

**UNIVERSIDAD NACIONAL
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS**



**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA
TESIS**

“Estudio del corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta* (Gusano cornudo)”

PRESENTADO POR:

Jean Piere Jesús Quiliche Duran

Para optar el Título de Biólogo con mención en Biotecnología

Asesor:

Blgo. Luis Alberto Huayna Dueñas.

Asesor externo:

Dr. Sabino Pacheco Guillén.

HUACHO – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS



ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA
TESIS

“Estudio del corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta* (Gusano cornudo)”

EVALUADO ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

Dr. William Guzmán Sánchez
PRESIDENTE

Dr. José Luis Romero Bozzetta
SECRETARIO

Mo. Carlos Francisco Goñy Ameri
VOCAL

Blgo. Luis Alberto Huayna Dueñas
ASESOR

HUACHO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a las bacterias porque gracias a ellas he podido tener un objeto de estudio y encontrar la vocación de mi vida.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de tesis me gustaría agradecer a mi madre María Alejandrina Duran Depaz, a mi abuela Alejandría Depaz Lugo y mi abuelo Juan Duran Graciano, por ser mi inspiración de superación en cada momento, siendo las personas que me inculcaron educación y valores con mucho esfuerzo, este trabajo es para ustedes.

A mi asesor interno de tesis el Biólogo Luis Alberto Huayna Dueñas por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formarnos como personas y profesionales, por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, su experiencia y su paciencia formo gran parte de lo que soy ahora, lo considero mi segundo padre, muchas gracias.

A mi asesor externo de tesis el Dr. Sabino Pacheco Guillen por ser una persona muy capacitada, por sus consejos el transcurso de mi tesis, criticar mis errores y hacerme entender que las cosas se logran con esfuerzo y criterio.

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Alejandra Bravo de la Parra y el Dr. Mario Soberón por sus consejos y apreciaciones en la revisión de la tesis.

Agradezco a mis compañeros del Instituto de Biotecnología de México: Samira, Francisco, Jared, Ana, Maricarmen, Nathaly, Jorge, Emmanuel, Adrián, Alberto, Alan, Cinthia, Mayra y a mi gran amigo Yang Yanchao, gracias por hacer mi estancia muy amena.

A mis amigos de vivienda Judith, Marcos, Víctor, Ruth, Susy y Oswaldo, gracias por esas charlas y reuniones tan divertidas.

Agradezco con mucha estima a mi grupo de investigación: Pedro, Juan, Luis, Sofía, Marco y Joseph del Laboratorio de Microbiología Agrícola, al docente el Dr. Luis Romero Bozzetta por sus consejos y apoyo moral en toda mi formación académica y a la Ing. Thalia Lloclla Tineo por ser una gran motivación en mi vida y brindarme mucho amor.

Por ultimo agradecer a mí alma mater la “Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión”, por haberme brindado formación académica en estos 5 años.

INDICE

PORTADA	I
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCION	12
Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	13
1.2 Formulación del problema	14
1.2.1 Problema General	14
1.2.2 Problemas Específicos.....	15
1.3 Objetivos de la investigación	15
1.3.1 Objetivo General	15
1.3.2 Objetivos Específicos	15
1.4 Justificación de la investigación	16
1.5 Delimitación del estudio	16
1.6 Viabilidad del estudio	16
Capítulo II: MARCO TEORICO	17
2.1 Antecedentes de la investigación	17
2.1.1 Antecedentes Internacionales	17
2.1.2 Antecedentes Nacionales.....	21
2.2 Bases Teóricas	22
2.2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
2.2.1.1 Historia.....	22
2.2.1.2 Ciclo de vida.....	23

2.2.1.3 Características de las δ -endotoxinas.....	24
2.2.2 Toxinas 3d-Cry	25
2.2.2.1 Definición.....	25
2.2.2.2 Modo de acción	27
2.2.3 <i>Manduca sexta</i>	29
2.2.3.1 Descripción del ciclo de vida	29
2.2.3.2 Distribución geográfica y daños que produce	31
2.3 Definiciones conceptuales	31
2.4 Formulación de la Hipótesis	32
2.4.1 Hipótesis General	32
2.4.2 Hipótesis Específicas.....	32
Capítulo III: METODOLOGÍA.....	34
3.1 Diseño metodológico	34
3.1.1 Tipo de investigación.....	34
3.1.2 Nivel de investigación	34
3.1.3 Diseño de investigación	34
3.1.4 Enfoque de investigación.....	34
3.2 Población y Muestra	34
3.3 Operacionalización de variables e indicadores	35
3.4 Técnicas e instrumento de recolección de datos	36
3.4.1 Técnicas a emplear	36
3.4.1.1 Diseños y síntesis de oligonucleótidos.....	36
3.4.1.2 Producción de mutantes sencillas.....	36
3.4.1.3 Producción de mutantes dobles	37
3.4.1.4 Obtención de toxinas Cry1Ab	38
3.4.1.5 Preparación y cuantificación proteínas de BBVM de <i>Manduca sexta</i>	39
3.4.1.6 Expresión y purificación del fragmento de caderina CR7-CR12.....	40

