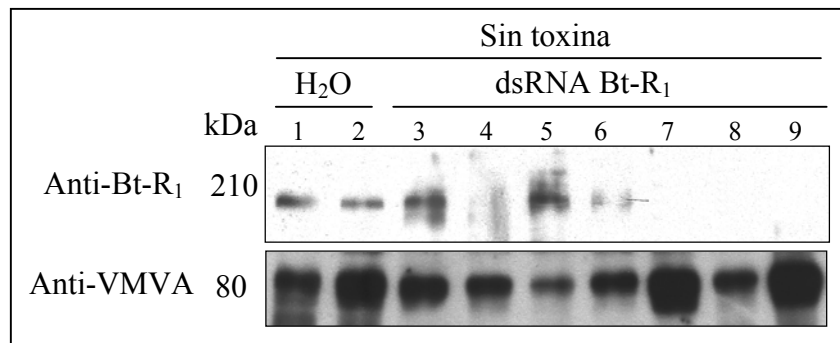


Figura. 21. Inmunodetección de Bt-R₁ en intestinos de larvas L3 que son la primera generación de pupas inyectadas y que no fueron retadas con toxina Cry1Ab. Columna 1 y 2: larvas de la primera generación de pupas inyectadas con H₂O, columnas 3 a 9: larvas de la primera generación de pupas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁.

De la misma manera, en un reporte con respecto al silenciamiento del gen de la *Hemolina*, la F1 de pupas de *H. cecropia* presentaron variaciones del nivel de silenciamiento, resultando en embriones con diferentes grados de malformación⁴. Este resultado es semejante al que obtuvimos al inyectar dsRNA de Bt-R₁ en pupa de *M. sexta*, en el que se obtiene silenciamiento parcial de Bt-R₁.

E) Análisis de la inyección de dsRNA de de Bt-R₁ en hembras adultas de *M. sexta*

En la Tabla 7 se presentan los datos de la inyección de 25 µg dsRNA de Bt-R₁ a diez hembras adultas de *M. sexta*. A las 12 h sobrevivieron todas las hembras adultas inyectadas que se mezclaron con machos no inyectados para el apareamiento. El porcentaje de ovoposición fue muy similar al de las hembras sin tratamiento. En cuanto al porcentaje de eclosión de huevos, los de las hembras no tratadas tuvieron un 98%, mientras que los huevos de adultas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁ tuvieron un 95% de eclosión. El porcentaje de eclosión de huevos de adultas inyectadas con agua fue del 96%. Por lo que se concluye que la

inyección no afectó el apareamiento, la eficiencia en la ovoposición ni la eclosión de huevos.

Tratamiento	Concentración de dsRNA (µg/25µl)	No. de adultas hembras inyectadas	Sobrevivientes a las 12 h	No. de machos sin tratamiento con los que se aparearon	No. de huevos ovopositados	No. de larvas que eclosionaron	Porcentaje de eclosión (%)
Sin inyectar	0	0	0		2932	2873	98
H ₂ O	0	4	4	2	161	155	96
Bt-R ₁	25	10	10	5	2889	2732	95

Nota: Se tomaron 10 adultas hembras como control sin tratamiento

Algunas de las larvas que eclosionaron de los huevos ovopositados de madres inyectadas con dsRNA de Bt-R₁, se retaron durante 5 días con 20, 50 y 100 ng de toxina Cry1Ab. En la Tabla 8 se muestra el número de individuos retados por cada dosis y el número de larvas sobrevivientes.

Tratamiento	No. de larvas L1 retadas con toxina Cry1Ab	Dosis de toxina Cry1Ab (ng)	Sobrevivientes a los 5 días de reto (%)	Mortalidad (%)
H ₂ O	24	0	100	0
	24	20	0	100
	24	50	0	100
	24	100	0	100
dsRNA Bt-R ₁	120	0	100	0
	120	20	41	59
	120	50	1	99
	120	100	3	97

Las larvas L1 progenie de adultas inyectadas con H₂O tuvieron una mortalidad del 100% en todas las dosis de toxina empleadas. Por otro lado, el 41% de las larvas L1 progenie de adultas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁, fueron tolerantes al reto con 20 ng de toxina durante de 5 días. Estas larvas se cambiaron a dieta normal y se crecieron hasta L3 en el que se recuperó el intestino; en la Figura 22, se presenta la inmunodetección de Bt-R₁ en esas larvas. Se observa que la proteína esta ausente en todas las larvas analizadas, excepto en las larvas de los carriles 5 y 6 que presentan menor cantidad de Bt-R₁, por lo que se concluye que también en este caso el silenciamiento fue parcial en algunas larvas y que a pesar de eso toleran las altas dosis de toxina Cry1Ab.

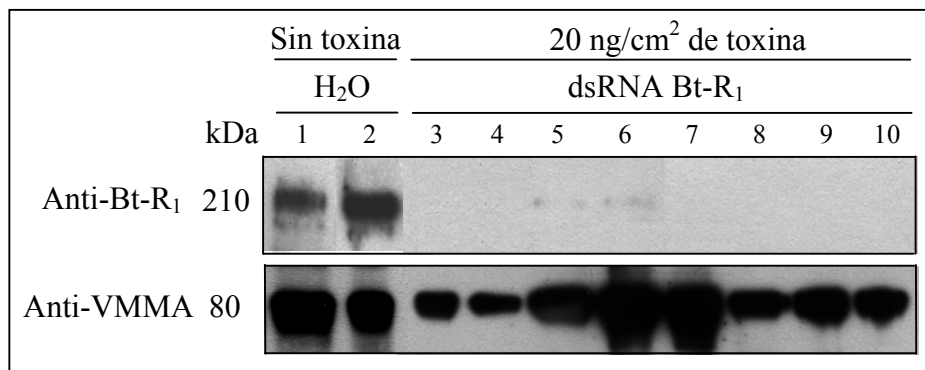


Figura. 22. Inmunodetección de Bt-R₁ en intestino de larvas L1 que son la primera generación de adultas inyectadas, retadas con 20 ng/cm² de toxina Cry1Ab. Columna 1 y 2: larvas inyectadas con H₂O sin reto a toxina, columnas 3 a 9: larvas en L3, F1 de adultas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁.

Liu y Kaufman (2004)⁴⁹, publicaron un trabajo desarrollado en el Himenóptero *Oncopeltus fasciatus*, en el que realizaron un metodología a la que ellos llamaron RNAi parental (pRNAi) intentando obtener una progenie que mostrara un fenotipo afectado por el RNAi. Inyectaron dsRNA de un gen homeótico en hembras adultas vírgenes y analizaron los defectos de la progenie. Tal como sucedió con la progenie de las adultas inyectadas con dsRNA de Bt-R₁, las hembras de *O. fasciatus* tratadas, produjeron grupos de embriones con diferentes grados de severidad en malformaciones, indicando diferentes niveles de silenciamiento del gen dentro de la progenie de las adultas inyectadas. En ese caso, incluso se observó un efecto temporal del insecto del silenciamiento en el que después de 10 días post-inyección de las hembras, los embriones con malformaciones severas obtenidos fueron disminuyendo.

