



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación de los receptores de la toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* en el intestino de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biol. Daniel Eduardo Rodríguez Chamorro

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Isabel Gómez Gómez (IBT, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE
ADSCRIPCIÓN

Dr. Arturo Guevara (IBT, UNAM)

Dr. Luis Cardenas (IBT, UNAM)

MÉXICO, D. F. Abril, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada bajo la asesoría de la Dra. Isabel Gómez Gómez, en el laboratorio del Dr. Mario Soberón Chávez, del departamento de Microbiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México con apoyo de la beca 46662 de CONACYT y el proyecto de PAPIIT No. IN209011

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Isabel Gómez por toda su ayuda, su apoyo, sus enseñanzas. Gracias por presionarme a siempre dar lo mejor de mi, por respetar y amar mi trabajo y supongo que lo mas importante, gracias por enseñarme a forjar un carácter, gracias jefa.

Al Dr. Soberón por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus amables consejos y enseñanzas, por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer mi por su amistad, su disposición a ayudarme en todo momento y sobretodo por todas las alegrías que me hicieron participe.

A mis amigos, siempre es lindo estar con ustedes, gracias por los desayunos, comidas, cenas, noches de pelis y de baile, por las risas y alegrías, por todos los momentos que hemos compartido en donde me siento en familia. Gracias amigos!!

A los Doctores: Enrique Rudiño, Pavel Isa, Edmundo Castillo, Baltazar Becerril y José Luis Reyes por tomarse el tiempo de leer esta tesis, agradezco sus valiosos comentarios y observaciones que sin duda mejoraron la calidad de este trabajo.

A mi familia por siempre estar conmigo, por su cariño y ejemplo, por hacer de mi la persona que soy.

A Nataly por apoyarme en todo momento, por su confianza, por permitirme crecer contigo, Te amo!!

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 5 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 6 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 6 |
| 1. RESUMEN..... | 8 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)..... | 9 |
| 2.2 Proteínas Cry: Clasificación y estructura..... | 11 |
| 2.3 Evolución de las toxinas Cry..... | 14 |
| 2.4 Mecanismo de acción de las toxinas Cry..... | 15 |
| 2.4.1 Solubilización y activación..... | 15 |
| 2.4.2 Reconocimiento de receptores y oligomerización..... | 15 |
| 2.4.3 Inserción en las membranas..... | 16 |
| 2.5 Los receptores de las toxinas Cry..... | 16 |
| 2.5.1 Aminopeptidasa (APN)..... | 17 |
| 2.5.2 Fosfatasa Alcalina (ALP)..... | 18 |
| 2.5.3 Caderina..... | 19 |
| 3. ANTECEDENTES..... | 20 |
| 3.1 Resistencia a las toxinas Cry..... | 20 |
| 3.2 Estrategias para superar la resistencia hacia las toxinas Cry..... | 22 |
| 3.2.1 Zonas de refugio..... | 22 |
| 3.2.2 Toxinas Cry modificadas..... | 22 |
| 3.2.3 Estrategia piramidal..... | 22 |
| 3.3 Cry1Ca vs Cry1A..... | 24 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 28 |
| 5. OBJETIVOS..... | 28 |
| 5.1 Objetivo general..... | 28 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 28 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 29 |
| 6.1 Purificación de cristales de la toxina Cry1Ca..... | 29 |
| 6.2 Bioensayos con larvas de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 29 |
| 6.3 Solubilización, activación y marcaje con biotina de la toxina Cry1Ca..... | 29 |
| 6.4 Extracción del intestino medio de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 29 |
| 6.5 Purificación de las vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) de intestino medio de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 30 |
| 6.6 Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry..... | 30 |
| 6.7 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford..... | 30 |
| 6.8 Determinación de actividad enzimática específica..... | 30 |
| 6.8.1 Actividad de Aminopeptidasa..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 6.8.2 Actividad de Fosfatasa Alcalina..... | 31 |
| 6.9 Experimentos de unión en solución..... | 31 |
| 6.10 Ensayos de competencia..... | 31 |
| 6.11 Solubilización de VMMA..... | 31 |
| 6.12 Experimentos de Inmunoprecipitación..... | 32 |
| 6.13 Ensayo de unión en ligando..... | 32 |
| 6.14 Gel de actividad de Fosfatasa Alcalina..... | 32 |
| 6.15 Electroforesis de dos dimensiones..... | 32 |
| 6.16 Soluciones y medios de cultivo..... | 34 |
| | |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 36 |
| 7.1 La actividad de la toxina Cry1Ca disminuye a lo largo del desarrollo larvario de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 36 |
| 7.2 Solubilización y activación de la toxina Cry1Ca de Bt..... | 37 |
| 7.3 Purificación de las vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) de intestino medio de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 37 |
| 7.4 La unión de la toxina Cry1Ca a VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> es saturable y específica..... | 38 |
| 7.5 La toxina Cry1Ca se une de manera inespecífica a VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> provenientes de instares tardíos..... | 41 |
| 7.6 La toxina Cry1Ca no compite por los mismos sitios de unión que la toxina Cry1Ab en VMMA de <i>M. sexta</i> | 42 |
| 7.7 Proteínas de unión a la toxina Cry1Ca presentes en las VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 42 |
| 7.8 Proteínas de unión a la toxina Cry1Ca presentes en las VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> resueltas en geles de dos dimensiones 2D..... | 43 |
| 7.8.1 La toxina Cry1Ca interacciona con actina en VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 45 |
| 7.8.2 La toxina Cry1Ca interacciona con APN en <i>M. sexta</i> | 46 |
| 7.8.3 Posibles receptores novedosos para la toxina Cry1Ca presentes en VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 48 |
| 7.9 Proteínas presentes en las VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> que interactúan en estado nativo con la toxina Cry1Ca..... | 49 |
| 7.10 La toxina Cry1Ca interacciona con la Fosfatasa Alcalina de <i>M. sexta</i> pero no de <i>S. frugiperda</i> | 51 |
| | |
| 8. CONCLUSIONES..... | 56 |
| | |
| 9. PERSPECTIVAS..... | 56 |
| | |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 57 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo de vida de Bt..... | 10 |
| Figura 2. Estructura tridimensional de las ocho toxinas Cry que se conocen a la fecha..... | 12 |
| Figura 3. Estructura tridimensional del dominio I..... | 13 |
| Figura 4. Estructura tridimensional del dominio II de la toxina Cry1Aa..... | 14 |
| Figura 5. Superposición tridimensional del dominio III y CBM..... | 14 |
| Figura 6. Mecanismo de acción molecular de las toxina Cry1Ab en el lepidóptero <i>M. sexta</i> | 16 |
| Figura 7. Mecanismos de resistencia a las toxinas Cry..... | 21 |
| Figura 8. Diferentes isoformas de aminopeptidasa en <i>M. sexta</i> interactúan con diversas toxinas Cry..... | 25 |
| Figura 9. Ensayo de <i>Ligand blot</i> de vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) aisladas de <i>S. frugiperda</i> que interactúan con la toxina Cry1Ca..... | 27 |
| Figura 10. Gel de acrilamida al 10% donde podemos observar a la toxina Cry1Ca y sus diferentes tratamientos..... | 38 |
| Figura 11. Ensayo de unión en solución con diferentes concentraciones de toxina marcada incubadas con VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> | 39 |
| Figura 12. Competencia homóloga de la toxina Cry1Ca con VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M.</i> <i>sexta</i> | 40 |
| Figura 13. Competencia homóloga de la toxina Cry1Ca con VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M.</i> <i>sexta</i> provenientes del 5° estadio larvario..... | 41 |
| Figura 14. Competencia heteróloga entre la toxina Cry1Ca y la toxina Cry1Ab en vesículas de <i>M. sexta</i> | 42 |
| Figura 15. Ensayo de unión a ligando de los insectos <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> con la toxina Cry1Ca..... | 42 |
| Figura 16. Ensayo de unión en ligando usando la toxina Cry1Ca sobre proteínas de VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> del 2° instar, separadas en electroforesis 2D | 45 |
| Figura 17. <i>Western blot</i> Anti – APN sobre VMMA de <i>M. sexta</i> resueltas en geles 2D..... | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Gel teñido con plata de proteínas de VMMA de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> de 2° instar, separadas en electroforesis 2D..... | 49 |
| Figura 19. Inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti-Cry1Ca..... | 50 |
| Figura 20. Gel de actividad de Fosfatasa Alcalina y <i>Ligand blot</i> de una replica del gel..... | 53 |
| Figura 21. Proteínas eluidas de la banda que presenta actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina de <i>M. sexta</i> | 54 |
| Figura 22. Gel de actividad de Fosfatasa Alcalina del inmunoprecipitado..... | 55 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Descripción de APN anclados por GPI encontrados en insectos susceptibles a las toxinas Cry..... | 18 |
| Tabla 2. Descripción de ALP anclados por GPI encontrados en insectos susceptibles a las toxinas Cry..... | 19 |
| Tabla 3. Listado de insectos resistentes reportados en la literatura..... | 21 |
| Tabla 4. Comparación de las dosis letal media de diferentes insectos para las toxinas Cry1Ca y Cry1A..... | 24 |
| Tabla 5. Comparaciones de las dosis letales medias de toxinas Cry1As y Cry1Ca probadas en distintos insectos..... | 26 |
| Tabla 6. Dosis letal media de diferentes toxinas Cry hacia el lepidóptero <i>S. frugiperda</i> | 27 |
| Tabla 7. Toxicidad de Cry1Ca hacia larvas de <i>S. frugiperda</i> y <i>M. sexta</i> en diferentes instares de desarrollo..... | 36 |
| Tabla 8. Enriquecimiento de Aminopeptidasa (APN) y Fosfatasa Alcalina (ALP) en las diferentes preparaciones de VMMA's..... | 37 |
| Tabla 9. Resultados del análisis de proteómica con la base de datos de <i>M. sexta</i> | 51 |
| Tabla 10. Resultados del análisis de proteómica con la base de datos de <i>Bombyx mori</i> | 52 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|------------------------|
| <i>A. ipsilon</i> | <i>Agrotis ipsilon</i> |
| ALP | Fosfatasa Alcalina. |
| APN | Aminopeptidasa N. |
| <i>B. cereus</i> | <i>Bacillus cereus</i> |

| | |
|--------------------------|---|
| <i>B. fusca</i> | <i>Buddleja fusca</i> |
| <i>B. mori</i> | <i>Bombyx mori</i> |
| BSA | Albúmina sérica bovina. |
| BT | <i>Bacillus thuringiensis</i> . |
| <i>D. saccharalis</i> | <i>Diatraea saccharalis</i> |
| DTT | Ditiotritol. |
| EDTA | Ácido etilen diamino tetra-acético. |
| EGTA | N, N, N', N' ácido tetra acético etilen flyco-bis-(β aminoetil éter). |
| <i>E. kuehniella</i> | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| <i>E. postvittana</i> | <i>Epiphyas postvittana</i> |
| GalNAc | N-acetil-galactosamina. |
| GPI | Glicosil-fosfatidil-inositol. |
| <i>H. armigera</i> | <i>Helicoverpa armigera</i> . |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxi etil) piperanzina-1-etanol sulfónico. |
| HCT | Medio mínimo para esporulación. |
| <i>H. virescens</i> | <i>Heliothis virescens</i> |
| kDa | Kilodaltones |
| LB | Medio Luria-Bertoni. |
| <i>L. dispar</i> | <i>Lymantria dispar</i> |
| <i>M. brassicae</i> | <i>Mamestra brassicae</i> |
| <i>M. sexta</i> | <i>Manduca sexta</i> . |
| <i>O. nubilalis</i> | <i>Ostrinia nubilalis</i> |
| <i>P. brassicae</i> | <i>Pieris brassicae</i> |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos. |
| PDB | Banco de datos de proteínas. |
| <i>P. gossypiella</i> | <i>Pectinophora gossypiella</i> |
| <i>P. interpunctella</i> | <i>Plodia interpunctella</i> |
| PMSF | Fenil metanosulfonil fluoruro. |
| PVDF | Polivinilideno difluoruro. |
| <i>P. xylostella</i> | <i>Plutella xylostella</i> |
| RNAi | Silenciamiento con RNA interferente. |
| SDS PAGE | Electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes |
| <i>S. exigua</i> | <i>Spodoptera exigua</i> |
| <i>S. frugiperda</i> | <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| <i>S. litura</i> | <i>Spodoptera litura</i> |
| SPR | Resonancia de superficie de plasmón |
| <i>T. ni</i> | <i>Trichoplusia ni</i> |
| VMMA's | Vesículas de la microvellosidad apical media. |

1. RESUMEN

B. thuringiensis es una bacteria gram positiva que en su fase de esporulación produce un cuerpo paraesporal conocido como cristal el cual posee propiedades insecticidas. El cristal está compuesto de toxinas formadoras de poro denominadas proteínas Cry. Las toxinas Cry se componen de 3 dominios, el dominio 1 posee la actividad de formación de poro y los dominios 2 y 3 son los responsables de la interacción con los receptores.

A la fecha, las toxinas Cry1A son las más utilizadas en cultivos transgénicos sin embargo, en los últimos años han aparecido insectos resistentes a los cultivos que expresan las toxinas Cry, esto pone en peligro a esta tecnología si acciones concretas no son llevadas a cabo. De las propuestas que se tienen para combatir la resistencia de insectos se encuentra la estrategia piramidal, esta herramienta consiste en la aplicación de dos toxinas Cry con un espectro de actividad sobrelapado pero con un reconocimiento a receptores distinto.

En ese sentido la toxina Cry1Ca posee un espectro de actividad similar al de las toxinas Cry1A, sin embargo no posee los mismos sitios de unión. Por otro lado, esta toxina es activa contra plagas muy importantes como *S. frugiperda* la cual no es controlada por las toxinas Cry1A. A pesar de estas ventajas la toxina Cry1Ca no es usada extensivamente. Esto se debe a que se posee un pobre conocimiento de los receptores de esta toxina, por esa razón en este trabajo nos propusimos identificar los receptores de la toxina Cry1Ca en *S. frugiperda* y *M. sexta*.

La manera en que se abordó el problema fue utilizando una serie de experimentos donde se analizó la unión de la toxina Cry1Ca de *B. thuringiensis* a vesículas de la microvellosidad apical del intestino (VMMA) de *S. frugiperda* y *M. sexta*. A través de la correlación de estos distintos experimentos se identificaron proteínas de VMMA que interactuaban con la toxina de manera desnaturalizante y nativa. Por su peso molecular hipotetizamos que las proteínas que interactuaban con la toxina eran aminopeptidasas (APN). Posteriormente mediante *western blot* y secuenciación por espectrometría de masas demostramos que en efecto la toxina Cry1Ca es capaz de interactuar con APN en ambos insectos.

En el presente estudio encontramos que las moléculas de unión de la toxina Cry1Ca en el intestino de *S. frugiperda* y *M. sexta*, son aminopeptidasas, en el caso de *S. frugiperda* esta molécula de unión es la primera reportada a la fecha.

2. INTRODUCCIÓN

El control de insectos plaga, que afectan a la agricultura o actúan como vectores en enfermedades humanas, es uno de los principales intereses a nivel mundial tanto en la producción de alimentos como en la salud humana. Se estima que existen 67,000 diferentes especies plaga de cultivos, incluidos invertebrados, patógenos de plantas, mala hierba y algunas especies de vertebrados; en conjunto causan la pérdida del 40% de la producción anual de alimentos a nivel mundial (Chandler *et al*, 2011).

Los insecticidas químicos, dominan el mercado mundial de control de plagas, debido a sus bajos costos de producción, fácil aplicación y gran espectro de insectos blancos. Como consecuencia, desde 1960 a la fecha, el manejo de las plagas se ha tratado principalmente con este tipo de productos. Sin embargo, el uso de este tipo de insecticidas ha generado gran contaminación ambiental y el incremento en daños a la salud humana, como son el cáncer y varios desordenes del sistema inmune (Bravo *et al*, 2011).

Por otro lado, el incremento acelerado de la población humana conlleva a un incremento en la producción de alimentos, sin la afectación al medio ambiente. Los bioinsecticidas representan una alternativa potencial para el futuro en la generación de alimentos sobre los insecticidas químicos. Lamentablemente, en la actualidad los bioinsecticidas representan menos del 5% de mercado mundial, a pesar de que en las áreas donde se aplican ofrecen una alternativa ambientalmente segura (Ibrahim *et al*, 2010).

B. thuringiensis (Bt) es una bacteria única, porque comparte un lugar común con numerosos compuestos químicos que son usados comercialmente para el control de insectos importantes en la agricultura y salud pública. Bt es seguro para humanos, es biodegradable, lo que lo convierte en el bioinsecticida más usado a nivel mundial (Ibrahim *et al*, 2010).

2.1 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

La era de Bt inicia en Japón cuando en 1901 azotaba la “enfermedad de soto”, la cual era responsable de grandes pérdidas de gusanos de seda (*B. mori*). El científico Shigetane Ishiwata descubrió la causa de esta enfermedad aislando el agente etiológico, el cual era una bacteria que nombró “*Bacillus sotto*”. Algunos años después, en 1911 el científico alemán Ernst Berliner aisló la misma bacteria de una polilla de harina (*E. kuehniella*) en la provincia alemana de Thuringia y fue llamada *Bacillus thuringiensis*.

El primer insecticida comercial basado en Bt, recibió el nombre de “Sporeina”. Fue producido en Francia en 1938 y se usaba principalmente para controlar la polilla de harina. En Estados Unidos, los bioinsecticidas basados en Bt se registraron ante la agencia de protección ambiental (EPA) en 1961.

Desde 1996 los cultivos transgénicos resistentes a insectos, conocidos como cultivos Bt, se han expandido alrededor del globo demostrando ser muy eficientes y benéficos en reducir el uso de insecticidas químicos. Las últimas estimaciones indican que más del 50% del algodón y 40% del maíz cultivado en Estados Unidos está genéticamente modificado para producir las toxinas insecticidas de Bt (Ibrahim *et al*, 2010).

Bt es una bacteria gram positiva, aerobia estricta, no encapsulada, con flagelo peritrico. Su clasificación esta basada en el serotipo H (antígeno flagelar). Hasta el momento se han caracterizado 69 serotipos y 82 variedades serológicas (serovar) (Ibrahim *et al*, 2010).

Durante el ciclo de vida de Bt se presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición y la fase de esporulación. El programa de esporulación consta de siete estadios, se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes y culmina con la formación de una espora, la cual es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico, que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo.

Bt es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como el suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A la fecha se han encontrado cepas con actividad tóxica hacia distintos órdenes de insectos como son: lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), homópteros (cigarras), ortópteros (langostas) y malófagos (piojos), también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios (Schnepf *et al*, 1998).

Bt pertenece al grupo de *B. cereus* y se define por la habilidad de producir cristales de naturaleza proteica durante su fase de esporulación, sin la producción de cristales Bt se vuelve indistinguible de *B. cereus*.

Los cristales de Bt están compuestos por proteínas denominadas Cry/Cyt, estas proteínas son las que confieren la actividad insecticida a *B. thuringiensis* (Figura 1). Más del 20% del contenido de proteína de la espora esta representado por las proteínas Cry/Cyt. Esta gran producción de proteínas Cry/Cyt parece estar controlada por una variedad de mecanismos que ocurren a nivel transcripcional, postranscripcional y postraducciona (Ibrahim *et al*, 2010).

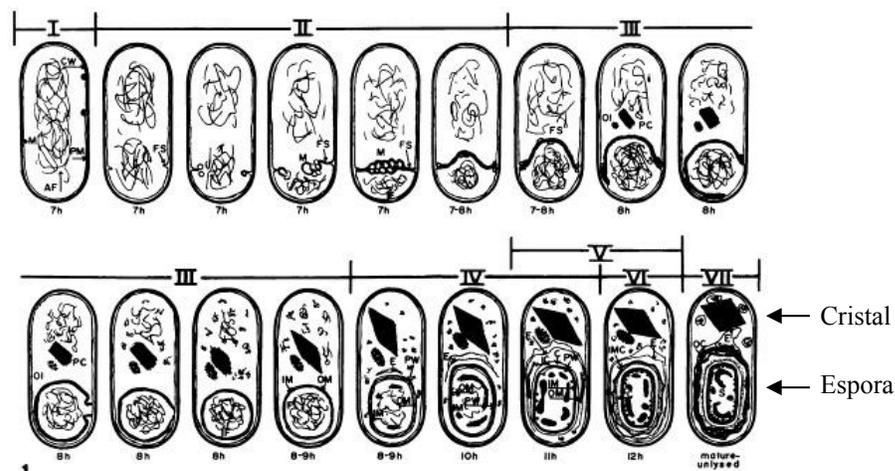


Figura 1. Ciclo de vida de Bt donde se aprecia el proceso de esporulación y formación de cristales (Bulla *et al*, 1980).

2.2 Proteínas Cry: Clasificación y estructura

Las proteínas Cry muestran una alta selectividad contra sus insectos blancos y son inocuas para humanos, vertebrados y plantas. Pertenecen a una clase de toxinas bacterianas conocidas como toxinas formadoras de poro (PFT), las cuales son secretadas como proteínas solubles en agua, con la capacidad de presentar cambios conformacionales que le van a permitir insertarse en la membrana plasmática del hospedero, donde formarán poros.

Se conoce una extraordinaria diversidad de toxinas Cry/Cyt, producto del interés y esfuerzo constante de la comunidad científica para aislar y caracterizar nuevas toxinas con propiedades innovadoras que permitan su uso en el control de insectos plaga.

La gran heterogeneidad de toxinas Cry, se debe al alto nivel de plasticidad genética de *B. thuringiensis*. Algunos de los genes de las toxinas están asociados a elementos de transposición que al promover la amplificación de los genes, da como resultado la generación de nuevas toxinas (Maagd *et al*, 2001). Además, la mayoría de los genes de las toxinas Cry son funcionales en plásmidos y la transferencia horizontal puede resultar en la producción de cepas con nuevas combinatorias de genes Cry (Thomas *et al*, 2000).

Las toxinas Cry son clasificadas con base en su secuencia primaria de aminoácidos. A la fecha se han identificado más de 500 genes de toxinas Cry, las cuales se han agrupado en 67 grupos distintos (Bravo *et al*, 2011). Estas secuencias de genes se han dividido en cuatro familias de proteínas filogenéticamente no relacionados que pueden tener distintos modos de acción: La familia de tres dominios (3D), la familia mosquitocida (Mtx), la familia binaria (Bin) y la familia Cyt (Bravo *et al*, 2011). Por otro lado, se ha reportado que algunas cepas de Bt producen adicionalmente toxinas insecticidas denominadas Vip, que se sintetizan en la fase vegetativa de su ciclo de vida (Bravo *et al*, 2011).

