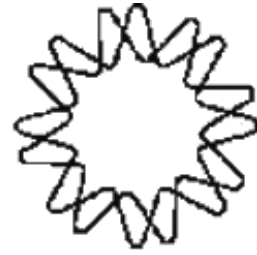




**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Estudio del mecanismo de acción de las toxinas Cry de  
*Bacillus thuringiensis* en la línea celular CF-1 de insecto**

**TESIS**

Para obtener el grado de Maestro

en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

BIOL. Leivi Clara Portugal Luna

DIRECTOR DEL TRABAJO

Dr. R. Carlos Muñoz Garay

Cuernavaca, Morelos

Junio 2012



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.

## **COMITÉ TUTORAL**

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu

Dr. R. Carlos Muñoz Garay

## **JURADO DE EXAMEN**

Dr. Baltazar Becerril Luján

Dr. Gerardo Corzo

Dra. Rosario Vera Estrella

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dr. Ignacio López González

Agradezco a los miembros del comité tutorial su participación a lo largo de la realización del presente trabajo, así como al jurado de examen por su revisión, comentarios y sugerencias en la redacción final de esta tesis.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra y el Dr. Mario Soberón Chávez del Departamento de Microbiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. R. Carlos Muñoz Garay.

Este trabajo fue financiado parcialmente por recursos recibidos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el donativo No. IN207712, por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el donativo No. 84648 y la beca de CONACyT como estudiante de posgrado de Ciencias Bioquímicas.

Agradezco también el apoyo económico brindado por parte de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, mediante el donativo para ayudantes de investigador nacional nivel III, del Sistema Nacional de Investigadores y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SIN-CONACyT).

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Alejandra Bravo de la Parra por brindarme la oportunidad de formar parte de su laboratorio

A mi director de tesis el Dr. R. Carlos Muñoz Garay, por su guía en este proyecto, por ser una persona sencilla que desde un principio confió en mí y que durante todos estos años de trabajo me ha aportado una buena formación científica.

A mis compañeros y ex compañeros de laboratorio : Jazmín López, Biviana Flores, Diana Martínez de Castro, Luis Enrique Zavala, Daniela Carmona, Leidy Bedoya, Josué Ocelotl, Fernando Zuñiga, Violeta Matus, Gustavo Caballero, Esperalda Reyes, Alan Jiménez, Angeles Cancino, Adriana Vega, Gladys Jiménez, Emiliano Cantón, Meztlli Gaytan, Dra. Blanca García, Rosalba por su ayuda en el laboratorio y por los momentos agradables.

A las Dras. Liliana Pardo, Isabel Gómez, Helena Porta, Claudia Ramírez por su ayuda y comentarios al proyecto cuando fue necesario.

A la Biol. Lizbeth Cabrera, una de las personas más trabajadoras, generosas, humildes y valiosas que me he encontrado en el camino, cuyos acertados consejos, que desde mis comienzos en la investigación han sido imprescindibles para mi desarrollo en el trabajo de laboratorio y en lo personal.

A Xóchitl González, Sergio Blancas y Biol. Jorge Sánchez por su apoyo técnico.

A Graciela Domínguez por su apoyo con los trámites necesarios para becas y congresos y por su buen humor.

A los miembros de docencia Gloria Villa y Antonio Bolaños y con su gran apoyo para todos los trámites administrativos que hacen posible la titulación.

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a las personas que me han brindado su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están conmigo, otras en los recuerdos y en mi corazón. También dedico este trabajo a aquellas personas que estoy conociendo y que me inspiran. Sin importar en dónde estén o si alguna vez llegan a leer esta dedicatoria les doy las gracias por formar parte de mi vida.

*Dedico.....*

*A ti que me diste la oportunidad de vivir y por darme una familia.*

*A mis padres que me dieron cuanto pudieron, aunque hemos pasado muchos momentos difíciles les agradezco pues me apoyaron a su manera.*

*A la Sra Guadupe, Sritas Margarita y Nelly Tapia Garduño por sus sabias palabras en cada conversación y por su ayuda cuando la necesite y sin dudar me la dieron, gracias con todo mi corazón.*

*Al Sr. Pedro Rafael Ramos por su ayuda en momentos muy difíciles.*

*A ti RJRT, especialmente dedico esta tesis, por tu paciencia, comprensión, empeño, por tu fuerza, por tu..... gracias por estos casi 6 años de conocernos, de estar juntos y compartir tantas cosas, hemos pasado tanto que ahora no estás conmigo. A ti te doy las gracias por todo el apoyo que me diste para continuar y que ahora cada uno debe seguir....., sabías que???,,,,, sí, sí lo sabes.*

*A mis hermanos que espero vengan tiempos mejores.*

*A mis sobrinos Dariana, Lillian, Elliot y Ulises que día a día descubran las maravillas que tiene la vida en cada etapa y disfruten su niñez.*

<b>i</b>	<b>ÍNDICE GENERAL</b>	.....	<b>6</b>
<b>ii</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	.....	<b>10</b>
<b>iii</b>	<b>ABREVIATURAS</b>	.....	<b>11</b>
<b>iv</b>	<b>RESUMEN</b>	.....	<b>13</b>
<b>v</b>	<b>ABSTRACT</b>	.....	<b>15</b>
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	.....	<b>16</b>
1.1	Uso de plaguicidas	.....	16
1.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	.....	17
1.3	Generación de resistencia de los insectos a las $\delta$ -endotoxinas.....		19
1.3.1	Mecanismos de resistencia de los insectos a las $\delta$ -endotoxinas.....		20
1.4	Toxinas insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....		21
1.4.1	Proteínas Cyt	.....	21
1.4.2	Proteínas Cry	.....	22
1.4.3	Nomenclatura	.....	22
1.5	Estructura de las toxinas Cry-3D .....		24
1.6	Modo de acción de las toxinas Cry3-D.....		26
1.6.1	Solubilización y procesamiento de la protoxina .....		27

1.6.2	Unión al receptor.....	28
1.6.3	Oligomerización.....	30
1.6.4	Muerte celular.....	31
1.6.4.1	Formación de poro.....	31
1.6.4.2	Modelo de señalización celular .....	31
1.7	Líneas celulares como modelos de estudio .....	34
1.7.1	Biología de la célula en cultivo .....	34
1.7.2	Líneas celulares de insectos.....	35
<b>II.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>37</b>
2.1	Líneas celulares de insecto como blanco de las toxinas Cry.....	37
2.2	Efectos intracelulares inducidos por toxinas formadoras de poro (TFP) .....	40
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>IV.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>43</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>43</b>
5.1	Objetivos particulares.....	43
<b>VI</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
6.1	Mantenimiento de la línea celular CF-1 de <i>Choristoneura fumiferana</i> .....	44

6.2	Crio preservación de la línea celular CF-1.....	45
6.3	Purificación de las toxinas .....	45
6.4	Activación de la protoxina .....	46
6.5	Determinación de la concentración de proteína.....	47
6.5.1	Método Bradford.....	47
6.5.2	Método Lowry.....	48
6.6	Marcaje de proteínas Cry .....	48
6.7	Obtención de membranas de células CF-1.....	49
6.8	Ensayos de unión de las toxinas a membranas de CF-1 (“Ligand blot”) .....	50
6.9	Identificación de receptores para las toxinas Cry en las células CF-1 .....	50
7.0	Oligomerización de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac.....	51
7.1	Ensayos de toxicidad.....	52
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
7.1	Purificación, solubilización y activación de las toxinas Cry.....	54



7.2	Análisis de la toxicidad de las toxinas Cry en la línea celular CF-1 .....	56
7.2.1	Estandarización de la medición de Lactato deshidrogenasa.....	56
7.3	Efecto de las toxinas Cry1A y de sus mutantes sobre las células CF-1... .....	60
7.4	Curva dosis-respuesta de las toxinas Cry1A sobre células CF-1.....	63
7.5	Efecto del catión divalente sobre la actividad de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y las CryMod.....	65
7.6	Unión de toxina Cry1Ab y Cry1Ac en células CF-1 (“Ligand blot”) .....	67
7.7	Búsqueda de receptores para las toxinas Cry en células CF-1 .....	68
7.8	Oligomerización de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac.....	69
<b>VIII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>70</b>
<b>IX.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>74</b>
<b>X.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>XI</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>77</b>

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Micrografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio de campo claro 1000X.

**Figura 2.** Estructura terciaria general de las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*.

**Figura 3.** Mecanismo de acción de las toxinas Cy1A en Lepidópteros.

**Figura 4.** Líneas celulares de invertebrados establecidas a lo largo del tiempo.

**Figura 5.** Representación esquemática de los tejidos de una larva adulta de Lepidóptero a partir de los cuales se han establecido las líneas celulares de insectos.

**Figura 6.** Sección de una placa de 96 pozos del ensayo de medición de Lactato deshidrogenasa (LDH).

**Figura 7.** Gel SDS-PAGE al 10 % de acrilamida de las toxinas Cy1A empleadas.

**Figura 8.** Efecto del suero fetal bovino en las estimaciones de LDH.

**Figura 9.** Efecto de la solución de activación de las toxinas cry en la viabilidad celular.

**Figura 10.** Localización de los aminoácidos mutados en las toxinas cry empleadas.

**Figura 11.** Cambios citológicos en las células CF-1 inducidos por la toxina Cry1Ab y sus mutantes.

**Figura 12.** Cambios citológicos inducidos en las CF-1 inducidos por la toxina Cry1Ac.

**Figura 13.** Gráfica de la curva dosis respuesta de las toxinas cry empleadas en la línea celular CF-1.

**Figura 14.** Papel del catión divalente en la toxicidad de las toxinas Cry empleadas.

**Figura 15.** Marcaje de la toxina Cry1Ab con biotina.

**Figura 16.** Unión de las toxinas Cry1A e identificación de los receptores de las toxinas Cry1A en las membranas de células CF-1.

**Figura 17.** Oligomerización de las toxinas Cry1A.

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Amperes
<b>APN</b>	Aminopeptidasa tipo N
<b>ALP</b>	Alcalino fosfatasa
<b><i>B. thuringiensis</i></b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>BSA</b>	Albúmina sérica de bovino
<b>Bt-R1</b>	Receptor I a caderina de <i>Manduca sexta</i>
<b>Cols</b>	Colaboradores
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>Ej</b>	Ejemplo
<b>ES</b>	Error estandar
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>HCT</b>	Medio mínimo de hidrolizado de triptona caseina
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>min</b>	Minutos
<b>Mod</b>	Modificada
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonil
<b>PVDF</b>	Membrana de difluoruro polivinilideno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b><i>sbs.</i></b>	Subespecie
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida gel electroforesis
<b>TFP</b>	Toxina formadora de poro
<b>TTN</b>	Tris/Tritón X-100/NaCl

<b>TX-100</b>	Tritón X-100
<b>UAF</b>	Unidades arbitrarias de fluorescencia
<b>VMMA</b>	Vesículas de membrana de la microvellosidad apical
<b>~</b>	Aproximadamente

#### IV RESUMEN

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* son empleadas como una alternativa biológica al control químico de insectos plaga en la agricultura y de insectos transmisores de enfermedades humanas. Estas toxinas interactúan con receptores específicos localizados en la microvellosidad de las células epiteliales del intestino del insecto blanco. Dicha unión permite la oligomerización e inserción de la toxina en la membrana, donde forma poros iónicos que provocan un desequilibrio osmótico y causan la lisis celular y la muerte del insecto.

Actualmente la parte bioquímica del mecanismo de acción de las toxinas Cry está ampliamente descrita, pero un análisis del mecanismo de acción de las toxinas a nivel celular es escaso. Esto se debe principalmente a la falta de un modelo celular apropiado que permita el empleo de técnicas con resolución de los eventos celulares que ocurren en presencia de las toxinas Cry. Como la identificación de rutas o moléculas específicas que pudiesen estar involucradas y que permitiesen a la célula sobrevivir ó que le lleven la muerte ante la toxina.

En el presente trabajo analizamos el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac en la línea celular CF-1 de *Choristoneura fumiferana*. También se analizó la toxicidad de 3 toxinas Cry afectadas en unión al receptor, en oligomerización y formación de poro. Nuestros datos muestran que todas las toxinas probadas mantuvieron su comportamiento de toxicidad previamente reportado en bioensayos

realizados sobre larvas de 1er instar del Lepidóptero *Manduca sexta*. Lo que sugiere que en CF-1 pudiese estar operando un mecanismo de acción de la toxina muy parecido al descrito *in vivo* en los insectos blanco.

Estos datos proponen que esta línea celular se puede emplear para estudiar los cambios intracelulares que se presentan cuando la toxina se inserta en la membrana y afecta la permeabilidad celular. De esta manera se podrá conocer y entender las respuestas celulares que desarrollan las células blanco en los insectos ante la acción de las toxinas Cry.

## ABSTRACT

The Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* are used as an alternative biological control to replace the chemical pesticide of insect pest in agriculture as well as disease vectors of public health importance. The interaction of cry toxins with specific membrane receptors of insect midgut cell is determinant in toxic activity. These interactions allow the oligomerization, insertion of toxin on membrane and pore formation that disrupts osmotic balance and causes cellular lysis and death of the insect larvae.

Currently, the biochemical mechanism of cry toxin action is extensively described, nevertheless, the effects at cellular level is poorly known due to the lack of an appropriated cellular model. This study was focused in the characterization of a cellular system that allows the use of tools with cellular resolution in order to identify the intracellular events in response to cry toxin.

We studied the action mechanisms of the toxins Cry1Ab and Cry1Ac on CF-1 cell line of the *Choristoneura fumiferana*. Additionally, we analyzed toxicity of 3 different cry toxins mutants affected in the binding to the receptor, oligomerization or pore formation.

Our data shows that all the tested toxins maintain their toxicity behavior observed on bioassays performed previously on larvae first instar of *Manduca sexta*, which suggest, that in CF-1 cells a similar mechanism to the one described in vivo could be operating. Taken together, our data propose that CF-1 can be used to study the intracellular changes that occur when the toxins are inserted into the membrane and effects in cellular permeability. With this model we could have a better understanding of the response that cells develop in the presence of cry toxins like signaling pathways or specific molecules involved in the death or survival of the cells in presence of the cry toxin.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Uso de plaguicidas

El control de plagas de insectos en la agricultura así como de insectos que son vectores de enfermedades humanas (como el dengue y malaria) tradicionalmente es mediante el empleo de insecticidas químicos. El mercado mundial de insecticidas está todavía dominado por compuestos que inhiben irreversiblemente a las acetilcolinesterasas (AChE). Los inhibidores de la AChE (organofosforados, carbamatos) y los que actúan sobre canales de sodio dependientes de voltaje (en particular, piretroides) representan aproximadamente el 70 % del mercado mundial. Sin embargo, debido a las similitudes en el sistema nervioso de los insectos y vertebrados, estos insecticidas tienen una considerable toxicidad hacia otros organismos no blanco, por lo tanto su uso puede causar daños considerables a animales benéficos y al ambiente (Nauen y Bretschneider 2002).

El amplio uso de estos compuestos ha causado el desarrollo de resistencia en muchos insectos plagas y además la selección de poblaciones resistentes conlleva al brote de plagas secundarias (Devine y Furlong, 2007). También los altos niveles de resistencia generan que las concentraciones eficaces para el control de los insectos lleguen a superar las concentraciones legalmente permitidas. Por ello, es necesaria una búsqueda de nuevos insecticidas con mejor eficacia y un modo de acción más específico hacia los insectos que se pretende combatir (Badii *et al.*, 1996). Los productos de origen biológico reúnen estas características y se han propuesto como una alternativa al control químico, denominándose bioinsecticidas. Las proteínas que



produce *Bacillus thuringiensis* son un ejemplo de bioinsecticidas y representan ~2 % del mercado total de insecticidas (Bravo *et al.*, 2011). Estas proteínas son activas contra larvas de varios ordenes de insectos y por su alta especificidad proporcionan varias ventajas como: seguridad en la salud humana, en el ambiente y en organismos no blanco, se garantiza la reducción de residuos de plaguicidas en los alimentos y un mejor equilibrio entre las poblaciones que interaccionan con las especies plaga (Shelton *et al.*, 2002).

## 1.2 *Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, móvil y se encuentra en varios hábitats. Durante su ciclo de vida presenta dos fases diferenciadas, la fase de crecimiento vegetativo en la cual se duplica mediante bipartición cada 30-90 minutos dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación que se desencadena cuando la bacteria esta en un medio con limitación de nutrientes (Betchel y Bulla 1976). Durante la esporulación produce proteínas Cry y Cyt ( $\delta$ -endotoxinas) contenidas en cristales bipiramidales, romboides, cuadrados o amorfos, dependiendo de la proteína Cry que exprese (Karamanlidou *et al.*, 1991; Kaelin *et al.*, 1994) (Figura 1B). Un gran número de  $\delta$ -endotoxinas son activas contra insectos como Lepidópteros (mariposas), Coleópteros (escarabajos), Dípteros (mosquitos) y al momento se conoce un menor número de toxinas contra Ortópteros (grillos), homópteros (pulgones), malófagos (falsos piojos) o contra otros invertebrados como Nemátodos (Aronson *et al.*, 1986; Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2003). Específicamente las  $\delta$ -endotoxinas tienen

como blanco un gran número de insectos plaga agroforestales e insectos vectores de enfermedades humanas como la malaria y dengue (de Maagd *et al.*, 2001; de Maagd *et al.*, 2003).

En 1981 se clonó el primer gen que codificaba para un cristal protéico de *B. thuringiensis* (Schnepf y Whiteley, 1981), a partir de entonces la búsqueda y caracterización de nuevos genes *cry* es un proyecto de interés mundial, ya que caracterizar la gran diversidad de esta familia de proteínas proporciona nuevas alternativas para la protección de cultivos que se ven expuestos a diversos insectos plaga y un manejo más adecuado de insectos transmisores de enfermedades humanas.

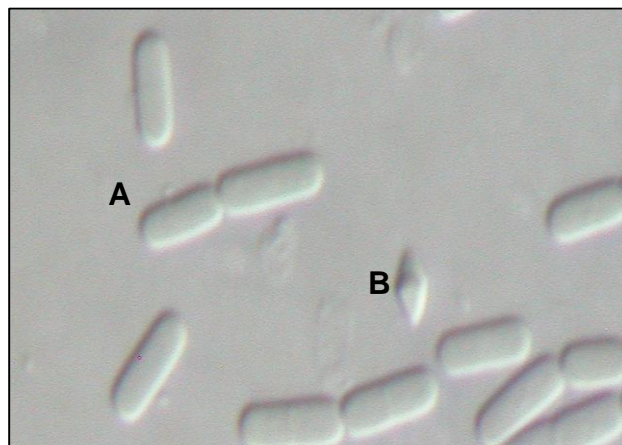


Figura 1. Micrografía de *B. thuringiensis* en microscopio de campo claro 1000X equipado con prisma de Normaski. (A) Células vegetativas de *B. thuringiensis*. (B) Se observa un cristal ya liberado del esporangio, forma bipyramidal más común de las toxinas Cry1 (Meadows *et al.*, 1992).

### 1.3 Generación de resistencia de los insectos a las $\delta$ -endotoxinas

Las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* se han utilizado como bioinsecticidas en la agricultura, principalmente en cultivos de hortalizas y cereales. En el año de 1930, salió al mercado el primer formulado comercial de *B. thuringiensis*. El ingrediente activo de estos formulados son mezclas de cristales y esporas, las cuales en un principio sólo se esparcían en los cultivos de interés. Sin embargo, de esta forma la acción de las toxinas estaba limitada sólo a la superficie de la planta y no al interior de los tejidos, que en muchas ocasiones son atacados por endoparásitos. Esto llevó a la creación de plantas transgénicas que expresaban una  $\delta$ -endotoxina (plantas *Bt*) (Barton *et al.*, 1987; Perlak *et al.*, 1990). Con esta estrategia se han obtenido distintas plantas resistentes a insectos, entre ellas: maíz, papa, alfalfa, soya, brócoli, col, arroz y caña de azúcar (Koziel *et al.*, 1993; Perlak *et al.*, 1993; Yamamoto y Powell, 1993; Parrot *et al.*, 1994; Metz *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 1995; Vázquez *et al.*, 1996; Wünn *et al.*, 1996; Arencibia *et al.*, 1995).