Aunque Bt-R₁ muy probablemente no tiene ninguna función homeótica en las larvas de *M. sexta* (como el caso del gen empleado en el reporte anterior), se observó que la inyección del dsRNA específico en adultas, permite obtener una progenie que a pesar de tener diferentes grados de silenciamiento de la proteína, tolera altas dosis de toxina.

De los experimentos de inyección de dsRNA de BT-R₁ a pupas y adultas, se propone que aplicando la dosis de selección adecuada a la progenie, es posible analizar el efecto del silenciamiento de proteínas sobre el mecanismo de toxicidad de las toxinas Cry desde el primer estadio de desarrollo de *M. sexta* evitando los efectos que pudiera provocar la inyección en las larvas neonatas.

8.2 Liberación de APN de VMMA's mediante tratamiento con PI-PLC y análisis de unión de la toxina Cry1Ab

Para realizar estos estudios se purificaron VMMA's a partir de larvas L3 de *M. sexta*. Se obtuvo 1 ml de VMMA's a una concentración de 5.3 µg/ ml con una

actividad específica de APN de 5968.3 nmol/min* μ g. Dado que la actividad específica de fosfatasa alcalina en esa muestra fue de 14.33 nmol/min* μ g y después del rompimiento de las VMMA's con Tritón X-100 fue de 14.6 nmol/min* μ g, se concluye que las VMMA's tienen la orientación adecuada, es decir, con las moléculas receptoras hacia el exterior.

El receptor APN se aisló de las VMMA's con la enzima PI-PLC. La presencia de la APN se analizó por inmunoblot, se midió la actividad específica de APN en cada muestra de sobrenadante y pastilla obtenidos del tratamiento. Después de tratar las VMMA's con PI-PLC durante 90 min, se detecta una alta proporción de la proteína APN en el sobrenadante, como se muestra en la Figura 23 (columna 5, panel A). El peso molecular de la proteína disminuye con el corte del GPI por la PI-PLC. En la columna 6 del panel B de la misma figura se muestra que la actividad de APN aumenta al 40 % en el sobrenadante de las VMMA's rasuradas con PI-PLC, comparada con el 2 % de la actividad de APN en el sobrenadante de las VMMA's control en tiempo cero (columna 2, panel B).

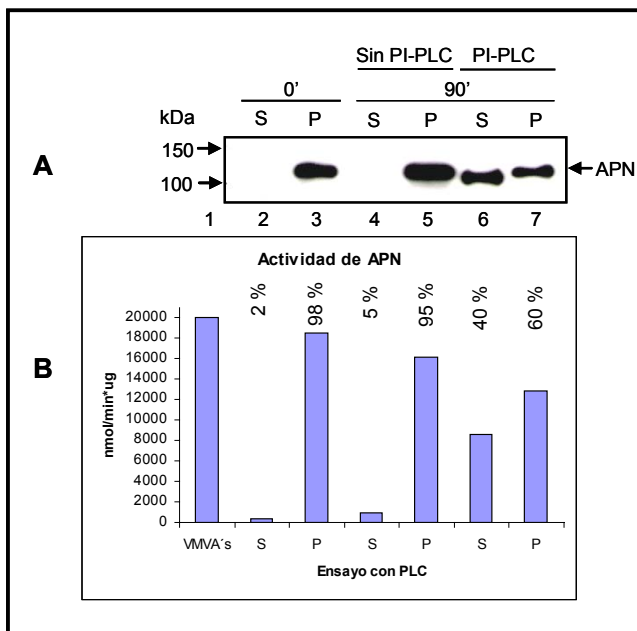


Figura 23 Inmunodetección de APN en VMMA's tratadas con PLC. Columna 1: Muestra de sobrenadante (S) antes de la reacción con PI-PLC (tiempo cero), columna 2: muestra de pastilla (P) a tiempo cero, columna 3: muestra de sobrenadante sin PI-PLC a los 90 min, columna 4: muestra de pastilla sin PI-PLC a los 90 min., carril 5: muestra de sobrenadante a los 90 min de reacción con PI-PLC, columna 6: muestra de pastilla a los 90 min de reacción con PI-PLC. En el panel B se muestra la actividad de APN de todas las muestras y el porcentaje con respecto a las VMMA's.

La unión de la toxina a estas VMMA's rasuradas se probó en un ensayo de unión tipo ligand-blot, por medio de un anticuerpo anti-toxina. En la Figura 24, se observa que la toxina se une a la APN presente en el sobrenadante de las VMMA's tratadas con PI-PLC (columna 6), esa unión está totalmente ausente en los sobrenadantes de las muestras en tiempo cero y en las muestras incubadas sin PI-PLC (columna 2 y 4), donde no existe APN.

De esta observación se concluye que el tratamiento de corte de APN de la membrana no afecta la unión de la toxina Cry1Ab a dicha proteína.

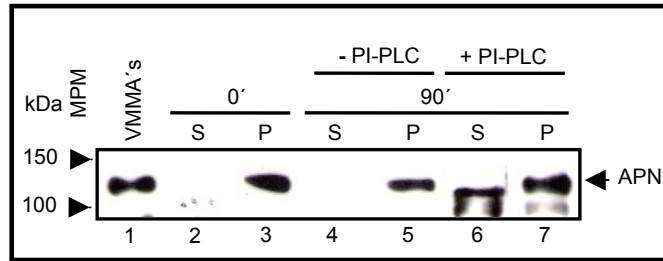


Figura 24. Ensayo de unión (ligand-blot) de Cry1Ab a VMMA's tratadas con PI-PLC. Columna 1: VMMA's sin tratamiento, columna 2: muestra de sobrenadante antes de la reacción con PI-PLC (tiempo cero), columna 3: muestra de pastilla a tiempo cero, columna 4: muestra de sobrenadante sin PI-PLC a los 90 min, columna 5: muestra de pastilla sin PI-PLC a los 90 min, columna 6: muestra de sobrenadante a los 90 min de reacción con PI-PLC, columna 7: muestra de pastilla a los 90 min de reacción con PI-PLC.

Tanto la pastilla de VMMA's rasuradas con PI-PLC que contiene menor cantidad de APN como el sobrenadante con la APN en forma soluble, se almacenaron a 4°C para su uso en otros análisis.

8.3 Análisis de la participación secuencial de Bt-R₁ y APN en el mecanismo de toxicidad de Cry1Ab.

A. Unión de la toxina Cry1Ab a VMMA's sin tratamiento y rasuradas con PI-PLC y su localización en membrana insoluble o soluble.

