

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Mecanismos de defensa en el insecto *Aedes aegypti* hacia el ataque de la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis*.

Tesis que para obtener el título de Maestra en Ciencias Bioquímicas presenta

Leidy Patricia Bedoya Pérez

Directora de tesis

Dra. María Alejandra Bravo de La Parra

Cuernavaca Morelos, Diciembre 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevo a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Microbiología Molecular bajo la dirección de la Dra. Maria Alejandra Bravo de la Parra.

Dedicado a mi familia por su disciplina y amor,
a Itzel y Luisfe por su inspiración y fortaleza
y a todos los ángeles* que me acompañaron en esta parte del camino.

*Tutores, amigos, compañeros y conocidos que aportaron ideas y tiempo en los expes, escucharon quejas, dieron consejos, invitaron a fiestas, sacaron risas, secaron lágrimas, ofrecieron abrazos y me tendieron su mano. Todos quienes se incluyan, aquí van

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	9
SUMMARY	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. <i>Aedes aegypti</i> , vector del virus dengue.....	11
1.2 Control biológico.....	12
1.3 Toxinas formadoras de poro.....	14
1.3.1 Toxinas Cry de <i>Bt</i>	15
1.4. Respuesta celular a formación de poro.....	22
1.4.1 Mecanismos de muerte inducidos por TFP.....	23
1.4.2. Mecanismos de defensa inducidos por TFP.....	24
2. ANTECEDENTES	28
2.1. Activación de biosíntesis de lípidos por el sistema SREBP	28
2.2. Activación sistema UPR por MAPK p38.....	30
2.3. RNAi como estrategia de silenciamiento.....	32
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo general.....	35
4.2. Objetivos específicos	35
5. MATERIALES Y METODOS	36
5.1. Medios de cultivo.....	36
5.1.1. Medio mínimo SP (Sporulation Protein)	36
5.1.2. Medio LB (Luria-Bertani)	37
5.2. Purificación de Cry 11Aa de <i>Bt</i>	37
5.3. Silenciamiento de genes	39
5.3.1. Síntesis de cDNA.....	40

5.3.2. Amplificado de segmentos de interés.....	41
5.3.3. Clonación.....	43
5.3.4. Protocolo células calcio competentes	45
5.3.5. Síntesis de RNA de doble cadena (RNAdc).....	47
5.3.6. Administración de RNAdc	49
5.4. Bioensayos	51
5.5. RT-PCR.....	51
5.6. Reto con LC ₅₀ de Cry11Aa a diferentes tiempos.....	52
5.6.1. Análisis de bandas	52
5.6.2. qRT-PCR.....	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
6.1. Clonación y alineamientos.....	53
6.2. Síntesis y administración de RNAdc.....	54
6.2.1. Sistema UPR	55
6.2.2. Sistema SREBP	64
7. CONCLUSIONES	69
8. PERSPECTIVAS	71
9. REFERENCIAS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	11
Figura 2 Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
Figura 3 Mecanismo de acción de diferentes TFP.....	15
Figura 4 Estructura tridimensional de Cry1Aa.....	17
Figura 5 Modelo de señalización AC/PKA (Bulla)[14].....	19
Figura 6 Modelo de "ping pong" (Bravo)[20]	21
Figura 7 Representación esquemática de la respuesta celular a TFP	25
Figura 8 Activación por fosforilación de MAPK p38 tras la formación de poro por parte de toxina Cry1Ab y Cry11Aa en <i>M. sexta</i> y <i>A. aegypti</i> respectivamente [22].....	27
Figura 9 Activación del Sistema SREBP en la célula tras el ataque de TFP's [28].....	29
Figura 10 Modelo de Respuesta del sistema UPR.[38]	31
Figura 11 Mecanismo de silenciamiento por RNAi	33
Figura 12 Método de estrías.....	38
Figura 13 Vector de clonación p-Litmus 28i.	44
Figura 14 Preparación de micelas de Effectene.	50
Figura 15 Bioensayo y RT-PCR de larvas de <i>A. aegypti</i> alimentadas con RNAd <i>circ</i> -1	57
Figura 16 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAd <i>XBP</i> -1.....	58
Figura 17 RT-PCR de (A) larvas silvestres y (B) silenciadas en <i>p38</i> expuestas a 2 y 4 horas de LC ₅₀ de Cry11Aa.	60
Figura 18 Análisis de bandas por densitometría	61
Figura 19 Análisis de PCR en tiempo real	62
Figura 20 Alineamiento de secuencias de <i>xbp-1</i>	63

Figura 21 Alineamiento entre Drice y Casp1Ae.....	64
Figura 22 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAdcCasp-1	65
Figura 23 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAdcS2P	66
Figura 24 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAdcSCAP	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Secuencia de oligonucleótidos específicos para cada gen	42
Tabla 2 Porcentajes de identidad de secuencias.....	54
Tabla 3 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de <i>A. aegypti</i> silenciadas en <i>ire-1</i>	57
Tabla 4 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de <i>A. aegypti</i> silenciadas en <i>xbp-1</i>	59
Tabla 5 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de <i>A. aegypti</i> silenciadas en <i>caspasa-1</i>	65
Tabla 6 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de <i>A. aegypti</i> silenciadas en <i>s2p</i>	66
Tabla 7 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de <i>A. aegypti</i> silenciadas en <i>scap</i>	68

RESUMEN

Aedes aegypti es el vector del virus dengue, este díptero ha adquirido una gran adaptabilidad medioambiental y resistencia a pesticidas químicos, lo cual ha propiciado el incremento de su población y por tanto, el aumento de la enfermedad del dengue a nivel mundial. Adicionalmente, los pesticidas químicos también presentan toxicidad inespecífica y generan contaminación ambiental. Es por esto, que una de las alternativas que se viene estudiando es el control biológico, utilizando para este fin las toxinas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis*.

Gracias a estudios realizados en células de mamíferos, *Caenorhabditis elegans* y *Aedes aegypti* retados con toxinas formadoras de poro (TFP), como aerolisina y toxinas Cry, sabemos que a bajas dosis de TFP las células desencadenan diversos mecanismos de defensa para contender con el deterioro de la membrana celular, causado por los poros presentes en ella. Dentro de estos mecanismos se encuentran la activación de MAPK p38 y de los sistemas UPR y SREBP entre otras.

El objetivo de este trabajo fue determinar, si las proteínas XBP-1 e IRE-1, del sistema UPR y las proteínas SCAP, S2P y caspasa-1 del sistema SREBP, de *A. aegypti* están involucradas en la respuesta de defensa en este insecto, utilizando el método de RNA de interferencia y posteriormente analizando el fenotipo de sensibilidad de las larvas silenciadas en dichas proteínas al ser intoxicadas con Cry11Aa.

Encontramos que el silenciamientos de *ire-1* y *xbp-1* del sistema UPR produjeron un aumento de sensibilidad de dos veces al retar las larvas con Cry11Aa y que p38 es importante en la activación de este sistema. Para el caso de SREBP, el silenciamiento de *scap* y *s2p* no aumentó la sensibilidad. Por lo que concluimos que en *A. aegypti* el sistema SREBP no está involucrado en mecanismos de defensa a TFP como Cry11Aa. Por otra parte, el silenciamiento de la caspasa-1 aumenta la sensibilidad dos veces al retarlas con Cry11Aa.

SUMMARY

Aedes aegypti is the vector of the Dengue virus. This dipteran species has acquired great environmental adaptability and resistance to chemical pesticides, which has promoted the increase of its population and therefore the worldwide increase of Dengue disease. In addition the chemical pesticides also have nonspecific toxicity and generate pollution. One of the alternatives that have been studied is the biological control based on the use of Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis*.

Thanks to studies in mammalian cells, *Caenorhabditis elegans* and *A. aegypti* to challenge by Pore Forming Toxins (PFT) as aerolisyn and Cry toxins, we know that in presence of low doses of PFT cells trigger different defense mechanisms to contend with damage of cell membrane, caused by pore formation. These mechanisms include the activation of MAPK p38, Unfolded Protein Response (UPR) and Sterol Regulatory Element Binding Proteins (SREBP) systems among others.

The goal of the present work was to elucidate if the protein XBP-1 and IRE-1 of UPR and the proteins SCAP, S2P and caspase-1 of the SREBP of *A. aegypti* are involved in defense response to Cry11Aa toxin challenge. We used the RNA interference methodology and afterwards analyzed the sensitivity phenotype of larvae silenced in these proteins to Cry11Aa toxin challenge.

We found that the silencing of IRE-1 and XBP-1 of UPR system doubled the sensitivity to Cry11Aa toxin challenge and that the p38 MAPK is important in the activation of this system. In the SREBP system the silencing of SCAP and S2P didn't increase sensitivity. We conclude that in *A. aegypti* the system SREBP isn't involved in defense mechanisms to Cry11Aa toxin.

The silencing of caspase-1 led an increase of two times the sensitivity to Cry11Aa toxin challenge.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Aedes aegypti*, vector del virus dengue

Aedes aegypti es el mayor vector urbano del virus dengue alrededor del mundo. Este es un Arbovirus de la familia *Flavoviridae* que produce una enfermedad de gran importancia en humanos, debido a la alta mortalidad reportada anualmente y al costo generado en tratamientos preventivo y correctivo [1]. Este vector se encuentra estrechamente relacionado con asentamientos humanos debido a que las hembras adultas prefieren alimentarse básicamente de sangre humana y depositan sus huevos en estanques de agua limpia o poco contaminada, incluyendo los contenedores de agua construidos por el hombre, bases de flores y de plantas, neumáticos desechados o cualquier objeto que potencialmente pueda almacenar agua. Sus huevos pueden ser viables por más de un año en desecación [2] y después de eclosionar desarrollan 4 estadios larvales en el agua y uno de pupa, que en total duran una semana, antes de convertirse en insectos adultos, los cuales tienen una supervivencia de hasta 30 días (Fig. 1).

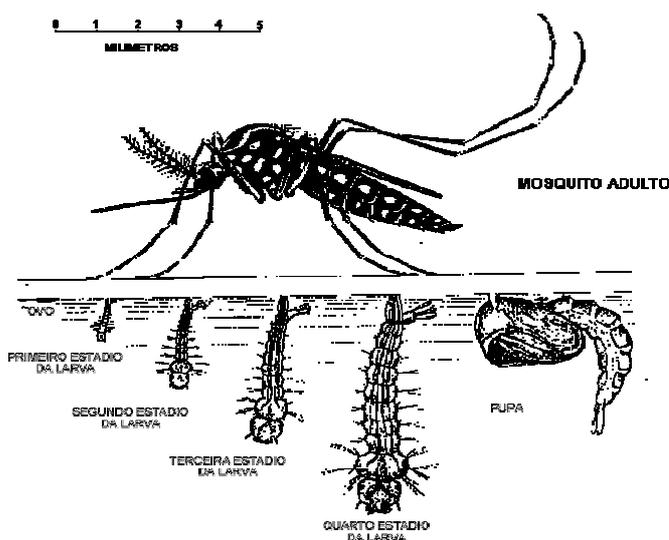


Figura 1 Ciclo de vida de *Aedes aegypti*.

Antes de llegar al estadio adulto, el insecto sufre cuatro cambios de estadios larvares y uno de pupa, todos son acuáticos.

Con el objetivo de erradicar los insectos vectores, se han usado indiscriminadamente pesticidas químicos, los cuales, aunque potentes son inespecíficos [3]. Estos insectos han desarrollado resistencia a los pesticidas, razón por la cual en los últimos años los niveles de población de mosquitos y de la enfermedad, se han visto incrementados notablemente en regiones tropicales y subtropicales del mundo [2].

Debido a los problemas de salud pública humana y la resistencia de los mosquitos a los pesticidas, actualmente existe un gran interés en el control biológico de plagas. Adicionalmente existe la necesidad de disminuir el uso de pesticidas químicos por la alta toxicidad para humanos y por la contaminación que producen al medio ambiente, debido a su baja tasa de degradación [4].

1.2 Control biológico

El control biológico o biocontrol está definido como el uso de enemigos naturales para reducir el número de organismos pestes. Éste puede ser definido en cuatro tipos: predadores, parásitos, patógenos y antagonistas o especies que compiten, sólo los dos últimos son microorganismos [5].

El uso de patógenos como biocontrol está ampliamente distribuido. Bacterias, virus, hongos y protozoos son usados por sus características.

“The US Environmental Protection Agency” (EPA, 2004), manifestó que: “Los biopesticidas son inherentemente menos tóxicos que los pesticidas químicos convencionales, tanto por su alta especificidad como, porque los agentes biológicos pueden perdurar por largos

periodos ejerciendo control y raramente ejercen su efecto eliminando completamente a la población plaga...” [5].

Dentro de los patógenos usados en el control biológico, se destacan las toxinas entomopatógenas producidas por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Fig. 2). Esta es una bacteria gram-positiva que en su fase de esporulación forma estructuras proteicas cristalinas, llamadas cuerpos parasporales, formadas por protoxinas conocidas como δ - endotoxinas. *Bt* produce dos tipos de δ - endotoxinas conocidas como proteínas Cyt y proteínas Cry [6, 7].



Figura 2 Micrografía de *Bacillus thuringiensis*.

Esta es una bacteria gram-positiva que en su fase de esporulación forma estructuras proteicas cristalinas, llamadas cuerpos parasporales, formadas por protoxinas conocidas como δ - endotoxinas. En la figura se indica la espora (1) y el cristal que contiene las proteínas Cry (2).

Las toxinas de *Bt* son toxinas específicas contra sus insectos blanco e inocuas para humanos, vertebrados y plantas, además son completamente biodegradables [6]. Adicionalmente, generan escasa resistencia debido a sus cortos tiempos de permanencia en el ambiente [8].

Al 2002, se estimaba que el 2% del mercado mundial de pesticidas era cubierto con biopesticidas, en el que las toxinas de *Bt* dominaban con el 95% [8].

1.3 Toxinas formadoras de poro

Al ser la membrana celular la estructura que delimita la célula, quizás la vida no podría ser posible sin ella y su formación seguramente fue un evento crucial para la evolución. Dado que su integridad es requerida para sobrevivir, la membrana constituye un punto débil, sensible tanto a ruptura mecánica como a alteraciones moleculares. Es por eso que no es sorprendente que algunos organismos sinteticen moléculas formadoras de poro designadas a irrumpir la integridad de la membrana para una variedad de propósitos [9].

Las toxinas formadoras de poro (TFP), son importantes factores de virulencia producidos por algunas bacterias para matar células eucariotas formando agujeros en sus membranas. Ellas representan un diverso número de proteínas con un amplio rango de células blanco. A pesar de que la secuencia de aminoácidos y la estructura de muchas TFP pueden variar entre una y otra, en cuanto al mecanismo de acción pueden presentarse aspectos similares (Fig. 3) [10].

Las TFP son secretadas por las bacterias como proteínas solubles que pueden difundirse hacia sus células blanco, donde se unen a receptores específicos. Se han identificado los receptores de diferentes TFP, dentro de los cuales se incluyen proteínas transmembranales o ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), lípidos o grupos de lípidos [9].

Para su activación es necesaria la acción de proteasas y la mayoría, si no son todas, las TFP requieren subsecuentemente oligomerización para que ocurra la formación del poro. Este paso es generalmente promovido por unión a receptores, así como a dominios membranales ricos en colesterol, denominados balsas lipídicas o "*lipids rafts*", que actúan

como una plataforma de concentración. Como consecuencia de la inserción de estas estructuras oligoméricas se da la formación del poro, permitiendo el paso de iones que conducen a desequilibrio osmótico y/o muerte celular [11, 12].