Los insectos han demostrado un enorme potencial para desarrollar resistencia a todos los productos que se han empleado para su control. La expresión constitutiva y generalizada (en todos los tejidos de la planta) de las  $\delta$ -endotoxinas, así como su empleo frecuente y extensivo son, sin duda, factores a influir en la aparición de mecanismos de protección del insecto ante las  $\delta$ -endotoxinas. En la actualidad, el desarrollo de resistencia es considerada la mayor amenaza para el uso efectivo y prolongado de las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*. Debido a su especificidad y tiempos cortos de permanencia en el ambiente las  $\delta$ -endotoxinas disminuyen la

posibilidad de inducir resistencia en los insectos. No obstante, varios experimentos de laboratorio muestran un alto potencial de desarrollo de resistencia en poblaciones expuestas de manera prolongada a estas toxinas (Tabashnik, 1994; Ferré y Van Rie., 2002; Tabashnik *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2005). El primer caso documentado de resistencia a formulados de *B. thuringiensis* es el de las poblaciones de campo de la polilla de la col *Plutella xylostella* en Hawai (Tabashnik *et al.*, 1990). En *Trichoplusia ni* también se ha observado resistencia a un formulado de *B. thuringiensis* en cultivos de invernadero en Canadá (Janmaat *et al.*, 2003, 2004; Kain *et al.*, 2004). A la fecha no se han encontrado poblaciones de insectos en el campo resistentes a las plantas *Bt*. Sin embargo, algunas de las poblaciones seleccionadas en laboratorio, como *P. xylostella*, *Pectinophora gossypiella*, *Helicoverpa armígera* (Tabashnik *et al.*, 2003), *T. ni* (Kain *et al.*, 2004), y *Chrisomela tremura* (Augustin *et al.*, 2004), son capaces de completar su desarrollo en plantas *Bt*.

### 1.3.1 Mecanismos de resistencia de los insectos a las $\delta$ -endotoxinas

En cuanto a los mecanismos de resistencia se ha mostrado que están relacionados con los diferentes pasos implicados en el modo de acción de la toxina (Bravo *et al.*, 2005). En algunos insectos una alteración en las condiciones que afectan a la solubilidad de las proteínas Cry se ha correlacionado con el desarrollo de resistencia (Rajamohan *et al.*, 1998). Otro posible mecanismo de resistencia consiste en la reparación del tejido dañado del tubo digestivo, como se ha observado en una población resistente a la toxina Cry1Ac, de *Heliothis virescens* (Forcada *et al.*, 1999; Martínez-Ramírez *et al.*, 1999). Sin embargo, los mecanismos de resistencia que mejor se conocen son los que

tienen que ver con alteraciones en la unión de la toxina a los receptores y los relacionados con el proceso proteolítico y activación de las proteínas Cry (Ferré y Van Rie, 2002; Griffiths y Aroian, 2005; Bravo *et al.*, 2005). Por otra parte también se ha mostrado que la resistencia de *H. virescens* a la toxina Cry1Ac se debe a una mutación del receptor de la toxina (Gahan *et al.*, 2001). También se han encontrado poblaciones resistentes de *P. gossypiella*, en las que se han observado eliminación de secuencias en genes que codifican para los receptores de la toxina (Morin *et al.*, 2003).

El estudio acerca del mecanismo de acción de las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* proporciona un mejor conocimiento del mecanismo molecular por el cual tienen su efecto y ha permitido explicar la causa de la resistencia para la mayoría de los casos. Toda esta información integrada permite plantear estrategias para solucionar la resistencia en los insectos a estas toxinas, como el caso del diseño de toxinas modificadas que abaten resistencia (Soberón *et al.*, 2007).

#### **1.4 Toxinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis***

Las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* se han clasificado con base a su secuencia de aminoácidos en dos familias, Cyt y Cry.

##### **1.4.1 Proteínas Cyt**

Las proteínas Cyt deben su nombre al hecho de poseer una actividad citolítica general *in vitro* contra varios tipos de células (Knowles 1994; Thomas y Ellar, 1983). Son tóxicas a Dípteros y los genes de muchas de ellas se han identificado y secuenciado,

las más estudiadas son Cyt1Aa1 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* y Cyt1Aa2 de *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* cepa PG14 (Earp y Ellar, 1987; Waalwijk *et al.*, 1985). Estas toxinas consisten en un dominio sencillo de 2 horquillas hélices  $\alpha$  externas que envuelven un núcleo de láminas  $\beta$  (Li *et al.*, 1996). Las toxinas Cyt presentan sinergismo con algunas toxinas Cry facilitando la unión y quizá la internalización de la toxina Cry, favoreciendo el efecto tóxico específico a Dípteros (Chilcott *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1995 y Pérez *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Proteínas Cry

Este grupo representa la mayor parte de las  $\delta$ -endotoxinas con una masa molecular de ~70 a 130 kDa (Bravo *et al.*, 1997). Al igual que las toxinas Cyt son sintetizadas como protoxinas durante la esporulación y cristalizan formando inclusiones de hasta 1  $\mu$ m de longitud. Las proteínas Cry representan una familia de proteínas muy diversa, muchos genes *cry* son asociados con elementos transponibles que facilitan la movilización de los genes (de Maagd *et al.*, 2001). Muchos de estos genes se encuentran en plásmidos de gran tamaño (González *et al.*, 1981) y sólo en unos pocos casos se han encontrado en el DNA cromosómico (Carlson y Kolsto, 1993) y una transferencia horizontal por conjugación bacteriana también pudo ayudar a aumentar la diversidad de estas toxinas (Caballero y Ferré, 2001; Thomas *et al.*, 2000 y 2001).

#### 1.4.3 Nomenclatura

Más de 200 genes *cry* se han clonado, secuenciado y estudiado de manera extensiva. Originalmente las toxinas Cry fueron clasificadas de acuerdo a su especificidad

insecticida (Höfte y Whiteley, 1989). Se formaron cuatro grupos de proteínas Cry: Cry I (específica a Lepidópteros), Cry II (Lepidópteros-Dípteros), Cry III (Coleópteros) y CryIV (Dípteros). Más adelante, Feitelson y colaboradores agregaron dos grupos más a la clasificación, Cry V y Cry VI, activas contra nemátodos (Feitelson *et al.*, 1992). La caracterización de nuevas proteínas Cry mostraron inconsistencias con esta clasificación, ya que las proteínas Cry nuevas tenían secuencias de aminoácidos semejantes pero con actividades diferentes. Por ello, en 1998 Crickmore y colaboradores propusieron una nueva clasificación basada en la identidad de secuencia de los aminoácidos. Esta nomenclatura define un nombre mnemónico Cry (del inglés “crystal”) y cuatro rangos jerárquicos. Las proteínas con menos del 45 % de similitud se consideran de diferente rango primario y se denominan con números (Ej. Cry1, Cry2, Cry3, etc), de menos del 78 y de 95 % de identidad constituyen el rango secundario y terciario respectivamente, los cuales son denominados con letras mayúsculas (Ej. Cry1A, Cry1B, Cry1C, etc.) y minúsculas (Ej. Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.) respectivamente. En la actualidad se ha reportado 67 rangos primarios de proteínas Cry que se pueden ver en la página [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). La mayoría de estas toxinas pertenecen al grupo de toxinas Cry de tres dominios (Cry-3D), pero también existen toxinas Cry semejantes a toxinas Mtx (por sus siglas en inglés “mosquitocidal toxin”) y toxinas binarias de *Bacillus sphaericus*, así como toxinas Cry que no tienen relación con ningún otro grupo de toxinas. Además, fuera del grupo de toxinas Cry algunas cepas de *B. thuringiensis* producen toxinas llamadas VIP (por sus siglas en inglés

“vegetative insecticidal protein”), las cuales a diferencia de las Cry se producen durante la fase de crecimiento vegetativo (Crickmore *et al.*, 2011).

## 1.5 Estructura terciaria de las toxinas Cry-3D

La estructura tridimensional de siete diferentes toxinas Cry-3D, Cry1Aa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry3Ba (Galitsky *et al.*, 2001), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005), Cry4Aa (Boonserm *et al.*, 2006), Cry8Ea (Guo *et al.*, 2009) se han resuelto por cristalografía. Del análisis de estas estructuras se concluye que son proteínas globulares y aún entre proteínas de rango primario distinto existe un plegamiento básico general organizado en tres dominios constituidos cada uno por ~200 aminoácidos. El dominio I (DI) inicialmente fue descrito en la toxina Cry3Aa es de ~220 aminoácidos y se encuentra en el extremo N-terminal. Está constituido por siete hélices  $\alpha$  cuya hélice central ( $\alpha$ -5) está rodeada por seis hélices externas (Figura 2). Este dominio muestra una estructura similar al dominio formador de poro de otras toxinas bacterianas como la toxina de la difteria y la colicina A (Parker y Pattus, 1993). También participa en la inserción en la membrana y formación del poro (Pigott y Ellar, 2007; Schnepf *et al.*, 1998). El dominio II (DII) está formado por tres láminas  $\beta$  antiparalelas que terminan en asas en el vértice de la molécula formando un prisma (Li *et al.*, 1991) y en estas asas es donde se tiene la mayor variabilidad entre las toxinas Cry (Boonserm *et al.*, 2005). Este dominio tiene un papel importante en la interacción con el receptor y por lo tanto tiene una participación importante en la



determinación de especificidad de las toxinas Cry (Li *et al.*, 1991; Rajamohan *et al.*, 1996).

Finalmente el dominio III (DIII) está constituido por dos láminas  $\beta$  antiparalelas arregladas en forma de emparedado, una sobre otra. El DIII muestra menos variabilidad estructural que el DII y las principales diferencias se presentan en la longitud, la orientación y la secuencia de las asas. Un claro ejemplo son las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac, en donde existen diferencias determinadas por la extensión del asa de Cry1Ac que crea una cavidad de unión a N-acetilgalactosamina, la cual está implicada en el reconocimiento de este azúcar presente en el receptor aminopeptidasa tipo N (APN) ( Burton *et al.*, 1999; Derbyshire *et al.*, 2001)

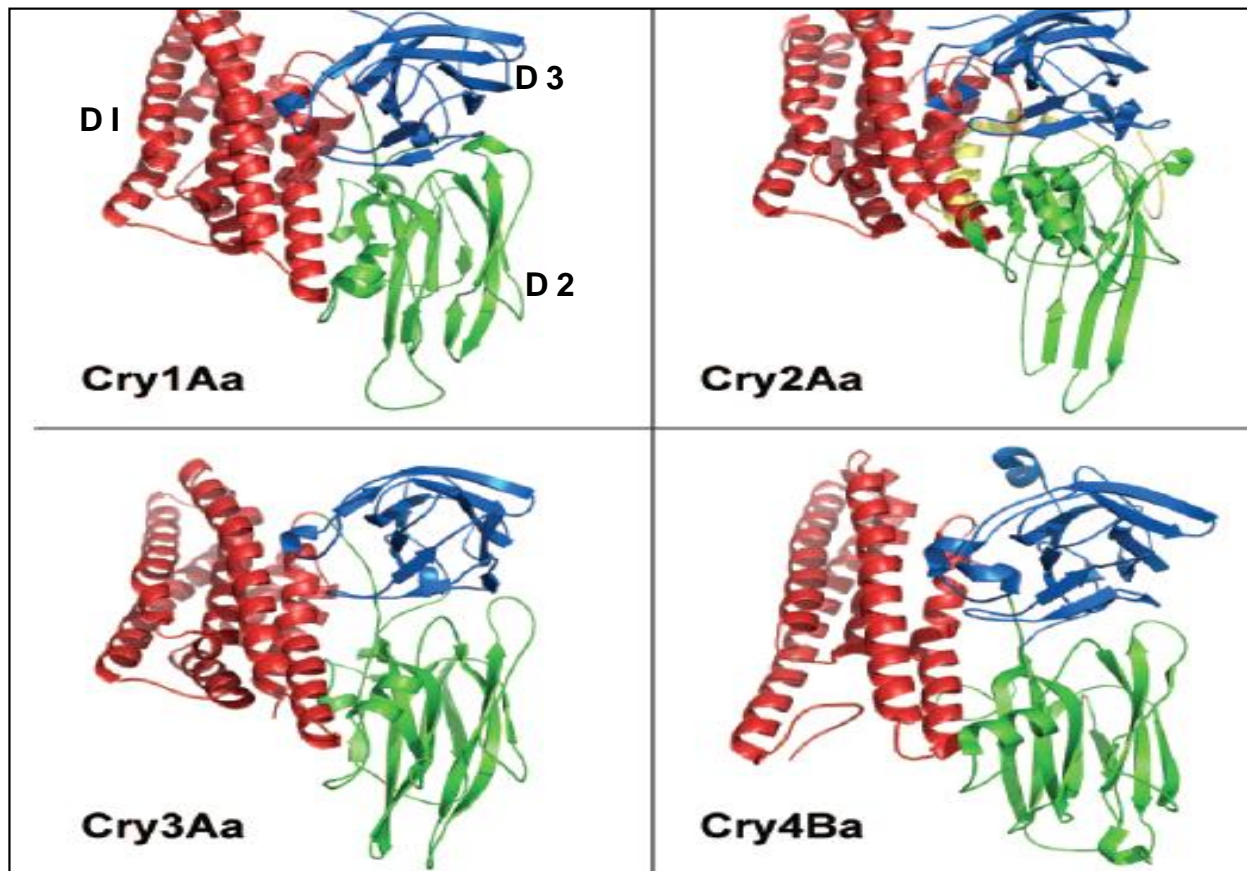


Figura 2. Estructura terciaria general de  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*. Los dominios D1, DII y DIII son mostrados en color rojo, verde y azul, respectivamente. El N- terminal del dominio de la protoxina Cry2Aa se muestra en amarillo. Las imágenes de las estructuras de estas proteínas fueron generadas usando el programa PyMol (Warren L. DeLano, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA [<http://www.pymol.sourceforge.net>]). Imagen tomada de Pigott y Ellar., 2007.

### 1.6 Modo de acción de las toxinas Cry-3D

La forma monomérica de las diferentes toxinas Cry-3D presenta una estructura tridimensional muy semejante entre ellas, lo que sugiere un mecanismo de acción general.

Una vez que las protoxinas contenidas en los cristales son ingeridas por el insecto, éstas se solubilizan y se procesan proteolíticamente a una forma monomérica de ~60 kDa (Chestukhina *et al.*, 1982; Höfte *et al.*, 1986; Choma *et al.*, 1990). Las proteínas Cry monoméricas se unen a receptores de células epiteliales del intestino, oligomerizan y se insertan en la membrana formando poros iónicos que finalmente provocan la muerte del insecto (Gill, 1995; Schnepf *et al.*, 1998, Bravo, 2004) (Figura 3).

#### 1.6.1 Solubilización y procesamiento de la protoxina

Las condiciones reductoras y el pH alcalino particular en el intestino de los insectos lepidóptero y díptero blanco, favorecen el rompimiento de los puentes disulfuro (abundantes en la mitad del C-terminal) lo cual permite solubilizar los cristales y así liberar a la protoxina de ~130 kDa (Gringorten *et al.*, 1992). Una vez que las protoxinas se encuentran solubles estas deben procesarse proteolíticamente para ser activas (Hofmann *et al.*, 1988). Puede generalizarse que el procesamiento de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros 28 aminoácidos del extremo N-terminal (Höfte *et al.*, 1986, Martens *et al.*, 1995; de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2002) y de los últimos 500 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína Cry, quedando de esta forma un fragmento monomérico de ~60 kDa activo y resistente a proteasas (Höfte y Whiteley, 1989). Entre las proteasas responsables del procesamiento de las proteínas Cry, en Lepidópteros se encuentran las del tipo tripsina, quimiotripsina y serina-proteasas (Martínez-Ramírez y Real, 1996); en coleópteros son cisteína y aspartato proteasas. También se encuentran termolisinas y catepsinas (Bravo *et al.*, 2004). El empleo de

estas proteasas ha ayudado a la activación *in vitro*, sin embargo, falta mucho por definir sobre las proteasas específicas que *in vivo* llevan a la forma activa de cada toxina Cry. Existen trabajos que proponen la participación de proteasas propias de *B. thuringiensis* y/o de bacterias propias del intestino del insecto que pudieran ser determinantes en el procesamiento de estas proteínas (Kumar y Venkatewerlu, 1998; Reddy *et al.*, 2000; Broderick *et al.*, 2006).

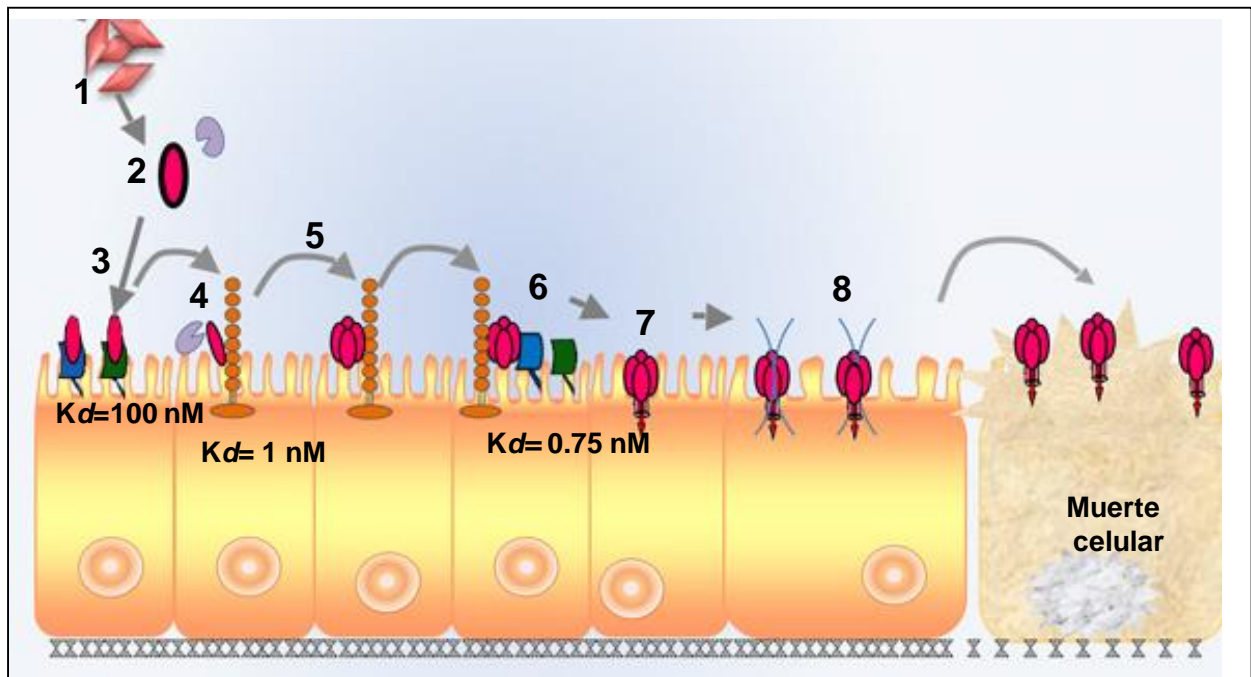


Figura 3. Mecanismo de acción de las toxinas Cry1A en Lepidópteros. El modelo propone la participación secuencial de receptores de la microvellosidad del epitelio intestinal del insecto blanco. 1.- Solubilización de los cristales, 2.- Activación de la protoxina por proteasas, 3.- Unión del monómero a APL y APN, 4.- Unión a caderina (BtR1) y procesamiento de la hélice  $\alpha$ -1, 5.- Oligomerización, 6.- Unión del oligómero a APN y ALP, 7.- Inserción en la membrana y formación del poro, 8.- Flujo iónico. Pacheco *et al.*, 2009.