La gran familia Cry de tres dominios (3D), es la mejor estudiada, esta conformada por al menos 40 subgrupos, con más de 200 secuencias de genes. La estructura tridimensional de ocho toxinas Cry-3D han sido determinadas: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry8Ea y Cry5B (Li *et al*, 1991; Grochulski *et al*, 1995; Morse *et al*, 2001; Galitsky *et al*, 2001; Boonserm *et al*, 2005, 2006; Guo *et al*, 2009; Hui *et al*, 2012). Estas toxinas presentan diferencias importantes en su secuencia de aminoácidos (Menos del 20% de similitud) así como en su especificidad hacia sus insectos blancos y sin embargo, muestran una topología similar (**Figura 2**).

La nomenclatura de las toxinas Cry 3D consiste en asignar cuatro rangos jerárquicos que son: números, letras mayúsculas, letras minúsculas y números (ejemplo Cry1Ca1). Los rangos se encuentran en función de la identidad de secuencia de aminoácidos que compartan con otras proteínas Cry. El primer rango esta dado por una proteína que presenta menos del 45% de identidad con los demás miembros de las toxinas Cry (ejemplo Cry1 y Cry2). El segundo rango esta dado si la proteína que presenta menos del 78% pero mas del 45% de identidad con un grupo particular de toxinas (ejemplo Cry1A y Cry1C). El tercer rango distingue proteínas que posean menos del 95% pero más del 78% de identidad con otras proteínas Cry (ejemplo Cry1Ca y Cry1Cb). Finalmente se les da un número a las proteínas que comparten más del 95% de identidad (ejemplo Cry1Ca1 y Cry1Ca2).

A lo largo de las secuencias de las diferentes toxinas Cry se han identificado cinco regiones con gran identidad en secuencia. Estas zonas llamadas “bloques conservados”, fueron identificadas en áreas estructuralmente importantes como el contacto entre dominios, sugiriendo que toxinas que posean estos bloques tendrán una estructura similar.

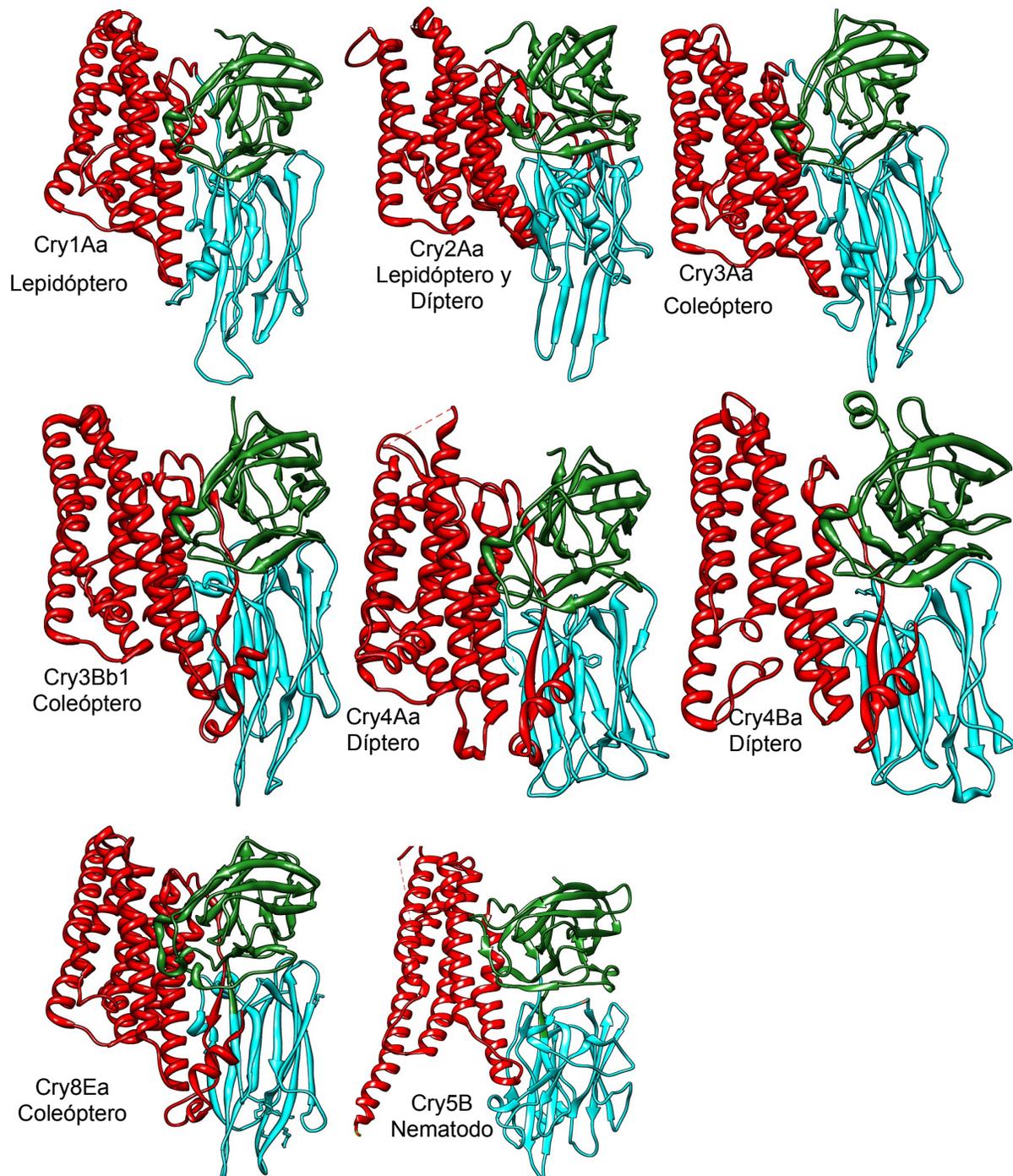


Figura 2. Estructura tridimensional de las ocho toxinas Cry que se conocen a la fecha. Se muestra la especificidad de cada toxina. Además en rojo se muestra el dominio I, en verde el dominio II y por último en cian el dominio III (PDB: 1CIY, 1I5P, 1DLC, 1JI6, 2C9K, 3EB7, 4D8M).

Las toxinas Cry de tres dominios, reciben su nombre por la topología que presentan, están compuestas de tres dominios estructural y funcionalmente distintos. El dominio I fue descrito por primera vez por Li y colaboradores y consiste en siete α -hélices, seis de estas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$) se encuentran rodeando a la hélice $\alpha 5$ central (Li *et al*, 1991) (**Figura 3**).

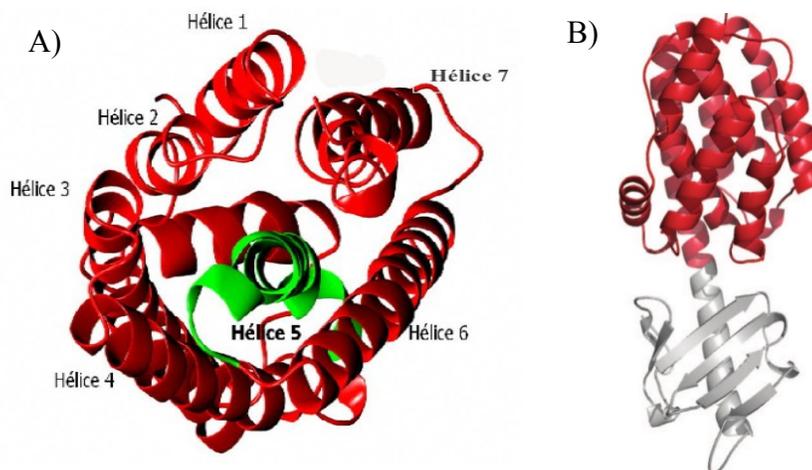


Figura 3. A) Estructura tridimensional del dominio I (PDB: 1CIY) y la B) Colicina (PDB: 1A87). El ramillete de hélices con similitud estructural con el dominio I de las toxinas Cry se muestra en rojo.

Todas las hélices son de naturaleza anfipática, los residuos polares y cargados se encuentran en la superficie de la hélice expuestos al solvente, mientras que los residuos hidrofóbicos, generalmente aromáticos se posicionan hacia el interior de la hélice. La mayoría de las hélices miden aproximadamente 30 Å de longitud y pueden ser capaces de atravesar una membrana hidrofóbica (Piggot y Ellar, 2007). Estas propiedades junto con la gran similitud topológica que presenta con el dominio formador de poro de la colicina (**Figura 3.**) y la toxina de difteria; condujo a la hipótesis de que el dominio I era el responsable de la formación de poro en las toxinas Cry y no los otros dominios (Li *et al*, 1991), y que posteriormente fue comprobada, mediante el empleo de péptidos sintéticos de la hélice $\alpha 5$ de la toxina Cry3Aa, que demuestran que esta región es capaz de formar poros en capas lipídicas en ausencia de receptor (Gazit *et al*, 1994).

El dominio II está formado por tres láminas β antiparalelas que en conjunto forman un prisma β . Dos de estas tres láminas están compuestas de cuatro cadenas conformando un motivo tipo “llave griega” el cual está expuesto al solvente. La tercera lámina β se empaqueta hacia el dominio I formando un motivo parecido de “llave griega” con tres hojas y una pequeña α hélice. Estructuralmente, el dominio II es el más variable de los dominios de las toxinas, especialmente en el ápice de las asas las cuales difieren considerablemente en tamaño, conformación y secuencia (**Figura 4**) (Piggot y Ellar, 2007). Debido a esta variabilidad se cree que el dominio II es un factor importante que interviene en la especificidad de las toxinas (Li *et al*, 1991); asimismo la similitud que poseen estas asas del dominio con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las inmunoglobulinas sugiere que el dominio II juega un papel preponderante en la interacción con los receptores (Piggot y Ellar, 2007).

El dominio III está formado por dos láminas β antiparalelas en un arreglo de “emparedado” ambas están compuestas por cinco hojas. La lámina exterior se encuentra frente al solvente

mientras que la lámina interna se orienta hacia el dominio I (Li *et al*, 1991). El dominio III muestra menor variabilidad en secuencia que el dominio II, las principales diferencias que se presentan en el dominio III son el tamaño, la orientación y la secuencia de las asas (Piggot y Ellar, 2007).

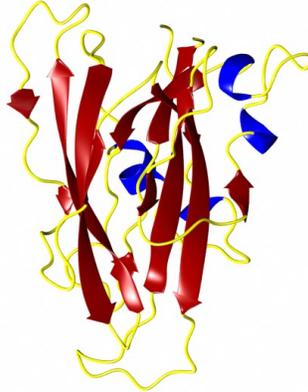


Figura 4. Estructura tridimensional del dominio II de la toxina Cry1Aa. Se esquematizan las regiones hipervariables (amarillo) importantes en la interacción con receptores (PDB: 1CIY, 1I5P).

El dominio III presenta gran similitud con los módulos de unión a carbohidratos (CBMs) (**Figura 5**) los cuales están presentes en muchas proteínas bacterianas como hidrolasas, glucosidasas, liasas y esterasas (Piggot y Ellar, 2007). Al igual que el dominio II, el dominio III esta involucrado con la interacción a receptores.

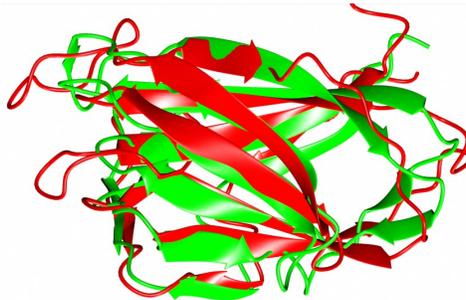


Figura 5. Superposición tridimensional del dominio III (Rojo) y CBM (Verde). Se puede apreciar la gran similitud que poseen las estructuras (PDB: 1CIY, 1UYY).

2.3 Evolución de las toxinas Cry

Se ha propuesto que los tres dominios que componen las toxinas Cry han evolucionado independientemente (Maagd *et al*, 2001). Las secuencias del dominio I muestran bastante homología indicando un origen común; mientras que el dominio II y III son más variables. De hecho para el dominio III se han demostrado diversos eventos de recombinación entre diferentes toxinas Cry desencadenando el cambio de especificidad en las nuevas toxinas (Bravo, 1997).

Esto es consistente con el hecho de que el dominio I este involucrado en la formación de poro, mientras que los otros dos dominios sean responsables de la interacción con receptores. Por esta razón se han generado toxinas Cry con modos de acción similares pero con especificidades diferentes.

Por otro lado se ha planteado que las toxinas Cry han coevolucionado con los insectos blancos (Maagd *et al*, 2001). Sin embargo, esta hipótesis solo es respaldada por algunos reportes donde se muestra una correlación entre la distribución geográfica de las proteínas Cry que contienen las diversas cepas de *B. thuringiensis*, con la distribución de las diferentes especies de insecto blanco en la naturaleza (Bravo *et al*, 1998; Bernhard *et al*, 1997).

2.4 Mecanismo de acción de las toxinas Cry

El mecanismo de acción de las toxinas Cry es bastante complejo. Se ha propuesto dos mecanismos de acción de las toxinas Cry, uno al que se podría llamar “indirecto”, consiste en la unión de la toxina a receptores, lo cual va a provocar una cascada de señalización que eventualmente llevará a la muerte celular (Zhang *et al*, 2006). Por otro lado nuestro grupo de laboratorio ha propuesto otro modelo, que se podría llamar “directo” en donde la propia toxina es capaz de formar poros en la membrana celular y de esta forma llevar a la lisis celular. Como ambos modelos la unión a receptores es fundamental para la actividad de las toxinas Cry, en este trabajo se limitará a describir el modelo propuesto por nuestro laboratorio.

Para realizar su acción, primero tienen que suceder una serie de pasos secuenciales como son: solubilización, activación, unión a receptores, oligomerización, inserción y citólisis. Esta serie de pasos ha sido particularmente estudiado para la toxina Cry1Ab en el lepidóptero *M. sexta*.

2.4.1 Solubilización y activación

Los cristales de toxinas Cry son cuerpos de inclusión resistentes a proteasas (Agaisse y Lereclus, 1995). Están constituidos por protoxinas, enlazadas entre sí gracias a puentes disulfuro que se generan por la gran cantidad de cisteínas que abundan en el extremo C-terminal de la protoxina. El ambiente del lumen intestinal de insectos lepidópteros y dípteros, presenta condiciones alcalinas y reductoras (Dow, 1986) por lo que los cristales se disuelven con facilidad.

Una vez solubilizada la protoxina en el lumen intestinal, está debe ser activada para liberar el fragmento tóxico. Esta activación consiste en cortes proteolíticos, en los extremos amino y carboxilo – terminal, realizado por las proteasas intestinales del insecto, que a la fecha no se conocen. En ese sentido, se han reportado dos grupos de protoxinas: largas como las Cry1 (130kDa) y cortas como las Cry2 (70kDa) (Bravo *et al*, 2011). Durante su activación las toxinas Cry1 pierden la mitad del C-terminal (aprox. 500 residuos). Por otro lado, también se genera la eliminación de 20 a 50 residuos de N-terminal, este procesamiento es común para la mayoría de las toxinas Cry.

2.4.2 Reconocimiento de receptores y oligomerización

Las toxinas Cry son activas contra una gran variedad de insectos y poseen la ventaja de ser altamente selectivas hacia su insecto blanco. Esta selectividad está mediada principalmente por la interacción que presenta con los receptores intestinales del insecto. Una vez que la

toxina es activada, pasa a través de complejos eventos de unión secuencial con diferentes proteínas intestinales que conducirán a su inserción en la membrana y la formación de poro. La primera interacción de la toxina activada Cry1Ab ocurre a través de las regiones expuestas de aminoácidos del dominio II (Asa 3) y el dominio III (hoja β 16) de la toxina con la aminopeptidasa (APN) y fosfatasa alcalina (ALP) del lepidóptero *M. sexta* (Gómez *et al*, 2006; Pacheco *et al*; 2009). Estas uniones son de baja afinidad (kD 101.6 nM APN y 267.3 nM ALP) sin embargo, concentran la toxina activada en la microvellosidad donde, posteriormente se une con alta afinidad (kD 1nM) a través del dominio II al receptor caderina (Gómez *et al*, 2006). La interacción con el receptor caderina facilita la proteólisis de la hélice α -1 del dominio I en extremo N-terminal induciendo la formación de una estructura oligomérica conocida como pre-poro (Gómez *et al*, 2002). Esta nueva estructura oligomérica de la toxina muestra un importante incremento en la afinidad (200 veces más) hacia los receptores anclados por GPI (kD 0.6 nM APN y 0.52 nM ALP) (Arenas *et al*, 2010). Por último, la interacción del oligómero con APN y ALP promueve la inserción en la membrana provocando la formación del poro y la eventual lisis celular (Pardo *et al*, 2006).

2.4.3 Inserción en membranas

La inserción del oligómero se lleva a cabo en microdominios de membrana ricos en colesterol (balsas lipídicas) en donde forman poros (Zhuang, 2001). Se han propuesto varias hipótesis sobre el mecanismo de inserción de las toxinas Cry en membranas, a la fecha, el modelo más aceptado es el tipo “sombriilla”, el cual propone que las hélices 5 y 6 del dominio 1 (**Figura 3**) se insertan en la membrana y forman el poro, mientras que el resto del dominio I junto con los dominios II y III permanecen en la superficie (Li *et al*, 1991). Una vez que el oligómero se ha insertado y formado el poro, aumenta la permeabilidad de la membrana, permitiendo el paso de agua, iones y moléculas pequeñas. En consecuencia la membrana celular se despolariza, afectando todo el sistema electromotriz de la membrana, lo que ocasionará la alcalinización de la célula, un aumento en su volumen y su eventual lisis, provocando una parálisis y destrucción del intestino, inhibición del apetito, desencadenando la eventual muerte del insecto (Knowles y Ellar, 1987). Una vez que la larva muere, los nutrientes están al alcance de la espora de Bt permitiendo su germinación y proliferación (Soberón y Bravo, 2008).

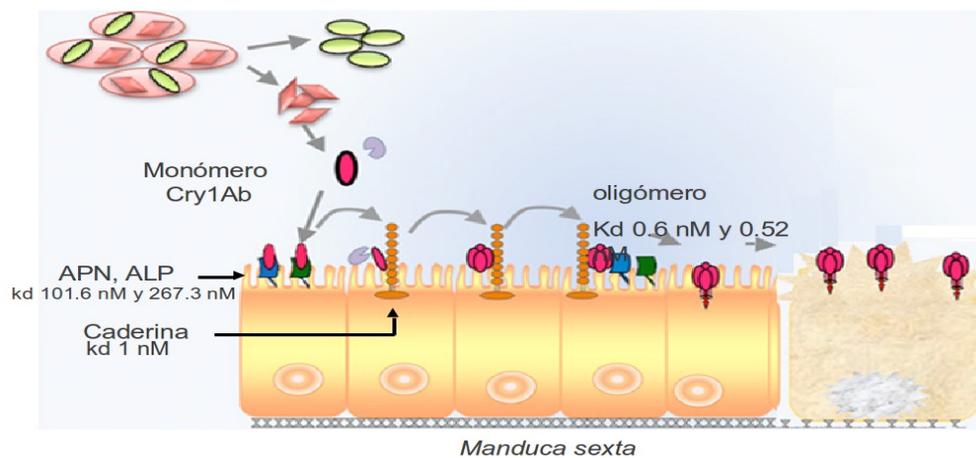


Figura 6. Mecanismo de acción molecular propuestos de las toxina Cry1Ab en el lepidóptero *Manduca sexta*

2.5 Los receptores de las Toxinas Cry

La gran especificidad que poseen las toxinas Cry esta mediada por la interacción de las toxinas con proteínas localizadas en las células del epitelio intestinal medio. En los lepidópteros, el intestino medio es la zona principal de digestión y absorción de los alimentos y por lo tanto es una de las partes de mayor importancia para la fisiología del insecto.

El intestino de lepidópteros es un tubo simple compuesto de una monocapa de células apoyadas sobre una membrana basal. Existen dos tipos de células: las columnares, con una microvellosidad apical y las células de goblet. Una membrana peritrófica, compuesta principalmente por quitina y glicoproteínas limitan al intestino, separando al contenido intestinal del epitelio (Knowles, 1994).

A la fecha se han reportado distintas moléculas que actúan como receptores putativos en el mecanismo de acción de las toxinas Cry como son: aminopeptidasa (APN), fosfatasa alcalina (ALP), caderina, glicolípidos, glicoconjugados de 270 kDa y una proteína de 252 kDa (Piggot y Ellar, 2007). Sin embargo, en lepidópteros solo se ha demostrado la funcionalidad de receptor para APN, ALP y caderina (Arenas *et al*, 2010).

2.5.1 Aminopeptidasa (APN)

La familia APN pertenece a la superfamilia de metaloproteasas/peptidasa con unión a zinc y a la subfamilia llamada gluczicinas. Los miembros de esta familia son caracterizados por un motivo pequeño de unión a zinc del tipo “HEXXH”. Se clasifican en cinco clases en función de sus relaciones filogenéticas. Poseen un peso molecular de entre 90 kDa y 170 kDa, sufren varias modificaciones postraduccionales y están ancladas a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Las APN son una clase de enzimas que catalizan la ruptura de aminoácidos neutrales del extremo N-terminal de proteínas. En intestinos de larvas de insectos lepidópteros, trabajan en cooperación con carboxipeptidasas, endopeptidasas y en conjunto digieren proteínas derivadas de la dieta del insecto (Piggot y Ellar, 2007). Además de conocer su papel en la digestión, se han estudiado ampliamente como receptor putativo de las toxinas Cry.

Se ha demostrado que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca y Cry1Fa interaccionan con APN de lepidópteros (Piggot y Ellar, 2007). De las APN reportadas a la fecha se ha demostrado interacción con alguna toxina Cry en los lepidópteros: *M. sexta*, *L. dispar*, *H. virescens*, *H. armigera*, *B. mori*, *S. litura*, *E. postvittana* y *P. xylostella* (**Tabla 1**) (Zuñiga *et al*, 2012).

Se ha visto que las APN están involucradas en la inserción de la toxina, puesto que su rompimiento mediante fosfolipasa C disminuye drásticamente la inserción de la toxina Cry1Ab en balsas lipídicas y reduce la actividad de poro de la toxina en VMMA (Bravo *et al*, 2004; Lorence *et al*, 1997). Por otro lado, la incorporación de esta enzima en bicapas lipídicas mejora la actividad de formación de poro de la toxina. Se ha visto que la N-acetil-galactosamina (GalNAc) es un epítipo importante de las APN para la interacción con las toxinas Cry1Ac (Piggot y Ellar, 2007).