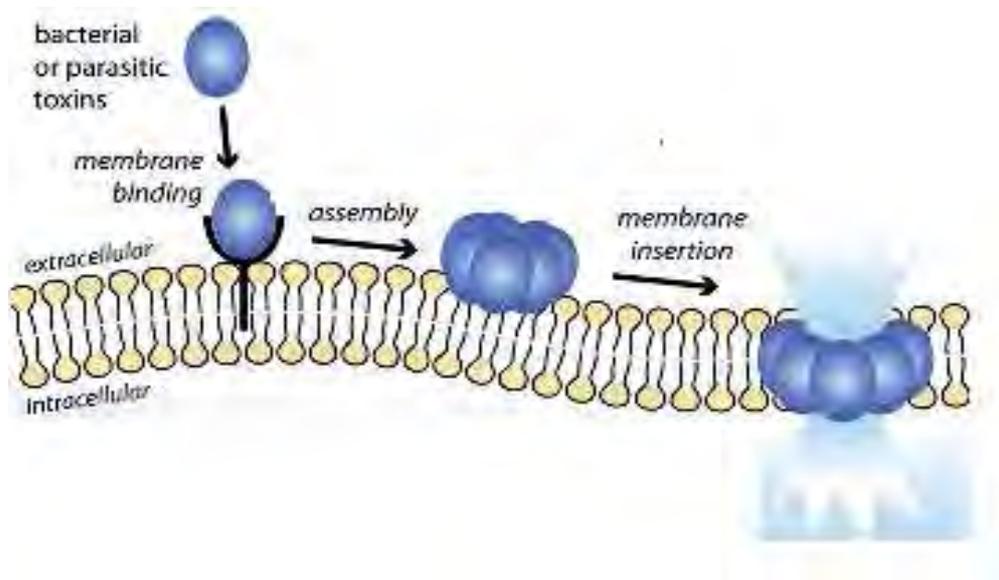


Figura 3 Mecanismo de acción de diferentes TFP.

Las TFP interactúan con los receptores de membrana celular y se oligomerizan, para posteriormente insertarse en la bicapa lipídica y formar un poro que lleva a la muerte celular [9].

Entre las TFP que producen diversas bacterias se encuentran: **toxinas α** , que incluyen la colicina de *Escherichia coli*, la exotoxina A de *Pseudomonas spp*, toxina diftérica de *Corinebacterium diphtheriae* y toxina Cry de tres dominios de *Bt*. Además se encuentran las **toxinas β** , como la aerolisina de *Aeromonas sp.*, α -hemolisina y toxinas Cyt de *Bt* [6].

1.3.1 Toxinas Cry de *Bt*

Las toxinas Cry de *Bt* son TFP producidas como protoxinas en el cuerpo parasporal [13], que contienen la familia de tres dominios (Cry 3-d), las cuales son proteínas globulares

formadas, como su nombre lo indica, por tres dominios que en la protoxina pueden estar formados por proteínas de dos tamaños principales, de 130 kDa o de 70 kDa . Cuando estas protoxinas son activadas por las proteasas en el intestino de la larva, se produce la toxina, la cual tiene un tamaño molecular de 60 kDa independiente de su tamaño inicial [6].

Las familias de toxinas Cry representan más de 200 toxinas relacionadas filogenéticamente con diferente especificidad en sus organismos blancos, en los que se incluyen insectos de los ordenes Lepidóptera, Coleóptera, Hymenóptera y Díptera también existen algunas toxinas Cry activas para nemátodos [6], causando esencialmente una intoxicación intestinal [7], estas proteínas son completamente inócuas para mamíferos. Su especificidad depende de receptores presentes en la superficie celular, representados ampliamente por una familia de caderinas expresadas en el intestino medio de varios insectos [14].

1.3.1.2 Estructura y Organización de Toxinas Cry

La estructura tridimensional de varias toxinas Cry de tres dominios con especificidad para diferentes insectos ha sido resuelta, incluyendo Cry1Aa, Cry1Ab, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa y Cry4Ba. Estas proteínas muestran una organización muy similar en tres diferentes dominios, sugiriendo un modo de acción conservado (Fig. 4) [15].

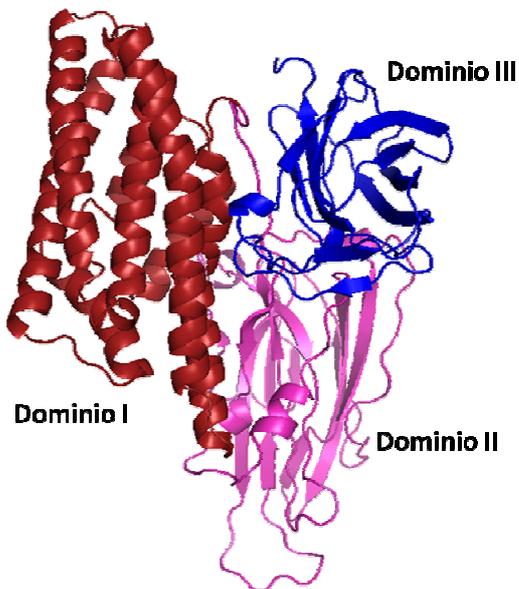


Figura 4 Estructura tridimensional de Cry1Aa.

En general, la estructura de las toxinas Cry coincide en la presencia de los tres dominios. El dominio I o N-terminal está formado por 7 hélices α y se propone que es responsable de la formación del oligomero, inserción en la membrana y formación del poro. El dominio II contiene tres hojas plegadas β antiparalelas y se une a los receptores de la membrana de las células blanco. El dominio III contiene dos láminas plegadas β , su interacción con el dominio I es importante para la estabilidad e integridad de la protoxina y adicionalmente se ha involucrado en la interacción con receptores.

Dominio I

El dominio I, también llamado dominio N-terminal, está compuesto por 7 hélices α antiparalelas y anfipáticas; seis de éstas forman un ramillete que rodea a la hélice α -5 que se localiza en el centro [8]. Se propone que este dominio es responsable de la formación del oligomero, inserción en la membrana y formación del poro (Fig. 4) [6, 15].

Dominio II

El dominio II está formado por tres hojas plegadas β antiparalelas, unidas por asas; su estructura es la más variable de los tres dominios, por lo tanto juega un papel

fundamental en la especificidad de la toxina, ya que contiene epítopes importantes para unirse con los receptores como son los denominados *Loop 2*, *Loop 3* y *Loop $\alpha 8$* (Fig. 4) [6, 8, 15].

Dominio III

El dominio III contiene dos láminas plegadas β antiparalelas que forman un sándwich- β , se ha propuesto que este dominio protege a la toxina de la acción proteolítica de las enzimas digestivas y que la interacción entre los dominio I y III es importante para la estabilidad e integridad de la protoxina. Adicionalmente, se ha reportado que también está involucrado en la unión a los receptores localizados en las células del intestino del insecto específicamente a través de $\beta 16$ y $\beta 22$ (Fig. 4) [8, 15].

1.3.1.3. Mecanismo de acción de toxinas Cry: Modelo de señalización y modelo de “ping pong”

Aparentemente la acción de la toxina es mucho más complicada que simplemente lisis osmótica. El modelo de señalización describe que la interacción de Cry1Ab y Bt-R1(caderina) en la línea celular H5, derivada de ovario de *Trichoplusia ni*, transfectada con el receptor caderina de *Manduca sexta*, activa el evento de citotoxicidad dependiente de Mg^{2+} , esta unión provoca la muerte en las células intestinales del insecto por activación de mecanismos de señalización donde se involucran la estimulación de la subunidad α de la proteína G estimuladora ($G_{\alpha s}$) y de la adenil ciclasa (AC), produciendo un aumento en los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y la activación de la proteína cinasa A (PKA). Este modelo propone que es suficiente la unión con el receptor para activar la vía de señalización AC/PKA, siendo PKA el componente clave en la muerte celular, ya que al

ser activada altera efectores que a su vez alteran la estabilidad del citoesqueleto y canales iónicos en la membrana [14]. Sin embargo, es importante anotar que este reporte se basa en el uso de una línea celular que no es blanco de Cry1Ab y que expresa un receptor no endógeno, por lo que aun resta dar la relevancia biológica de actividad de esta vía en *M. sexta* (Fig.5).

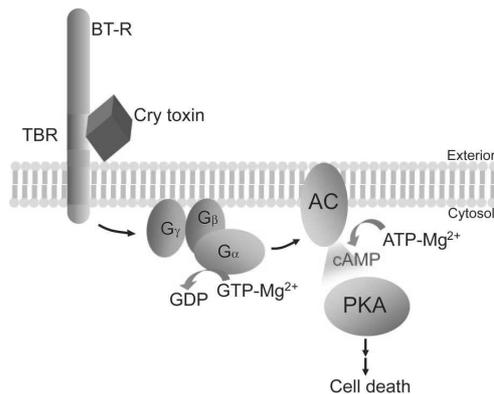


Figura 5 Modelo de señalización AC/PKA (Bulla)[14].

La toxina Cry se une a caderina y activa mecanismos de señalización que involucran la estimulación de la proteína G estimuladora (G_{α_s}) y la adenil ciclasa (AC), produciendo un aumento en los niveles de AMPc y la activación de PKA, la cual activa proteínas desestabilizantes del citoesqueleto y de canales iónicos, llevando a la muerte celular [14].

En cuanto al modelo “ping pong”, éste fue descrito con vesículas del intestino de *M. sexta* y se ha comprobado en larvas de este mismo insecto, usando diferentes mutantes de la toxina. Este modelo involucra moléculas de unión adicionales, como son diferentes receptores anclados por GPI, como alcalino fosfatasa (ALP) y aminopeptidasa (APN) [15].

Se conoce como modelo de “ping pong” porque inicialmente la toxina activada se une a receptores muy abundantes en la membrana, como APN/ALP con baja afinidad, posterior a esta interacción se une con caderina que es menos abundante, esta interacción facilita la oligomerización de la toxina y finalmente el oligómero se une de nuevo y con mayor afinidad a APN/ALP presentes en las balsas lipídicas, formando así un poro en la membrana celular (Fig. 6) [15].

Inicialmente, los cristales deben ser ingeridos por las larvas y éstos se solubilizan en el lumen del intestino medio del insecto, el cual tiene un pH básico (pH 10-11), en Lepidópteros y Dípteros [6, 8].

La protoxina es activada por acción de las proteasas digestivas del intestino de la larva, las cuales realizan los cortes proteolíticos hasta llevarla a un estado activo del tamaño de 60 kDa. En el caso de la toxina Cry 11Aa, se produce un corte extra en el Dominio II, generando dos fragmentos de 32 y 36 kDa, estos dos fragmentos siguen asociados en una proteína que migra en la columna de exclusión molecular igual que las proteínas de 60 kDa [6, 8].

Posteriormente se da la interacción con APN/ALP y luego con caderina, receptores localizados en la microvellosidad apical de las células del intestino larvario. La unión de la toxina Cry con el Bt-R1 (caderina) facilita un corte proteolítico extra, que conlleva a la remoción del extremo N-terminal, incluyendo la hélice α -1 [16]. Este corte expone residuos hidrofóbicos e induce a la oligomerización de la toxina en una estructura donde se asocian de 3 ó 4 subunidades [6, 8, 17]. El oligómero aumenta 200 veces su afinidad hacia los receptores anclados por GPI, APN o ALP [18, 19]. Estos receptores se encuentran localizados en las balsas lipídicas, donde el oligómero se inserta formando un poro en la membrana, induciendo la muerte de las larvas al destruir las células del intestino debido al desbalance osmótico que conlleva a la ruptura de la membrana celular [6, 15].

La APN es una molécula abundante en el intestino de *M. sexta*, en contraste con Bt-R1 que está presente en una concentración mucho más baja. Es por esto que se especula que el monómero de Cry1Ab se une primero con baja afinidad a APN antes de realizar la interacción de alta afinidad con Bt-R1 para posteriormente unirse de nuevo a los segundos receptores con mayor afinidad (APN/ALP) [15].

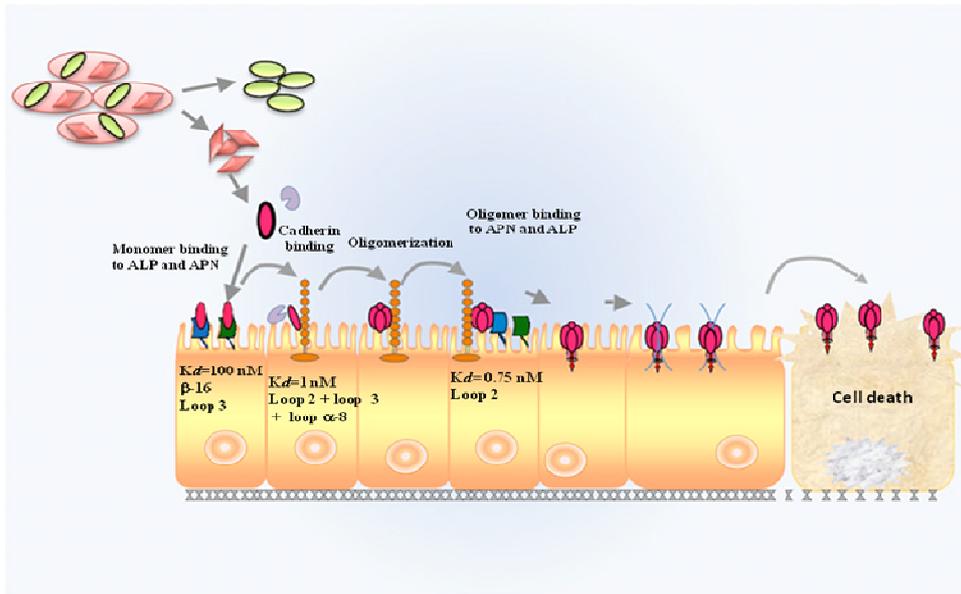


Figura 6 Modelo de "ping pong" (Bravo)[20]

Interacción de la toxina Cry1Ab con APN/ALP y el Bt-R1. Posterior a la solubilización y activación de la toxina en el intestino del insecto, el monómero Cry se une con baja afinidad a APN/ALP, esta interacción es seguida de la unión de alta afinidad con Bt-R1 que lleva a cortes en la hélice α -1 y oligomerización. La estructura oligomérica se une con alta afinidad a APN/ALP, permaneciendo unido con Bt-R1, posteriormente se da la inserción en la membrana [15].

Los resultados de trabajos realizados en nuestro laboratorio proponen que la remoción de la hélice α -1, gracias a la activación de la toxina por las proteasas del intestino y su unión a caderina, son pasos esenciales para la oligomerización, unión a receptores y formación de poro; sustentando la importancia del receptor caderina en la toxicidad de *Bt*, por lo tanto, toxinas Cry1Ab y Cry1Ac modificadas (Cry1AbMod y Cry1AcMod), generadas por ingeniería genética y carentes de la hélice α -1, pueden oligomerizar en ausencia del receptor [20].

Las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod matan insectos sensibles, silenciados en caderina o reportados como resistentes por mutaciones en el gen de esta proteína, soportando el modelo de "ping pong" y formación de poro y refutando el de señalización, el cual describe la interacción con el receptor como único paso para desencadenar una respuesta de muerte celular [20].

La pérdida de toxicidad frente a Lepidópteros y Dípteros de toxinas mutadas en la hélice $\alpha 3$ del Dominio I, las cuales se unen a caderina igual que la toxina silvestre, pero no forman poro debido a cambios en residuos importantes en la formación del oligómero, y de mutantes de la hélice $\alpha 4$ del dominio I, que forman oligómero pero no forman poro, sustentan la importancia de la interacción con receptores, pero además la oligomerización y posteriormente la formación de poro, en el mecanismo de acción de dichas toxinas [21, 22].

1.4. Respuesta celular a formación de poro

El principal blanco de las TFP es la membrana plasmática, la cual es víctima de ruptura mecánica tras la formación de poro, lo que produce cambios en la composición citoplasmática de iones y la pérdida del potencial de membrana [6]. En mamíferos se ha reportado que lo que ocurre es principalmente salida de K^+ y entrada de Ca^{++} , provocando la despolarización de la membrana plasmática e induciendo cambios en la presión osmótica de la célula blanco [8-10].

Las lesiones producidas por las TFP son de tamaños variados, según la naturaleza de la toxina y puede estar rodeada por lípidos o proteínas. Estudios recientes sugieren que diferentes lesiones son reparadas por la célula, involucrando diversos mecanismos de defensa que operan a diferentes tiempos [9].