En un estudio previo, nuestro grupo demostró que cuando se incubaba protoxina de Cry1Ab con VMMA's de *M. sexta*, tanto la toxina, como Bt-R₁ y la APN se localizan en los microdominios de membrana⁶. Al rasurar la APN con PI-PLC, Bt-R₁ ya no se vio movilizada a los microdominios y la toxina ya no se insertó en la membrana. En este trabajo se propuso utilizar este tipo de estudios para demostrar la participación secuencial de los receptores en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab. La estrategia consistió en inhibir la unión de la toxina a Bt-R₁ y/o APN para posteriormente determinar la localización de la toxina y de los receptores en la región insoluble o soluble de membrana.

Lo primero que se intentó contestar fue en dónde se localiza la toxina cuando interacciona con VMMA's que contienen menor cantidad de APN debido al tratamiento con PI-PLC.

Para ello, se incubaron 500 µg de VMMA's con 500 µg de protoxina (proporción 1:1) durante 1h a TA, y después de una compactación por centrifugación (30 min a 14, 000 rpm), la pastilla fue solubilizada con Tritón 1% (30 min a 4°C). Las membranas se cargaron en un gradiente de flotación de Opti-Prep para separar la fracción de membrana insoluble de la soluble. Dichas fracciones se resolvieron en un gel de SDS-PAGE para la posterior detección de la toxina y a la APN por inmunoblot (representación gráfica de la estrategia experimental en Anexo 4-A)

En la Figura 25, se compara la señal obtenida en el inmunoblot anti-Cry1Ab y anti-APN de las VMMA's rasuradas con PI-PLC con respecto a las no rasuradas. En el panel **A** se observa que la señal de la toxina se localiza principalmente en la región insoluble (I) de membrana las VMMA's control incubadas con protoxina (columna 1). Mientras que en las VMMA's que fueron tratadas con PI-PLC, disminuyó la cantidad de toxina unida a las vesículas (columna 3), localizándose principalmente en la región soluble (S) de membrana (columna 4). La localización de la toxina coincide con la ubicación de la APN, la cual se presenta en el panel B que corresponde al inmunoblot anti-APN de las mismas muestras; como se observa en el carril 3 la APN esta ausente en la región insoluble de las VMMA's rasuradas con PI-PLC.

Estos datos permiten concluir que cuando la APN no esta presente en las VMMA's debido al tratamiento con PI-PLC, la toxina es incapaz de moverse hacia la región insoluble de esas membranas e insertarse en los microdominios, quedándose en el sobrenadante de la reacción de activación.

Este resultado resalta el papel de la APN en conducir la toxina a la región insoluble y facilitar su inserción a la membrana del intestino del insecto blanco.

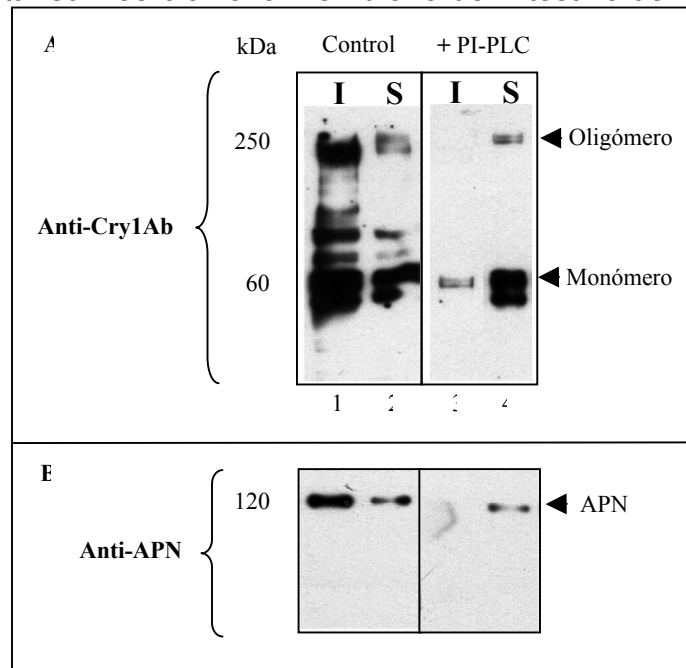


Figura 25. Inmunoblot: anti-Cry1Ab (Panel A), anti-APN (Panel B) de VMMA's rasuradas con PI-PLC. Columna 1: membrana insoluble de VMMA's control (I), columna 2: membrana soluble de VMMA's control (S), columna 3: membrana insoluble de VMMA's rasuradas con PI-PLC, columna 4: membrana soluble de VMMA's rasuradas con PI-PLC.

B. Unión de toxina y su localización en membrana insoluble o soluble al inhibir su unión con APN por competencia con proteínas-GPI.

Inicialmente, se incubaron 500 μg de VMMA's con un exceso de proteínas ancladas por GPI en forma soluble (liberadas previamente con PI-PLC) y 500 μg de protoxina durante 1h a TA y finalmente se separó la membrana insoluble de la soluble por medio de gradientes de flotación de Opti-Prep (representación gráfica de la estrategia experimental en Anexo 4-B).

El resultado de este experimento se muestra en la Figura 26, en el panel A se muestra la señal de la toxina detectada con el anticuerpo anti-Cry1Ab. Se observa que la señal de la toxina en membrana insoluble disminuyó notablemente con respecto al control. Por otro lado, el inmunoblot anti-APN (panel B), muestra que la señal de APN en membrana insoluble (columna 3) no se modificó por la incubación con APN soluble ya que la señal es igual al control (columna 1).

El ensayo de actividad específica de APN de cada una de esas muestras, indica que la actividad se mantiene igual en las VMMA's control, es decir, la APN anclada a membrana no sufre ninguna modificación, sin embargo, no hay oligómero en membrana insoluble.

Estos datos indican que la toxina está siendo secuestrada por la APN en solución, disminuyendo de esta manera su inserción en membrana.

De acuerdo al modelo del mecanismo de toxicidad de las proteínas Cry, los resultados de este experimento sugirieron que la unión de toxina a la APN anclada a la membrana facilita su inserción en microdominios.

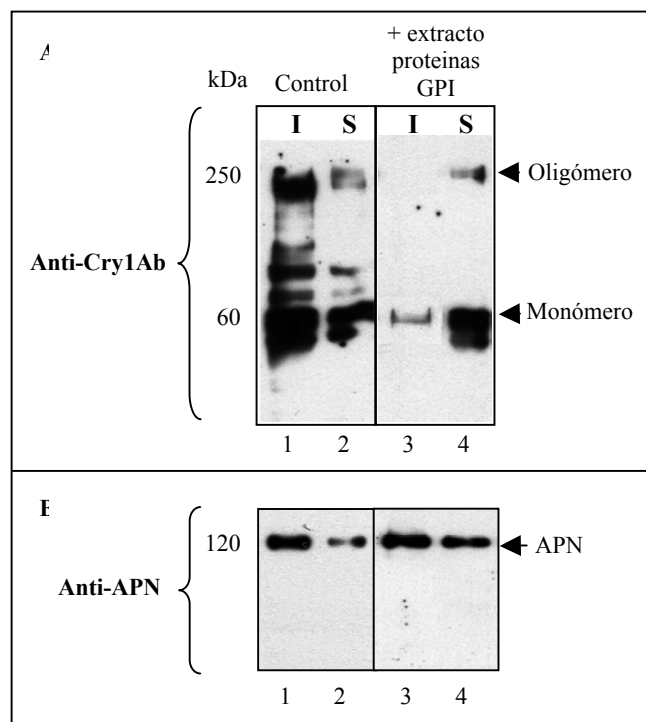


Figura 26. Inmunoblot: anti-Cry1Ab (Panel A) y anti-APN (Panel B) de VMMA's más proteínas ancladas por GPI solubles. Columna 1: membrana insoluble de VMMA's control, columna 2: membrana soluble de VMMA's control, columna 3: membrana insoluble de VMMA's + proteínas

ancladas por GPI solubles, columna 4: membrana soluble de VMMA's + proteínas ancladas por GPI solubles.

