



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

La participación del óxido nítrico en la
respuesta de *Manduca sexta* a la intoxicación
con Cry1Ab

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ELVA CAROLINA CHÁVEZ HERNÁNDEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. HELENA PORTA DUCOING
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Chávez
Hernández
Elva Carolina
62 35 08 15
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
409063613

2. Datos del tutor

Dra.
Helena
Porta
Ducoing

3. Datos del sinodal 1

Dr.
José Luis
Puente
García

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Ana María
Cevallos
Gaos

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Liliana
Pardo
López

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Alejandro
Córdoba
Aguilar

7. Datos del trabajo escrito

La participación del óxido nítrico en la respuesta de *Manduca sexta* a la intoxicación con Cry1Ab
85 p.
2013

Este trabajo fue posible gracias a los donativos Conacyt 179333 y DEGAPA IN218610.

Dedicada con amor a mi madre, por enseñarme a perseguir y alcanzar mis sueños.

AGRADEZCO...

A la UNAM, por brindarme la oportunidad de ser parte de ella, por regalarme las mejores experiencias de mi vida y guiar mi camino profesional.

A la Facultad de Ciencias, la casa que me alojó por 4 años. A los profesores que me formaron y en especial a aquellos que me motivaron a ir más allá. A la comunidad estudiantil, donde encontré amigos inigualables y compañeros extraordinarios.

Al taller, en especial al Dr. José Luis Puente y a los tallerines de mi generación: Sonia, Oscar, Emanuel, Andrea, Wendy, Ana Laura, Gustavo y Tania.

Al Instituto de Biotecnología, en especial al laboratorio de la Dra. Alejandra Bravo y el Dr. Marío Soberón, gracias por dejarme ser parte del equipo y confiar en mí para sacar este proyecto adelante.

A mi querida tutora, la Dra. Helena Porta, gracias por ser una guía siempre disponible, por tu paciencia y tiempo.

A Gladys Jiménez, por ser tan buena compañera y amiga, gracias por tus contribuciones al desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio del Dr. Humberto Lanz, en especial a Benito Recio, por su ayuda en las mediciones de NO.

A la Dra. Cevallos Gaos, la Dra. Pardo López y al Dr. Córdoba Aguilar por aceptar ser parte de mi jurado y por sus comentarios enriquecedores.

A mi mamá, Vale e Isaac, por su constante apoyo y motivación para hacer lo que me proponga. Los amo.

En este trabajo se usaron los donativos Conacyt 179333 y DEGAPA IN218610.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
El óxido nítrico: funciones como segundo mensajero y agente tóxico	12
La señalización por NO y sus moléculas blanco	12
Síntesis del NO	14
La iNOS y sus funciones en mamíferos.....	15
Los Inflamosomas, la Caspasa 1 y la iNOS están en la misma vía de respuesta inflamatoria	16
El NO regula la apoptosis	18
La NOS en insectos	20
Inmunidad en insectos.....	21
<i>Bacillus thuringiensis</i> como bioinsecticida.....	23
Modo de acción de las toxinas Cry	25
La muerte de la larva por Bt.....	27
ANTECEDENTES	29
Respuestas celulares ante Toxinas Formadoras de Poro	29
Las vías de supervivencia y muerte celular forman parte de la respuesta ante las TFP 29	
Las TFP inducen la apoptosis por medio de la activación de Caspasa 3	31
Respuestas inmunes ante las TFP.....	32
Las TFP inducen el ensamble del inflamosoma y promueven la activación de Caspasa 1.....	33
El NO y los AMP son efectores importantes de la respuesta inmune innata de los insectos contra patógenos	34
HIPÓTESIS	38
JUSTIFICACIÓN.....	39
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Bioensayos	41
Extracción de DNA de los intestinos de <i>M. sexta</i>	42
Extracción de RNA de los intestinos de <i>M. sexta</i>	43

Síntesis de cDNA	44
Reacción de la Polimerasa en cadena (PCR)	44
Electroforesis de DNA	44
Extracción de la proteína de los intestinos de <i>M. sexta</i>	46
Cuantificación de proteína	46
Medición de nitritos y nitratos mediante la reacción de Griess	46
Medición de la actividad de Caspasa 1	47
Medición de la actividad de Caspasa 3	48
RESULTADOS.....	48
Las larvas de <i>M. sexta</i> producen NO durante su desarrollo	48
Determinación de una dosis subletal de toxina Cry1Ab para <i>M. sexta</i> de segundo instar	51
La toxina Cry1Ab induce la producción de NO por medio de la NOS en el intestino pero no en la hemolinfa	52
El NO es tóxico para <i>M. sexta</i>	53
El gen <i>nos</i> se transcribe <i>de novo</i> en el intestino de <i>M. sexta</i> en respuesta a la toxina Cry1Ab	55
El mRNA de <i>lebocina</i> se acumula en respuesta a la toxina Cry1Ab independientemente de la concentración de NO.....	57
El mRNA de <i>caspasa 1</i> y <i>caspasa 3</i> se acumula en respuesta a la toxina Cry1Ab independientemente de la producción de NO.....	59
La toxina Cry1Ab induce la actividad de Caspasa 3 y disminuye la de Caspasa 1	61
DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES.....	71
PERSPECTIVAS	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74
APÉNDICES.....	79
A. Protocolo para la purificación de la protoxina Cry1Ab soluble	79
Esporulación de Bt	79
Purificación de cristales de Cry1Ab	79
Solubilización de cristales purificados (protoxina).....	80
B. Dieta de las larvas de <i>Manduca sexta</i>	82
C. Ciclo de vida de <i>Manduca sexta</i>	83

ABREVIATURAS

ADP: adenosin difosfato

Akt: proteína cinasa B

AMP: péptido antimicrobiano

ANOVA: análisis de variancia

Apaf-1: factor activador de la apoptosis 1

ATP: adenosin trifosfato

Bcl-2: proteína del linfoma 2 de células B

BSA: albúmina de suero bovino

Bt: *Bacillus thuringiensis*

Bti: *Bacillus thuringiensis israelensis*

Caco-2: línea celular derivada del adenocarcinoma colorectal epitelial humano

cAMP: adenosín monofosfato 3', 5' cíclico

cDNA: cadena codificante de ácido desoxiribonucleico

cGMP: guanocín monofosfato cíclico

Cit C: citocromo c

Cry: toxina Cristal

Cry1Ab R99E: mutante de Cry1Ab que cambia el aminoácido arginina 99 por glutamato

Cyt: toxina citolítica

D.O.: densidad óptica

DAP: ácido diaminopimelico

DEVD: tetrapéptido aspartil-glutamil-valil-aspartato

DISC: complejo de señalización inducido por muerte

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxiribonucleótidos trifosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: etilen-diamida tetra ácido acético

E-NO: compuesto metal-nitrosil

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ERK: cinasa de respuesta extracelular

FAD: flavin adenina dinucleótido

FAK: cinasa de adhesión focal

HeLa: línea celular derivada de cáncer cervical de Henrietta Lacks

IL-18: interleucina 18

IL-1 β : interleucina 1 β

IMD: inmunodeficiencia

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IRF: factor de regulación del interferón

JNK: cinasa C-Jun N-terminal

kDa: kilo Daltones

LC: concentración letal

LC₁₀: dosis letal a la que el 10% de las larvas mueren en 7 días de intoxicación

LC₅₀: dosis letal a la que el 50% de las larvas mueren en 7 días de intoxicación

LC₉₀: dosis letal a la que el 90% de las larvas mueren en 7 días de intoxicación

MAPK: proteínas cinasa activada por mitógenos

MCP: muerte celular programada

M-MLV RT: retrotranscriptasa del virus Leucemia Moloney de Murino

M-NO: compuesto organonitrosil

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

NADP, NADPH: nicotidamida adenina dinucleótido fosfato, nicotidamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NAME: L-N-G-nitroarginina metil ester

NF- κ B: factor nuclear κ B

NLR: receptor tipo NOD

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

NO₂⁻: nitrito

NO₃⁻: nitrato

NOD: dominio de oligomerización de nucleótidos

NOS: óxido nítrico sintasa

Nox2: NADPH óxidasa fagocítica

NPS: nitroprusiato de sodio

p38: proteína cinasa activada por mitógenos p38

PAMP: patrones moleculares asociados a daño

PARP: polimerasa poli ADP-ribosa

pb: pares de bases

PBS: amortiguador salino de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: fenil-metil-sulfonyl fluoruro

pNA: cromóforo p-nitroanilina

PO: fenol oxidasa

PPO: pro fenol oxidasa

PRR: receptor de reconocimiento de patógenos

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

rpS3: proteína ribosomal S3

TAE: buffer de Tris, ácido acético y EDTA

TFP: toxinas formadoras de poro

TLR: receptor tipo Toll

YVAD: tetrapéptido tirosil-valil-alanil-aspartato

Z-VAD-FMK: inhibidor de caspasas carbobenzoil-valil-alanil-aspartil-[O-metil]- fluorometilcetona

β GRP 1 y 2: proteína de reconocimiento de glucanos

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora y antimicrobiana producida por medio de la enzima Óxido nítrico sintasa (NOS) durante la respuesta inmune innata. Una de sus funciones principales incluye la regulación de procesos como la inflamación y la apoptosis. La proteína Cry1Ab es una toxina formadora de poro que produce la bacteria *Bacillus thuringiensis* que perfora a las células del epitelio intestinal de las larvas de insectos blanco; por su naturaleza proteíca y su alta especificidad para ciertas especies de insectos ha sido usada como un eficiente bioinsecticida amigable con el medio ambiente. En este trabajo se analizó si el NO participa en la respuesta de las larvas del lepidóptero *Manduca sexta* intoxicadas con la toxina Cry1Ab como una respuesta posiblemente relacionada a la supervivencia. Además se analizó si la apoptosis y/o la respuesta inmune innata se regulan por NO en respuesta a Cry1Ab mediante el análisis de la actividad de caspasas (1 y 3) y de la síntesis a nivel transcripcional de los péptidos antimicrobianos: lebecina, atacina y moricina. Los métodos usados en este trabajo incluyen bioensayos de toxicidad a Cry1Ab, la medición de NO mediante la reacción de Griess, el análisis de la expresión de transcritos mediante RT-PCR y la medición de la actividad de caspasas mediante ensayos colorimétricos. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de nitritos y nitratos, como una medida indirecta de la presencia de NO, aumentaron en el intestino de las larvas intoxicadas con Cry1Ab. Mientras que el tratamiento con nitroarginina metil ester (NAME), un inhibidor de la NOS, previno el aumento de nitritos y nitratos en el intestino de las larvas intoxicadas. Además el gen *nos* se reguló positivamente a nivel transcripcional en el intestino durante la intoxicación con Cry1Ab. Lo cual sugiere que el NO participa en la respuesta celular del intestino ante la intoxicación con Cry1Ab en *M. sexta*. Mediante el análisis del porcentaje de mortalidad se encontró que la producción de NO dependiente de Cry1Ab no solo no ayudó a la supervivencia sino que resultó tóxico para la larva. También se analizó si otros componentes de la respuesta inmune innata, como los péptidos antimicrobianos (AMP), se modifican por la intoxicación con Cry1Ab y si se regulan

por la síntesis de NO. Se encontró que solo el transcrito del gen de *lebocina* se acumula en respuesta a la toxina Cry1Ab y que fue independiente de la producción de NO. Por otro lado se analizó la actividad de la caspasa 1 y la caspasa 3, implicadas en inflamación y apoptosis respectivamente, durante la intoxicación con Cry1Ab. Se encontró que la intoxicación con Cry1Ab disminuyó la actividad de caspasa 1 y aumentó la de caspasa 3 en extractos del intestino, y que su actividad fue independiente de los niveles de NO en el intestino. En conclusión el NO se produce en la respuesta de *Manduca sexta* ante la intoxicación con la toxina Cry1Ab y resulta tóxico para la larva. Además, los procesos de inflamación, síntesis de AMP y apoptosis durante la intoxicación con Cry1Ab parecen ser independientes de la producción de NO.

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico: funciones como segundo mensajero y agente tóxico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso, permeable a la membrana celular y altamente reactivo. El NO es un segundo mensajero con funciones en el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular. También se le ha implicado en diversas patologías como el choque séptico, infartos, enfermedades neurodegenerativas y en la respuesta inflamatoria (Rivero., 2006).

La síntesis de NO como agente antimicrobiano es una respuesta ampliamente distribuida y se ha descrito en los vertebrados, los invertebrados, las plantas y los microorganismos. Su espectro de acción es muy amplio, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que es tóxico para casi todos los patógenos analizados, desde virus hasta metazoarios (Rivero., 2006).

La señalización por NO y sus moléculas blanco

La señalización del NO es compleja debido a su movimiento rápido y a su alta reactividad con distintas biomoléculas. La difusión de NO es más rápida que su tasa de reacción intracelular en la célula que lo produce, por lo que puede difundir varios diámetros celulares de su sitio de síntesis (Kang et al., 2004). Se estima que la vida media del NO en condiciones fisiológicas es de un segundo y que en este tiempo, en eucariontes, puede difundirse localmente a una distancia de cuatro o cinco células (Chokshi et al., 2008).

El NO producido durante procesos inflamatorios puede ser altamente tóxico. La gran toxicidad del NO en este caso se debe a su alta concentración y a su gran reactividad con el oxígeno lo cual produce moléculas radicales altamente tóxicas que tienen propiedades dañinas para las enzimas y el DNA, como el peroxinitrito (OONO^-) que es un producto de la reacción del NO con el anión superóxido (Rivero, 2006). El anión superóxido, al igual que el NO, se produce en los sitios de inflamación como consecuencia de la inducción de los complejos enzimáticos oxidativos como la NADPH oxidasas o las Xantin oxidasas (Chokshi et al., 2008).

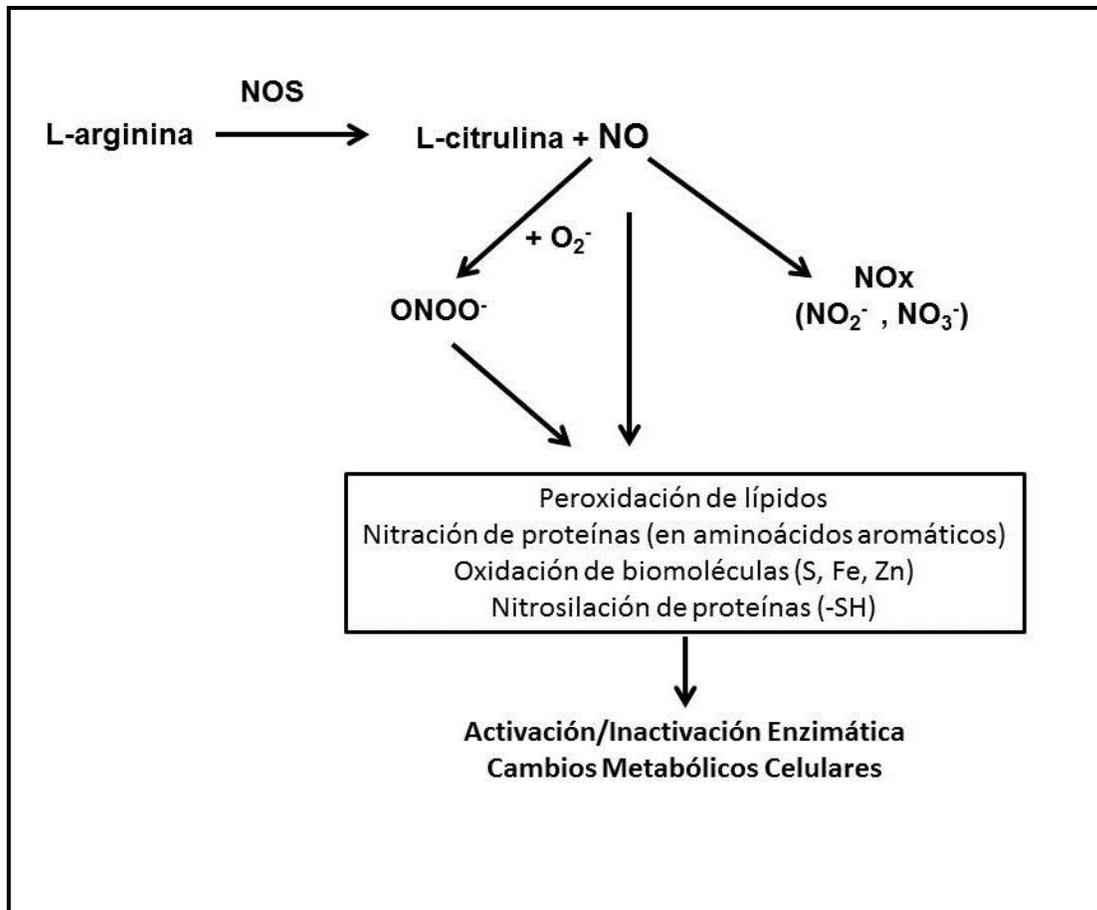


Figura 1. Blancos del NO y sus moléculas derivadas. A partir de L-arginina la enzima Óxido Nítrico Sintasa (NOS) cataliza la síntesis de NO y L-citrulina. El NO puede difundir directamente a sus blancos o bien descomponerse en otro óxido de nitrógeno (NO_x) por ejemplo en nitritos (NO_2^-) o nitratos (NO_3^-) que son moléculas más estables. El NO también puede reaccionar con el anión superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito que es una molécula altamente reactiva y tóxica. Los blancos del NO o sus moléculas derivadas incluyen a proteínas y otras biomoléculas como lípidos. Sus efectos incluyen la peroxidación de lípidos, nitración de proteínas en aminoácidos aromáticos como tirosina o triptófano, la oxidación de biomoléculas con metales redox como proteínas con centros de Fe, S o Zn, y la nitrosilación de proteínas en residuos de cisteína. La modificación de las biomoléculas blanco causa la activación o inactivación de enzimas importantes en la señalización celular, el metabolismo y la transcripción.

El peroxinitrito es un intermediario clave de la respuesta inflamatoria *in vivo*, y es uno de los responsables de los efectos patológicos o citotóxicos del NO. El

peroxinitrito puede ejercer sus efectos mediante varios mecanismos. Puede oxidar directamente sitios de proteínas como tioles (nitrosilación de proteínas), los centros de azufre o los de hierro, y los dedos de zinc. Por otra parte, el NO puede mediar la oxidación de las biomoléculas mediante su descomposición en radicales altamente reactivos como el dióxido de nitrógeno (Chokshi et al., 2008). También causa peroxidación de los lípidos de la membrana, la oxidación de sulfhídricos y la nitración de compuestos fenólicos como la tirosina en proteínas. Los residuos de la nitrotirosina se han detectado en múltiples sitios de inflamación y son indicadores de la participación del peroxinitrito (Potoka et al., 2002).

El NO también puede convertirse en un óxido de nitrógeno distinto como nitrito (NO_2^-) y/o nitrato (NO_3^-); o un compuesto nitrosil (E-NO) donde E puede ser S, N, C o un metal. El NO o sus derivados pueden ejercer su función fisiológica por medio de su reacción con biomoléculas que contienen: metales activos redox como la guanilato ciclasa, el citocromo p450 o proteínas con dedos de zinc; o con moléculas orgánicas libres de metales como residuos de cisteína, triptófano o tirosina (Kang et al., 2004; Tennyson & Lippard, 2011). Por su alta reactividad con varias biomoléculas, el NO no tiene un solo receptor definido. Varios de los blancos del NO o sus derivados son moléculas reguladoras, por ejemplo factores de transcripción o componentes de varias cascadas de señalización. Por esta misma razón, el NO ejerce efectos heterogéneos dando lugar a diversos fenotipos (Bogdan, 2001).

Síntesis del NO

El NO se produce por la oxidación de L-arginina a L-citrulina por medio de la enzima Óxido nítrico sintasa (NOS). La NOS de mamíferos es un gran complejo enzimático que requiere de varios cofactores: dinucleótido flavin-adenina (FAD), mononucleótido flavin (FMN), dinucleótido nicotinamida adenina fosfato (NADP) y tetrahidrobiopterina. El complejo de la NOS consiste de dos dominios, uno de oxigenasa o catalítico y otro de reductasa. Para que el complejo catalítico sea biológicamente activo debe conformar un dímero. La calmodulina es esencial para

su activación, ya que se une a un sitio de regulación entre los dos dominios catalíticos y ayuda al proceso de transferencia de electrones (Davies, 2000).

En vertebrados existen tres isoformas de esta enzima: la inducible (iNOS) y dos constitutivas, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS). Con respecto a su función, eNOS es esencial para la vasodilatación del sistema cardiovascular y en la angiogénesis; la nNOS se encuentra en el sistema nervioso así como en los músculos donde juega un papel en procesos como la neurogénesis, la potenciación a largo plazo y la relajación, mientras que iNOS tiene una función inmunoprotectora, la cual permite responder a las infecciones de las bacterias, los virus y otros patógenos (Rivero, 2006).