Es claro que antes de que ocurran daños irreversibles tras la formación de suficientes poros que destruyen la membrana plasmática, las células blanco pueden desencadenar sofisticados mecanismos de transducción de señales como respuesta a las

concentraciones sublétricas de TFP [10]. Entre las respuestas de las células se podrían incluir respuestas inmunes adaptativas o innatas [23].

Por otro lado, a altas concentraciones de TFP las células blanco sólo desencadenan respuestas de muerte.

1.4.1 Mecanismos de muerte inducidos por TFP

Las respuestas que desencadenan muerte dependen del tipo de célula blanco y de la dosis de toxina, en general, son principalmente apoptosis, oncosis y piroptosis [10].

La apoptosis se induce por bajas dosis de TFP y es descrita como un proceso de muerte programada en el cual no hay inflamación. La morfología celular se caracteriza por condensación citoplasmática y nuclear y fragmentación del DNA, se involucran cascadas de caspasas [24].

La respuesta de oncosis se caracteriza por hinchazón celular y de organelas, globulación e incremento de la permeabilidad de la membrana y se asocia con altas dosis de TFP. La piroptosis es el proceso de inflamación dependiente de caspasa-1, la muerte celular involucra la secreción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β e IL-18 después de la formación del complejo inflamosoma [10].

1.4.2. Mecanismos de defensa inducidos por TFP

Tras el daño de la membrana, las células activan vías de señalización con el objetivo de reparar la integridad de la membrana plasmática y la homeostasis de iones, interesantemente esas vías no requieren síntesis de proteínas.

Entre las diferentes respuestas descritas a la fecha, se ha reportado que las células activan cascadas de señalización que les permiten entrar a estados quiescentes, donde se consume un mínimo de energía mientras que ocurre la reparación del daño en la membrana celular. Más específicamente, se detiene la síntesis de proteínas, los constituyentes citosólicos son reciclados por autofagia y la energía es almacenada en gotas de lípidos [10, 25]. La autofagia como respuesta de defensa a TFP se ha reportado en células CaCo-2, tras la acción de la citolisina de *Vibrio cholerae* la célula produce un autofagosoma que contiene la TFP y la lleva a degradación en los lisosomas [26]. Un resumen de los mecanismos celulares en respuesta a TFP se presenta en la figura 7.

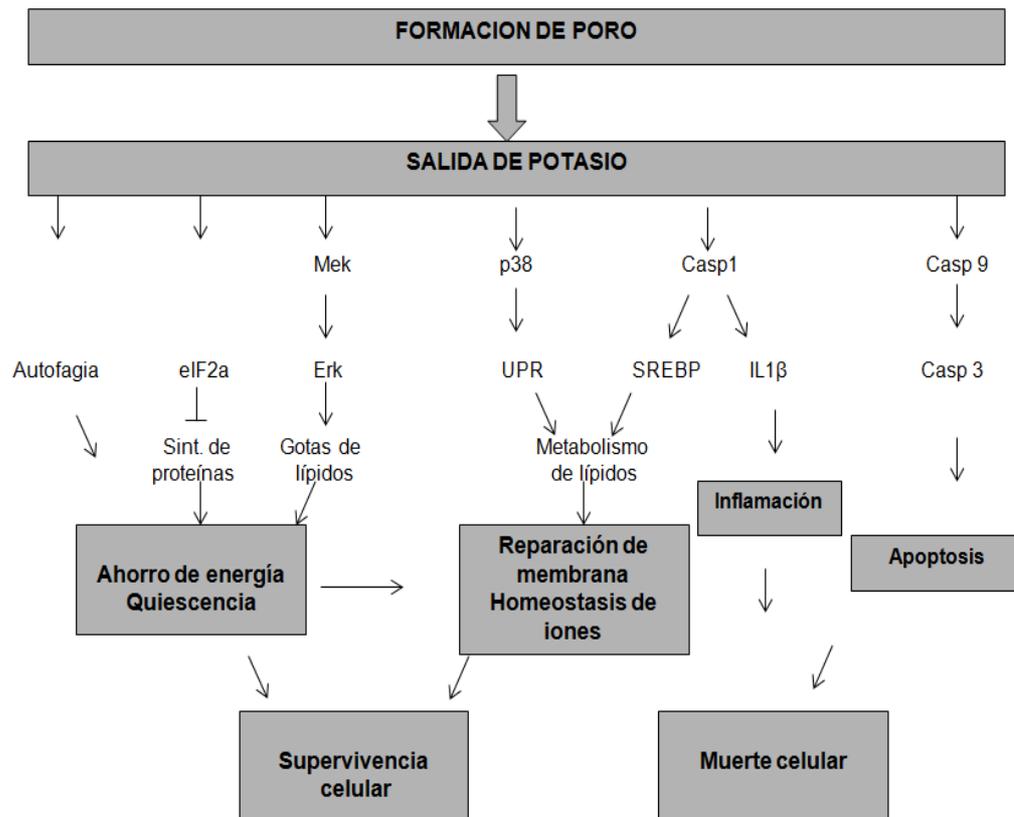


Figura 7 Representación esquemática de la respuesta celular a TFP

Los eventos de formación de poro y disminución de potasio intracelular son indispensables en diferentes líneas celulares y organismos completos, ya que desencadenan una variedad de respuestas frente a TFP, las cuales llevan a ahorro de energía, reparación de membranas y homeostasis de iones para la supervivencia celular y mecanismos de apoptosis e inflamación que desencadenan muerte celular (figura modificada de Ref.[25]).

Dentro de los procesos celulares que ocurren tras la formación de poro está la activación de la endocitosis-exocitosis, la cual, se ha caracterizado en células Cos7 y HaCaT tras la formación de poro por α -toxina y estreptolisina O. Este proceso es dependiente de la entrada de calcio, la célula eucariota internaliza el complejo del poro y posteriormente lo regresa al medio extracelular como un exosoma [27].

La activación de la síntesis de lípidos se describió en *Caenorhabditis elegans* tras la acción de Cry5B así como en células CHO y HeLa al retarlas con aerolisina, el aumento de la

biogénesis de membrana, constituye un mecanismo para reparar la membrana deteriorada por la TFP [28, 29].

1.4.2.1. Activación de la vía de MAPK p38

La familia MAPK (*Mitogen activated protein kinases*) incluye un grupo altamente conservado de cinasas de serina, tirosina y treonina, involucradas en la regulación celular en respuesta a señales intra y extracelulares o estreses físicos, tales como radiación, choque osmótico o injuria isquémica, las controlando los mecanismos de supervivencia celular y adaptación, esta familia se divide en tres vías, donde se incluyen p38, JNK (c-Jun NH2-cinasa terminal) y ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) [30].

La activación por fosforilación de MAPK p38 es uno de los mecanismos más conservados a nivel de células eucariotas en cuanto a respuesta a diferentes tipos de estrés, incluyendo formación de poro por TFP [22]. Esta activación se ha descrito en células epiteliales, HaCaT, HeLa y *C. elegans* como respuesta a la formación de poro por estreptolisina, neumolisina, α -toxina, aerolisina, α -hemolisina y Cry5B entre otras [10]. Sin embargo, se sabe relativamente poco de ésta respuesta en insectos contra el ataque de toxinas Cry de *Bt*.

En estudios realizados en *C. elegans* al retarlo con Cry5B y en células de mamífero (HeLa) frente aerolisina, se observó el aumento de MAPK p38 y JNK, adicionalmente la mutación o bloqueo de MAPK p38 produjo nemátodos y células HeLa hipersensibles a la TFP correspondiente, por lo que se concluyó que p38 está involucrada activando la respuesta de defensa en el nematodo y también en células de mamíferos [31]. Posteriormente, se comprobó que la MAPK p38 en *C. elegans* y HeLa después del tratamiento con la TFP,

activa la respuesta a estrés del retículo endoplasmático de proteínas mal plegadas (UPR), un sistema complejo que responde a diferentes situaciones de estrés en la célula, cuyas mutaciones en algunos de sus componentes inducen hipersensibilidad a TFP [29].

Basándose en estos estudios, en el laboratorio se analizó la activación de MAPK p38 en larvas de *M. sexta* y *A. aegypti* después de ser intoxicadas con Cry1Ab y Cry11Aa, respectivamente, particularmente se analizó su fenotipo tras silenciar esta proteína y exponerlos a la toxina. Se encontró que la fosforilación de MAPK p38 es una respuesta *in vivo* de las células del intestino de larvas de *M. sexta* y *A. aegypti* intoxicadas con Cry1Ab (Fig. 8A) y Cry11Aa (Fig. 8B) respectivamente. Además, esta respuesta depende de la actividad de formación de poro, ya que al exponer las larvas de *A. aegypti* y *M. sexta* a toxinas mutadas, Cry1Ab-R99E y Cry11Aa-R90E que no forman poro, pero que si son capaces de unir a receptores, no se observó la fosforilación de MAPK p38, indicando la importancia de la formación del poro en la activación de MAPK p38 en ambos insectos (Fig. 8 A y B)[22].

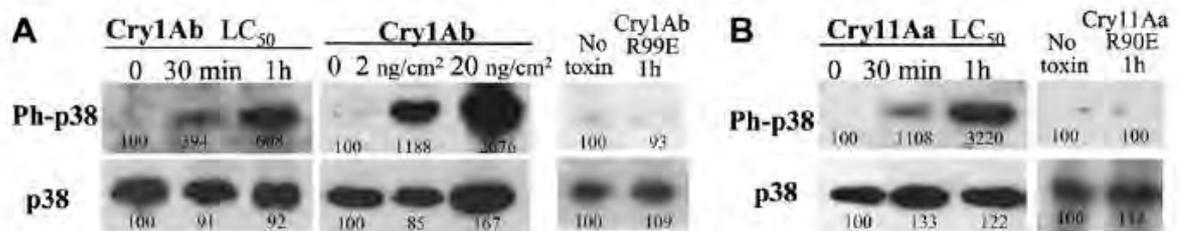


Figura 8 Activación por fosforilación de MAPK p38 tras la formación de poro por parte de toxina Cry1Ab y Cry11Aa en *M. sexta* y *A. aegypti* respectivamente [22].

- A. Larvas de primer estadio de *Manduca sexta* intoxicadas con Cry1Ab y con mutante no toxica de Cry1Ab, afectada en oligomerización y formación de poro (R99E).
- B. Larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* son intoxicadas con Cry11Aa y con una mutante no toxica de Cry11Aa, afectada en oligomerización y formación de poro (R90E).

El silenciamiento de MAPK p38 en los insectos *A. aegypti* y *M. sexta* produjo un fenotipo similar al observado en otros organismos silenciados al exponerlos a TFP, este bloqueo induce hipersensibilidad de 10 veces a la toxina Cry, por lo que se propone que esta ruta dispara una respuesta de defensa a la toxina tanto en insectos Dípteros, como en Lepidópteros [22].

2. ANTECEDENTES

2.1. Activación de biosíntesis de lípidos por el sistema SREBP

Se ha reportado que la inducción de síntesis de lípidos constituye una respuesta de defensa a aerolisina y α -toxina en células HeLa. Las células responden a tratamientos con la TFP activando los centros de regulación que aumentan la biogénesis de lípidos de membrana [28].

La disminución de los niveles intracelulares de potasio, debido a su salida de la células tras la formación del poro por parte de la toxina, está asociada al ensamblaje de dos tipos de complejos de inflamosomas IPAF y NALP3 encargados de activar la Caspasa-1, la cual está involucrada en la activación del centro regulatorio de la biosíntesis de lípidos, SREBP (*Sterol Responsive Element Binding Proteins*) [10].

Las SREBP regulan la biosíntesis de colesterol y la endocitosis de lipoproteínas de baja densidad LDL (*Low Density Lipoprotein*). Los genes regulados por el sistema SREBP poseen a nivel del promotor el SRE (*Sterol Regulatory Element*), al cual se unen las proteínas SREBP para activar su transcripción [32].

Las proteínas SREBP se encuentran retenidas en el retículo endoplasmático gracias a los cofactores Insig 1, Insig 2 y SCAP (*SREBP-Cleavage Activating Protein*). En condiciones en que se requiera sintetizar esteroides, estas proteínas liberan a SREBP, quien sufre dos cortes proteolíticos por parte de las proteasas S1P y S2P (*Site 1/2 protease*) en el aparato de Golgi, para finalmente ser trasladados al núcleo donde las proteínas SREBP pueden unirse a regiones SRE en sus promotores blanco y activar la transcripción de genes

involucrados en biosíntesis de lípidos, lo que contribuye en la supervivencia de la célula por reparación de la membrana (Fig.9) [28].

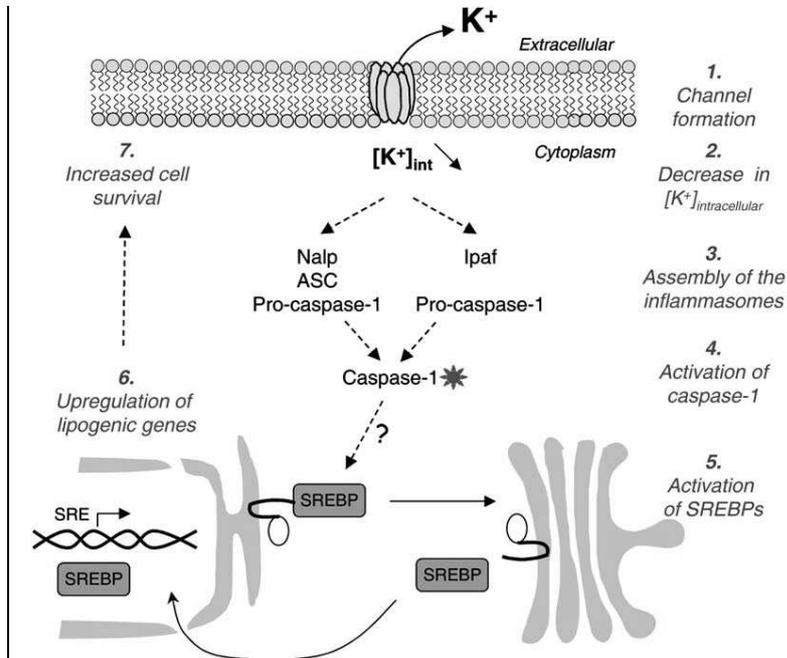


Figura 9 Activación del Sistema SREBP en la célula tras el ataque de TFP's [28].

En células HeLa, como respuesta a aerolisina, se ensamblan los inflammasomas Nalp e Ipaf que activan la caspasa 1, la cual realiza cortes sobre las proteínas SREBP presentes en la membrana del retículo endoplasmático, esta proteína se dirige a golgi donde sufre otros cortes proteolíticos y finalmente ingresa a núcleo a activar la síntesis de lípidos con iniciadores SRE

De cierta forma, fue sorprendente observar la presencia en insectos de las proteínas del sistema SREBP similares a las encontradas en mamíferos, ya que estos no sintetizan esteroides. En *Drosophila melanogaster* se presentan algunas similitudes y diferencias con respecto al funcionamiento en mamíferos. En *D. melanogaster* este sistema no es regulado por colesterol, en lugar de eso su principal regulador es el ácido palmítico o lípidos derivados de él, como la fosfatidiletanolamina, principal fosfolípido de las membranas celulares. Por lo tanto, se propone que la función del sistema SREBP en el insecto, es mantener la integridad de la membrana más que la homeostasis de colesterol, estimulando la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, tales como acetil CoA sintetasa, acetil CoA carboxilasa, ácido graso sintetasa y acil graso CoA sintetasa [33, 34]. Adicionalmente, contrario a lo reportado para mamíferos, larvas mutadas o silenciadas en *scap* y *s2p* son viables debido a diferentes mecanismos de

compensación [35, 36], pero al igual que en mamíferos, se reportó que ciertas caspasas (Drice y Dronc) están involucradas en la activación del sistema SREBP en *D. melanogaster* [35].

2.2. Activación sistema UPR por MAPK p38

El sistema de respuesta a proteínas mal plegadas, denominado UPR (*Unfolded protein response*) es un mecanismo conservado en eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos, el cual es usado para contrarrestar con el estrés iniciado en el retículo endoplasmático [37].