3.4.1.7 Bioensayos con <i>Manduca sexta</i>	40
3.4.1.8 Análisis de la oligomerización	40
3.4.1.9 Ensayos de Western Blot.....	41
3.4.1.10 Marcaje de la toxina Cry1Ab S39C con fluoróforos extrínsecos.....	41
3.4.1.11 Ensayos de transferencia de energía resonante entre fluoróforos (FRET)	42
3.4.2 Descripción de los instrumentos	44
3.5 Técnicas para el procesamiento de la información	46
Capítulo IV: RESULTADOS.....	47
4.1 Diseño y síntesis de oligonucleótidos	47
4.2 Generación de mutantes simples y dobles de la toxina Cry1Ab.....	48
4.3 Obtención de toxinas Cry1Ab.....	49
4.4 Preparación y cuantificación proteínas de BBMV de <i>Manduca sexta</i>	52
4.5 Expresión y purificación del fragmento de caderina CR7-CR12	52
4.6 Bioensayos con <i>Manduca sexta</i>	53
4.7 Análisis de oligomerización	53
4.8 Marcaje de la toxina Cry1Ab S39C con fluoróforos extrínsecos	55
4.9 Ensayos de transferencia de energía resonante entre fluoroforos (FRET)	56
Capítulo V: DISCUSION, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
5.1 Discusión	58
5.2 Conclusiones.....	59
5.3 Recomendaciones	60
Capítulo VI: FUENTES DE INFORMACIÓN	61
5.1 Fuentes Bibliográficas	61
5.2 Fuentes Electrónicas	66
ANEXOS	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables, definición, dimensiones e indicadores.....	35
Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos que se diseño en el programa SnapGene Viewer.....	47
Tabla 3. Cuantificación de la toxina Cry1Ab y mutantes.....	52
Tabla 4. Valores de CL ₅₀ en bioensayos con larvas de <i>Manduca sexta</i>	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la esporulación en <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de <i>B. thuringiensis</i>	24
Figura 3. Filograma de las proteínas Cry y Cyt	25
Figura 4. Estructura cristalografica de la toxina Cry1Aa.....	26
Figura 5. Modo de acción de la toxina Cry1A	29
Figura 6. Huevo de <i>Manduca sexta</i>	29
Figura 7. Larva de <i>M. sexta</i>	30
Figura 8. Pupa de <i>M. sexta</i>	30
Figura 9. Adulto de <i>M. sexta</i>	31
Figura 10: Flujograma del proyecto de tesis	43
Figura 11. Unión por enlace disulfuro de las hélices de las mutantes dobles	48
Figura 12. Cromatograma de secuencias de las mutantes de Cry1Ab	49
Figura 13. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de diferentes mutantes Cry1Ab	50
Figura 14. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de diferentes mutantes Cry1Ab y toxinas activadas	51
Figura 15. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de la mutante Cry1Ab D74C-R93C..	51
Figura 16. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de fragmento de caderina de CR7-CR12.	53