2.5.2 Fosfatasa Alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina (ALP) es encontrada en todos los animales. Su función es remover los grupos fosfatos de distintas moléculas como proteínas, nucleótidos, alcaloides etc, que son ingeridos en la dieta del insecto.

Tabla 1. Descripción de Aminopeptidasa anclados por GPI encontrados en insectos susceptibles a las toxinas Cry (Tomado de Zuñiga *et al*, 2012)

| APN ancladas por GPI que unen a toxinas Cry | | | |
|---|-------------|------------------------|---|
| Especie | Proteína | Toxina de unión | Método de identificación |
| <i>Manduca sexta</i> | APN Clase 1 | Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab | Cromatografía de afinidad, <i>Ligand blot</i> , SPR |
| | APN Clase 2 | Cry1Ab5 | Cromatografía de afinidad, <i>Ligand blot</i> |
| <i>Lymantria dispar</i> | APN Clase 1 | Cry1Ac | Inmunolocalización |
| | APN Clase 3 | | Purificación mediante cromatografía |
| <i>Heliothis virescens</i> | APN Clase 1 | Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa | Cromatografía de afinidad, SPR, <i>Ligand blot</i> |
| | APN Clase 3 | Cry1Ac | Cromatografía de afinidad, <i>Ligand blot</i> |
| | APN Clase 4 | Cry1Fa | Cromatografía de afinidad, SPR |
| <i>Helicoverpa armigera</i> | APN Clase 1 | Cry1Ac, Cry1Aa, Cry1Ab | Expresión heteróloga, <i>Ligand blot</i> |
| | APN Clase 3 | Cry1Ac | Expresión heteróloga, <i>Ligand blot</i> |
| <i>Bombyx mori</i> | APN Clase 1 | Cry1Aa, Cry1Ab | Cromatografía de intercambio iónico, expresión heteróloga, <i>Ligand blot</i> |
| | APN Clase 3 | Cry1Ac | Expresión heteróloga, <i>Ligand blot</i> |
| | APN Clase 4 | Cry1Aa, Cry1Ab | Expresión heteróloga, <i>Ligand blot</i> |
| <i>Spodoptera litura</i> | APN Clase 3 | Cry1C | Identificación in silico, expresión heteróloga, <i>Ligand blot</i> |
| | APN Clase 5 | Cry1C | |
| <i>Epiphyas postvittana</i> | APN Clase 3 | Cry1Aa, Cry1Ba | Cromatografía de intercambio iónico |
| <i>Plutella xylostella</i> | APN Clase 1 | Cry1Aa, CryAb | Expresión heteróloga, <i>Ligand blot</i> |
| | APN Clase 2 | | |
| | APN Clase 3 | | |
| | APN Clase 4 | | |

Las ALP, se dividen en dos grupos: las ALP solubles (s-ALP) y ALP unidas a la membrana (m-ALP) (Zuñiga *et al*, 2012). Ambos grupos de ALP se encuentran en larvas de insectos, específicamente en células epiteliales del intestino. Tanto s-ALP como m-ALP muestran diferencias en su actividad enzimática lo que sugiere que ellas realizan diferentes funciones *in vivo*.

Las ALP ancladas por GPI que interactúan con toxinas Cry han sido identificadas en los lepidópteros: *M. sexta*, *H. virescens* y *H. armigera* y solo se ha demostrado interacción con toxinas Cry1A (**Tabla 2**).

2.5.3 Caderina

La superfamilia de proteínas caderina es altamente diversa y posee una variedad de funciones como: adhesión celular, migración, organización de citoesqueleto y morfogénesis. Las proteínas son definidas por la presencia de dominios repetidos de unión a calcio de aproximadamente 110 aminoácidos. Las caderinas clásicas presentan 5 repeticiones pero se ha reportado la existencia de caderinas con 34 dominios repetidos. Son glicosiladas y usualmente se encuentran ancladas a la membrana por un solo dominio transmembranal (Piggot y Ellar, 2007).

Tabla 2. Descripción de Fosfatasa alcalina anclados por GPI encontrados en insectos susceptibles a las toxinas Cry (Tomado de Zuñiga *et al*, 2012)

| ALP ancladas por GPI que interactúan con toxinas Cry | | |
|--|----------------|---|
| Especie | Toxina | Método de identificación |
| <i>Manduca sexta</i> | Cry1Ac | Espectrometría de masas de geles de 2D. |
| <i>Helicoverpa armigera</i> | Cry1Ac, Cry1Aa | Cromatografía de intercambio aniónico |
| <i>Heliothis virescens</i> | Cry1Ac | <i>Western Blot</i> |

Las caderinas de insectos son proteínas modulares compuestas por tres dominios, el ectodominio que a su vez esta compuesto por 11 o 12 repeticiones, el dominio transmembranal y el dominio intracelular. Se encuentran localizadas en la membrana basolateral de las células intestinales.

A la fecha, las proteínas tipo caderinas que interactúan con las toxinas Cry, se encuentran en los lepidópteros : *M. sexta*, *B. mori*, *L. dispar*, *H. armigera*, *H. virescens*, *P. gossypiella* y *O. nubilalis*. Este receptor juega un papel preponderante en el mecanismo de acción de las toxinas Cry, ya que es el responsable de la oligomerización de la toxina, el cual es un paso crucial en la toxicidad. Se ha propuesto la idea de que las proteínas tipo caderinas expresadas en el intestino de lepidópteros son los mayores determinantes de especificidad para las toxinas Cry1 (Piggot y Ellar, 2007).

A la fecha, todas las caderinas clonadas y expresadas en líneas celulares interactúan con su toxina Cry y le confieren susceptibilidad a la célula que la expresa. Esto puede deberse al hecho de que la glicosilación no parece ser esencial en la unión con la toxina y por lo tanto no son relevantes los patrones de glicosilación de las diferentes líneas celulares.

3. ANTECEDENTES

3.1 Resistencia a las toxinas Cry

Se espera que el uso de insecticidas microbianos basados en *B. thuringiensis* incremente considerablemente en el futuro, debido a las crecientes preocupaciones ambientales por el uso de insecticidas químicos. La resistencia a Bt en el campo es la mayor preocupación de aumentar el uso de este bioinsecticida.

En teoría la interrupción de cualquier paso en el mecanismo de acción de las toxinas Cry (**Figura 6**) puede provocar la generación de resistencia en los insectos blancos. De hecho, poblaciones de insectos resistentes seleccionados en condiciones de laboratorio han mostrado que la resistencia puede desarrollarse por diferentes mecanismos, como la alteración en la activación de toxinas Cry por proteasas intestinales (Oppert *et al*, 1997; Keller *et al*, 1996; Li *et al*, 2004), el secuestro de la toxina por restos de glicolípidos (Ma *et al*, 2012) o esterazas (Gunning *et al*, 2005), por inducir una elevada respuesta inmune (Hernández-Martínez *et al*, 2010; Rahman *et al*, 2004). Sin embargo, el mecanismo más común por el cual los insectos desarrollan resistencia hacia las toxinas Cry es mediante la modificación de sus receptores, provocando que la unión de la toxina se vea disminuida (Ferré y Van Rie, 2002; Heckel *et al*, 2007).

Existen múltiples ejemplos en la literatura reportando fenotipos de resistencia a toxinas Cry, asociados a mutaciones en genes que codifican para las proteínas de unión de toxinas Cry o mutaciones que afectan la transcripción de receptores por mecanismos regulatorios en trans. Los primeros ejemplos que fueron reportados describen mutaciones en el gen de caderina (CAD), pero mutaciones en otros receptores como aminopeptidasa (APN) y fosfatasa alcalina (ALP) también han sido reportados como se muestra en la **Tabla 3**.

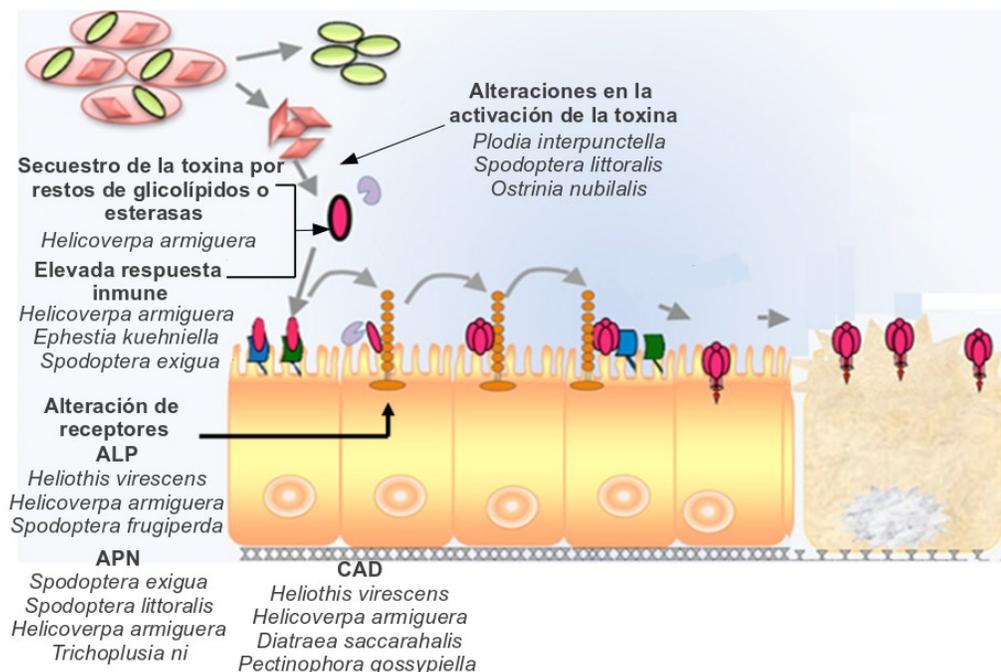


Figura 7. Mecanismos de resistencia a las toxinas Cry

Tabla 3. Listado de insectos resistentes reportados en la literatura. La resistencia es el cociente entre las dosis letal media de la cepa resistente a la cepa susceptible.

| Mecanismos de resistencia a las toxinas Cry | | | | | |
|--|---|----------------------------|----------------------|--------------------------------|---|
| Receptor | Insecto (Cepa) | Toxina | Mecanismo | Resistencia (veces resistente) | Referencia |
| Caderina | <i>Heliothis virescens</i> (YHD2) | Cry1Ac | Retrotransposon | 10,000 x | Gahan <i>et al</i> , 2001; Jurat-Fuentes <i>et al</i> , 2004 |
| Caderina | <i>Pectinophora gossypiella</i> (AZP-R) | Cry1Ac | Delección | 3100 x | Morin <i>et al</i> , 2003 |
| Caderina | <i>Helicoverpa armigera</i> (GYBT) | Cry1Ac | Delección | 564 x | Xu <i>et al</i> , 2005 |
| Caderina | <i>Diatraea saccharalis</i> (CryAb-RR) | Cry1Ab | Baja expresión | 100 x | Yang <i>et al</i> , 2011 |
| Aminopeptidasa | <i>Spodoptera exigua</i> | Cry1Ca | Perdida de expresión | | Herrero <i>et al</i> , 2004 |
| Aminopeptidasa | <i>Helicoverpa armigera</i> | Cry1Ac | Delección | 2971 x | Zhang <i>et al</i> , 2009 |
| Aminopeptidasa | <i>Ostrinia nubilalis</i> | Cry1Ab | Mutación | 3100 x | Khajuria <i>et al</i> , 2011 |
| Aminopeptidasa | <i>Trichoplusia ni</i> (GLEN-CryAc-BCS) | Cry1Ac | Perdida de expresión | 100 x | Tiewsi y Wang, 2011 |
| Fosfatasa alcalina | <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> | Cry1Ac Cry1Ac Cry1Fa | Baja expresión | | Jurat-Fuentes, y Adang, 2004; Jurat-Fuentes <i>et al</i> , 2011 |

3.2 Estrategias para superar la resistencia hacia las toxinas Cry

A la fecha, el maíz y el algodón son los únicos cultivos comerciales que expresan las toxinas Cry de Bt. Se estima que se cultivan alrededor de 160 millones de hectáreas en el mundo (Clive, 2007). Esto ha provocado altos niveles de producción de proteínas Cry lo

que representa una fuerte presión de selección para poblaciones de insectos plaga, lo que ha generado un aumento en la resistencia hacia las toxinas Cry en el campo.

Los casos de resistencia a cultivos Bt documentados a la fecha son: *S. frugiperda* en Puerto Rico al maíz Bt el cual expresa la toxina Cry1Fa (Storer *et al*, 2010), *B. fusca* en Sudáfrica resistente al maíz Bt que expresa la toxina Cry1Ab (van Rensburg, 2007), *P. gossypiella* en la India (Bagla, 2010) y China (Wan *et al*, 2012) resistentes al algodón que expresa la toxina Cry1Ac, *H. armigera* en China a resistente al algodón que expresa la toxina Cry1Ac (Liu *et al*, 2010) y Cry2Ab en Australia (Downes *et al*, 2010). Estos datos sugieren que la resistencia a cultivos Bt es un problema emergente y pone en peligro esta tecnología si acciones concretas no son tomadas inmediatamente.

De las propuestas que se tienen a la fecha para contender con la resistencia de insectos plaga a las toxinas Cry se encuentran la estrategia de zonas refugio, la generación de toxinas Cry modificadas y la estrategia piramidal.

3.2.1 Zonas de refugio

Esta estrategia propone el uso de zonas refugio, donde cultivos que no expresan las toxinas Cry son plantados alrededor de cultivos que si expresan las toxinas. Debido a que la resistencia en la mayoría de los casos ha mostrado ser de carácter recesivo, en muchos países la estrategia de refugio ha sido usada para evitar la selección de poblaciones resistentes a Bt. Este procedimiento tiene como objetivo mantener una población de insectos susceptibles que son capaces de reproducirse con insectos resistentes, resultando en una progenie heterocigota, la cual es susceptible a las toxinas, esto retrasa la aparición de resistencia en el campo (Pardo *et al*, 2012). Esta estrategia ha sido exitosa en prevenir la aparición de resistencia en *P. gossypiella* al algodón Bt en los Estados Unidos. Sin embargo, a pesar del uso de zonas refugio, poblaciones de insectos resistentes han sido encontradas en campos Bt (Pardo *et al*, 2012).

3.2.2 Toxinas Cry modificadas

Las toxinas Cry modificadas surgen del conocimiento adquirido del mecanismo de acción de las toxinas Cry, en donde la interacción con el receptor caderina provoca el corte de la hélice α -1 (**Figura 6**), con este dato se diseñaron toxinas a las cuales se removió la hélice α -1 mediante ingeniería genética. La característica principal de las toxinas Cry modificadas es que no necesitan de la interacción con la caderina para formar estructuras oligoméricas, permitiendo ser activas contra insectos resistentes que perdieron la expresión de este receptor.

Por ejemplo, se ha visto que las toxina Cry1AbMod es capaz de matar insectos silenciados en el gen de caderina los cuales presentan tolerancia a la toxina Cry1Ab (Soberón *et al*, 2007). En un siguiente estudio se demostró que Cry1AbMod es capaz de reducir la resistencia de seis de los insectos plagas más importantes: la cepa NO-QA de *P. xylostella*, la cepa ECB de *O. nubilalis*, la cepa ECB de *D. saccharalis*, la cepa Cry1Ab-RR de *H. armigera*, la cepas GlenBtR y Gip- BtR de *T. ni*, la cepas YEE y YHD3 de *H. virescens* (Franklin *et al*, 2009; Tabashnik *et al*, 2011). Estas poblaciones de cepas resistentes poseen diferentes bases genéticas de resistencia, sugiriendo que las toxinas Cry1AMod tienen el

potencial de abatir la resistencia no solo cuando esta se encuentra ligada a la pérdida de caderina, sino también a otros receptores como ALP, APN.

De los inconvenientes que presentan las toxinas Cry modificadas, son la poca diversidad con la que se cuenta, a la fecha sólo la toxina Cry1AbMod y Cry1AcMod están disponibles. A pesar de que estas toxinas poseen actividad contra un amplio espectro de insectos, existen muchas plagas que no son susceptibles a estas toxinas. Otro inconveniente, es la pérdida de actividad de las toxinas modificadas hacia insectos susceptibles, este es un serio problema ya que en el campo, las poblaciones de insectos resistentes se encuentran mezclados con insectos susceptibles, por lo tanto la aplicación de las toxinas Cry modificadas no controlaría eficientemente a los insectos susceptibles generando a largo plazo resistencia en los insectos susceptibles.

3.2.3 Estrategia piramidal

La estrategia piramidal propone la aplicación de dos toxinas Cry con un espectro de actividad sobrelapado pero con un sitio de interacción distinto. Esta idea surge del fenómeno de resistencia cruzada, el cual consiste en insectos que se han hecho resistentes a una toxina empleada para combatirlos, también se vuelven resistentes a otras toxinas a las cuales nunca han sido expuestos.

El hecho de que diferentes toxinas Cry se vuelvan inocuas para el mismo insecto resistente sugiere que los sitios de interacción son los mismos para las diferentes toxinas Cry, es decir que comparten los mismos receptores. Por el contrario insectos resistentes a cierta toxina Cry, que siguen siendo susceptibles a otra toxina Cry, sugiere que los sitios de interacción son distintos y por lo tanto no presentan el fenómeno de resistencia cruzada.

Con esta estrategia se atacan dos blancos en el insecto y por lo tanto retarda la aparición de resistencia, ya que la probabilidad de que surjan dos mecanismos de resistencia distintos al mismo tiempo es menor.

Durante los 5 primeros años desde la introducción de cultivos Bt en 1995, únicamente las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac han sido utilizadas como control biológico. Gradualmente, con la acumulación de información acerca del modo de acción de las toxinas Cry y sus receptores epiteliales, se han desarrollado e introducido avanzadas variedades piramidales, las cuales expresan dos toxinas con diferentes modos de reconocimiento a receptores (http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/pip_list.htm).

Recientemente, la estrategia piramidal ha sido fuertemente recomendada, instando a la generación y desarrollo de cultivos Bt que expresen dos diferentes toxinas Cry que minimicen la evolución de resistencia de las poblaciones de insectos que se encuentran expuestas a las toxinas. Actualmente ya existen plantas Bt que utilizan esta estrategia como el algodón Bt Bollgard II (Monsanto, Mi), expresa las proteínas Cry1Ac y Cry2Ab que une a diferentes moléculas receptores, se encuentra ya disponible. Otro ejemplo, de plantas Bt que expresen diferente combinación de genes Cry es la SmartStax (Monsanto, MI and Dow AgroSciences, IN), un maíz Bt que expresa la toxinas Cry1Fa, Cry2Ab y Cry1Ab.10.5 (una toxina híbrida que contiene el dominio I y II de Cry1Ab y el dominio III de Cry1Fa y el C-terminal de Cry1Ac).

Sin embargo, el desarrollo de resistencia a múltiples toxinas es también posible, como lo demuestra la cepa CXS y KCBhyb de *H. virescens* o la cepa BX-R de *P. gossypiella* quienes son resistentes a las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab (Jurat-Fuentes *et al*, 2003; Tabashnik *et al*, 2009). Por esta razón es necesario seguir buscando nuevos pares de toxinas que sean activas para la misma plaga, pero que sus mecanismos de actividad sean distintos, es decir utilicen diferentes receptores del mismo insecto.

En ese sentido se ha demostrado que la toxina Cry1Ca no posee resistencia cruzada con las toxinas Cry1A (Moar *et al*, 1995; Ferre *et al*, 1991), y se plantea como una toxina candidata para utilizarla en este tipo de estrategia.

3.3 La toxina Cry1Ca no comparte los mismos sitios de unión que las toxinas Cry1A

A la fecha, la subclase de toxinas Cry1A representan el grupo de proteínas Cry más estudiado tanto en su interacción con receptores, como en su mecanismo de acción, lo que ha promovido ampliamente su uso como control biológico. A pesar de que el espectro insecticida de la toxina Cry1Ca es muy similar al de la toxinas Cry1A, su empleo como control biológico no es tan extenso.

En la **Tabla 4**, podemos apreciar diferentes insectos que son susceptibles a ambas toxinas y en los cuales se podría aplicar la estrategia piramidal para controlar este tipo de plagas, debido a que se cuentan con las dos condiciones, la primera, que el espectro entre ambas toxinas se encuentra sobrelapado (**Tabla 4**), y la segunda que posean sitios de interacción distintos.

En ese sentido, recientemente se aisló una población de campo de *P. xylostella* que al estar expuesta de manera constante a aerosoles basados a Bt subsp. *Kurstaki*, presentó altos niveles de resistencia a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa, no obstante presentó niveles moderados de resistencia a la toxina Cry1Ca (Sayyed *et al*, 2005). En *P. gossypiella* se encontró una población resistente a las toxinas Cry1Aa y Cry1Ab pero siguió siendo susceptible a la toxina Cry1Ca (Tabashnik *et al*, 2000). También se han encontrado poblaciones de *H. virescens* resistentes a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Fa, pero siguen siendo susceptibles a la toxina Cry1Ca (Gould *et al*, 1995). Todos estos datos nos sugieren que insectos susceptibles tanto a la toxinas Cry1A como a la Cry1Ca poseen sitios de interacción distintos y por lo tanto este par de toxinas son una opción viable para su aplicación en la estrategia piramidal.

Un ejemplo donde se ha demostrado que los sitios de interacción son distintos para las toxinas Cry1A y Cry1Ca es en *M. sexta*, donde se han reportado diferentes receptores para distintas toxinas Cry. Se sabe que *M. sexta* posee cuatro APN, de las cuales dos interaccionan con alguna toxina Cry (Piggot *et al*, 2007). Una APN de 120 kDa que interacciona con las toxinas Cry1A pero que sin embargo no interacciona con la toxina Cry1Ca (Masson *et al*, 1995) (**Figura 8.A**). Por otro lado, una APN de 106 kDa que interacciona con la toxina Cry1Ca pero no es capaz de unirse a la toxina Cry1Ac (Luo *et al*, 1996) (**Figura 8.B**).