El sistema UPR, produce un aumento de la cantidad de membrana del retículo endoplasmático y de sus componentes, incluyendo chaperonas y otras enzimas que modifican proteínas necesarias para el plegamiento proteico. Las proteínas que no se pueden plegar son retrotranslocadas al citoplasma para ser degradadas por el proteasoma. En una célula en estadio basal, la proteína chaperona Kar2p permanece unida a las proteínas IRE-1, a diferencia de una situación de estrés, donde la demanda de plegamiento de proteínas es alta y se generan proteínas mal plegadas, estas Kar2p liberan las proteínas IRE-1 con el objetivo de que interaccionen entre ellas y participen en el procesamiento de intrones de *xbp-1* (HAC en humanos) activando esta ruta del sistema UPR [38], por otro lado, se ha reportado que el sistema UPR también resulta en la inducción de síntesis de lípidos (Fig. 10) [39].

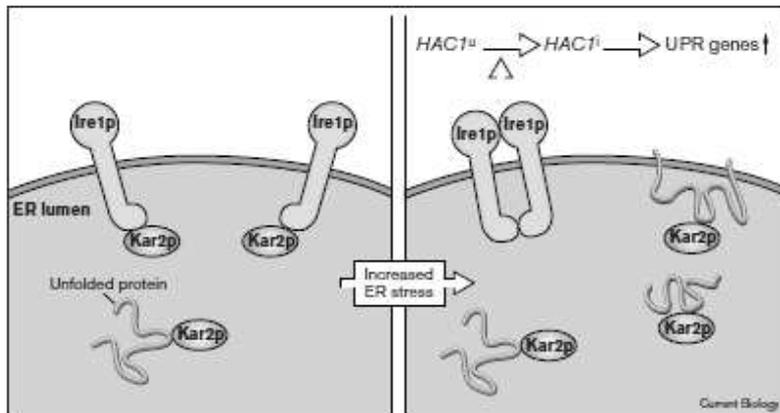


Figura 10 Modelo de Respuesta del sistema UPR.[38]

En estadios basales la proteína Kar2p permanece unida a IRE-1, a diferencia de una situación de estrés, donde la demanda de plegamiento de proteínas es alta y se generan proteínas mal plegadas, Kar2p liberan a IRE-1 con el objetivo de que interaccionen entre ellas y participen en el procesamiento de intrones de *xbp-1* (HAC en humanos) activando esta ruta del sistema UPR.

La forma activa del factor transcripcional XBP-1, generado por la remoción de intrones es suficiente para inducir la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, principales fosfolípidos del sistema endomembranoso, gracias al aumento en la actividad de las enzimas involucradas en su síntesis [40]. Interessantemente, la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina se correlaciona con la activación de UPR, dando evidencia de que ésta es una respuesta rápida al incremento de las necesidades de fosfolípidos por parte de la célula [41].

Distintos análisis experimentales en células HeLa y en nemátodos, demostraron que la MAPK p38 es activada por fosforilación como respuesta al estrés generado por las TFP aerolisina y Cry5B respectivamente. En estos dos modelos, se demostró que la MAPK p38 induce en el retículo endoplasmático la activación del sistema UPR. Mutaciones o silenciamiento en las proteínas IRE-1 ó XBP-1 del sistema UPR, resultan en hipersensibilidad a toxina Cry5B en *C. elegans* y a aerolisina en células HeLa, por lo que se propuso que UPR está participando en una respuesta de defensa a TFP y que es activada por MAPK p38 [29].

Adicionalmente, se propone que seguido de la formación de poro, el sistema UPR responde con la activación por MAPK p38, activando síntesis de lípidos, así mismo, sustancias que producen proteínas mal plegadas (ej. Tunicamicina), activan la transcripción de chaperonas y proteínas relacionadas con el plegamiento [29].

2.3. RNAi como estrategia de silenciamiento

El RNA de interferencia (RNAi) es un mecanismo biológico provocado por RNA de doble cadena (RNAdc) de origen exógeno (*small interfering RNA-siRNA-*) o endógeno (microRNA), que induce el silenciamiento de genes a nivel post-transcripcional, involucrando la degradación del RNA mensajero (RNAm) de una manera altamente secuencia-específica [42, 43]. Inicialmente fue descubierto como respuesta antiviral, ahora es reconocido como un mecanismo de regulación natural para el silenciamiento de la expresión de genes en eucariotas y es usado como una poderosa herramienta experimental para investigar la función de proteínas específicas [42].

Podemos decir que el RNAi se ha posicionado como un método que permite responder muchas preguntas en biología celular, especialmente en las vías de transducción de señales y es efectivo en el estudio de muchos tipos de proteínas, incluyendo componentes estructurales, receptores de la superficie celular, factores transcripcionales y enzimas, ya que éste es un método de disminución de expresión, más no de eliminación total de las proteínas [44]. Esta estrategia revolucionó el estudio de la función de proteínas, ya que es usado para identificar proteínas y vías, que al ser silenciadas provocan un fenotipo determinado [45].

Un RNAdc largo es incorporado artificialmente en una línea celular o a organismos completos para la disminución de la expresión de genes (*Knockdown*). El RNAdc es

procesado por Dicer produciendo siRNA de aproximadamente 21 pares de bases, con dos nucleótidos en el extremo 3' que sobresalen, característicos de los productos cortados por RNasa III como Dicer. Dependiendo del organismo pueden existir uno o varios tipos de Dicer, cada una responsable de diferentes tipos de RNAdc [45, 46], posterior a los cortes, los fragmentos de 21 nucleótidos son incorporados como RNA de cadena sencilla (ssRNA), llamado cadena guía, en un complejo de ribonucleoproteína conocido como Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA (RISC). El RISC identifica los RNAm blanco, basándose en una complementariedad perfecta entre el siRNA y el RNAm y entonces, la endonucleasa de RISC, llamada slicer, una proteína argonauta, corta el RNAm en un sitio cercano a la mitad del siRNA complementario (Fig. 11) [45, 47].

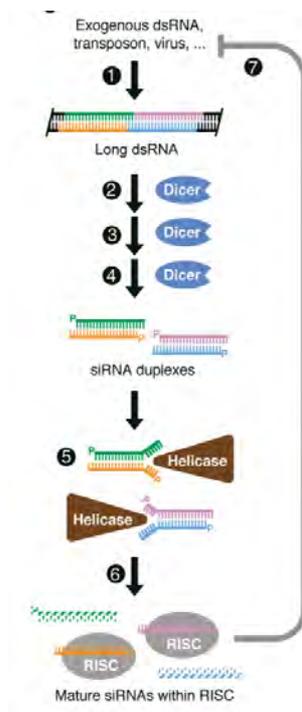


Figura 11 Mecanismo de silenciamiento por RNAi

El RNAdc ingresa a la célula y es procesado por Dicer produciendo un siRNA (21 pares de bases), con dos nucleótidos en el extremo 3' que sobresalen. Los fragmentos de 21 nucleótidos son incorporados como RNA de cadena sencilla (ssRNA), en un complejo de ribonucleoproteína (RISC). El RISC identifica los RNAm blanco, basándose en una complementariedad perfecta entre el siRNA y el RNAm, es ahí donde la endonucleasa slicer, corta el RNAm en un sitio cercano a la mitad del siRNA complementario [45].

Actualmente, es claro que el silenciamiento de genes mediado por RNAdc es un mecanismo conservado en eucariotas. Incluso, la técnica ha sido usada como herramienta para evaluar la genómica funcional en insectos, particularmente en estudios de función de genes en insectos modelo como *D. melanogaster* [45, 46].

La amplificación del RNAdc exógeno en nemátodos, plantas y hongos, se da a través de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP), que amplifica el efecto del silenciamiento de genes por generación transitoria de siRNA derivados de los genes blanco[45]. Esta enzima es probablemente responsable de la amplia respuesta de RNAi mediada por siRNA. Homólogos canónicos de RdRP se han observado en artrópodos como las garrapatas [45] y en estudios recientes realizados en *D. melanogaster*, demostraron que el gen *D-elp1*, una subunidad de la RNA polimerasa II, tiene actividad de RdRP y está involucrada en la inmunidad mediada por RNAi [48].

El silenciamiento por RNAi ha sido ampliamente utilizado en nemátodos y en insectos. El RNAdc se ha administrado a los insectos de diferentes maneras, entre ellas por microinyección, inmersión de los insectos en una solución que contenga el RNAdc y alimentándolos con el RNAdc, entre otras [22, 46]. En todos los casos se ha reportado silenciamiento específico de la proteína blanco.

3. HIPÓTESIS

Aedes aegypti responde al ataque de Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis*, con sistemas de defensa homólogos a los sistemas SREBP y UPR.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Determinar si las proteínas de los sistemas SREBP y UPR están involucradas en la respuesta de defensa en *Aedes aegypti* intoxicadas con toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis*.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el papel de las proteínas caspasa 1, SCAP y S2P del sistema SREBP en la respuesta de *Aedes aegypti* expuestos a toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis*.
- Evaluar el papel de las proteínas IRE-1 y XBP-1 del sistema UPR en la respuesta de *Aedes aegypti* expuestos a toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis*.
- Evaluar si en *Aedes aegypti* el sistema UPR está regulado por MAPKp38.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Medios de cultivo

5.1.1. Medio mínimo SP (Sporulation Protein)

Medio para favorecer la esporulación de las cepas de *Bt*.

Volumen final: 1L

Caldo nutritivo	8g
MgSO ₄	0.25g
KCl	1 g
Bactor Agar	20g

Disolver todos los reactivos (a excepción del agar) en el agua. Posteriormente ajustar el pH a 7 con KOH 5M. Aforar el volumen de la solución a 1 litro de agua destilada. Agregar el agar y esterilizar por autoclave 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez que el medio se ha enfriado, puede agregarse el antibiótico (eritromicina 25µg/mL) y cada una de las siguientes soluciones stock esterilizadas por filtración.

Stock 1 1 mL

MnCl₂4H₂O (disolver 0.198 g en 100 mL de agua destilada)

Stock 2 2 mL

FeSO₄7H₂O (disolver 9.15 g en 250 mL de agua destilada)

H₂SO₄ (tomar 7 mL de un stock 1N para 250 mL de agua destilada)

Stock 3 1mL

CaCl₂2H₂O (disolver 9.8 g en 100 mL de agua)

5.1.2. Medio LB (Luria-Bertani)

Medio para sembrar y mantener cepas de *Bt* y *Escherichia coli*

Volumen final: 1 Litro

A 950 mL de agua destilada agregar:

Bacto-triptona	10 g
Bacto-extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Bactor-Agar (sólo para medio sólido)	20 g

Disolver los tres primeros reactivos en el agua, posteriormente ajustar el pH a 7 con NaOH 5M (aprox. 0.2 mL) aforar el volumen de la solución a 1 litro de agua destilada. Agregar el agar (en caso de ser necesario) y esterilizar por autoclave 20 minutos a 15 lb/sq. Una vez que el medio se ha enfriado puede agregarse el antibiótico (ampicilina 100µg/mL), tanto para el medio líquido como para el sólido.

5.2. Purificación de Cry 11Aa de *Bt*

La cepa de *Bt* resistente a eritromicina que contiene el plásmido pCG6-Cry11Aa, se cultivó por el método de estrías (Fig. 12) sobre la totalidad de la superficie una caja de medio sólido de esporulación SP, con 25µg/mL de eritromicina y se incubó a 30°C. Antes de sembrar 20 cajas e incubar por dos días en medio SP con 25µg/mL de eritromicina, la cepa se reactiva realizando 2 pases sucesivos por dos días (cada uno de 24 horas) en el

mismo medio con el objetivo de favorecer su esporulación y la producción de inclusiones cristalinas [49].

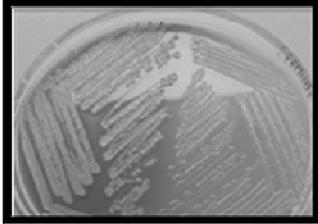


Figura 12 Método de estrías

Método de cultivo de cepa de *Bt* que contiene el plásmido pCG6-Cry11Aa, para la producción de la toxina, en medio agar SP.

La producción de los cristales se verifica por microscopía óptica una vez que han transcurridos dos días de cultivo, depositando 20 μ L de agua destilada estéril sobre una lámina de vidrio y emulsificando una asada del cultivo descrito anteriormente, ésta lámina se lleva al microscopio, donde mediante contraste de fases se observan los cristales y las esporas bacterianas, cuando el cultivo alcanza un 90% de esporulación respecto a bacterias vegetativas, es posible ver los cristales parasporales en una proporción 1:1 respecto a las esporas. En este momento el cultivo se procesa para la purificación de los cristales.

Posteriormente, todo el contenido celular de las cajas cultivadas fue transferido con asa a un tubo falcon que contenía 20 mL de agua destilada estéril con PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) como inhibidor de proteasas a una concentración de 1 mM. Esta muestra se somete a pulsos de sonicación intermitente durante 30 segundos con el objetivo de homogenizar el contenido de la muestra, todo este procedimiento se realiza en frío.

La muestra homogenizada por sonicación se centrifuga a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C y posteriormente se resuspende en 20 mL de agua destilada estéril con PMSF a una concentración de 1 mM.

La concentración de la toxina Cry11Aa es cuantificada por espectrofotometría (*Pharmacia LKB Ultraspec II*), con el reactivo de Bradford (Bio-Rad), el cual se diluyó en agua destilada a una proporción 1:4 reactivo, agua milli Q. Se adicionó 10 µL de la muestra en 990 µL de la dilución Bradford. Ésta mezcla se cuantificó a una longitud de onda de 595 nm y el resultado de absorbancia se interpoló usando una curva estándar de albúmina sérica bovina.

Adicionalmente, para corroborar el peso molecular de la toxina Cry11Aa (65kDa) se realizó una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, 10 µg de toxina más 5 µL de solución lítica 4X se hierve durante 5 minutos y posteriormente se corre el gel aproximadamente 1 hora a 24 miliAmp. Posteriormente, el gel es lavado con agua con el objetivo de eliminar el exceso de SDS y se tiñe en una solución de Azul de Commasie. (GelCode Blue Stain Reagent *thermo Scientific*) en agitación por aproximadamente una hora.

5.3. Silenciamiento de genes

El silenciamiento post-transcripcional de los genes que codifican para las proteínas de interés se realizó por RNAi, con el objetivo de evaluar el fenotipo de respuesta hacia la toxina Cry. Esta técnica involucra los siguientes pasos:

5.3.1. Síntesis de cDNA

5.3.1.1. Extracción de RNA total

Se extrajeron por disección los intestinos de 30 larvas silvestres de cuarto estadio de *A. aegypti* y este tejido se almacenó a -80°C en buffer estabilizante *RNAlater* (QUIAGEN). Posteriormente, se realizó lisis mecánica sobre esta muestra en frío y el RNA total fue purificado con el Kit RNeasy (QUIAGEN) siguiendo el protocolo de muestras de tejido animal. Las columnas a usar son tratadas previamente con DNAsa para obtener un producto más puro y se siguen las indicaciones del fabricante.

El RNA obtenido de las columnas por elución con agua libre de RNAsas fue cuantificado por absorbancia de luz UV a 280/260 nm en el Espectrofotómetro NanoDrop2000 *Thermo Scientific* y se verificó su calidad en gel de agarosa 2% con tiocinato de guanidina.

5.3.1.2. Retrotranscripción

Para este procedimiento, fue usado el Kit SuperScript II Reverse Transcriptase (*Invitrogen*) Se mezclaron 1 μg de RNA total, 1 μL de oligonucleótido dT a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN-3') y 4 μL de dNTP mix (dATP, aCTP, dGTP a 10mM cada uno), esta suspensión se llevó a 65°C durante 5 minutos. Posteriormente, se incubó en hielo durante un minuto.

Pasado este tiempo se adicionaron los siguientes reactivos de *Invitrogen*:

4 μL buffer de reacción 5X

1 μL DTT (ditiotretitol) 0.1 M

1 μL enzima RNase out

1 μL enzima Superscript III

La mezcla se resuspendió e incubó durante 1 hora a 50°C, finalmente la enzima fue inactivada calentando por 5 minutos a 70°C.