La iNOS y sus funciones en mamíferos

La isoforma iNOS está ausente en las células en reposo pero se sintetiza rápidamente en varios tipos de células y tejidos en respuesta a componentes virales y microbianos (proteínas, lípidos, polisacáridos) y a citosinas pro-inflamatorias, así como a complejos del sistema inmune producidos en enfermedades infecciosas agudas (Tennyson & Lippard, 2011). El NO producido por la iNOS puede funcionar como un agente antiviral, antimicrobiano, inmunoestimulante o inmunosupresor, citotóxico o citoprotector (Bogdan, 2001).

A diferencia de las otras isoformas, la iNOS puede producir altas concentraciones de NO en poco tiempo; típicamente de 100 a 1000 veces más NO que las formas constitutivas. Por ejemplo, las isoformas constitutivas de NOS producen concentraciones picomolares de NO, mientras que iNOS produce concentraciones nanomolares o micromolares de NO durante la inflamación en mamíferos (Chokshi et al., 2008). Esto es posible debido a que su activación es independiente de calcio y una vez presente la isoforma inducible cataliza la síntesis de NO hasta que el sustrato se vuelve limitante. Mientras que la activación e inactivación de las formas constitutivas de NOS dependen de los niveles de calcio intracelulares, lo que permite una respuesta eficiente para la transmisión controlada de las señales celulares. Por lo tanto se cree que la regulación de la producción de NO por medio

de iNOS ocurre a nivel de la transcripción y/o la traducción de esta enzima (Rivero, 2006).

Los Inflamosomas, la Caspasa 1 y la iNOS están en la misma vía de respuesta inflamatoria

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa ante un patógeno. Esta respuesta se inicia cuando se reconoce algo como “no propio” por medio de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) que se unen a estructuras en los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Cooper & Mitchell-Foster, 2011). Estos receptores activan distintas vías de señalización que resultan en la activación de los mecanismos de resistencia a los patógenos, como la activación de la respuesta inflamatoria mediante la formación del inflamosoma, la producción de moléculas efectoras como las citosinas inflamatorias, la producción de moléculas citostáticas y citotóxicas y el reclutamiento de células especializadas en el sitio dañado (Buzzo et al., 2010).

Los inflamosomas son complejos multiproteicos que activan a la enzima caspasa 1. Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas que son sintetizadas como zimógenos que para su activación se cortan en sitios definidos después de un residuo de aspartato. Las caspasas inactivas, o procaspasas, se procesan inicialmente para separar la subunidad grande (p20) de la pequeña (p10), después de esto el dominio N-terminal se remueve para formar una proteasa catalíticamente activa (Kuranaga, 2012). Una vez activada, la caspasa 1 corta proteolíticamente a los precursores de las citosinas como pro-IL-1 β y pro-IL-18; las formas activas de estas interleucinas inician las respuestas proinflamatorias y las antimicrobianas. La caspasa 1 activa, también corta a otras proteínas que regulan la inducción de la piroptosis, un tipo de muerte celular dependiente de caspasa 1 que tiene características de apoptosis y necrosis; así como la inducción de la autofagia, las vías de reparación celular mediante la regulación del metabolismo de lípidos y los mecanismos de degradación bacteriana (Franchi et al., 2012).

Se ha visto que la caspasa 1 puede activar a la NOS y al inflamosoma en los macrófagos en respuesta a la flagelina. Los receptores tipo Toll (TLR, por sus

siglas en inglés) pueden activar la expresión de la iNOS en los mamíferos debido a que reclutan factores de transcripción IRF y NF-κB, ambos necesarios para inducir la expresión y la activación de la iNOS, así como la activación de la caspasa 1 (Buzzo et al., 2010).

Por otro lado el NO puede inhibir la actividad de la caspasa 1. El NO puede inhibir la inflamación por medio de la S-nitrosilación del residuo de cisteína del sitio activo de la caspasa 1, lo cual impide su activación proteolítica y suprime su actividad (Kim et al., 2002).

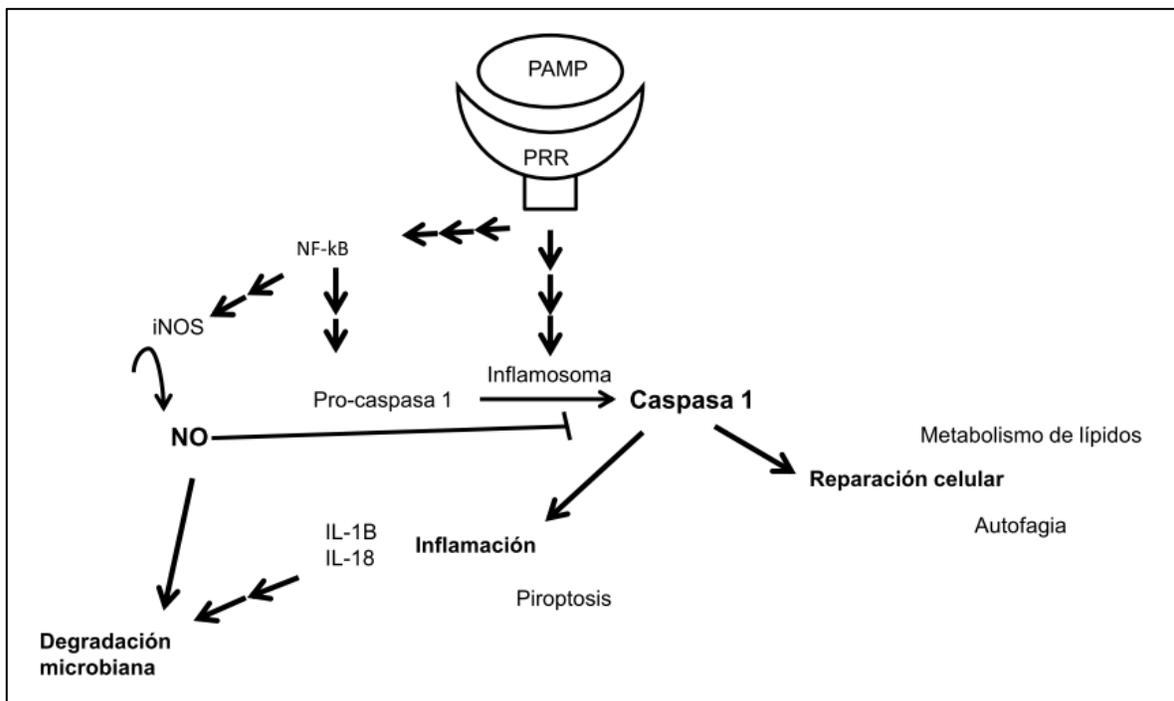


Figura 2. La Caspasa 1 y el NO están en la misma vía de respuesta ante patógenos.

Cuando los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) reconocen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) se inician distintas cascadas de señalización que conducen a la activación del factor transcripcional NF-κB, el cual permite la transcripción de los genes *inos* y de *caspasa 1*. La enzima iNOS produce NO en cantidades que resultan tóxicas para los microbios patógenos. Además, las cascadas de señalización de reconocimiento de algo como “no propio” permiten el ensamble del inflamosoma y la activación de Caspasa 1. La Caspasa 1 se relaciona con la inflamación, la producción de citosinas (IL-1β y IL-18) y con la muerte por piroptosis. También está

relacionada con respuestas de reparación celular como la autofagia y la síntesis de lípidos. El NO en altas concentraciones puede inhibir la actividad de varias enzimas por medio de nitrosilación, incluyendo a la Caspasa 1.

El NO regula la apoptosis

La muerte celular programada (MCP) es un proceso celular fundamental durante el desarrollo y en la regulación de la homeostasis de tejidos al eliminar células no deseadas (Kuranaga, 2012). Existen distintos tipos de MCP, entre los cuales se encuentran la apoptosis, que se distingue por sus características morfológicas celulares y por la participación de proteínas específicas (Kang et al., 2004). La apoptosis está caracterizada por la condensación del citoplasma y la fragmentación de la cromatina, la pérdida de la polaridad en células epiteliales, así como de las uniones celulares, la formación de burbujas en la membrana celular y la desintegración de la célula en cuerpos apoptóticos (Bialik et al., 2010; Kuranaga, 2012). La apoptosis esta mediada por la actividad de caspasas (Bialik et al., 2010; Chokshi et al., 2008). Las caspasas identifican a sus proteínas blanco por medio de secuencias de reconocimiento específicas donde cortan después de residuos de ácido aspártico (Potoka et al., 2002). Los mecanismos de la apoptosis están conservados en todos los animales, desde invertebrados a vertebrados (Kuranaga, 2012).

La apoptosis se inicia por la formación de complejos multiproteicos incluyendo al complejo de señalización inducido por muerte (DISC, por sus siglas en inglés), y al apoptosoma. DISC se genera por la unión de los ligandos extracelulares a los receptores de muerte (vía extrínseca). Mientras que el apoptosoma se forma al liberarse el citocromo C (Cit C) de la mitocondria (vía intrínseca). Estos complejos reclutan y activan a las caspasas iniciadoras, DISC activa a la caspasa 8 y el apoptosoma activa a la caspasa 9. Las caspasas iniciadoras activan a las caspasas efectoras (caspasa 3, 6 y 7) cuyo blanco son substratos celulares específicos para la proteólisis (Bialik et al., 2010).

La proteólisis de los blancos de las caspasas son los responsables del fenotipo de las células apoptóticas. Por ejemplo, la degradación del inhibidor de la desoxyribonucleasa por medio de las caspasas efectoras causa la fragmentación de DNA genómico entre los nucleosomas que es característico de la apoptosis. La separación de las células del tejido es el resultado del corte de los componentes del complejo de adhesión celular (Fink & Cookson, 2005). Otros blancos incluyen a proteínas estructurales, proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y a proteínas involucradas en el señalamiento celular como la cinasa de adhesión focal (FAK) (Potoka et al., 2002).

El NO puede provocar la muerte celular directa o indirectamente por medio de sus moléculas derivadas. El NO puede inhibir reversiblemente enzimas que producen radicales libres, como las enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, lo cual puede causar la muerte celular. Por otro lado, cuando el NO inhibe a la Cit C oxidasa, se pueden escapar aniones superóxido de la cadena de transporte de electrones, los cuales reaccionan con el NO produciendo peroxinitrito (Chokshi et al., 2008; Potoka et al., 2002). Mientras que las reacciones del NO con las enzimas son reversibles, las del peroxinitrito no lo son (Radi, Cassina, & Hodara, 2002). El peroxinitrito puede oxidar residuos de cisteína inactivando varios componentes de la cadena de transporte de electrones, incluyendo el complejo I, II, III, y V; lo cual resulta en la inhibición de la fosforilación oxidativa y finalmente la muerte celular por necrosis o apoptosis por medio de la vía intrínseca (Chokshi et al., 2008; Potoka et al., 2002).

Se ha descrito que el peroxinitrito induce apoptosis en varios tipos celulares incluyendo a las células epiteliales intestinales, los macrófagos y las neuronas (Chokshi et al., 2008).

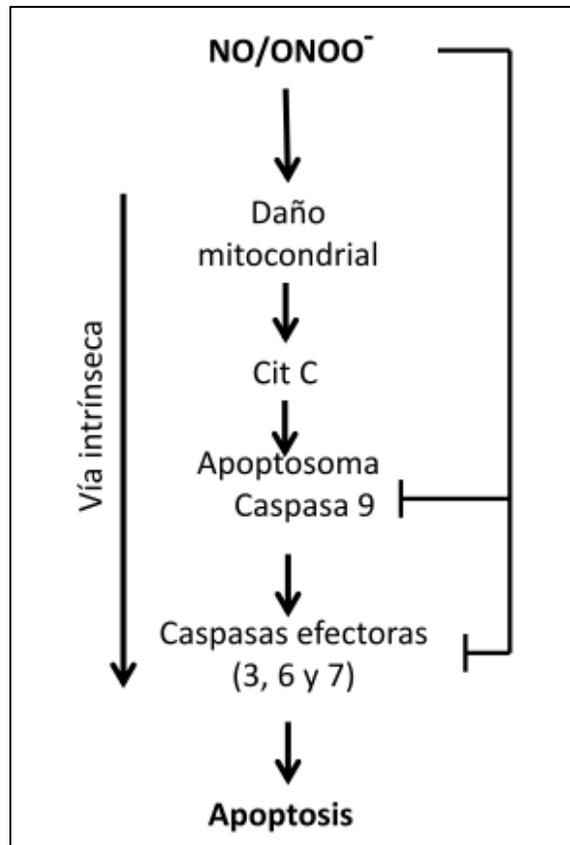


Figura 3. El NO y/o su derivado el peroxinitrito (ONOO⁻) pueden inducir la apoptosis por medio de la vía intrínseca. El NO y/o el ONOO⁻ pueden causar daño mitocondrial al inhibir varios complejos de la cadena de transporte de electrones, lo cual conduce a la liberación de Cyt C al citosol y el ensamblaje del apoptosoma. La activación de caspasa 9 en el apoptosoma permite el corte y activación de caspasas efectoras de la apoptosis como Caspasa 3, 6 y 7. El NO también puede inhibir la actividad de caspasas por medio de nitrosilación.

La NOS en insectos

En la década de los 90's se describió por primera vez a la NOS en el sistema nervioso de los insectos, la cual comparte similitudes con la forma constitutiva endotelial de la NOS de vertebrados. En estudios posteriores se encontró que el NO induce la respuesta inmune de insectos, y se ha demostrado que algunos insectos producen una forma inducible de NOS. En la mayoría de las especies de insectos estudiadas solo se ha encontrado una isoforma de la NOS, ya sea la constitutiva o la inducible, sin embargo en algunos insectos, la misma isoforma se

ha descrito como inducible y/o constitutiva en diferentes órganos. La NOS en invertebrados se ha descrito en múltiples tejidos: en el sistema nervioso central, el sistema visual, las glándulas salivales y el lóbulo de la antena se encuentra como forma constitutiva; mientras que en las células del intestino medio, los hemocitos y el cuerpo graso es inducible (Rivero, 2006).

Inmunidad en insectos

Los insectos no cuentan con inmunidad adaptativa (solo existente en cordados) pero si tienen el evolutivamente antiguo y eficiente sistema de defensa conocido como inmunidad innata (Christophides et al., 2002).

En los insectos la primera línea de defensa consiste en barreras estructurales, el exoesqueleto o la cutícula, la matriz peritrófica, el epitelio del tracto gastrointestinal y la envoltura quitinosa de las tráqueas. Una vez que los patógenos logran pasar esas barreras, se enfrentan con un repertorio diverso de respuestas inmunes altamente eficientes tanto celulares como humorales. Las respuestas celulares son mediadas por hemocitos, células circulantes de la hemolinfa especializadas en la respuesta inmune, los cuales matan a los patógenos directamente mediante la fagocitosis, la melanización, la nodulación y la encapsulación o indirectamente mediante la liberación de las señales sistémicas. Las respuestas humorales incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la activación transcripcional de numerosos genes que codifican para la producción de los péptidos antimicrobianos (AMP, por sus siglas en inglés) (Cooper & Mitchell-Foster, 2011; Moreno-García, Córdoba-Aguilar, Condé, & Lanz-Mendoza, 2013). Otro componente importante de la respuesta inmune del insecto es la activación de la cascada de la fenol oxidasa (PO, por sus siglas en inglés), que resulta en la deposición de melanina en el sitio de la reacción inmune y en la liberación de moléculas intermediarias microbicidas (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). Los órganos que tienen un papel importante en las respuestas inmunes sistémicas incluyen a la hemolinfa (la sangre del insecto), al cuerpo graso (equivalente al hígado) y los epitelios, principalmente el epitelio intestinal (Eleftherianos, et al., 2010).

Las respuestas inmunes más inmediatas de los insectos, incluyen la fagocitosis de los microorganismos patógenos por los hemocitos y la activación de la cascada de la PO que lleva a la encapsulación del microorganismo invasor en melanina (melanización). La PO esta normalmente presente como un precursor inactivo llamado pro-fenol oxidasa (PPO). Su activación ocurre por medio de una cascada de serin proteasas, que es iniciada cuando se reconocen microorganismos invasores y lleva al corte proteolítico de PPO en la hemolinfa, causando la síntesis del pigmento melanina y la producción de nódulos de melanina alrededor de microbios, de tal manera que se aíslan los patógenos (Eleftherianos et al., 2010; González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012).

Poco después, las moléculas efectoras como los péptidos antimicrobianos (AMP) aparecen en la hemolinfa y los epitelios. Los AMP se producen rápidamente y pueden ser altamente específicos para cierta clase de patógenos. Estos son sintetizados en el cuerpo graso, los epitelios, el intestino, las tráqueas y en los hemocitos. Su síntesis está regulada principalmente por la vía de señalización Toll, que se prende en respuesta a las bacterias gram positivas, las levaduras y los hongos, y por la vía de señalización de la inmunodeficiencia (IMD) que se prende principalmente en respuesta a las bacterias gram negativas (Cooper & Mitchell-Foster, 2011).

Los AMP se encuentran en un gran número de organismos, incluyendo a las bacterias, los hongos, las plantas y los animales, y son un aspecto importante de la respuesta inmune innata. La mayoría de los AMP se conocen como moléculas inmuno-moduladoras que son activas por las bacterias, las levaduras, los hongos, los parásitos, los virus y las células tumorales. Algunos AMP matan directamente a los patógenos *in vitro*. Los AMP están involucrados en la quimioatracción de las células inmunes, la expresión de las citosinas pro-inflamatorias y las anti-inflamatorias, la cicatrización, la apoptosis, la regulación del sistema inmune innato y el adaptativo (Brandenburg, et al., 2012).

Los AMP son moléculas pequeñas, anfipáticas y catiónicas; su tamaño va de 15-200 aminoácidos típicamente pero existen algunos de hasta 30 kDa (Ghosh et al.,

2011). Estas moléculas son ricas en los residuos de arginina y lisina que les confieren una carga positiva. Se cree que su carga catiónica, su pequeño tamaño y su estructura anfipática les permite interactuar e insertarse en la membrana de los microbios (Brandenburg et al., 2012). Otros mecanismos por los cuales los AMP afectan a los microorganismos son: la inhibición de la síntesis de la pared celular, la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas, así como la inhibición de la actividad de algunas enzimas (Li et al., 2012).

Los efectores más estudiados del sistema inmune de los insectos son los AMP (Eleftherianos et al., 2010). En *Drosophila*, la expresión de AMP se regula por la vía Toll y la vía IMD, ambas tienen dos factores de transcripción principales, Dorsal y Rel, respectivamente, miembros de la familia Rel/NF- κ B, que pueden ser regulados por las especies reactivas de oxígeno (Herrera-Ortiz, et al., 2011). El NO activa la vía Imd y la expresión de AMP en los hemocitos, el cuerpo graso y el intestino. Se cree que esto ocurre porque el cGMP, producido por la guanilato ciclasa soluble estimulada por el NO, es capaz de estimular la vía Imd (Davies et al., 2012).

***Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida**

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria gram positiva que produce cuerpos de inclusión compuestos de proteínas insecticidas durante su etapa de esporulación. Estas proteínas pertenecen a dos diferentes familias de las δ -endotoxinas: la familia de las toxinas Cristal (Cry) que son las más abundantes, y la familia de las proteínas citolíticas (Cyt) que se encuentran en ciertas cepas de Bt con actividad dipterocida. Tanto las toxinas Cry como las Cyt son toxinas formadoras de poro (TFP) que afectan a las células intestinales de las larvas del insecto, sin embargo estas dos familias no están relacionadas estructuralmente (Vachon et al., 2012).

Las toxinas Cry tienen actividad contra los estadios larvarios de algunos insectos del orden Lepidóptera (polillas), Coleóptera (escarabajos) y Díptera (mosquitos) y también contra algunas especies de nemátodos. (Sanahuja et al., 2011; Vachon et al., 2012). Además de ser muy efectivas son altamente específicas para su blanco;

por ejemplo, las toxinas del grupo Cry1A son activas solamente contra ciertas especies de lepidópteros, mientras que las toxinas Cry5 y Cry6 son específicas para nemátodos y la Cry11 y Cry4 para mosquitos (Pigott & Ellar, 2007; Vachon et al., 2012).

Las toxinas de Bt se han usado como una alternativa amigable con el medio ambiente a los insecticidas químicos, debido a su inocuidad para otros organismos, incluyendo a los mamíferos, y a su naturaleza biodegradable (Sanahuja et al., 2011). Las toxinas de Bt se han empleado principalmente para tres propósitos: para el control de plagas defoliadoras en la industria forestal y la agricultura, en el control de mosquitos vectores de enfermedades y en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a insectos (Bravo et al., 2007).

Una de las aplicaciones más exitosas de Bt ha sido el control de lepidópteros defoliadores, los cuales son pestes de coníferas en Canadá y Estados Unidos. En ambos países, se ha usado principalmente la cepa de Bt HD-1 la cual produce las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa (Bravo et al., 2007). Esta cepa se ha usado por más de setenta años en formulaciones que se aplican directamente sobre los cultivos y se considera como uno de los productos bacterianos más seguros que existen (Sanahuja et al., 2011).