Tabla 4. Comparación de las dosis letal media de diferentes insectos para las toxinas Cry1Ca y Cry1A (Modificado de Avisar *et al*, 2009).

| Insecto | Toxina Cry | Lc ₅₀ (ng/cm ²) |
|-----------------------------|---------------|---|
| <i>Mamestra brassicae</i> | Cry1Ca | 22 |
| | Cry1Aa | 165 |
| | Cry1Ab | 162 |
| <i>Mamestra configurata</i> | Cry1Ca | 45.3 ng/larva |
| | Cry1Ab | 29.8 ng/larva |
| <i>Manduca sexta</i> | Cry1Ca | 74 |
| | Cry1Aa | 5 |
| | Cry1Ab | 7.5 |
| | Cry1Ac | 12-16 |
| <i>Bombyx mori</i> | Cry1Ca | 30 ng/larva |
| | Cry1Aa | 2 ng/larva |
| <i>Plutella xylostella</i> | Cry1Ca | 5 |
| | Cry1Ac | 0.9 |
| <i>Trichoplusia ni</i> | Cry1Ca | 12 |
| | Cry1Aa | 1.1 |
| | Cry1Ab | 3.4 |
| | Cry1Ac | 2-5 |

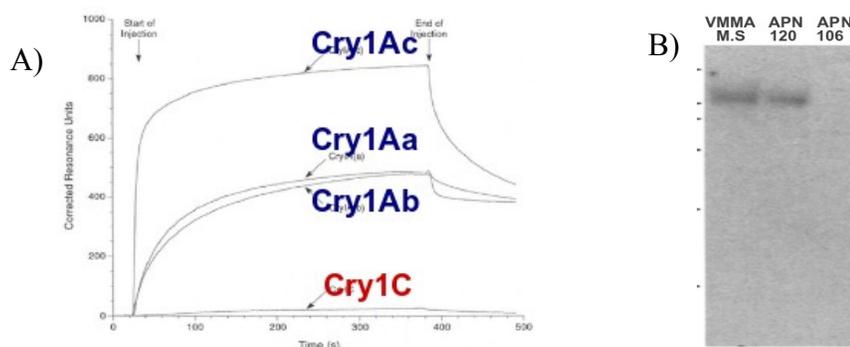


Figura 8 A). Experimento de superficie de resonancia de plasmóon (SPR) donde se aprecia que la toxina Cry1Ca no es capaz de interaccionar con la APN de 120 kDa que si une a las toxinas Cry1A (Modificado de Masson *et al*, 1995). **B).** *Western blot* donde se aprecia que la toxina Cry1Ac no es capaz de unirse a la APN de 106 kDa que si interacciona con la toxina Cry1Ca (Modificado de Luo *et al*, 1996).

Esto abre la posibilidad de buscar nuevos receptores en insectos susceptibles a ambas toxinas. Por ejemplo, en *M. sexta* en donde ya se tienen reportados tres receptores para las toxinas Cry1A (Caderina, APN y ALP) surge la pregunta si son los mismos receptores para la toxina Cry1Ca o si son distintos. Esto ofrecería una herramienta biotecnológica viable para la utilización de ambas toxinas en la estrategia piramidal, así como en los casos en donde ya se presente resistencia a toxinas Cry1A y poder combatirla con la toxina Cry1Ca.

Por otro lado, el espectro insecticida de la toxina Cry1Ca abarca insectos lepidópteros que son completa o parcialmente tolerantes a las toxinas Cry1A. Como se puede apreciar en la **Tabla 5**, la toxina Cry1Ca es tóxica para un amplio rango de especies de insectos como: *M. brassicae*, *P. xylostella* e incluso contra subespecies del género *Spodoptera*; todos estos insectos no son controlados por la toxinas Cry1A y son responsables de grandes pérdidas a cultivos como el maíz, algodón y soya a nivel mundial (Avisar *et al*, 2009).

Tabla 5. Comparaciones de las dosis letales medias de toxinas Cry1As y Cry1Ca probadas en distintos insectos (Tomado de Ocelot, 2011).

| Insecto | Toxina Cry | LC ₅₀ (ng/cm ²) |
|------------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Mamestra brassicae</i> | Cry1Ac Cry1Ca | >150000 ng/ml 350 ng/ml |
| <i>Spodoptera exigua</i> | Cry1Ab Cry1Ca | 601 55 |
| <i>Spodoptera frugiperda</i> | Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ca | >2000 >2000 31 |
| <i>Trichoplusia ni</i> | Cry1Aa Cry1Ca | >2000 12 |

Esto nos indica que existen plagas bastante importantes que son susceptibles a la toxina Cry1Ca y que no son controlados por las toxinas Cry1A, una de las posibles causas por la cual la toxina Cry1Ca no se ha empleado extensamente, a pesar de las ventajas que posee, es el poco conocimiento que se tiene de sus receptores.

Un ejemplo interesante es el caso de *S. frugiperda*, la cual es una plaga bastante importante que afecta los cultivos de maíz y algodón desde los Estados Unidos hasta Sudamérica. De las toxinas Cry de Bt, la proteína Cry1Ca es la más tóxica contra esta especie (**Tabla 6**). Sin embargo, a la fecha no se conoce ningún receptor en este insecto para ninguna toxina Cry.

Aranda y colaboradores (Aranda *et al*, 1996) reportaron dos proteínas de este insecto con pesos de 40 y 44 kDa que interaccionan con la toxina Cry1Ca (**Figura 9**), sin embargo aún no se identifica ningún molécula de unión.

Con base en estos antecedentes nos propusimos identificar las proteínas intestinales de *S. frugiperda* y *M. sexta* que interaccionan con la toxina Cry1Ca.

Tabla 6. Dosis letal media de diferentes toxinas Cry hacia el lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (Tomado de Aranda *et al*, 1996).

| Toxina | LC₅₀ (ng/cm²) |
|---------------|--|
| Cry1Aa | >2000 |
| Cry1Ab | >2000 |
| Cry1Ac | >2000 |
| Cry1B | >2000 |
| Cry1C | 31(18-49) |
| Cry1D | 77(17-147) |
| Cry1E | >2000 |
| Cry1Fa | 170 |

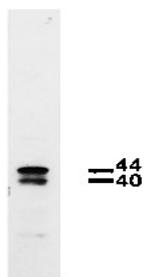


Figura 9. Ensayo de Ligand blot de vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) aisladas de *Spodoptera frugiperda* que interaccionan con la toxina Cry1Ca (Tomado de Aranda *et al*, 1996)

4. HIPÓTESIS

- Los receptores de la toxina Cry1Ca en *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda* son APN, ALP y caderina distintos a los reportados para las toxinas Cry1A

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Identificar las moléculas de unión de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* que interaccionan con la toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*.

5.2 Objetivos particulares

- Calcular la dosis letal media (LC₅₀) de la toxina Cry1Ca hacia los lepidópteros *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda*
- Analizar la unión entre la toxina Cry1Ca y las vesículas derivadas de la microvellosidad media apical de *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda* a través del uso de diferentes técnicas
- Identificar mediante espectrometría de masas aquellas proteínas de las VMMA que interaccionen con la toxina Cry1Ca.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Purificación de cristales de la toxina Cry1Ca

Se creció la cepa que expresa la toxina silvestre Cry1Ca entomocidus 60.5 en cajas petri con medio LB-agar suplementado con eritromicina (10 µg/ml) durante 12 horas a 30°C. Posteriormente se inoculó el medio de esporulación HCT líquido (200 ml) que contiene 10 µg/ml de eritromicina. Realizar crecimiento a 30 °C con agitación, hasta observar en el microscopio la formación de cristales (aproximadamente 3 días).

Para recuperar los cristales, centrifugar el cultivo a 10,000 rpm 10 min, eliminar el sobrenadante. Resuspender la pastilla en 0.3 M NaCl, 0.1 M de EDTA pH 8 y volver a centrifugar en las condiciones antes descritas. Realizar tres veces este paso. Posteriormente resuspender la pastilla en agua con PMSF 1 mM y nuevamente volver a centrifugar en las mismas condiciones tres veces y almacenar a 4 °C.

6.2 Bioensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*.

Los bioensayos se realizaron con larvas neonatas de *S. frugiperda* y *M. sexta* por el método de contaminación de superficie. En placas de 24 pozos se coloca dieta artificial hasta llenar la mitad de cada pozo. Una vez que la dieta se seca, se agregan las diferentes dosis de la toxina en un volumen final de 30 µl de agua, las cajas se dejan secar y se coloca una larva por cada pozo. Después de siete días se monitorea la mortalidad. La concentración requerida para matar el 50% de las larvas (LC₅₀) fue calculada mediante un análisis *probit* con el software Polo-PC Leotra.

6.3 Solubilización, activación y marcaje con biotina de la toxina Cry1Ca.

Centrifugar la mezcla de espora - cristal resuspendida en agua con PMSF a 10,000 rpm 10 min, eliminar el sobrenadante. Solubilizar la pastilla en amortiguador de carbonatos (50 mM pH 10.5) más 0.02% de mercaptoetanol. Incubar en agitación a 37 °C durante 2 horas. Pasado el tiempo, centrifugar a 13,400 rpm por 10 min. Eliminar la pastilla.

Cuantificar la concentración de proteína en el sobrenadante por el método de Bradford, posteriormente agregar 1:4 (v/v) Tris-HCl 1 M pH 8 (750 µl de protoxina + 250 µl Tris). Agregar tripsina 1:50 (p/p) e incubar una hora a 37 °C con agitación. Inactivar la tripsina con PMSF 1 mM final y centrifugar a 14,000 rpm 10 min. Recuperar el sobrenadante y cuantificar la concentración de proteína por el método de Bradford.

Dializar la toxina activada durante 12 h en amortiguador de boratos (Ac. Bórico 0.05 M, Na OH 0,05 M y NaCl 0.15 M, pH 8.6 ajustado con HCl). Incubar la toxina dializada durante una hora a temperatura ambiente con biotina (40 µl de biotina por 1 mg de toxina). Empacar una columna con sephadex G25 de 5ml, se equilibra con 20 ml de PBS. Centrifugar la columna a 2000 rpm por 2 min. Agregar la muestra y centrifugar de igual forma. Recuperar la toxina marcada y cuantificar la concentración de proteína por el método de Bradford.

6.4 Extracción del intestino medio de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*.

Colocar las larvas en frío para su disección. Fijar cada uno de los extremos de las larvas sobre una tabla de disección de unicel usando alfileres entomológicos. Eliminar los primeros 3 segmentos de cada extremo de la larva haciendo un corte transversal con las tijeras curvas. Posteriormente realizar un corte longitudinal en la región media. Separar el intestino medio ayudándose de pinzas de punta redonda y enjuagar el tejido en amortiguador 300 mM manitol, 17 mM tris-HCl, 5 mM de EGTA, 2 mM DTT y 0.5 mM de PMSF ajustado a pH de 7.4 con KOH. Recuperar el tejido en un tubo inmerso en hielo seco y conservar a -70 °C.

6.5 Purificación de las vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) de intestino medio de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*.

Descongelar los intestinos en hielo. Colocar la muestra en un homogenizador de vidrio estéril inmerso en hielo, diluida 1:10 p/v en la solución 1 (300 mM manitol, 17 mM Tris-HCL, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 10 mM HEPES, 10 mM EDTA y 0.1 mM de PMSF ajustado a un pH de 7.4 con KOH). Colocar el embolo de teflón del homogenizador en un motor taladro Black & Decker v-114. Dar nueve golpes a 2250 rpm. Agregar un volumen igual de una solución 24 mM MgCl₂, agitar suavemente y dejar reposar 15 min en hielo (en este punto tomar una muestra de 100 µl designada como homogenizado inicial). Centrifugar a 4500 rpm durante 15 min a 4 °C en un rotor Beckman JA-20, descartar la pastilla y cambiar el sobrenadante a otro tubo estéril el cual se centrifuga a 16,000 rpm durante 30 min a 4 °C usando el equipo antes descrito, descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en la mitad del volumen de la solución 1 inicial y medio volumen de 24 mM de MgCl₂, volver a repetir las centrifugaciones anteriores. Resuspender la segunda pastilla en la solución 1 diluida 1:1 con agua desionizada, dar 3 golpes a 2250 rpm usando el equipo antes descrito, alícuotar y almacenar a -70°C. Cuantificar la proteína de las VMMA y del homogenado inicial mediante el método de Lowry (DC proteína-dye, BIO-RAD).

6.6 Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry.

Preparar una mezcla de la solución A y la solución S del sistema DC protein- dye, (BIO-RAD) 50:1 (1ml Sol A y 20 µl Sol S). Tomar 5 µl de la muestra y adicionar 125 µl de la mezcla preparada anteriormente, agitar en vortex, incubar por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente agregar 1ml de la solución B, agitar en vortex, e incubar por otros 15 min. Leer a 750 nm en un espectrofotómetro. Referenciar los resultados obtenidos a una curva estándar de BSA.

6.7 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford.

Tomar 5 µl de la muestra y llevarla a un volumen de 800 µl con agua desionizada, posteriormente añadir 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-rad). Medir la absorbancia a 595 nm. Referenciar los resultados a una curva estándar de BSA.

6.8 Determinación de actividad enzimática específica.

6.8.1 Actividad de Aminopeptidasa.

En una celda de poliestireno de 1 ml mezclar 400 μ l de Agua (MQ), 200 μ l Tris-HCl 1 M pH 8, 250 μ l NaCl 1M y 5 μ l de VMMA, agitar bien. Posteriormente adicionar 100 μ l de un stock 10 mM de L-leucina-p-nitroanilina (LpNA), mezclar por inversión y seguir la cinética de reacción durante varios minutos en el espectrofotómetro a 405 nm. Para calcular la actividad específica se consideró que el coeficiente de absorción de la p-nitroanilina es de 0.1 mol^{-1} (Bravo *et al*, 2002). Una unidad de actividad específica de aminopeptidasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μ mol de LpNA por minuto.

6.8.2 Actividad de fosfatasa alcalina.

Disolver 1 mg/ml de p-nitrofenol fosfato en una solución 0.5 mM de MgCl_2 , 100 mM de tris-HCl pH 9.5 (Solución 1). Dispersar 5 μ g de muestra en 500 μ l de solución 1. Agitar en vortex e incubar 15 min a temperatura ambiente. Detener la reacción agregando 500 μ l de una solución 250 mM de EDTA pH 8 y agitar en vortex. Leer a 405 nm. Referenciar los resultados obtenidos a una curva estándar de p-nitrofenol. La actividad enzimática específica se calcula considerando la cantidad de proteína necesaria para transformar 1 nmol de p-nitrofenol fosfato en un minuto.

6.9 Experimentos de unión en Solución.

Incubar 10 μ g de VMMA's con 10 nM de toxina marcada con biotina en 100 μ l de amortiguador (PBS-Tween 0.1% con BSA 0.1%) durante una hora a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, centrifugar las muestras a 14,000 rpm 10 min, descartar el sobrenadante y lavar con 100 μ l de amortiguador de unión y volver a centrifugar en las condiciones antes descritas, repetir este paso al menos dos veces. Resuspender la pastilla en 10 μ l de PBS. Separar las proteínas en un gel de acrilamida al 10%, electrotransferir a una membrana de PVDF.

Después de la transferencia lavar la membrana con PBS-T 0.1% durante 15 min a temperatura ambiente (T.A). Bloquear con PBS-T 2% durante 20 min. Enjuagar e incubar una hora con streptavidina acoplada a peroxidasa (1:50,000), pasado el tiempo de incubación, lavar la membrana y verificar la unión de la toxina mediante quimioluminiscencia.

6.10 Ensayos de competencia.

Incubar 10 μ g de VMMA's con 10 nM de toxina marcada con biotina y 50 y 100 veces más de toxina no marcada en 100 μ l de amortiguador (PBS-T 0.1% con BSA 0.1%) durante una hora a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, centrifugar las muestras a 14,000 rpm 10 min, descartar el sobrenadante y lavar con 100 μ l de amortiguador de unión centrifugar en las condiciones antes descritas, repetir este paso al menos dos veces. Resuspender la pastilla en 10 μ l de PBS. Separar las proteínas en un gel de acrilamida al

10%, electrotransferir a una membrana de PVDF. A partir de este momento el protocolo es el mismo a los experimentos de unión en solución.

6.11 Solubilización de VMMA

Diluir 50 µg de vesículas en 200 µl de buffer CHAPS (Tris-HCl pH 8.5 20 mM, NaCl 100mM, EDTA 5mM, PMSF 1mM, CHAPS 1%) e incubar por dos horas a 4°C, posteriormente se centrifugan a 70,000 rpm por 40 min, el sobrenadante se cuantifica mediante Lowry.

6.12 Experimentos de Inmunoprecipitación

Para cada experimento tomar 50 µl de perlas de agarosa con proteína A. Como la resina se encuentra en etanol, se lava 5 veces con 500 µl de PBS 1x centrifugando 2 min a 10,000 rpm en cada lavado. Una vez lavada la resina se incuba con 0.1 µl de anticuerpo anti-Cry1Ca por dos horas a 4°C. Se agrega 10 µg de toxina Cry1Ca y las vesículas de la microvellosidad media apical del intestino las cuales previamente se solubilizaron en buffer CHAPS, la mezcla se deja incubando toda la noche a 4°C.

Posteriormente se centrifuga 2 minutos a 10,000 rpm, se elimina el sobrenadante y se lava 5 veces con 500 µl de PBS 1x centrifugando 2 min a 10,000 rpm en cada lavada, al final se resuspende las perlas en 20 µl de mezcla lítica, se hierve para separar el complejo y se carga toda la mezcla en un gel de acrilamida.

6.13 Experimento de unión a ligando.

Separar en un gel de acrilamida al 10%, 10 µg de VMMA's purificadas de diferentes estadios de desarrollo larvario de *S. frugiperda* y *M. sexta*. Electrotransferir las proteínas a una membrana PVDF. Lavar la membrana con PBS-T 0.1% 15 min. Bloquear con PBS-BSA 1% una hora, lavar la membrana con PBS-T 0.1% e incubar con la toxina Cry1Ca marcada con biotina en amortiguador de incubación (PBS-BSA-T 0.1% 0.1%) durante dos horas a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación enjuagar la membrana con PBS-T 0.1% y volver a incubar con streptavidina acoplada a peroxidasa durante una hora. Verificar la unión mediante quimioluminiscencia.

6.14 Gel de actividad de fosfatasa alcalina.

Cargar en un gel de acrilamida las VMMA's con la mezcla lítica (sin SDS y sin hervir). Las condiciones de corrida son las habituales y una vez resueltas incubar al gel en solución de revelado (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ pH 9.5 ajustado con NaOH) por 20 min para equilibrar. Retirar esta solución y agregar solución nueva a la que se le adiciona los volúmenes necesarios de sustrato (para 40 ml de solución agregar 137.6 µl de 5-bromo-4cloro-3indol fosfato (BCIP) y 247.6 µl de nitro blue tetrazolina (NBT)). Incubar hasta la aparición de bandas. Se retira la solución y se agrega EDTA 250 mM pH 8 para detener la reacción.

6.15 Electroforesis de dos dimensiones

El primer paso de la electroforesis bidimensional es la purificación de la muestra, en este paso se remueven moléculas que afectan la separación en la primera dimensión como: alcaloides, ácidos nucleicos, azúcares, para este procedimiento se utilizó 2-D clean-up kit provisto por GE Healthcare. El protocolo que se siguió es el siguiente:

A 100 µg de VMMA añadir 300 µl de precipitante, mezclar por inversión e incubar 15 min en hielo. Agregar 300 µl de co-precipitante y centrifugar a 4°C a 12,000 x g por 5 minutos. Eliminar el sobrenadante, dar un pulso a la centrifuga y remover el líquido remanente sin tocar el pellet. Agregar 40 µl de co-precipitante a la pastilla e incubar en hielo por 5 minutos. Centrifugar a 12,000 x g durante 5 min, eliminar el sobrenadante. Agregar 25 µl de agua destilada y vortexear. Agregar 1 ml de amortiguador de lavado (previamente congelado a -20°C) y 5 µl de aditivo de lavado. Agitar el tubo hasta dispersar pastilla. Incubar a -20°C durante 30 minutos, vortexear cada 10 min. Centrifugar a máxima velocidad por cinco minutos. Desechar el sobrenadante y secar la pastilla con el tubo abierto por 3 minutos. Resuspender en 70 µl de amortiguador de rehidratación DeStreak provisto por GE Healthcare.

Una vez resuspendidas se cuantificaron usando el 2-D quant kit de GE Healthcare. El protocolo que se siguió es el siguiente:

Agregar 2.5 µl y 5 µl del total de la muestra resuspendida (de los 70 µl provenientes de la purificación). Agregar 100 µl de precipitante, mezclar por vortex. Agregar 100 µl de co-precipitante. Agitar por vortex y mezclar por inversión. Centrifugar las muestras por 5 minutos a 14,000 RPM. Quitar los tubos de la centrifuga lo mas pronto posible. Decantar el sobrenadante, dar un pulso a la centrifuga y remover el sobrenadante remanente. Agregar 20 µl de la solución de cobre y 80 µl de agua miliQ. Agitar para re suspender la pastilla. Preparar reactivo de color, mezclando 100 partes del agente de color “A” por una parte del agente de color “B”. Agregar 200 µl del reactivo de color a cada muestra y dejar incubar a temperatura ambiente por 20 min. Medir la absorbancia en placa de ELISA 100 µl /pozo a 480 nm. Referenciar los valores obtenidos a una curva estándar hecha con BSA provista en el kit.

Una vez cuantificada la muestra se carga la cantidad de proteína deseada en las Immobiline DryStrips de 7 cm pH 3-10 NL (no linear) provistas por GE Healthcare. Para los geles que se tiñeron con plata se cargaron 50 µg de proteína y los geles que se transfirieron para realizar *ligand blot* y *western blot* se cargaron con 70 µg. El cargado de proteína se realiza mediante hidratación pasiva, dejando toda la noche la cantidad de proteína deseada en 125 µl de volumen final de la solución de rehidratación con 1 de amortiguador IPG pH 3-10 NL en el cassette nivelado.

Una vez que las Immobiline DryStrips se rehidratan, se colocan con el gel hacia arriba en el colector (manifold), el colector se posiciona en el Ettan IPGphor 3. Posteriormente se coloca la Immobiline DryStrips a la altura que indique el aparato, se agregan 108 ml de aceite mineral, se colocan papeles filtros a los extremos de cada Immobiline DryStrips previamente humedecidos con 125 µl de agua miliQ. Se utilizó el siguiente programa: Paso 1 300V por 200 Vh, Paso 2 Gradiente 1000V por 300 Vh, paso 3 gradiente 5000V por 4000 Vh, paso 4 5000 V por 1250 Vh. Aproximadamente tarda 3 horas en correr la primera dimensión.