Con el objetivo de verificar la calidad del cDNA producido, se realizó RT-PCR para amplificar un fragmento de tubulina usado como control.

5.3.2. Amplificado de segmentos de interés

Para cada fragmento de interés se diseñaron oligonucleótidos específicos con Oligo Primers Analysis Software versión 7.54 (Wojciech & Piotr Rychlik, marca de fábrica *Molecular Biology Insights*, Inc.) basándonos en las secuencias reportadas en la base de datos para el genoma de *A. aegypti*, estos oligonucleótidos deben contener las secuencias de enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* en los extremos 5' para que posteriormente permitan clonar los segmentos de interés. En la tabla 1 se detalla la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos.

Tabla 1 Secuencia de oligonucleótidos específicos para cada gen

GEN	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO DEL PRODUCTO PCR (pares de bases)
S2P	5'-CCG GAA TTC AAC ATT CGG AAG GTG ATT GA-3'	154
	5'-CCC AAG CTT GGT GGC CAA TGT AGA TAA CG- 3'	
SCAP	5'-CCG GAA TTC GTG GGA TAA GTC GTT CGA TG-3'	174
	5'-CCC AAG CTT TCA TGA AGC CTC TTT GGA AG - 3'	
CASP1Q16	5'-CCG GAA TTC TAT CTG TAT GCA AAG GA-3'	250
	5'-CCC AAG CTT ATG AGT AGA ATC CCG GAA TG- 3'	
XBP-1	5'-CCG GAA TTC TGG AAC GTG TAA CGA ATG TG-3'	234
	5'-CCC AAG CTT TTA CCA CAC GGA CAG GAA GT- 3'	
IRE-1	5'-CCG GAA TTC TGC TGT TGC AAA AGA TGA GG-3'	202
	5'-CCC AAG CTT CTC AGG ATT CCG GTA CGT GT - 3'	
RPS3	5'-GGC ATG TTC CGT GCT GAA TTG AAC G-3'	230
	5'TTC TCG GCG TAC AGC TCG ACG-3'	
TUBULINA	5'-CTACGGCAAGAAGTCCAAGC-3'	243
	5'-GAAGCGTGATCGAAGAGAC-3'	
p38	5'- GAA GAT CTT CGG AAA TCA TGC TCA-3'	500
	5'-GAA GAT CTT CGG GAC GAA ATT AAG-3'	

La amplificación de la secuencia específica se realizó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con una mezcla de reacción de MgCl₂ a 5 mM, enzima TaqPolimerasa 2.5 U, Buffer de TaqPolimerasa 2X, dNTP's a 0.5 mM, oligonucleótido 3' a 0.5µM, oligonucleótido 5' a 0.5µM y 1 µg de cDNA como templado.

Para las condiciones de amplificación inicialmente se hizo un ciclo de 94°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de 30 segundos cada uno a 94, 60 y 72°C, finalmente se programó un último ciclo a 72°C por 5 minutos (*Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems*)

Para verificar el peso esperado de cada uno de los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. El producto PCR fue purificado con el Kit MiniElute (QUIAGEN) usando membrana de sílica para adsorber el DNA en presencia de altas concentraciones de sal.

El producto purificado se envió a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM) para confirmar la identidad de la secuencia del segmento amplificado con el del gen blanco.

5.3.3. Clonación

El vector seleccionado para realizar la clonación de los productos de PCR fue el plásmido *Litmus 28i* (Invitrogen) (Fig. 13), este vector posee dos promotores para la enzima RNA polimerasa T7 situados de forma opuesta, lo que permite la transcripción *in vitro* de dos cadenas de RNA complementarias que se asocian formando un RNA de doble cadena el cual será posteriormente usado para dirigir el silenciamiento post-transcripcional de los genes.

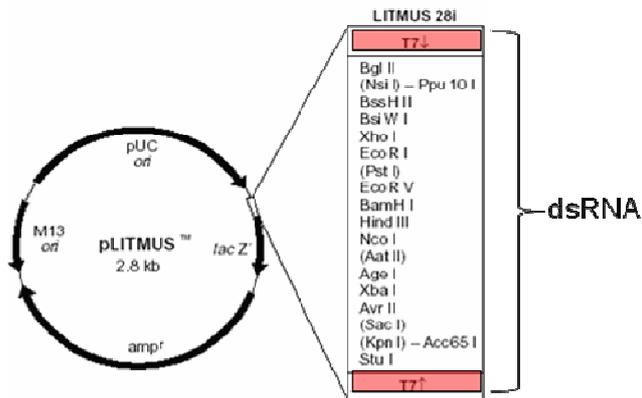


Figura 13 Vector de clonación p-Litmus 28i.

Contiene los sitios de las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* y 2 promotores de la RNA-polimerasa T7 situados de forma opuesta, lo cual permite la clonación del producto de PCR de un fragmento del gen blanco y la síntesis de dos RNAm complementarios que forman un RNAdc.

Tanto el fragmento a clonar como el plásmido contienen los sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *EcoRI*, los cuales facilitan su posterior ligación, para ello ambos son digeridos adicionando 1U de cada una de las enzimas y Buffer Red (Fermentas) a una concentración final de 2X para digerir 1 µg de producto durante 2 horas a 37°C.

Posteriormente, tanto el fragmento a clonar como el plásmido, se ligaron en una proporción 3:1 inserto:plásmido con 1U de la enzima ligasa T4 y una concentración final de 2X del Buffer de ligación (Fermentas), durante 5 horas a temperatura ambiente, seguido de este paso se realiza la transformación en células calcio competentes de *E. coli*.

5.3.4. Protocolo células calcio competentes

Cultivar la cepa TOP10 de *E. coli* en 5 mL de medio líquido LB en agitación a 37°C durante toda la noche. Pasado este tiempo tomar 2 mL del cultivo y pasarlos a un matraz con 100 mL de medio líquido LB, crecer en agitación a 37°C hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0.4.

Poner el matraz en hielo, pasar a tubos falcon de 50 mL (4 tubos) y centrifugar 10 minutos a 3000 rpm a 4°C. Resuspender en 10 mL de CaCl₂ 60 mM con glicerol al 15% frío e incubar 30 minutos en hielo.

Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm a 4°C, resuspender en 2 mL de CaCl₂ 60 mM con glicerol al 15% frío. Alicuotar 200 µL en tubos eppendorf estériles, almacenar a -70°C por un tiempo máximo de 6 meses.

5.3.4.1. Transformación de células calcio competentes

Se toman 20 µL de la ligación y se mezclan suavemente con 200 µL de células calcio competente las cuales son incubadas durante 30 minutos en hielo. Posteriormente las células son sometidas a un choque térmico durante 2 minutos a 42°C, de aquí se pasan nuevamente en hielo por 5 minutos más. Las células se recuperan en 800 µL de medio líquido LB incubando durante una hora en agitación a 37°C.

Posteriormente se dispersaron en placa con medio sólido LB con ampicilina 100 µg/mL, 100 200 y 300 µL por separado, esparciéndolas con perlas de vidrio. Este cultivo se creció a 37°C durante 24 horas.

Las colonias de *E. coli* transformantes, crecidas en agar LB y seleccionadas por resistencia a ampicilina, se subcultivaron en medio líquido LB ampicilina 100 µg/mL, por 12 horas a 37°C en agitación, para posteriormente purificar el DNA plasmídico con el segmento de interés, con el Kit QUIAprep Miniprep (QUIAGEN). Este procedimiento se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas seguido de una absorción del DNA en una membrana de sílica, en presencia de altas concentraciones de sal, los pasos incluyen:

- Preparación y limpieza del lisado bacteriano: el cultivo bacteriano líquido es lisado con un buffer alcalino y posteriormente neutralizado a altas concentraciones de sal, posterior a 10 minutos de centrifugación a 14000 rpm el sobrenadante se pasa a una columna de purificación con membrana de sílica.
- Adsorción del DNA en la membrana: el sobrenadante obtenido en el paso anterior, se pasa a las columnas de purificación que contienen una membrana de sílica para adsorción selectiva de DNA plasmídico presente en el sobrenadante en un buffer con altas concentraciones de sal.
- Lavado y elución del DNA plasmídico: el DNA plasmídico adsorbido gracias al paso por la membrana de sílica es lavado con buffer PB con el fin de remover las endonucleasas, las sales son removidas con buffer PE y posteriormente el DNA plasmídico se eluye de la membrana con el buffer EB o agua.

Del cultivo líquido se realizó una PCR de colonia usando el oligonucleótido para el sitio T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3') con el fin de comprobar la clonación; igualmente el producto purificado con el Kit QUIAprep Miniprep se envió a la Unidad de Secuenciación, con el objetivo de corroborar que el producto insertado era el deseado.

Al realizar los alineamientos del producto de clonación versus la secuencia de interés y comprobar que teníamos un alto porcentaje de identidad (90-100%) se procedió a amplificar el segmento de interés realizando una PCR con 10 reacciones de un volumen final de 50 μ L cada una, usando este producto como templado y el oligonucleótido de T7 como iniciador, esto con el fin de aumentar la concentración del producto. Posteriormente, este producto PCR fue purificado por MiniElute (QUIAGEN) en columnas con membrana de sílica.

5.3.5. Síntesis de RNA de doble cadena (RNAdc)

Usando como templado 1 μ g del producto de PCR purificado anteriormente, el cual contiene los dos promotores para la RNA polimerasa T7, se realizó la transcripción *in vitro* usando el Kit HiScribe T7 (*New England Biolabs*) con el fin de sintetizar dos RNA complementarios y formar un RNAdc

Por cada reacción de 40 μ L, fue necesario adicionar:

- 1 μ g Producto de PCR purificado
- 4 μ L Buffer de transcripción 10X
- 2 μ L Mezcla de ribonucleótidos 20X
- 2 μ L HMW 20X (Componente de alto peso molecular)
- 4 μ L RNA polimerasa T7

Según el volumen de templado adicionado, se llevó a un volumen final de 40 μ L con agua libre de RNAsas, esta mezcla se incubó a 42°C entre 4-8 horas.

En general se realizaron aproximadamente 10 reacciones de transcripción *in vitro* para alcanzar la cantidad deseada de RNAdc.

La extracción y purificación de RNAdc producido en los pasos anteriores se realizó con la técnica de fenol-cloroformo.

5.3.5.1. Purificación con Fenol: Cloroformo de RNAdc

Por cada 20 μ L de reacción de transcripción *in vitro* se le agrega 120 μ L de agua tratada con 0.1% pirocarbonatos de dietilo (DEPC) y 15 μ L de Acetato de sodio 3 M pH 5.2.

Extraer con un volumen igual de una mezcla 1:1 de fenol: cloroformo. Centrifugar la mezcla 2 minutos a 13000 rpm, remover la fase acuosa y pasarla a un tubo nuevo.

Agregar un volumen igual de cloroformo, mezclar bien las dos fases por agitación en vortex y centrifugar la mezcla 2 minutos a 13000 rpm, remover la fase acuosa y pasarla a un tubo nuevo. Repetir este paso una vez más.

Precipitar el RNAdc agregando dos volúmenes iguales de etanol absoluto y dejar a -20°C por lo menos 30 minutos. Centrifugar 15 minutos a 14000 rpm a 4°C .

Remover el sobrenadante, cuidando de no tirar la pastilla semitransparente precipitada, agregar 500 μ L de etanol al 70% y centrifugar durante 2 minutos a 14000 rpm a 4°C .

Remover el sobrenadante y secar en savant durante 15 minutos. Resuspender en 20 μ L de agua tratada con DEPC.

Con el objetivo de verificar la calidad del RNAdc producido, éste fue cuantificado por absorbancia de luz UV a 280/260 nm en el Nanodrop 2000 de ThermoScientific y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para verificar la integridad y el peso del fragmento de interés.

5.3.6. Administración de RNAdc

El Kit Effectene Transfection Reagent (QUIAGEN) fue usado para encapsular el RNAdc y suministrárselo a las larvas de *A. aegypti* recién eclosionadas. El Effectene se usa en conjunto con el Enhancer y el buffer de condensación con el objetivo de alcanzar una alta eficiencia en la transfección. Inicialmente el RNAdc es condensado gracias a la formación del complejo Enhancer-RNAdc en el buffer EC, posteriormente, las micelas de Effectene son adicionadas para encapsular el complejo Enhancer-RNAdc (Fig.14).

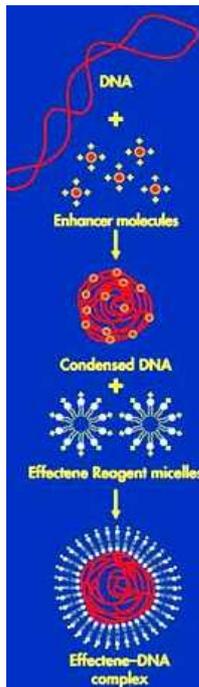


Figura 14 Preparación de micelas de Effectene.

El RNAdc es condensado con moléculas de Enhancer y posteriormente encapsulado en Effectene, estas micelas son usadas para alimentar larvas recién eclosionadas de *A. aegypti* con el objetivo de realizar el silenciamiento de genes blanco.

300 larvas de *A. aegypti* recién eclosionadas fueron alimentadas durante 16 horas con micelas de Effectene que contenían el complejo Enhancer-RNAdc en un volumen aproximado de 15 mL de agua destilada, adicionado con 2.5 µg de RNAdc encapsulado por larva.

Transcurridas las 16 horas, se llevo a un volumen final de 100 mL con agua destilada y se procedió a alimentar las lavas con una mezcla de croquetas de ratón, extracto de levadura y lactoalbúmina en agua destilada, hasta que alcanzaran su cuarto estadio de desarrollo.

Como control para este ensayo, 200 larvas de *Aedes aegypti* recién eclosionadas, fueron alimentadas con micelas de Effectene sin RNAdc.

5.4. Bioensayos

Las larvas de cuarto estadio de *A. aegypti* alimentadas con micelas de Effectene que contenían RNAdc y las larvas control, se sometieron a bioensayos de 24 horas con espora cristal de toxina Cry11Aa purificados de la cepa CG6 de *Bt*, utilizando cinco diferentes dosis, entre 50-3000 ng/mL, en un volumen final de 100 mL de agua desclorada y 10 larvas por dosis en tres repeticiones. Por el método de Bradford se determinó la concentración total de proteínas presentes en la espora/cristal y con este dato se calculó la dosis requerida.

La mortalidad se evaluó a las 24 horas, para calcular la LC_{50} , se utilizó el programa de análisis estadístico *Polo-PC* de LeOra Software, Berkeley CA. Ésto permite observar si el silenciamiento de estos genes afecta la susceptibilidad hacia la toxina Cry11Aa.

5.5. RT-PCR

Con el objetivo de comprobar si fue efectivo el silenciamiento, se realizó un RT-PCR para comparar los niveles de expresión de RNAm de las larvas alimentados con RNAdc y con las larvas alimentadas con micelas de Effectene sin RNAdc, analizando como control la expresión del gen de una proteína ubicua como tubulina.

El RNA se obtuvo y cuantificó de la manera previamente descrita.

Posteriormente, usando como templado el RNA obtenido, se sintetizó cDNA con la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el procedimiento del fabricante, tal y como se describió anteriormente en retrotranscripción.

Se realizó una RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para los fragmentos de interés para comprobar analizar los niveles de expresión de los RNAm de los genes de interés y tubulina como control, los productos se analizaron en geles de agarosa al 2%.

5.6. Reto con LC₅₀ de Cry11Aa a diferentes tiempos

Larvas de *A. aegypti* recién eclosionadas fueron alimentadas con RNAdc de MAPK p38, con el objetivo de silenciar la expresión de este gen y comprobar si está involucrado en la activación transcripcional de una rama de UPR tras el reto con Cry11Aa. Larvas silvestres usadas como control y larvas silenciadas en p38, fueron expuestas a 2 y 4 horas con la LC₅₀ de Cry11Aa.