La cepa *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), la cual expresa una mezcla de toxinas Cry y Cyt que actúan en sinergia, es altamente activa contra mosquitos y moscas vectores de enfermedades como *Aedes aegypti* (vector de la fiebre del dengue), *Simulium damnosum* (vector de la oncocercosis), y ciertas especies de *Anopheles* (vectores de la malaria). Bti se ha implementado como un método alternativo para el control de la población de mosquitos y moscas negras debido a su alta actividad insecticida, a la falta de resistencia a Bti, a su inocuidad para organismos no blanco y a la aparición de poblaciones resistentes a insecticidas químicos (Bravo et al., 2007).

Por otro lado, el desarrollo de cultivos transgénicos que producen las proteínas Cry de Bt ha sido muy importante para la sustitución de los insecticidas químicos

por alternativas amigables con el medio ambiente. En las plantas transgénicas la toxina Cry se produce continuamente, protegiendo a la toxina de su degradación y haciéndola disponible ante insectos masticadores y perforadores. Además, el uso de cultivos resistentes a insectos ha disminuido considerablemente el uso de pesticidas (Bravo et al., 2007). Actualmente las plantas genéticamente modificadas con los genes *cry* de Bt son los cultivos transgénicos más cultivados en el mundo (Sanahuja et al., 2011).

Modo de acción de las toxinas Cry

Las toxinas Cry son toxinas formadoras de poro (TFP) que se insertan en la membrana citoplasmática de las células intestinales de las larvas del insecto blanco, lo cual provoca la lisis celular y la subsecuente muerte del insecto por inanición y/o septicemia (Sanahuja et al., 2011).

La especificidad de las toxinas para su insecto blanco y la inocuidad para los mamíferos y otros seres vivos está dada por las condiciones alcalinas extremas necesarias para su solubilización y por los receptores específicos que se encuentran solo en los insectos susceptibles (Sanahuja et al., 2011).

Las toxinas Cry son muy diversas, comprenden al menos 50 grupos con más de 200 miembros (Bravo et al., 2007). A pesar de la diversidad de sus secuencias, todas las proteínas Cry comparten la misma estructura terciaria. La porción carboxilo terminal está involucrada en la formación del cristal en la espora pero no es parte de la toxina madura y es cortada en el intestino del insecto. La porción amino terminal es la toxina activa y tiene tres dominios. El dominio I es un racimo de siete hélices α , seis de las cuales son anfipáticas y rodean a la séptima hélice hidrofóbica, este dominio es responsable de la inserción en la membrana y la formación del poro. El dominio II consiste de tres hojas β plegadas antiparalelas con regiones expuestas tipo loop, y el dominio III es un sándwich β . El dominio II y III confieren especificidad a la unión con receptores en las células del insecto y definen al hospedero en el cual las toxinas son activas (Sanahuja et al., 2011).

Actualmente existen dos modelos del mecanismo de acción de las toxinas Cry. En el primero se propone que la toxina Cry interactúa secuencialmente con sus receptores en la membrana citoplásmica de las células del intestino medio lo cual permite su subsecuente oligomerización e inserción en la membrana. Una vez ingerida por el insecto, el ambiente altamente alcalino ($\text{pH} > 9.5$) del intestino permite la solubilización del cristal que contiene a las protoxinas. Las protoxinas se activan por las proteasas del intestino y las toxinas se unen por medio del dominio II al receptor caderina, lo cual causa un cambio conformacional en la toxina que permite el corte de la hélice α -1 del dominio I. Este corte induce la oligomerización de la toxina y aumenta su afinidad por un receptor secundario que es una proteína anclada a la membrana por glicosil-fosfatidil-inositol (como la Aminopeptidasa 1 o la Fosfatasa alcalina). La unión al segundo receptor dirige al oligómero a balsas lipídicas en la membrana y permite su inserción formando un poro lítico en las células. Estos poros tienen un radio de 0.5 a 1 nm y son permeables a moléculas pequeñas como iones inorgánicos, agua, aminoácidos y monosacáridos. Su presencia en la membrana plasmática altera los gradientes iónicos transmembranales y puede llevar a la lisis celular debido al influjo masivo de agua (Pigott & Ellar, 2007; Vachon et al., 2012).

El segundo modelo sugiere que los efectos de la toxina Cry no dependen de la formación de poro. En este modelo se propone que la unión de la toxina Cry al receptor caderina en la membrana plasmática es suficiente para iniciar una cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} que promueve la activación de las proteínas G, las adenilato ciclasas y la acumulación de Adenosín monofosfato cíclico (cAMP), así como la activación de la proteína cinasa A. Lo cual conduce a la desestabilización del citoesqueleto y de los canales iónicos, así como a la muerte celular (Pigott & Ellar, 2007; Vachon et al., 2012).

Ambos modelos tienen evidencias a favor basadas en técnicas experimentales distintas, así como puntos débiles revisados recientemente. Vachon y colaboradores (2012) han hecho una fuerte crítica a ambos modelos, y concluyen que el primer modelo hace referencia a una estructura oligomérica fuera de la

membrana llamada prepore que probablemente sea un artefacto de las técnicas experimentales y que el segundo modelo no puede pasar por alto que las toxinas Cry son toxinas formadoras de poro y que su actividad depende de esto.

La muerte de la larva por Bt

En la literatura se han descrito tres mecanismos como última causa de la muerte de las larvas. El primero, una vez ingerida la toxina, la larva muere en menos de 24 horas y se atribuye directamente a la toxemia. La segunda, la ingesta prolongada de Bt lleva a un arresto en el desarrollo de la larva y, su muerte eventual se considera que ocurre por la inanición. El tercero, y más citado, es por la sepsis debida al crecimiento de Bt en el hemocele una vez que las esporas han pasado a través del intestino dañado por la toxina Cry. Sin embargo, este último carece de soporte debido a que las preparaciones de toxina Cry libre de la célula de Bt, así como la inyección directa de la toxina Cry activa al hemocele, o la alimentación con plantas transgénicas que expresan a Cry pueden matar a larvas exitosamente (Broderick et al., 2010).

Se ha propuesto que la toxina Cry no causa directamente la muerte del insecto si no que al dañar el epitelio intestinal favorece la translocación de la microbiota del intestino al hemocele causando un estallido de la respuesta inmune que últimamente es letal para el hospedero. Por ejemplo en un estudio anterior se ha demostrado que las toxinas de Bt reducen su habilidad para matar a las larvas de varias especies de lepidópteros cuando estas han sido tratadas previamente con antibióticos. También que la ingestión de bacterias entéricas no patógenas incrementa significativamente la letalidad de la subsecuente ingestión de Bt (Broderick, Raffa, & Handelsman, 2006). Además, en larvas de *Lymantria dispar* tratadas con antibiótico y con toxina Cry, la administración de peptidoglicanos, componentes capaces de prender la respuesta inmune, aumentaron la mortalidad de las larvas (Broderick et al., 2010).

En los últimos 30 años la investigación alrededor de la toxina Cry se ha centrado en la interacción con sus receptores y la formación del poro pero no se han

abordado los eventos subsecuentes que llevan a la muerte celular y del insecto (Broderick et al., 2006). En una reciente revisión sobre las toxinas Cry y su modo de acción (Vachon et al., 2012) se ha descrito la necesidad de estudiar en mayor detalle las alteraciones que causan los poros de las toxinas Cry en las vías de señalización y la regulación de las células del insecto afectado. Aunque varias vías de señalización intracelular parecen ser activadas por las toxinas Cry, el mecanismo por el cual estas vías contribuyen a la patogénesis o a la protección de los efectos deletéreos de las toxinas son aún inexplorados.

ANTECEDENTES

Respuestas celulares ante Toxinas Formadoras de Poro

Mucho de lo que se sabe hoy en día sobre el mecanismo de acción de las toxinas Cry surgió de la investigación basada en otras toxinas formadoras de poro. Si bien, la secuencia de aminoácidos de las distintas TFP no está conservada, varias de estas toxinas comparten algunos aspectos de su mecanismo de acción. En general el modo de acción de las TFP involucra el reconocimiento con sus receptores, su activación por proteasas y la inducción de cambios conformacionales para poder insertarse en las membranas celulares del hospedero produciendo los poros iónicos (Cancino-Rodezno., et al 2010). Por lo tanto para estudiar los mecanismos que podrían estar involucrados en la respuesta celular ante las toxinas Cry es necesario entender lo que se sabe de otras toxinas formadoras de poro.

Existen dos grupos principales de TFP dependiendo de la estructura que tienen las subunidades que forman el poro: las toxinas de hélice α y las toxinas de barril β . La primera clase incluye a la Colicina, la Exotoxina A, la toxina de la Difteria y a las toxinas Cry, mientras que la Aerolisina, Hemolisina α , el antígeno protector del Ántrax, las toxinas dependientes de colesterol como la Perfringolisina O y las toxinas Cyt pertenecen a las toxinas de barril β (Bravo et al., 2007). Si bien las TFP son muy heterogéneas, todas comparten un modo general de acción y sus efectos en la célula blanco dependen de su capacidad de permeabilizar la membrana celular.

Las vías de supervivencia y muerte celular forman parte de la respuesta ante las TFP

La formación de poro por las TFP permeabiliza la membrana lo que provoca cambios en la composición iónica de Ca^{2+} y/o K^+ y en la presión osmótica. Se ha observado que las células activan varios mecanismos de señalización celular a dosis subletales de TFP que podrían estar relacionados con los cambios iónicos

de Ca^{2+} y/o K^+ (Cancino-Rodezno, et al., 2010). Algunas de las respuestas celulares ante las TFP involucran a las vías de señalización del estrés celular y la respuesta inmune, así como a los procesos de la supervivencia y la muerte celular.

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), como su nombre lo indica, son proteínas serina/treonina cinasas que son activadas por mitógenos y estrés. Las cascadas de señalización de las MAPK regulan varios procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis (Chokshi et al., 2008). Existen tres familias de MAPK: las cinasas de respuesta al estrés p38, las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y las cinasas de respuesta extracelular (ERK) (Chokshi et al., 2008). Tanto la vía de señalización por JNK como por MAPK p38 han sido descritas como importantes en la respuesta de las células ante las TFP.

Se ha demostrado que el estrés osmótico producido por la formación del poro de las diferentes TFP induce la fosforilación de la MAPK p38 (Cancino-Rodezno, 2010). La activación de MAPK p38 está relacionada con el inicio de la respuesta inmune en células epiteliales, así como la regulación positiva de efectores apoptóticos, como genes de arresto de crecimiento y de daño al DNA (Chokshi et al., 2008). La activación de MAPK p38 por una TFP se describió por primera vez en *Caenorhabditis elegans* tratado con la toxina de Bt Cry5B; y ha sido descrita para otras TFP como la aerolisina, la neumolisina, la estreptolisina O, la antrolisina O y la α -hemolisina (Cancino-Rodezno, 2010).

La vía JNK se activa por el estrés ambiental. JKN activa a c-jun mediante su fosforilación y c-jun se dimeriza con c-fos para formar el factor de transcripción AP-1 (Kao et al., 2011). Los efectos apoptóticos de JNK dependen del tipo celular, el estímulo y el entorno local. Sin embargo, la mayoría de los estudios indican que JNK es pro-apoptótico (Chokshi et al., 2008). La cascada de señalización de JNK MAPK es inducida en células de mamíferos y en *C. elegans* por distintas TFP independientemente del tamaño del poro. Tanto el silenciamiento con RNAi del gen de JNK MAPK como del factor transcripcional AP-1 aumentan la

susceptibilidad de las células de mamíferos y de *C. elegans* a las TFP. En la intoxicación del nemátodo *C. elegans* con Cry5B, más del 50% de los genes activados transcripcionalmente por la intoxicación dependen de JNK para su inducción, y de la respuesta transcripcional dependiente de MAPK p38 inducida por Cry5B el 85% de los genes también los regula JNK (Kao et al., 2011). Se considera que la cascada de la señalización de MAPK JNK, actúa como un regulador central conservado de la respuesta celular ante las TFP.

La vía ERK se activa por factores de crecimiento, así como por los agentes oxidantes y los radicales libres. Se ha encontrado que ERK, al igual que MAPK p38 y JNK, puede afectar la apoptosis en formas opuestas (activando o inhibiendo) dependiendo en el tipo celular y el estímulo estudiado (Chokshi et al., 2008). Sin embargo, a diferencia de MAPK p38 y JNK, no se ha definido si ERK también está involucrada en la respuesta celular ante las TFP.

Se sabe que las cinasas MAPK p38, ERK y JNK promueven la expresión de iNOS (Bogdan, 2001). Debido a que las vías de las cinasas p38 y JNK son reguladores centrales de la respuesta transcripcional de defensa ante las toxinas Cry y otras TFP, es posible que por medio de estas vías se induzca la transcripción del gen *nos* ante la intoxicación con estas toxinas.

Las TFP inducen la apoptosis por medio de la activación de Caspasa 3

Las TFP pueden causar diferentes tipos de muerte celular dependiendo del tipo celular y de la dosis de la toxina. En general se ha encontrado que a bajas dosis las TFP inducen apoptosis mientras que a altas concentraciones pueden causar oncosis o necrosis (Cancino-Rodezno, et al., 2010). Algunos ejemplos de TFP que inducen apoptosis por medio de Caspasa 3 son la leucocidina Penton-Valentine de *Staphylococcus aureus* en los neutrófilos, la enterotoxina de *Clostridium perfringens* en las células Caco-2, en las células endoteliales la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae* y en las células HeLa la parasporina 1 de Bt (Porta, et al., 2011).

Además se ha demostrado que la actividad de formación de poro se necesita para inducir la respuesta de apoptosis, ya que las TFP mutantes afectadas en la capacidad de formar poros, o las mutantes knockout, u los organismos donde la expresión de TFP se disminuyó por RNAi no pueden inducir estas respuestas (Porta et al., 2011).

En un análisis de la expresión del mRNA del gen *caspara 3* en *M. sexta* alimentada con Cry1Ab, se encontró que las células intestinales expresan a *caspara 3* a partir de dos horas de exposición a una dosis baja de la toxina Cry1Ab y esta se sostiene hasta las 24 h (Porta et al., 2011). Sin embargo no se sabe si la caspasa 3 se activa o aumenta su actividad durante la intoxicación con Cry1Ab.

Respuestas inmunes ante las TFP

Datos recientes han mostrado que las TFP pueden actuar como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). En los mamíferos las TFP, como la neumolisina de *S. pneumoniae*, la antrolisina O de *B. anthracis* y la α -toxina de *S. aureus*, son capaces de activar a los macrófagos mediante los PRR incluyendo a los NLR y los TLR. Los macrófagos son células fagocíticas que eliminan a las bacterias mediante la activación coordinada de la oxidasa fagocítica (Nox 2), la iNOS, AMPs y proteasas. Los macrófagos también son los encargados de producir citosinas pro-inflamatorias e inmunoregulatoras (Bebien et al., 2012).

En los insectos las células análogas a los macrófagos son los hemocitos de la hemolinfa que junto al cuerpo graso son los órganos más importantes en la respuesta inmune. Sin embargo los epitelios también tienen una respuesta inmune humoral muy importante ante el daño local e influyen directamente en la respuesta inmune sistémica (Eleftherianos et al., 2010). Las toxinas Cry podrían estar prendiendo respuestas inmunes locales o sistémicas al causar daño al epitelio intestinal en insectos susceptibles.

Las TFP inducen el ensamble del inflamosoma y promueven la activación de Caspasa 1

El eflujo de K^+ causado por algunas TFP está ligado al ensamble del inflamosoma y la activación de la caspasa 1 (Cancino-Rodezno et al., 2010). Varios patógenos bacterianos activan a la caspasa 1 mediante la secreción de sus TFP. *S. aureus* con la toxina hemolisina α , *S. pneumoniae* con la toxina pneumolisina, la toxina letal de *B. anthracis*, y la hemolisina de *Vibrio cholerae*. Otras toxinas bacterianas también inducen la activación del inflamosoma como la toxina B del Cólera, la toxina Adenilciclase y las toxinas A y B de *Clostridium difficile*. Dado que estas toxinas tienen mecanismos diferentes de acción, no está claro cómo activan al inflamosoma, sin embargo se han propuesto varias teorías que incluyen cambios en la concentración intracelular de K^+ y Na^+ debido a la formación de los poros en las membranas celulares, la producción de especies reactivas de oxígeno y el daño mitocondrial (Franchi et al., 2012).

La activación de Caspasa 1, causa un tipo de muerte celular programada en macrófagos llamada piroptosis. La piroptosis ha sido descrita como un mecanismo de la respuesta inmune en contra de patógenos como *Salmonella*, *Legionella*, *Pseudomonas* y *Shigella* (Buzzo et al., 2010). La activación de Caspasa 1 y la muerte por la piroptosis ha sido observada en los macrófagos tratados con TFP como la estreptolisina, la neumolisina y la toxina del ántrax (Franchi et al., 2012).

La caspasa 1 está involucrada en la activación del metabolismo de lípidos y en mamíferos se ha visto que las TFP inducen la activación de factores de transcripción importantes para la biogénesis de la membrana (Cancino-Rodezno, et al., 2010).

Se ha reportado que en larvas de *M. sexta* se induce transitoriamente la transcripción de *caspasa 1* a una dosis media y baja de la toxina Cry1Ab, aunque no se sabe si esto se correlaciona con un aumento en su actividad (Porta et al., 2011).

El NO y los AMP son efectores importantes de la respuesta inmune innata de los insectos contra patógenos

El intestino es una barrera esencial que protege tanto a animales vertebrados como invertebrados de la invasión de los microorganismos. La disrupción del balance entre la microbiota del intestino y el huésped resulta en que las bacterias del intestino provoquen respuestas similares a esas causadas por patógenos invasores en el hospedero (Broderick et al., 2010). Este desbalance puede ser causado por agentes biológicos como patógenos o toxinas y por agentes físicos. El daño a la barrera intestinal causado por la toxina Cry podría tener consecuencias en el estado inmune del insecto afectado.

Existen evidencias de que la respuesta inmune participa en la defensa del insecto ante las toxinas Cry. Estudios previos sugieren que la tolerancia del lepidóptero *Ephestia kuehniella* a las toxinas Cry de Bt se correlaciona con un estado inmune elevado. Sin embargo se ha demostrado que la melanización de la hemolinfa de una cepa resistente a Bt de *E. kuehniella*, que se correlaciona con la activación de la pro-fenol oxidasa, no es la responsable de la tolerancia a Bt en el intestino (Rahman et al., 2007). Es posible que otros mecanismos inmunes estén involucrados en la tolerancia a Bt, probablemente respuestas humorales del intestino ya que es el órgano dañado por la toxina.

Existen otras evidencias de la modulación del sistema inmune del hospedero por las toxinas de Bt. La ingestión de dosis medias (LC₅₀) de Bt por larvas de *Galleria mellonella* incrementaron los niveles de estrés oxidativo en el intestino (Dubovskiy, Martemyanov, et al., 2008) y dosis bajas de Bt (LC₅ y LC₁₅) aumentaron la actividad fagocítica de los hemocitos (Dubovskiy, Krukova, & Glupov, 2008). En larvas de *Trichoplusia ni*, la exposición a toxinas de Bt redujo el número de hemocitos y componentes del sistema inmune humoral (AMPs y PPO) (Ericsson, Janmaat, Lowenberg, & Myers, 2009). En larvas de *L. dispar* se encontraron cambios en la hemolinfa causados por la ingestión de toxinas Bt: el número de hemocitos disminuyó y se encontraron defectos en los hemocitos como falta de propiedades adhesivas, inclusiones citoplasmáticas y signos de membranas rotas

(Broderick et al., 2010). Se cree que la modulación del sistema inmune del hospedero podría ser un efecto indirecto por el cual la microbiota del intestino altera la susceptibilidad a Bt.

Algunos inhibidores de la respuesta inmune innata reducen la mortalidad de *L. dispar* tratada con toxinas de Bt. Entre estos inhibidores se encuentran moléculas que actúan como atrapadores (scavengers) de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como la S-metil-L-tiocitrulina, la N-acetil cisteína, y el glutatión. (Broderick et al., 2010). Esto sugiere que la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno podría estar involucrada en la susceptibilidad ante las toxinas de Bt.