Figura 17. Análisis de oligomerización con Cry1Ab, Cry1Ab S39C-T239C y Cry1Ab D74C-R93C	54
Figura 18. Marcaje de la toxina Cry1Ab S39C sin y con fluoróforos extrínsecos visualizado en SDS-PAGE	55
Figura 19. A. Espectro de emisión de los triptófanos de la toxina Cry1Ab y Cry1Ab S39C marcada con fluoróforos extrínsecos. B. Análisis de oligomerización de Cry1Ab S39C con BBMV.....	56
Figura 20. Gráficos de fluorescencia con Ex 488 nm y Emi 500-620 nm de Cry1Ab S39C marcadas con fluoróforos extrínsecos. A. con BBMV. B. con el fragmento de caderina CR7-CR12.....	57
Figura 21. Colonias en Agar Luria Bertani. A. <i>Escherichia coli</i> DH5 α . B. <i>Escherichia coli</i> SC110. C. <i>Bacillus thuringiensis</i> 407.....	69
Figura 22. A. Mutagenésis sitio dirigida por PCR en el termociclador. B. Electroporación para introducir plásmidos mutagénicos. C. Corrida de SDS-PAGE	69
Figura 23. A. Cuantificación de toxinas por espectrofotometría. B. Purificación de toxinas en columna de intercambio aniónico.....	69
Figura 24. A. Preparación de BBMV de <i>Manduca sexta</i> . B. Sonicación de <i>Escherichia coli</i> ER2566 que expresa fragmento de caderina CR7-CR12. C. Diálisis de la toxina Cry1Ab S39C para eliminación de urea y fluoróforo no acoplado a toxina.	70
Figura 25. A. Preparación del “sandwich” para Western Blot. B. Buffer de transferencia en camara de transferencia. C. Revelador quimioluminiscente Western Blotting Luminol Reagente (ImmunoCruz).	70
Figura 26. Bioensayos con <i>Manduca sexta</i> . A. Placas de 24 pocillos con dieta y larvas del primer estadio. B. Larva muerta. C. Larva viva.	70

RESUMEN

Estudio del corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta* (Gusano cornudo)

Jean Piere Jesús Quiliche Duran¹, Luis Alberto Huayna Dueñas¹, Sabino Pacheco Guillén², Alejandra Bravo de la Parra²

Objetivo: Determinar de qué manera el corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*. **Materiales y métodos:** En el diseño experimental se generó mutantes dobles con cisteínas para establecer puentes disulfuro entre la hélice α -1 y α -7 (Cry1Ab S39C-T239C) para estudiar el corte proteolítico en la oligomerización; y la mutante Cry1Ab D74C-R93C, la cual establece un puente disulfuro entre la hélice α -2b y α -3, con el propósito de estudiar el cambio conformacional en la oligomerización, dicho análisis se realizó en condiciones in-vitro en presencia de BBMV y fragmentos de caderina CR7-CR12, se visualizó por Western blot. Por otra parte, también se generó la mutante Cry1Ab S39C para analizar el desprendimiento de la hélice α -1 por medio de FRET en el monómero y oligómero, el análisis de oligomerización se realizó como se mencionó anteriormente, por último, se realizó bioensayos con larvas de *Manduca sexta* con las mutantes que se generaron y se determinó la concentración letal media (CL₅₀) con el programa LdP Line. **Resultados:** Las mutantes Cry1Ab S39C-T239C y Cry1Ab D74C-R93C en el análisis de oligomerización se observó complejos proteicos de 180-200 kDa que corresponden al oligómero de la toxina Cry1Ab en presencia de BBMV o con el fragmento de caderina CR7-CR12. Con respecto a los ensayos de FRET con la mutante Cry1Ab S39C la presencia de BBMV o CR7-12 mostraron un FRET (+) comparable a la toxina monomérica. En los bioensayos con larvas de *M. sexta* la CL₅₀ (ng/cm²) de la toxina Cry1Ab es 1.81, Cry1Ab S39C es 0.93 Cry1Ab S39C-T239C es 0.86 y Cry1Ab D74C-R93C es 17.52. **Conclusiones:** El análisis de oligomerización de la mutante Cry1Ab S39C-T239C, junto con los estudios de FRET con la mutante Cry1Ab S39C muestran que una vez que se lleve a cabo el corte proteolítico entre la hélice α -2a y α -2b, no es necesario la separación de la hélice α -1 y α -2a para formar el oligómero de la toxina Cry1Ab. La mutante Cry1Ab D74C-R93C mostró que probablemente el cambio conformacional de la hélice α -2b, no es necesario para formar el oligómero. Las mutantes Cry1Ab S39C y Cry1Ab S39C-T239C presentan ser más tóxicas que la Cry1Ab.

Palabras claves: oligomerización, *Bacillus thuringiensis*, mutantes, toxina Cry1Ab.

¹ Facultad de Ciencias. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho. Perú

² Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca. México.