### 1.6.2 Unión al receptor

Las proteínas Cry después de ser activadas se unen a receptores específicos localizados en las microvellosidades de células columnares del epitelio intestinal de las larvas de insectos susceptibles (Hofmann *et al.*, 1988; Bravo *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998; De Maagd *et al.*, 2001, 2003). Esta interacción es determinante para la especificidad de la toxina (Van Rie *et al.*, 1989; Jenkins y Dean, 2001). A la fecha, están reportados tres receptores para las toxinas Cry1A activas contra Lepidópteros: cadherina (Bt-R1) con un peso molecular de ~210 kDa (Nagamatsu *et al.*, 1998; Nagamatsu *et al.*, 1999; Vadlamudi *et al.*, 1993; Vadlamudi *et al.*, 1995; Gahan *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002), miembros de la familia de las APN con un peso molecular de ~120 kDa (Gill *et al.* 1995; Rajagopal *et al.*, 2002 y Sangadala *et al.*, 1994), fosfatasa alcalina (ALP) (Jurat-Fuentes y Adang, 2004, 2006; Fernández *et al.*, 2006;) y para el caso de Dípteros adicionalmente se reportó una  $\alpha$ -amilasa (Fernández-Luna *et al.*, 2010). Con excepción de Bt-R1 todas están ancladas a la membrana a través de un puente de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Para la toxina Cry5B con actividad contra nemátodos se propuso que los glicolípidos participan en la interacción con la membrana (Gahan *et al.*, 2001; Herrero *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2005). Así como la participación de un glicoconjugado de ~270 kDa y una proteína de ~250 kDa llamada P252 (Pigott y Ellar, 2007).

Las proteínas Cry1A unen a Bt-R1 de al menos seis especies de Lepidópteros, *Manduca sexta*, *Bombyx mori*, *H. virescens*, *H. armígera*, *P. gossypiella* y *Ostrinia nubilalis*. La proteína Bt-R1 de insectos que une a las toxinas Cry está compuesta por

un ectodominio formado por 11 o 12 repetidos (RC), un dominio transmembranal y un dominio intracelular (Bel y Escrache, 2006). La unión de toxinas Cry1 a la proteína APN se ha descrito en Lepidópteros como *B. mori*, *H. armigera*, *H. virescens*, *Lymantria dispar*, *M. sexta* y *P. xylostella* (Bravo *et al.*, 2011). ALP se ha reportado como proteína de unión de Cry1A en *H. virescens* y *M. sexta*. El glicoconjugado une a Cry1Ac en *L. dispar*. Adicionalmente la toxina Cry1Ac une a proteínas como la subunidad A de V-ATPasa y la actina en *M. sexta* y *H. virescens*, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de la toxina puede involucrar otros componentes de las células del intestino del insecto, pero la función de éstos aún no está analizado (McNall y Adang, 2003; Krishnamoorthy *et al.*, 2007).

### 1.6.3 Oligomerización

La interacción de la toxina Cry monomérica con sus receptores es de manera secuencial (Bravo 2004). Recientemente se ha propuesto que en un inicio la toxina interactúa tanto con el receptor APN y ALP (Pacheco *et al.*, 2009). Esta primera interacción es de baja afinidad (100 nM) pero sirve para incrementar la cantidad de toxina sobre la membrana. Enseguida la toxina interactúa con Bt-R1 y esta interacción tiene dos efectos sobre la toxina, a) promover un último procesamiento proteolítico que remueve la hélice  $\alpha-1$  del dominio I exponiendo regiones hidrofóbicas, lo que a su vez induce, b) la formación de un oligómero de ~250 kDa el cual incrementa 200 veces su afinidad a APN quien dirige la inserción de la toxina a microdominios de membrana (Miranda *et al.*, 2001; Gómez *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006).

#### 1.6.4 Muerte celular

##### 1.6.4.1 Formación de poro y lisis celular

Una vez que el oligómero está unido a la APN, parte del dominio I de la toxina se inserta de forma irreversible en la membrana formando un poro el cual tiene una permeabilidad a iones  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $Ca^{+2}$ , al agua y moléculas de mayor tamaño; lo que trae como consecuencia la lisis celular, disrupción de la integridad del intestino y la muerte del insecto (Zhuang *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2005). El tamaño del poro de las toxinas Cry1 se ha estimado de diferentes tamaños, que van de poros pequeños de ~0.6 nm y en otros casos de 1 a 2.5 nanómetros de diámetro, esta discrepancia probablemente se debe a que los estudios fueron realizados con sistemas y condiciones diferentes (Carroll *et al.*, 1997; Villalon *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1997). Por otra parte, una vez que las esporas bacterianas tienen acceso a la hemolinfa estas se multiplican en ella y provocan una septicemia que incrementa el efecto de las toxinas insecticidas (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2004).

##### 1.6.4.2 Modelo de señalización celular

Por otro lado, son varios los trabajos reportados en los que se muestra la importancia de Bt-R1 como receptor para las toxinas Cry. En dichos trabajos expresan heterológamente Bt-R1 en una línea celular de insecto no sensible y como resultado encuentran que ésta se vuelve sensible (Hua *et al.*, 2004; Aimanova *et al.*, 2006). Zhang y colaboradores reportaron que la línea celular de *T. ni* (H5) se vuelve sensible a la toxina Cry1Ab al expresar Bt-R1 de *M. sexta* y propusieron que la unión de la toxina monómerica a Bt-R1 desencadena la activación de una vía intracelular dependiente de

Mg<sup>2+</sup> asociada a muerte celular por incrementos de adenilato ciclasa y AMPc (Zhang *et al.*, 2006). En dicho trabajo proponen que tanto la formación del oligómero y la inserción en membrana de la Cry1Ab se da por una interacción lípido-proteína no específica y descartan la formación de un poro iónico que pudiese provocar la muerte de la célula en su modelo empleado, la toxicidad la atribuyen solo a una interacción específica del monómero con Bt-R1. Cabe aclarar que en ese trabajo no explican el aumento del oligómero en presencia del receptor y no demuestran si el oligómero presente solo está unido o insertado en la membrana, lo cual era necesario para llegar a la conclusión de que el oligómero insertado no es responsable de la toxicidad, a su vez no explican como una proteína expresada heterológicamente puede incorporarse a un sistema de señalización complejo como el de muerte celular.

Tanto la propuesta de formación de poro y la de señalización celular (Bravo, *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2006) consideran la participación fundamental de Bt-R1. Esta observación coincide con reportes en los que la alteración de la interacción de la toxina con Bt-R1 correlaciona con resistencia del insecto a la toxina (Ferré *et al.*, 2002; Pigott *et al.*, 2007).

Actualmente se cuenta con grandes avances en la caracterización bioquímica, molecular y electrofisiológica del mecanismo de acción de las toxinas Cry (Gómez *et al.*, 2007; Jiménez-Juárez., 2008) lo cual ha permitido el diseño de nuevas toxinas Cry mutantes que *in vivo* permiten demostrar que la formación del poro es el responsable de la toxicidad. Por ejemplo se tienen mutantes de Cry1Ab en el dominio I que solo están afectadas en oligomerización o en formación de poro y que conservan sus



características de unión a los diferentes receptores, pero en bioensayos estas mutantes pierden por completo la toxicidad, lo que indica que *in vivo* se requiere la formación del poro para matar al insecto (Jiménez-Juárez., 2008; Rodríguez-Almazán *et al.*, 2009). También se han diseñado las toxinas Cry Modificadas (CryMod) a las cuales por ingeniería genética se les eliminó la secuencia nucleotídica correspondiente a la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I, estas toxinas oligomerizan en ausencia de Bt-R1 y son tóxicas en insectos resistentes que presentan mutaciones en el gen de Bt-R1 o baja expresión del receptor por silenciamiento de Bt-R1 (Soberón *et al.*, 2007). Este diseño de toxinas respalda sin duda alguna al mecanismo de formación de poro como responsable de la toxicidad de las toxinas Cry.

Por otro lado cabe destacar que hasta el momento se ha dado una atención limitada al análisis del mecanismo de acción de las toxinas de Cry a nivel celular (Schwartz *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1994; Monette *et al.* 1997; Knowles y Farndale, 1988; Knowles y Dow 1993; Loeb *et al.*, 2001), esto se debe principalmente a la falta de un modelo celular apropiado que permita hacer un análisis intracelular durante la intoxicación con la toxina Cry. Contar con un modelo celular permitirá entre varias cosas dilucidar los mecanismos intracelulares que pudiesen inducirse por la toxina en la célula blanco y de tal manera identificar rutas o moléculas específicas que pudiesen estar involucradas en la defensa ante el ataque de la toxina y que permitan a la célula sobrevivir o bien le lleven la muerte.

## **1.7. Líneas celulares como modelos de estudio**

Las líneas celulares de invertebrados se han cultivado exitosamente durante los últimos 35 años. Entre los usos que se les ha dado esta la expresión de proteínas recombinantes para investigación básica o para aplicaciones comerciales a larga escala (Hink *et al.*, 1991). Su utilidad se ha extendido a diferentes campos de la biología entre las cuales se destacan las áreas de genética, bioquímica, biología molecular y parasitología entre otras (Morales *et al.*, 1997).

### **1.7.1 Biología de la célula en cultivo**

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada. De acuerdo con esa capacidad, las células pueden crecer formando una monocapa o en suspensión, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa. Igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa o en suspensión, como por ejemplo las células HeLa, derivadas de células cervicales cancerígenas (Davis, 1996).

Cuando se mantiene un cultivo se establece una nueva selección de células ya que aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento y a pesar de que en el momento en que se alcanza la confluencia las células en general detienen su crecimiento, pueden existir tipos celulares, neoplásicos, que sigan duplicándose y que desplacen a las otras células del cultivo (Reina, 2003).

Por otro lado, el epitelio del intestino medio de insectos consta de varios tipos de células con el siguiente orden de abundancia; columnares, caliciformes, regenerativas y células endocrinas. Éstas células epiteliales recién disociadas en cultivos primarios son una mezcla de células columnares y caliciformes en una proporción de 4: 1 en comparación con 1: 1 para el epitelio intacto. Esto sugiere que la disociación del epitelio y la adaptación al medio de cultivo es más difícil para células caliciformes que para las células columnares (Chapman, 1985). Así pues se debe de entender el cultivo como un sistema dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos o de las condiciones de cultivo (Reina, 2003).

#### 1.7.2 Líneas celulares de insectos

El cultivo *in vitro* de las más de 500 líneas celulares continuas de insectos que existen actualmente, se logró gracias al desarrollo de los medios de cultivo (Lynn, 2001; Lynn, 2002) (Figura 4), los cuales empezaron siendo medios muy simples hasta los medios de cultivo complejos con los requerimientos nutricionales necesarios y particulares para el mantenimiento de las células en cultivo (Eagle, 1955).

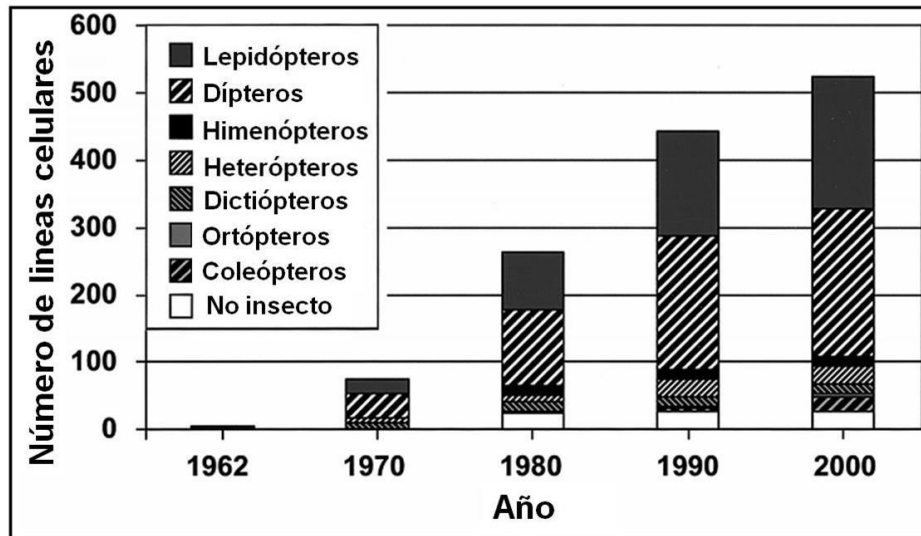


Figura 4. Líneas celulares de invertebrados establecidas a lo largo del tiempo. Cada barra representa el total de líneas celulares que se han reportado en un año específico. Principalmente se han desarrollado líneas celulares de Dípteros y Lepidópteros. Imagen modificada de Lynn, 1999.

Grace estableció la primera línea celular de un insecto utilizando los ovarios de la polilla emperador australiana (Vago, 1972; Lynn, 1999), desde entonces se han establecido líneas celulares de diferentes invertebrados, a partir de tejido embrionario, de hemocitos, larvas de neonatos y de diferentes tejidos de insectos adultos (Figura 5) (Lynn 2001). Estas líneas en su mayoría se han empleado en el aislamiento e identificación de virus, producción de antígenos, interacción con parásitos, bioquímica y biología molecular (Oelofsen *et al.*, 1990; Lynn 1999).

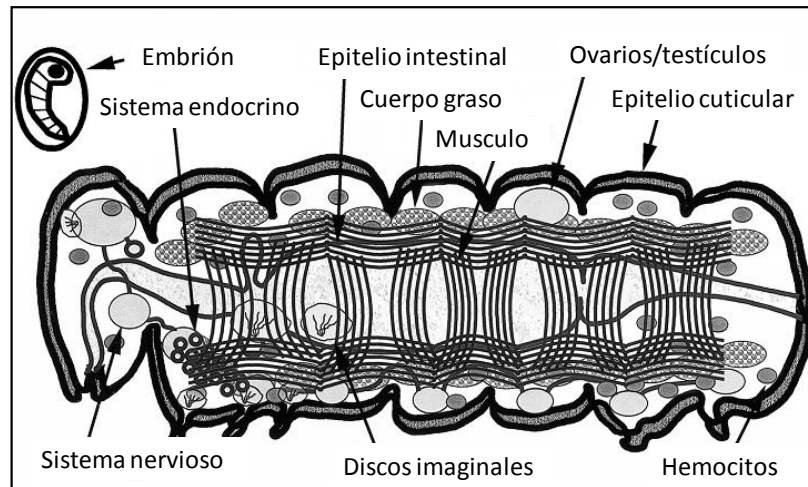


Figura 5. Representación esquemática de los tejidos de una larva adulta de Lepidóptero a partir de los cuales se han establecido las líneas celulares de insecto. Imagen tomada y modificada de Lynn, 1999.

## II ANTECEDENTES

### 2.1 Líneas celulares de insecto como blanco de las toxinas Cry

Los avances en la preparación de cultivos primarios de Lepidópteros y coleópteros han permitido establecerlos y mantenerlos *in vitro* por períodos de hasta seis meses preservando las características diferenciadas de las células, sin embargo estos cultivos son extremadamente laboriosos y requieren incluso de la purificación de hormonas del insecto para suministrar al cultivo (Hakim, *et al.*, 2009; Sadrud-Din *et al.*, 2006; Smaghe *et al.*, 2005). Por otro lado, varias líneas celulares de insecto han sido una herramienta para la caracterización del espectro de acción de las toxinas Cry

(Gringorten *et al.*, 1999; Gringorten 2001), así como análisis de unión (Johnson, 1994; Haider y Ellar 1987) y formación de poro (Schwartz *et al.*, 1993; Monette *et al.*, 1994; Vachon *et al.*, 1995). En estos trabajos se describen algunas líneas celulares que son sensibles a las toxinas Cry pero los datos de toxicidad reportados son solo cualitativos.

Entre los primeros trabajos en líneas celulares de insectos, se reportó que al igual que las células columnares *in vivo*, las líneas celulares de insecto responden a la toxina Cry por hinchamiento y lisis celular, en donde se propuso que el poro formado tiene un papel importante en la respuesta citotóxica y contribuye al hinchamiento y lisis celular (Murphy *et al.*, 1976; Nishiitsutsuji-Uwo *et al.*, 1979, Himeno 1987). Por otro lado, Knowles y Ellar (1987) emplearon la línea celular CF-1 que proviene de un macerado de larvas neonatas de *Choristoneura fumiferana* y analizaron el efecto citolítico de las toxinas Cry en presencia de solutos neutros con diferentes radios hidrodinámicos y propusieron un modelo de formación de poro y lisis osmótica como mecanismo de acción.

Otros estudios con células de insecto involucran eventos moleculares intracelulares que podrían tener alguna relevancia *in vivo* a concentraciones subletales de toxinas de *B. thuringiensis*. Se encontró que la toxina desacopla la fosforilación oxidativa en intestinos aislados (Travers *et al.*, 1976) y Potvin *et al* (1998) nota aumentos de  $Ca^{2+}$  intracelular en células CF-1 tratadas con toxina y propone que es resultado de un influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular y del  $Ca^{2+}$  liberado de fuentes intracelulares. Posteriormente Monette y colaboradores (1997) observaron un efecto dosis dependiente del  $Ca^{2+}$  extracelular en la toxicidad de las toxinas de *B. thuringiensis* hacia una línea celular de

*Spodoptera frugiperda* (Sf9) que fue suprimida por bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{La}^{2+}$ ) pero fue potenciado por inhibir el almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . Actualmente el mecanismo que media la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aún es desconocido y la relevancia toxicológica aún no es clara.

En otros trabajos, en varias líneas celulares de insecto sin sensibilidad a las toxinas Cry se han expresado las proteínas receptoras propuestas para estas toxinas (Banks *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2004; Keeton y Bulla., 1997; Zhang *et al.*, 2006; Karlygash *et al.*, 2006). De todos los trabajos reportados en pocos se ha logrado que la expresión del receptor confiera sensibilidad a la línea celular en el rango de concentración que ocurre *in vivo* (Gill y Ellar., 2002). En tales trabajos la expresión del receptor fue uno a la vez, ya sea APN, Bt-R1 o APL. El no lograr reproducir la alta sensibilidad a la toxina en las células, como ocurren *in vivo* en las larvas del insecto, puede ser entre otras razones porque el receptor no está expresándose de manera correcta. Otra posibilidad es que dado que en el insecto se requiere de la unión secuencial a varios receptores, es posible que sea indispensable la expresión heteróloga simultánea de dos o más receptores en la misma célula para lograr efectos de la toxina más cercanos a los que ocurren en la larva. En este contexto, el estudio de la toxicidad de las proteínas Cry en una línea celular sensible de manera natural es de gran utilidad ya que puede proporcionar información sobre cómo las células responden a nivel celular ante la toxina. En particular mediante técnicas de biología celular es posible dilucidar las vías de señalización y las proteínas que participan durante el proceso de intoxicación. El análisis de este tipo proporcionará nuevos blancos moleculares que pueden ser claves en respuestas de resistencia al bioinsecticida.