Una vez que la primera dimensión ha concluido, se pone la Inmobiline DryStrips en 5 ml de amortiguador de equilibrio (75 mM Tris pH 8.8, 6 M de urea, 30 % de glicerol, 2% de SDS, 1 % azul de bromofenol y 0.05 g de DTT) por 15 minutos en agitación. Posteriormente se incuba la Inmobiline DryStrips en 5 ml de amortiguador de equilibrio (75 mM Tris pH 8.8, 6 M de urea, 30 % de glicerol, 2% de SDS, 1% azul de bromofenol y 0.125 g de Iodoacetamida) durante 15 min en agitación. Los tiempos tienen que ser exactos.

Posteriormente colocamos las Inmobiline DryStrips en un gel de acrilamida al 10 %, con peine preparativo, el ánodo de la Inmobiline DryStrips va del lado izquierdo del gel. Se corre el gel a 20 mA, una vez que termina la segunda dimensión se tiñe el gel con plata o se transfieren a una membrana PVDF para estudios posteriores.

6.16 Soluciones y medios de cultivo

| Soluciones | | | |
|---|--|----------------------------------|---|
| Nombre | Composición | | Comentarios |
| Solución I (Para complementar el medio HCT) | KH_2PO_4 | 68 g/L | Esterilizar |
| Solución II (Para complementar el medio HCT) | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 12.3 g/L 0.169 g/L 1.4 g/L | Esterilizar |
| Solución III (Para complementar el medio HCT) | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ H_2SO_4 | 2 g/L 100 ml/L | Esterilizar |
| Solución IV (Para complementar el medio HCT) | $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 14.7 g/L | Esterilizar |
| Amortiguador de corrida 10x | Tris Glicina SDS 10% | 30 g/L 14.4 g/L 10 ml/L | Filtrar |
| Amortiguador de Transferencia | Tris Glicina Metanol | 30 g/L 14.4 g/L 200 ml/L | filtrar |
| Amortiguador de Carbonatos 5x | Na_2CO_3 Na_2HCO_3 | 5.5 g/100 ml 4.2 g/ 100ml | Las soluciones de preparan por separado. Se toman 20 ml de la solución Na_2HCO_3 y se le agregan aproximadamente 80 ml de la solución Na_2CO_3 , hasta llegar a un pH de 10.5 |

| | | | |
|-------------------------------------|---|---|--|
| Amortiguador de Disección | Manitol Tris EGTA DTT PMSF | 300 mM 17 mM 5 mM 2 mM 0.1 mM | Ajustar el pH a 7.4 con KOH |
| Amortiguador de preparación de VMMA | Manitol Tris EGTA EDTA HEPES DTT PMSF | 300 mM 17 mM 5 mM 10 mM 10 mM 2 mM 0.1 mM | Ajustar el pH a 7.4 con KOH |
| Solución de lavado de cristales | NaCl EDTA | 0.5 M 0.01 M | Ajustar el pH a 8 |
| Medios para Bacterias | | | |
| Nombre | Composición | | Comentarios |
| LB | Bactotripton Extracto de Levadura | 10 g/L 5 g/L | Ajustar el pH a 7 con NaOH y esterilizar |
| LB agar | Medio LB Agar | 1 L 15 g | Esterilizar. Dejar enfriar hasta 50°C y añadir, si procede, el antibiotico de selección. Distribuir en cajas petri y dejar solidificar. Conservar a 4°C |
| HCT | Bactotripton Casa aminoácidos | 5 g/L 2 g/L | Ajustar el pH a 7.25 con KOH y esterilizar. Antes de usar complementar con 50 ml de la Sol I, 1 ml de la Sol II, 10 ml de la Sol III, 10 ml de la Sol IV y 30 ml de glucosa al 10% |

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 La actividad de la toxina Cry1Ca disminuye a lo largo del desarrollo larvario de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*.

Para determinar la actividad de la toxina Cry1Ca a lo largo del desarrollo larvario de *S. frugiperda* y *M. sexta*, realizamos bioensayos de los tres primeros instares de desarrollo de ambos insectos (Tabla 7).

Tabla 7. Toxicidad de Cry1Ca hacia larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* en diferentes instares de desarrollo, en paréntesis se muestran el error asociado.

| Instar de desarrollo <i>Manduca sexta</i> | LC ₅₀ ng/cm ² | Instar de desarrollo <i>Spodoptera frugiperda</i> | LC ₅₀ ng/cm ² |
|--|--|--|--|
| 1° | 0.889 (0.732-2.58) | 1° | 149 (122-182) |
| 3° | 5.56 (4.15-7.61) | 2° | 351 (245-564) |
| | | 3° | > 5000 |

Como podemos apreciar, a medida que la larva se desarrolla la susceptibilidad a la toxina Cry1Ca disminuye para ambos insectos. En el caso de *S. frugiperda* la susceptibilidad disminuye 33 veces de 1° a 3° instar de desarrollo. En cambio para *M. sexta* la susceptibilidad disminuye 7 veces de 1° a 3° instar de desarrollo.

Esto concuerda con los datos reportados, donde se ha visto que existe una sensibilidad diferencial a lo largo del desarrollo larvario de algunos insectos. Gilliland y colaboradores reportan que para los insectos *M. sexta*, *P. brassicae*, *M. brassicae* y *A. ipsilon*, se genera cierta resistencia a diferentes toxinas Cry a medida que las larvas van creciendo (Gilliland *et al*, 2002).

El hecho de que el estadio larvario tenga relación con la sensibilidad del insecto hacia las toxinas Cry, tiene consecuencias importantes a nivel biotecnológico y de investigación; ya que se tiene que tomar en cuenta cuando se aplique una estrategia de control biológico en el campo y a nivel de investigación implica nuevas preguntas sobre los mecanismos moleculares responsables de este fenómeno. En ese sentido una de las posibilidades que se ha manejado es que a medida que el insecto crece los receptores que interaccionan con la toxina Cry cambian. Arenas y colaboradores demostraron que a lo largo del desarrollo larvario de *M. sexta*, la toxina Cry1Ab se unen diferencialmente a los diferentes receptores caracterizados (Arenas *et al*, 2010).

Estos datos nos sugieren que la búsqueda de receptores debería realizarse en los instares de desarrollo donde la toxina es activa; es decir en los primeros estadios de desarrollo. Esto contrasta con la mayoría de los receptores reportados a la fecha, ya que tradicionalmente los insectos se disectan en los instares tardíos, por la facilidad que presenta la obtención de tejido, en donde quizá los receptores funcionales ya no se encuentran presentes.

Por esta razón todos los experimentos de este trabajo se realizaron con vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) purificadas a partir de intestinos de insectos en instares tempranos de su desarrollo tanto de *S. frugiperda* como de *M. sexta*.

Una vez demostrada la actividad de nuestra cepa de la toxina Cry1Ca hacia las colonias de insectos con las que contamos en el laboratorio, decidimos analizar la unión de la toxina Cry1Ca hacia VMMA de ambos insectos.

7.2 Purificación de las vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) de intestino medio de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*.

Se disectaron larvas de 2° instar de desarrollo de ambos insectos. Posteriormente se purificaron las VMMA's y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry, así como las actividades específicas de aminopeptidasa y fosfatasa alcalina, los cuales son marcadores de microvellosidad apical. En la **Tabla 8** se resumen estos resultados donde observamos los enriquecimientos correspondientes a cada preparación.

Tabla 8. Enriquecimiento de Aminopeptidasa (APN) y Fosfatasa alcalina (ALP) en las diferentes preparaciones de VMMA's.

| | Enriquecimiento APN (VMMA/ Homogenado) | Enriquecimiento ALP (VMMA/ Homogenado) |
|------------------------------|---|---|
| <i>Spodoptera frugiperda</i> | 11.4 | 11.6 |
| <i>Manduca sexta</i> | 5.9 | 1.8 |

La unión de las toxinas Cry a sus receptores intestinales es un determinante importante para la especificidad. Las vesículas de la microvellosidad media apical (VMMA) son la herramienta más utilizada para estudiar la unión y buscar posibles receptores de las toxinas Cry. Estudios pioneros demostraron que la toxina Cry1Ba la cual es activa contra el lepidóptero *P. brassicae* se une específicamente a la VMMA de este insecto pero no a las VMMA preparadas de intestino de rata (Hofmann *et al*, 1988). La mayoría de los receptores de toxinas Cry reportados a la fecha se han encontrado en VMMA de los insectos susceptibles (Piggot y Ellar, 2007).

7.3 Solubilización y activación de la toxina Cry1Ca de Bt

Para la purificación de la toxina se utilizó una cepa Bt 60.5 entomocidus la cual produce únicamente la toxina Cry1Ca silvestre. Esta cepa se creció y se incubó hasta la fase de esporulación en la que se producen los cristales de toxina. Los cristales se solubilizaron en amortiguador de carbonatos a un pH alcalino, esta estrategia se utiliza para simular el ambiente que se presenta en el intestino de insectos lepidópteros y dípteros (Dow, 1986). Una vez que se obtiene la protoxina soluble (130 kDa), la activamos con un tratamiento de

tripsina, el cual sustituye al que es realizado por las proteasas intestinales, dando como resultado la generación del fragmento activo de la toxina (66 kDa).

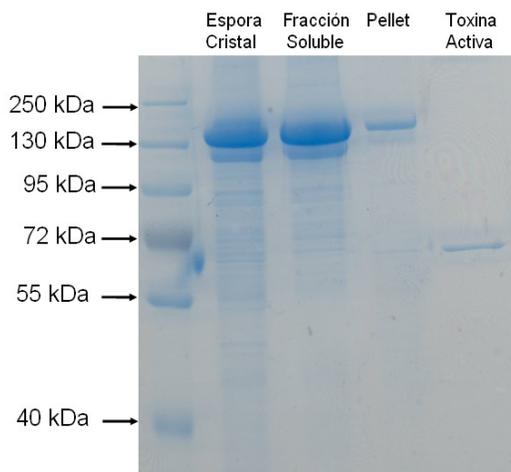


Figura 10. Gel de acrilamida al 10% donde podemos observar a la toxina Cry1Ca y sus diferentes tratamientos.

En la **Figura 10**, observamos que la protoxina y la toxina activa tienen la talla esperada de 130 kDa y 66 kDa respectivamente. Al realizar una revisión de la literatura, observamos que todos los trabajos descritos a la fecha, las protoxinas y toxinas Cry1Ca resueltas en un SDS-PAGE migran alrededor de 130 kDa y 66 kDa (Aranda *et al*, 1996; Ocelot 2011; Xue *et al*, 2005; Kamauchi *et al*, 2003; Agrawal *et al*, 2002), independientemente de la fuente su expresión (*E. coli* o Bt).

Como no apreciamos bandas adicionales en el carril que corresponde a la toxina activada, esta muestra se marcó directamente con biotina sin ningún paso de purificación adicional. Una vez que contamos con una muestra de toxina purificada y con vesículas de la microvellosidad media apical de ambos insectos, el siguiente paso fue el realizar una serie de experimentos donde se analizó la unión entre la toxina Cry1Ca con las VMMA de ambos insectos.

7.4 La unión de la toxina Cry1Ca a VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* es saturable y específica

Para determinar si la interacción de la toxina Cry1Ca con las vesículas es saturable, se realizó un ensayo de unión en solución (Tipo Bosh) (**Figura 11**), de la toxina a las VMMA éste experimento consiste incubar diferentes concentraciones de toxina previamente marcada con biotina, con las VMMA en solución. La biotilación es una importante técnica de laboratorio que sirve para estudiar varios procesos, incluyendo la localización de proteínas, interacción de proteínas, transcripción y replicación del ADN, etc. En nuestro laboratorio se utiliza para el estudio de interacciones proteína-proteína. En este tipo de experimento se espera que en un lapso de tiempo, la toxina interaccione con las proteínas presentes en la VMMA. Al cabo de la incubación las vesículas se centrifugan, se lavan, retirando toda la toxina que no se unió, las proteínas de las vesículas se resuelven en un gel

de acrilamida con la toxina que se unió y se detecta solamente a la toxina mediante un *western blot* de streptavidina – peroxidasa.

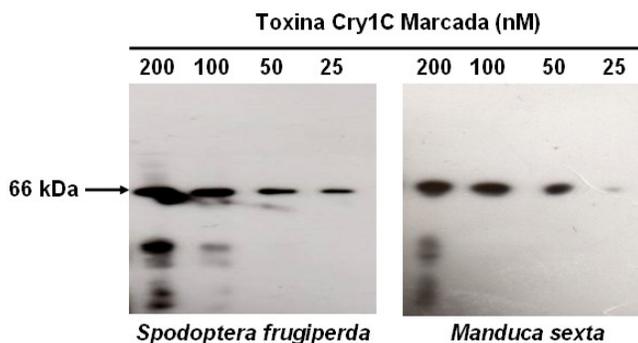


Figura 11. Ensayo de unión en solución con diferentes concentraciones de toxina marcada incubadas con 10 μ g de VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*.

Como se muestra en la **Figura 11** a mayor concentración de toxina la unión con las vesículas aumenta. En ambos insectos se observa un patrón similar de unión, ya que con 25 nM de toxina se empieza a observar la unión y con 200 nM de toxina se satura la unión resultando en la aparición de otras bandas, producto del exceso de toxina. Estos resultados demuestran que la interacción de la toxina Cry1Ca a las VMMA de los lepidópteros *S. frugiperda* y *M. sexta* es saturable. Si la unión no fuera saturable significaría que la unión de la toxina a las VMMA no tendría relevancia en la actividad insecticida de la toxina.

Estos datos correlacionan con todos los reportes publicados a la fecha, en donde la toxina Cry1Ca se une de manera saturable a vesículas de la microvellosidad tanto de *M. sexta* como de *S. frugiperda* (Aranda *et al*, 1996; Abdul-Rauf y Ellar, 1999; Luo *et al*, 1999; Rang *et al*, 2004).

Por otro lado se ha reportado que toxinas que no son activas (Cry1E) o lo son marginalmente (Cry1Ca) contra *H. virescens* presentan nula (Cry1E) o débil unión (Cry1Ca) a vesículas de esta especie; en cambio la toxina Cry1A la cual es tóxica frente a este insecto, presenta una fuerte unión a sus vesículas (Van rie *et al*, 1990). Por otro lado, la toxina Cry1A no es tóxica para *S. littoralis* no presenta una unión saturable a las VMMA de este insecto (Van rie *et al*, 1990), esto nos sugiere, la existencia de una fuerte correlación entre la actividad de una toxina con la unión que presenta a vesículas del insecto blanco, es decir, entre más actividad posea una toxina, mayor será su unión a las VMMA.

En ese sentido, nuestros resultados de bioensayos señalan que la toxina Cry1Ca es 169 veces más activa para *M. sexta* que para *S. frugiperda* (**Tabla 7**), por lo tanto esperaríamos más unión de la toxina Cry1Ca a *M. sexta* que para *S. frugiperda*. Sin embargo, en nuestro laboratorio el sistema que usamos solo nos permite determinar la unión de forma cualitativa ya que esta basado en la esterificación de lisinas con biotina, y no se controla el número de moléculas de biotina que se enlazan a la toxina, impidiendo realizar cálculos estequiométricos que permitan calcular las constantes de afinidad. Por esta razón con este sistema no es posible comparar fehacientemente la unión de la toxina a ambos insectos.

Para poder comparar la unión de la toxina Cry1Ca a las vesículas de ambos insectos, se requiere un sistema que determine la unión de manera cuantitativa, por ejemplo el marcaje de toxina con isótopos radioactivos. Con este tipo de herramientas, en la literatura existe un consenso en que la toxina Cry1Ca se une en mayor grado a vesículas de *M. sexta* que a *S. frugiperda* (Aranda *et al*, 1996; Abdul-Rauf y Ellar, 1999; Luo *et al*, 1999; Rang *et al*, 2004) sugiriendo que las diferencias en unión que existen entre la toxina Cry1Ca a vesículas de ambos insectos sea la razón que explique la diferencia que exista en su actividad tóxica.

A continuación analizamos si la unión de la toxina es específica ya que hay muchos ejemplos donde la unión no correlaciona con toxicidad, por ejemplo Aranda y colaboradores (Aranda *et al*, 1996) demostraron que la toxina Cry1Ab se une a vesículas de *S. frugiperda* a pesar de que esta toxina no es activa contra este insecto (**Tabla 6**) concluyendo que esta unión es inespecífica.

Para validar que la unión es específica se realizaron competencias homólogas (**Figura 12**), en las cuales se incubaba la toxina marcada con excesos de la misma toxina sin marcar. Cuando la unión es específica la toxina posee determinados sitios de unión en las VMMA, y por lo tanto al añadir un exceso de toxina sin marca de biotina esta ocupa todos los sitios de unión impidiendo que la toxina marcada se una, por esta razón la unión a VMMA disminuye. Por otro lado, cuando la unión es inespecífica la toxina posee demasiados sitios de unión en VMMA al grado que a pesar de que se añaden excesos de toxina sin marca de biotina, la toxina marcada tiene probabilidad de unirse y por esta razón la unión no disminuye.

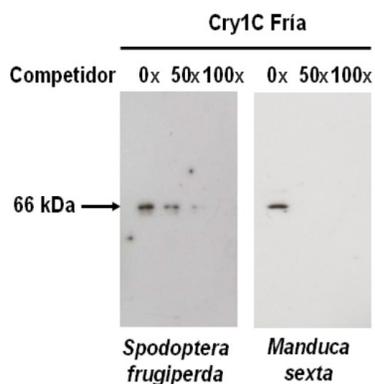


Figura 12. Competencia homóloga de la toxina Cry1Ca con VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*. Se incubó 10 µg de VMMA con 10 nm de toxina marcada y se añadieron excesos molares de toxina sin marcar.

Como se aprecia en la **Figura 12** en *M. sexta* desde 50 veces más de competidor la unión de la toxina marcada se abate por completo, a diferencia de *S. frugiperda* donde la competencia es más gradual; sin embargo en ambos insectos, a mayor cantidad de competidor la señal de la toxina marcada va desapareciendo; esto demuestra que la unión de la toxina Cry1Ca a VMMA de *S. frugiperda* y *M. sexta* es específica, correlacionando con la toxicidad de esta proteína hacia estos lepidópteros.

Todos los trabajos reportados a la fecha concuerdan en que la toxina Cry1Ca se compite por ella misma tanto en vesículas de *M. sexta* como de *S. frugiperda* (Aranda *et al*, 1996;

Abdul-Rauf y Ellar, 1999; Luo *et al*, 1999; Rang *et al*, 2004), lo cual coincide con nuestros resultados. De esta manera se demostró que la unión de la toxina Cry1Ca a VMMA de *S. frugiperda* y *M. sexta* es saturable y específica.

7.5 La toxina Cry1Ca se une de manera inespecífica a VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* provenientes de instares tardíos.

Debido a que la actividad insecticida de la toxina Cry1Ca disminuye a medida que la larva va desarrollándose (**Tabla 6**), nos preguntamos si la unión de la toxina Cry1Ca cambia con vesículas provenientes de 5° estadio larvario. Uno esperaría que como la toxina Cry1Ca posee menor actividad hacia larvas de 5° instar, la unión a vesículas de este instar sería menor para ambos insectos. Sin embargo, como se discutió anteriormente nuestro sistema de marcado no nos permite evaluar la unión de forma cuantitativa, por lo que no podemos comparar si la unión de la toxina Cry1Ca disminuye con vesículas de 5° instar.

Una forma de averiguar si existen cambios en la unión de la toxina Cry1Ca a vesículas de instares tardíos, es mediante una competencia homóloga, esto con el objeto de evaluar si la toxina compite por los mismos sitios de unión, de la misma forma con vesículas de 5° que de 2° instar.

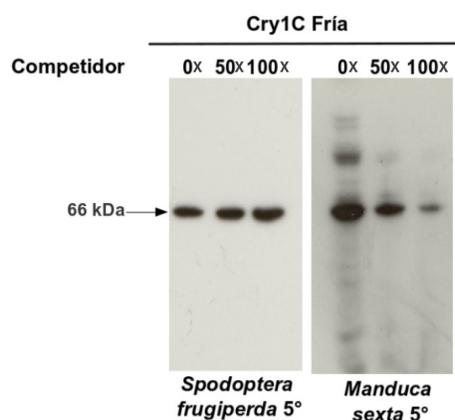


Figura 13. Competencia homóloga de la toxina Cry1Ca con VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* provenientes de 5° estadio larvario. Se incubo 10 µg de VMMA de 5° instar con 10 nm de toxina marcada y se añadieron excesos molares de toxina sin marcar.

Como podemos apreciar en la **Figura 13**, para *S. frugiperda* la unión de la toxina marcada se mantiene a pesar de que se añaden excesos de competidor (toxina no marcada), esto nos indica que la unión de la toxina Cry1Ca a vesículas de 5° instar no es específica, lo cual contrasta con la unión de la misma toxina, en vesículas de 2° instar (**Figura 12**) donde la unión si se compite. En cambio para *M. sexta* la unión de la toxina disminuye a medida que se añaden excesos de competidor, lo cual nos indica que la unión si es específica, sin embargo, la especificidad de la unión es menor, pues en la **Figura 12** apreciamos que en vesículas de 2° instar con 50 veces más de competidor la unión desaparece por completo, en cambio en 5° instar a pesar de que se añaden 100 veces más de competidor se sigue observando la unión.

Una posible explicación para entender porque la especificidad de la unión de la toxina Cry1Ca en vesículas de 5° instar de *S. frugiperda* se ve más afectada que en *M. sexta*, es la actividad insecticida. Pues como apreciamos en la **Tabla 6**, para *M. sexta* la actividad

insecticida disminuye 6.25 veces de 1° a 3° instar de desarrollo, en cambio para *S. frugiperda* disminuye 33 veces. Con base en estas diferencias, nosotros esperaríamos que la unión de la toxina Cry1Ca no disminuyera severamente en *M. sexta* con vesículas de 2° y 5° instar, en cambio para *S. frugiperda* esperaríamos una diferencia mayor en la unión de la toxina a lo largo del desarrollo larvario.

Estos resultados nos sugieren que a medida que las larvas se desarrollan, los sitios de interacción con la toxina Cry1Ca cambian, lo que puede afectar la especificidad de la interacción, y puede ser una de las causas por la cual la toxina ya no es activa para larvas en estadios de desarrollo avanzados (**Tabla 7**), por esta razón concluimos que vesículas derivadas de 5° estadio larvario de ambos insectos no son un buen modelo para la búsqueda de receptores a las toxinas Cry.