C. Unión de toxina y su localización en membrana insoluble o soluble al inhibir su unión con APN empleando anticuerpo anti-APN.

500 μ g de VMMA's se incubaron con anticuerpo anti-APN, como control se incubaron VMMA's únicamente con buffer TNE (1h a 70 rpm a TA), posteriormente, se incubaron con 500 μ g protoxina (1h a TA). Finalmente, las membranas insoluble y soluble fueron separadas por medio de gradientes de flotación de Opti-Prep (representación gráfica de la estrategia experimental en Anexo 4-C).

En el panel **A** de la Figura 27 se muestra el inmunoblot anti-toxina de las muestras de VMMA's incubadas previamente con anticuerpo anti-APN. En este experimento, claramente se cambió la distribución de la toxina a la región soluble de membrana (columna 4).

No se sabe si el anticuerpo anti-APN se une al mismo sitio al que se une la toxina. Sin embargo, tal vez debido a su tamaño o naturaleza proteica de alguna manera, evitó que la toxina se localizara en la región insoluble tal como sucede en las VMVA's control (columna1).

En el panel **B** se presenta la inmunodetección de la APN. En el experimento control se observa que esta proteína se localiza sobre todo en la región insoluble de la membrana (columna 1). Sin embargo, en las VMMA's incubadas con anti-APN, la localización de esta proteína cambió hacia la región soluble de la membrana (columna 4) y no se observa la señal de esta proteína en la región insoluble tal como ocurre en el control. Otra de las explicaciones a esta observación, puede ser que el anticuerpo anti-APN probablemente, esté desplazando la APN a la región de membrana soluble, aunque sin intervenir en sus propiedades de unión y debido a esto, se observa una acumulación de toxina en membrana soluble donde se localiza la APN.(columna 4). Por tanto, el efecto del anticuerpo no fue necesariamente el inhibir la interacción de la toxina con la APN sino el de cambiar la localización del receptor y consecuentemente la localización de la toxina.

Este resultado correlaciona perfectamente con el mecanismo de acción de las toxinas Cry propuesto, en el que la toxina se dirige a los microdominios de membrana por su afinidad hacia la APN y que dicha interacción es importante para la movilización de la toxina hacia la región insoluble de membrana. De estos resultados se concluye que si cambia la localización de APN, también la de la toxina.

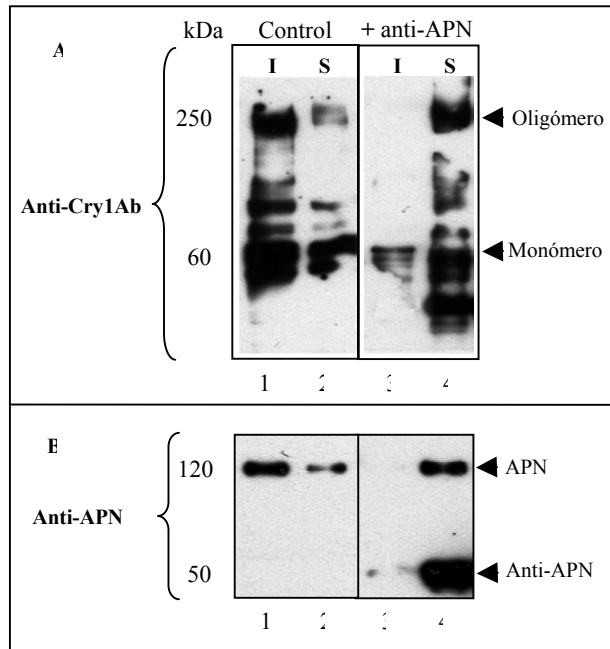


Figura 27. Inmunoblot: anti-Cry1Ab (Panel A) y anti-APN (Panel B) de VMMA's incubadas con anticuerpo anti-APN. Columna 1: membrana insoluble de VMMA's control, columna 2: membrana soluble de VMMA's control, columna 3: membrana insoluble de VMMA's incubadas con anti-APN, columna 4: membrana soluble de VMMA's incubadas con anti-APN.

D. Unión de toxina y su localización en membrana insoluble o soluble, al inhibir su unión con Bt-R₁ empleando péptidos sintéticos del Dominio II de Cry1Ab o anticuerpo anti-Bt-R₁.

Para inhibir la interacción de la toxina con el receptor Bt-R₁, se incubaron 500 µg de VMMA's con una mezcla (1:1) de péptidos sintéticos correspondientes a las asas 2 y 3 del Dominio II de la toxina durante 1 h a TA (representación gráfica de la estrategia experimental en Anexo 4-D). Por análisis previos se sabe que esas regiones de la toxina interaccionan con el receptor Bt-R₁ y compiten la unión de la toxina con este receptor³³.

Además, en un experimento independiente se inhibió la interacción de la toxina con Bt-R₁ empleando anticuerpo anti- Bt-R₁. Para ello, se incubó 500 µg de VMMA's con anticuerpo anti-Bt-R₁, como se incubó la misma cantidad de VMMA's únicamente con buffer TNE durante 1 h a 70 rpm a TA (representación gráfica de la estrategia experimental en Anexo 4-C).

Posteriormente, cada reacción de VMMA's se incubó con 500 µg protoxina durante 1 h a TA y se separó la membrana insoluble de soluble por medio de gradientes de flotación de Opti-Prep

En el panel **A** de la Figura 28 se muestra el resultado de la inmunodetección de toxina Cry1Ab. En las VMMA's incubadas con los péptidos sintéticos de las asas 2 y 3 del Dominio II, se observa una disminución de la cantidad de oligómero y

monómero en ambas regiones de membrana (columna 3 y 4) con respecto al control (columna 1 y 2). Cuando se incubó las VMMA's con anticuerpo anti-Bt-R₁ la proporción de toxina disminuye en ambas regiones de membrana (columna 5 y 6). Es importante destacar que la cantidad de oligómero formado fue severamente disminuida y a pesar de que la proporción de la APN no fue modificada hay muy poco oligómero en la región insoluble de membrana de ambos tratamientos (panel B, inmunodetección de APN).