ABSTRACT

Study of proteolytic cleavage and conformational change of helix α -1 and α -2 of domain I of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* in the in-vitro oligomerization in *Manduca sexta* (Horned worm)

Jean Piere Jesús Quiliche Duran¹, Luis Alberto Huayna Dueñas¹, Sabino Pacheco Guillén², Alejandra Bravo de la Parra²

Objective: To determine how the proteolytic cleavage and conformational change of helix α -1 and α -2 of domain I of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* will influence the in-vitro oligomerization in *Manduca sexta*. **Materials and methods:** In the experimental design, double mutants with cysteines were generated to establish disulfide bridges between helix α -1 and α -7 (Cry1Ab S39C-T239C) to study proteolytic cleavage in oligomerization; and the mutant Cry1Ab D74C-R93C, which establishes a disulfide bridge between the α -2b and α -3 helix, with the purpose of studying the conformational change in the oligomerization, said analysis was performed under in-vitro conditions in the presence of BBMV and fragments of cadherin CR7-CR12, visualized by Western blot. On the other hand, the mutant Cry1Ab S39C was also generated to analyze the detachment of the α -1 helix by means of FRET in the monomer and oligomer, the oligomerization analysis was carried out as mentioned above, and finally, bioassays with larvae were carried out. of *Manduca sexta* with the mutants that were generated and the mean lethal concentration (LC₅₀) was determined with the LdP Line program. **Results:** The mutants Cry1Ab S39C-T239C and Cry1Ab D74C-R93C in the oligomerization analysis were observed protein complexes of 180-200 kDa corresponding to the oligomer of the Cry1Ab toxin in the presence of BBMV or with the cadherin fragment CR7-CR12. With respect to the FRET assays with the mutant Cry1Ab S39C the presence of BBMV or CR7-12 showed a FRET (+) comparable to the monomeric toxin. In bioassays with *M. sexta* larvae the LC₅₀ (ng / cm²) of the Cry1Ab toxin is 1.81, Cry1Ab S39C is 0.93 Cry1Ab S39C-T239C is 0.86 and Cry1Ab D74C-R93C is 17.52. **Conclusions:** The oligomerization analysis of the mutant Cry1Ab S39C-T239C, together with the FRET studies with the mutant Cry1Ab S39C show that once the proteolytic cleavage between the helix α -2a and α -2b is carried out, it is not The separation of helix α -1 and α -2a is necessary to form the oligomer of the Cry1Ab toxin. The mutant Cry1Ab D74C-R93C showed that probably the conformational change of the helix α -2b is not necessary to form the oligomer. The mutants Cry1Ab S39C and Cry1Ab S39C-T239C appear to be more toxic than Cry1Ab.

Keywords: oligomerization, *Bacillus thuringiensis*, mutants, Cry1Ab toxin.

¹ Facultad de Ciencias. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho. Perú

² Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca. México.

INTRODUCCION

El proyecto de tesis es el resultado de un trabajo investigativo que genera una importancia incalculable para el estudiante, pues su afinidad e interés por la investigación elaborada forjan un campo grande de conocimientos, además de dar la resolución a problemas y abriendo nuevos pasos a investigaciones futuras. Así el alumno de Biología con mención en Biotecnología consolida las características profesionales conllevándolo a su línea de investigación.

La presente investigación de tesis titulada “Estudio del corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta* (Gusano cornudo)”, tuvo como objetivo estudiar los eventos moleculares, en específico la oligomerización de la toxina Cry1Ab interactuando con receptores de membrana del intestino medio de *M. sexta* en condiciones in-vitro, así como la generación de mutantes para estudiar dicho evento y evaluar su toxicidad en larvas de *M. sexta*; esto se formuló debido a la gran problemática de la contaminación ambiental por insecticidas químicos, la generación de plagas resistentes que afectan a la agricultura y el poco conocimiento del mecanismo molecular de las toxinas Cry, esto permitió generar la necesidad científica de poder realizar este proyecto de tesis.

El presente proyecto de tesis está dividido en seis capítulos, en concordancia al esquema de tesis de pregrado de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. El capítulo I está referido al planteamiento del problema, aquí se expone la realidad problemática, la formulación del problema, objetivos, justificación, delimitación y viabilidad del estudio, el capítulo II se refiere al marco teórico, aquí se muestran los antecedentes nacionales e internacionales, bases teóricas, definiciones conceptuales y formulación de hipótesis, el capítulo III contiene la metodología que incluye diseño metodológico, población y muestra, operacionalización de variables e indicadores, técnicas e instrumento de recolección de datos y técnicas para el procesamiento de la información, el capítulo IV describe la obtención de los resultados, aquí se exponen las figuras y las tablas estadísticas obtenidas después del procesamiento de los datos, el capítulo V se refiere a la discusión, conclusiones y recomendaciones, el capítulo VI cubre las fuentes de información revisadas y en Anexos se menciona las guías de observación y figuras que muestran el trabajo realizado en el laboratorio.

Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

En la historia de la agricultura, el ser humano siempre ha dado importancia a otras especies de la naturaleza que ayudan o dificultan la producción agrícola. Entre estas especies se encuentran los insectos ya que son los primeros en colonizar los campos de cultivo recién sembrados y en muchas de las ocasiones, sobrepasan el umbral tolerado por los agricultores convirtiéndose en una plaga (Alomar, 2005). Las pérdidas de cosechas generadas por plagas y enfermedades, han sido aproximadas en un 37% de la producción agrícola en todo el mundo y con un 13% causada por insectos (Gatehouse, Hilder y Boulter, 1992).

Frente a esto, desde su invención, los agroquímicos han representado la principal opción para el control de numerosas plagas (Rosas-García, 2008). Su uso se ha propagado sin tomar en cuenta los efectos adversos de estos, como el surgimiento de plagas resistentes y secundarias, daños al medio ambiente y otros organismos (Rosas-García y De Luna-Santillana, 2006). Existe evidencia que provocan la contaminación de acuíferos superficiales, alimentos, suelo. Además, afectan a la diversidad de las especies, la cadena alimenticia, el flujo de energía, los ciclos de nutrientes, la genética de los organismos, y en general, en el equilibrio del ecosistema (Granados, 1995). El daño a la salud que origina en los agricultores se debe principalmente al inadecuado manejo de los agroquímicos y a la toxicidad de estos productos durante y después de su uso, ello genera efectos de manera inmediata por intoxicaciones agudas (Rozas, 1999), y a largo plazo provoca intoxicaciones crónicas que puede ocasionar cáncer testicular, riesgos elevados de leucemia, mieloma múltiple, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer a la piel y cáncer cerebral, numerosos estudios sugieren que los agricultores expuestos a los fenoxiácidos y otros herbicidas tienen un elevado riesgo de sarcoma de tejidos blandos y linfoma no-Hodgking (Zahm y Blair, 1993).

Es por eso que desde hace algunos años se ha hecho énfasis en el uso de bioinsecticidas, ya que son productos biodegradables y específicos. Existen organismos entomopatógenos, y entre ellos figuran los hongos, protozoarios, algunos grupos de nemátodos y bacterias. Dentro de este último grupo podemos señalar a *Bacillus thuringiensis* (Bt) como la más importante, debido a que es la bacteria más utilizada para la producción de bioinsecticidas. Bt es Gram+, aeróbica estricta, quimiorganótrofa, presentando la particular habilidad de

producir inclusiones de tipo cristalinas en simultaneidad en su fase de esporulación. Se han descubierto δ -endotoxinas activas contra lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Carreras, 2003). Las ventajas de Bt es que presenta inocuidad al hombre, animales domésticos, flora y fauna silvestre. Se puede incrementar su actividad biocida mezclando con productos químicos como feromonas, adhesivos, etc. La vida en almacén es duradera en forma de producto seco, además cada vez se mejora los precios de producción, debido a los avances tecnológicos, microbiológicos y genéticos, lo que lo hace competitivo frente a los agroquímicos (Razo, 1990). Bt produce un arsenal de toxinas insecticidas tales como Vip, Cry y Cyt. Las toxinas Cry son las más estudiadas y utilizadas para el control de insectos plaga. Sobre el mecanismo molecular de las toxinas Cry, se ha establecido que una vez que los insectos susceptibles las ingieren, la unión de las toxinas Cry a sus receptores en las células del epitelio intestinal del insecto diana es un evento importante en su especificidad (Ferré y Van Rie, 2002). Una vez unida a los receptores, la toxina oligomeriza y puede insertarse en la membrana plasmática para formar poros (Aronson y Shai 2001). Dichos poros forman canales iónicos que afectan la potencial transmembrana, lo cual causa lisis osmótica y así la muerte del insecto (Bravo, Likitvivatanavong, Gill y Soberón, 2011).

No se conoce completamente el proceso de la inserción en la membrana, pero se cree que existen eventos de reconocimiento molecular con otros receptores de la superficie celular que ayudan a la oligomerización y precisamente en estos eventos ocurren cortes proteolíticos y cambios conformacionales. Por ello la oligomerización de las toxinas Cry es un paso clave en el modo de acción de estas proteínas insecticidas. Sin embargo, estos cortes y cambios son aún desconocidos en las proteínas Cry de Bt.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema General

¿El corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*?