7.6 La toxina Cry1Ca no compite por los mismos sitios de unión que la toxina Cry1Ab en VMMA de *Manduca sexta*.

Nuestra hipótesis señala que la toxina Cry1Ca no posee los mismos receptores que las toxinas Cry1A. Para corroborar que la toxina Cry1Ca no compite por los mismo sitios de interacción que las toxinas Cry1A, se realizó una competencia heteróloga, donde la toxina Cry1Ca se marcó con biotina, se incubó con vesículas de *M. sexta* de 2° instar y se le añadieron excesos de toxina Cry1Ab no marcada, se centrifugaron las vesículas, se corrieron en un gel de acrilamida, se transfirieron y se detectó a la toxina marcada (Cry1Ca) con un *western blot* de streptavidina - peroxidasa.

Este experimento solo se realizó en vesículas de *M. sexta*, debido a que este insecto es susceptible a ambas toxinas, en cambio *S. frugiperda* solo es susceptible a la toxina Cry1Ca.

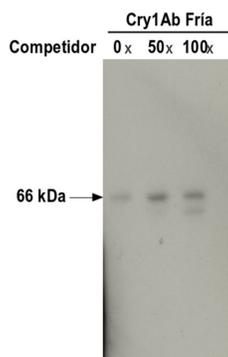


Figura 14. Competencia heteróloga entre la toxina Cry1Ca y la toxina Cry1Ab en vesículas de *Manduca sexta*. Se incubó 10 µg de VMMA con 10 nm de toxina Cry1Ca marcada y se añadieron excesos molares de toxina Cry1Ab sin marcar.

Como se aprecia en la **Figura 14**, la toxina Cry1Ca es capaz de unirse a vesículas de *M. sexta* a pesar de que se añadan excesos de competidor (toxina Cry1Ab), esto nos indica que las toxinas poseen sitios de interacción distintos. De hecho si se observa con atención, se aprecia como a medida que se añade más competidor, la toxina Cry1Ca se une en mayor grado a las vesículas, esto puede deberse a que se ha visto que la toxina Cry1Aa sinergiza con la toxina Cry1Ca.

Xue y colaboradores, demostraron que cuando se agregan cantidades equimolares de ambas toxinas a larvas de *S. exigua* y *H. armigera* la actividad insecticida aumenta 4 y 2.7 veces respectivamente a comparación si solo se agrega una u otra toxina, esta mayor actividad tóxica puede deberse a que la presencia de ambas toxinas mejora su unión a las vesículas y de ahí que presenten mayor actividad en pareja, que individualmente.

Este experimento corrobora la hipótesis, de la toxina Cry1Ca posee sitios de interacción distintos a los de la toxinas Cry1A, sin embargo, con este tipo de experimentos sólo se analiza la unión de manera general es decir no se puede saber cual o cuales de todas las proteínas presentes en las VMMA son las responsables de la interacción con la toxina.

7.7 Proteínas de unión a la toxina Cry1Ca presentes en las VMMA's de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*

Para conocer las proteínas de las VMMA que interaccionan con la toxina Cry1Ca se realizó un experimento de ensayo de unión de ligando (*ligand blot*) con vesículas de ambos insectos **Figura 15**. Esta técnica consiste en separar las proteínas de las VMMA en un gel de acrilamida, posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Una vez que las proteínas se encuentran en la membrana, se incuban con la toxina marcada, para después revelar y observar con que proteínas de las VMMA interacciona la toxina. Con esta técnica se han identificado varias proteínas de diversos insectos que interaccionan con diferentes toxinas Cry.

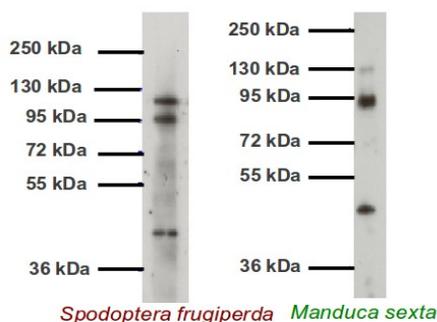


Figura 15. Ensayo de unión a ligando de los insectos *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* con la toxina Cry1Ca. Se separaron 10 µg de VMMA en un SDS-PAGE al 10%, posteriormente se transfirió a una membrana ECL, la cual se incubo con 10 nm de toxina marcada y se revelo con streptavidina-peroxidasa.

Como se aprecia en la **Figura 15** para *S. frugiperda* se observan tres proteínas con pesos moleculares de 44, 104 y 120 kDa aproximadamente. En el caso de *M. sexta* podemos apreciar tres proteínas en rangos muy similares a los que encontramos en *S. frugiperda*, con pesos moleculares de 44, 95 y 106 kDa aproximadamente.

Para *M. sexta* se han reportado distintos receptores para las toxinas Cry1A como son aminopeptidasas, fosfatasa alcalina y caderina (Vadlamudi *et al*, 1993; Knight *et al*, 1994; Arenas *et al*, 2010). En el caso de la aminopeptidasa se ha demostrado que interacciona con la toxina Cry1Ac pero no con la toxina Cry1Ca, sin embargo, también se ha reportado la existencia de otra aminopeptidasa que si une a la Cry1C pero no a la Cry1Ac (**Figura 8**). Muy probablemente una proteína que observamos en el *ligand blot* sea la aminopeptidasa

de 106 kDa ya reportada para este insecto que interacciona con la toxina Cry1Ca (Luo *et al*, 1996), mientras que las demás proteínas pudieran resultar novedosas.

Para *S. frugiperda* suponemos que las proteínas de 104 kDa y 120 kDa son aminopeptidasas, debido al peso molecular que presentan estas proteínas y a los antecedentes que se reportan en la literatura. En ese sentido, se ha encontrado la presencia de aminopeptidasas que interaccionan con la toxina Cry1Ca en especies del género Spodoptera como son: *S. litura* (104 kDa) y *S. exigua* (109 kDa) en ambos insectos se ha demostrado un papel importante en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ca (Agrawal *et al*, 2002; Herrero *et al*, 2005). Para el caso de *S. litura* al silenciar la aminopeptidasa que une a la Cry1Ca mediante RNA de interferencia se adquiere un fenotipo de resistencia a la toxina Cry1Ca (Rajagopal *et al*, 2002) demostrando el papel como receptor de esta proteína. En el caso de *S. exigua* se han detectado en la naturaleza colonias resistentes de este insecto a la toxina Cry1Ca y se ha demostrado que esta resistencia se debe a la pérdida de expresión de una de cuatro aminopeptidasas que posee este insecto (Herrero *et al*, 2005) sugiriendo la participación de esta proteína en el mecanismo de acción de esta toxina. Debido a estos antecedentes y a la cercanía filogenética que presentan *S. litura* y *S. exigua* con *S. frugiperda*, nuestros resultados nos sugieren que las proteínas que interaccionan con la toxina Cry1Ca son aminopeptidasas.

Respecto a la proteína de 44 kDa, se observa en ambos insectos, sugiriendo que sea una proteína conservada entre los lepidópteros y con gran capacidad de interaccionar con las toxinas Cry. A la fecha, no se conoce ningún receptor funcional para las toxinas Cry en este peso. Sin embargo, Aranda y colaboradores había reportado en la literatura, la interacción de la toxina Cry1Ca con una proteína de 44 kDa en VMMA de *S. frugiperda*, aunque aún no se ha identificado (Aranda *et al*, 1996).

7.8 Proteínas de unión a la toxina Cry1Ca presentes en las VMMA's de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* resueltas en geles de dos dimensiones (2D)

Se ha reportado para la mayoría de los insectos lepidópteros plaga, poseen múltiples isoformas de receptores a las toxinas Cry. Sin embargo, aún no se tiene la certeza de haber encontrado todas las isoformas para la mayoría de estos, debido a que no se cuenta con el genoma secuenciado. A la fecha, del único insecto que se conocen todas sus isoformas es *B. mori*, pues su genoma se describió desde el 2004 (Mita *et al*, 2004). En el se ha visto la presencia de cuatro APN, las cuales en estudios posteriores demostraron la capacidad de interaccionar con alguna toxina Cry (Piggot y Ellar, 2007).

Para poder analizar múltiples isoformas de las proteínas con capacidad de interaccionar con las toxinas Cry, se han utilizado estrategias proteómicas como la electroforesis en dos dimensiones (2D). Esta técnica permite separar isoformas que tengan el mismo peso molecular, cuestión que no es posible realizar en la electroforesis de una dimensión.

La electroforesis 2D, consiste en separar las proteínas en función de su punto isoeléctrico, en lo que se conoce como 1° dimensión y posteriormente separarlas en función de su peso molecular, nombrada la 2° dimensión. Cabe destacar que la segunda dimensión se separa en dirección 90° respecto a la primera. Con este tipo de estrategia se analiza el proteoma, ya que permite separar todas las proteínas presentes en una muestra determinada.

En la literatura se han reportado diferentes análisis proteómicos que han servido en el estudio de proteínas intestinales de lepidópteros y su relación con la toxinas Cry de Bt. Candas y colaboradores usaron electroforesis 2D para comparar las diferencias entre líneas resistentes y susceptibles de *P. interpunctella* a una cepa de Bt y encontraron cambios en diferentes proteínas involucradas en el metabolismo oxidativo, en la actividad de quimotripsina, y en la ATPasa mitocondrial. Los autores concluyeron que la resistencia a Bt al menos en este insecto es multifacética (Candas *et al*, 2003). De igual forma Jurat Fuentes y colaboradores (Jurat-Fuentes *et al*, 2003) usaron electroforesis 2D para comparar líneas resistentes y sensibles de *H. virescens* a la toxina Cry1Ac. Los autores encontraron que la resistencia se encuentra asociada a una pérdida de expresión de una ALP, demostrando el papel de esta proteína en el mecanismo de acción de la toxina.

Con la finalidad de estudiar posibles isoformas de las proteínas de unión a la toxina Cry1Ca se realizaron geles de dos dimensiones (2D), En ellos se separaron las proteínas de VMMA de *M. sexta* y *S. frugiperda*, ambas de 2° instar, posteriormente se electrotransfirieron a una membrana PVDF, donde se realizó un *ligand blot* con la toxina Cry1Ca marcada con biotina, para observar los *spots* que interaccionan con la toxina.

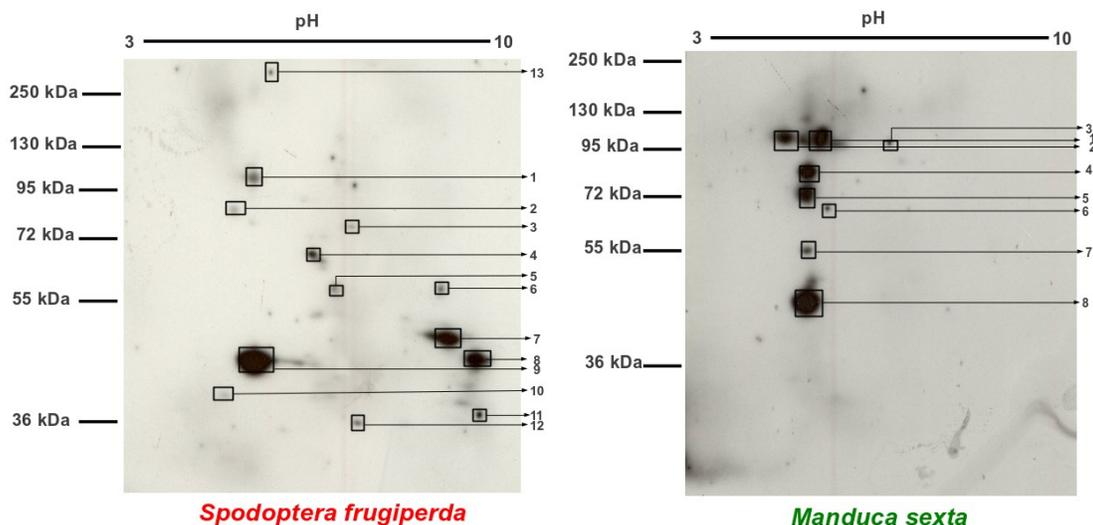


Figura 16. Ensayo de unión a ligando usando la toxina Cry1Ca sobre proteínas de VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* de 2° instar, se separaron 70 µg de VMMA en electroforesis 2D, usando tiras de 7 cm pH 3-10 no lineal Immobiline DryStrip (GE Healthcare) para la primera dimensión y 10% gel – SDS para la segunda dimensión. El gel se transfirió a una membrana PVDF y se incubó con 10 nm de toxina marcada. Se muestra marcador molecular a la izquierda de cada gel y rango de pH de enfoque isoeléctrico en la parte superior del gel.

En la **Figura 16** se muestran las proteínas presentes en las VMMA de *S. frugiperda* y *M. sexta* resueltas en geles 2D que interaccionan con la toxina Cry1Ca. En *S. frugiperda* observamos 13 proteínas que interaccionan con la toxina Cry1Ca, con pesos de: 36, 38, 40, 44, 49, 57, 58, 65, 76, 85, 104 y >250 kDa aproximadamente. Mientras, para *M. sexta* se observan 8 proteínas que interaccionan con la toxina Cry1Ca con pesos de: 44, 54, 65, 72, 83, 95, y 106 kDa aproximadamente. Cabe destacar que los *spots* que se señalan son aquellos que correlacionan con geles replica teñidos con plata (**Figura 18**).

Al comparar los *ligand blot* realizados sobre geles de 1D contra 2D, observamos que, cuando el experimento se realiza sobre geles de 2D, se resuelven un número mayor de proteínas que interaccionan con la toxina Cry1Ca, que en geles 1D (**Figura 15**), esto sucede para ambos insectos. Sin embargo, en el *ligand blot* 2D notamos las mismas proteínas que encontramos en el *ligand blot* 1D, es decir se sigue observando una proteína de 44 kDa y las proteínas en el rango de 90 kDa a 120 kDa aproximadamente, las cuales, como se discutió anteriormente, suponemos que son aminopeptidasas.

7.8.1 La toxina Cry1Ca interacciona con actina en VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*

De acuerdo con nuestros resultados, existe una proteína de 44 kDa presente en VMMA de *S. frugiperda* (*Spot* 9, **Figura 16**) y de *M. sexta* (*Spot* 8, **Figura 16**) con la capacidad de interaccionar con la toxina Cry1Ca. Al Realizar una revisión bibliográfica, encontramos que al menos para *M. sexta* la identidad de esta proteína se ha determinado como actina (Bonfanti *et al*, 1992). El primer reporte donde se comprobó fue en estudios del citoesqueleto de *M. sexta* usando electroforesis de dos dimensiones, los autores reportaron un *spot* de 43 kDa con un punto isoeléctrico aproximado de 5.7 el cual fue inmunoreactivo con un anticuerpo de actina (Bonfanti *et al*, 1992).

Posteriormente se identificó a esta proteína como actina a través de la huella peptídica (PMF “peptide mass fingerprint”) en VMMA de *M. sexta*, *H. virescens* y *H. armigera* resueltas en geles de dos dimensiones, los autores secuenciaron el *spot* por su capacidad de interaccionar con la toxina Cry1Ac (McNall y Adang, 2003; Krishnamoorthy *et al*, 2007; Chen *et al*, 2010). Debido a que la actina es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución, y a que se ha encontrado en otros insectos lepidópteros, es razonable pensar que la proteína de 44 kDa presente en VMMA de *S. frugiperda* también sea actina.

La actina es una proteína esencial y abundante del citoesqueleto con numerosas funciones. Debido a la importancia de esta proteína, el contenido proteico de la actina en una célula es elevado. Su función primordial es la formación de microfilamentos en la célula, este es un procesos dinámico que proporciona andamiaje a la célula, esto le ofrece la posibilidad de re-modelarse rápidamente en respuesta a su entorno o a señales del ambiente. Sobre este andamiaje se puede dirigir la deformación de la membrana celular externa que permite la ingestión celular o la citocinesis.

Puesto que la actina se encuentra formando parte del citoesqueleto, es poco probable que esta proteína pueda funcionar como un posible receptor para las toxinas Cry. Debido a la localización de la actina en la célula, el contacto entre las toxinas Cry y la actina debe ocurrir después de que la toxina penetre la barrera epitelial del intestino. Esto se contrapone con el modelo del mecanismo de acción de las toxinas Cry, donde las toxinas no son capaces de entrar en el citoplasma celular, sino solo insertarse en la membrana plasmática donde forman poros (**Figura 6**), sin embargo la interacción puede darse cuando la toxina se inserta dentro de la membrana o una vez que la integridad de la célula se encuentra comprometida debido al proceso lítico (McNall y Adang, 2003).

Si bien, es difícil pensar que la actina juegue un papel en el mecanismo de acción de las toxinas Cry como receptor, es razonable pensar que el desequilibrio de la subestructura del

citoesqueleto en la microvellosidad es parte del proceso de intoxicación de las toxinas Cry y por lo tanto juegue un papel importante en la defensa de la célula ante el ataque de la toxina, más no es probable que intervenga como un receptor en inicial de la intoxicación.

7.8.2 La toxina Cry1Ca interacciona con APN en *Manduca sexta*

Por otro lado, apreciamos en el *ligand blot* 2D que para *S. frugiperda* solo se observa una proteína de 104 kDa (*Spot* 1, **Figura 16**) que interacciona con la toxina Cry1Ca, esto coincide con el *ligand blot* 1D (**Figura 15**) pues también se observa una proteína en el mismo peso molecular. Sin embargo, al parecer en el *ligand blot* 2D se pierde la interacción con una proteína de 120 kDa que observamos en el *ligand blot* 1D (**Figura 15**), esta pérdida se puede deber a que en la realización de la electroforesis 2D, las proteínas pueden perder azúcares, grupos fosfatos, que pueden ser epítopes importantes para la interacción. (Piggot y Ellar, 2007).

Para *M. sexta* el *ligand blot* 2D en la talla de 106 kDa se observan al menos 3 proteínas distintas que interaccionan con la toxina Cry1Ca (*Spots* 1, 2, 3, **Figura 16**), esto nos indica que la interacción que observamos en el *ligand blot* 1D en esta talla es resultado de tres proteínas distintas con la toxina Cry1Ca. Como se discutió anteriormente, debido al peso molecular que presentan estas proteínas suponemos que para ambos insectos, la identidad de estas proteínas sean APN. Para corroborar que estas proteínas son APN, se realizó un *western blot* anti APN sobre VMMA de *M. sexta* y *S. frugiperda* separadas en geles 2D.

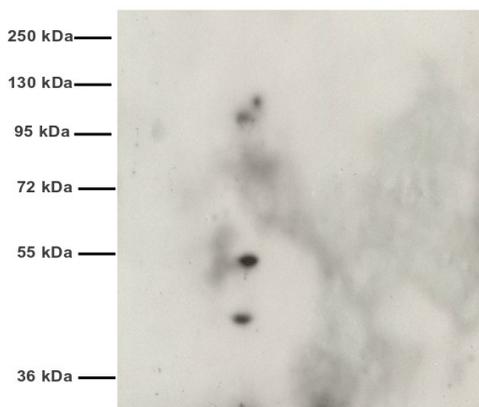


Figura 17. *Western blot* Anti – APN sobre VMMA de *Manduca sexta* resueltas en geles 2D. se separaron 70 μ g de VMMA en electroforesis 2D, usando tiras de 7 cm pH 3-10 no linear Immobiline DryStrip (GE Healthcare) para la primera dimensión y 10% gel – SDS para la segunda dimensión. Se muestra marcador molecular a la izquierda de cada gel y rango de pH de enfoque isoeléctrico en la parte superior del gel.

Como podemos observar en la **Figura 17**, el anticuerpo anti – APN reconoce dos proteínas: con pesos de 106 kDa y 115 kDa aproximadamente. El anticuerpo utilizado, es de naturaleza policlonal y fue obtenido a partir de inmunizar conejos con APN de 115 kDa clase 1 que interacciona con las toxinas Cry1A.

Este experimento nos confirma que al menos para *M. sexta* parece que la identidad de la proteína de 106 kDa que interacciona con la toxina Cry1Ca es APN. Este mismo experimento se intentó realizar sobre VMMA de *S. frugiperda*, sin embargo el anticuerpo

no reconoció ninguna proteína, indicando que los sitios de reconocimiento son distintos para ambos insectos. Sin embargo, debido a que se han detectado receptores putativos de tipo aminopeptidasa para la toxina Cry1Ca en VMMA de, *S. litura* y *M. sexta*, no puede descartarse que la proteína de 104 kDa de *S. frugiperda* que interacciona con la toxina Cry1Ca sea aminopeptidasa.

La participación de APN en unión con la toxina Cry1Ca fue observada por primera vez en *M. sexta*, donde Cry1Ca y Cry1Ac reconocen APN funcionalmente relacionadas, pero estructuralmente distintas de 106 kDa y 115 kDa respectivamente. A la fecha, el gen que codifica para la APN de 106 kDa en *M. sexta* no se ha identificado (Luo *et al*, 1996). Posteriormente se ha reportado, el papel de la APN clase 4 como receptor específico de la toxina Cry1Ca, usando silenciamiento *in vivo*, por RNA de interferencia. Una inyección de dsRNA en larvas de 5° instar, reduce la expresión endógena de la APN y decrementa la sensibilidad de las larvas a la toxina Cry1Ca (Rajagopal *et al*, 2002). También se ha reportado, que cuando se transfecta con siRNA a células SF21 que expresan la APN de *S. litura*, se observa una pérdida en la unión de la toxina Cry1Ca, esto se estudió por *ligand blot* e inmunoprecipitación. Esto confirma el papel de la APN de *S. litura* como receptor de la toxina Cry1Ca (Agrawal *et al*, 2002).

Desde que se reportó que las toxinas Cry interaccionan con APN (Knight *et al*, 1994), se han aislado y caracterizado diferentes isoformas de APN. Las APN de lepidópteros, conocidas a la fecha se han agrupado en cinco diferentes clases en función de sus relaciones filogenéticas (Piggot y Ellar, 2007). El promedio en identidad de secuencia dentro de una clase varía de 56% a 67%. Entre las diferentes clases, la clase 2 es la que presenta mayores diferencias, con un promedio de identidad de secuencia del 25% de parecido con las otras clases. La clase 1 y la clase 3 son las más similares con un promedio de identidad de secuencia del 38%. A la fecha, todas las APN reportadas dentro de una especie se pueden agrupar dentro de las cinco clases de APN, de hecho algunas APN muestran gran similitud con aquellas que se encuentran en otros organismos, por ejemplo, la APN clase 2 de *M. sexta* es más parecida a las APN de pollo o de rana que a la APN clase 1 del mismo insecto, y aún con esas diferencias ambas APN de *M. sexta* tienen la capacidad de interaccionar con la toxina Cry1Ab.