Se extrajo RNA total de las larvas control y silenciadas retadas con Cry11Aa los diferentes tiempos, se verificó su calidad y se cuantificó tal y como se describe anteriormente y éste fue usado como templado para sintetizar cDNA, que a su vez fue usado para amplificar los transcritos de IRE-1 y XBP-1 por medio de RT-PCR analizando su comportamiento en dichos tiempos de exposición a la toxina y comparando larvas silvestres y larvas silenciadas en MAPK p38.

5.6.1. Análisis de bandas

Se corrieron geles de agarosa al 2% para observar los productos de PCR del transcrito de la proteína ribosomal RPS3, usada como control constitutivo, de p38, de IRE-1 y XBP-1 para analizar su comportamiento tras el reto por diferentes horas a LC₅₀ de Cry11Aa. Las densidades de las bandas se analizaron con el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ.

5.6.2. qRT-PCR

Se extrajo RNA total tal y como se describió anteriormente, tanto de larvas silvestres expuestas a Cry11Aa por 2 y 4 horas como de larvas silenciadas en MAPK p38 expuestas a

los mismos tiempos de toxina. A partir de las muestras de RNA, por retrotranscripción, se sintetizó cDNA de cada una de ellas.

La cuantificación de los transcritos de RPS3, p38, IRE-1 y XBP-1, se llevó a cabo por PCR en tiempo real empleando el equipo Light Cycler 480 II de Roche®. La mezcla de reacción consistió de: 10 µl de SYBRGREEN (Fermentas®), 1 µL de cDNA (5 ng), 1 µL de oligonucleótido 5' (250 nM), 1 µl de oligonucleótido 3' (250 nM) y 7 µl de H₂O estéril. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, 1 ciclo a 95 °C por 15 segundos y 1 ciclo a 60 °C por 1 min; los dos últimos ciclos se repitieron 40 veces. Se emplearon controles internos los cuales consistieron en la misma reacción anterior sin adicionar cDNA. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. El nivel de transcritos de RPS3 fue usado como control interno para normalizar los niveles de los transcritos de los genes a evaluar. Los datos fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak y Schmittgen [50].

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Clonación y alineamientos

Los fragmentos seleccionados para el silenciamiento de los genes correspondientes a los sistemas UPR y SREBP fueron amplificados usando como templado cDNA de larvas silvestres de cuarto estadio de *A. aegypti* y se enviaron a secuenciación, posteriormente se clonaron usando los sitios de restricción para las enzimas *HindIII* y *EcoRI* en el vector *p-Litmus*, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

El cDNA plasmídico que contiene el fragmento también fue enviado a secuenciación, con este resultado se realizó un alineamiento de las secuencias utilizando el programa ClustalW2 para obtener el porcentaje de identidad del fragmento clonado frente al

segmento amplificado (Tabla 2) y para verificar que correspondían a los fragmentos de los genes de interés.

Tabla 2 Porcentajes de identidad de secuencias

Secuencia	% de Identidad	Pares de bases
IRE-1	100	202
XBP-1	100	234
CASP-1	100	250
SCAP	98	174
S2P	100	154

6.2. Síntesis y administración de RNAdc

El fragmento purificado que contiene los promotores para la RNA polimerasa T7 es usado como templado para sintetizar dos RNAm complementarios y obtener un RNAdc, éste fue encapsulado en Effectene tal y como se describe en Materiales y Métodos. Para todos los silenciamientos se alimentaron 300 larvas silvestres recién eclosionadas de *A. aegypti* con aproximadamente 2.5µg de RNAdc para cada una, su concentración fue medida por espectrofotometría en Nanodrop 2000 de ThermoScientific, también se verificó su integridad en gel de agarosa al 2%.

Debido a que en ensayos preliminares se observó un bajo porcentaje de supervivencia después de alimentar las larvas con RNAdc encapsulado en Effectene, decidimos crecer un máximo de 100 larvas en un recipiente de aproximadamente 20 centímetros cuadrados, ya que el espacio disponible fue determinante en su desarrollo, logrando de esta manera

aumentar considerablemente el porcentaje de supervivencia de las larvas alimentadas con RNAdc encapsulado en Effectene. Las larvas se crecieron hasta alcanzar su cuarto estadio, momento en el cual fueron evaluadas por bioensayos para observar su fenotipo de respuesta a Cry11Aa. Además se analizó la expresión del RNAm por RT-PCR tras el silenciamiento, comparando la expresión con cDNA de larvas silvestres alimentadas con Effectene sin RNAdc.

Se observó que temperaturas superiores a 25°C permitían un rápido desarrollo de las larvas, a pesar de que el crecimiento no está coordinado, las larvas alimentadas con RNAdc en Effectene llegan a cuarto estadio entre 5 y 10 días posteriores al suministro de RNAi.

6.2.1. Sistema UPR

El sistema UPR se ha relacionado con respuesta a Cry5B y aerolisina en *C. elegans* y células HeLa respectivamente. Este sistema posee tres vías iniciadas por las proteínas IRE-1, PERK y ATF6 y en términos generales, contribuye en la respuesta a estrés del retículo endoplasmático.

IRE-1 activada realiza un procesamiento no convencional sobre el RNAm de *xbp-1*, produciendo la primera respuesta a estrés que perdura alrededor de 8 horas tras el estímulo [51].

El RNAm de *xbp-1* codifica para un activador transcripcional que dirige la transcripción de genes tales como chaperonas del RE, que participan directamente en el plegamiento de proteínas [51].

Este factor transcripcional también induce la producción de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, principales fosfolípidos del sistema endomembranoso, gracias al aumento en la actividad de las enzimas involucradas en su síntesis [40]. Se ha demostrado que la inducción de la síntesis de fosfatidilcolina se correlaciona con la activación de UPR, dando evidencia de que ésta es una respuesta rápida al incremento de las necesidades de fosfolípidos por parte de la célula [41]. La hipótesis manejada para este sistema y que se relaciona con la formación de poros por TFP en la membrana celular, es que estos lípidos son ocupados para reparar la membrana.

Ya que la rama de IRE-1 y XBP-1 se encontró involucrada en la respuesta de defensa de *C. elegans* frente a Cry5B, se silenció la expresión de estas dos proteínas en larvas de *A. aegypti* para observar su fenotipo de respuesta frente a Cry11Aa.

Tras alimentar 300 larvas recién eclosionadas de *A. aegypti* con RNAdc de *ire-1*, el 80% de ellas alcanzaron el cuarto estadio, comparadas con el crecimiento del control alimentado con Effectene sin RNAdc (CE) donde se observó una supervivencia de 95%, el crecimiento de las larvas tratadas no fue coordinado y tardaron entre 3 y 5 días más que las larvas silvestres en llegar al cuarto estadio (Tabla 3).

La mutación de *ire-1* en *C. elegans* lleva a un aumento de la sensibilidad de 13.2 veces frente a Cry5B con respecto a gusanos control [29]. En el caso de *A. aegypti* silenciados en *ire-1* reportamos un aumento de la sensibilidad de 2.6 veces al retar con Cry11Aa (Tabla 3) con respecto las larvas control CE, a pesar de observar una disminución del 33 % en la expresión del RNAm en el ensayo de RT-PCR (Fig. 15), lo cual indica que esta proteína es importante para desencadenar un mecanismo de defensa hacia esta toxina.

Por otro lado, gusanos de *C. elegans* mutados en *ire-1* resultaron afectados en su crecimiento, nosotros observamos un silenciamiento de *ire-1* en *A. aegypti* de sólo un

33% y las larvas presentaron un 80% de supervivencia, por lo que podríamos inferir que larvas con un silenciamiento mayor podrían también estar afectadas en su crecimiento.

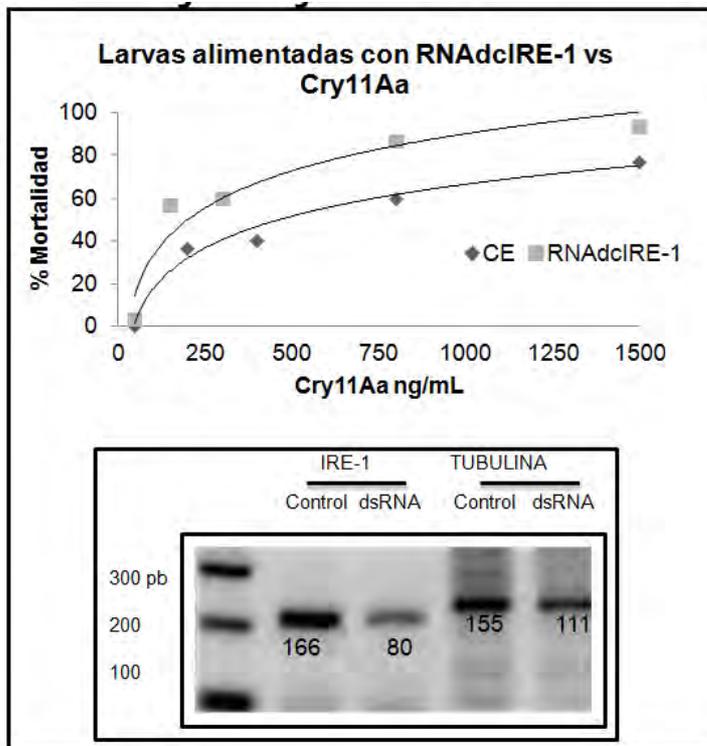


Figura 15 Bioensayo y RT-PCR de larvas de *A. aegypti* alimentadas con RNAdc*ire-1*. En la gráfica se observa la curva de porcentajes de mortalidad de larvas silenciadas y larvas control expuestas a Cry11Aa y la fotografía del gel muestra bandas de transcritos de tubulina usados como control e *ire-1* que comprueban la disminución de su expresión tras el silenciamiento con RNAi.

Tabla 3 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de *A. aegypti* silenciadas en *ire-1*

Proteína silenciada	% Supervivencia de larvas silenciadas	LC ₅₀ ng/mL (Límite de confianza 90%)	Aumento de sensibilidad
IRE-1	80	214 (137-306)	2.6
Control Effectene	95	555 (408-725)	--

Tras alimentar 300 larvas recién eclosionadas de *A. aegypti* con RNAdc de *xbp-1*, el 83% de estas alcanzaron el cuarto estadio comparadas con larvas silvestres alimentadas con Effectene sin RNAdc (CE) donde se observó 95% de supervivencia (Tabla 4), este

porcentaje aumento comparado con ensayos preliminares, donde se obtuvo un porcentaje de supervivencia de 31 y 65%, demostrando que el espacio suministrado para crecer es importante. El crecimiento de las larvas silenciadas en *xbp-1* no fue coordinado y tardaron entre 3 y 5 días más en llegar al cuarto estadio que las larvas control CE.

En *C. elegans* el silenciamiento de *xbp-1* aumenta la sensibilidad 5.7 veces al ser retadas con Cry5B, con respecto al control no silenciado, en este trabajo se reporta para *A. aegypti* un incremento de 2.1 veces al retar con Cry11Aa, tras una disminución del 93% del RNAm en el análisis de RT-PCR (tabla 4), lo que nos indica que en *A. aegypti* ésta proteína también se encuentra involucrada en respuesta de defensa tras el reto con Cry11Aa.

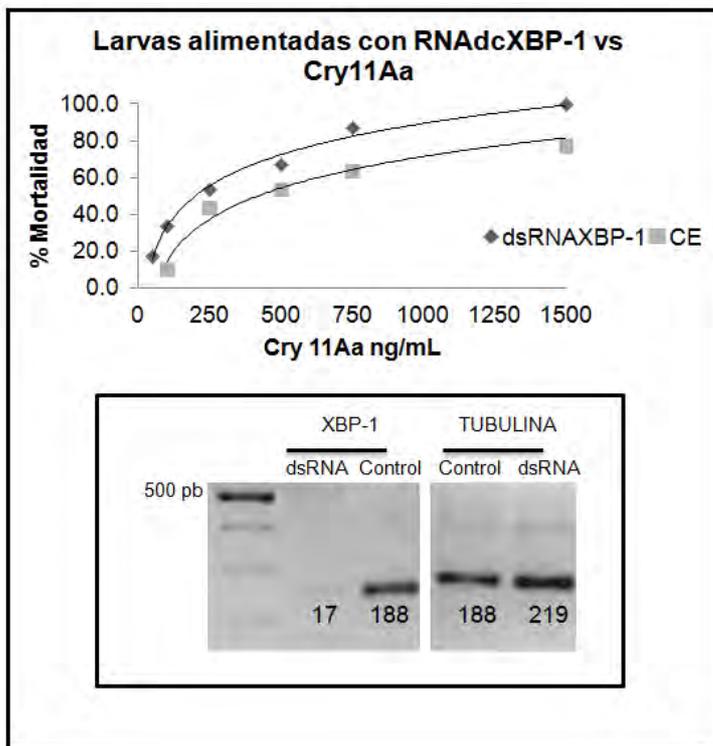


Figura 16 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAdcXBP-1. En la gráfica se observa la curva de porcentajes de mortalidad de larvas silenciadas y larvas control expuestas a Cry11Aa y la fotografía del gel muestra bandas de transcritos de tubulina usados como control y *xbp-1* que comprueban la disminución de su expresión tras el silenciamiento con RNAi.

Tabla 4 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de *A. aegypti* silenciadas en *xbp-1*

Proteína silenciada	% Supervivencia de larvas silenciadas	LC₅₀ ng/mL (Límite de confianza 90%)	Aumento de sensibilidad
XBP-1	83	213.6 (154.8-285.8)	2.1
Control Effectene	95	449 (340-593)	--

Por medio de mutantes y RNAi se logro demostrar que la MAPK p38 es responsable de la activación/regulación de la vía IRE-1 y XBP-1 del sistema UPR, tras el reto con Cry5B en *C. elegans*. Además, en este organismo también se demostró que la ausencia de p38 provoca un fenotipo de hipersensibilidad 100 veces mayor que larvas control, sin embargo, el silenciamiento de *ire1* o *xbp-1* resultan en un aumento de la sensibilidad a toxina Cry5B de 13.2 y 5.7 veces, respectivamente [29]. Con estos resultados es evidente que además de UPR, p38 activa otros sistemas como respuesta de defensa frente a Cry5B en *C. elegans*.

Trabajos realizados en nuestro grupo de investigación, demostraron que el silenciamiento de p38 en *A. aegypti* lleva a un aumento en la sensibilidad frente a la toxina Cry11Aa de 10 veces, comparadas con las larvas control [22] y de 2.6 y 2.1 tras el silenciamiento de *ire-1* y *xbp-1* respectivamente, los cuales fueron observados en este trabajo. Esto demuestra que p38 y UPR, específicamente la vía IRE-1 y XBP-1, al igual que en *C. elegans*, también son importantes para *A. aegypti* y que adicionalmente, hay una correlación entre el aumento de la sensibilidad al silenciar p38, *ire-1* y *xbp-1* entre ambos organismos.

Además, al analizar el número de veces que aumenta la sensibilidad en cada uno de los silenciamientos, tanto para *C. elegans* como para *A. aegypti*, podemos proponer que p38 está involucrada en la activación de otros mecanismos de defensa a Cry11Aa en *A. aegypti* adicionales a UPR, ya que la ausencia de p38 resulta en un aumento en la sensibilidad mayor que la ausencia de UPR, tal y como se observa en *C. elegans*.

6.2.1.1. La activación del sistema UPR depende de p38?

Con base en los resultados obtenidos tras el silenciamiento de UPR y teniendo en cuenta los antecedentes de *C. elegans* donde se menciona que la vía de UPR, IRE-1 y XBP-1 son blanco de activación por parte de la proteína MAPK p38, analizamos el comportamiento de UPR en *A. aegypti* tras el reto con Cry11Aa y si p38 tiene que ver con su activación/regulación, específicamente nos interesó analizar qué ocurre en cuanto la expresión de los transcritos de *ire-1* y *xbp-1* en larvas silenciadas en p38, tras retarlas por 2 y 4 horas con la LC₅₀ de Cry11Aa. Ésto se analizó realizando RT-PCR tal y como se describe en Materiales y Métodos y observando las muestras en una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Fig.17).