## 2.2 Efectos intracelulares inducidos por toxinas bacterianas formadoras de poro (TFP)

Altas concentraciones de TFP son eficientes para una rápida lisis de la célula blanco. Sin embargo, a concentraciones subletales de TFP la célula puede activar mecanismos de defensa. En células de mamífero se ha reportado que cambios moderados en la permeabilidad iónica inducida a dosis subletales de TFP activan algún tipo de respuesta celular, la cual puede variar por ejemplo entre una lisis osmótica, una muerte programada, o la sobrevivencia celular (González *et al.*, 2008; 2011). Las distintas respuestas celulares observadas ante las TFP dependen del tipo de célula, la concentración de la toxina y el tiempo de exposición. Por ejemplo, en células epiteliales de hígado de hámster juvenil y en células hepáticas de embrión humano dosis bajas de TFP como la aerolisina, pneumolisina, estreptolisina,  $\alpha$ -hemolisina de *S. aureus* y antrolisina O de *B. anthracis* inducen una respuesta celular que involucra MAPK/p38 (del inglés “Mitogen activated protein kinase”) (Huffman *et al.*, 2004; Ratner *et al.*, 2006). En estos reportes se demostró que concentraciones del orden nM de estas toxinas no causan citólisis, pero sí inducen una respuesta pro-inflamatoria al inicio, lo que promueve la sobrevivencia celular. Los estudios sobre este tipo de respuestas en líneas celulares de mamífero son amplios. Sin embargo; a pesar de que la clonación del primer gen de una toxina Cry fue en el año 1981 se sabe relativamente poco de la citotoxicidad en células sensibles a las toxinas Cry. Sobre el tema se sabe que la toxina Cry5Ba es tóxica para *Caenorhabditis elegans* y actúa como inductor de la vía de MAPK/p38 en células epiteliales. En estos nemátodos se silenciaron los 3 elementos



de la cascada modular de p38: pmk, sek y nsy. Los resultados demostraron que esta vía es indispensable para la respuesta de resistencia hacia la toxina Cry5B, ya que todos los organismos silenciados resultaron hipersensibles hacia la toxina (Huffman *et al.*, 2004).

Por otro lado, también se analizó la participación de la vía de las MAPK/p38 en la respuesta a la intoxicación con toxinas Cry específicas en larvas de *M. sexta* y *A. aegypti*. En los dos insectos se encontró que la expresión del mensajero y de la proteína de p38 así como la activación por fosforilación de p38 responde a la intoxicación con la toxina Cry específica. Así mismo las mutantes Cry afectadas en oligomerización no indujeron la fosforilación de p38 (Cancino-Rodezno *et al.*, 2010).

Otro trabajo reporta que en larvas de *Ephesia kuehniella* hay una tolerancia a la toxina Cry1Ac a concentraciones subletales de la toxina, lo cual correlacionó con una elevada respuesta inmune asociada con la producción de pro-coagulantes que reconocen o forman agregados específicos alrededor de la toxina (Rahman *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2007).

Finalmente está el trabajo citado anteriormente, en el cual se empleó la línea H5 de *T. ni* para expresar el receptor Bt-R1, en el cual proponen que la toxicidad de Cry1Ab está dada por un proceso de señalización intracelular dependiente de  $Mg^{2+}$  (independiente a la formación de poro), en el cual una proteína G se activa en respuesta a la unión del monómero con el receptor Bt-R1. En esta propuesta sugieren que la proteína G activa a la adenilato ciclasa quien promueve la producción de AMPc intracelular. Los niveles elevados de AMPc disparan la ruta de la proteína cinasa A (PKA), lo que conlleva

finalmente a la muerte producida por una ruptura de la membrana plasmática y de los organelos debido al incremento de la permeabilidad celular (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, no hay otro reporte en la literatura que respalde este modelo. Además, es importante señalar que este modelo se basa en el efecto de la toxina Cry1Ab en una línea celular que expresan heterológicamente a Bt-R1 de *M. sexta* y que por la metodología empleada faltó un análisis más cuidadoso para tener bases y poder descartar al modelo de formación del poro.

### **III JUSTIFICACIÓN**

Hasta el momento el laboratorio se ha encargado de la caracterización detallada a nivel molecular del mecanismo de acción de las toxinas Cry mucho de lo cual se ha resuelto por medio del diseño de toxinas Cry mutantes específicas, las cuales se evalúan ampliamente desde su capacidad de formar los cristales, su capacidad de ser solubles, procesamiento correcto, capacidad de oligomerizar, formar el poro en membranas modelo y, principalmente, su capacidad de seguir siendo tóxicas a las larvas de los insectos blanco.

Para el estudio del efecto de la toxina Cry a nivel celular es indispensable contar con una línea celular sensible de manera natural. Esto permitirá analizar las posibles respuestas intracelulares incluso en una sola célula con resolución espacio temporal, pudiendo definir los mecanismos que se activan para contender con la toxicidad o que se suman al efecto tóxico de las proteínas Cry. Obtener información de este tipo no es

posible al momento por la dificultad de realizar este análisis en células blanco dentro del organismo.

#### **IV HIPÓTESIS**

El mecanismo de acción de las toxinas Cry propuesto *in vivo* en Lepidópteros opera de forma conservada en la línea celular CF-1 del insecto *Choristoneura fumiferana*

#### **V OBJETIVO GENERAL**

Estudio del modo de acción de la toxina Cry1Ab y sus mutantes en la línea celular CF-1 del lepidóptero *Choristoneura fumiferana*

##### **5.1 Objetivos particulares**

- Analizar la toxicidad de Cry1Ab en la línea celular CF-1, así como la de las mutantes que no matan en bioensayos: Cry1Ab-G439D que no une a Bt-R1, Cry1Ab R99E que no oligomeriza, Cry1Ab E129K que su oligómero no se inserta en membrana y no forma poro, Cry1Ab F371A que como oligómero está afectado en unión a ALP y APN.
- Analizar la toxicidad de Cry1Ac, Cry1AbMod y Cry1AcMod. Las toxinas CryMod en bioensayos matan a insectos resistentes.
- Explorar el efecto del catión divalente extracelular en la actividad de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac

- Identificar las proteínas que unen a las toxinas Cry en la línea celular CF-1
- Análisis de la oligomerización de la toxina Cry en las células CF-1.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Mantenimiento de la línea celular CF-1 de *Choristoneura fumiferana*

La línea celular se obtuvo del laboratorio del Dr. Guido F. Caputo del “Canadian Forest Service, Natural Resources Canada, Sault Ste. Marie, Ontario” de Canadá.

El cultivo se mantuvo en frascos de 25 cm<sup>2</sup> con medio Grace’s (Grace 1962), que contiene suero fetal bovino (SFB) al 10 % y Triptosa al 0.25 % (v/v) (Grace’s suplementado) en un pH de 6.8 y una temperatura de 27 °C.

Para la realización de la resiembra (pase de cultivo) se tuvo en cuenta que el cultivo tuviese un 80 % de confluencia, lo cual fue cada 3 días. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: las células se resuspendieron por agitación manual. Se tomó una alícuota de volumen conocido de la suspensión celular y se cuantificó la densidad celular por conteo directo en una cámara Neubauer (Improved Neubauer, Hausser Scientific) colocada en un microscopio invertido empleando un objetivo de 20X. En una nueva caja se adicionó el volumen de la suspensión celular equivalente a  $10^6$  células y se aforó a un volumen de 6 ml con medio Grace’s suplementado. El cambio de medio Grace’s se realizó cada 3 días.

## 6.2 Criopreservación de la línea celular CF-1

La criopreservación de las células de CF-1 se hizo de la siguiente manera: por agitación manual se resuspendió el cultivo celular y se centrifugó 5 min a 1000 rpm (PowerSpin, MX Centrifuga, UNICO). La pastilla celular fue resuspendida en medio Grace's no suplementado y se cuantificó la densidad celular. Una vez cuantificadas las células se almacenan en crioviales (Corning) en volúmenes de 1.6 ml a una densidad celular de  $1.5 \times 10^6$  células por ml en medio Grace's suplementado y 10 % de dimetil sulfoxido (DMSO).

Los crioviales fueron sometidos a un proceso de enfriamiento y congelamiento gradual que empezó con 20 minutos (min) a 20 °C y luego a -70 °C para luego llevarlas a -196 °C bajo nitrógeno líquido. Dos semanas después del congelamiento de las células CF-1 se descongeló un criovial para determinar la viabilidad celular.

## 6.3 Purificación de las toxinas

Los cristales de toxinas silvestre Cry1Ab y Cry1Ac así como las mutantes de Cry1Ab G439D, R99E, E129K, F371A y de toxinas modificadas Cry1AbMod y Cry1AcMod se producen en una cepa acristalífera *cry*<sup>-</sup> transformada con el plásmido que contiene el respectivo gen *cry1*. Las cepas se cultivaron por 3 días a 30 °C en medio de esporulación HCT con eritromicina (10 mg/ml). Luego de la esporulación los cultivos fueron recuperados para lavarse enseguida con 300 mM NaCl y 10 mM de ácido

tetraacético etildiamina (EDTA) a 10,000 rpm 4 °C por 10 min (Eppendorf, Centrifuga 5804R, rotor f-34-6-38). La pastilla se lavó 4 veces por centrifugación con la misma solución y enseguida fue resuspendida en 5 ml de solución TTN: (20 mM Tris- HCl, 300 mM NaCl, Tritón X-100 0.1 % (TX-100)) a pH 7.2. La muestra se sonicó en tres pulsos de 50 segundos (s) a 20 watts con 1 min de descanso a 4 °C entre cada pulso (la aplicación de ultrasonido permite la ruptura de las bacterias que aún no han liberado el cristal y la eliminación de agregados de cristales). La muestra sonicada se pasó por un gradiente discontinuo de sacarosa que se describe a continuación: se prepararon soluciones al 67, 72, 79 y 84 % de sacarosa adicionadas con: 50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, TX-100 0.1 % a pH 8. En tubos “Ultra-Clear” para ultracentrifuga (Beckman) se colocó cuidadosamente 6 ml de cada solución en orden de mayor a menor porcentaje de sacarosa. Una vez listo el gradiente la muestra se cargó en los tubos y se centrifugó a 23,000 rpm a 15 °C por 20 min (Beckman, Ultracentrifuga L-80, rotor SW28). Después se recuperaron los cristales de las primeras 2 fracciones y se diluyeron las muestras con TX-100 al 0.01 % y se centrifugó 5 veces como al principio. La pastilla obtenida se resuspendió en solución Tris HCl 50 mM con fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) a una concentración final de 1 mM y pH 8. Finalmente se hicieron alícuotas de 100 µl de las fracciones y se almacenaron a 4 °C para su uso posterior.

#### **6.4 Activación de la protoxina**

Los cristales purificados se solubilizaron en 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.5 con 0.2 % β-mercaptoetanol a 37 °C por 2 horas (h). La muestra se centrifugó a 90,000 rpm, 15 min

(Beckman Coulter Optima™ Ultracentrifuga, Rotor TLA 100) a 4 °C y se recuperó el sobrenadante que contiene la protoxina soluble. El pH fue reducido adicionando un Tris-HCl 1M a pH 8.5 (relación 1:7). La activación de la protoxina se hizo con tripsina (SIGMA) en relación 1:50 µg (tripsina: proteína) durante 2 h, pH 8.5, 37 °C, 500 rpm (Eppendorf, Termoximer comfort). Finalmente la reacción se detuvo con PMSF a una concentración final de 1 mM.

## **6.5 Determinación de la concentración de proteína**

### **6.5.1 Método Bradford**

Para cuantificar las toxinas empleadas se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método utiliza un reactivo llamado reactivo de Bradford, que al entrar en contacto con proteínas se reduce, cambiando su color amarillento al azul intenso.

En un volumen de 790 µl de agua estéril se agregaron 10 µl de la muestra a medir. Se mezcló y se adicionó 200 µl del reactivo de Bradford (Bio-Rad), se dejó reaccionar 4 min y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrómetro (Beckman, DU 650). Los valores se interpolaron a una curva estándar hecha con albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones definidas de 1 a 20 µg/ml.

### 6.5.2 Método Lowry

La cuantificación de la proteína de membrana de las células CF-1 se realizó por el método Lowry. Este método se basa en la reacción de las proteínas (grupos R de aminoácidos aromáticos) con el reactivo de Folin dando un complejo con color (Lowry O, 1951). Primero se hizo la mezcla 1 ml del reactivo A (2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  disuelto en 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  NaOH) con 20  $\mu\text{l}$  del reactivo S, de esta mezcla se tomó 125  $\mu\text{l}$ , se agregó 5  $\mu\text{l}$  de la muestra problema y se dejó reaccionar 15 min. Después se agregó 1 ml del reactivo B (1 %  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y se dejó reaccionar 15 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Beckman, DU 650). De igual manera los valores se interpolaron a una curva estándar hecha con albúmina sérica bovina (BSA) (los reactivos A, S y B son proveídos por el fabricante, Bio Rad)

### 6.6 **Marcaje de proteínas Cry**

La biotilación de las toxinas activadas se hizo siguiendo las condiciones de Denolf y cols (1993) con una ligera modificación. En breve, se utilizó Biotinil N-hidroxisuccinimida ester (Amershan, GE, México, Cat 1061918) para marcar con biotina en los residuos de lisinas de la toxina. Inicialmente la toxina fue filtrada a solución de Boratos (50 mM Ácido Bórico, 50 mM NaOH, 150 mM NaCl, pH 8.6) por medio de filtros AmiconUltra-Y50 (Millipore). Luego de la filtración se adicionó 40  $\mu\text{l}$  del stock de biotilación por cada 1 mg de proteína y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Luego la proteína fue cargada en una mini columna de Sephadex G-25 (previamente calibrada



con PBS) y se centrifugó a 2,000 rpm (Eppendorf, Centrifuga 5804R, rotor A-4-44 ) por 2 min para separar la toxina de la biotina libre. De las muestras colectadas se hizo electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %. Este gel se electrotransfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore) a 350 mA durante 1 h. La membrana se bloqueó 1 h con BSA al 1 %, se lavó con PBS-Tween 0.1 %, se incubó con un conjugado estreptavidina/peroxidasa de rábano (Streptavidin/HRP, Millipore, relacion 1/150,000) y el marcaje de la proteína se reveló con reactivos quimioluminiscentes (Thermo Scientific).

### **6.7 Obtención de membranas de células CF-1**

Un cultivo de CF-1 al 80 % de confluencia se recuperó de la caja y luego las células se centrifugaron 5 min a 13,000 rpm (Eppendorf, Centrifuga 5415R). La pastilla celular se resuspendió en medio Grace's suplementado con 10  $\mu$ M de Leupeptina y 1 mM de PMSF en hielo. Posteriormente se sonicó 3 veces en pulsos de 30 s con intervalos entre pulsos de 1 min en hielo. Finalmente se centrifugó a 90,000 rpm (Beckman, Optima Max Ultracentrifuga, rotor TLA 100), 1 a 4 °C. La pastilla obtenida se resuspendió en la misma solución y se cuantificó la proteína con el método de Lowry.

## **6.8 Ensayos de unión de las toxinas Cry en membranas de CF-1 (“Ligand blot”)**

Para la detección de las proteínas de CF-1 a las que une la toxina, 10 µg de proteína de membrana fueron hervidos 5 min con mezcla lítica (Laemmli *et al.*, 1970). Esta muestra se analizó por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 10 % y se electrotransfirió a una membrana de PVDF. La membrana fue bloqueada 30 min con PBS-Tween al 2 % en agitación constante. Se hicieron 3 lavados de 15 min con PBS-Tween 0.1 % y se incubó con 1 nM de toxina biotinilada. Posteriormente se lavó de igual manera y se incubó 1 h con estreptavidina (relación 1/150,000) en agitación constante. Se hicieron los últimos 3 lavados de manera similar y un último lavado con PBS. Finalmente la unión de la toxina a las membranas se reveló por quimioluminiscencia (Thermo Scientific).

## **6.9 Búsqueda de receptores para las toxinas Cry en membranas de células CF-1**

En el laboratorio se cuenta con anticuerpos policlonales contra algunos receptores de toxinas Cry1A presentes en diferentes Lepidópteros. Entre ellos contamos con anticuerpos para Bt-R1, APN de *M. sexta* y *H. virescens*, también contamos con anticuerpo para ALP de *M. sexta*. Se emplearon estos anticuerpos para explorar si algunos de los receptores previamente descritos en otros insectos Lepidópteros pudiesen estar presentes en las membranas de las células de CF-1. Proteína de

membrana de estas células en cantidad de 10  $\mu$ g se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10 %. La muestra se electrotransfirió a una membrana de PVDF la cual posteriormente fue bloqueada 1 h con leche al 5 % en agitación constante. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.1 % y se incubó 1 h con el primer anticuerpo de conejo, ya sea anti Bt-R1, APN o ALP (relación 1/10,000). Nuevamente la membrana se lavó 3 veces y se incubó 1 h con el segundo anticuerpo de ratón anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP, del inglés “horseradish peroxidase”, Santa Cruz Biotechnology, EUA) a una relación 1/30,000. Finalmente se hicieron 3 lavados y un último lavado con PBS para luego revelar por quimioluminiscencia (Thermo Scientific).

## **7.0 Oligomerización de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac**

Luego de 1 h de incubar las células CF-1 con la toxina, la muestra se recuperó y se centrifugó 30 min a 90 000 rpm. 5 mg de la pastilla obtenida se hirvieron con mezcla lítica y se corrieron en un gel SDS-PAGE al 8 %. El gel se electrotransfirió a una membrana de PVDF (Millipore, Bedford, MA). La membrana se bloqueó 1 h con PBS-Tween 0.2 % y leche descremada al 5 %. Enseguida se incubó 1 h con un primer anticuerpo anti-cry1Ab o anti-Cry1Ac (1:30 000). Este es un anticuerpo policlonal que reconoce tanto al monómero y oligómero de la toxina (Gómez *et al.*, 2006). Después, la membrana se lavó 3 veces cada 5 min con PBS-Tween 0.2 % y se incubó 1 h con un segundo anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa en una dilución 1:30000 (Sigma, St Louis, MO, EUA). Finalmente la membrana se lavó de igual manera y se detectó la toxina con un sistema de luminiscencia (ECL; Amersham Pharmacia Biotech) como lo

describe el proveedor. Como marcador de peso molecular en los geles SDS-PAGE se usaron proteínas estándar (BioRad, Hércules CA).

## **7.1 Ensayos de toxicidad**

Diferentes procedimientos y ensayos se han utilizado para cuantificar y comparar la toxicidad de las proteínas Cry en varias líneas celulares de insectos, los cuales incluyen la medición de los cambios del contenido de ATP (Johnson, 1981), exclusión de colorante como el azul de tripano (Thomas y Ellar, 1983; Gringorten *et al.*, 1999) y medidas en los cambios de volumen por medio de la técnica de “light scattering” como medida de la lisis celular. En este trabajo los ensayos de toxicidad de las proteínas Cry se hicieron con el paquete CytoTox96 “Non-Radiactive Citotoxicity Assay” (Promega, Madison, WI, EUA). El ensayo mide cuantitativamente la cantidad de lactato deshidrogenasa (LDH) libre en el sobrenadante, la cual es una enzima citosólica estable que es liberada luego de que las células han muerto (Decker y Lohmann-Matthes, 1988). La LDH en el sobrenadante del cultivo es medido por una reacción enzimática que resulta en la conversión de una sal tetrazolium hacia un producto rojo formazán. La intensidad del color obtenido es proporcional al número de células muertas que liberaron LDH. El paquete contiene: solución de lisis (Tritón X-100 9 % v/v), sustrato, solución del sustrato y solución de paro (1 M Acido acético). El sustrato y la solución del sustrato se mantienen a -20 °C y antes de su uso se dejaron a temperatura ambiente para que se descongelaran. Luego se solubilizó el sustrato con

12 ml de solución del sustrato, a esta mezcla se le llamo solución E, la cual se protegió de la luz y su uso fue inmediato a su preparación.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: las células se sembraron en placas de 96 pozos (Costar 3596, Corning, Corning, NY, EUA) y para que las células se adhirieran a la base de la placa se incubó por 3 h a 27 °C. Luego las células fueron tratadas con 3, 10, 31, 100, 315, 3150 y 8350 nM de cada toxina Cry, el control negativo de los ensayos de toxicidad son las células tratadas con PBS (390 mOsm, pH 8.5) aforando con este al volumen final de las células tratadas con toxina. El control positivo que da la máxima señal de liberación de LDH son las células tratadas con 10µl de TX-100, la placa se incubó 4 h a 27 °C (Thermomixer confort, Eppendorf). Después la placa se centrifugó a 1300 rpm (Eppendorf, Centrifuga 5804R, rotor A-2 MTP) durante 4 min, recuperamos 50 µl del sobrenadante de cada pozo y lo transferimos a una nueva placa. Se agregó 50 µl de solución E y se dejó reaccionar por 30 min. Finalmente adicionamos 50 µl de la solución de paro. Dejamos incubar 1 h y posteriormente se hizo la lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de caja multi pozos. El blanco empleado para la lectura de la placa es la mezcla del medio Grace's suplementado y un volumen de PBS igual al empleado para la adición de la toxina. Cabe recordar que el método de medición de LDH es colorimétrico y sensible a la luz, por ello una vez agregados los reactivos la placa se mantuvo en obscuridad durante el experimento (Figura 6). Los datos obtenidos se procesaron de la siguiente manera: a los valores del control positivo y la condición con toxina se le restó el valor del control negativo y se calculó el porcentaje de liberación de LDH inducido por la toxina a cada concentración respecto al

100 % de liberación de LDH inducido por TX-100, lo que refleja directamente el porcentaje de células muertas. Finalmente para obtener las curvas dosis respuesta los valores obtenidos se ajustaron a una curva de Hill de tres parámetros (mediante la opción ajuste del programa Sigma Plot versión 8.0) cuya  $r^2$  fue  $>0.9$ . Cada punto de la curva representa 3 experimentos independientes con su respectivo cuadruplicado siendo  $n=12$ .