Por lo tanto, con este experimento se bloquearon los sitios de interacción de la toxina con el receptor Bt-R₁ presente en las VMMA's empleando la mezcla de péptidos sintéticos de Dominio II. La competencia con los péptidos, bloqueó la interacción de la toxina con Bt-R₁ y disminuyó drásticamente la presencia de monómero y de oligómero en ambas regiones de membrana. En cambio, la utilización del anticuerpo anti- Bt-R₁ bloqueó sobre todo la producción de oligómero y disminuyó la presencia de monómero en los microdominios. Esto permitió comprobar que la interacción de la toxina con Bt-R₁ es importante para la interacción del monómero con Bt-R₁ y para la formación de oligómero, corroborando el papel de Bt-R1 en el mecanismo de toxicidad de la proteína Cry1Ab de Bt.

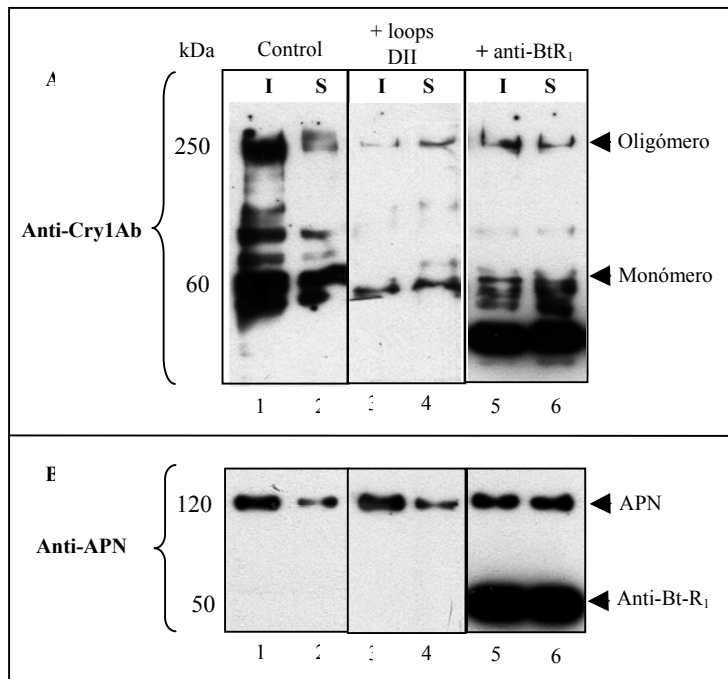


Figura 28. Inmunoblot: anti-Cry1Ab (panel A) y anti-APN (panel B) de VMMA's incubadas con una mezcla de péptidos sintéticos de las asas 2 y 3 del Dominio II y con anticuerpo anti-Bt-R₁. Columna 1: membrana insoluble de VMMA's control, columna 2: membrana soluble de VMMA's control, columna 3: membrana insoluble de VMMA's incubadas con mezcla de péptidos sintéticos, columna 4: membrana soluble de VMMA's incubadas con mezcla de péptidos sintéticos, columna 5: membrana insoluble de VMMA's incubadas con anti-Bt-R₁, columna 6: membrana soluble de VMMA's incubadas con anti-Bt-R₁.

9.0 CONCLUSIONES

1.- El silenciamiento independiente de los receptores Bt-R₁ y APN resultó en menor sensibilidad a la toxina Cry1Ab. Comprobando que ambos receptores juegan un papel importante en el mecanismo de toxicidad de la toxina Cry1Ab en *M. sexta*.

A este respecto se destaca que:

- a) La inyección de dsRNA de Bt-R₁ y APN1 a larvas L1 de *M. sexta* resultó más eficiente que la inyección en huevos para obtener individuos que toleraran altas dosis de toxina.
- b) Se obtuvo silenciamiento específico de la proteína APN1 en larvas L1. La tolerancia de éstas larvas a altas dosis de toxina Cry1Ab, correlaciona con una disminución en la actividad específica de APN y la ausencia de la proteína.
- c) La inyección de dsRNA de Bt-R₁ en hemolinfa de la región dorsal de larvas L1 permitió el desarrollo normal de las larvas y confirió tolerancia a 100ng/cm² de toxina Cry1Ab.
- d) La inyección de mayores cantidades de dsRNA de Bt-R₁ a larvas L1, resultó en una mayor tolerancia a altas dosis de toxina Cry1Ab a corto plazo, pero también en una posible afección del desarrollo de las larvas causando ciertos niveles de letalidad.
- e) El silenciamiento en larvas de *M. sexta*, se da al menos a las 12 h horas post-inyección porque a ese tiempo ya toleran las altas dosis de toxina Cry1Ab a la que fueron expuestas.
- f) La inyección de pupas con dsRNA de Bt-R₁ no interfirió en el proceso de metamorfosis y eclosión de las adultas. La progenie presentó silenciamiento parcial de la proteína Bt-R₁ en algunas larvas y total en otras.
- g) La inyección de hembras adultas no interfirió en el apareamiento con los machos, ni en los porcentajes de ovoposición y de eclosión de huevos viables. Se obtuvo silenciamiento parcial de la proteína y el 41% de la progenie toleró 20 ng/cm² de toxina Cry1Ab durante 5 días; condiciones en las que larvas silvestres no sobrevivieron.

2.- El receptor APN es importante para conducir a la toxina a la región insoluble de membrana.

- a) El tratamiento de las VMMA's con PI-PLC disminuye la cantidad de APN asociada a la membrana, disminuyendo además la actividad específica de esta proteína en la región insoluble.
- b) La APN rasurada con PI-PLC de las VMMA's mantiene la capacidad de unir a la toxina Cry1Ab.
- c) La presencia del oligómero de la toxina Cry1Ab en los microdominios de membrana se disminuye drásticamente cuando la APN no está presente.
- d) El oligómero de la toxina, se localiza en microdominios de membrana de VMMA's cuando se compite su unión con APN soluble. Sin embargo, la cantidad de monómero asociado a la membrana soluble no fue afectado por este tratamiento, indicando que su unión a las membranas no se afectó, ni depende de APN.
- e) Cuando las VMMA's son incubadas con anticuerpo anti-APN, la localización de APN cambia de la región insoluble a la soluble de membrana. La localización de la toxina oligomérica coincide con la ubicación de la APN en estas membranas.

3.- El receptor Bt-R₁ es importante para la correcta activación de la toxina y la formación de oligómero.

-La unión de la toxina Cry1Ab a su receptor Bt-R₁ se inhibe por la incubación previa de las VMMA's con los péptidos sintéticos de las asas 2 y 3 del dominio II de la toxina que interaccionan específicamente con este receptor.

- La inhibición de la interacción de toxina Cry1Ab con Bt-R₁ empleando los loops del dominio II de Cry1Ab, disminuye tanto la unión del monómero a Bt-R₁, como la cantidad de oligómero en la región insoluble de membrana.

-La inhibición de la interacción de la toxina con Bt-R₁ empleando anticuerpo anti-Bt-R₁, disminuye la formación del oligómero y su localización en la región insoluble de membrana.