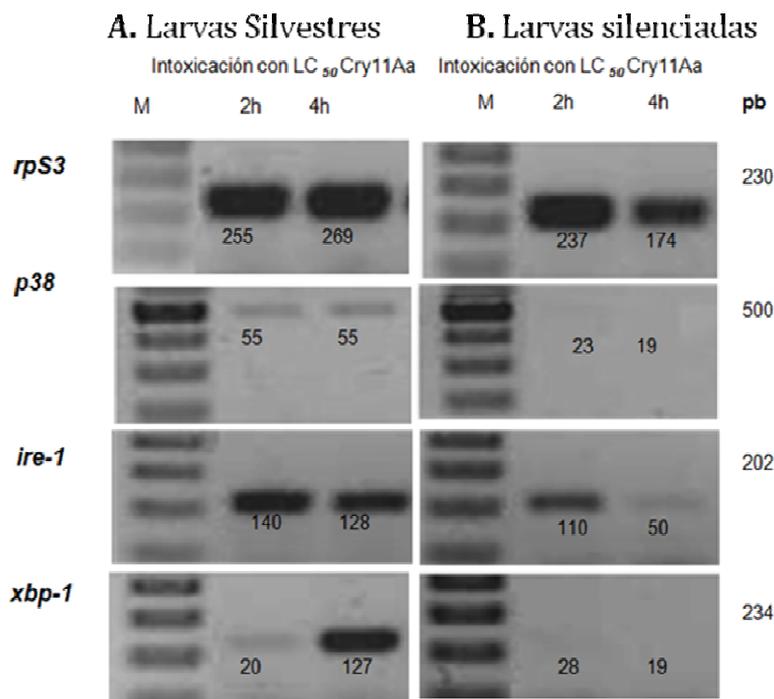


Figura 17 RT-PCR de (A) larvas silvestres y (B) silenciadas en *p38* expuestas a 2 y 4 horas de LC₅₀ de Cry11Aa. Electroforesis en geles de agarosa al 2% de los transcritos amplificados de *rpS3*, *p38*, *ire-1* y *xbp-1* a partir de cDNAs de larvas silvestres y silenciadas en *p38* de *A. aegypti* expuestas a 2 y 4 horas de LC₅₀ de Cry11Aa. Los números baja cada banda indican valores densitométricos con referencia a control.

En este análisis, podemos observar que el transcrito de MAPKp38 no presentaba cambios tras el reto con Cry11Aa. Tal y como se describe en estudios previos, donde se demostró que su activación se da a nivel post-transduccional por medio de fosforilación tras el estrés producido por la toxina (ver Fig. 8) [22].

Sin el estímulo de la toxina no hay activación de p38, por tanto las vías activadas por esta proteína no van a sufrir cambios relevantes.

En larvas silvestres de *A. aegypti* expuestas a Cry11Aa pudimos observar que durante la intoxicación con Cry11Aa la expresión de *ire-1* es elevada. Sin embargo, la expresión de *xbp-1* está disminuida a las 2 horas de intoxicación y se incrementa a las 4 horas. Por el contrario cuando silenciemos p38 y las larvas se exponen a Cry11Aa, observamos que tanto *ire-1* como *xbp-1* disminuyen su expresión (Fig.17B)

El análisis de densitometría de las bandas de la figura 17 se realizó normalizando todo con el control constitutivo del RNAm de la proteína ribosomal *rp53* y comparando larvas silenciadas frente a silvestres (Fig. 18).

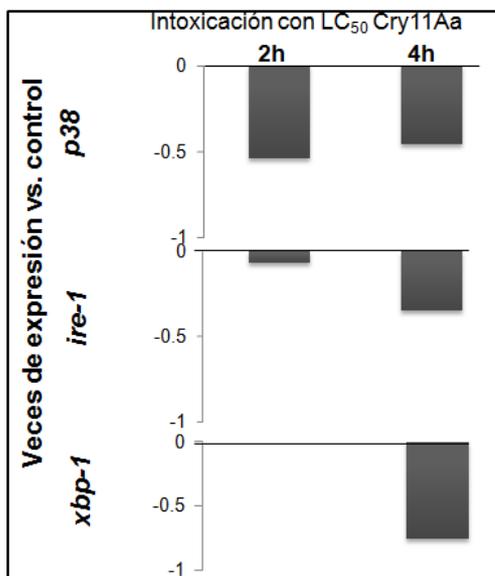


Figura 18 Análisis de bandas por densitometría

Comportamiento de UPR en larvas silenciadas en p38 de *A. aegypti* retadas con LC50 de Cry11Aa normalizadas con *rp53* y comparadas con larvas silvestres.

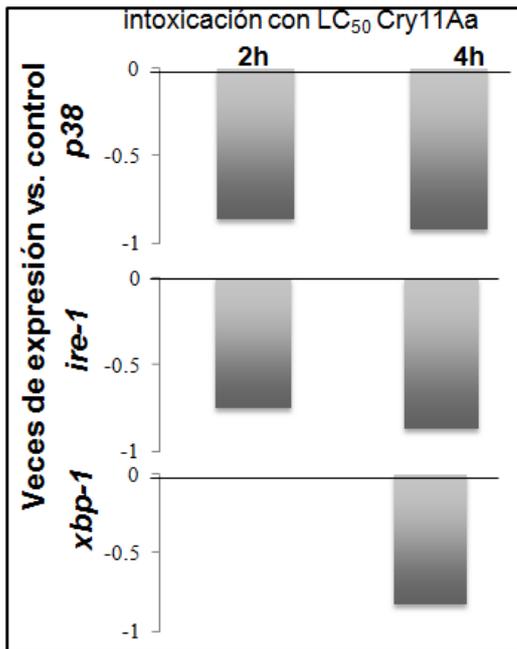


Figura 19 Análisis de PCR en tiempo real
Comportamiento de UPR en larvas silvestres de *A. aegypti* retadas con LC₅₀ de Cry11Aa

Además contamos con los resultados de PCR en tiempo real de las mismas muestras (Fig. 19), éste es un método cuantitativo más sensible que también indica que la expresión de *ire-1* y *xbp-1* se disminuye después de 2 y 4 horas de intoxicación con Cry11Aa, cuando p38 está ausente.

Tanto la densitometría de bandas como la PCR en tiempo real, muestran que cuando p38 está silenciado, la expresión de *ire-1* y *xbp-1* no aumenta, incluso, a pesar de exponer las larvas a Cry11Aa, estos transcritos disminuyen, al compararlas con larvas silvestres. Es por esto que se sugiere que p38 podría estar involucrada en la regulación de la expresión de *ire-1* y *xbp-1* como respuesta al estrés producido por la intoxicación con Cry11Aa en *A. aegypti*.

Tenemos contemplado analizar la función de IRE-1 cuando p38 está presente y cuando está silenciada. Por lo que proponemos analizar el procesamiento alternativo (splincing) del RNAm de *xbp-1*, el cual se lleva a cabo por IRE-1, este procesamiento ha sido reportado en *C. elegans* y *Homo sapiens*. El análisis de la secuencia del sitio de procesamiento de *xbp-1* es muy conservado para *C. elegans*, y *A. aegypti*, por lo que

podemos inferir que el procesamiento para activar este transcrito es similar en distintos organismos (Fig. 20).

```

xbp-1Hs CAG----CGCTTGGG-GATGGATGCCCTGGTTGCTGAAGAGGAGGCGG-----AAGCCAA 452
xbp-1Ae CAAGCCGAGCTAGAGCGACGACTCAACGATCTTCAGCAGCACCTACAGT-TGAACGCCAT 440
xbp-1Ce CAACGAAAACCTGATGAACAGCAATGATGCATGCATCTACCAGAACGTCGTCTACGAAGA 452
      ** . . . . .
xbp-1Hs G-GGGAATGAAGTGAGG-----CCAGTGGCC-----GGTCTGCT----- 486
xbp-1Ae C-AAGTCGGAACGACGAC--CCCAGCAGCCTCACACAGTGTGGCTCTGCTTCCACCCT 497
xbp-1Ce AGAAGTCGTGCGGTGAGGTTGCACCAGTGTGTCGTCGTCGG---AGGAGAGGATCGCCGTGC 509
      ..*:. . . . .
xbp-1Hs ----GAGTCCGCAGCACTCAGACTACGTGCACCTCTGCAGCAGG-----TGCAGGC 533
xbp-1Ae TCTAGGATCAGCAGCATCCG---CCCAAACCCCTCAGCAGCAGGGATCTTTAATGGAAGC 554
xbp-1Ce CTTTGAATCAGCAGCATTC---TTAATGAGCCTCAGCAGTGGG-----AACAGGC 557
      *..**.*.***** * . . . . . *****:***** .** :. *.**
xbp-1Hs CCAGTTGTCACCCCTCCAGAACAT-CTCCCATG-GATTCTGGCG-----G 577
xbp-1Ae ACAGACGACACTGAGTCAGGACAAGATGGGTCTG-AAGACCGACGAAG-----AAAAGG 607
xbp-1Ce CCGATCCACCTCCATCAACAACAACATCAGCAACCAACTCCGTCGTATGGATTCCAAGAA 617
      *. . . . . :*. . . . . * . . . . . :. * : * * * *
xbp-1Hs TATTGACTCTTCAGAT-TCAGAGTCTGATATCCTGTT----GGGCATTCTGGACAACCT 631
xbp-1Ae TAGCGACCCCTGTGGAAGATAGTTGCTCTCTGCCTGCTCTACAGGACATGCTCGAAGACTT 667
xbp-1Ce GAACAACACAATCAGTGTGGATATGTATCTAACTATCATCTCGATTCTATGCAACCACAT 677
      * .** *: . . . . . * : : .** . * . * . * . **:*
xbp-1Hs GGAC----CCAGTCAT----GTTCTTCAAATGCC--CTTCCCAG--AGCCTGCCAGCC 678
xbp-1Ae CGACGTGTCGAAGCTCGAAGAGCTCGCCGAAAGCCTTCTGGCCAATGTACAAGCGAACT 727
xbp-1Ce GGATCGCAACAAGAAG-ATGGACACCTCGAACAAATCCTCGAACATCTCAAGAGCCCAAG 736
      ** .** .: . : * .** . . . . . ** . . . * . . . :** . .

```

Figura 20 Alineamiento de secuencias de *xbp-1*

Los nucleótidos subrayados corresponden al sitio de procesamiento alternativo realizado por IRE-1 en los transcritos de *xbp-1* en *H. sapiens (Hs)* y *C. elegans (Ce)* para activarlo como factor transcripcional. Adicionalmente, se resalta en gris la identidad de secuencias que existe en ese mismo sitio entre *A. aegypti (Ae)* y *Ce*.

6.2.2. Sistema SREBP

El sistema SREBP fue descubierto en células de mamíferos estimulando la síntesis de colesterol y ácidos grasos no saturados [33] y se ha reportado que induce la síntesis de lípidos como respuesta de defensa a aerolisina y α -toxina en células HeLa [28].

La proteína SREBP activada se une a regiones SRE en sus promotores blanco para iniciar la transcripción de genes involucrados en biosíntesis de lípidos, lo que contribuye en la supervivencia de la célula por reparación de la membrana tras la formación de poro [28].

En células HeLa se ha comprobado que la Caspasa-1 está involucrada en la activación de este sistema [10], igualmente se describió que la caspasa Drice de *D. melanogaster* se encuentra involucrada en la activación del sistema SREBP, contribuyendo en la regulación de la biogénesis de membrana [35].

Encontramos que *A. aegypti* tiene un homólogo de la caspasa Drice de *D. melanogaster*, nombrada Caspasa-1Q16MZ1, que presenta un 74% de identidad de secuencia (Fig. 21), por lo que decidimos silenciar la expresión de sus transcritos por RNAi.

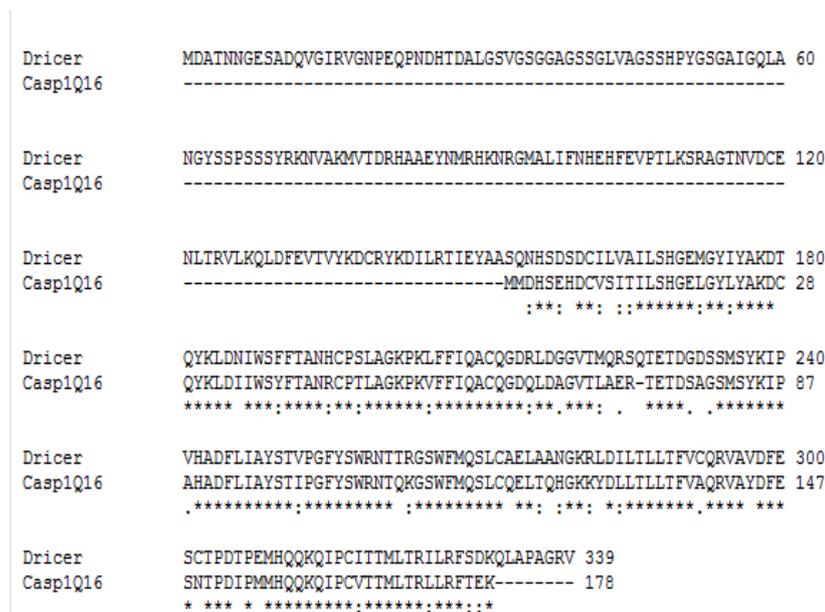


Figura 21 Alineamiento entre Drice y Casp1Ae.

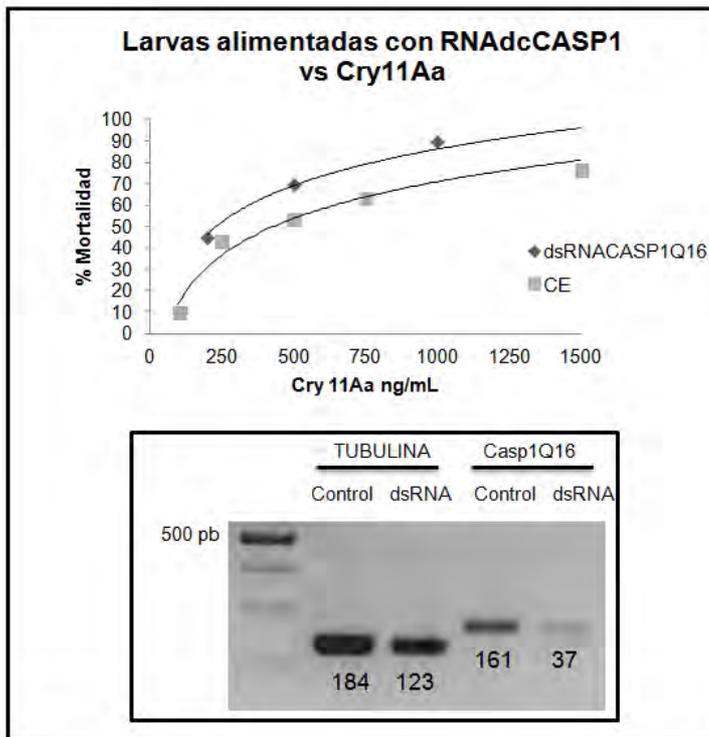


Figura 22 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAdcCasp-1

En la gráfica se observa la curva de porcentajes de mortalidad de larvas silenciadas en las *casp-1* y larvas control expuestas a Cry11Aa. El gel muestra bandas de transcritos de tubulina usados como control y Casp1Q16Ae que comprueban la disminución de su expresión tras el silenciamiento con RNAi.

Tabla 5 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de *A. aegypti* silenciadas en *caspasa-1*

Proteína silenciada	%Supervivencia de silenciadas	LC ₅₀ ng/mL (límite de confianza 90%)	Aumento de sensibilidad
Caspasa-1	98	217 (23-353)	2.0
Control Effectene	95	449 (340-593)	--

Al realizar el silenciamiento de la Caspasa-1 se observó un aumento en la sensibilidad de 2.0 veces tras el silenciamiento del 72% de sus transcritos. En cuanto al porcentaje de supervivencia tras el silenciamiento de *casp-1*, este fue del 98% (Fig. 22) (Tabla 5).