Por otro lado la enzima NOS es un componente del sistema inmune de insectos cuya síntesis y actividad contribuye a la resistencia de los insectos contra patógenos. El tratamiento con RNAi contra *nos* o la manipulación farmacológica de la actividad de NOS reducen los niveles de NO en el intestino del lepidóptero *M. sexta* infectados oralmente con la bacteria patógena *Photobacterium* y promueve la translocación de las bacterias a la hemolinfa por la pared del intestino, disminuyendo la supervivencia de las larvas (Eleftherianos et al., 2010). El gen *nos* se activa transcripcionalmente en el intestino de *A. gambiae* tanto por bacterias como por el parásito de la malaria, lo cual controla el crecimiento de ambos patógenos (Dimopoulos, et al., 1998). En *Drosophila*, la infección con bacterias gram negativas induce la expresión de *nos* y la inhibición de la actividad de NOS incrementa la mortalidad de las moscas (Herrera-Ortiz et al., 2011). En una línea celular derivada del lepidóptero *Estigmene acreae* la actividad de NOS se incrementó hasta tres veces debido a la infección con bacterias patógenas o la adición de lipopolisacáridos bacterianos (Davies, 2000).

Los efectores más estudiados del sistema inmune de insectos son los AMP (Eleftherianos et al., 2010). En el gusano de la seda *Bombyx mori* se han descrito seis familias de AMP: cecropinas, atacinas, lebecinas, moricinas, gloverinas y defensinas (Tanaka et al., 2012). En *M. sexta* se han detectado algunos AMP, como las lebecinas, las moricinas y las gloverinas, y al analizar su regulación

transcripcional se ha mostrado que se inducen en respuesta a una infección (Kanost et al., 2004). Otras proteínas que forman parte de la respuesta inmune innata de *M. sexta* y se regulan positivamente en respuesta a una infección, incluyen a las lisozimas, las hemolinas y las proteínas de reconocimiento de glucanos (β GRP1 y 2) (Kanost et al., 2004). La expresión de la *atacina*, la *lebocina* y la *moricina* se induce en los hemocitos y el cuerpo graso de las larvas de *M. sexta* a través de la vía Toll, 24 h después de la inyección de lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico y el peptidoglicano (Xu et al., 2012). En el cuerpo graso de *M. sexta* se induce la expresión de la *lebocina* y la *moricina* por el peptidoglicano tipo DAP de *E. coli* pero no la de la *atacina* o la *cecropina* y su expresión depende del TLR (Zhong et al., 2012).

La producción del NO influye en la expresión de genes de la respuesta inmune como los AMP. El NO exógeno induce la producción del AMP diptericina en larvas de *Drosophila* (Foley & O'Farrell, 2003). En *B. mori* la inyección con un donador de NO induce la expresión del gen de la *cecropina B* (Imamura, Yang, & Yamakawa, 2002). En los mosquitos *A. albimanus* infectados con *Plasmodium berghei* se inducen en el intestino y el cuerpo graso, los genes de *atacina*, *cecropina* y *gambicina* lo cual se correlaciona con un incremento en los niveles de NO y H₂O₂ en la hemolinfa. Además el tratamiento de los mosquitos con el inhibidor de NOS, nitroarginina metil ester (NAME), redujo el efecto de la infección de *P. berguei* en la expresión de los AMP, mientras que el NO exógeno indujo su expresión (Herrera-Ortiz et al., 2011).

La disrupción de la barrera intestinal causa que la microbiota local prenda respuestas inmunes del hospedero como las que causarían agentes patógenos (Broderick et al., 2010). Por lo tanto, es posible que el daño causado por la toxina Cry en el intestino de insectos susceptibles induzca estas mismas respuestas reguladas por la producción de NO.

En este proyecto se analizó si el NO participa en la respuesta del insecto a la intoxicación con la toxina Cry1Ab y mediante qué mecanismos, respuesta inmune y/o apoptosis. Usando como modelo de estudio al gusano del tabaco *M. sexta*

(Lepidoptera) y como marcadores de la respuesta inmune la actividad de caspasa 1 y la expresión de AMPs, y como marcador de la apoptosis la actividad de caspasa 3.

HIPÓTESIS

Las larvas de *M. sexta* producen NO en respuesta a la intoxicación con la toxina Cry1Ab de forma local (intestino) y/o sistémica (hemolinfa).

El NO producido por las larvas de *M. sexta* en respuesta a la toxina Cry regula mecanismos involucrados en la inflamación, la apoptosis y la producción de péptidos antimicrobianos.

JUSTIFICACIÓN

Las toxinas Cry son proteínas con actividad insecticida producidas por la bacteria *B. thuringiensis*. A diferencia de los insecticidas químicos, estas toxinas son altamente específicas para ciertos insectos, siendo inocuas para otros seres vivos y por su naturaleza proteica son biodegradables; por lo tanto son una herramienta biotecnológica amigable con el medio ambiente. Las toxinas Cry han resultado muy eficientes en el combate de insectos plaga de cultivos y en el control de insectos transmisores de enfermedades, ambos económicamente importantes (Bravo et al., 2007).

En el pasado el estudio de las bases biológicas de la acción de la toxina Cry ha llevado a mejoras en la tecnología existente en torno a este bioinsecticida y a contender contra la resistencia que ha surgido en el campo (Sanahuja et al., 2011). Recientemente se ha mencionado la necesidad de estudiar los efectos posteriores a la formación de los poros en la membrana de las células epiteliales del insecto ya que es un campo poco explorado (Vachon et al., 2012).

Si bien el mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha estudiado ampliamente, poco se sabe sobre la respuesta de las células del insecto. El sistema inmune es parte primordial de esta respuesta y por lo tanto se decidió investigar si el NO participaba ante el daño causado por las toxinas Cry.

Un mejor entendimiento de la biología básica entre la toxina y su insecto blanco permitirá optimizar el uso de Bt.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Analizar si el NO se induce en respuesta a la intoxicación con la toxina Cry1Ab y si esta molécula regula la síntesis de AMP, y la síntesis y actividad de caspasa 1 y 3 en *M. sexta*.

Objetivos particulares

- Medir la producción de NO durante el desarrollo larvario de *M. sexta*
- Calcular la dosis letal media de la toxina Cry1Ab en larvas de *M. sexta* de segundo instar.
- Medir la producción de NO en bioensayos con la toxina Cry1Ab, con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa NAME (L-N-G-nitroarginina metil ester), y con el donador de NO, Nitroprusiato de Sodio (NPS), en intestino y en hemolinfa.
- Analizar la mortalidad de las larvas de *M. sexta* alimentadas con Cry1Ab, con NAME y con NPS.
- Analizar la expresión a nivel transcripcional de *nos* en el intestino de larvas intoxicadas con Cry1Ab en el intestino.
- Analizar la expresión a nivel transcripcional de los genes de los péptidos antimicrobianos *lebocina*, *atacina* y *moricina* en el intestino en bioensayos con Cry1Ab.
- Analizar la expresión a nivel transcripcional de *caspasa 1* y *3* en el intestino de larvas intoxicadas con Cry1Ab y si esta depende de la producción de NO.
- Medir la actividad de Caspasa 1 y 3 en el intestino de larvas intoxicadas con Cry1Ab y si esta depende de la producción de NO.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioensayos

En los bioensayos realizados en este trabajo se emplearon larvas de *Manduca sexta* de segundo hasta cuarto instar obtenidas del insectario del laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para los bioensayos se emplean cajas con 24 pozos de 2 cm² de área cada uno, que contienen una dieta sólida artificial (ver apéndice).

Se coloca una larva por pozo en dieta contaminada con los siguientes tratamientos: control (agua), toxina Cry1Ab, NAME (L-N-G-nitroarginina metil ester 2 mg/ml de medio) y NPS (nitroprusiato de sodio 26 µg/cm²). Las toxinas y el nitroprusiato de sodio se preparan en solución con agua y se añaden 35 µl por pozo sobre la superficie de la dieta solidificada, se distribuye uniformemente y se deja secar. El NAME se añade en la mezcla líquida para preparar la dieta a la concentración indicada.

Las toxinas Cry en su forma soluble, se obtienen por medio de gradientes de sacarosa (ver apéndice). Las protoxinas solubles las preparó amablemente la Bioquim. Gladys Jiménez del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Para la disección de intestino y la extracción de hemolinfa, las larvas son colocadas en una caja Petri y se lavan con una disolución de etanol 70% y posteriormente con PBS, son secadas en papel absorbente. La extracción de hemolinfa e intestino se realiza bajo el microscopio estereoscópico y las larvas se colocan sobre la superficie de una caja petri con hielo. Se corta el cuerno de las larvas, se extraen las gotas de hemolinfa con la micropipeta y se colecta en un tubo Eppendorf en hielo. Para disectar el intestino, se corta la cabeza y la cola de la larva y se extrae con ayuda de pinzas de disección, se desliza la parte plana de una punta de micropipeta sobre el intestino para eliminar el bolo alimenticio y el intestino se coloca en un tubo Eppendorf sobre hielo con PBS (200 µl para 24 intestinos). Las muestras son almacenadas a -70°C hasta su análisis.

Para determinar la producción de NO durante el desarrollo de las larvas de *M. sexta* se seleccionan larvas de segundo instar. Se colocan en cajas de 24 pozos con dieta normal y cada 24 h se extrae hemolinfa e intestinos de 24 individuos durante 7 días.

Para determinar la concentración letal media (LC₅₀) de Cry1Ab en larvas de segundo instar, se emplean dosis crecientes de protoxina soluble (0, 0.5, 1, 2, 4, 6 ng/cm²). Se utiliza una caja con 24 larvas por cada dosis y se registra el porcentaje de mortalidad a los 7 días. Los porcentajes de mortalidad y su relación con la dosis de la protoxina se analizan mediante la función estadística Probit (POLO PLUS) que calcula las concentraciones letales (LC) 10, 50 y 90; es decir las dosis a las cuales el 10%, 50% o 90% de la muestra muere a los 7 días, respectivamente.

Para medir la producción de NO y la actividad de caspasas inducidos por la protoxina Cry1Ab, se alimenta a las larvas de *M. sexta* con una dieta contaminada con protoxina soluble a una LC₅₀ (Cry1Ab 2.1 ng/cm²) y se colectan los intestinos después de 24 h de tratamiento. Como control negativo se alimenta a las larvas con dieta normal. Se disectan los intestinos de 24 larvas por tratamiento.

Para medir la transcripción de diferentes péptidos antimicrobianos, se colectan 24 intestinos en TRIzol® Reagent de tratamientos similares a los descritos arriba para posteriormente extraer RNA.

Para analizar la viabilidad de las larvas de *M. sexta* alimentadas con los diferentes compuestos y toxinas mencionados arriba, simultáneamente se realizan bioensayos por triplicado y el porcentaje de mortalidad se calcula a los 7 días de iniciado el tratamiento. Los resultados se analizaron con una prueba de χ^2 .

Extracción de DNA de los intestinos de *M. sexta*

Se emplea el método de Plant DNAzol® Reagent (Invitrogen). El intestino de *M. sexta* se homogeniza en 300 μ l de DNAzol con un rotor automático. Se incuba 5 minutos a 25 °C con agitación. Se añaden 300 μ l de cloroformo, se mezcla y se

incuba a 25 °C por 5 minutos con agitación. Se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min (Eppendorf Microcentrifuge 5430/R) y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo. Para precipitar el DNA se añaden 225 µl de etanol al 100% y se mezcla por inversión 6 veces. Se incuba a temperatura ambiente por 5 min y se centrifuga a 5,000 rpm por 4 min. Para lavar la pastilla se remueve el sobrenadante y se añaden 170 µl de DNazol y 130 µl de etanol. Se mezcla con el vórtex y se incuba por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifuga a 5,000 rpm por 4 min. Se remueve la solución y se lava la pastilla con una mezcla de 300 µl de etanol al 75%. Se centrifuga a 5,000 rpm por 4 min. Para solubilizar el DNA se remueve el etanol y se seca la pastilla al aire. Se disuelve la pastilla de DNA en 70 µl de agua. Se mide la concentración de DNA por medio del equipo NanoDrop (Thermo Scientific) y se diluye con agua para llevarlo a una concentración de 1 µg/µl. Se guarda a -20° C hasta su uso.

Extracción de RNA de los intestinos de *M. sexta*

Para extraer el RNA de los intestinos de las larvas se emplea el método de TRIzol® Reagent (Invitrogen). Se homogenizan 24 intestinos en 400 µl de TRIzol® Reagent con un rotor automático en un tubo Eppendorf de 1.5 ml en hielo. Se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min para remover el material insoluble. Se recupera el sobrenadante y se incuba a temperatura ambiente por 5 min. Se añaden 80 µl de cloroformo, se mezcla por 15 segundos (s) y se incuba a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifuga a 12,000 rpm por 15 min a 4°C (Eppendorf Microcentrifuge 5430/R). La fase acuosa se recupera en un tubo nuevo y se le añaden 200 µl de isopropanol para precipitar el RNA. Se incuba a temperatura ambiente por 10 min y se centrifuga a 12,000 rpm por 10 min a 4°C. Se remueve el sobrenadante y se lava la pastilla de RNA con 400 µl de etanol al 75%, se mezcla con vórtex y se centrifuga a 7500 rpm por 5 min a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se seca la pastilla a temperatura ambiente. La pastilla seca se resuspende en 50 µl de agua libre de RNAsas y se incuba 10 min a 65°C. Se calcula la concentración de RNA por medio del equipo NanoDrop (Thermo

Scientific) y se diluye una muestra con agua a una concentración de 1 µg/µl. Se almacena a -20°C hasta ser usado.

Síntesis de cDNA

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. En un tubo de PCR se agregan 2 µl de la dilución de RNA (1 µg/µl), 1 µl de oligo dT (500 mg/µl) y 9 µl de agua destilada. La mezcla se incuba por 5 min a 65 °C. Posteriormente se agregan 2 µl de DTT (0.1M), 4 µl de buffer 5X First Strand y 1 µl de una mezcla de dNTPs (desoxiribonucleótidos trifosfato) 10 mM cada uno (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a pH neutro y se incuba por 2 min a 37 °C. Se agrega 1 µl de M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) y se incuba a 37 °C por 50 min. Se inactiva la reacción a 70 °C por 15 min.

Reacción de la Polimerasa en cadena (PCR)

La reacción se hace en un volumen final de 50 µl. En un tubo de PCR se agregan 5 µl 10X buffer de PCR [Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM], 3 µl MgCl₂ 25 mM, 1 µl de la mezcla de dNTPs 10 mM, 1 µl de primer F (10 pm/µl), 1 µl de primer R (10 pm/µl), 2 µl de DNA *Taq* polimerasa, 2 µl de cDNA y 35 µl de agua destilada. La reacción se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones: 94 °C 2 min para desnaturalizar, 55 °C por 30 s para el apareamiento de primers con el cDNA, 68 °C (10 s por cada 100 pb de producto deseado) para extensión, 72 °C por 3 min para terminación. La reacción se lleva a cabo en 25 o 30 ciclos.

Los oligonucleótidos usados como primers se diseñan con base en la secuencia de DNA codificante de cada gen (ver tabla 1).

Electroforesis de DNA

Para observar los productos de PCR amplificados, se añaden 5 µl de buffer de carga a 50 µl de reacción de PCR y se mezcla. Se analiza en geles al 2% de agarosa en Buffer TAE. Se carga de 5-10 µl de reacción de PCR por pozo. Como marcador de masa molecular se emplea 1.5 µl del O'Gene Ruler 100pb Plus DNA ladder (Fermentas). Los geles se corren a 80 V por 50 min. Se tiñen en una

solución de bromuro de etidio por 10 min. Se destiñen en agua por 10 min y se observan con luz UV.

Gen	Secuencia	Primers	Producto amplificado (pb)
<i>atacina 2</i>	AY232304	F 5'- GTCGTCCTGGTCTGTCTTCTCG-3' R 5'- AAGAACTTGGAGAGGGAGAAGCC-3'	602
<i>caspara 1</i>	HM234675	F 5'- GTGATGAAGGCGACGCATGG-3' R 5'-GGTTTACCAGCAAGTGTGGGA-3'	450
<i>caspara 3</i>	*	F 5'-ACGAAGATGTCTGAAGCTCTGAAT-3' R 5'-ACGAAGATGTCTGAAGCTCTGAAT-3'	282
<i>lebocina</i>	GU563901	F 5'-GGAGATCAACCTTTATGGCTGTACC-3' R 5'-CGATTGTATCCCGGATGAGTAGC-3'	269
<i>moricina</i>	AY232301	F 5'-GGCTATAAAGCAGGCTGGCAAGG-3' R 5'-CGAAGGGAGAACGGCAGGCATAA-3'	259
<i>nos</i>	AF062749	F 5'-CACGCAAGCGACATTACAGTGC-3' R 5'-CGCTATGTTACCTCCACTAACG-3'	1235
<i>rpS3</i>	U12708	F 5'-CCGATCGGAGATCATCATCATGGCC-3' R 5'-GCAACCGCGCGCTTCAGACTCC-3'	271

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos usados como primers en este trabajo.

Se describe el nombre del gen y el número de anotación de su secuencia en Gene Bank, así como la secuencia de los oligonucleótidos que se usaron como primers para la amplificación de un fragmento de cada gen por RT-PCR, y el tamaño del producto amplificado en pares de bases (pb). * Primers diseñados a partir de la secuencia

codificadora para caspasa 3 identificada en el contig de *M. sexta* ctg7180001055914 (Porta et al., 2011).

Extracción de la proteína de los intestinos de *M. sexta*

Los intestinos colectados en PBS se muelen con un rotor automático manteniéndolos en hielo. Para separar los restos celulares, las muestras se centrifugan a 13,200 rpm durante 10 min a 4 °C (Eppendorf Microcentrifuge 5430/R). El sobrenadante se colecta en tubos nuevos y la proteína se cuantifica mediante el método de Bradford. El extracto celular se usa para cuantificación de nitritos y nitratos mediante la reacción de Griess y para medir la actividad de caspasas.

Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realiza mediante el método de Bradford el cual se basa en la unión del colorante Azul de Coomassie a las proteínas y se mide mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976). Se prepara un blanco con 1 ml de agua y 200 µl de reactivo de Bradford y un estándar de referencia con 5 µl de BSA (albúmina sérica bovina), 995 µl de agua y 200 µl de reactivo de Bradford. Para las muestras se emplean 5 µl de extracto celular en 995 µl de agua y 200 µl de reactivo de Bradford por duplicado. Se lee en el espectrofotómetro a 595 nm y se calcula la concentración de proteína en las muestras usando como referencia la lectura y concentración de BSA.

Medición de nitritos y nitratos mediante la reacción de Griess

En el método de Griess los nitritos reaccionan con sulfamida en medio ácido formando una sal diazotada transitoria, este intermedio reacciona con n-naftil-etilendiamida generando un compuesto azo estable. El color rosa-púrpura del producto permite que el ensayo para medir nitritos sea muy sensible (0.5 µM). La densidad óptica del compuesto azo es linealmente proporcional a la concentración de nitritos. El espectro de absorción del producto colorido es máximo entre 530-

550 nm, sin embargo un filtro de 570 también puede ser usado para detectarlo. La reacción de Griess solo mide concentración de nitritos, así que para poder medir nitratos es necesario reducirlos previamente. Entre los métodos más comunes para la reducción de nitratos a nitritos se encuentra el uso de la enzima nitrato reductasa (Tarpey et al., 2004).

Para la medición de NO se usa el kit Nitrate/nitrite Assay kit Colorimetric (Sigma) el cual se basa en la reacción colorida de Griess. Para reducir nitratos a nitritos se añadieron 3.75 μ l de Nitrato reductasa y 3.75 μ l del Cofactor (NADPH) a 30 μ l de extracto celular y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se añaden 18.75 μ l de reactivo de Griess A (sulfamida) y después de 5 min se añaden 18.75 μ l de reactivo de Griess B (naftilenetilamida). Se incubó por 10 min a temperatura ambiente para el desarrollo de la reacción colorida. Se centrifugan las muestras por 10 min a 12,000 rpm (Eppendorf Microcentrifuge 5430/R) para eliminar las proteínas precipitadas por los reactivos ácidos que interfieren en la lectura. Se coloca el sobrenadante en la placa y se lee a una longitud de onda de 570 nm. Se prepara una curva estándar de concentración de nitritos (μ M) a partir de una solución de NaNO_3 . En base a la curva se calcula la concentración de nitritos en las muestras. La concentración de nitritos es ajustada a la proteína total de las muestras para fines comparativos (100 μ g/ 30 μ l). Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Medición de la actividad de Caspasa 1

Se usó el kit Caspase 1 Assay Kit Colorimetric (Abcam®) el cual se basa en el uso del sustrato específico para caspasa 1 (YVAD) etiquetado con el cromóforo p-nitroanilina (pNA). Cuando el sustrato es cortado por caspasa 1 presente en una muestra biológica se libera pNA. El color amarillo que produce pNA libre se monitorea a una longitud de onda de 405 nm. La densidad óptica (D.O.) es proporcional a la cantidad de caspasa 1 activa presente en la muestra.