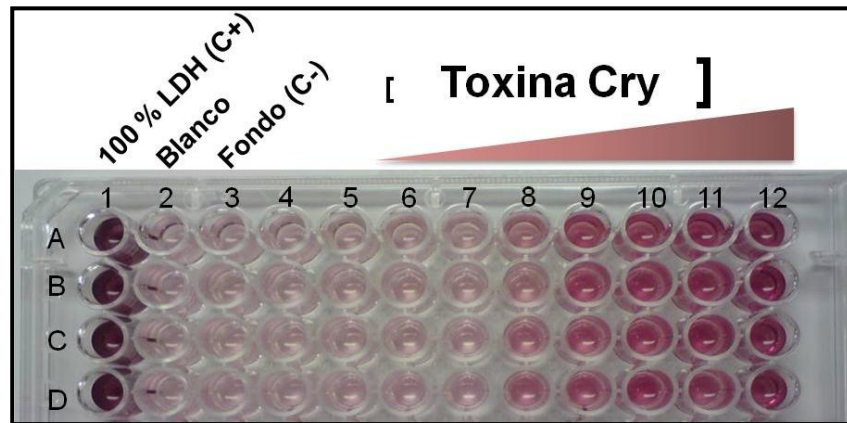


Figura 6. Sección de una placa de 96 pozos donde se realiza el ensayo de medición de LDH de células CF-1 tratadas con diferentes concentraciones de toxina. El volumen final contenido en cada pozo es de 150  $\mu$ l, que corresponden a la mezcla de 50  $\mu$ l del sobrenadante de células tratadas con toxina o no tratadas (PBS), 50  $\mu$ l de solución E y 50  $\mu$ l de solución de paro. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de LDH liberada. En los experimentos las concentraciones probadas se realizaron por cuadruplicados.

## VII RESULTADOS

### 7.1.- Purificación, solubilización y activación de las toxinas Cry

Los cristales de Cry1Ab y sus mutantes R99E, E129K, G439D y F371A; así como los cristales de Cry1AbMod, Cry1Ac y Cry1AcMod fueron purificados por gradientes de

sacarosa tal como se describe en materiales y métodos. Los cristales se solubilizaron y activaron con tripsina en amortiguador  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 8.5. De las toxinas tratadas con tripsina se cargaron 5  $\mu\text{g}$  en un gel SDS-PAGE al 10 % y se verificó su patrón de procesamiento (Figura 7). Como se puede observar, a excepción de las CryMod las proteínas se procesan a una toxina de  $\sim 60$  kDa. Cabe recordar que las toxinas CryMod no poseen la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I y son tóxicas a insectos resistentes (Soberón *et al.*, 2007; Tabashnik *et al.*, 2011), El procesamiento de Cry1AbMod resulta en una proteína adicional de  $\sim 50$  kDa. A pesar de la diferencia en el perfil de procesamiento de las toxinas CryMod, estas siguen siendo tóxicas en bioensayos con larvas de insectos blanco y como se mostrará más adelante también para la línea celular.

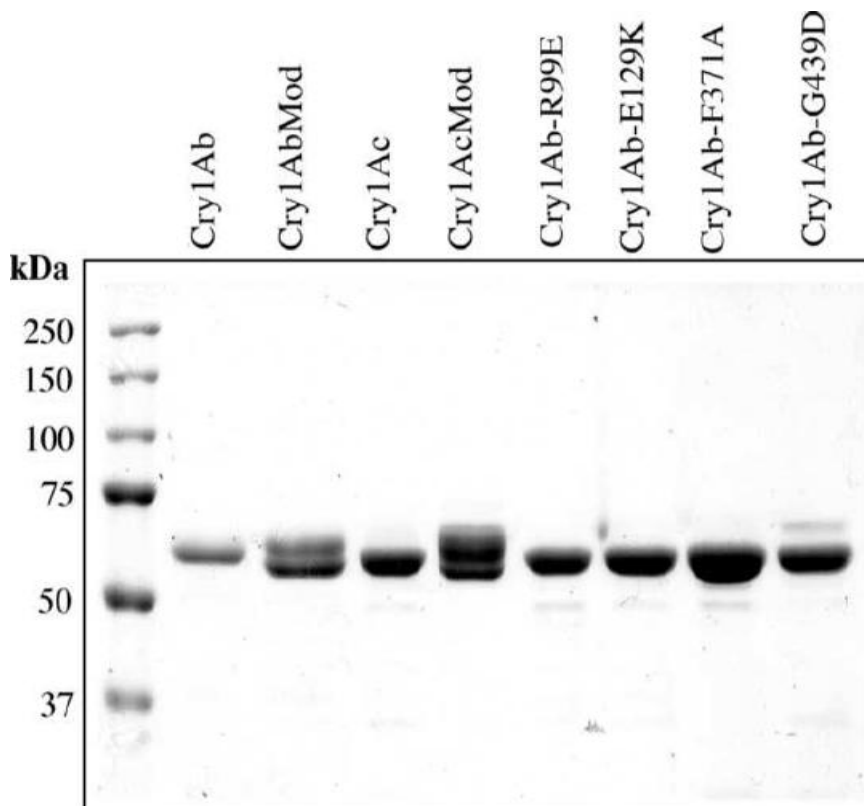


Figura 7. Gel SDS-PAGE al 10 % de las toxinas Cry1A y de las toxinas mutantes. Las toxinas fueron activadas por digestión con tripsina (1:50, pH 8.5). El gel fue tenido con azul de Coomassie. Cada carril corresponde a 5  $\mu\text{g}$  de toxina.

## **7.2 - Análisis de la toxicidad de las toxinas Cry1A en la línea celular CF-1 de *Choristoneura fumiferana***

### 9.2.1 Estandarización de la medición de LDH

La estandarización del método de medición de LDH incluyó determinar la densidad celular óptima para el ensayo, la cual es aquella con que se tiene como mínimo una diferencia de 2 a 3 veces entre los valores promedio de la absorbancia de las células tratadas y no tratadas con TX-100. La diferencia permitiría tener un amplio rango para que en los experimentos de toxicidad se pudiese observar un efecto claro de cada concentración de las toxinas.

La determinación de la densidad óptima se hizo de manera similar a los ensayos de toxicidad, en donde una caja con células CF-1 al 80 % de confluencia celular fue resuspendida y el conteo de las células se hizo directamente al microscopio en una cámara de Neubauer, (con azul de tripano al 0.004 %, para evidenciar vivas de muertas). En una placa de 96 pozos se sembraron 10, 20, 40, 60, 80 mil células por pozo. Cada densidad se sembró en 6 pozos de los cuales a 3 pozos de cada densidad celular se le agregó 10  $\mu$ l de TX-100 y se incubó 45 min. La placa se centrifugó a 1300 rpm durante 4 min y a 50  $\mu$ l del sobrenadante se le adicionaron 50  $\mu$ l de solución E y se dejó reaccionar por 30 min. Finalmente adicionamos 50  $\mu$ l de la solución de paro, se incubó a temperatura ambiente por 1 h y posteriormente se hizo la lectura de la absorbancia a 490 nm en un lector de caja multi pozos. La densidad celular óptima fue de  $6 \times 10^4$  células/0.1 ml.



La línea celular CF-1 se mantuvo en medio suplementado con SFB al 10 % y el SFB contiene trazas de LDH, lo cual da una señal de fondo considerable para el experimento; encontramos que el 2.5 % de SFB es suficiente para mantener viables a las células CF-1 durante el tiempo que dura el experimento y reducir sustancialmente el ruido de fondo. Como se ve en la figura 8 a tiempos cortos en ausencia de SFB observamos una liberación de LDH y conforme avanza el tiempo hay más muerte celular por falta del SFB. Por el contrario, en las células con SFB al 2.5 % se observó que hasta las 2 h hay liberación de LDH indicando que las células son más resistentes en SFB 2.5 %. Normalizando los valores de absorbancia con el obtenido con la solución de lisis, a las 4 h sin SFB hay una muerte celular de ~8 % comparado a ~3 % en presencia de SFB 2.5 %. Era importante optimizar la cantidad mínima de SFB para disminuir la señal de fondo de LDH presente en el suero, pero también que esta cantidad fuese suficiente para no estresar e inducir muerte en las células CF-1. Finalmente los experimentos de toxicidad se realizaron a 4 h con SFB al 2.5 %.

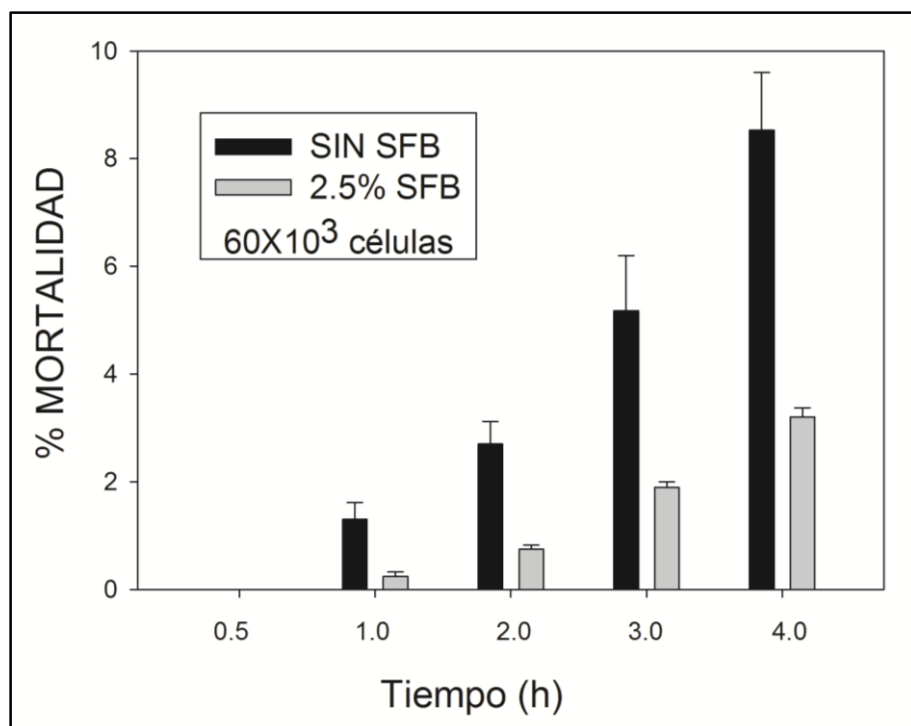


Figura 8. Efecto del SFB en las estimaciones de LDH. La gráfica muestra los porcentos de LDH liberada respecto al tiempo. Encontramos que 2.5 % de SFB permite que las células se mantengan viables y además con una reducida señal de fondo de la lectura de LDH en el medio. Nótese que la escala llega solo al 10 %

de muerte.

La solución de activación de las proteínas Cry (carbonatos pH 10.5) es tóxico para las células CF-1 (Figura 9) por ello, antes de hacer los ensayos de toxicidad, se hizo el recambio a una solución no dañina la cual fue PBS con osmolaridad de 390 correspondiente al medio Grace's y pH 8.5. El recambio se hizo mediante filtros AmiconUltra-Y50 (Millipore). Durante el recambio de solución las toxinas tienden a precipitarse. Para retirar la toxina precipitada se centrifugó a 90 000 rpm, 20 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína nuevamente por el método de Bradford.

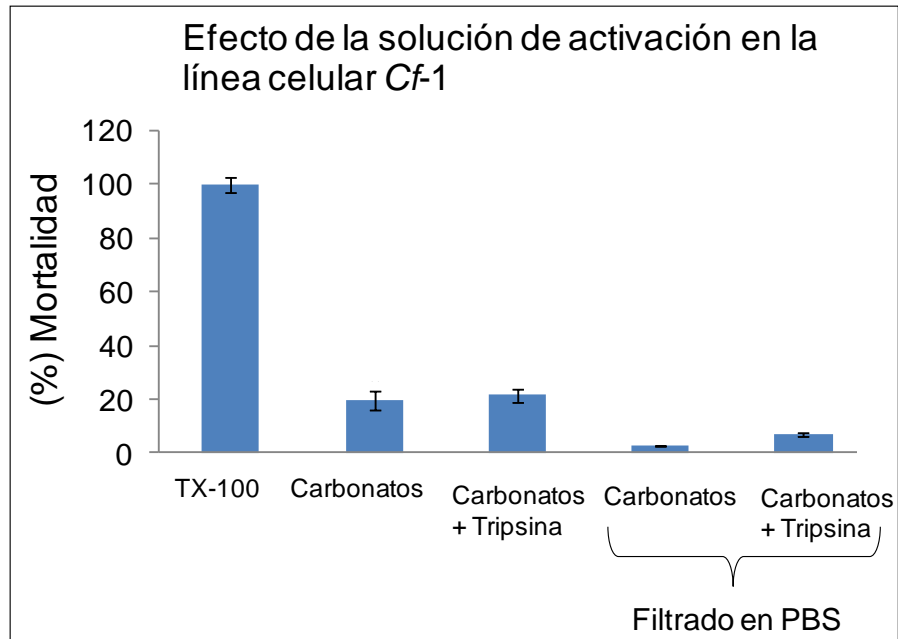


Figura 9. Efecto de la solución de activación de las toxinas en la viabilidad celular. La activación de las toxinas es con 100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y tripsina, pH 8.5; esta mezcla es tóxica para las células CF-1 por ello se hizo el recambio de la solución mediante la filtración de las muestras a PBS 390 mOsm, pH 8.5.

Los ensayos de toxicidad se hicieron con  $6 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{l}$  en placas de 96 pozos, de cada toxina se hicieron las respectivas diluciones para tener las concentraciones finales de 3, 10, 31, 100, 315, 1000, 3150, 8350 nM. Cada concentración de toxina se probó por triplicado. Independientemente de la concentración de las toxinas todas fueron adicionadas en volúmenes idénticos (20-30  $\mu\text{l}$ ).

### 7.3 Efecto de las toxinas Cry1A y de las mutantes sobre las células CF-1

En el laboratorio contamos con un grupo de toxinas mutantes de Cry1Ab las cuales han ayudado a dilucidar el mecanismo de acción de las toxinas Cry1 propuesto por nuestro grupo, en tal mecanismo la toxicidad se atribuye a la formación de un poro en la membrana. Dos de estas mutantes están en el dominio I, la primera tiene una mutación en la Arginina 99 localizada en la hélice  $\alpha$ -3, (Cry1Ab R99E). La mutante sigue manteniendo la afinidad a Bt-R1 pero no es tóxica *in vivo* ya que a está afectada en la oligomerización y por ende en la formación de poro (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007). Otra mutante es Cry1Ab E129K localizada en la hélice  $\alpha$ -4, la cual oligomeriza pero no se inserta a la membrana. A pesar de que esta toxina también es capaz de unir a los receptores, en los bioensayos con larvas de *M. sexta* no es tóxica. A su vez Cry1Ab F371A y Cry1Ab G439D son mutantes del asa 2 y 3 del dominio II respectivamente. Previamente se demostró que el oligómero de Cry1Ab F371A está afectado en la unión a APN y ALP, por lo tanto no se inserta y no es tóxica en bioensayos (Arenas *et al.*, 2010). Por otro lado la Cry1Ab-G439D se describió que no une Bt-R1 y no mata en bioensayos (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2009). En la figura 10 se enlista las toxinas empleadas en este trabajo y se muestra la regiones en donde se encuentra cada mutación.

A pesar de que el patrón de procesamiento de las mutantes de Cry1Ab es similar a la forma silvestre (Figura 6) el efecto sobre las células CF-1 difiere de su forma silvestre y Cry1AbMod.

$\delta$ -endotoxina	CL <sub>50</sub> ng/ cm <sup>3</sup>	Localización del residuo mutado
Cry1Ab	1.3 (0.9-1.7)	
R99E	> 2000	Hélice $\alpha$ -3 del dominio I
E129K	> 2000	Hélice $\alpha$ -4 del dominio I
F371A	> 1000	Asa 2 del dominio II
G439D	> 2000	Asa 3 del dominio II

Figura 10. Mutantes de la toxina Cry1Ab empleadas en los experimentos de toxicidad en la línea celular CF-1. La tabla muestra la ubicación de cada mutación y la concentración letal (CL<sub>50</sub>) de cada toxina en los bioensayos en *M. sexta*. Modificado de Rodríguez-Almazán *et al.*, 2009 y Arenas *et al.*, 2010.

En la figura 11 se pueden observar los cambios morfológicos de las células CF1 tratadas con las toxinas. Las células incubadas con 315 nM y 3.15  $\mu$ M de Cry1Ab muestran cambios citológicos. A bajas concentraciones las células pierden su forma, hay deformación de la membrana y a altas concentraciones se hinchan y lisan, un efecto similar al observado con el control positivo (TX-100). Efectos similares fueron observados con la Cry1Ac (Figura 12). Las células tratadas con ionomicina, un ionóforo específico para Ca<sup>2+</sup> provoca que las células pierdan su forma típica, se ponen redondas y se hinchan sin aparente daño de la membrana. La respuesta de la Cry1Ab Mod a bajas concentraciones fue similar al efecto de la Cry1Ab a altas concentraciones, mientras que la Cry1Ab R99E, una toxina que no oligomeriza no tiene efecto en la morfología de las células (Figura 11). La Cry1AcMod tuvo un efecto similar a la Cry1AbMod, mientras que las mutantes Cry1Ab E129K, F371A y G439D no tuvieron efecto en la morfología de las células ni provocaron la liberación de LDH de las células.