1.2.2 Problemas Específicos

¿La unión por medio de un enlace disulfuro por mutagénesis sitio dirigida que inmoviliza covalentemente la hélice α -1 y α -7 localizadas en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*?

¿La unión por medio de un enlace disulfuro por mutagénesis sitio dirigida que inmoviliza covalentemente la hélice α -2b y α -3 localizadas en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*?

¿Es necesario el corte proteolítico de la hélice α -1 y α -2a en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*?

¿La inserción de cisteína en la hélice α -1, α -2b, α -3 y α -7 por mutagénesis sitio dirigida en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la toxicidad frente a *Manduca sexta*?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar de qué manera el corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

1.3.2 Objetivos Específicos

Determinar si la unión por medio de un enlace disulfuro por mutagénesis sitio dirigida que inmoviliza covalentemente la hélice α -1 y α -7 localizadas en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

Determinar si la unión por medio de un enlace disulfuro por mutagénesis sitio dirigida que inmoviliza covalentemente la hélice α -2b y α -3 localizadas en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influyen en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

Comprobar si es necesario el corte proteolítico de la hélice α -1 y α -2a en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

Demostrar si la inserción de cisteína en la hélice α -1, α -2b, α -3 y α -7 por mutagénesis sitio dirigida en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* influirán en la toxicidad frente a *Manduca sexta*.

1.4 Justificación de la investigación

La importancia de la presente tesis radica en conocer el mecanismo molecular de la toxina Cry1Ab, lo cual traería como resultado un mejor entendimiento de la oligomerización de dicha toxina, así su mejoramiento con la generación de mutantes que permitan un mejor control de insectos que dañen a cultivos de relevancia económica. La tesis tendría una gran relevancia a nivel nacional e internacional de investigación básica-aplicada ya que sería una de las pocas que estudie el estado del arte de cómo actúa la toxina Cry1Ab frente a receptores de *Manduca sexta*, utilizando técnicas de biología molecular, microbiología, ingeniería de proteínas, bioinformática, análisis instrumental, etc.

1.5 Delimitación del estudio

El proyecto de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México-México, la presente tesis se realizó durante 7 meses.

Los ensayos se delimitarán con el estudio de la toxina Cry1Ab, las cuales se realizaron en condiciones in-vitro y los ensayos de toxicidad con larvas del primer estadio de *Manduca sexta*.

1.6 Viabilidad del estudio

Se contó con los recursos económicos, infraestructura, apoyo de personal calificado y capacitado del Laboratorio de Microbiología Molecular del IBT-UNAM que viene realizando investigación básica-aplicada por más de 30 años en el área de toxinas de *Bacillus thuringiensis* y el asesoramiento de docentes del Laboratorio Multifuncional de Biología de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión.

Capítulo II: MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Antecedentes Internacionales

Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo y Soberón (2002), realizaron un estudio con el propósito de estudiar la interacción del anticuerpo de cadena única (scFv73) que imita al receptor caderina en el proceso de activación de protoxinas. Se realizó obteniendo jugo gástrico y vesículas de membrana de la microvellosidad apical (BBVM) de larvas de quinto estadio de *Manduca sexta*, se produjeron cristales Cry1Ab, para luego activarlo con scFv73, se añadió tripsina o jugo gástrico, la purificación de las toxinas activadas se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño, se secuenció los extremos N-terminal del monómero y el oligómero, la toxina activada se separó en SDS-PAGE y se realizó Western blot detectando con anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab y con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano picante, se visualizaron por quimioluminiscencia, para los ensayos de toxicidad con Cry1Ab se utilizaron larvas del primer estadio de *Manduca sexta*. Los resultados presentaron que la CL₅₀ de la protoxina Cry1Ab es 1 (ng/cm²) y el Western Blot con la protoxina Cry1Ab activada con scFv73 y jugo gástrico se observó monómero (60 kDa), intermediario de la oligomerización (120 kDa) y oligómero (250 kDa), el secuenciamiento del amino terminal del monómero (²⁹IETGYTP) corresponde al comienzo de la hélice α -1 y el oligómero (⁵¹VPGAG) que estaba ubicado entre las hélices α -1 y α -2. La conclusión fue que la interacción del receptor scFv73 es un paso necesario para la activación proteolítica de la toxina Cry1A así se evidencio la eliminación de las hélices α -1 y α -2 del dominio I en el oligómero.