ANEXO 1

Medio SP	1 L
Caldo nutritivo	8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25 g
KCl	1 g
Solución I: (MnCl ₂ 10mM)	1 ml

A la mezcla se le ajustó el pH a 7 y se esterilizó en autoclave. Antes de inocular la cepa el medio se complementó con:

Solución II: (FeSO ₄ · 7H ₂ O en H ₂ SO ₄)	1 N
Solución III: (CaCl ₂ · H ₂ O)	0.5 M

Medio HCT 1 L

Bacto-triptona	5 g
Casa-aminoácidos	2 g
Solución I: KH ₂ PO ₄ (6.8 %)	50 ml
Solución II: MgSO ₄ · 7H ₂ O	123 g
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.169 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O 1.4 g, mezclar todo en 100 ml	1 ml
Solución III: (Fe ₂ SO ₄ 0.2 g en 100 ml de H ₂ SO ₄ 1N)	10 ml
Solución IV: (CaCl ₂ · 2H ₂ O 1.47 %)	10 ml
Glucosa 10 %	30 ml

Se disolvió la bacto-triptona y los casamino-ácidos, se ajustó el pH a 7.25 y se esterilizó. Antes de inocular la cepa se complementó con las soluciones I-IV y la glucosa previamente esterilizados.

ANEXO 2

El vector pLITMUS 28i, posee un sitio múltiple de clonación flanqueado por promotores opuestos para la polimerasa T7, 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 (Figura A).

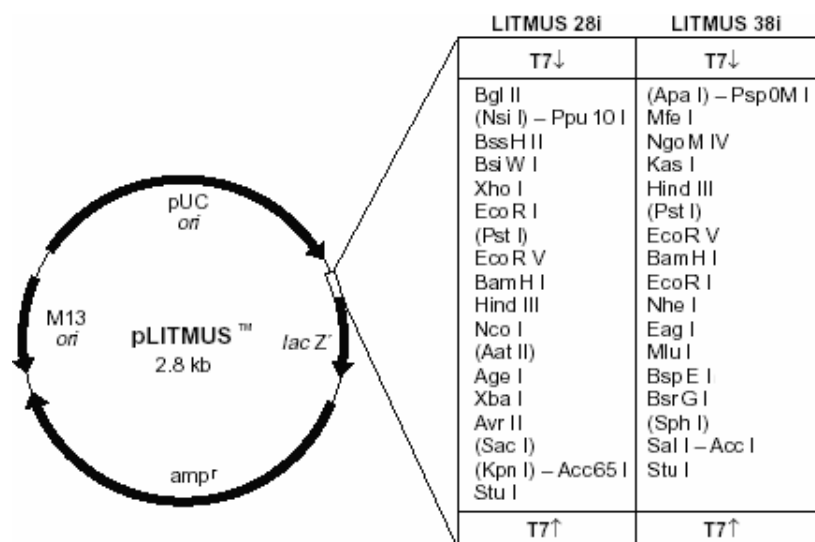


Figura A. Vector pLITMUS. Tomado de HiScribe™ RNAi Transcription Kit.

ANEXO 3

MICRODISPENSADOR

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

MICROMANIPULADOR

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

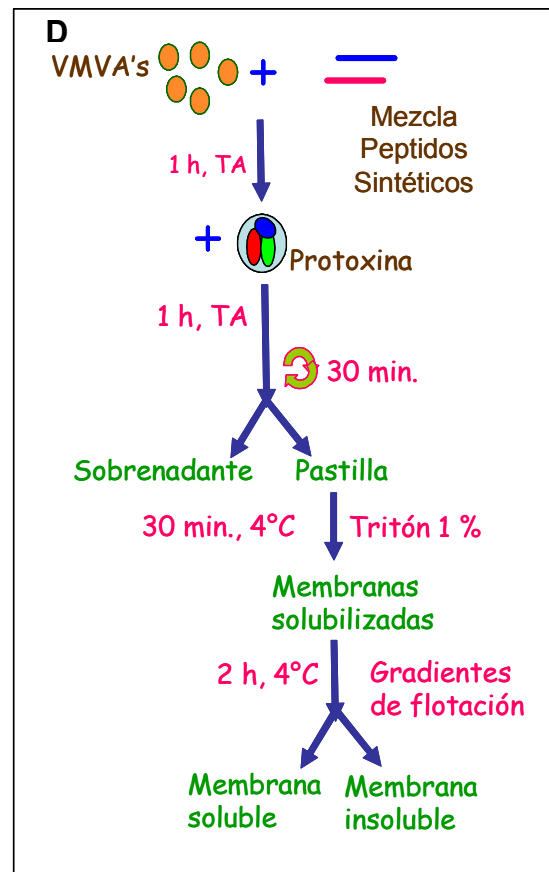
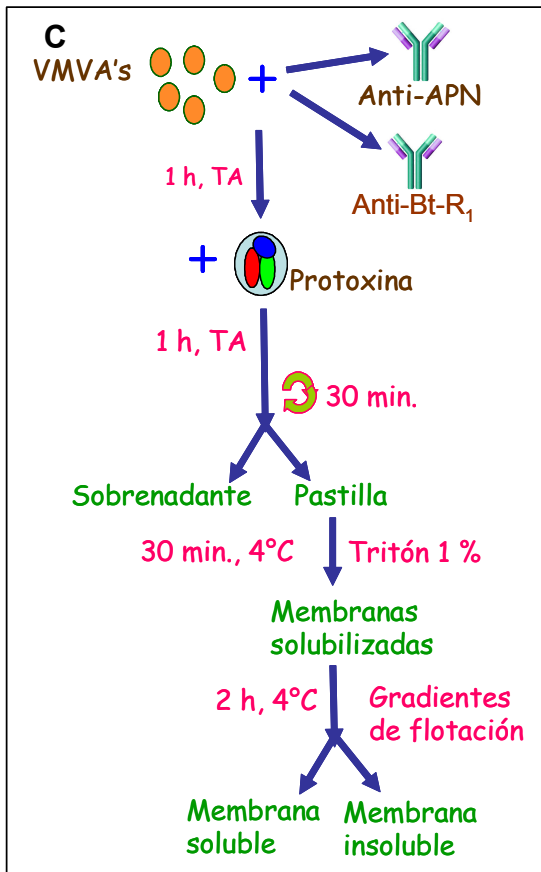
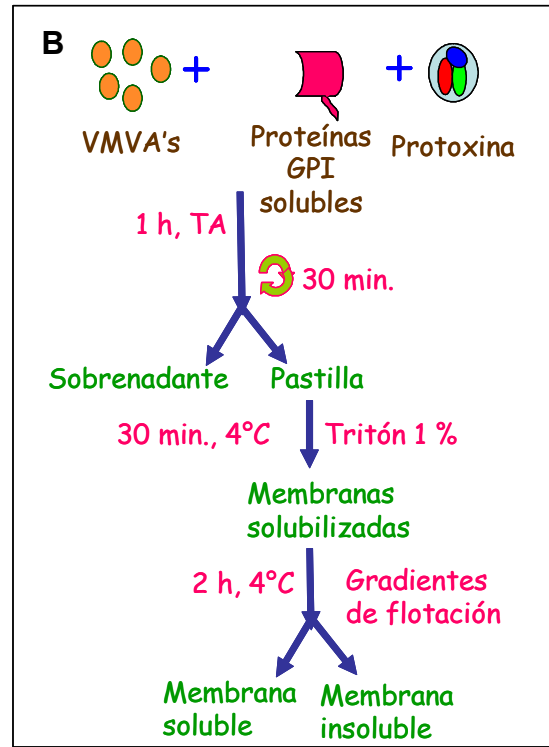
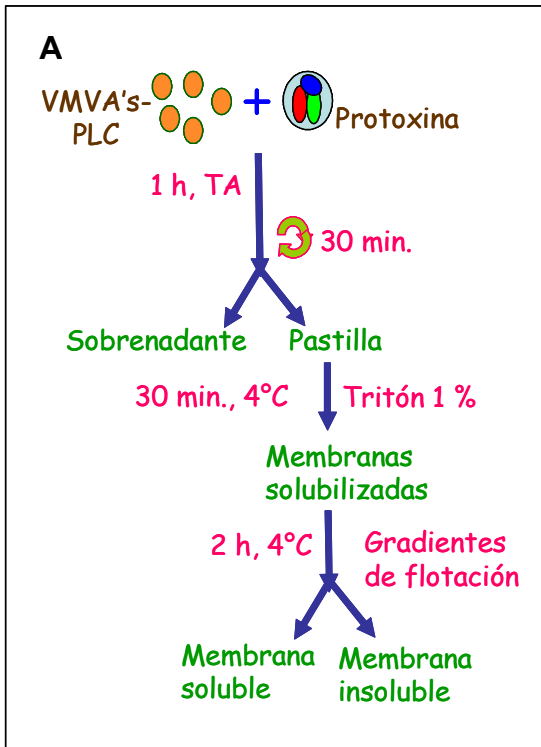
CAPILARES PARA MICROINYECCIÓN