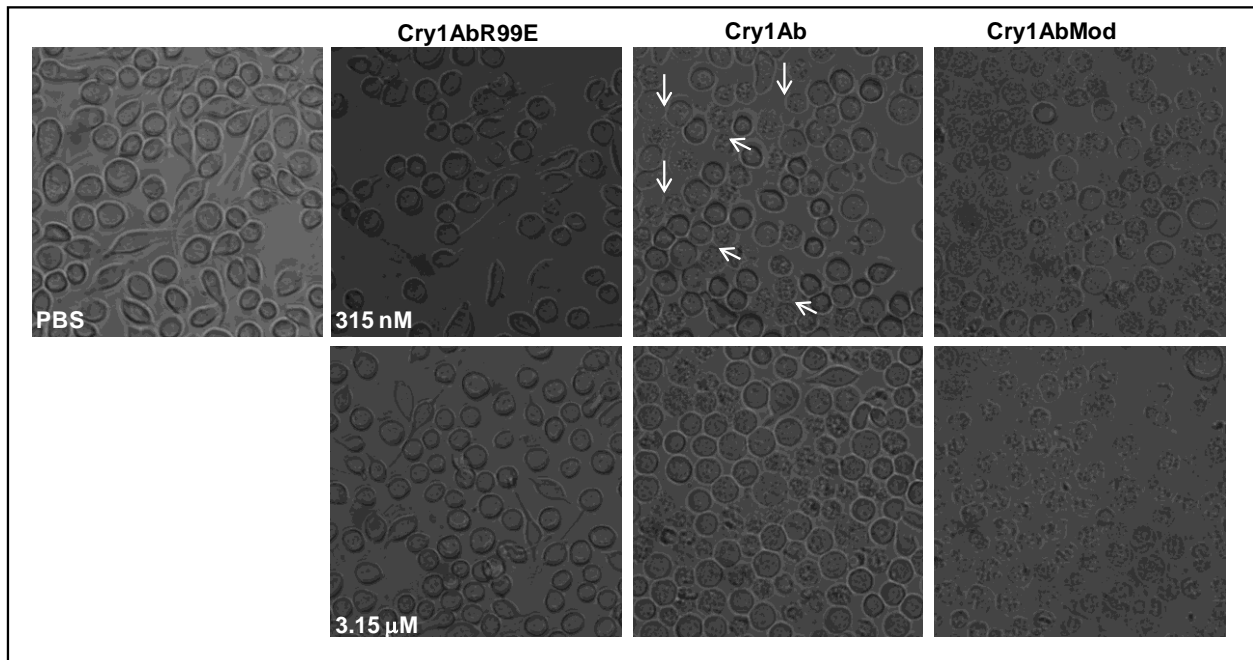


Figura 11. Cambio citológicos en células CF-1 inducidos por Cry1Ab y sus mutantes. Las células CF-1 fueron incubadas con diferentes concentraciones de las toxinas. En la imagen se muestra el efecto de 315 y 3.15  $\mu\text{M}$  de Cry1Ab, Cry1Ab R99E y Cry1AbMod. Obsérvese que a ambas concentraciones de Cry1Ab R99E no hay cambios morfológicos en las células, efecto similar al control negativo (PBS). A diferencia las toxinas Cry1Ab y Cry1AbMod provocaron el hinchamiento de las células y la ruptura de la membrana. Fotomicrografía mediante iluminación de contraste de fases.

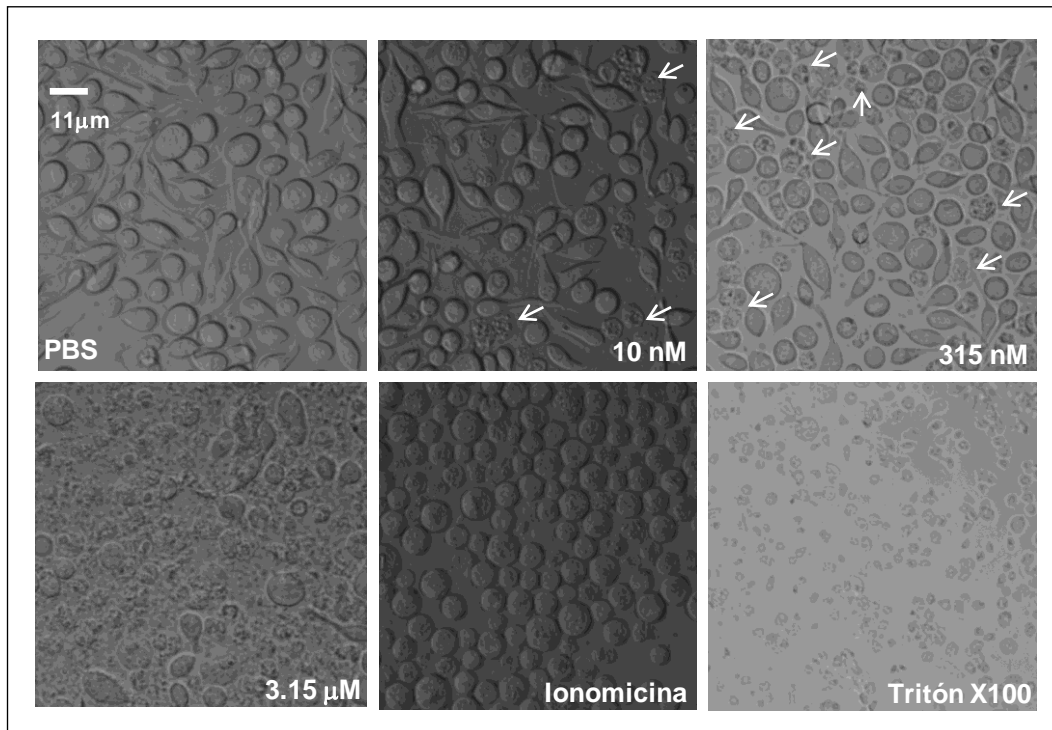


Figura 12. Efecto de la toxina Cry1Ac a diferentes concentraciones sobre la línea celular CF-1. Control negativo (PBS), 10 nM, 315 nM y 3.15  $\mu$ M de Cry1Ac, 2  $\mu$ M Ionomicina y control positivo (Tritón X100 0.8 %). Obsérvese que el daño de las células es dosis dependiente, las células pierden su forma típica, se vuelven esféricas, aumentan su tamaño y hay ruptura de la membrana (flecha). La ionomicina es un ionóforo para  $\text{Ca}^{2+}$  como se puede observar provoca que las células se tornen esféricas pero no emulsiona los lípidos como ocurre con TX-100 que disrumpe por completo la membrana celular.

#### 7.4 Curva dosis respuesta de las toxinas Cry1A sobre las células CF-1

Las curvas dosis respuesta de las diferentes toxinas Cry se obtuvieron con el ensayo de LDH. Los valores obtenidos de los ensayos con las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y ambas CryMod se ajustaron con la ecuación Hill de tres parámetros (programa SigmaPlot 8.0) (Figura 13) con la cual se estimó las dosis efectivas medias para cada

toxina ( $DE_{50}$ ). Los valores se muestran con su error estándar (ES) en la tabla 1. Ambas proteínas CryMod son tóxicas para las células CF-1 en una manera dosis dependiente. Como se esperaba, la Cry1Ac es 7 veces más tóxica que la Cry1Ab (Tabla 1). Por otro lado puede observarse que ambas toxinas CryMod son igualmente tóxicas para las células CF-1. Las toxinas mutantes Cry1Ab E129K, F371A y G439D inducen ~10 % de mortalidad solo a muy altas concentraciones ( $10 \mu\text{M}$ ), mientras que la Cry1Ab R99E no tuvo efecto alguno (Figura 13).

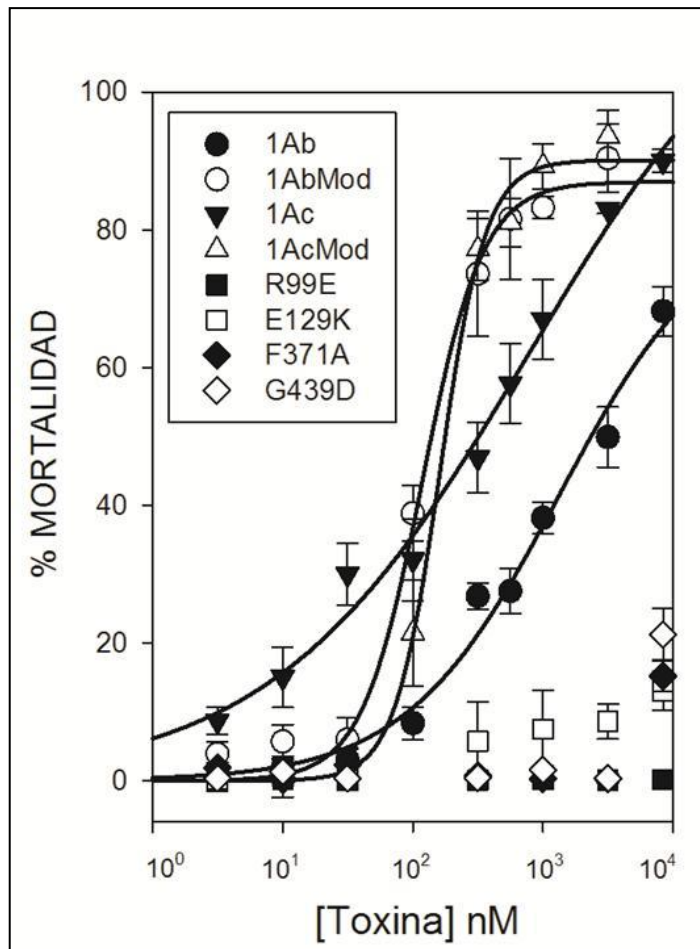


Figura 13. Efecto de la toxina Cry1Ab y sus mutantes R99E, E129K, F371A, G439D, Cry1AbMod y Cry1Ac hacia la línea celular CF-1. Obsérvese que las toxinas mutantes no son tóxicas en el rango de concentración en que la Cry1Ab y Cry1AbMod sí tuvieron efecto. A la máxima concentración ( $8.3 \mu\text{M}$ ) inducen ~10 % de mortalidad a excepción de la R99E que no oligomeriza no tuvo ningún efecto. Cada punto representa el promedio de tres experimentos en donde cada concentración se aplicó por cuadruplicado. Los puntos se ajustaron a una curva de Hill de tres parámetros donde en todos los casos  $r^2 > 0.98$ .



<b>Toxina</b>	<b>DE<sub>50</sub> nM</b>
	<b>Valor ± ES</b>
Cry1Ab	2, 245.0 ± 3.5
Cry1Ac	317.4 ± 3.6
Cry1AbMod	138.7 ± 2.8
Cry1AcMod	176.9 ± 5.0
Cry1Ab R99E	> 10 000
Cry1Ab E129K	> 10 000
Cry1Ab F371A	> 10 000
Cry1Ab G439D	> 10 000

Tabla 1. Dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) de las toxinas empleadas. La toxina Cry1Ac es ~7 veces más tóxica que Cry1Ab. La Cry1AbMod es ~16 veces más tóxica que su silvestre Cry1Ab. La Cry1AcMod es ~2 veces más tóxica que la silvestre. Las toxinas mutantes de Cry1Ab tanto del dominio I y II no tuvieron efecto tóxico sobre la línea celular CF-1. Las DE<sub>50</sub> se estimaron con la ecuación de Hill de tres parámetros (SigmaPlot 8.0). ES= error estándar

### **7.5 Efecto del catión divalente sobre la actividad de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac y las CryMod**

Como se mencionó, anteriormente, Zhang y colaboradores observaron que la toxicidad de Cry1Ab en la línea celular H5 es prevenida en presencia de EDTA, el cual quela tanto Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> pero no EGTA que preferencialmente atrapa Ca<sup>2+</sup> (Patton *et al.*, 2004) por lo tanto sugirieron que la toxicidad de Cry1Ab contra las células H5 es dependiente de Mg<sup>2+</sup>. Para determinar el efecto del catión divalente en la toxicidad de Cry1Ab y Cry1Ac en las células CF-1 a los ensayos de LDH se les incluyó 5 mM de

EDTA o EGTA con los respectivos controles. Se empleó la  $DE_{50}$  de cada toxina que induce el 50 % de respuesta en las células CF-1. Los datos fueron analizados por el método ANOVA. En la figura 14 se observa que tanto la toxicidad de Cry1Ab, Cry1Ac y las CryMod se ve atenuada por la presencia de ambos quelantes, lo cual sugiere que ambos cationes divalentes son requeridos para la toxicidad contra las células CF-1.

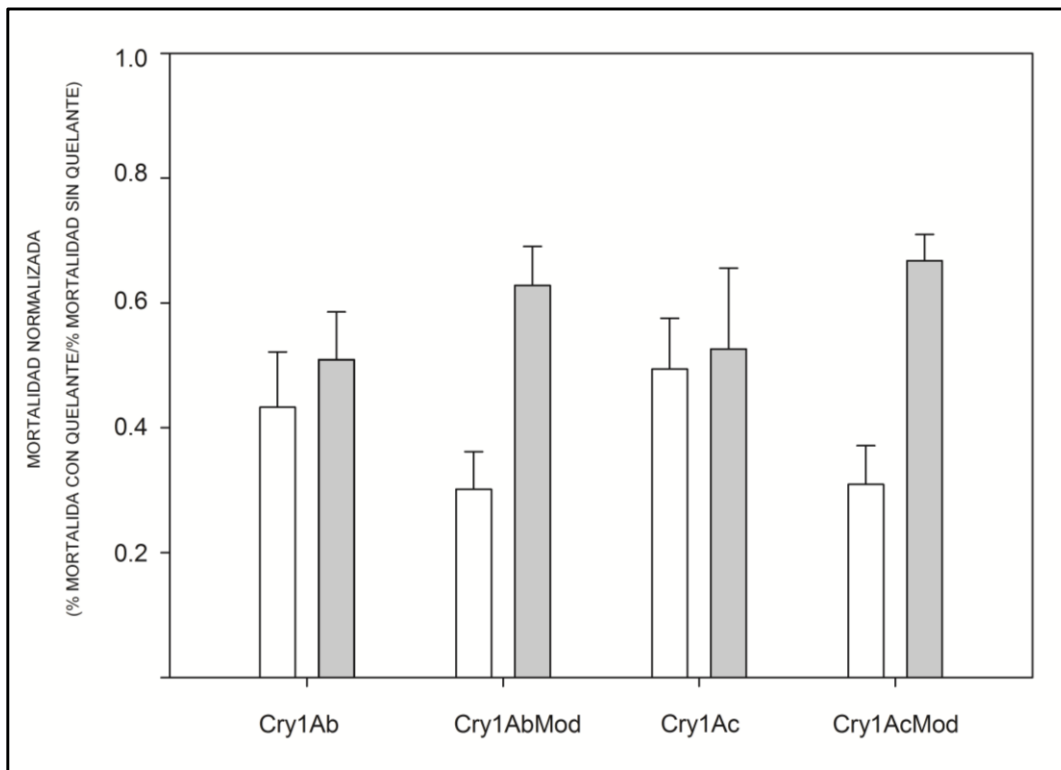


Figura 14. Participación del catión divalente ( $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) en la respuesta de las células CF-1 hacia Cry1Ab, Cry1AbMod, Cry1Ac y Cry1AcMod. Se empleó 5 mM de EGTA (barra blanca) y EDTA (barra gris). Las células fueron tratadas con la  $DE_{50}$  de cada toxina y la mortalidad de las células fue analizada por la liberación de LDH. La mortalidad de las células tratadas con toxina en presencia del quelante fue normalizada con el control que son las células tratadas con toxina en ausencia del quelante. Cada valor representa el promedio de 4 experimentos independientes. Las diferencias de los quelantes respecto al control fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ). La presencia de ambos quelantes disminuye la actividad de las toxinas lo cual sugiere que el catión divalente es importante para el efecto de la toxina.

## 7.6 Unión de toxina Cry1Ab y Cry1Ac en células CF-1 (“Ligand blot”)

Una vez que se determinó que la línea celular CF-1 es sensible a Cry1Ab, CryMod y no a las mutantes Cry1Ab R99E, E129K, F371A y G439D procedimos a la identificación de proteínas a las cuales unía la toxina. Para ello la toxina se marcó con biotina tal como se describe en Materiales y Métodos. Dicha marca no interfiere con la migración de la proteína en el gel SDS-PAGE y permite detectar cantidades mínimas de toxina (0.1 ng) (Figura 15). Después de verificar la marca de la toxina se realizaron los experimentos de “ligand blot”. Tanto Cry1Ab, Cry1Ac unen a proteínas de membrana de ~230, 130 y 80 kDa (Figura 16A (carril 1, 5)) al igual que las CryMod (datos no mostrados). Ensayos de competencia homóloga utilizando un exceso de 1000 veces de toxina no marcada bloquean a la Cry1Ab marcada en su unión a las proteínas de ~230 y 130 kDa, demostrando que la unión de la toxina a estas proteínas es específica. Por el contrario, la interacción con la proteína de ~80 kDa no se afectó, sugiriendo que la unión de esta proteína es inespecífica (Figura 16A, carril 2). En ausencia de toxina marcada, la estreptavidina reacciona con la proteína de ~80 kDa (Figura 16A, carril 3). La mutante Cry1Ab G439D está afectada en la unión a estas proteínas (Figura 16A, carril 4).

## 9.7 Búsqueda de receptores para las toxinas Cry en las células CF-1

Los ensayos de unión mostraron que la toxina estaba uniéndose a proteínas de talla distinta, en caso de que estas correspondieran a receptores previamente identificados para las toxinas Cry decidimos utilizar anticuerpos policlonales específicos para Bt-R1, ALP y APN de dos Lepidópteros, *M. sexta* y *H. virescens*. Cabe aclarar que estos experimentos no mostrarían la identidad de las proteínas detectadas por “ligand blot” pero en caso de ser positivos para la talla correspondiente de cada receptor nos daría más elementos para suponer que los receptores se encuentran conservados en la línea celular. Los anticuerpos específicos para Bt-R1 de *M. sexta* y *H. virescens* revelan dos bandas de ~130 y 230 kDa (Figura 16, carril 6-7). Con los anticuerpos para APN solo el de *M. sexta* detectó una banda de ~230 kDa (Figura 16, carril 8).

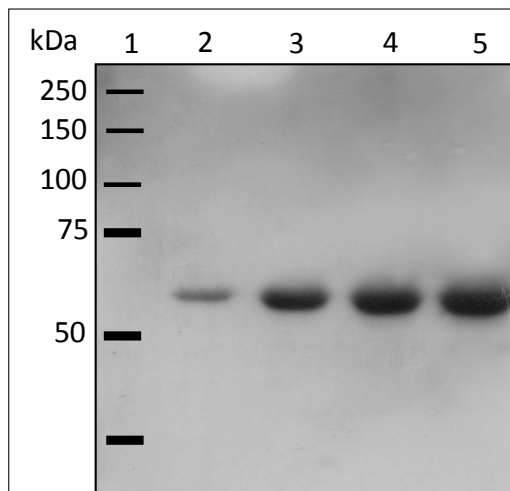


Figura 15. Marcaje de la toxina Cry1Ab con biotina. “Western blot”: marcador de peso molecular (carril 1), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.75 µg de Cry1Ab biotinilada (carril 2-5 respectivamente). La biotinilación no interfiere con el tamaño ni la toxicidad de las proteínas Cry (Denolf *et al.*, 1993)

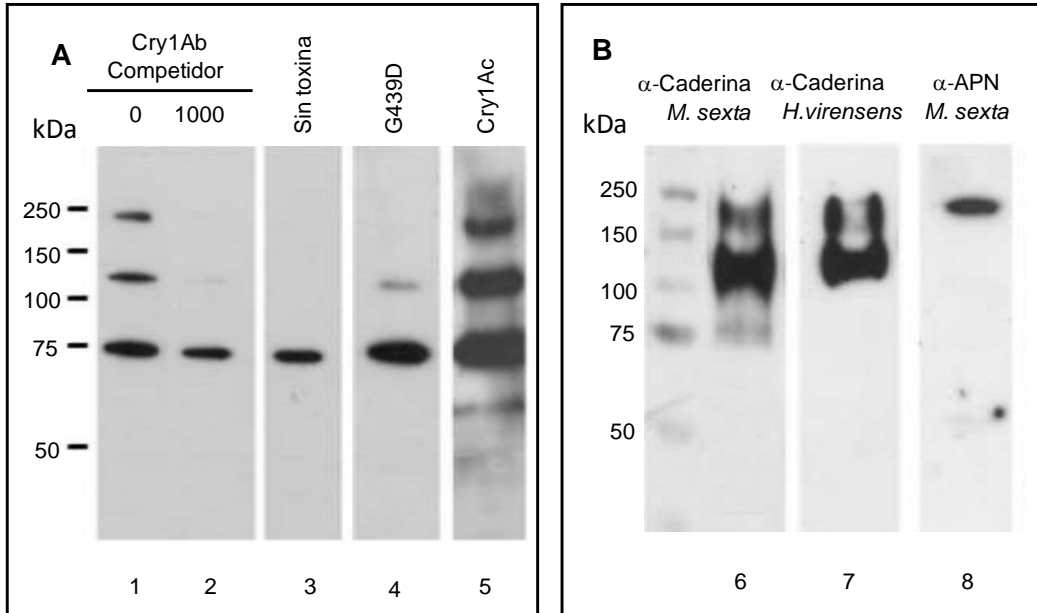


Figura 16. Unión de las toxinas Cry1A e identificación de los receptores de las toxinas Cry1A en membranas de células CF-1. Panel A. El “ligand blot” muestra a la toxina biotinilada unida a la membrana de las células CF-1. La unión de Cry1Ab biotinilada fue analizada en ausencia (carril 1) y presencia de un exceso Molar de 1000 veces de toxina no biotinilada (carril 2). El carril 4 y 5 muestra la unión de la Cry1Ab G439D y la Cry1Ac, respectivamente. El control negativo consiste en las membranas sin toxina (carril 3). Las unión de las toxinas biotiniladas fue visualizado con estreptavidina acoplada a HRP y sustrato quimioluminiscente (Thermo Scientific). Panel B. “Western blot” de caderina y APN detectado con anticuerpo policlonal anti-caderina de *M. sexta* (carril 6) y de *H. virescens* (carril 7) y anticuerpo policlonal anti-APN de *M. sexta* (carril 8). El segundo anticuerpo fue anti-conejo acoplado a HRP.