Las muestras de extracto celular del intestino se diluyen hasta una concentración de 80 μ g en 25 μ l. En una placa de poliestireno transparente de 96 pozos con

fondo plano se añaden por pozo: 25 µl de muestra, 25 µl de 2x Reaction Buffer DTT 10 mM y 2 µl de sustrato YVAD-p-NA (4 mM). Se incubó a 37 °C por 2 h y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. Todas las reacciones se realizan por duplicado y los resultados indican el incremento de la densidad óptica (D. O.) con respecto al control. Los resultados se analizaron con un Análisis de Variancia (ANOVA) de una o dos vías y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Medición de la actividad de Caspasa 3

Se usa el kit CaspACE™ Assay System Colorimetric (Promega) el cual se basa en el mismo principio que el kit para caspasa 1. Las muestras de proteína de intestino se ajustaron a 50 µg de proteína en 20 µl de muestra. En una placa de poliestireno transparente de 96 pozos con fondo plano se añade por pozo: 20 µl de muestra, 32 µl de Buffer para caspasa 3, 2 µl de DMSO, 10 µl de DTT (100 mM), 34 µl de agua y 2 µl del sustrato específico para caspasa 3 (DEVD-pNA). Adicionalmente se prepara una reacción similar pero que lleva el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK a una concentración final 50 µM. Se incubó la placa por 4 h a 37 °C y se lee a una longitud de onda de 405 nm. Todas las reacciones se realizan por duplicado y los resultados indican el incremento en la densidad óptica (D. O.) con respecto al control. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

RESULTADOS

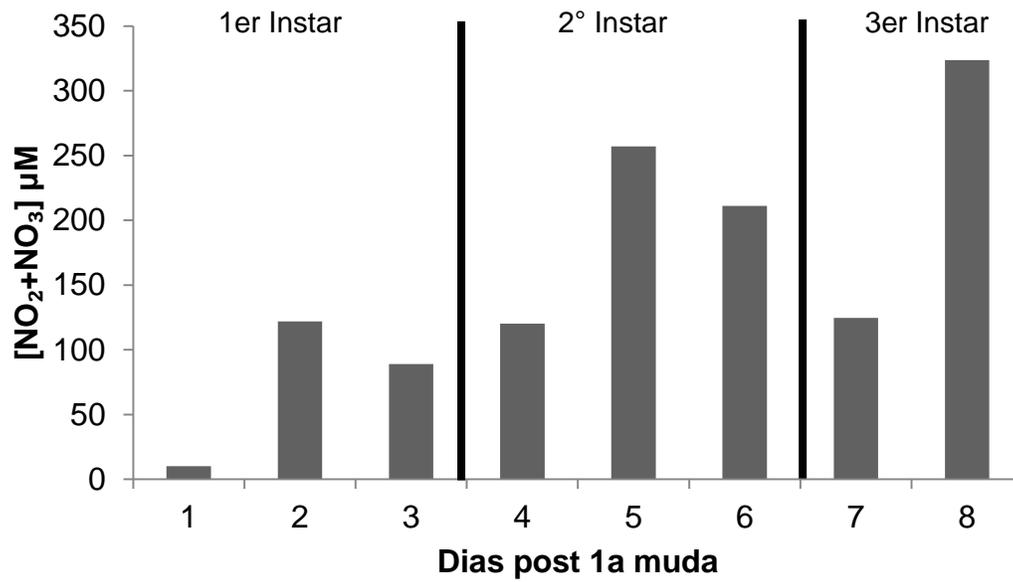
Las larvas de *M. sexta* producen NO durante su desarrollo

Se analizó la producción de NO desde el segundo instar hasta el cuarto instar (ver anexo “Ciclo de vida de *Manduca sexta*”) para identificar el periodo de desarrollo en el que la producción de NO basal en intestino y hemolinfa fuera mínima y así poder analizar posteriormente el efecto de la toxina sin tener un fondo del NO producido debido al desarrollo.

Si bien se hizo por triplicado el experimento, solo se muestran los resultados de un ensayo debido a que los resultados no son comparables entre si al haber usado métodos distintos para la cuantificación de nitritos y nitratos. En la figura 4 se muestran los resultados de una medición representativa, en los tres experimentos independientes se mostró la misma tendencia aunque la escala era distinta.

Como se muestra en la figura 4a, en el intestino los resultados mostraron que los valores de NO medidos como concentración de nitritos más nitratos a las 24 horas después de iniciado el experimento son los más bajos (10 μM). En este punto las larvas han pasado a segundo instar. Los niveles son bajos al inicio y termino de un instar, mientras que en la fase media los niveles aumentan. Por ejemplo al pasar al tercer instar el nivel de NO es de 120 μM , al siguiente día subió a 260 μM y durante el último día del tercer instar baja a 210 μM . Durante el cuarto instar los niveles de NO suben hasta una concentración máxima de 324 en el segundo día. En la hemolinfa (Fig. 4b) la concentración de NO es significativamente más alta que en el intestino (~ 5 veces más alta). En la hemolinfa los resultados mostraron que los valores de NO medidos como concentración de nitritos + nitratos a las 24 horas después de iniciado el experimento son los más bajos (64 μM). En este punto las larvas han pasado a segundo instar. Al pasar al tercer instar el NO se incrementa y durante este instar los valores de nitritos + nitratos se mantienen relativamente constantes (370 μM). Al pasar al cuarto instar los valores incrementan más del doble (937 μM) con respecto al tercer instar, y se mantienen en aumento a las 48 horas del cuarto instar. En general, la concentración de nitritos + nitratos en el intestino y la hemolinfa aumenta durante el desarrollo larvario, siendo más baja durante el segundo instar temprano. Por lo tanto decidimos trabajar con larvas de *M. sexta* de segundo instar temprano (primer día post-muda), donde la producción de NO basal es menor y las larvas son sensibles a dosis bajas de la toxina Cry1Ab.

A) Intestino



B) Hemolinfa

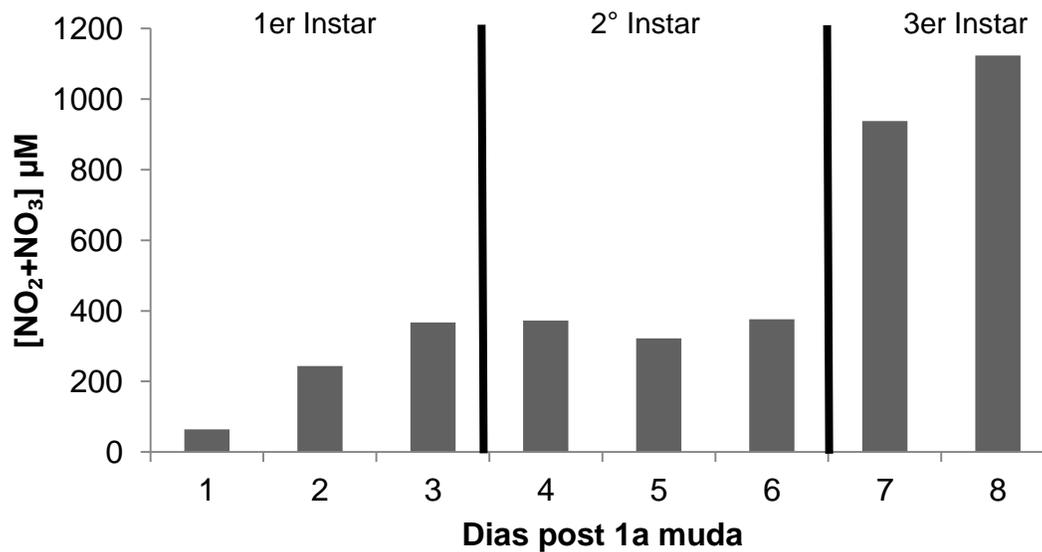


Figura 4. Producción de NO durante el desarrollo en *M. sexta*. Concentración de nitritos + nitratos a partir del 2° instar cada 24 h en A) el intestino, y B) la hemolinfa. Medición representativa.

Determinación de una dosis subletal de toxina Cry1Ab para *M. sexta* de segundo instar

En la figura 5 se muestra la mortalidad a los 7 días de intoxicación con la toxina Cry1Ab soluble en dosis crecientes. De estos datos se obtuvo mediante la prueba estadística Probit la tabla 2 que muestra las concentraciones letales (LC) a las cuales muere una décima parte de la muestra (LC₁₀), la dosis letal media (LC₅₀) y la dosis a la que muere el noventa por ciento de la muestra (LC₉₀) en un período de 7 días.

En los bioensayos siguientes se decidió usar una dosis media LC₅₀ (2.1 ng/cm²) y medir a las 24 h después de intoxicar; ya que es una dosis suficientemente alta para desencadenar respuestas de daño sin que las larvas mueran en ese periodo de tiempo.

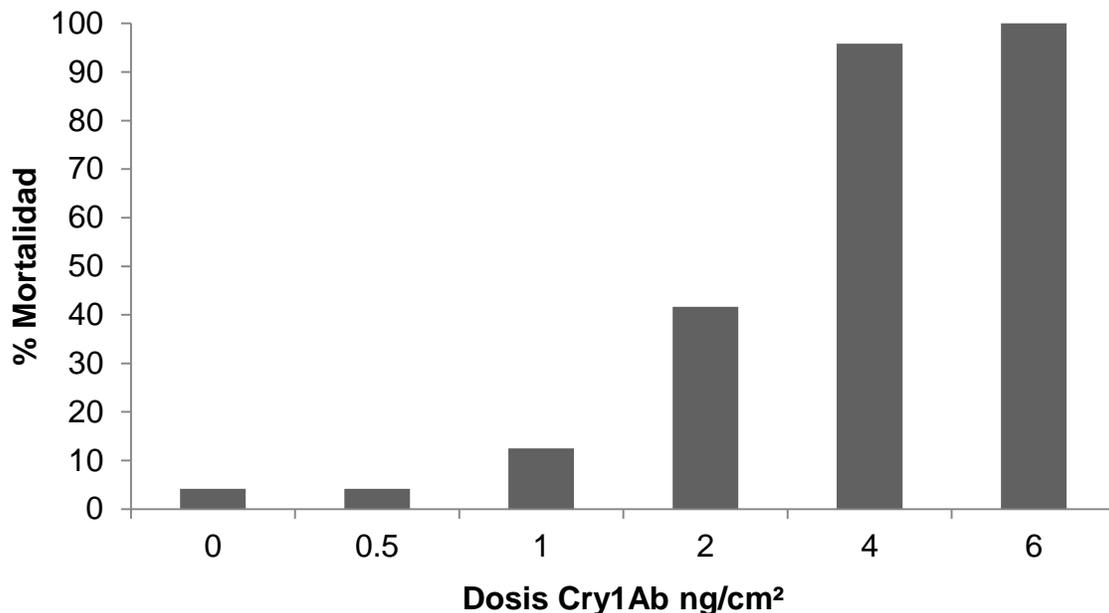


Figura 5. Bioensayo para determinar la concentración letal media (LC₅₀) de Cry1Ab en larvas de *M. sexta* de 2º instar. Mortalidad de las larvas (24 larvas por dosis) con dosis crecientes de protoxina soluble de Cry1Ab a los 7 días de intoxicación.

Dosis letal	Cry1Ab (ng/cm ²)
LC ₁₀	1.3
LC ₅₀	2.1
LC ₉₀	3.6

Tabla 2. Concentraciones letales de Cry1Ab para larvas de *M. sexta* de 2° instar. Las concentraciones letales (ng de protoxina soluble Cry1Ab en cm² de dieta) a las cuales la toxina Cry1Ab mata al 10% (LC₁₀), 50% (LC₅₀) y 90% (LC₉₀) de las larvas en una semana, fueron calculadas a partir del análisis con la prueba Probit de la mortalidad de las larvas intoxicadas con dosis crecientes de la protoxina soluble Cry1Ab.

La toxina Cry1Ab induce la producción de NO por medio de la NOS en el intestino pero no en la hemolinfa

Para analizar si la toxina incrementaba los niveles basales de NO en las larvas de segundo instar, se realizaron tres bioensayos independientes, cada uno incluyó una muestra de 24 larvas intoxicadas con 1) Cry1Ab, 2) con el inhibidor de la NOS, NAME, 3) Cry1Ab + NAME 4) con NPS que es un donador de NO (control positivo) ó 4) larvas alimentadas con dieta normal. En la figura 3 se muestra la medición de nitritos + nitratos en el intestino y la hemolinfa.

La concentración de nitritos + nitratos en el intestino (Fig. 6A) de larvas control alimentadas con dieta normal fue de 8.2 µM. En las larvas alimentadas con toxina Cry1Ab (LC₅₀) se observó que el nivel de nitritos + nitratos en el intestino es de 31.6 µM, lo que representa un incremento de 4 veces con respecto al control. Para demostrar que el incremento en la concentración de nitritos + nitratos producido por la ingestión de la toxina Cry1Ab depende de la actividad enzimática de la NOS, se alimentaron larvas de *M. sexta* con una dieta contaminada con toxina Cry1Ab y NAME. La administración del inhibidor NAME disminuyó la concentración de nitritos + nitratos (4.5 µM) a una concentración basal igual a la del control con respecto a las larvas intoxicadas con Cry1Ab. Lo cual indica que la producción de NO observado durante la ingestión de la toxina Cry1Ab depende de la actividad de la NOS. Se observó que la concentración de nitritos + nitratos en

las larvas tratadas solo con NAME fue similar a la del control sin NAME, lo cual sugiere que los niveles basales de nitritos + nitratos no dependen de la actividad de NOS. Como control positivo del ensayo para medir NO, las larvas se alimentaron con NPS; los niveles de nitritos + nitratos aumentaron con respecto al control como se esperaba. En la hemolinfa (Fig. 6B) no hay cambios significativos en la producción de NO en ninguno de los tratamientos, por lo tanto el efecto de la toxina Cry1Ab en la producción de NO está limitado al intestino.

El NO es tóxico para *M. sexta*

En el experimento anterior se analizó el porcentaje de mortalidad a los 7 días como control de la toxicidad de la protoxina Cry1Ab. En la figura 7 se puede observar que la LC_{50} de Cry1Ab mató a la mitad de las larvas como se esperaba. El tratamiento con el inhibidor NAME no es tóxico para las larvas ya que el porcentaje de mortalidad es similar al del control. El NO fue tóxico para las larvas de *M. sexta* como lo muestra el uso de NPS. Además, cuando se alimentó a las larvas con toxina Cry1Ab y NAME, la mortalidad disminuyó (20%) con respecto a las larvas tratadas solo con Cry1Ab. Este resultado estuvo relacionado muy probablemente con la disminución del NO. Por lo tanto el NO producido por la intoxicación con Cry1Ab es tóxico para *M. sexta* y constituye un elemento importante en la mortalidad causada por la toxina Cry1Ab.

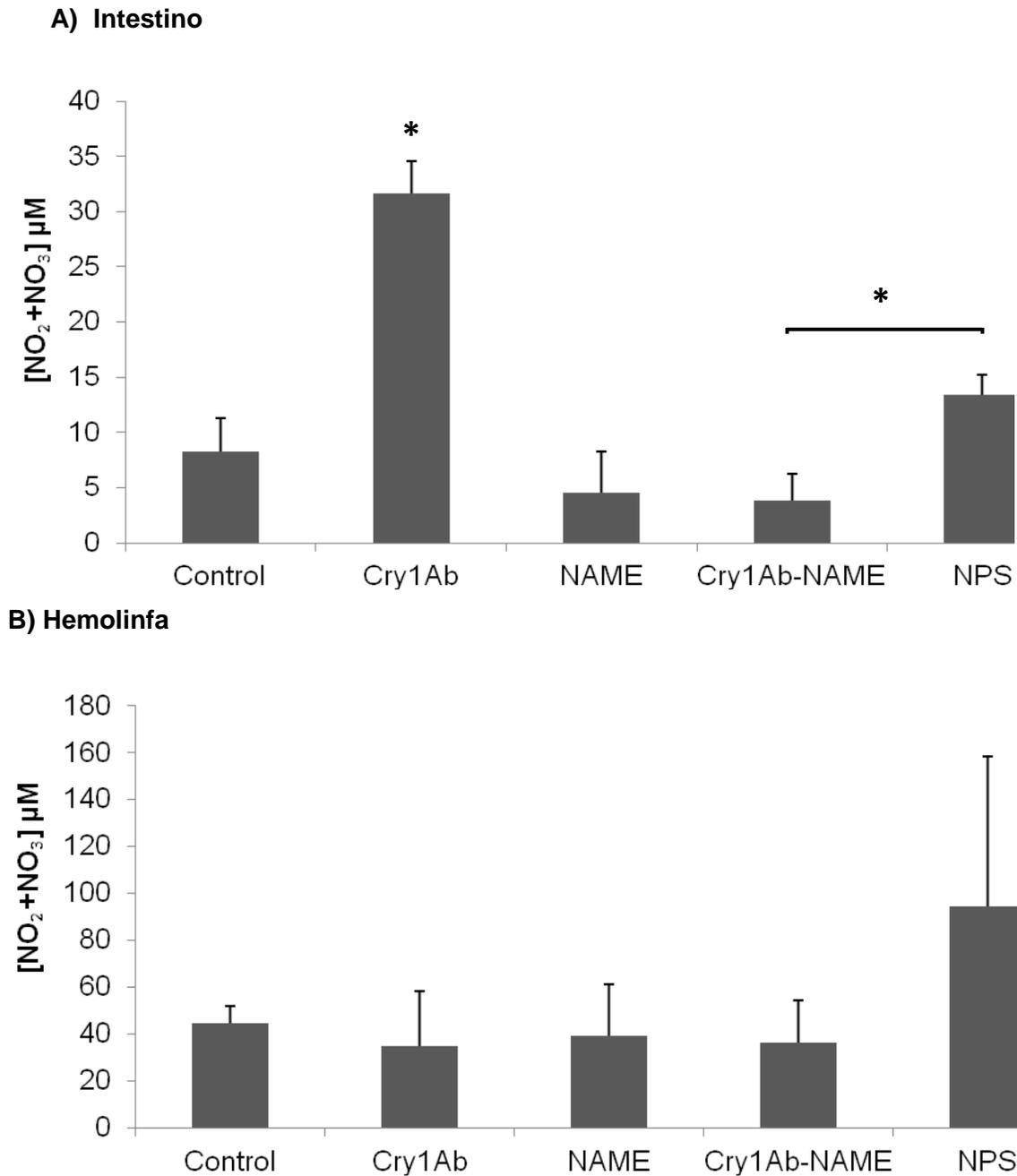


Figura 6. La toxina Cry1Ab induce la producción de NO en el intestino pero no en la hemolinfa. Se midió la concentración de nitritos + nitratos como medida indirecta de la producción de NO en A) el intestino y B) la hemolinfa, en larvas control (dieta normal), o tratadas con Cry1Ab (LC₅₀ protoxina Cry1Ab soluble), NAME (L-N-G-nitroarginine metil ester 2 mg/ml de dieta), LC50-NAME y NPS (Nitroprusiato de sodio 26ug/cm² dieta). La ANOVA de dos vías muestra que hay diferencias significativas (P<0.05) entre el intestino y la hemolinfa. (*) Diferencia significativa (P<0.05) entre tratamientos en el intestino de acuerdo al ANOVA de una vía y a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En la

hemolinfa no hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos de acuerdo al ANOVA de una vía.

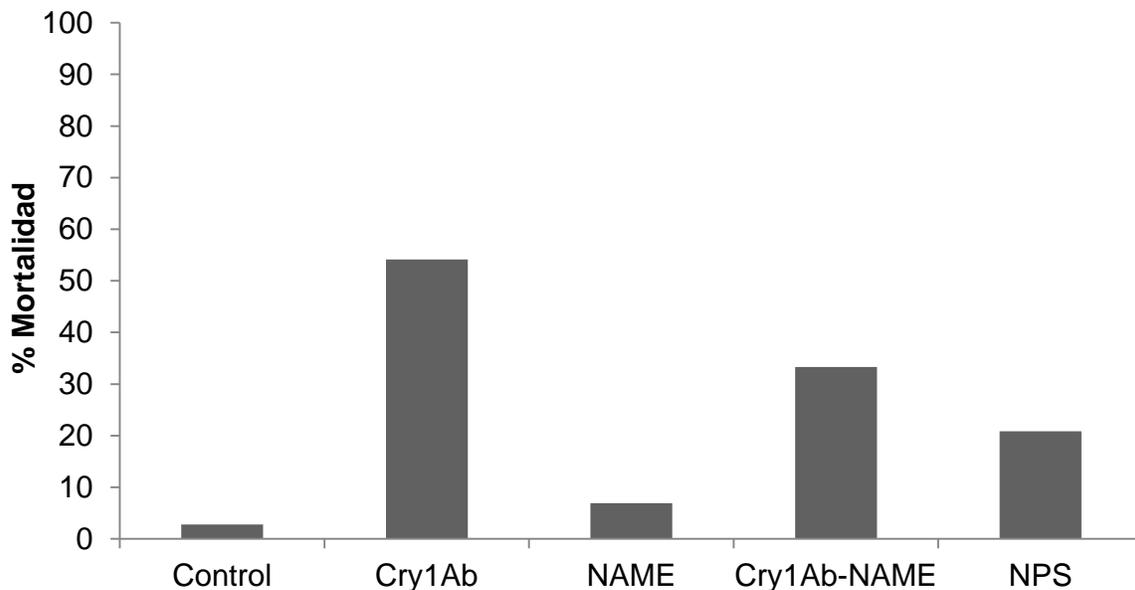


Figura 7. El NO producido por Cry1Ab es tóxico para *M. sexta*. El porcentaje de la mortalidad de las larvas de *M. sexta* se calculó a los 7 días de iniciados los tratamientos: control (dieta normal), Cry1Ab (LC_{50} protoxina Cry1Ab soluble), NAME (L-N-G-nitroarginine metil ester 2 mg/ml de dieta), LC_{50} -NAME y NPS (Nitroprusiato de sodio 26 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dieta). Diferencias significativas entre las larvas intoxicadas y las no intoxicadas con $P < 0.05$ de acuerdo al test de χ^2 .