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

ACEITE MINERAL

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

ANEXO 4



REFERENCIAS

1. **Ahlquist**, P. (2002). RNA-Dependent RNA Polimerases, Viruses, and RNA Silencing. *Science*. **296**, 1270-3.
2. **Agrawal**, N, Malhotra, P. y Bhatnagar, RK. (2002). Interaction of gene cloned and insect cell expressed Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Applied. Env. Microbiol.* **68**, 4583-92.
3. **Barik**, S. (2006). RNAi in moderation. *Nature Biotech.* **24**, 796-97.
4. **Bettencourt**, R. Terenius, O. y Faye, I. (2002). *Hemolin* gene silencing by ds-RNA injected into *Cecropia* pupae is lethal to next generation embryos. *Ins. Mol. Biol.* **11**, 267-71.
5. **Bitko**, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. y Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med.* **11**, 50-5.
6. **Bravo**, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, SS. y Soberón, M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta.* **1667**, 38-46.
7. **Bravo**, A., Miranda, R., Gómez, I. y Soberón M. (2002). Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochim Biophys Acta.* **1562**, 63-9.
8. **Bravo**, A., Soberón, M. y Gill, SS. (2005). *Bacillus thuringiensis*: Mechanism and use. *Elsevier BV*.6.
9. **Boonserm**, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C. y Lescar, J. (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J Bacteriol.* **188**, 3391-401.
10. **Boonserm**, P., Davis, P., Ellar, DJ. y Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mol Biol.* **348**, 363-82.
11. **Burton**, SL., Ellar, DJ., Li, J. y Derbyshire, DJ. (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**, 1011-22.
12. **Chen**, J., Brown, MR., Hua, G. y Adang, MJ. (2005). Comparision of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm. *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.* **321**, 123-9.
13. **Caplen**, NJ. (2002). A new approach to the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol.* **20**, 49-51.
14. **Carmichael**, GG. (2002). Medicine:Silencing viruses with RNA. *Nature.* **418**, 379-80.
15. **Chomczynski**, P. y Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-9.

16. **Crickmore**, N., Zeigler, DR., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. y Dean, DH. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**, 807-13.
17. **Cullen**, BR. (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res.* **102**, 3-9.
18. **de Maagd**, RA., Bakker, PL., Masson, L., Adang, MJ., Sangadala, S., Stiekema, W. y Bosch, D. (1999). Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **31**, 463-71.
19. **de Maagd**, RA., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. y Schnepf, HE. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet.* **37**, 409-33.
20. **de Maagd**, RA., Bravo, A. y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* **17**, 193-9.
21. **de Maagd**, RA., Weemen-Hendriks, M., Stiekema, W. y Bosch, D. (2000). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 1559-63.
22. **Denolf**, P, Hendrickx, K., Van Damme, J., Jansens, S., Peferoen, M., Degheele, D. y Van Rie, J. (1997). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostela* midgut Aminopeptidasa N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur J Biochem.* **248**, 748-61.
23. **Derbyshire**, DJ., Ellar, DJ. y Li, J. (2001). Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **57**, 1938-44.
24. **Donze**, O. y Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs syntetized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **30**: e46.
25. **Dorsch**, JA., Candas, M., Griko, NB., Maaty, WS., Midboe, EG., Vadlamudi, RK. y Bulla, LA. Jr. (2002). Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membrane-proximal extracellular domain of BT-R₁ in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem Mol Biol.* **32**, 1025-36.
26. **Dykhhoorn**, DM., Novina, CD. y Sharp, PA. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**, 457-67.
27. **Elefterianos**, I., Millichap, PJ., Ffrench-Constant, RH. y Reynolds, SE. (2006). RNAi suppression of recognition protein mediated immune responses in the tobacco hornworm *Manduca sexta* causes increased susceptibility to the insect pathogen *Photobacterium*. *Dev Comp Immunol.* **30**, 1099-107.
28. **Fabrick**, JA., Kanost, MR. y Baker, JE. (2004). RNAi-induced silencing of embryonic tryptophan oxygenase in the Pyralid moth, *Plodia interpunctella*. *J Insect Sci.* **4**.
29. **Fernández**, L, Aimonova, KG., Gill, S., Bravo, A. y Soberón, M. (2005). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J.* **394**, 77-84.