7.8.3 Posibles receptores novedosos para la toxina Cry1Ca presentes en VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta*

El *ligand blot*, es una estrategia poderosa en la búsqueda de receptores a las toxinas Cry, ya que como se observa en la **Figura 16**, existen más proteínas presentes en ambos insectos que interaccionan con la toxina Cry1Ca. Por esta razón proponemos secuenciar mediante espectrometría de masas, los *spots* de *S. frugiperda* y *M. sexta*, que interaccionen con la toxina Cry1Ca, de esta forma elucidar la identidad de estas proteínas y su posible papel en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ca.

Para corroborar que los *spots* que interaccionan con la toxina Cry1Ca se encuentran presentes en el proteoma de la microvellosidad de ambos insectos se separaron las proteínas presentes en las VMMA de ambos insectos, mediante electroforesis 2D y se tiñeron los geles con plata.

En la **Figura 18** apreciamos el proteoma intestinal de *S. frugiperda* y de *M. sexta*, podemos observar que para ambos insectos el mayor número de proteínas poseen un peso molecular por debajo de 100 kDa y un punto isoeléctrico menor a 7. Para *S. frugiperda* se observan 300 proteínas aproximadamente, mientras que para *M. sexta* se observan 200 proteínas individuales aproximadamente.

Para ambos insectos, se marcaron la posición de los *spots* que interaccionan con la toxina Cry1Ca, en función de su peso molecular y su punto isoeléctrico, los cuales proponemos secuenciar mediante espectrometría de masas con la finalidad de identificar otros posibles receptores putativos para la toxina Cry1Ca.

En la literatura se han reportado una gran diversidad de receptores putativos, en diferentes insectos, para las toxinas Cry, específicamente la toxina Cry1Ac, utilizando el *ligand blot* en 2D, como son: Subunidad β y α de la ATP sintasa vacuolar (V-ATPasa), actina, proteína de estrés al calor (HSCP), proteína tipo desmocolina, aminopeptidasa y fosfatasa alcalina (McNall y Adang, 2003; Krishnamoorthy *et al*, 2007; Chen *et al*, 2010). Aunque solo se ha demostrado la funcionalidad como receptor para APN y ALP, otras proteínas pueden participar en el mecanismo de acción de las toxinas Cry pero faltan estudios para dilucidar su papel en el mecanismo de acción.

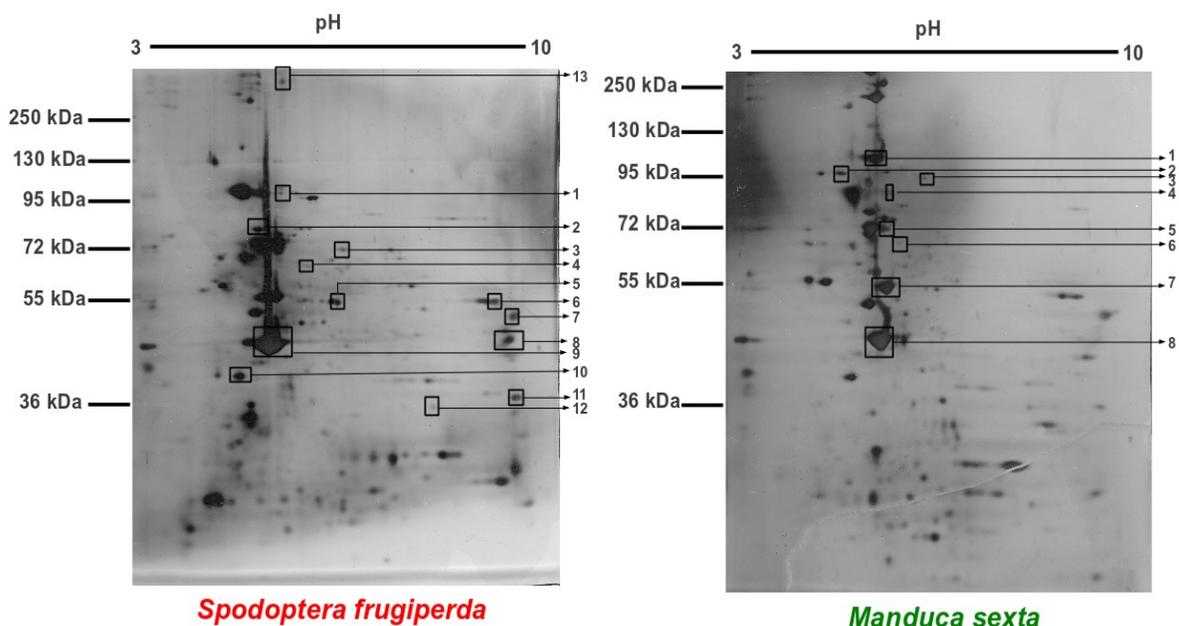


Figura 18. Gel teñido con plata de proteínas de VMMA de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* de 2^o instar, se separaron 40 μ g de VMMA en electroforesis 2D, usando tiras de 7 cm pH 3-10 no lineal Immobiline DryStrip (GE Healthcare) para la primera dimensión y 10% gel – SDS para la segunda dimensión. Se muestra marcador molecular a la izquierda de cada gel y rango de pH de enfoque isoeléctrico en la parte superior del gel.

Debido a que en el *ligand blot* ya sea 1D o 2D, las proteínas se encuentran desnaturalizadas, muchas interacciones puede que no sucedan *in vivo* pues se exponen epítopes que naturalmente no se encuentran presentes. Por esta razón, faltarían realizar competencias homólogas en *ligand blot* para determinar que las bandas y *spots* que

apreciamos son dadas por una unión específica y no sean producto de la unión inespecífica producida al desnaturalizar las proteínas.

Por otro lado, para estudiar las interacciones que se asemejan a las que se dan *in vivo* es necesario utilizar otras estrategias que permitan analizar la unión en un estado conformacional nativo, como por ejemplo la inmunoprecipitación.

7.9 Proteínas presentes en las VMMA's de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* que interaccionan en estado nativo con la toxina Cry1Ca

La inmunoprecipitación es una técnica donde las proteínas se encuentran en su estado nativo y las interacciones que se generan pueden ser de mayor relevancia biológica. Realizamos la inmunoprecipitación con vesículas de 2° instar de *S. frugiperda* y *M. sexta* (Figura 19). En este tipo de experimento se incubaron a las VMMA con la toxina Cry1Ca en solución. Posteriormente el complejo toxina - vesículas se incubó con un anticuerpo anti-Cry1Ca, el cual previamente se asocia con proteína A unida a agarosa, esto forma un complejo de alto peso molecular que mediante centrifugación es posible separar, por último el inmunoprecipitado se separa en un gel de acrilamida. De esta manera, se purifican las proteínas que interaccionaron con la toxina. Una característica importante de este experimento es que las interacciones que se detectan son con el plegamiento nativo de las proteínas, el cual se asemeja al que se realiza *in vivo* en el intestino del insecto.

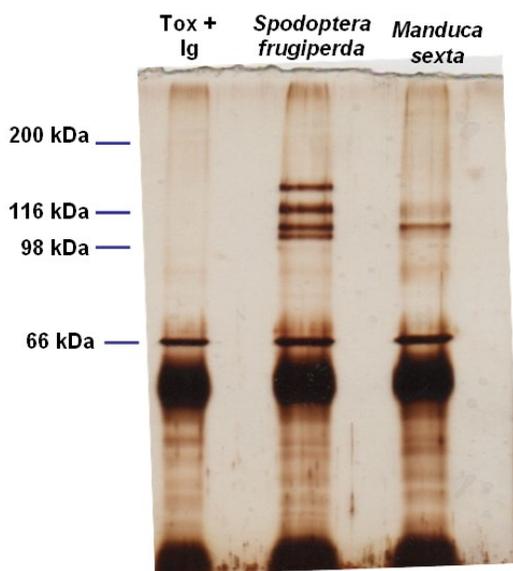


Figura 19. Inmunoprecipitación utilizando anticuerpo anti-Cry1Ca. Se incubó 50 μ l de perlas de agarosa con 0.1 μ g de anticuerpo, posteriormente se agregaron 10 μ g de toxina pura, para finalmente agregar 50 μ g de VMMA de 2° instar previamente solubilizadas.

Como se puede apreciar en la Figura 19 para *S. frugiperda* se encontraron cuatro proteínas con pesos de 100 a 130 kDa que interaccionan con la toxina Cry1Ca. Mientras que para *M. sexta* se observa claramente una proteína de 106 kDa y otra con menor intensidad de 115 kDa aproximadamente. Se observa, para ambos insectos la toxina Cry1Ca de 66 kDa, así como el anticuerpo anti-Cry1Ca (IgG).

Tabla 10. Resultados del análisis de proteómica. En las columnas superiores de la derecha se muestra las cuatro muestras que se enviaron, en las columnas inferiores de la derecha se muestra el numero de péptidos de cada muestra que poseen un porcentaje de identidad (Código de colores) con las proteínas de la base de datos de *Bombyx mori* que se encuentran en las filas inferiores de la izquierda.

| # | Visible? | Starred? | Bio View: Identified Proteins (28) | Accession Number | Molecular Weight | Protein Grouping Ambiguity | | | | | | | | | |
|----|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|----------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|--------------------------|
| | | | | | | 01-QC for MS2E | 02-MS2E injection 0.14X | 03-QC for SF2E | 04-SF2E injection 0.14X | 05-QC for MS5E | 06-MS5E injection 0.14X | 07-QC for SF5E | 08-SF5E injection 0.14X | 09-QC for MS2E | 10-MS2E injection 0.018X |
| 1 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | calmodulin [Bombyx mori] | gi 11405... | 17 kDa | | 7 | | 1 | | 2 | 1 | 2 | 7 | |
| 2 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | aminopeptidase N precursor [...] | gi 11298... | 107 k... | | 8 | | | | 13 | | 1 | 3 | |
| 3 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | aminopeptidase N precursor [...] | gi 11298... | 112 k... | | 5 | | 3 | | 6 | | 6 | 2 | |
| 4 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | aminopeptidase N-2 [Bombyx...] | gi 38956... | 108 k... | | 3 | | 5 | | 8 | | 7 | 2 | |
| 5 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | aminopeptidase N3 precursor... | gi 16246... | 114 k... | | 6 | | | | 8 | 0 | | 1 | |
| 6 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | TPA: putative cuticle protein [...] | gi 22367... | 160 k... | | 1 | | 3 | | 3 | | 2 | | |
| 7 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | SUMO-1 activating enzyme [B...] | gi 11405... | 38 kDa | 2 | | 2 | | | | 2 | | 1 | |
| 8 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | carboxypeptidase [Bombyx m...] | gi 38071... | 52 kDa | | 4 | | | | 6 | | | | |
| 9 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Fanconi anemia, complementa... | gi 33310... | 153 k... | | 1 | | 0 | | 2 | | 0 | 0 | |
| 10 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | NADPH-specific isocitrate deh... | gi 15130... | 49 kDa | | 1 | | 0 | | 0 | | 0 | 0 | |
| 11 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | polyubiquitin [Bombyx mori] | gi 11298... | 102 k... | | | | 2 | | 2 | | 2 | | |
| 12 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | Actin A3 [Bombyx mori] | gi 17370... | 42 kDa | | | | 0 | | 4 | | | | |
| 13 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | leucyl aminopeptidase-like pr... | gi 16923... | 63 kDa | | 1 | | 0 | | | | 1 | | |
| 14 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | eukaryotic initiation factor 5C... | gi 11627... | 48 kDa | | | | 0 | | 1 | | 0 | | |
| 15 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | tropomyosin-2 isoform 4 [Bo... | gi 15379... | 30 kDa | | 0 | | 2 | | 0 | | 2 | | |
| 16 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | thiol peroxidoredoxin [Bombyx...] | gi 11298... | 22 kDa | | | | 0 | | 1 | | | | |
| 17 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | alkaline phosphatase [Bomby... | gi 25568... | 59 kDa | | 0 | | | | 2 | | | 1 | |
| 18 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | ORF2 [Bombyx mori] | gi 1549144 | 132 k... | | | | 2 | | 1 | | | | |
| 19 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | UDP-glycosyltransferase UGT... | gi 36389... | 55 kDa | | 0 | | | | | | | 1 | |
| 20 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | cocoonase assistant protein [...] | gi 31944... | 13 kDa | | | | 0 | | | | 2 | | |
| 21 | <input checked="" type="checkbox"/> | <input checked="" type="checkbox"/> | MSL1 protein [Bombyx mori] | gi 14788... | 93 kDa | | 0 | | 1 | | | | | | |

Los resultados de este análisis nos indicaron que en ambos insectos las proteínas de talla aproximada de 104 kDa y 106 kDa son aminopeptidasas. Una característica limitante de este metodología es que no se cuentan con los genomas secuenciados de *M. sexta* y *S. frugiperda*, esto nos impide comparar directamente los resultados de las secuencias.

Podemos observar que al comparar las secuencias con una base de datos que se tiene de *M. sexta* se encuentran una gran variedad de péptidos que correlacionan, abarcando gran parte de la proteína, sin embargo cuando estas misma secuencias se cruzan con una base de datos distinta como la de *B. mori* el numero de péptidos que empalman se reduce, es por esta razón que para *S. frugiperda* se encuentran pocos péptidos en ambas bases de datos, sin embargo a pesar de esto los péptidos que si correlacionan lo hacen con un grado de confianza por arriba del 95% lo cual nos indica que la identidad de estas proteínas es aminopeptidasa sin embargo falta determinar la secuencia completa de esta proteína.

En las tablas de proteómica se pueden observar una gran cantidad de proteínas que correlacionan con las secuencias, sin embargo se puede observar como el número de péptidos que empalman es muy pobre, así como el grado de confianza, por esa razón creemos que es poco probable que alguna de esas proteínas tenga un papel en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ca. Probablemente su aparición se deba a que las VMMA son una mezcla compleja de proteínas en donde se ha demostrado que llevan componentes de otros membranas como mitocondrial o golgi, así como contenido citoplasmático.

Es importante destacar que para *S. frugiperda* no se había reportado ninguna proteína de unión a las toxinas Cry. En este trabajo, por primera vez se reporta una proteína de unión a la toxina Cry1Ca que interacciona en estado nativo y desnaturizante.

7.10 La toxina Cry1Ca interacciona con la fosfatasa alcalina de *Manduca sexta* pero no de *Spodoptera frugiperda*

Por ultimo se decidió analizar si la fosfatasa alcalina de *S. frugiperda* y *M. sexta* es una proteína que interacciona con la toxina Cry1Ca, se realizó un gel de actividad de fosfatasa alcalina. Esta técnica nos permite analizar las proteínas que presenten la actividad enzimática de ALP de una mezcla de proteínas.

Este experimento consiste en separar las proteínas de las VMMA de ambos insectos en un gel de acrilamida de manera semi-desnaturalizada, posteriormente el gel se incubó con el sustrato de la ALP y un compuesto colorimétrico, que permite visualizar la posición de la ALP en el gel a través de su actividad enzimática. Este gel se realizó por duplicado, la copia se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a la que se realizó un *ligand blot*, con la intención de observar si la (s) proteínas que presentan actividad de fosfatasa alcalina, interaccionan con la toxina Cry1Ca.

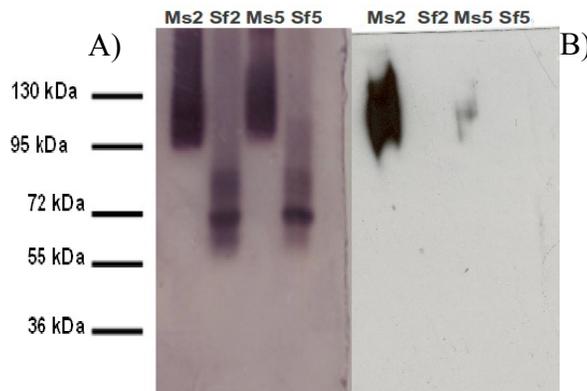


Figura 20. A) Gel de actividad de fosfatasa alcalina y B) *Ligand blot* de una replica del gel. Se separaron 10 µg de VMMA en un SDS-PAGE. A) El gel se remoja en una solución de revelado. B) Se transfiere a una membrana PVDF donde se incubó con 10 nm de toxina y se reveló con streptavidina-peroxidasa.

En la **Figura 20** podemos apreciar que en las VMMA de ambos insectos existen proteínas con actividad de fosfatasa alcalina (ALP). La ALP presentes en *M. sexta* y en *S. frugiperda* difieren en peso molecular. Sin embargo, es importante destacar que el peso molecular no es exacto en este experimento debido a que es un gel semi-desnaturalizante. En el *ligand blot*, encontramos que la ALP de *M. sexta* interacciona con la toxina Cry1Ca. Por el contrario, la ALP de *S. frugiperda* no se une a esta toxina, al menos en estas condiciones.

Por otro lado, observamos que para *M. sexta* no se aprecian cambios significativos en la actividad de las ALP en los instares de desarrollo tempranos (2°) y tardíos (5°), sin embargo, la unión con la toxina Cry1Ca cambia considerablemente en vesículas derivadas de 2° instar a 5° instar, esto nos sugiere que la disminución de la unión no se debe a una pérdida en la expresión, sino a un cambio en las isoformas de ALP, las cuales mantienen una actividad enzimática constante a lo largo del desarrollo larvario, pero las ALP expresadas en instares de desarrollo temprano presentan mayor interacción con la toxina Cry1Ca. En ese sentido Arenas y colaboradores demostraron que la unión de ALP con la toxina Cry1Ab es mayor en los primeros instares de desarrollo y esta unión iba disminuyendo a medida que la larva iba desarrollándose (Arenas *et al*, 2011).

A la fecha no se ha reportado ninguna ALP que interaccione con la toxina Cry1Ca, de hecho todas las ALP reportadas para lepidópteros fueron descritas por su interacción con la toxina Cry1A (**Tabla 2**) (Zuñiga *et al*, 2012). En ese sentido, surge la pregunta si la ALP ya descrita que interacciona con la toxina Cry1Ac es la misma que observamos en este experimento y que interacciona con la Cry1Ca. En nuestro laboratorio se tienen datos que indican que la ALP que interacciona con la toxina Cry1Ac no es capaz de unir con la toxina Cry1Ca, estos experimentos se realizaron por superficie de resonancia de plasmón (SPR) (Datos no publicados). Esto sugiere la existencia de posibles isoformas de ALP en *M. sexta* que pudieran interactuar con distintas toxinas Cry y que a la fecha no han sido descritas.

En el caso de *S. frugiperda* no detectamos unión de ninguna ALP con la toxina Cry1Ca, sin embargo, se tiene evidencia que la ALP de este insecto participa en el mecanismo de acción de la toxinas Cry, ya que se han encontrado colonias resistentes de este insecto a la toxina Cry1Fa, las cuales pierde la expresión de ALP (Jurat –Fuentes *et al*, 2011). Sin embargo, a la fecha no se ha reportado la unión de esta toxina a la ALP. Por otro lado se ha reportado que la toxina Cry1Fa posee los mismos sitios de unión que las toxinas Cry1A (Sena *et al*, 2009) y presentan resistencia cruzada para ambas toxinas (Gong *et al*, 2010). Esto nos hace pensar que los sitios de interacción de la toxina Cry1Fa al igual que las toxina Cry1A son distintos a los de la toxina Cry1Ca. Por lo tanto es posible que la ALP de este insecto no interaccione con la toxina Cry1Ca.

Un aspecto importante es que debido a que las proteínas no se encuentran totalmente desplegadas a su estructura primaria los pesos moleculares no son exactos, por ello, para poder definir el peso molecular de las proteínas con actividad enzimática de fosfatasa alcalina, se cortó la banda del gel de actividad, se eluyeron las proteínas y se volvieron a separar en un gel desnaturizante, el cual se tiñó con plata, esto con el objetivo de observar el peso molecular real de las ALP presentes en *M. sexta* y poder correlacionar los experimentos de *ligand blot* (1D y 2D) e inmunoprecipitación.

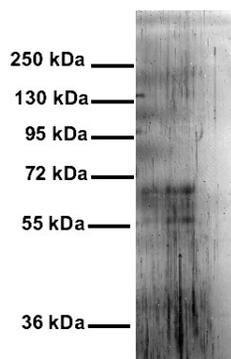


Figura 21. Proteínas eluidas de la banda que presenta actividad enzimática de fosfatasa alcalina de *Manduca sexta*. Se reveló un gel de actividad de fosfatasa alcalina con 100 μ g de VMMA, se cortó la banda y se eluyó, se concentró y se cargó a un gel SDS-PAGE.

Podemos observar en la **Figura 21** dos proteínas con pesos moleculares de 56 kDa y 65 kDa, este es peso molecular real de las proteínas presentes en el gel de actividad (**Figura 20**) y que poseen actividad enzimática de fosfatasa alcalina en *M. sexta*.

En este rango de peso molecular no observamos proteínas en el *ligand blot* 1D ni en la inmunoprecipitación, sin embargo en el *ligand blot* 2D (**Figura 16**), observamos una proteína de 65 kDa que interacciona con la toxina Cry1Ca, posiblemente una nueva ALP.

La ALP reportada en *M. sexta* que interacciona con la toxina Cry1Ac también posee un peso molecular de 65 kDa. Sin embargo, se sabe que las fosfatasa alcalinas presentes en lepidópteros son un grupo de proteínas bastante conservado en peso y secuencia, de hecho para una gran diversidad de insectos las diferentes isoformas de ALP poseen el mismo peso y solo difieren un poco en el punto isoeléctrico, esto nos sugiere que en el rango de 65 kDa existen diferentes isoformas de ALP.

Es posible que en la inmunoprecipitación la banda de 65 kDa no se aprecie debido a que en ese rango de peso molecular se encuentra la toxina y el anticuerpo, para observar si el inmunoprecipitado lleva proteínas con actividad enzimática de ALP, se realizó un gel de actividad con el inmunoprecipitado.

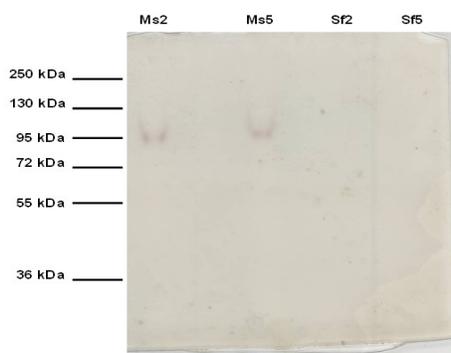


Figura 22. Gel de actividad de fosfatasa alcalina del inmunoprecipitado. Se repitió el mismo experimento de inmunoprecipitación. El inmunoprecipitado se cargó a un SDS-PAGE el cual se remojó en la solución reveladora de actividad de fosfatasa alcalina.