El gen *nos* se transcribe *de novo* en el intestino de *M. sexta* en respuesta a la toxina Cry1Ab

Para analizar si la toxina Cry1Ab tenía un efecto en la expresión de *nos* en el intestino de estos insectos se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar un producto de PCR de 1,235 pares de bases a partir de cDNA Poli(A)+; la especificidad de estos oligonucleótidos se probó amplificando sobre DNA genómico de *M. sexta* (Fig. 8). Estos oligonucleótidos se emplearon para analizar la expresión del gen *nos* en los intestinos de larvas de *M. sexta* intoxicados con una LC_{50} durante 24 h. Como control de carga se usó el transcrito de la proteína ribosomal S3 (*rpS3*). Como se observa en la figura 9, la toxina Cry1Ab indujo la acumulación del mensajero *nos de novo* en el intestino de las larvas intoxicadas.

Por lo tanto la toxina Cry1Ab induce la producción de NO en las células del intestino de las larvas y esta inducción podría estar relacionada a un aumento en los niveles del mRNA de *nos*.

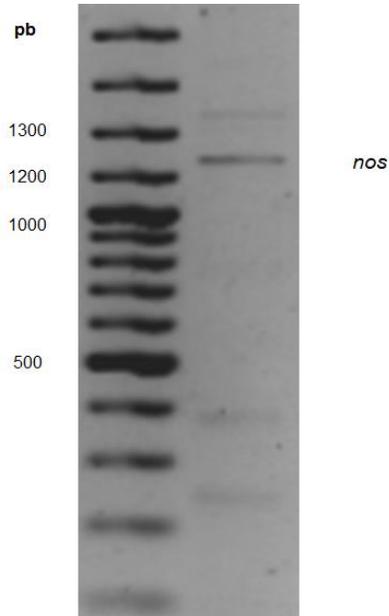


Figura 8. Amplificación del gen *nos* por medio de PCR usando como templado DNA genómico de *M. sexta*. Para las condiciones de la reacción ver materiales y métodos.

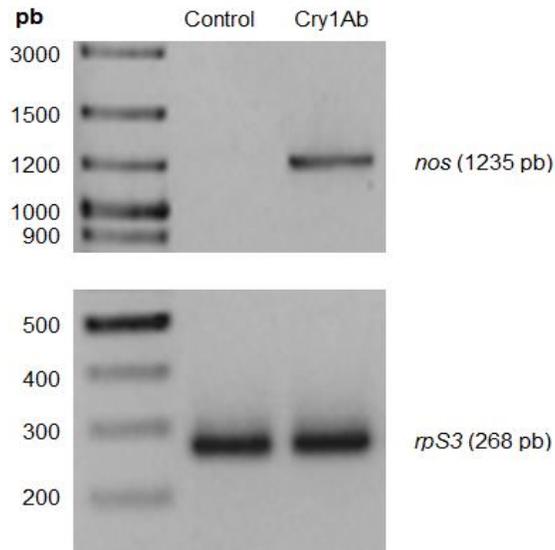


Figura 9. El gen *nos* se transcribe *de novo* en el intestino de *M. sexta* en respuesta a la intoxicación con Cry1Ab. Expresión del mRNA de *nos* por medio de RT-PCR usando extractos de RNA de larvas de 2° instar a las 24 horas de iniciar el tratamiento: control

(dieta normal) o intoxicadas con una LC_{50} de protoxina Cry1Ab soluble. Como control de carga se amplificó el transcrito de la proteína ribosomal S3 (*rpS3*).

El mRNA de *lebocina* se acumula en respuesta a la toxina Cry1Ab independientemente de la concentración de NO

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar un producto de PCR de los genes de *atacina*, *lebocina* y *moricina* (Materiales y métodos). Estos oligonucleótidos se probaron amplificando sus productos de PCR correspondientes sobre DNA genómico de *M. sexta* (Fig. 10). Los resultados indicaron que en respuesta a Cry1Ab se acumuló el mRNA de *lebocina* (Fig. 11) en el intestino de *M. sexta* pero no se acumulan los mRNAs de *moricina* ni de *atacina* (Fig. 12).

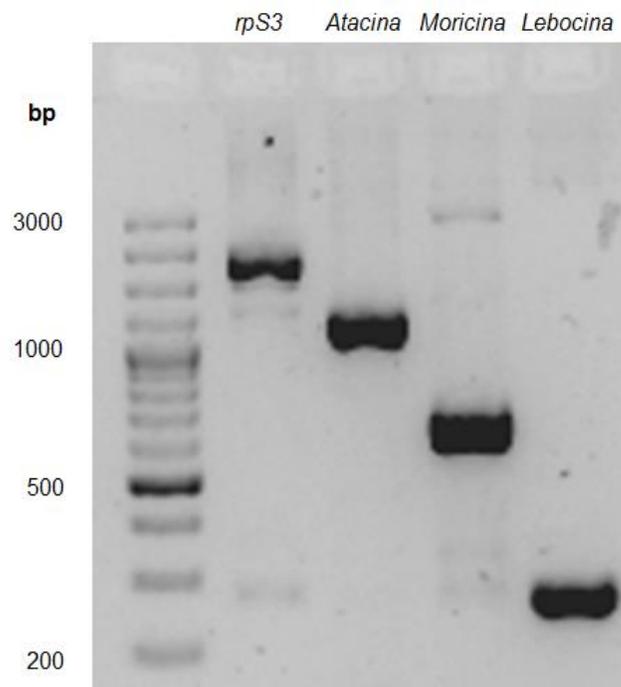


Figura 10. Amplificación de los genes *rpS3*, *atacina*, *moricina* y *lebocina* por medio de PCR usando como templado DNA genómico de *M. sexta*. Para las condiciones de la reacción ver materiales y métodos.

Mientras que en los tres genes estudiados, el tratamiento con el inhibidor NAME indujo la acumulación de los transcritos y el tratamiento simultáneo con NAME y Cry1Ab aumentó la transcripción de *atacina* y *lebocina* de manera sumatoria en comparación con los tratamientos de Cry1Ab o NAME por separado. Sin embargo, los niveles de NO son iguales entre las larvas control, las tratadas con NAME y las tratadas con Cry1Ab/NAME (ver Fig. 6A). Por lo tanto, la intoxicación con Cry1Ab induce la transcripción de *lebocina* y el compuesto NAME, pero no la producción de NO, también induce la acumulación de los transcritos de *lebocina*, *atacina* y *moricina*.

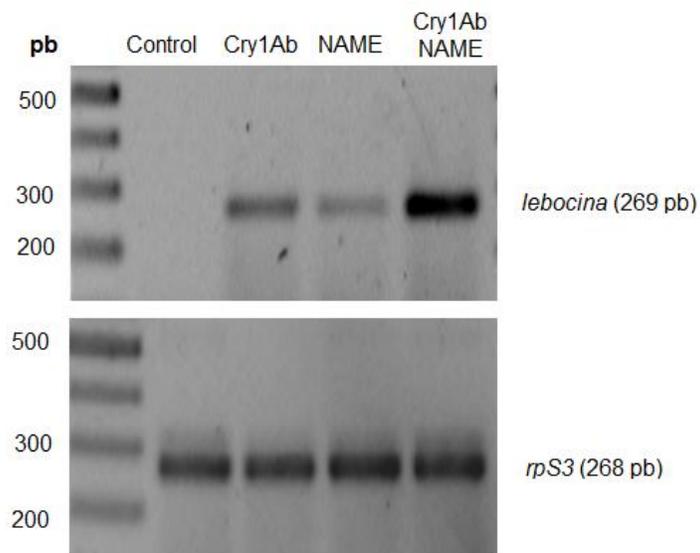


Figura 11. El gen del AMP *lebocina* se transcribe en respuesta a Cry1Ab independientemente de la concentración de NO. Expresión del mRNA de *lebocina* por medio de RT-PCR usando extractos de RNA del intestino de *M. sexta* de 2° instar a las 24 horas de iniciar el tratamiento: control (dieta normal), Cry1Ab (LC₅₀ protoxina Cry1Ab soluble), NAME (L-N-G-nitroarginina metil ester 2 mg/ml de dieta) o Cry1Ab-NAME. Como control de carga se amplificó el transcrito de la proteína ribosomal S3 (*rpS3*).

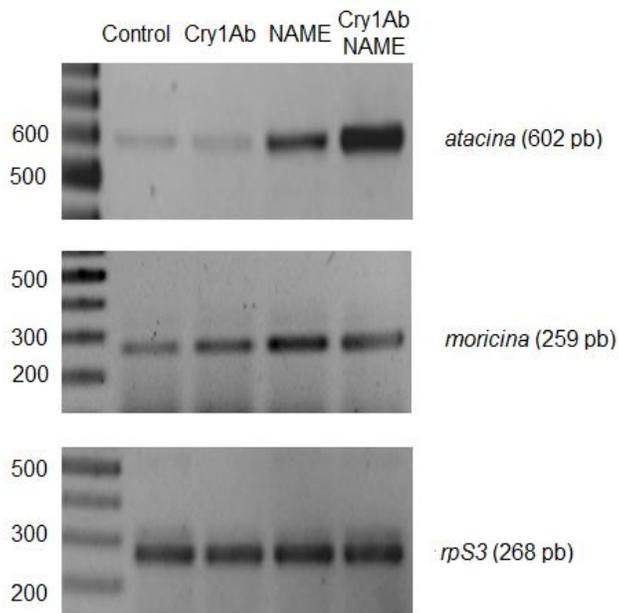


Figura 12. La transcripción basal de *atacina* y *moricina* no se modificó en respuesta a la intoxicación con Cry1Ab. Expresión del mRNA de *atacina* y *moricina* por medio de RT-PCR usando extractos de RNA del intestino de *M. sexta* de 2° instar a las 24 horas de iniciar el tratamiento: control (dieta normal), Cry1Ab (LC₅₀ protoxina Cry1Ab soluble), NAME (L-N-G-nitroarginine metil ester 2 mg/ml de dieta) o LC50-NAME. Como control de carga se amplificó el gen de la proteína ribosomal S3 (*rpS3*).

El mRNA de *caspasa 1* y *caspasa 3* se acumula en respuesta a la toxina Cry1Ab independientemente de la producción de NO

En este trabajo se analizó si la transcripción de *caspasa 1* y *3* dependen del NO producido por la intoxicación con Cry1Ab (Figura 6A). Los oligonucleótidos diseñados para *caspasa 1* y *3* se probaron en un PCR usando como templado DNA genómico de *M. sexta* (Fig. 13).

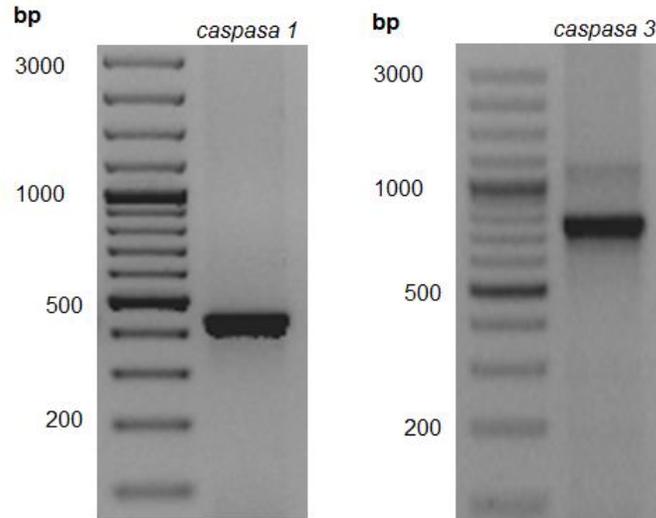


Figura 13. Amplificación de los genes *caspasa 1* y *caspasa 3* por medio de PCR usando como templado DNA genómico de *M. sexta*. Para las condiciones de la reacción ver materiales y métodos.

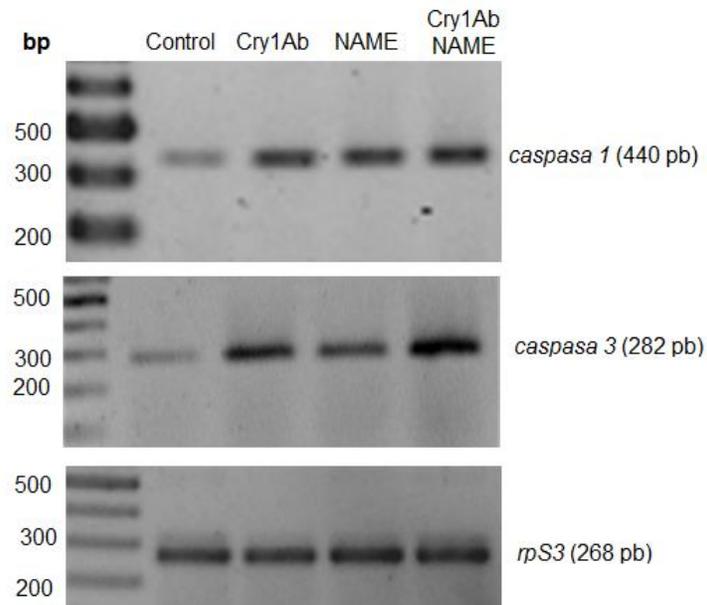


Figura 14. El mRNA de *caspasa 1* y *caspasa 3* se acumula en respuesta a Cry1Ab independientemente de la producción de NO. Expresión del mRNA de *caspasa 1* y *caspasa 3* por medio de RT-PCR usando extractos de RNA del intestino de *M. sexta* de 2° instar a las 24 horas de iniciar el tratamiento: control (dieta normal), Cry1Ab (LC₅₀

protoxina Cry1Ab soluble), NAME (L-N-G-nitroarginina metil ester 2 mg/ml de dieta) o Cry1Ab-NAME. Como control de carga se amplificó el gen de la proteína ribosomal S3 (*rpS3*).

La figura 14 muestra que tanto el mRNA de *caspara 1* como el de *caspara 3* aumentan a las 24 horas de la intoxicación con Cry1Ab. Sin embargo, esta respuesta parece ser independiente de la síntesis de NO, debido a que ambos mRNAs se acumulan de manera similar en las larvas tratadas con Cry1Ab-NAME a las larvas tratadas solamente con Cry1Ab. Por lo tanto, el mRNA de *caspara 1* y *caspara 3* se acumularon en respuesta a la toxina Cry1Ab independientemente de la producción de NO.

La toxina Cry1Ab induce la actividad de Caspasa 3 y disminuye la de Caspasa 1

La función de las caspasas depende de su actividad como cisteín-proteasas, por lo tanto se analizó esta actividad en extractos de intestino de larvas intoxicadas con Cry1Ab. En la figura 15 se observa que la actividad de Caspasa 3, marcadora de la apoptosis, aumentó cuatro veces en el intestino de larvas intoxicadas con Cry1Ab con respecto al control. El tratamiento con NAME también aumentó su actividad al mismo nivel que el de la toxina (4 veces). Por otro lado, se observó que actividad de Caspasa 3 en las larvas tratadas con Cry1Ab y NAME aumentó casi ocho veces con respecto al control y por lo tanto se observó un efecto sumatorio.

Es interesante mencionar que el inhibidor NAME indujo la actividad de Caspasa 3. Este aumento no lo causó la concentración de NO en el intestino, ya que las larvas control tienen la misma concentración de NO que las tratadas con NAME (ver Fig. 6A). Pero podría ser causado por la inhibición de la NOS, ya que en las larvas tratadas con NAME se cuatriplica la actividad de Caspasa 3 con respecto a las larvas control y de la misma forma en las larvas con NAME/Cry1Ab se duplica la actividad de Caspasa 3 con respecto a las larvas tratadas solo con Cry1Ab. Por lo tanto la actividad de Caspasa 3 parece regularse positivamente como

consecuencia tanto de la inhibición de la actividad de NOS (NAME) como con el aumento de su actividad (Cry1Ab).

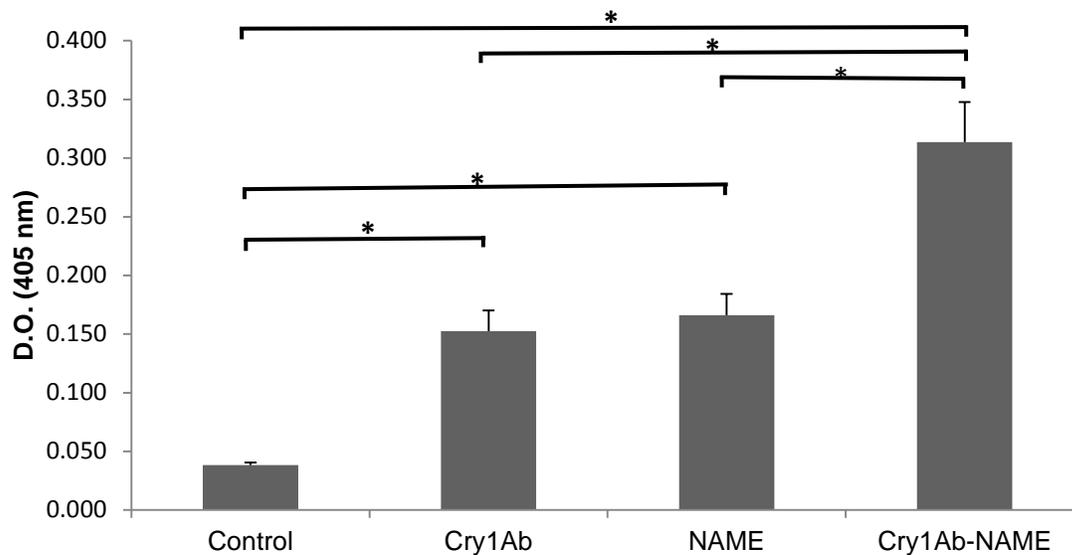


Figura 15. La intoxicación con Cry1Ab induce la actividad de Caspasa 3 en el intestino de *M. sexta*. Lectura a una longitud de onda de 405 nm del producto colorimétrico pNA que se libera cuando es procesado el sustrato específico para caspasa 3, DEVD-pNA. Un aumento en la Densidad Óptica (D.O.) a 405 nm indica un aumento en la actividad de caspasa 3. (*) Diferencias significativas ($P < 0.05$) de acuerdo al ANOVA de una vía y a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Por otro lado, los resultados de la medición de la actividad de Caspasa 1 (ver Fig. 16), implicada en la respuesta inflamatoria, muestran que hay una ligera disminución en la actividad de Caspasa 1 en las larvas intoxicadas con Cry1Ab y las tratadas con NAME con respecto al control. Mientras que en las larvas tratadas con Cry1Ab/NAME la actividad de Caspasa 1 es menor con respecto al control, a la toxina Cry1Ab o al NAME usados independientemente. La actividad de Caspasa 1 no parece estar relacionada ni con aumento de NO producido por la toxina, ni con la disminución del mismo ocasionado por el NAME. Por lo tanto, la intoxicación con Cry1Ab disminuye la actividad de Caspasa 1 en el intestino de *M. sexta* y esta regulación es independiente de la producción de NO a nivel postraduccional.