30. **Gahan**, L.J., Gould, F. y Heckel, DG. (2001). Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. **293**, 857-60.
31. **Galitsky**, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, JR., Pangborn, W. y English, L. (2001). Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **57**, 1101-9.
32. **Gill**, M y Ellar, D. (2002). Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol Biol*. **11**, 619-25.
33. **Gomez**, I., Miranda-Rios, J., Rudiño-Piñera, E., Oltean, DI., Gill, SS., Bravo, A. y Soberon, M. (2002). Hydrophobic complementarity determines interaction of epitope ⁸⁶⁹HITDTNNK⁸⁷⁶ in *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor with loop 2 of Domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *J Biol. Chem*. **277**, 30137-43.
34. **Gómez**, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. y 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 Lett*. **513**, 242-6.
35. **Griffitts**, JS., Haslam, SM., Yang, T., Garczynski, SF., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, PS., Dell, A., Adang, MJ. y Aroian, RV. (2005). Glycolipids as Receptors for *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin. *Science*. **307**, 922-25.
36. **Grochulski**, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, JL., Brousseau, R. y Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J Mol Biol*. **254**, 447-64.
37. **Gvakharia**, BO., Bebas, P., Cymborowski, B. y Giebultowicz, JM. (2003). Disruption of sperm release from insect testes by cytochalasin and beta-actin mRNA mediated interference. *Cell Mol Life Sci*. **60**, 1744-51.
38. **Hannon**, GJ. (2002) RNA interference. *Nature*. **418**, 244-51.
39. **Herrero**, S., Gechev, T., Bakker, PL., Moar, WJ y de Maagd, RA. (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BNC Genomics*. **6**.
40. **Hua**, G., Jurat-Fuentes, JL., Adang, MJ. (2004) Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R_{1a} cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochem Mol Biol*. **34**, 193-202.
41. **Hutvagner**, G., Simard, MJ., Mello, CC. y Zamora, PD. (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. *PLoS Biol*. **2**, 465-75.
42. **Jurat-Fuentes**, JL. y Adang, MJ. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem*. **271**, 3127-35.
43. **Keeton**, TP. y Bulla, LA. 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**, 3419-25.

44. Knight, PJK., Crickmore, N. y Ellar, DJ. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol Microbiol.* **11**, 429-36.
45. Knight, PJK., Knowles, BH. and Ellar, D. (1995). Molecular cloning of an insect Aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) toxin. *J Bio. Chem.* **270**, 17765-70.
46. Lenz, G. (2005). The RNA interference revolution. *Braz. J Med Bio. Res.* **38**, 1749-57.
47. Levin, DM., Breuer, LN., Zhuang, S., Anderson, SA., Nardi, JB. y Kanost, MR. (2005). A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol.* **35**, 369-80.
48. Li, JD., Carroll, J., Ellar, DJ. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature.* **353**, 815-21.
49. Liu, PZ., Kaufman, TC. (2004). *hunchback* is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. *Development.* **131**, 1515-27.
50. López, S y Arias, CF. (2004). Preface. *Virus research.* **102**, 1-2.
51. Lorence, A., Darszon, A. and Bravo, A. (1997). Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. *FEBS Lett.* **414**, 303-7.
52. Lowry, OH., Rosebrough, NJ., Farr, AL., and Randall, RJ. (1951) Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-75.
53. Luo, K., McLachlin, JR., Brown, MR. y Adang MJ. (1999). Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells. *Protein Exp Purif.* **17**, 113-22.
54. McNall, RJ. y Adang, MJ. (2003). Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem Mol Biol.* **33**, 999-1010.
55. Meng, J., Candas, M., Keeton, TP., Bulla, LA. Jr. (2001). Expression in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) insect cells of BT-R(1), a cadherin-related receptor from *Manduca sexta* for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Protein Expr Purif.* **22**, 141-7.
56. Midboe, EG., Candas, L. y Bulla, LA. 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.
57. Morse, RJ., Yamamoto, T. y Stroud, RM. (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure (Camb).* **9**, 409-17.
58. Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., Miura, N. y Sato, R. (2002). Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Lett.* **519**, 215-20.

59. **Nakanishi, K., Yaoi, K., Shimada, N., Kadotani, T. y Sato, R. (1999).** *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Aa toxin binds to a highly conserved region of aminopeptidase N in the host insect leading to its evolutionary success. *Biochim Biophys Acta.* **1432**, 57-63.
60. **Plasterk, RH. (2002).** RNA silencing: The genome's Immune system. *Science.* **296**, 1263-5.
61. **Quan, GX. y Kanda, T. (2002).** Inducción of the *white* egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm *white* gene. *Ins Mol Biol.* **11**, 217-22.
62. **Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P. y Bhatnagar, RK. (2002)** Silencing of midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J Bio Chem.* **277**, 46849-51.
63. **Rausell, C., García-Robles, I., Sánchez, J., Munoz-Garay, C., Martínez-Ramírez, AC., Real, MD. y 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**, 99-105.
64. **Sangadala, S., Walters, FS., English, LH. y Adang, MJ. (1994).** A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K⁺ efflux in vitro. *Biol Chem.* **269**, 10088-92.
65. **Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, KL., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, RH. y Fire, A. (2001)** On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell.* **107**, 465-76.
66. **Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, DR., Dean, DH. (1998).** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Bio. Rev.* **62**, 775-806.
67. **Schwartz, JL., Lu, YJ., Sohnlein, P., Brousseau, R., Laprade, R., Masson, L. y Adang, MJ. (1997).** Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* **412**, 270-6.
68. **Tabunoki, H., Higurashi, S., Ninagi, O., Fujii, H., Banno, Y., Nozaki, M., Kitajima, M., Miura, N., Atsumi, S., Tsuchida, K., Maekawa, H. y Sato, R. (2004).** A carotenoid-binding protein (CBP) plays a crucial role in cocoon pigmentation of silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *FEBS Lett.* **567**, 175-8.
69. **Tsuda, Y., Nakatani, F., Hashimoto, K., Ikawa, S., Matsuura, C., Fukada, T., Sugimoto, K. y Himeno, M. (2003).** Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). *Biochem J.* **369**, 697-703.
70. **Vadlamudi, RK., Ji, TH., Bulla, LA. Jr. (1993).** A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. berliner. *J Biol Chem.* **268**, 12334-40.
71. **Vadlamudi, RK., Weber, E., Ji, I., Ji, TH., Bulla, LA. Jr. (1995).** Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem.* **270**, 5490-4.

- 72. Vermehren, A.** Qazi, S. y Trimmer, BA. (2001). The nicotinic alpha subunit MARA1 is necessary for cholinergic evoked calcium transients in *Manduca* neurons. *Neurosci Lett.* **313**, 113-6.
- 73. Wolfersberger, MG.**, Luethy, P., Maurer, A., Parenti, P., Sacchi, FV., Giordana, B., y Hanozett, GM. (1987). RepARATION and partial characterization of aminoacid transporting brush border membrane vesicles from de larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp Biochem Physiol.* **86**, 301-8.
- 74. Yaoi, K.**, Nakanishi, K., Kadotani, T., Imamura, M., Koizumi, N., Iwahana, H. y Sato, R. (1999). *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin-binding region of *Bombyx mori* aminopeptidase N. *FEBS Lett.* **463**, 221-24.
- 75. Zamore, PD.** (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science.* **296**, 1265-9.
- 76. Zhuang, M.**, Oltean, DI., Gómez, I., Pullikuth, AK., Soberón, M., Bravo, A. y Gill, SS. (2002). *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J Biol Chem.* **277**, 13863-72.