Pacheco, Gómez, Gill, Bravo y Soberón (2009), hicieron una investigación que tuvo como fin el mejoramiento de la actividad insecticida utilizando fragmento de caderina (CAD). Se realizó expresando la toxina Cry1Ab en *Bacillus thuringiensis* 407 que alberga el plásmido pHT315-cry1Ab, las cepas se cultivaron en un medio de esporulación, se solubilizaron y activaron con tripsina, para la obtención de fragmentos de caderina (CR7-CR12) se expresó en *E. coli* BL21 que contiene el plásmido pET22b, se purificaron los fragmentos por columnas de Níquel-Agarosa, para el ensayo de oligomerización se incubaron la protoxina Cry1Ab con los fragmentos de caderina CR7-12, CR7, CR11 o CR12, se digirieron con jugo de gástrico de *Manduca sexta*. La mezcla de reacción se separó en SDS-PAGE y se realizó Western Blot detectando con anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab

y con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a la peroxidasa de rábano picante, se observó por quimioluminiscencia, para los ensayos de toxicidad se utilizaron larvas del primer estadio de *M. sexta* las cuales se les trató con toxinas activadas de Cry1Ab y fragmentos de caderina. Los resultados presentaron la formación de oligómeros de la toxina Cry1Ab en presencia de CR7, CR11 o CR12, los bioensayos la concentración de CL₁₀ de toxinas Cry1Ab (0,05 ng/cm²) se mezclaron con 5 ng/cm² de diferentes péptidos de caderina correspondientes a CR7-12, CR12, CR11, CR7 el porcentaje de mortalidad fue con la CR7-CR12 un 80%, la CR12 un 65%, la CR11 un 40% y la CR7 un 35% en comparación en donde no hay fragmento de caderina un 10%. La conclusión es que los fragmentos de caderina aumentan la actividad insecticida de la toxina Cry1A, lo cual se ve reflejado en la obtención de oligómeros cuando se incubaba con dichos fragmentos.

Pacheco et al. (2018), realizaron un estudio que tuvo como objetivo identificar puentes salinos en los oligómeros de la toxina Cry1Ab, Cry1Fa, Cry4BA y Cry5BA. Para lograrlo se elaboró un modelo de la estructura trimérica de la toxina Cry1Ab utilizando el trímero Cry4Ba como plantilla, los alineamientos de secuencias de proteínas se realizaron mediante la alineación de Muscle 3.7, la identificación de la hélice putativa α -3 y orientación de las diferentes caras de la hélice se realizó mediante el análisis de la probabilidad, se realizó simulaciones de equilibrio del modelo trimérico de Cry1Ab, se construyó las mutantes Cry1Ab R99E, Cry1Ab E101R, Cry1Ab R99E-E101R y Cry1Ab R99E-N85D-R87K utilizando el plásmido pHT315-cry1ab que contiene el gen cry1ab, se transformaron en la cepa 407 de *B. thuringiensis* acristalifera, se produjeron las toxinas en medio de esporulación, para los ensayos de toxicidad con las mutantes de Cry1Ab se aplicaron en larvas neonatas de *M. sexta* frente a diferentes soluciones de protoxinas para determinar la CL₅₀, los ensayos de oligomerización se obtuvieron incubando la toxina activada con el fragmento CAD (CR7-CR12), las muestras se separaron en SDS-PAGE y se realizó ensayos de Western se detectó con anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab y luego con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante, se observó por quimioluminiscencia. Teniendo como resultado la obtención de un modelo estructural del trímero Cry1Ab el cual se observó que el residuo de arginina (R99), en la hélice α -3 está muy cerca de un residuo de ácido glutámico (E101), las simulaciones dinámicas moleculares extendidas mostraron que estos residuos forman un puente intermolecular salino, las simulaciones del mutante R99E revelaron un rápido colapso de la organización local de las hélices α -3 y una sorprendente pérdida de la simetría triple,

las estructuras cristalinas de las toxinas Cry4Ba y Cry5Ba revelaron una organización trimérica donde las hélices α -1 y α -2a se perdieron durante el proceso de cristalización y el análisis estructural de Cry5Ba mostró que los residuos Cry5Ba-D129 y Cry5Ba-K131 están ubicados en la hélice extendida α -3 formando un puente salino, en las estructuras triméricas Cry5Ba y Cry4Ba que forman parte de la hélice extendida α -3, los ensayos de toxicidad presentaron los siguientes CL_{50} (ng/cm²) de Cry1Ab es 2.4, Cry1Ab R99E es >10000, Cry1Ab E101K >10000, Cry1Ab R99E-E101R es 278.6 y Cry1Ab R99E-N85D-R87K es 250.6, en los ensayos de oligomerización las mutantes CryAb R99E-E101R y CryAb R99E-N85D-R87K presentaron estructura oligoméricas en comparación de la mutante Cry1Ab R99E y Cry1Ab E101R donde hubo ausencia. Como conclusión se logró la identificación de dos puentes salinos que resaltan un rol determinante en la toxicidad y estabilidad del oligómero.