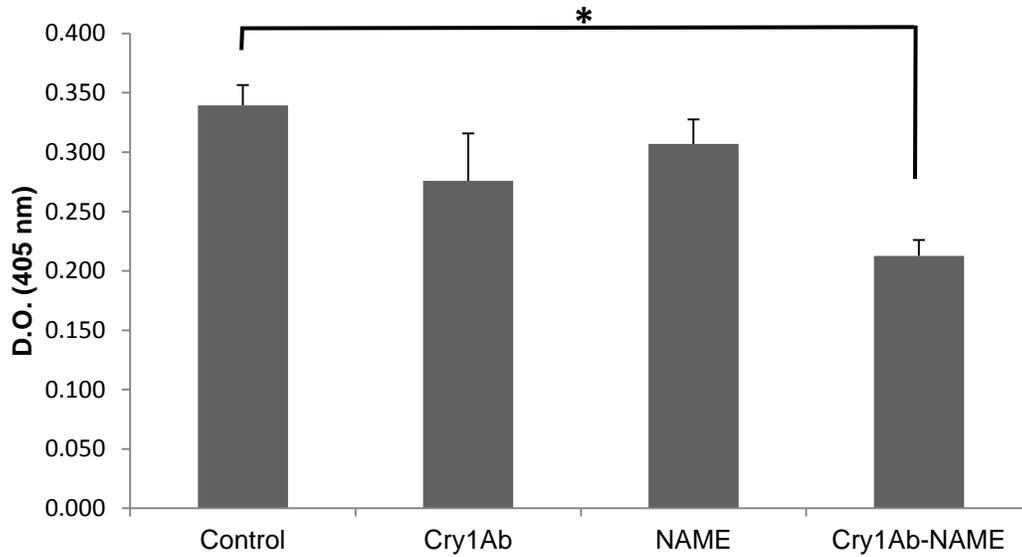


Figura 16. La intoxicación con Cry1Ab disminuye la actividad de Caspasa 1 en el intestino de *M. sexta*. Lectura a una longitud de onda de 405 nm del producto colorimétrico pNA que se libera cuando es procesado el sustrato específico para caspasa 1, YVAD-pNA. Un aumento en la Densidad Óptica (D.O.) a 405nm indica un aumento en la actividad de caspasa 1. (*) Diferencia significativa ($P < 0.05$) de acuerdo al ANOVA de una vía y a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

DISCUSIÓN

Se ha estimado que existen más de 30 millones de especies de insectos, y hasta la fecha todos los estudiados usan el NO como una molécula señalizadora (Davies, 2000). Algunas especies son vectores de enfermedades y otras son plagas económicamente importantes. Así, desde nuestro punto de vista el estudio de la función de NO/NOS en *M. sexta*, empleada como modelo de estudio, no solo genera resultados de importancia general para el estudio de las respuestas a las toxinas específicas, pero podría generar conocimiento para desarrollar nuevas formas de control de plagas.

En este proyecto se deseó conocer si el NO participa en la respuesta del lepidóptero *M. sexta* a la intoxicación con la toxina Cry1Ab y si la toxina desencadenaba la respuesta inmune, inflamación y/o apoptosis.

Se encontró que los niveles de NO aumentan en el intestino de *M. sexta* en respuesta a la ingestión de Cry1Ab, y que la sobreproducción de NO por medio de NOS resulta tóxica para la larva. Estas observaciones difieren de otros reportes en donde las infecciones con organismos patógenos inducen la producción de NO con efectos protectores para el hospedero (Dimopoulos et al., 1998; Eleftherianos et al., 2009; Herrera-Ortiz et al., 2011).

El aumento en la concentración de NO por la intoxicación de Cry1Ab solo se observó en el intestino pero no en la hemolinfa. Lo cual implica que la respuesta fue local y se limitó al tejido dañado por la toxina Cry. Anteriormente se había demostrado que la inducción del mRNA de *nos* en *M. sexta* por medio de la infección con bacterias patógenas se limita al tejido por el cual entran las bacterias (Eleftherianos et al., 2009).

Uno de los mayores reguladores de la producción de NO es la expresión de iNOS. A su vez, la expresión de iNOS está determinada en primer lugar por su síntesis *de novo* en parte regulada por citosinas, así como la estabilidad de su mRNA y proteína (Bogdan, 2001). En concordancia, en este trabajo se encontró que el

mRNA de *nos* se sintetizó *de novo* en el intestino de *M. sexta* en respuesta a la intoxicación con una LC₅₀ de Cry1Ab. Se ha descrito un solo gen de *nos* en *M. sexta* (Nighorn et al., 1998) y se desconoce si existen más. Este gen es constitutivo en algunos tejidos del insecto, como en el nervio olfatorio (Gibson & Nighorn, 2000). Sin embargo los niveles del mRNA del gen *nos* se sintetizaron *de novo* en el intestino en respuesta a la toxina Cry1Ab. Lo cual implica que la NOS de *M. sexta* tiene una doble función como enzima constitutiva e inducible aunque en distintos tejidos. Esta es la primera vez que se describe la inducción de *nos* y la producción de NO por medio de una toxina formadora de poros en insectos.

Si bien el NO puede ser un agente antimicrobiano que ayuda a la eliminación de patógenos, también puede llegar a ser altamente citotóxico para el hospedero (Rivero, 2006). Se ha visto que dependiendo de la especie, el tipo de infección o la ruta de entrada del agente patógeno, la iNOS puede resultar indispensable para el control de la infección, no tener efecto aparente o puede empeorar la enfermedad (Bogdan, 2001). En algunas infecciones la expresión de iNOS está claramente asociada con una enfermedad más severa e incluso fatal. Los posibles mecanismos por los cuales sucede esto son la citotoxicidad y el daño al tejido mediado por la producción de NO (Bogdan, 2001). En este estudio, el aumento de los niveles de NO resultó tóxico para las larvas de *M. sexta*, evidencia de esto fue que la molécula donadora de NO, el Nitroprusiato de Sodio, incrementó el porcentaje de mortalidad de *M. sexta*, además la toxina Cry aumentó los niveles de NO y cuando se inhibió la actividad de la NOS con NAME, la mortalidad de las larvas disminuyó en un 20%.

El aumento en la síntesis de NO, pudo ser el resultado de a) la interacción de la toxina Cry1Ab con sus receptores membranales, b) del desbalance iónico causado por la permeabilización de la membrana por medio de la formación de poros y/o c) por el reconocimiento de moléculas de la microbiota del intestino por medio de la disrupción del epitelio intestinal (Figura 17).

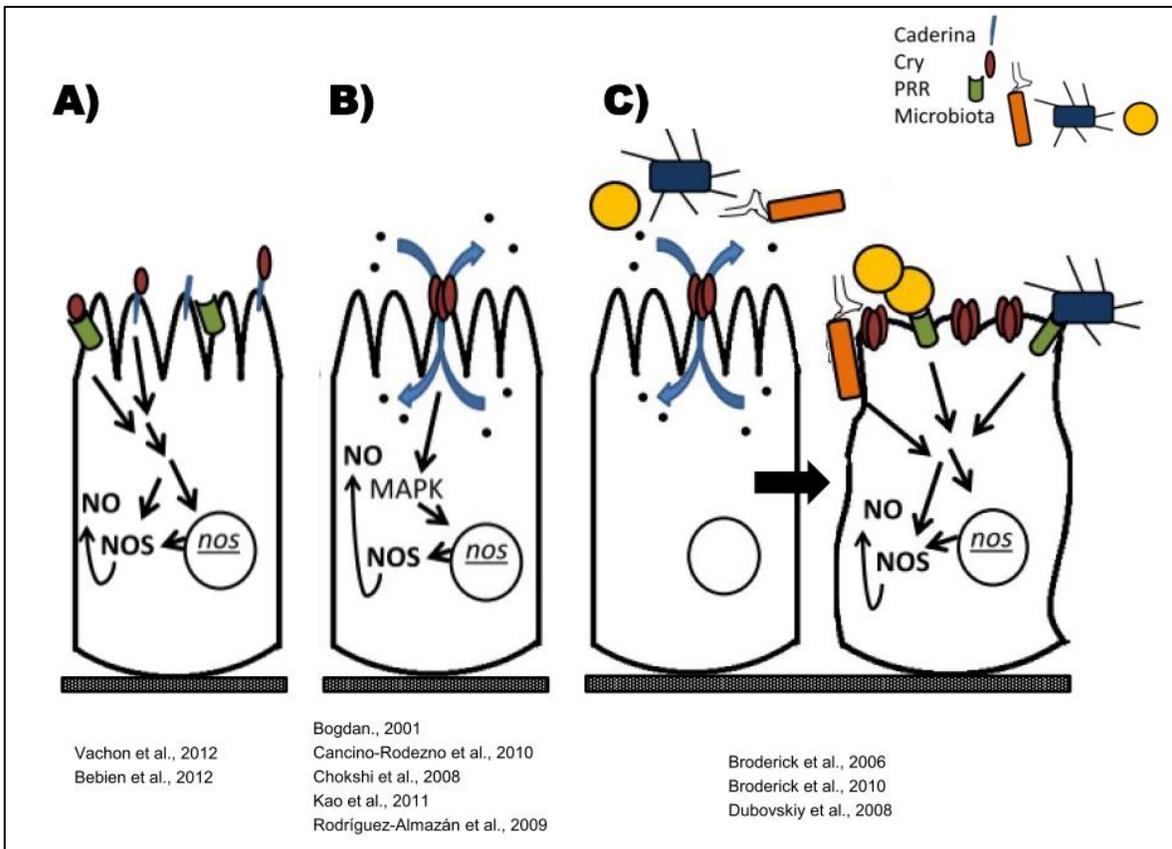


Figura 17. Posibles escenarios de la síntesis de NOS y la producción de NO por la toxina Cry en el epitelio intestinal. La transcripción de *nos* y la síntesis de NO por la NOS puede deberse a: A) El inicio de una cascada de señalización intracelular causada por la interacción de Cry con su receptor membranal Caderina o con los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). B) La activación de la vía de las MAPK (ERK, JNK, p38) por un desbalance iónico debido a la formación de poros líticos de la toxina Cry en la membrana celular. C) La interacción de la microbiota propia del intestino cuando la formación de poros líticos de la toxina Cry (izquierda) produce la disrupción del epitelio intestinal (derecha).

El primer escenario, donde la toxina Cry puede desencadenar la señal para la producción de NO podría ser apoyado por la teoría que dice que el modo de acción de las toxinas Cry resulta de su unión a la caderina en la membrana celular y desencadena una cascada de señalización dependiente de Mg^{2+} (Vachon et al., 2012). O bien por la hipótesis de que las TFP pueden actuar como patrones

moleculares asociados a patógenos que son capaces de señalar la presencia de un patógeno por medio de su interacción con PRRs (Bebien et al., 2012).

Una forma de probar si la formación de poro por Cry1Ab es necesaria para inducir la producción de NO o si la sola interacción de la toxina con la membrana o receptores es la responsable, sería mediante el uso de toxinas mutantes que son capaces de interactuar con sus receptores en la membrana de las células intestinales pero son incapaces de formar poros como la mutante Cry1Ab R99E (Rodríguez-Almazán et al., 2009).

En el segundo escenario, donde la formación de poro es esencial para desencadenar la respuesta del insecto. La activación de la síntesis de NO podría ser explicada por los cambios en la presión osmótica y la composición iónica debida a la permeabilización de la membrana mediante los poros líticos de Cry (Cancino-Rodezno, 2010). Estos cambios activan vías de señalización de estrés celular como el de las MAPK p38, ERK y JNK (Chokshi et al., 2008).

Se sabe que las cinasas p38, ERK y JNK promueven la expresión de iNOS en mamíferos (Bogdan, 2001). Debido a que las vías de las cinasas p38 y JNK son reguladores centrales de la respuesta transcripcional de defensa ante las toxinas Cry y otras TFP (Kao et al., 2011), es posible que por medio de estas vías se induzca la transcripción de NOS ante la intoxicación con las toxinas Cry. Sería interesante conocer si la inducción transcripcional de *nos* por la toxina Cry1Ab depende de p38 en *M. sexta*, lo cual podría hacerse mediante el silenciamiento de p38.

Las evidencias del tercer escenario, donde las respuestas ante la toxina Cry son moduladas por los microorganismos del intestino están basadas en estudios donde la sensibilidad de los insectos a Bt cambia cuando se modifica la microbiota intestinal. Por ejemplo, larvas de lepidópteros tratadas con antibióticos reducen su susceptibilidad ante las toxinas de Bt. Mientras que la mortalidad aumenta cuando las larvas que comieron toxinas de Bt ingieren posteriormente bacterias entéricas no patógenas. Además que moléculas bacterianas que prenden la respuesta

inmune son capaces de aumentar la mortalidad de larvas tratadas con Bt (Broderick et al., 2006).

A la par, se ha encontrado que las toxinas de Bt modifican el estado inmune del insecto. En estudios anteriores se han descrito cambios en el número y fenotipo de los hemocitos, además de la activación de la cascada de la PPO y la transcripción de algunos AMP (Dubovskiy, Krukova, et al., 2008) pero no se ha demostrado que la inhibición de estas respuestas tenga un efecto en la mortalidad de los insectos a las toxinas Cry. Por otro lado, se ha descrito que inhibidores de la respuesta inmune innata reducen la mortalidad de larvas tratadas con toxinas de Bt, entre los cuales se encuentran atrapadores de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como S-metil-L-tiocitrulina, N-acetil cisteína y glutatión (Broderick et al., 2010). De la misma forma, nuestros resultados mostraron que el NAME, un inhibidor específico para la enzima NOS, aumentó la resistencia de las larvas ante la intoxicación con Cry1Ab. Si la microbiota del intestino está participando en la inducción de la síntesis de NO es algo que queda por probar. Este experimento podría ser hecho mediante el tratamiento de los insectos con antibióticos, la intoxicación con Cry1Ab y la medición de NO.

Los AMP son importantes moléculas efectoras de la respuesta inmune innata de insectos. El análisis de la transcripción en el intestino de los genes de la *lebocina*, *la moricina* y *la atacina* por la intoxicación durante 24 horas con Cry1Ab mostró que solamente el mRNA de *lebocina* se acumuló en respuesta a la intoxicación. La *lebocina* es un péptido de 32 aminoácidos rico en prolina. Aunque se ha demostrado que la *lebocina* causa permeabilidad de la membrana bacteriana su actividad antibacteriana es débil en condiciones fisiológicas. Sin embargo se ha reportado que puede servir como un potenciador de la actividad antibacteriana de otros AMP (Tanaka et al., 2012). La *lebocina* ha mostrado tener un patrón de expresión muy distinto a otros AMP en *M. sexta*, además de no depender de la vía Toll para su activación y en *B. mori* es regulada por factores de transcripción especiales que no actúan en otros genes de AMP (Tanaka et al., 2012; Zhong et al., 2012).

Si bien ya se había reportado que Cry1Ab induce la acumulación del transcrito de *caspara 1* y *3* (Porta et al., 2011), no se sabía si esto correlacionaba con su actividad. Los efectos pro-apoptóticos de caspasa 3 y pro-inflamatorios de caspasa 1 dependen de su actividad como proteasas (Kuranaga, 2012). En este trabajo se observó que a las 24 horas de intoxicación con Cry1Ab ambos transcritos se acumulan en las larvas intoxicadas con una dosis media. Y que la inducción transcripcional de caspasa 3 se correlaciona con el aumento de su actividad enzimática en las larvas intoxicadas con Cry1Ab.

En cambio el aumento en la transcripción de caspasa 1 no se relaciona con su activación, al menos a las 24 horas de intoxicación, ya que durante la intoxicación con Cry1Ab la actividad de caspasa 1 parece disminuir ligeramente con respecto a las larvas no intoxicadas. La actividad de caspasa 1 se debe a la activación de la proenzima y es una respuesta rápida de inflamación. Sin embargo la síntesis del mRNA es probablemente una respuesta de sustitución de la proenzima para sostener los niveles basales de la misma.

En este trabajo se quería saber si el aumento de la actividad de caspasas por medio de Cry1Ab dependía de la sobreproducción de NO.

Los resultados mostraron que la actividad de caspasa 3 disminuyó por la actividad de NOS, independientemente de si las larvas son intoxicadas o no. Consistentemente el tratamiento con el inhibidor de NOS, NAME, causó un aumento de la actividad de caspasa 3 de dos (larvas control) a cuatro veces (larvas intoxicadas con Cry1Ab). Aunque el NO tiene efectos pro apoptóticos por medio de su citotoxicidad, también se ha descrito que puede afectar la actividad de enzimas por medio de la S-nitrosilación. Existen reportes de S-nitrosilación del residuo de cisteína del sitio activo de caspasa 3 *in vivo*, lo cual impide su activación y suprime su actividad (Kang et al., 2004).

Estos resultados indican que el NO es una biomolécula que participa en la regulación de la actividad de caspasa 3 en el intestino de *M. sexta*. Por un lado, la toxina Cry aumenta la actividad de caspasa 3 y aumenta los niveles de NO en el

intestino; por otro lado el inhibidor de NOS previene la síntesis de NO pero activa a caspasa 3. Por lo tanto, es probable que la activación de caspasa 3 por medio de la intoxicación con Cry1Ab sea independiente de NO, pero que la actividad de NOS tenga un efecto inhibitorio constante en la actividad de caspasa 3. Por ejemplo se ha sugerido que los niveles basales de NO podrían estar previniendo la activación de vías apoptóticas mediante la inhibición de la actividad de caspasas (Kim et al., 2002).

Otra posibilidad es que el NAME tenga efectos secundarios que hayan inhibido la actividad de caspasa 3 por vías independientes a NOS. En ocasiones anteriores se ha discutido que los inhibidores de NOS y las fuentes exógenas de NO pueden ocasionar efectos secundarios que han hecho difícil estimar los efectos de la señalización del NO (Bogdan, 2001). De ser así, el uso de otra metodología podría esclarecer este fenómeno, por ejemplo mediante el silenciamiento de *nos*. El silenciamiento de genes en las larvas de *M. sexta* es una técnica relativamente sencilla que se ha usado con éxito en ocasiones anteriores (Terenius et al., 2010).

La caspasa 3 es una enzima efectora de la apoptosis, es decir se encuentra como una de las últimas enzimas dentro de la cascada de señalización de este proceso. El incremento en la actividad de caspasa 3 por medio de la toxina Cry apunta a que la apoptosis se encuentra funcionando en el intestino. Sin embargo, para probar que efectivamente la apoptosis participa en la respuesta ante la intoxicación con Cry1Ab, hacen falta otros estudios. Usualmente el fenotipo apoptótico se describe mediante más de una técnica, por ejemplo mediante la inmunodetección del fragmento pequeño de caspasa 3, lo cual es otro indicador de su activación; o por medio de la detección del corte de sustratos de caspasas como la Polimerasa poli ADP-ribosa (PARP), la cual es una enzima nuclear involucrada en la reparación del DNA que es un sustrato de caspasa 3 durante la apoptosis. Además se podría ver la muerte celular en cortes del intestino de larvas de *M. sexta* intoxicadas con Cry1Ab, con técnicas como TUNEL, que permiten detectar las células apoptóticas cuyo DNA ha sido fragmentado.

CONCLUSIONES

- Se midió la producción de NO en el intestino y hemolinfa de *M. sexta* durante el desarrollo. Tanto en hemolinfa como en intestino se encontró que su concentración aumenta conforme la larva crece.
- En este trabajo se usaron larvas de *M. sexta* de 2° instar porque es el estadio donde se puede colectar suficiente hemolinfa para su análisis, con menor producción basal de NO y mayor susceptibilidad a la toxina Cry1Ab.
- La dosis letal media de la pro-toxina Cry1Ab en larvas de *M. sexta* de segundo instar fue de 2.1 ng/cm².
- La intoxicación de las larvas de *M. sexta* con Cry1Ab induce la producción de NO por medio de NOS en el intestino pero no en la hemolinfa. El NO producido por la intoxicación con Cry1Ab resulta tóxico para la larva y contribuye a la mortalidad causada por la toxina a una dosis letal media.
- El gen de *nos* se transcribe *de novo* durante la intoxicación con Cry1Ab en el intestino de *M. sexta*.
- El mRNA del AMP *lebocina* se acumula en respuesta a Cry1Ab en el intestino, pero no el de *atacina* ni *moricina*, y su expresión es independiente de los niveles de NO.
- La intoxicación con Cry1Ab induce la transcripción de *caspasa 1* y *3* en el intestino independientemente de los niveles de NO.
- La actividad de Caspasa 3 se induce en respuesta a la toxina Cry1Ab en el intestino independientemente de los niveles de NO. La actividad de Caspasa

1 disminuye ligeramente en respuesta a la toxina Cry1Ab en el intestino independientemente de los niveles de NO.

PERSPECTIVAS

- Analizar si la proteína NOS se sintetiza *de novo* en el intestino de *M. sexta* ante la intoxicación con Cry1Ab, como sucede con su mRNA, mediante técnicas como el Western Blot.
- Usar la mutante Cry1Ab R99E para probar si la formación de poro es necesaria para desencadenar la inducción de la síntesis de NO.
- Analizar, mediante el tratamiento con antibióticos de las larvas de *M. sexta*, si el aumento en la concentración de NO por medio de la intoxicación con Cry1Ab depende de las bacterias del intestino.
- Analizar si la susceptibilidad de las larvas ante la intoxicación con Cry1Ab se modifica mediante el silenciamiento de *nos*.
- Analizar si la inducción transcripcional de *nos* depende de la MAPK p38 y/o JNK, mediante el silenciamiento de sus respectivos genes.
- Analizar si los fenotipos observados en las larvas tratadas con NAME son similares a los fenotipos que se observen mediante el silenciamiento de *nos*.
- Probar si la apoptosis es un proceso que participa en el intestino durante la intoxicación con Cry1Ab.