## 7.8 Oligomerización de Cry1Ab y Cry1Ac

La oligomerización de las toxinas Cry es un paso importante en el mecanismo de acción. Nosotros analizamos la capacidad de Cry1Ab y Cry1Ac de formar oligómeros

cuando interactúan con las membranas de CF-1. Después de 1 h de incubación con las células CF-1, ambas toxinas se integran a la membrana y forman estructuras oligoméricas (Figura 17)

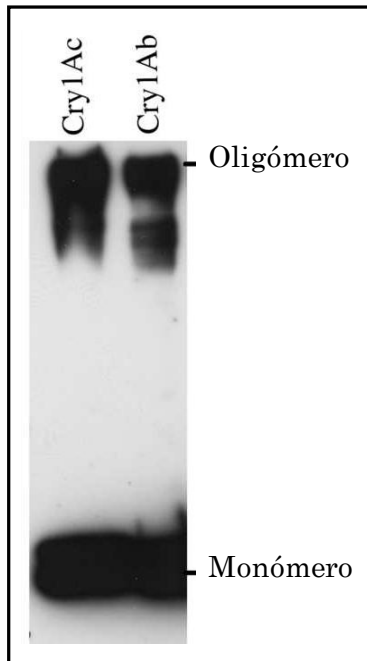


Figura 17. Oligomerización de Cry1Ab y Cry1Ac. La presencia del oligómero fue analizado por medio de “western blot” con anticuerpos policlonales específicos para Cry1Ab y Cry1Ac. 5  $\mu$ g de las células tratadas con la toxina se cargaron en un gel SDS-PAGE. Nótese que el anticuerpo reconoce tanto a la forma monomérica y oligomérica de la toxina.

## VIII. DISCUSION

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la línea celular CF-1 del Lepidóptero *Choristoneura fumiferana* sensible a toxinas Cry comparte en lo general el mecanismo de acción descrito hasta el momento en células del intestino de larvas del insecto blanco.

Con el antecedente de que la línea celular CF-1 es sensible a las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab (Johnson, 1994; Gringorten *et al.*, 1999) se decidió emplear estas células. El

presente trabajo confirma que la toxina Cry1Ab y Cry1Ac son tóxicas para las células CF-1 y que la Cry1Ac es más activa, tal como lo reportó Gringorten y colaboradores. En función de la metodología empleada, a diferencia de lo reportado, nosotros establecimos diferencias cuantitativas entre diferentes toxinas, determinando así que la Cry1Ac es 7 veces más tóxica con una  $DE_{50}$  de 317.4 nM respecto a la Cry1Ab con una  $DE_{50}$  de 2.2  $\mu$ M (Tabla 1). En las larvas de *C. fumiferana* se observa esta misma correlación de toxicidad entre estas dos toxinas. Esta consistencia sugiere que las células CF-1 mantienen los determinantes específicos que definen la diferencia de toxicidad entre estas toxinas, por lo cual, estas células podrían ser un sistema *in vitro* para una exhaustiva investigación del modo de acción de las toxinas Cry a nivel celular.

Las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac tienen una alta homología (98 %) en el dominio I y II, pero tienen importantes diferencias en el dominio III (44 % de identidad). El dominio III de Cry1Ac contiene un sitio de unión para el azúcar N-acetilgalactosamina que está ausente en el dominio III de Cry1Ab (Burton *et al.*, 1999). Lo anterior sugiere que uno de los factores que determina la diferencia de toxicidad entre las dos toxinas se encuentra en el dominio III de la Cry1Ac. Previamente se mostró que la Cry1Aa no tiene toxicidad contra células CF-1 (Gringorten *et al.*, 1999). Los dominios I y III de Cry1Aa son 99 % idénticos a los de Cry1Ab y a su vez el dominio II de Cry1Aa muestra mucho menos homología (71 %) con el dominio II de Cry1Ab y Cry1Ac. Es evidente que las regiones importantes localizadas en el dominio II de Cry1Ab y Cry1Ac también están involucradas en su toxicidad hacia las células CF-1. Por otro lado, Masson y colaboradores (1994) analizaron la toxicidad de proteínas híbridas de Cry1Aa-Cry1Ac hacia CF-1 y determinaron que la región que está entre los residuos 258-510 de

Cry1Ac corresponden al dominio II y un fragmento del dominio III (hojas  $\beta$ ,  $\beta$ 12- $\beta$ 16), siendo esta región determinante en la toxicidad de Cry1Ac contra esta línea celular. Estos resultados son consistentes con el presente trabajo en donde las mutantes del dominio II afectadas en la unión al receptor, Cry1Ab F371A (asa 2) y Cry1Ab G439D (asa 3) no fueron tóxicas a la línea celular CF-1, lo cual reafirma que la interacción de la toxina (oligómero u monómero) con el receptor es importante también para su acción en las células CF-1, sin embargo aún es necesario establecer si los receptores presentes en estas células son los mismos o de naturaleza similar a los caracterizados en *M. sexta*. Finalmente, lo anterior apoya la conclusión de que el dominio II es una región importante que está involucrada en la toxicidad contra la línea celular CF-1 de insecto.

También se emplearon dos mutantes del dominio I, la Cry1Ab R99E que es una mutante en la hélice  $\alpha$ -3 que está afectada en la oligomerización (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007) y la Cry1Ab E129K una mutante en la hélice  $\alpha$ -4 que oligomeriza pero no se inserta en la membrana (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2009). Estas toxinas no fueron tóxicas para la línea celular CF-1. De acuerdo a los análisis de “ligand blot” donde identificamos que la Cry1Ab y Cry1Ac unen de manera específica a proteínas de ~ 230 y 130 kDa y los experimentos de “western blot” con anticuerpos específicos para BtR1 y APN en donde identificamos proteínas de la misma talla, consideramos a éstas como determinantes de la toxicidad. Sin embargo, el hecho de que las mutantes del dominio I de Cry1Ab (que se ha reportado no están afectadas en unión a sus receptores) no hayan tenido efecto de muerte en las células CF-1, sugiere que la unión no



desencadena una respuesta intracelular suficiente para inducir una muerte celular, dato contrario a lo que reportó el grupo de Zhang y colaboradores, que proponen una muerte celular por interacción con BtR1. Nuestros datos demuestran la necesidad de la formación de un poro por las toxinas Cry para poder lograr el efecto lítico en la célula. Estos resultados sugieren que los pasos de unión y de cambio conformacional de la toxina que se ha propuesto durante la intoxicación en larvas, también son eventos que pueden estar ocurriendo durante la toxicidad de la línea celular CF-1.

Por otro lado, las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod (no poseen la hélice  $\alpha-1$ ) son más tóxicas para la línea celular CF-1 que las formas silvestres y entre ellas su toxicidad es similar (Tabla 1). También se ha reportado que las toxinas CryMod restablecen la sensibilidad de insectos que son resistentes a algunas toxinas Cry (Soberón *et al.*, 2007; Tabashnik *et al.*, 2011). Estas CryMod no necesitan la presencia de BtR1 para oligomerizar por lo tanto forman estructuras oligoméricas en ausencia de este receptor (Soberón *et al.*, 2007; Muñoz-Garay *et al.*, 2009). El hecho de que las CryMod sean más tóxicas para la línea celular CF-1 que sus respectivas silvestres sugiere que los pasos iniciales de unión involucrados en la oligomerización pueden limitar la actividad de las Cry silvestres contra la línea celular CF-1 y así marcar la diferencia entre Cry1Ab y Cry1Ac. A su vez determinamos que la Cry1AbMod es 16 veces más tóxica que la Cry1Ab, mientras la Cry1AcMod es solo dos veces más tóxica que su forma silvestre.

Previamente se reportó que la toxicidad de Cry1Ab en células de *T. ni* que expresan heterológamente BtR1 se ve inhibida por la presencia de EDTA y no EGTA (Zhang *et*

*al.*, 2006). Ambos quelantes unen  $\text{Ca}^{2+}$  pero EDTA también une a  $\text{Mg}^{2+}$ , el EGTA tiene baja afinidad por  $\text{Mg}^{2+}$  (Patton *et al.*, 2004). En el trabajo de Zhang y colaboradores ellos concluyen que la citotoxicidad de Cry1Ab es dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  pero no de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nuestros experimentos realizados de manera similar con las células CF-1 mostraron resultados diferentes. Observamos que la toxicidad de las Cry1A y Cry1AMod es inhibida tanto por la presencia de EDTA como de EGTA, lo cual sugiere que ambos cationes divalentes influyen en la acción de la toxina.

## IX CONCLUSION

- La línea celular CF-1 es sensible a las toxinas Cry1A y Cry1AMod y no a las mutantes de Cry1Ab, las cuales están afectadas en su toxicidad en larvas de *M. sexta*. Esto sugiere que el mecanismo de acción de las Cry, el cual involucra la formación de un poro en el intestino del insecto *in vivo*, está conservado en la línea celular CF-1.
- La toxicidad de las proteínas Cry1A y Cry1AMod contra células CF-1 es dependiente de la oligomerización y formación de poro. La interacción con receptores en membrana por sí misma no es suficiente para un efecto tóxico, ya que las mutantes Cry1Ab R99E y Cry1Ab E129K las cuales unen a receptores en *M. sexta*, pero no pueden oligomerizar o insertarse en membrana, respectivamente, no son tóxicas para las células CF-1.
- La  $\text{DE}_{50}$  de la Cry1Ac confirma que es 7 veces más tóxica que la Cry1Ab, ambas CryMod son más tóxicas que las silvestres. En el caso de Cry1AbMod, ésta es 16 veces más tóxica que Cry1Ab.

- La influencia del catión divalente en el mecanismo de acción es determinante tanto para las toxinas Cry1A como para las CryMod en la toxicidad contra las células CF-1.
- La Cry1Ab biotinilada une de manera específica a dos proteínas una de ~230 y 130 kDa en las células CF-1 y dicha unión es determinante en la toxicidad, dado que la Cry1Ab G439D que no es toxica para las células CF-1 no une a estas proteínas.
- Los ensayos de “western blot” muestran que la toxicidad de las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac contra las células CF-1 correlaciona con su capacidad de formación de una estructura oligomérica .

## **X      PERSPECTIVAS**

Por el hecho de que las toxinas silvestres y mutantes utilizadas reiteraron el fenotipo descrito en bioensayos con *M. sexta* proponemos a la línea celular como un modelo para el estudio del mecanismo de acción de las toxinas Cry a nivel celular. Este modelo biológico específicamente permitirá analizar los cambios celulares a nivel de segundos mensajeros durante la toxicidad, tanto con las toxinas silvestres como con las mutantes que no forman un poro. Estas últimas resultan claves para definir si la unión a los receptores puede activar alguna cascada de señalización intracelular, y que de acuerdo a nuestros resultados si existiera una cascada de señalización pudiera ser para la sobrevivencia celular ya que las mutantes no tuvieron efecto lítico. Otra forma de explorar la posible participación de una vía de señalización activada en presencia de la toxina, es el empleo de inhibidores específicos de señales para apoptosis, autofagia y p38 y de tal manera determinar si existe un incremento o decremento en la sensibilidad

a la toxina Cry1Ab. Esta estrategia permitirá identificar si la célula emplea estas rutas de señalización como se ha descrito para otras TPF en células de mamífero como parte de una respuesta que potencia o aminora el efecto de las TFP.

## XI LITERATURA CITADA

- Augustin, S., Courtin, C., Rejasse, A., Lorme, P., Genissel, A., & Bourguet, D. 2004. Genetics of resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* poplars in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol.* 97 (3): 1058-1064.
- Aimanova, K.G., Zhuang, M & Gill, S. S. 2006. Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. *J Invertebr Pathol.* 92 (3):178-187.
- Arencibia, A., Molina, P., de la Riva, G. A. & Selman-Housein, G. 1995. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L. plants) by intact cell electroporation. *Plant Cell Report.* 14 (5): 305-309.
- Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M. & Gómez, I. 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem,* 285 (17): 12497-503.
- Aronson, A. I., Beckman, W. & Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. *Microbiol. Rev.* 50 (1): 1-24.
- Badii, M. H., Flores, A. E., Foreughbakhch, R., Quiroz, H. & Torres, R. 1996. Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. En: Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Pp :40-47.
- Barton, K. A., Whiteley, H. R. & Yang, N. S. 1987. *Bacillus thuringiensis* delta endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiol.* 85 (4): 1103-1109.
- Betchel, D. B. & Bulla Jr. L. A. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 127 (3): 1472-1481.
- Bel, Y. & Escriche, B., 2006. Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. *Gene.* 381, 71-80.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J. & Li, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *Journal Molecular Biology.* 348 (2): 363–382.
- Boonserm, P., Angsuthanasombat, M., Mo, C. & Lescar, J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *Journal of Bacteriology.* 188 (9): 3391–3401.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–254.

- Bravo, A., Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. 1997. *J Bacteriol.* 179 (9): 2793-2801.
- Bravo, A., Sánchez, J., Kouskoura, T & Crickmore, N. 2002. N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. *J Biol Chem.* 277 (27): 23985-23987
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Zhuang, M., Gill, S. S. & Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica Biophysica Acta.* 1667 (1): 38-46.
- Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S. & Peferoen, M. 1992. Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J Invertebr Pathol.* 60 (3): 247-254.
- Bravo, A., Gill, S.S. & Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use. *Comprehensive Molecular Insect Science* Elsevier BV, pp. 175–206.
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S .S. & Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*, 41 (7): 423-431
- Broderick, N. A., Kenneth, F. R. & Handelsman, Jo. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS.* 103 (41): 15196-15199.
- Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J. & Derbyshire, D.J., 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognized by a site on the domain III lectin like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J Mol Biol.* 287 (5): 1011-1022.
- Caballero, P. & Ferré, J. 2001. *Bioinsecticidas: fundamentos & aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas.* 1 ed. Phytoma-España.
- Cancino-Rodezno, A., Porta, H., Soberón, M. & Bravo, A. 2010. Defense and death responses to pore forming toxins. *Biotechnol Gen Eng Rev.* 26: 65-82.
- Carlson, C. R., & Kolsto. 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J Bacteriol.* 175 (4): 1053-1060.
- Carroll, J., Wolfersberger, M. G & Ellar, D. J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-induced permeability change in *Manduca sexta* brush border membrane vesicle proceeds by more than one mechanism. *J Cell Sci.* 110 (24): 3099-3104.
- Chapman R. F. 1985. Structure of the Digestive System. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Eds Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), Vol. 4, pp. 165-211. Pergamon Press, Oxford.

- Chestukhina, G. G., Kostina, L. I., Mikhailova, A. L., Tyurin, S. A., Klepikova, F. S. & Stepanov, V. M. 1982. The main features of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin molecular structure. Arch Microbiol. 132 (2): 159-162.
- Chilcott, C. N., & Ellar, D. J. 1998. Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. J Gen Microbiol. 134 (9): 2551-2558.
- Choma, C. T., Surewicz, W. K., Carey, P. R., Pozsgay, M., Raynor, T. & Kaplan, H. 1990. Unusual proteolysis of the protoxin and toxin of *Bacillus thuringiensis* structural implications. Eur J Biochem. 189 (3): 523-527.
- Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A., & Ellar, D. J. 1995. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. FEMS Microbiol Lett. 131 (3):249-254.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E, Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, D. H. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 62 (3): 807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A. & Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature (2011). [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/)
- Davis, J. M. 1996. Basic Cell Culture: a Practical Approach. Oxford. 301p.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N. & Schnepf, H. E. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annu Rev Genet. 37: 409–433.
- de Maagd, R. A., Bravo, A. & Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics. 17 (4):193–199.
- Denolf, P., Jansens, S., Van Houdt, S., Peferoen, M., Degheele, D & Van Rie, J. 1993. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Appl. Environ. Microbiol. 59 (6):1821–1827.
- Devine, G. J., & Furlong, M. J. 2007. Insecticide use: contexts and ecological consequences. Agr Hum Values. 24 (3): 281–306.
- Decker, T. & Lohmann-Matthes, M.L. 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J Immunol Meth. 115 (1): 61–9.
- Eagle, H. 1955. Nutrition needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. Science. 122 (3168): 501-514.

- Earp, D.J., & Ellar, D. J. 1987. *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* strain PG14: nucleotide sequence of a gene encoding a 27kDa crystal protein. *Nucleic Acids Res.* 15 (8): 3619.
- Feitelson, J. S., Payne, J., & Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology* 10: 271–275.
- Fernández, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A. & Soberón, M. 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J.* 394 (1): 77–84.
- Fernández-Luna, M.T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S. S., Bravo, A., Soberón, M. & Miranda-Rios, J. 2010. An  $\alpha$ -amylase is a Novel Receptor for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae). *Environmental Microbiology.* 12 (3): 746–757
- Ferré, J. & Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol.* 47: 501–533.
- Forcada, C., Alcánces, E., Garcerá, M., Tato, A. & Martínez, R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. *Arch Insect Biochem Physiol.* 42 (1): 51-63.
- Gahan, L. J., Gould, F. & Heckel, D. G. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science.* 293 (5531): 857–860.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak, A., Ghosh, D., Luft, J. R., Pangborn, W. & English, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial  $\delta$ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. Sect. D* 57: 1101–1109.
- Gill, M & Ellar. 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol Biol.* 11(6) 619–625.
- Gill, S. S. Cowles, E. A. & Francis, V. 1995. Identification, isolation, and cloning of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.* 270 (45): 27277-27282.
- Gómez, I., Arenas, I., Benítez, I., Miranda-Rios, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J. C., Bravo, A. & Soberón, M. 2006. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J Biol Chem.* 281 (45): 34032–34039.
- Gómez, I. Pardo-López, L. Muñoz-Garay, C. Fernández, L. E. Pérez, C. Sánchez, J. Soberón, M. & Bravo, A. 2007. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28 (1): 169-173.
- Gómez, I., Dean, D. H., Bravo, A. & Soberón, M. 2003. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: two structural determinants in the *Manduca sexta*



- Bt-R1 receptor interact with loops  $\alpha$ -8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry* 42 (35):10482–10489.
- Gómez, I., Oltean, D. I., Gill, S. S., Bravo, A. & Soberón, M. 2001. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. *J Biol.* 276 (31): 28906-28912.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. & Soberón, M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513 (2-3): 242–246.
- González, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F. G. & Frêche, B. 2008. Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story?. *Cell Mol Life Sci.* 65 (3):493-507.
- González, J. M., Dulmage, H. T., & Carlton B. C. 1981. Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid.* 5 (3): 351-365.
- González, M. R., Bischofberger, M., Frêche, B., Ho, S., Parton, R.G. & van der Goot, F. G. 2011. Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol.* 13 (7):1026-43.
- Guo, S., Ye, S., Liu, Y., Wei, L., Xue, J., Wu, H., Song, F., Zhang, J., Wu, X., Huang, D. & Rao, Z., 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168 (2): 259-266.
- Griffitts, J. S., Haslam, S. M., Yang, T., Garczynski, S. F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P. S., Dell, A., Adang, M. J. & Aroian, R. V. 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* 307 (5711): 922–925.
- Gringorten, J. L., Sohi, S.S & Masson, L. 1999. Activity spectra of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins against eight insect cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35 (5): 299-303.
- Gringorten, J. L. 2001. Ion balance in the lepidopteran midgut and insecticidal action of *Bacillus thuringiensis*. In *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, ed. I Ishaaya, pp. 167–207. New York: Springer.
- Gringorten, J.L., Milne, R. E., Fast, P. G., Sohi, S. S. & Van Frankenhuyzen, K. 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* 60 (1): 47-52.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J. L., Brousseau, R. & Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA (a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254 (3): 447–464.