Podemos observar actividad de ALP en el inmunoprecipitado de *M. sexta* pero no en *S. frugiperda*, esto correlaciona con el *ligand blot* del gel de actividad, sugiriendo que la interacción que se da entre la toxina Cry1Ca con la ALP de *M. sexta* también se presenta en condiciones nativas. Sin embargo, los resultados generados por espectrometría de masas no nos indicaron la presencia de ALP. Esto puede deberse a que no hay genoma de *M. sexta* o bien que en la muestra enviada para análisis esta proteína se encuentra pobremente representada. Proponemos mandar a espectrometría de masas muestras más puras de los inmunoprecipitados con el objeto de aumentar la proporción de proteína, esperando un mayor grado de identificación.

En el presente estudio encontramos que las moléculas de unión de la toxina Cry1Ca de *B. thuringiensis* en el intestino de *S. frugiperda* y *M. sexta*, son aminopeptidasas, en el caso de *S. frugiperda* esta es la primera molécula de unión reportada a la fecha.

8. CONCLUSIONES

- Se demostró que la toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* se une de manera saturable y específica a VMMA de 2° instar de desarrollo derivadas de los lepidópteros *Manduca sexta* y *Spodoptera frugiperda*.
- Se encontró evidencia de una nueva isoforma de ALP en *Manduca sexta* que interacciona con la toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*.
- Se identificó una APN en *Spodoptera frugiperda* que interacciona en condiciones nativas y desnaturalizantes con la toxina Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*. Esta APN es el primer receptor para las toxinas Cry reportado para este insecto.
- La toxina Cry1Ca no comparte los sitios de unión con la toxina Cry1Ab.

9. PERSPECTIVAS

1. Determinar la secuencia completa de las moléculas de unión de *Spodoptera frugiperda* y *Manduca sexta* que interaccionan con la toxina Cry1Ca.
2. Demostrar el papel funcional de receptor a las moléculas de unión descritos en este trabajo, a través del uso del silenciamiento.
3. Clonar los receptores descritos, lo que nos permitirá continuar con estudios más detallados la interacción de la toxina Cry1Ca con los receptores.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Rauf, M; Ellar, D. (1999). Toxicity and receptor binding properties of a *Bacillus thuringiensis* CryIC toxin active against both lepidoptera and diptera. *Journal Invertebrate Pathology*. Vol 73(1), p. 52-58.
- Agaisse, H; Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of Bacteriology*. Vol 77 (21), p. 6027–6032
- Agrawal, N; Malhotra, P; Bhatnagar, R. (2002). Interaction of gene-cloned and insect cell-expressed aminopeptidase N of *Spodoptera litura* with insecticidal crystal protein Cry1C. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 68 (9), p. 4583–4592
- Andrews, K. (1988). Latin american research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *The Florida Entomologist*. Vol 71(4), p. 630-53.
- Angelucci, C; Barrett-Wilt, G; Hunt, D; Akhurst, R; East, P; Gordon, K; Campbell, P. (2008). Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: identification of proteins binding the delta-endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 38(7), p. 685-696
- Aranda, E; Sanchez, J; Peferoen, M; Güereca, L; and Bravo, A. (1996). Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 68, p. 203–212.
- Arenas, I; Bravo, A; Soberon, M; Gomez, I. (2010). Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 285, p. 12497-12503.
- Avisar, D; Eilenberg, H; Keller, M; Reznik, N; Segal, M; Sneh, B; Zilberstein, A. (2009). The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as a potential bioinsecticide in plants. *Plant Science*. Vol 176 (3), p. 315–324
- Bagla, P. (2010). Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. *Science*. Vol 327, p. 1439.
- Bastidas, R; Zavala, Y. (1995). *Principios de Entomología Agrícola*. Ediciones Sol de Barro.
- Bayyareddy, K; Andacht, T; Abdullah, M; Adang, M. (2009). Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. Vol 39(4), p. 279-286.
- Bernhard, K; Jarrett, P; Meadows, M; Butt, J; Ellis, D; j; Roberts, G; Pauli, S; Rodgers, O

P; Burges, H. (1997). Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 70, p. 59–68.

Bishop, D. (1994). Biopesticides. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol 5 (3), p. 307-311

Blahutiak A. (1970). Influencia de la temperatura en el desarrollo de *Laphygma frugiperda* (S. and A.) serie Poeyana. Instituto de Biología No.77.

Boonserm, P; Davis, P; Ellar, D; Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal of Molecular Biology*. Vol 348, p. 363-382.

Boonserm, P; Mo, M; Angsuthanasombat, Ch; Lescar, J. (2006). Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Å resolution. *Journal of Bacteriology*. Vol 188, p. 3391-3401

Bravo, A. (1997). Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of Bacteriology*. Vol 179 (9), p. 2793–2801

Bravo, A; Sarabia, S; Lopez, L; Ontiveros, H; Abarca, C; Ortiz, A; Ortiz, M; Lina, L; Villalobos, F; Peña, G; Nuñez-Valdez, M; Soberón, M; Quintero, R. (1998). Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 64(12), p. 4965-4972.

Bravo, A; Miranda, R; Gómez, I; Soberón, M. (2002). Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol 1562 (1-2), p. 63-69.

Bravo, A; Gómez, I; Conde, J; Muñoz-Garay, C; Sánchez, J; Miranda, R; Zhuang, M; Gill, S; Soberón, M. (2004). 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*. Vol 1667(1), p. 38-46.

Bravo, A; Likitvivatanavong, S; Gill, S.S, and Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 41, p. 423-431

Bulla, A; Bechtel, B, Kramer, J; Shethna, I; Aronson, I; Fitz-James, C. (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki. *Biochemistry and Biophysic Research Community*. Vol 9, p. 1123-1130.

Candas, M; Loseva, O; Oppert, B; Kosaraju, P; Bulla, L. (2003). Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the indian- meal moth larval gut proteome. *Molecular Cellular Proteomics*. Vol 2, p. 19–28.

Chandler, D; Bailey, A; Tatchell, M; Davidson, G; Greaves, J; Grant, W. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol 366, p. 1987–1998

Chang, W; Gahan, L; Tabashnik, B; Heckel, D. (1999). A new aminopeptidase from diamondback moth provides evidence for a gene duplication event in Lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 8 (2), p. 171-177

Chen, L; Liang, G; Zhang, J; Wu, K; Guo, Y; Rector, B. (2010). Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. Vol 73 (2), p. 61-73.

Clive, J. (2007). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007, ISAAA Brief No. 37 ISAAA: Ithaca, NY, 2007.

Dechklar, M; Tiewisiri, K; Angsuthanasombat, C; Pootanakit, K. (2011). Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 41(3), p.159-66.

Denolf, P; Hendrickx, K; Van Damme, J; Jansens, S; Peferoen, M; Degheele, D; Van Rie, J. (1997). Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem*. 248:748–761.

Dow, J. (1986). Insect midgut function. *Advance in Insect Physiology*. Vol 17, p. 127-138

Downes, S; Parker, T; Mahon, R. (2010). Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. *PloSOne*. Vol 5: e12567

Emmerling, M; Chandler, D; Sandeman, M. (2001). Molecular cloning of three cDNAs encoding aminopeptidases from the midgut of *Helicoverpa punctigera*, the Australian native budworm. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 31(9), p. 899-907

EPA (Agencia del medio ambiente E.U) www.epa.gov/scipol/sap

Fernandez, L; Aimanova, K; Gill, S; Bravo, A; Soberón, M. (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *The Biochemical Journal*. Vol 15, p. 77-84.

Ferre, J; Real, D; Van Rie, J; Jansens, S; Peferoen, M. (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol 88, p. 5119-5123.

Ferré, J; Van Rie, J. (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Entomology*. Vol 47, p. 501–533.

Gadner, W; Fuxa J; (1980). Pathogens for the suppression of the fall armyworm. *The Florida Entomologist*. Vol 63(4), p. 439-47.

Gahan, L; Gould, F; Heckel, D. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*. Vol 293, p. 857-860

Galitsky, N; Cody, V; Wojtczak, A; Ghosh, D; Luft, J; Pangborn, W; English, L; (2001). Structure of the insecticidal bacterial d-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallography section D, Biological Crystallography*. Vol 57 (8), p. 1101 - 1109.

Garner, K; Hiremath, S; Lehtoma, K; Valaitis, A. (1999). Cloning and complete sequence characterization of two gypsy moth aminopeptidase-N cDNAs, including the receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 29(6), p. 527-535.

Gazit, E; Bach, D; Kerr, D; Sansom, S; Chejanovsky, N; Shai, Y. (1994). The alpha-5 segment of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: in vitro activity, ion channel formation and molecular modelling, *Biochemical Journal*. Vol 304, p. 895-902.

Gilliland, A; Chambers, C; Bone, E; Ellar, D. (2002). Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-Endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 68 (4), p. 1509-1515

Gómez, I; Sanchez, J; Miranda, R; Bravo, A; Soberon, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*. Vol 513, p. 242-246.

Gómez, I; Arenas, I; Benitez, I; Miranda-Ríos, J; Becerril, B; Grande, G; Almagro, J; Bravo, A; Soberón, M. (2006). Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 281, p. 34032-34039.

Gong, Y; Wang, C; Yang, Y; Wu, S; Wu, Y. (2010). Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 104 (2), p. 90-96.

Grochulski, P; Masson, L; Borisova, S; Pusztai-Carey, M; Schwartz, J; Brousseau, R; Cygler, M. (1995). *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 254, p. 447-464.

Guo, S; Ye, S; Liu, Y; Wei, L; Xue, J; Wu, H; Song, F; Zhang, J; Wu, X; Huang, D; Rao, Z. (2009). Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *Journal of Structural Biology*. Vol 168 (2), p. 259-266.

Gunning, R; Dang, H; Kemp, F; Nicholson, I; Moores, G. (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 71, p. 2558-2563

Heckel, D; Gahan, L; Baxter, S; Zhao, J; Shelton, A; Gould, F; Tabashnik, B. (2007) The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal Invertebrate Pathology*. Vol 95, p. 192-197.

Hernandez, P; Navarro, G; Caccia, S; de Maagd, R; Moar, W; Ferré, J; Escriche, B; Herrero, S. (2010) Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. *PloS One*. Vol 17: e12795.

Herrero, S; Gechev, T; Bakker, P; Moar, W; de Maagd R. (2005). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*. Vol 6 (96).

Hofmann, C; Lüthy, P; Hutter, R; Pliska., V. (1988). Binding of the d endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*. Vol 173, p. 85–91.

Hofmann, C; Vanderbruggen, H; Hofte, H; Van Rie, J; Jansens, S; Van Mellaert, H. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol 85, p. 7844– 7848.

Hui, F; Scheib, U; Hu, Y; Sommer, R; Aroian, R; Ghosh, P. (2012). Structure and Glycolipid Binding Properties of the Nematicidal Protein Cry5B. *Biochemistry*. 2012 Nov 26. [Epub ahead of print]

Ibrahim, M; Gryko, N; Junker, M; Bulla, L. (2010). *Bacillus thuringiensis* a genomic and proteomics perspective. *Bioengineered bugs*. Vol 1 (1), p. 31-50.

Iracheta, M; Pereyra-alférez, B; Galán-wong, L, Ferré, J. (2000). Screening for *Bacillus thuringiensis* cristal proteins active against the Babbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol 76 (1). 70-75

Jurat-Fuentes J; Gould, F; Adang, M. (2003). Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggest multiple mechanism of resistance. Applied Environmental Microbiology. Vol 69, p. 5898-5906.

Jurat-Fuentes, J; Gahan, L; Gould, F; Heckel, D; Adang, M. (2004) The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Biochemistry. Vol 43, p. 14299-14305

Jurat-Fuentes, J; Adang, M. (2004). Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. European Journal of Biochemistry. Vol 271(15), p. 3127-3135.

Jurat-Fuentes, J; Karumbaiah, L; Krishna, S; Ning, C; Liu, C; Wu, K; Jackson, J; Gould, F; Blanco, C; Portilla, M; Perera, O; Adang, M. (2011). Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Plos one. Vol 6 (3) e17606.

Kamauchi, S; Yamagiwa, M; Esaki, M; Otake, K; Sakai, H. (2003). Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin to the midgut epithelial membranes of *Culex pipiens*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol 67 (1), p. 94-99.

Keller, M; Sneh, B; Strizhov, N; Prudovsky, E; Regev, A; Koncz, C; Schell, J; Zilberstein, A. (1996) Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. Insect Biochemistry Molecular Biology. Vol 26, p. 365-373.

Khajuria, C; Buschman, L; Chen, M; Siegfried, B; Zhu, K. (2011). Identification of a novel aminopeptidase P-like gene (OnAPP) possibly involved in Bt toxicity and resistance in a major corn pest (*Ostrinia nubilalis*). PLoS One. Vol 6, e23983.

Knight; P; Knowles, B; Ellar, D. (1995). Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) toxin. The Journal of Biological Chemistry. Vol 270 (30), p. 17765-17770

Knowles, B; Ellar, D. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins with different insect specificity. Biochimica et Biophysica. Acta. Vol 924, p. 509-518.

Knowles, B. (1984). Mechanism of action *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxin. Advances in insects physiology. Vol 24, p. 275-308

Krishnamoorthy, M; Jurat-Fuentes, L; McNall, R; Andacht, T; Adang, M. (2007). Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. Vol, 37 (3), p, 189–201

Liu, F; Xu, Z; Zhu, Y; Huang, F; Wang, Y; Li, H; Gao, C; Zhou, W; Shen, J. (2010). Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa*

armigera (Lepidoptera:Noctuidae) in northern China. Pest Manage Science. Vol 66, p. 155–161

Li, H; Oppert, B; Higgins, R; Huang, F; Zhu, K; Bushman, L. (2004) Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and –susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). Insect Biochemistry Molecular Biology. Vol 34, p. 753-762

Li, J; Carrol, J; Ellar, D. (1991). Crystal structure of insecticidal d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature. Vol 353, p.815-821

Lorence, A; Darszon, A; Bravo, A. (1997). Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. FEBS Letters. Vol 414(2), p.303-307.

Luo, k, Lu, Y; Adang, M. (1996). A 106 kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C d-endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. Insect Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 26, p. 783-791

Luo, K; Banks, D; Adang, M. (1999). Toxicity, Binding, and Permeability Analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 65 (2), p. 457-464

Ma, G; Rahman, M; Grant, W; Schmidt, O; Asgari, S. (2012) Insect tolerance to the crystal toxins Cry1ac and Cry2Ab is mediated by binding of monomeric toxin to lipophorin glycolipids causing oligomerization and sequestration reactions. Developmental & Comparative Immunology. Vol 37 (1), p. 184–192

Maagd, R; Weemen-Hendriks, M; Stiekema, W; Bosch, D. (2000). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. Applied and Environmental Microbiology. Vol 66 (4), p. 1559-1563

Maagd, R; Bravo, A; Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics. Vol.17 (4), p. 193-199

Masson, L; Lu, J; Mazza, A; Brousseau, R; Adang M. (1995). The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. The journal of biological chemistry. Vol 270 (35), p. 20309-20315

McNall, R; Adang, M. (2003). Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. Insect Biochemistry and Molecular Biology. Vol 33(10), p. 999-1010.

Mita, K; Kasahara, M; Sasaki, S; Nagayasu, Y; Yamada, T; Kanamori, H; Namiki, N; Kitagawa, M; Yamashita, H; Yasukochi, Y; Kadono-Okuda, K; Yamamoto, K; Ajimura, M; Ravikumar, G; Shimomura, M; Nagamura, Y; Shin-I, T; Abe, H; Shimada, T;

Morishita, S; Sasaki, T. (2004). The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. DNA Resarch. Vol 11 (1), p. 27-35.

Moar, W; Pusztai-Carey, M; Van Faassen, H; Bosch, D; Frutos, R; Rang, C; Luo, K; Adang, M. (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC Resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Applied Environmental Microbiology. Vol 61(6), p. 2086–2092.

Monnerat, R; Martins, E; Queiroz, P; Ordúz, S; Jaramillo, G; Benintende, G; Cozzi, J; Real, M; Martinez-Ramirez, A; Rausell, C; Cerón, J; Ibarra, J; Del Rincon-Castro, M; Espinoza, A; Meza-Basso, L; Cabrera, L; Sánchez, J; Soberón, M; Bravo, A. (2006). Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. Applied Environmental Microbiology. Vol 72 (11), p.7029-35.

Mooseker, M. (1985). Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. Annual Review Cell Biology. Vol 1, p. 209–241.

Morin, S; Biggs, R; Shriver, L; Ellers-Kirk, C; Higginson, D; Holley, D; Gahan, L; Heckel, D; Carriere, Y; Dennehy, T; Brown, J; Tabashnik, B. (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol 100, p. 5004-5009.

Morse, R; Yamamoto, T; Stroud, R; (2001). Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure. Vol 9, p. 409 - 417.

Ocelot, J. (2011). Análisis del papel de la región B16 del dominio III de la toxinas Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* en toxicidad contra *Manduca sexta*. Tesis de Maestría, UNAM.

Oltean, D; Pullikuth, A; Lee, H; Gill, S. (1999). Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor A from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. Applied and Environmental Microbiology. Vol 65(11), p. 4760-4766

Oppert, B; Kramer, K; Beeman, R; Johnson, D; McGaughey, W. (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Journal of Biological Chemistry. Vol 272, p. 23473-23476.

Pacheco, S; Gomez, I; Arenas, I; Saab-Rincon, G; Rodriguez-Almazan, C; Gill, S; Bravo, A; Soberón, M. (2009). Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping-pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors. Journal of Biological Chemistry. Vol 284, p. 32750-32757.

Pardo-López, L; Gómez, I; Rausell, C; Sánchez, J; Soberón, M; Bravo, A. (2006). Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. Biochemistry. Vol 45, p. 10329 - 10336.

Pardo-Lopez, L; Soberon, M; Bravo, A. (2012). *Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection FEMS Microbiology Review, Apr 30.En prensa

Pigott, C; and Ellar, D. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 71 (2), p. 255–281

Rahman, M; Roberts, H; Sarjan, M; Asgari, S; Schmidt, O. (2004) Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol 101, p. 2696-2699.

Rajagopal, R; Sivakumar, S; Agrawal, N; Malhotra, P; Bhatnagar, R. (2002). Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes Its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. The journal of biological chemistry. Vol. 277 (49), p. 46849–46851

Rang, C; Bergvingson, D; Bohorova, N; Hoisington, D; Frutos, R. (2004). Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. Current Microbiology. Vol 49(1), p. 22-7

Sayyed, A; Gatsi, R; Ibiza-palacios, M; Escriche, B; Wright, d; Crickmore, N. (2005). Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. Application of environmental microbiology. Vol 71 (11), p. 6863-6869

Schnepf, E; Tomczak, K; Ortega, J; Whiteley, H. (1990). Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. The journal of biological chemistry. Vol 265 (34), p. 20293-20930

Schnepf, E; Crickmore, N; Van rie, J; Lereclus, N; Baum, J; Feitelson, J; Zeigler, D; Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol 62 (3), p. 775–806

Siafeg (Sistema de alerta fitosanitaria del estado de Guanajuato). (2011) <http://www.siafeg.com/Estudios>

Soberón, M; Bravo, A. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, cap 27. Mexico, D.F.. UNAM. p. 303-314

Storer, N; Babcock, J; Schlenz, M; Meade, T; Thompson, G; Bing, J; Huckaba, R. (2010). Discovery and characterization of field resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. Journal Economy Entomology. Vol 103, p. 1031-1038.

- Tabashnik, B; Unnithan, G; Masson, L; Crowder, D; Li, X; Carriere, Y. (2009). Asymmetrical crossresistance between *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac and Cry2Ab in pink bollworm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol 106, p. 11889-11894.
- Thomas, J; Morgan, A; Whipps, J, Saunders, R. (2000). Plasmid Transfer between the *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in Laboratory Culture and Soil and in Lepidopteran and Coleopteran Larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 66(1), p. 118–124
- Tiewisiri, K; Wang, P. (2011). Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol 108, p. 14037-14042.
- Vadlamudi, R; Ji, T; Bulla, L. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *Journal Biological Chemistry*. Vol 268, p.12334–12340.
- Van Rensburg, J. (2007). First report of field resistance by stem borer *Busseola fusca* (Fuller) to Bt transgenic maize. *South Africa Journal Plant Soil*. Vol 24, p. 147-151
- Van rie, J; Jansens, S; Hofte, H; Degheele, D; Van mellaert, H. (1990). Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 56 (5), p. 1378-1385
- Wang, P; Zhang, X; Zhang, J. (2005). Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 35(6), p. 611-620
- Wan, P; Huang, Y; Wu, H; Huang, M; Cong, S; Tabashnik, B; Wu, K. (2012) Increased frequency of pink bollworm resistance to Bt toxin Cry1Ac in China. *PLoS ONE*. Vol 7, p. e29975.
- Xu, X; Yu, L; Wu, Y. (2005) Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 71, p. 948-954.
- Xue, J; Cai, Q; Zheng, D; Yuan, Z. (2005) The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1c from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. *Letters in Applied Microbiology*. Vol 40 (6), p. 460-465.
- Yang, Y; Zhu, Y; Ottea, J; Husseneder, C; Leonard, B; Abel, C; Luttrell, R; Huang, F. (2011). Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *PLoSOne*. Vol 6: e25783
- Yaoi, K; Nakanishi, K; Kadotani, T; Imamura, M; Koizumi, N; Iwahana, H; Sato, R. (1999). cDNA cloning and expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin binding 120

kDa aminopeptidase N from *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta*. Vol 1444 (1), p. 131-137.

Xue, J; Cai, Q; Zheng, D; Yuan, Z. (2005). The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1c from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. *Letters in Applied Microbiology*. Vol 40 (6), p. 460-465.

Zhang, X; Candas, M; Griko, N; Taussig, R; Bulla, L. (2006). 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*, Vol 103 (26), p. 9897-9902

Zhang, S; Cheng, H; Gao, Y; Wang, G; Liang, G; Wu, K. (2009). Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry Molecular biology*. Vol 39, p. 421-429

Zhu, Y; Kramer, K; Oppert, B; Dowdy, A. (2000). cDNAs of aminopeptidase-like protein genes from *Plodia interpunctella* strains with different susceptibilities to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Vol 30(3), p. 215-224

Zhuang, M; Oltean, D; Gómez, I; Pullikuth, A; Soberón, M; Bravo, A; Gill, S. (2001). *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *Journal of Biological Chemistry*. Vol 277, p. 13863-13872.

Zuñiga, F; Bravo, A; Soberón, M; Gómez, I. (2012). Role of GPI-anchored membrane receptors in the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins en: Larramendy, L. *Integrated Pest Management and Pest Control*. Intech. en prensa