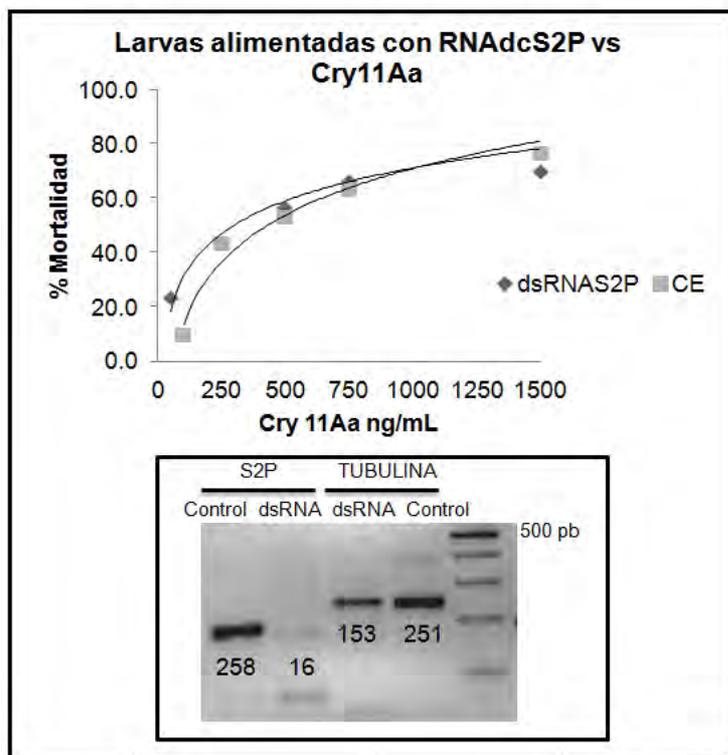


Figura 23 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAiS2P

En la gráfica se observa la curva de porcentajes de mortalidad de larvas silenciadas y larvas control expuestas a Cry11Aa. El gel muestra bandas de transcritos de tubulina usados como control y S2P que comprueban la disminución de su expresión tras el silenciamiento con RNAi.

Tabla 6 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de *A. aegypti* silenciadas en *s2p*

Proteína silenciada	%Supervivencia de silenciadas	LC ₅₀ ng/mL (límite de confianza 90%)	Aumento de sensibilidad
S2P	86.6	305 (137-533)	1.5
Control Effectene	95	449 (340-593)	--

Para el caso del silenciamiento de S2P, que es una metaloproteasa hidrofóbica encargada de realizar el segundo corte proteolítico a SREBP para activarlo como factor transcripcional y dirigirlo al núcleo, no se observa un aumento significativo en la sensibilidad hacia Cry11Aa, ya que los valores de LC₅₀ sobrelapan con los del control. El

silenciamiento del 91% de los transcritos de S2P en *A. aegypti* no presentó un cambio drástico en el crecimiento de las larvas (Fig. 23) (Tabla 6).

Otra proteína del sistema SREPB que se silenció fue SCAP, que es una proteína transmembranal que se encarga de retener las proteínas SREBP en el RE, ésta proteína censa las concentraciones celulares de esteroides y se ha sugerido que su interacción con la caspasa-1 en mamíferos permite la liberación de SREBP para que se active el sistema [28]. A diferencia de lo reportado para células HeLa silenciadas en SCAP, donde al exponerlas a la aerolisina se observaba una mayor sensibilidad con respecto a larvas control, nosotros no obtuvimos ninguna variación en la sensibilidad tras el silenciamiento de SCAP, ya que las LC_{50} se sobrelapan entre las larvas control y las larvas silenciadas, demostrando su poca o nula importancia en la respuesta de defensa tras la intoxicación con Cry11Aa (Fig. 24).

Cabe anotar que el 98% de silenciamiento de los transcritos de SCAP produjo una supervivencia del 62.3% (Tabla 7), lo que nos sugiere que esta proteína probablemente esté relacionada con el crecimiento de las larvas.

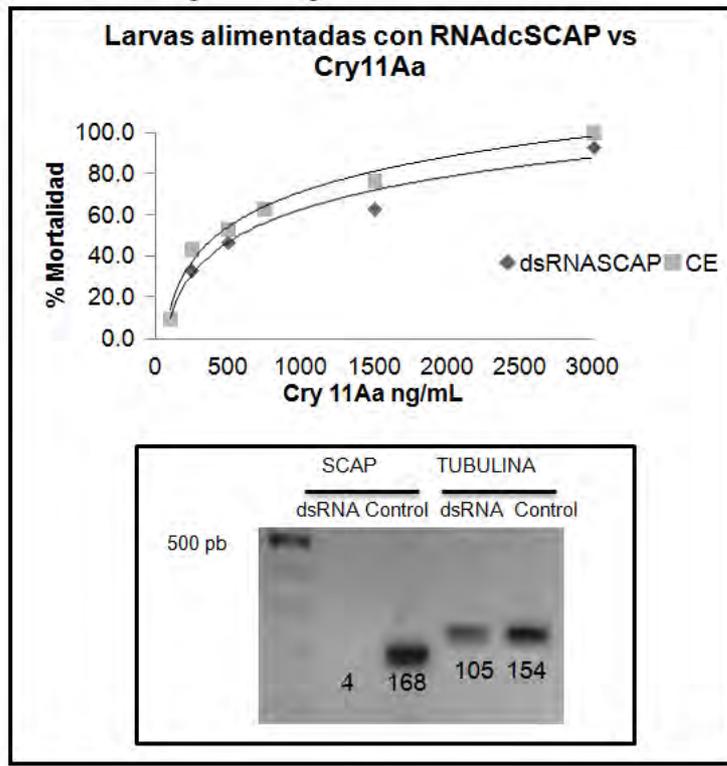


Figura 24 Bioensayo y RT-PCR de larvas alimentadas con RNAiSCAP. En la gráfica se observa la curva de porcentajes de mortalidad de larvas silenciadas en SCAP y larvas control expuestas a Cry11Aa. El gel muestra bandas de transcritos de tubulina usados como control y SCAP que comprueban la disminución de su expresión tras el silenciamiento con RNAi.

Tabla 7 Supervivencia y sensibilidad hacia la toxina Cry11Aa de larvas de *A. aegypti* silenciadas en *scap*

Proteína silenciada	% Supervivencia de silenciadas	LC ₅₀ ng/mL (Límite de confianza 90%)	Aumento de resistencia
SCAP	62.3	683 (475-1160)	0.19
Control Effectene	95	555 (408-725)	--

7. CONCLUSIONES

Sistema UPR

- El aumento de la sensibilidad en *A. aegypti* de 2.6 y 2.1 en el silenciamiento de *ire-1* y *xbp-1* respectivamente, indica que esta vía participa en la defensa a TFP como Cry11Aa.
- Al retar larvas silvestres de *A. aegypti* a la LC₅₀ de Cry11Aa por 2 y 4 horas, se pudo observar que los transcritos de *ire-1* no cambian su expresión, por el contrario, la expresión de los transcritos de *xbp-1* tras el reto con la LC₅₀ de Cry11Aa, se induce a las 4 horas de exposición a la toxina.
- El silenciamiento de MAPK p38, causa una disminución en la cinética de expresión de los transcritos de *ire-1* y *xbp-1* en *A. aegypti*, cuando las larvas son expuestas a la LC₅₀ de Cry11Aa.
- En *C. elegans* el silenciamiento de p38 induce una hipersensibilidad de 100 veces, mientras el silenciamiento de UPR sólo de 10 veces. En *A. aegypti* se ha reportado que el silenciamiento de p38 induce una hipersensibilidad de 10 veces y en este trabajo el silenciamiento de UPR resulta en 2 veces más sensible, por lo que podemos concluir que la participación de UPR en ambos organismos es sólo una parte de la respuesta que genera p38 en la defensa a TFP.

Sistema SREBP

- Contrario a lo reportado en células de mamífero, al parecer el sistema SREBP no está directamente involucrado en mecanismos de defensa en *A. aegypti* frente a TFP, ya que el silenciamiento de SCAP y S2P no causó un fenotipo de hipersensibilidad a Cry11Aa.
- El silenciamiento de la caspasa 1 en *A. aegypti*, incremento 2 veces la sensibilidad a Cry11Aa, por lo que concluimos que están involucrada en respuesta de defensa a esta toxina, sin embargo, con los datos de este trabajo no podemos relacionarla directamente con la activación de SREBP. Cabe la posibilidad de que esta caspasa esté involucrada en otras respuestas como la de piroptosis que se sabe está activada por caspasas 1.

8. PERSPECTIVAS

- Analizar la activación de la función de IRE-1 durante la intoxicación de *A. aegypti* con Cry11Aa y su dependencia ante la presencia de p38 mediante el análisis del procesamiento de *xbp-1*.
- Analizar la expresión de genes cuya expresión depende de XBP-1, como son *hsp4* (*Heat Shock Protein*) y Y41C4A.11 del complejo COP I.

9. REFERENCIAS

1. Gubler, D.J., *Dengue Fever Viruses* ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2001.
2. Jansen, C.C. and N.W. Beebe, *The dengue vector Aedes aegypti: what comes next*. Microbes and Infection, 2010. **12**(4): p. 272-279.
3. Hoffman, M.P., F.G. Zalom, and T.P. Kuhar, *Integrated Pest Management* ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2006.
4. Cui, F., M. Raymond, and C.-L. Qiao, *Insecticide resistance in vector mosquitoes in China*. Pest Management Science, 2006. **62**(11): p. 1013-1022.
5. Harper, D.R., *Biological Control by Microorganisms*, in eLS. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
6. Bravo, A., S.S. Gill, and M. Soberón, *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. Toxicon Insecticidal Toxins and their Potential for Insect Pest Control, 2007. **49**(4): p. 423-435.
7. Madigan, M. and J. Martinko, *Biología de los microorganismos*, ed. P. Educación. 2004.
8. Miranda, R., et al., *Mecanismos de acción de las toxinas Cry*. TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2002. **5**(1): p. 5-13.
9. Bischofberger, M., M.R. Gonzalez, and F.G. van der Goot, *Membrane injury by pore-forming proteins*. Current Opinion in Cell Biology, 2009. **21**(4): p. 589-595.
10. Cancino-Rodezno, A., et al., *Defense and death responses to pore forming toxins*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 2009. **26**: p. 65-82.
11. Parker, M.W. and S.C. Feil, *Pore-forming protein toxins: from structure to function*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2005. **88**(1): p. 91-142.
12. Gonzalez, M., et al., *Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story?* Cellular and Molecular Life Sciences, 2008. **65**(3): p. 493-507.
13. Menestrina, G. and M. Dalla Serra, *Pore-forming Toxins*. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2001.
14. Zhang, X., et al., *A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(26): p. 9897-9902.
15. Pacheco, S., et al., *Domain II Loop 3 of Bacillus thuringiensis Cry1Ab Toxin Is Involved in a "Ping Pong" Binding Mechanism with Manduca sexta Aminopeptidase-N and Cadherin Receptors*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(47): p. 32750-32757.
16. Gómez, I., et al., *Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix [alpha]-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin*. FEBS Letters, 2002. **513**(2-3): p. 242-246.
17. Gomez, I., et al., *Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix $\hat{I}\pm$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin*. FEBS Letters, 2002. **513**(2-3): p. 242-246.
18. Bravo, A., et al., *Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2004. **1667**(1): p. 38-46.
19. Jurat-Fuentes, J.L. and M.J. Adang, *Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae*. European Journal of Biochemistry, 2004. **271**(15): p. 3127-3135.
20. Soberón, M., et al., *Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance*. Science, 2007. **318**(5856): p. 1640-1642.

21. Jiménez-Juárez, N., et al., *Bacillus thuringiensis Cry1Ab Mutants Affecting Oligomer Formation Are Non-toxic to Manduca sexta Larvae*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(29): p. 21222-21229.
22. Cancino-Rodezno, A., et al., *The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from Bacillus thuringiensis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2010. **40**(1): p. 58-63.
23. Aroian, R. and F.G. van der Goot, *Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs)*. Current Opinion in Microbiology, 2007. **10**(1): p. 57-61.
24. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells*. Infect. Immun., 2005. **73**(4): p. 1907-1916.
25. Gonzalez, M.R., et al., *Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival*. Cellular Microbiology, 2011. **13**(7): p. 1026-1043.
26. Gutierrez, M.G., et al., *Protective role of autophagy against Vibrio cholerae cytotoxin, a pore-forming toxin from V. cholerae*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(6): p. 1829-1834.
27. Husmann, M., et al., *Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis*. FEBS Letters, 2009. **583**(2): p. 337-344.
28. Gurcel, L., et al., *Caspase-1 Activation of Lipid Metabolic Pathways in Response to Bacterial Pore-Forming Toxins Promotes Cell Survival*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1135-1145.
29. Bischof, L.J., et al., *Activation of the Unfolded Protein Response Is Required for Defenses against Bacterial Pore-Forming Toxin In Vivo* PLoS Pathogens, 2008. **4**(10).
30. Porta, H., et al., *Role of MAPK p38 in the cellular responses to pore-forming toxins*. Peptides. **In Press, Corrected Proof**.
31. Huffman, D.L., et al., *Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(30): p. 10995-11000.
32. Metherall, J.E., E.A. Nash, and D.C. Warnick, *Cholesterol Metabolism Regulation*. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2005.
33. Seegmiller, A.C., et al., *The SREBP Pathway in Drosophila: Regulation by Palmitate, Not Sterols*. Developmental Cell, 2002. **2**(2): p. 229-238.
34. Rawson, R.B., *The SREBP pathway [mdash] insights from insigs and insects*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 631-640.
35. Amarneh, B., K.A. Matthews, and R.B. Rawson, *Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein by the Caspase Drice in Drosophila Larvae*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(15): p. 9674-9682.
36. Matthews, K.A., C. Ozdemir, and R.B. Rawson, *Activation of Sterol Regulatory Element Binding Proteins in the Absence of Scap in Drosophila melanogaster*. Genetics, 2010. **185**(1): p. 189-198.
37. Plongthongkum, N., et al., *Ire1 regulated XBP1 mRNA splicing is essential for the unfolded protein response (UPR) in Drosophila melanogaster*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **354**(3): p. 789-794.
38. Hampton, R.Y., *ER stress response: Getting the UPR hand on misfolded proteins*. Current Biology, 2000. **10**(14): p. R518-R521.
39. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-529.
40. Sriburi, R., et al., *XBP1: a link between unfolded protein response, lipid biosynthesis and biogenesis of the endoplasmic reticulum*. The Journal of Cell Biology, 2004. **167**(1): p. 35-41.

41. van der Sanden, M.H.M., et al., *Inhibition of phosphatidylcholine synthesis is not the primary pathway in hexadecylphosphocholine-induced apoptosis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2004. **1636**(2-3): p. 99-107.
42. Higuchi, Y., S. Kawakami, and M. Hashida, *Strategies for In Vivo Delivery of siRNAs: Recent Progress*. *BioDrugs*, 2010. **24**(3): p. 195-205 10.2165/11534450-000000000-00000.
43. Ortiz, B., *RNA interference: from origins to a novel tool for gene silencing*. *Revista de Investigación clínica; organo del hospital de enfermedades de la nutrición*, 2009. **61**(5): p. 412-427.
44. Echeverri, C.J. and N. Perrimon, *High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(5): p. 373-384.
45. Terenius, O., et al., *RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design*. *Journal of Insect Physiology*. **In Press, Uncorrected Proof**.
46. Price, D.R.G. and J.A. Gatehouse, *RNAi-mediated crop protection against insects*. *Trends in Biotechnology*, 2008. **26**(7): p. 393-400.
47. Bartel, D.P., *MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-297.
48. Lipardi, C. and B.M. Paterson, *Identification of an RNA-dependent RNA polymerase in Drosophila involved in RNAi and transposon suppression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(37): p. 15645-15650.
49. Meza, R., et al., *Isolation of Cry1Ab protein mutants of Bacillus thuringiensis by a highly efficient PCR site-directed mutagenesis system*. *FEMS Microbiology Letters*, 1996. **145**(3): p. 333-339.
50. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta]CT$ Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
51. Lin, J.H., et al., *IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response*. *Science*, 2007. **318**(5852): p. 944-949.