BIBLIOGRAFÍA

- Bebien, M., Hensler, M. E., Davanture, S., Hsu, L.-C., Karin, M., Park, J. M., Alexopoulou, L., et al. (2012). The pore-forming toxin β hemolysin/cytolysin triggers p38 MAPK-dependent IL-10 production in macrophages and inhibits innate immunity. *PLoS pathogens*, 8(7), e1002812.
- Bialik, S., Zalckvar, E., Ber, Y., Rubinstein, A. D., & Kimchi, A. (2010). Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10), 556–564.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, 2(10), 907–916. doi:10.1038/ni1001-907
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brandenburg, L.-O., Merres, J., Albrecht, L.-J., Varoga, D., & Pufe, T. (2012). Antimicrobial Peptides: Multifunctional Drugs for Different Applications. *Polymers*, 4(1), 539–560.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15196–15199.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2010). Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *BMC microbiology*, 10, 129.
- Buzzo, C. L., Campopiano, J. C., Massis, L. M., Lage, S. L., Cassado, A. A., Leme-Souza, R., Cunha, L. D., et al. (2010). A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. *The Journal of biological chemistry*, 285(42), 32087–32095.
- Cancino-Rodezno, A., Porta, H., Soberon, M., & Bravo, A. (2010). Defense and death responses to pore forming toxins. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 26, 65–82.

- Chokshi, N. K., Guner, Y. S., Hunter, C. J., Upperman, J. S., Grishin, A., & Ford, H. R. (2008). The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Seminars in perinatology*, *32*(2), 92–9.
- Christophides, G. K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P. T., et al. (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science (New York, N.Y.)*, *298*(5591), 159–165.
- Cooper, D., & Mitchell-Foster, K. (2011). Death for survival: what do we know about innate immunity and cell death in insects? *Invertebrate Survival Journal*, *8*(2), 162–172.
- Davies, S. (2000). Nitric oxide signalling in insects. *Insect biochemistry and molecular biology*, *30*(12), 1123–38.
- Davies, S.-A., Overend, G., Sebastian, S., Cundall, M., Cabrero, P., Dow, J. A. T., & Terhzaz, S. (2012). Immune and stress response “cross-talk” in the *Drosophila* Malpighian tubule. *Journal of insect physiology*, *58*(4), 488–97.
- Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., & Kafatos, F. C. (1998). Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *The EMBO journal*, *17*(21), 6115–23.
- Dubovskiy, I., Krukova, N., & Glupov, W. (2008). Phagocytic activity and encapsulation rate of *Galleria mellonella* larval haemocytes during bacterial infection by *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol*, *98*, 360–362.
- Dubovskiy, I., Martemyanov, V., Vorontsova, Y., Rantala, M., Gryzanova, E., & Glupov, W. (2008). Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, *148*, 1–5.
- Eleftherianos, I, Felföldi, G., Ffrench-Constant, R. H., & Reynolds, S. E. (2009). Induced nitric oxide synthesis in the gut of *Manduca sexta* protects against oral infection by the bacterial pathogen *Photorhabdus luminescens*. *Insect molecular biology*, *18*(4), 507–16.
- Eleftherianos, Ioannis, Ffrench-Constant, R. H., Clarke, D. J., Dowling, A. J., & Reynolds, S. E. (2010). Dissecting the immune response to the entomopathogen *Photorhabdus*. *Trends in microbiology*, *18*(12), 552–60.
- Ericsson, J., Janmaat, A., Lowenberg, C., & Myers, J. (2009). Is decreased generalized immunity a cost of Bt resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *J Invertebr Pathol*, *100*, 61–67.

- Fink, S., & Cookson, B. (2005). Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 73, 1907–16.
- Foley, E., & O’Farell, P. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev*, 17, 115–125.
- Franchi, L., Munoz-Planillo, R., & Nunez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol*, 13(4), 325–332. doi:10.1038/ni.2231
- Ghosh, J., Lun, C. M., Majeske, A. J., Sacchi, S., Schrankel, C. S., & Smith, L. C. (2011). Invertebrate immune diversity. *Developmental and comparative immunology*, 35(9), 959–74.
- Gibson, N., & Nighorn, A. (2000). Expression of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the developing olfactory system of *Manduca sexta*. *The Journal of comparative neurology*, 422(2), 191–205.
- González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1), 1–16. doi:10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x
- Herrera-Ortiz, A., Martínez-Barnette, J., Smit, N., Rodriguez, M. H., & Lanz-Mendoza, H. (2011). The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(1), 44–50.
- Imamura, M., Yang, J., & Yamakawa, M. (2002). cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect molecular biology*, 11(3), 257–265.
- Kang, Y.-C., Kim, P. K., Choi, B.-M., Chung, H.-T., Ha, K.-S., Kwon, Y.-G., & KIM, Y.-M. (2004). Regulation of Programmed Cell Death in Neuronal Cells by Nitric Oxide. *In Vivo*, 18(3), 367–376.
- Kanost, M. R., Jiang, H., & Yu, X.-Q. (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198(1), 97–105.
- Kao, C.-Y. Y., Los, F. C., Huffman, D. L., Wachi, S., Kloft, N., Husmann, M., Karabrahimi, V., et al. (2011). Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS pathogens*, 7(3).

- Kim, P. K. M., Kwon, Y.-G., Chung, H.-T., & Kim, Y.-M. (2002). Regulation of Caspases by Nitric Oxide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 962(1), 42–52.
- Kuranaga, E. (2012). Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes to Cells*, 17(2), 83–97.
- Li, Y., Qu, H., Xiang, Q., Su, Z., & Huang, Y. (2012). Overview on the recent study of Antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*.
- Moreno-García, M., Córdoba-Aguilar, A., Condé, R., & Lanz-Mendoza, H. (2013). Current immunity markers in insect ecological immunology: assumed trade-offs and methodological issues. *Bulletin of entomological research*, 103(2), 127–39. doi:10.1017/S000748531200048X
- Nighorn, A., Gibson, N. J., Rivers, D. M., Hildebrand, J. G., & Morton, D. B. (1998). The nitric oxide-cGMP pathway may mediate communication between sensory afferents and projection neurons in the antennal lobe of *Manduca sexta*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(18), 7244–55.
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 71(2), 255–281.
- Porta, H., Muñoz-Minutti, C., Soberon, M., & Bravo, A. (2011). Induction of *Manduca sexta* Larvae Caspases Expression in Midgut Cells by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2011.
- Potoka, D. A., Nadler, E. P., Upperman, J. S., & Ford, H. R. (2002). Role of nitric oxide and peroxy nitrite in gut barrier failure. *World journal of surgery*, 26(7), 806–811.
- Radi, R., Cassina, A., & Hodara, R. (2002). Nitric oxide and peroxy nitrite interactions with mitochondria. *Biological chemistry*, 383(3-4), 401–9. doi:10.1515/BC.2002.044
- Rahman, M. M., Roberts, H. L. S., & Schmidt, O. (2007). Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephesia kuehniella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(2), 125–132.
- Rivero, A. (2006). Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in parasitology*, 22(5), 219–225.

- Rodríguez-Almazán, C., Zavala, L. E., Muñoz-Garay, C., Jiménez-Juárez, N., Pacheco, S., Masson, L., Soberón, M., et al. (2009). Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity. *PLoS one*, *4*(5), e5545.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, *9*(3), 283–300.
- Tanaka, H., Sagisaka, A., Fujita, K., Furukawa, S., Ishibashi, J., & Yamakawa, M. (2012). BmEts upregulates promoter activity of lebecin in *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *42*(7), 474–481.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A., & Grisham, M. B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *286*(3), R431–44. doi:10.1152/ajpregu.00361.2003
- Tennyson, A. G., & Lippard, S. J. (2011). Generation, translocation, and action of nitric oxide in living systems. *Chemistry & biology*, *18*(10), 1211–1220.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Sriramana, K., Albrechtsen, M., et al. (2010). RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of insect physiology*, *57*(2), 231–45.
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J.-L. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of invertebrate pathology*, *111*(1), 1–12.
- Xu, X.-X. X., Zhong, X., Yi, H.-Y. Y., & Yu, X.-Q. Q. (2012). Manduca sexta Gloverin Binds Microbial Components and is Active against Bacteria and Fungi. *Developmental and comparative immunology*.
- Zhong, X., Xu, X.-X. X., Yi, H.-Y. Y., Lin, C., & Yu, X.-Q. Q. (2012). A Toll-Spätzle pathway in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *42*(7), 514–524.

APÉNDICES

A. Protocolo para la purificación de la protoxina Cry1Ab soluble

Esporulación de Bt

Para obtener los cristales de Cry1Ab se estría una caja con medio solido LB (Peptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y Eritromicina (10 µg/ml) a partir de un glicerol con la cepa de *B. thuringiensis* Cry1Ab/pHT315. Se incuba a 30°C, durante una noche para promover el crecimiento. Posteriormente se toma una colonia aislada y se estría en medio solido HCT (Bactotripton 0.005 g/ml y Casaminoácidos 0.002 g/ml, pH 7.25) con Eritromicina 10 µg/ml; este medio es adicionado con: Solución I (KH₂PO₄ 0.068 g/ml), Solución II (Mg₂SO₄ 0.0123 g/ml; MnSO₄ 0.000169 g/ml; ZnSO₄ 0.0014 g/ml), Solución III Fe(SO₄) 0.002 g/ml; H₂SO₄ 1N, Solución IV CaCl₂ 0.0147 g/ml y Glucosa 10 %. Se incuba a 30°C por 3 días para permitir la esporulación de las bacterias y la producción de los cristales de la toxina Cry1Ab.

Después de transcurridos los tres días de esporulación, se analizan los cultivos al microscopio y se verifica que haya cristales, los cuales tienen una forma romboide muy característica. Posteriormente, los cristales se recuperan para purificarlos.

Purificación de cristales de Cry1Ab

Para recuperar los cristales, el cultivo se colecta en 10 ml de agua raspando la caja de Petri, se centrifuga a 10000 rpm durante 10 min, y se lava con agua 3 veces. Posteriormente la pastilla se resuspende en 30 ml de NaCl 0.3M, EDTA 0.01M, pH 8 y se centrifuga a 10, 000 rpm durante 10 min; con esta solución se lava 3 veces. Por último se lava la pastilla centrifugando a 10,000rpm durante 10 min en una solución de PMSF 1 mM 3 veces.

Se resuspende la pastilla en buffer TTN (20mM Tris pH 7.4, 300mM NaCl, Triton X-100 al 0.1%). Esta muestra se resuspende en un máximo de 12ml de buffer. Se

sonica la muestra dando 3 pulsos de 50 s a 20 W con 1 min de descanso en hielo entre cada sonicación.

Se preparan 4 disoluciones de sacarosa (A: 33.6gr + 12ml H₂O, B: 31.6gr + 14ml H₂O, C: 28.8gr + 17ml H₂O, D: 26.8gr + 19ml H₂O) y se funden por calentamiento poco a poco para evitar su caramelización. Se agrega 400ul de Tritón X-100 0.1%, 2ml Tris-HCl 1M pH8 y 80ul de NaCl 5M

Se preparar los gradientes en tubos para centrifugar, agregando 6 ml de la disolución de sacarosa A en el fondo del tubo, resbalando por la pared lentamente. Después de la misma manera agregar las demás disoluciones de sacarosa en orden.

Se agrega a cada gradiente 2ml de las muestras sonicadas de Bt y centrifuga a 23,000 rpm durante 20 min a 15°C en la Ultracentrifuga. Para balancear las muestras se usa el buffer TTN.

Se separan las fracciones y se observan al microscopio para identificar a las fracciones que contienen a los cristales. Generalmente las fracciones de la parte superior contienen los cristales más limpios. Las primeras dos fracciones se limpian por separado.

Para eliminar la sacarosa se lava con 30 ml de H₂O Milli Q + triton 0.01% y se centrifuga a 10,000 rpm. La pastilla se lava mínimo 3 veces. Se resuspende la pastilla en Tris 50 mM pH8, PMSF 1mM y se guardan los cristales a 4°C.

Solubilización de cristales purificados (protoxina)

Se toman 200 µl de la fracción de cristales purificados (1 mg/ml) y se resuspenden en 200 µl de buffer de carbonatos 5X pH10.5 con 0.02% de β-mercaptoetanol. Se incuba 1 h a 37°C. Se centrifugar a 14,000 rpm durante 10-14 min. Se recupera el sobrenadante, que es donde se encuentra la protoxina soluble purificada.

Se cuantifica la proteína con el reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA).

Para revisar la pureza e identidad de los cristales, 10 μg de protoxina soluble se resuelven en un gel de acrilamida 10% SDS-PAGE y se identifican por Western-Blot utilizando anticuerpos anti-Cry1Ab.

B. Dieta de las larvas de *Manduca sexta*

Para 1 litro de dieta:

- Kappa carragenina 12.5 g o ágar 20 g
- Agua destilada 1000 ml
- Germen de trigo 80 g
- Caseínato de caseína 36 g
- Sacarosa 32 g
- Levadura 16 g
- Sales Wesson 12 g
- Ácido sórbico 2 g
- Metilparabeno 1 g
- Colesterol 3 g
- Vitaminas Vanderzant 10 g o solución vitamínica 10 ml
- Tetraciclina 0.25 g
- Formaldehido 3% 1 ml
- Aceite de linaza 4 ml

C. Ciclo de vida de *Manduca sexta*

Manduca sexta (Lepidoptera) es una polilla que presenta un ciclo de vida con metamorfosis completa. Durante este ciclo presenta diferentes etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Cada instar se refiere a la etapa de desarrollo del animal, mientras que el estadio se refiere al periodo de tiempo entre las mudas de la larva.

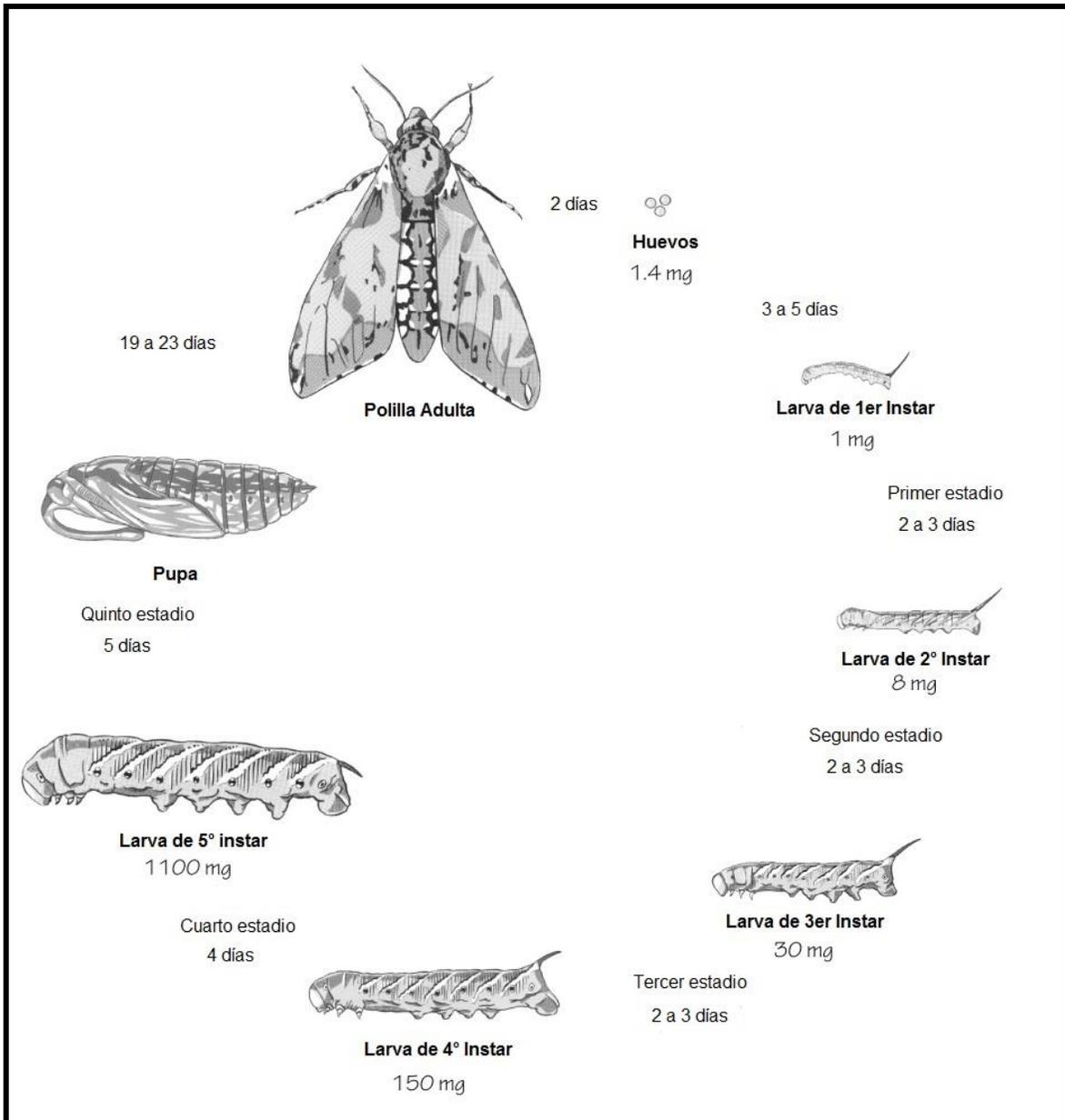


Figura 18. Ciclo de Vida de *Manduca sexta*.

Las hembras adultas de *Manduca sexta* depositan sus huevos en el envés de las hojas de la planta de la que se alimentan las larvas. Los huevos son color verde pálido, esféricos y de aproximadamente 1 mm de diámetro. Las hembras ovodepositan en una sola ocasión y pueden llegar a poner hasta 200 huevos.

Después de 3 a 5 días de desarrollo embrionario, los huevos eclosionan gracias a que la larva mastica el cascaron. Las orugas de primer instar son de color amarillo-verde claro y tienen una longitud aproximada de 4-7 mm. Mientras la larva crece su color cambia a verde turquesa brillante, y presenta 7 pares de líneas laterales blancas limitadas por una negra. En el extremo posterior del cuerpo se encuentra un apéndice en forma de cuerno de color café rojizo.

Las larvas de *Manduca* son masticadoras voraces (de ahí el nombre de *Manduca*) que se alimentan de plantas como tabaco, tomate, papa, chile y otras plantas de la familia Solanaceae. Una larva de 5° instar puede devorar una planta entera de tomate o chile en una sola noche.

Antes de cada muda, la larva deja de comer y vacía su contenido gastrointestinal. Durante esta fase, la cutícula (exoesqueleto) vieja de la cabeza se desliza hacia adelante haciendo lugar para la nueva cutícula. Finalmente la vieja cutícula se desprende en dos partes, la posterior y la anterior, y la larva se la come. Este proceso de muda ocurre 4 veces. La muda es lo que permite identificar el inicio de un nuevo estadio y saber el instar de la larva.

El crecimiento del cuerpo de la larva durante sus 5 estadios es remarcable, sin embargo la cabeza de la larva permanece del mismo tamaño durante cada estadio y es otra característica que permite identificar el instar de las larvas. Por ejemplo, las larvas de primer instar pueden tener una longitud variante de 4-7 mm durante este estadio, pero su cabeza mide ~0.5 mm hasta que muda y pasa a segundo instar. En el segundo instar la cabeza es de ~ 1 mm de diámetro e inician con una longitud de ~ 1 cm, para cuando van a pasar al siguiente estadio su cabeza sigue del mismo tamaño aunque su cuerpo crece hasta una longitud de ~ 2 cm.

Al final del quinto instar algo distinto sucede. La larva baja de su planta hospedera e inicia un periodo ambulante. Durante esta etapa, los contenidos gastrointestinales se vacían, el cuerpo pierde humedad y el corazón se hace visible en la parte dorsal de la larva. En este punto, la larva se entierra en la tierra o hojarasca a una profundidad de 20 a 40 cm. Esto la protege del clima y los predadores.

Después de unos días la larva enterrada muda una última vez formando una pupa verde claro. En las primeras horas, reacciones químicas endurecen y oscurecen la cutícula de la pupa hasta que esta se hace dura y café oscura. Durante tres semanas los tejidos se reorganizan formando al adulto.

Cuando la pupa eclosiona la cutícula se rompe y el adulto emerge. La polilla adulta extiende su proboscis y bombea fluidos del abdomen para inflar las alas.

El adulto es una polilla gris con una amplitud de las alas de 10 cm. Tiene un escamado denso, alas posteriores bandeadas, y seis puntos amarillo-naranja a cada lado del abdomen (de ahí el epíteto específico de *sexta*). La proboscis es usada como un sifón que se puede enrollar y les permite comer néctar, la única comida del adulto. Los adultos son voladores altamente activos al amanecer y al anochecer. Después de dos días de emerger de la pupa, los adultos comienzan a aparearse. Las hembras ovopositan en las plantas que las larvas prefieren comer. Después de una semana de vida como adultos, las polillas mueren.