- Haider, M. Z. & Ellar, D. J. 1987. Characterization of the toxicity and cytopathic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. *Molecular Microbiology*. 1 (1): 59-66.
- Hakim, R.S., Caccia, S., Loeb, M. & Smagghe, G. 2009. Primary culture of insect midgut cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 45 (3-4):106–110
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W. J. & de Maagd, R. A. 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6: 96.
- Himeno, M. 1987. Mechanism of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxin action on insect cell in vitro. In: Maramorosch K (ed) *Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture*. Academic Press, San Diego, pp 29-43.
- Hink, W. F., Thomsen, D. R., Davidson, D. J., Meyer, A. L. & Castellano, F. J. 1991. Expression of Three Recombinant Proteins using Baculovirus Vectors in 23 Insect Cell Lines. *Biotechnol. Prog.* 7, 9-14.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J., Jansens, S. & Van Mellaert, H. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 85 (21): 7844–7848.
- Höfte, H., De Greve, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vadekerckhove, J., Vyerbruggen, H., Van Montagu, M., Zabeau, M. & Vaeck, M. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. *Eur. J. Biochem.* 161 (2): 273-280.
- Höfte, H. & Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 53 (2): 242–255.
- Hu, Y., Rajan, L. & Schilling, W. P. 1994.  $Ca^{2+}$  signaling in Sf9 insect cells and the functional expression of a rat brain M5 muscarinic receptor. *Am J Physiol.* 266, 1736–1743.
- Hua, G., Jurat-Fuentes, J-L & Adang, M. J. 2004. Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R1a cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (3): 193-202.
- Huffman, D. L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., van der Goot, F. G., & Aroian, R. V. 2004. Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 101 (30): 10995-11000.
- Janmaat, A. F., & Myers, J. 2003. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Philos. Trans. R. Soc. London B*. 270: 2263-2270.

- Janmaat, A. F., Wang, P., Kain, W., Zhao, J., & Myers, J. 2004. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in *Trichoplusia ni*. *Appl Environ Microbiol.* 70 (10): 5859-5867
- Jenkins, J. L & Dean, D. H. 2001. Binding specificity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa for purified, native *Bombyx mori* aminopeptidase N and cadherin-like receptors. *BMC Biochem.* 2: 12
- Jenkins, J.L., Lee, M.K., Valaitis, A.P., Curtiss, A. & Dean, D.H., 2000. Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. *J Biol Chem.* 275, 14423-14431.
- Jiménez-Juárez, N. Muñoz-Garay, C. Gómez, I. Saab-Rincón, G. Damian-Alamazo, J. Y. Gill, S. S. Soberón, M. & Bravo, A. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. *J Biol Chem.* 282 (29): 21222-21229.
- Johnson, D.E. 1981. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein toward cultured insect tissue. *J Invertebr Pathol.*, 38, 94-101.
- Johnson, D.E., 1994. Cellular toxicities and membrane binding characteristics of insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* toward cultured insect cells. *J Invertebr Pathol.* 63 (2): 123-129.
- Jurat-Fuentes, J. L. & Adang, M. J. 2006. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J Invertebr Pathol.* 92,166–171.
- Jurat-Fuentes, J. L., & M. J. Adang. 2004. Characterization of Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur J Biochem.* 271 (15): 3127-3135.
- Kain, W. C., Zhao, J. K., Janmaat, A. F., Myers, J., Shelton, A. M., & Wang, P. 2004. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in a greenhouse-derived strain of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol.* 97 (6): 2073-2078.
- Keeton, T. P. & Bulla, L. A. Jr. 1997. Ligand specificity and affinity of BT-R<sub>1</sub> the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *Appl Environ Microbiol.* 63 (9) : 3419-3425.
- Knowles, B. H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. In *Advances in Insect Physiology*, Volume 24 (ed. PD Evans) pp.275-308. Academic Press, London.
- Knowles, B. H., & Dow, J. A. 1993. The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action in the insect gut. *Bioessays* 15 (7): 469–475.

- Knowles, B. H., & Ellar, D. J. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim Biophys Acta* 924 (3): 507–518.
- Knowles, B. H. & Farndale, R. W. 1988. Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins and melittin. *Biochem. J.* 253 (1): 235–241.
- Koziel, G. M., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M. & Evola, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology*. 11, 194–200.
- Krishnamoorthy, M., Jurat-Fuentes, J.L., McNall, R.J., Andacht, T. & Adang, M.J., 2007. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37 (3):189-201.
- Kumar, N. S. & Venkateswerlu, G. 1998. Intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* susbs. kurstaki and their role in protoxina activation. *FEMS. Microbiology Letters.* 166, 377-382.
- Laemmli, U.K.1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680 – 685
- Li, J. D., J. Carroll. & Ellar, D. J. 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815–821.
- Li, J. D., Koni, P. A. & Ellar, D. J. 1996. Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol Biol.* 257 (1): 129-152.
- Loeb, M. J., Martin, P. A., Hakim, R. S., Goto, S. & Takeda, M. 2001. Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J Insect Physiol.* 47 (6) :599–606
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lynn, D. 1999. Development of insect Cell Lines: virus Susceptibility and applicability to Prawn Cell Culture. *Methods in Cell. Science.* 21 (4): 173.181.
- Lynn, D.E. 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 37 (6): 319-321.
- Lynn, D.E. 2002. Methods for maintaining insect cell cultures. *J. Insect Sci.* 2: 9
- Martens, J. W., Visser, B., Vlak, J. M. & Bosch, D. 1995. Mapping and characterization of the entomocidal domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) protoxin. *Mol Gen Genet.* 247, 482-487.

- Martínez-Ramírez, A., Gould, F & Ferré, J. 1999. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Biocont. Sci .Technol.* 9: 239-246.
- Masson, L., Mazza, A., Gringorten, L., Baines, D., Aneliunas, V. & Brousseau, R., 1994. Specificity domain localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins is highly dependent on the bioassay system. *Mol. Microbiol.* 14, 851-860.
- Meadows, M. P., Ellis, D. J., Jarret, P., & Burges, H. D. 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 :1344-1350.
- McNall, R.J. & Adang, M.J., 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 999-1010.
- Metz, T., Roush, R. T., Tang, J. D., Shelton, A. M. & Earle, E.D 1995. Transgenic broccoli expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein: Implications for plant resistance management strategies. *Mol Breeding* 1: 309–317.
- Miranda, R., Zamudio, F. Z. & Bravo, A 2001. Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 1155–1163.
- Monette, R., Potvin, L., Baines, D., Laprade, R. & Schwartz, J. L. 1997. Interaction between calcium ions and *Bacillus thuringiensis* toxin activity against Sf9 cells (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera). *Appl env Microbiol.* 63, 440–447
- Morales, A., Olano, V. A. & Ferro, C. 1997. Laboratorio de Entomología 1934-1997. *Biomédica.* 17 (1) 77-93.
- Morin, S., Biggs, R. W., Sisterson, M. S., Shriver, L., Ellers-Kisk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Brown, J. K & Tabasnik, B. E. 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 100: 5004-5009.
- Muñoz-Garay, C., Ramírez-Almazán, C., Aguilar, J. N., Portugal, L., Gómez, I., Saab-Rincón, G., Soberón, M. & Bravo, A. 2009. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl Env Microb.* 7548–7550.
- Murphy, D. W., Sohi, S. S. & Fast, P. G. 1976. *Bacillus thuringiensis* enzyme- digested delta-entotoxin: effect on cultured insect cells. *Science.* 194: 954-956.

- Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S. & Kogure, M. 1998. Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(a) toxin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62:727–734.
- Nagamatsu, Y., Koile, T., Sasaki, K., Yoshimoto, A. & Furukawa, Y. 1999. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. *FEBS Lett* 460: 385–390.
- Nauen R, & Bretschneider, T. 2002. New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook* 12: 241–245.
- Nishiitsutsuji-Uwo, J., Endo, Y. & Himeno, M. 1979. Mode of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: effect on TN-368 cells. *J Invertebr Pathol.* 34: 267-275.
- Oelofsen, M., Gericke, A., Smith, M. & Van der Linde, T. C. 1990. Establishment and characterization of a Cell Line from the Mosquito *Culex (culex) theileri* (Diptera: Culicidae) and its Susceptibility to Infection with Arboviruses. *J. of Medical Entomology.* 27 (6): 939-944.
- Pacheco S, Gómez I, Arenas I, Saab-Rincon G, Rodríguez-Almazán C, Gill SS, Bravo A, & Soberón, M. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J Biol Chem.* 284 (47): 32750-32757.
- Parrot, W. A., All, J. N., Adang, M. J., Bailey, H. R., Boerma, H. R., & Stewart, C. N. 1994. Recovery and evaluation of a soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis var kurstaki* insecticidal gene. *In vitro Cell Dev Biol* 30P: 144–149.
- Parker, M.W. & Pattus, F., 1993. Rendering a membrane protein soluble in water: a common packing motif in bacterial protein toxins. *Trends Biochem. Sci.* 18 (10), 391–395.
- Patton, C., Thompson, S. & Epel, D. 2004. Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* 35 (5): 427-431.
- Pérez, C., Fernández, L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., Soberón, M. & Bravo, A. 2005. *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (51): 18303–18308.
- Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T., Fischhoff, D. A. Insect resistant cotton plants. 1990. 8 (10):939-943. Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. J., Parker, G. B., McPherson, S. L., Wyman, J., Love, S., Reed, G., Biever, G., & Fischhoff, D. A. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by colorado potato beetles. *Plant Mol Biol* 22 (2): 313–321.

- Pigott, C. R & Ellar, D.J. Role of receptor in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. 2007. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 71 (2): 255-281.
- Potvin, L., Laprade, R. & Schwartz, J.L. 1998. Cry1Ac, a *Bacillus thuringiensis* toxin, triggers extracellular Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in Cf1 cells (*Choristoneura fumiferana*, Lepidoptera). J. Exp Biol. 201:1851–58.
- Rahman, M. M., Roberts, H. L. S., Sarjan, M., Asgari, S.,Schimdt, O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. Proc Natl Acad Sci USA. 101 (9): 2696-2699.
- Rahman, M. M., Roberts, H. L. S. & Schimdt, O. 2007. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-supressed larvae of the plour moth *Ephesia kuehniella*. J Inv Pathol. 96 (2):125-132.
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhortra, R. K. Bhatnagar. 2002. Silencing of midgut Aminopeptidase N of Spodoptera litura by double stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuriengiensis* toxin receptor. J Biol Chem. 277 (49): 46849-51.
- Rajamohan, F., Cotrill, J., Gould, F & Dean, D.1996. Role of domain II, loop residues of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin is reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens* J Biol Chem. 271: 2390-2396
- Rajamohan, F., Lee, M. K. & Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. Progr Nucl Acid Res. Mol. Biol. 60: 1-27
- Reddy, Y. C., Kumar, S., & Venkateswerlu, G. 2000. Identification and purification of 69 kDa intracelular protease involved in the proteolytic processing of the cristal  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. tenebionis. FEMS Micribiology Letters. 183: 63-66.
- Reina, M. 2003. Capítulo 1: introducción al cultivo celular. En: técnicas de estudios de líneas celulares.
- Ratner, A.J., Hippe, K.R., Aguilar, J.L., Bender, M.H., Nelson, A.L. and Weiser, J.N. 2006. Epithelial cellsare sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. J Biol Chem 281, 12994–12998.
- Rodríguez-Almazán, C., Zavala, L., Muñoz-Garay, C., Jiménez-Juárez, N., Pacheco, S., Masson, L., Soberón,. & Bravo, A. 2009. Dominant negative mutants of Bacillus thuringiensis Cry1Ab toxin demonstrate the role of toxin oligomerization in its insecticidal action and provide ways to counter toxin activity. PNAS, Agricultural Science.
- Sadrud-Din S, Loeb M, Hakim R. 1996. In vitro differentiation of isolated stem cells from the midgut of *Manduca sexta* larvae. J Exp Biol. 199:319–25.

- Smagghe, G., Vanhassel, W., Moeremans, C., Wilde, D.D., Goto, S. 2005. Stimulation of midgut stem cell proliferation and differentiation by insect hormones and peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040:472–75.
- Smedley, D.P., Ellar, D.J., 1996. Mutagenesis of three surfaced loops of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin reveals residues important for toxicity receptor recognition and possibly membrane insertion. *Microbiology* 142, 1617-1624.
- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English, & M. J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and <sup>86</sup>Rb-K efflux in vitro. *J Biol Chem.* 269:10088–10092.
- Schnepf, H. E., Crickmore, N., Van Rie, J., Dereclus, J., Baum, J., Feiteson, D. R., Zeigler, R., & Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 775-806.
- Schnepf, H. E. & Whiteley, H. R. 1985. Delineation of a Toxin-encoding Segment of a *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene. *The Journal of Biological Chemistry* (260) 10: 6273-6280.
- Schnepf, H. E. & Whiteley, H. R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (78) 5: 2893-2897.
- Shelton, A. M., Zhao., J. Z., & Roush, R. T. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu Rev Entomol.* 47: 845-881.
- Soberón, M., L. Pardo-López, I. Gómez, B. E. Tabashnik, & A. Bravo. 2007. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. *Science* 318: 1640-1642.
- Schwartz, J. L., Garneau, L., Masson, L., Brousseau, R. 1991. Early response of cultured lepidopteran cell to exposure to  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. *Biochim Biophys Acta.* 1065: 250-260.
- Schwartz, J. L., Juteau, M., Grochulski, P., Cygler, M., Prefontaine, G., Brousseau, R., & Masson, L. 1997. Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* through disulfide bond engineering. *FEBS Lett.* 410: 397-402.
- Schwartz, J. L., Garneau, L., Savaria, D., Masson, L., Brousseau, R. & Brousseau, E. 1993. Lepidopteran specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J Membr Biol.* 132: 53-62.
- Tabashnik, B. E. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J Econ Entomol.* 83: 1671-1676.



- Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann Rev Entomol.* 39: 47-79.
- Tabashnik, B. E., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Morin, S., Sisterson, M. S., Roush, R. T., Shelton, A. M. & Zhao, J. Z. 2003. Insect resistance to transgenic Bt crops: lesson from the laboratory and field. *J Econ Entomol.* 96:1031- 1038.
- Tabashnik, B.E., Biggs, R. W., Higginson, D.M., Henderson, S., Unnithan, D.C., Unnithan, G. C Ellers-Kirk, C., Sisterson, M.S., Dennehy, T.J., Carrière, J, & Morin, S. 2005. Association Between Resistance to Bt Cotton and Cadherin Genotype in Pink Bollworm. *J. Econ. Entomol.* 98 (3): 635-644.
- Tabashnik, B.E., Huang, F., Ghimire, M. N., Leonard, B. R., Siegfried, B. D., Rangasamy, M., Yang, Y., Wu, Y., Gahan, L. J., Heckel, D. G., Bravo, A, & Soberón, M. 2011. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance *Nat.Biotechnol.* En impresión
- Thomas, W.E & Ellar, D. J. 1983. *Bacillus thuringiensis var israelensis* crystal delta-endotoxin: Effect on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Sci.* 60, 181-197.
- Thomas, D. J., J. A. Morgan, J. M. Whipps, & J. R. Saunders. 2001. Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:330–338.
- Thomas, D. J., J. A. Morgan, J. M. Whipps, & J. R. Saunders. 2000. “Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis subspecies kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae”. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:118–124.
- Travers, R. S., Faust, R. M. & Reichelderfer, C. F. 1976. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*  $\delta$ -endotoxin on isolated lepidoteran mitochondria. *J Invertebr Pathol.* 28: 351-356.
- Vachon, V., Paradis, M. J., Marsolaris, M., Schwartz, J. L. & Laprade, R. 1995. Ionic permeabilities induced by insecticidal toxins ob *Bacillus thuringiensis* in Sf9 cells. *J Membr Biol.* 148: 57-63.
- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji, & L. A. Bulla Jr. 1993. *A specific binding protein from Manduca sexta for the insecticidal toxin of Bacillus thuringiensis subsp. berliner.* *J Biol Chem.* 268:12334–12340.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji, & L. A. Bulla Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem.* 270:5490–5494.
- Vago, C. 1972. *Invertebrate Tissue Culture.* Edit. Academic Press. Vol II. New York. pp 415.

- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hófte, D. Degheele, & H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. *Eur J Biochem.* 186:239–247.
- Vázquez, R. I, González, J., Prieto, D., de la Riva, G. A., & Selman-Housein G. 1996. Obtención de plantas transgénicas de col (*Brassica oleraceae* var Hercules 31) con resistencia putativa al ataque de *Plutella xylostella*. Abstract of III International Colloquium on Plant Biotechnology. Plant Biotechnology Institute, Las Villas Central University, June 23–26, p 87, Santa Clara, Cuba.
- Vázquez, R. I, Prieto, D., González, J., & de la Riva G. A. 1995. Development of combinatorial genetic constructions containing truncated versions of cryIA(b) and cryIB genes from *Bacillus thuringiensis* for further production of autopesticide cabbage plants. *Adv Mod Biotech toxins.* 3: II.73.
- Villalon, M., Vachon, V., Brousseau, R., Schwartz, J. L. & Laprade, R. 1998. Video imagin analysis of the plasma membrane permeabilizing effects of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins in Sf9 cells. *Biochem Biophys Acta.* 1368: 27-34.
- Waalwijk, C., A. M. Dullemans, M. E. S. van Workum, & B. Visser. 1985. *Nucleic Acid Res.* 13: 8207-8217.
- Woodgett, J. R. & Takahashi, M. 2006. Protein Kinases: Physiological Roles in Cell Signalling. eLS
- Wünn J., Klöti, A., Burkhardt, G., Biswas, G.C.G., Launis, K., Iglesias, K., & Potrykus, I. 1996. "Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control". *Biotechnology* 14: 171–176.
- Xu, X., Yu, L., & Wu, Y. 2005. Disruption of a Cadherin Gene Associated with Resistance to Cry1Ac  $\delta$ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Env Microbiol.* 71 (2): 948–954.
- Yamamoto T., & Powell, G, K. 1993. "*Bacillus thuringiensis* crystal proteins: recent advances in understanding its insecticidal activity". *Advanced Engineered Pesticides* (Leo Kim, ed), Marcel Dekker, NY, USA.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N.B., Taussig, R., Bulla Jr., L.A. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 9897-9902.
- Zhuang, M., Oltean, D. I., Gómez, I., Pullikuth, A., Soberón, M., Bravo, A & Gill, S. S. 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277: 13863-13872.