Chavez et al. (2015), desarrollaron una investigación que tuvo como finalidad determinar si la intoxicación de larvas de *Manduca sexta* con Cry1Ab activa la expresión de sintasa de óxido nítrico (NOS) con un aumento de óxido nítrico (NO). Esta investigación se consiguió expresando en cepas de *Bacillus thuringiensis* la toxina Cry1Ab y Cry1Ab E129K que fueron cultivado en medio de esporulación, se cosecharon, se lavaron y las inclusiones de cristales se purificaron por gradientes de sacarosa discontinuos, se solubilizaron, se recuperaron por centrifugación, los ensayos de toxicidad se realizaron con larvas de *M. sexta* con soluciones de protoxinas y se obtuvo la concentración letal media (CL_{50}), para analizar la mortalidad de las larvas de *M. sexta* cuando se alimentaron con una dieta contaminada con nitroprusiato de sodio (SNP) o L-NAME incorporado a la dieta, con o sin adición de la toxina Cry1Ab, la mortalidad en estos ensayos se registró después de 7 días, la determinación de la producción de NO en larvas de *M. sexta* con Cry1Ab, l-NAME, nitroprusiato de sodio y una mezcla de Cry1Ab más l-NAME, las larvas se lavaron, se obtuvo el intestino medio de *M. sexta*, la concentración de NO en las muestras se determinó cuantificando nitritos y nitratos (NO_2^-/NO_3^-), se realizó la transcripción inversa-PCR (RT-PCR). Teniendo como resultado que en el tejido del intestino medio la concentración de NO era 3,8 veces mayor en las larvas tratadas con Cry1Ab en comparación con las larvas de control, la toxicidad de Cry1Ab E129K (CL_{50} >10,000 ng/cm²), la activación de la expresión de NOS después de la intoxicación con la toxina Cry1Ab se obtuvo que aumentó 12 veces en comparación con las larvas de control, el efecto de la producción de NO de la toxina Cry1Ab L-NAME elimina el efecto de la

toxina para inducir la producción de NO en el tejido del intestino medio y la mortalidad de Cry1Ab se redujo, L-NAME existe mortalidad no fue abolido, el control positivo con SNP aumentado la mortalidad de las larvas, se obtuvo como conclusión que la intoxicación de larvas de *M. sexta* con Cry1Ab activa la expresión de NOS con un aumento correspondiente en NO.

Lee, You, Gould y Dean (1999), realizaron un estudio que tuvo como objetivo el estudio del papel funcional del dominio III en la toxicidad con *Manduca sexta*. Esta investigación se logró generando mutantes que sustituyan alanina en la región del dominio III Cry1Ac, desde los residuos de aminoácidos 503 a 525, los cuerpos de inclusión de cristales de Cry1Ac, las toxinas mutantes se solubilizaron, la concentración de proteínas de protoxinas se estimó con el ensayo de proteínas Coomassie, para los ensayos de toxicidad se utilizaron larvas de 2 a 3 días de *M. sexta* y se estimó la dosis letal media de la toxina (CL₅₀). Como resultado se obtuvo que CL₅₀ (ng/cm²) de Cry1Ac es 4.68, ⁵⁰³SS⁵⁰⁴ es 4.75, ⁵⁰⁶NNI⁵⁰⁸ es 4.81, ⁵⁰⁹QNR⁵¹¹ es 8.61, ⁵²²ST⁵²³ es 4.56, ⁵²⁴ST⁵²⁵ es 5.13, ⁵⁰⁹Q es 7.53, ⁵¹⁰N es 4.46, ⁵¹¹R es 8.13 y ⁵¹³Y es 9.79. Se obtuvo como conclusión que las mutantes que afectan alanina no afectan la toxicidad con larvas de *M. sexta*.

Wu y Aronson (1992), su estudio tuvo como objetivo determinar si generando diferentes puntos de mutación de la toxina Cry1Ab se genera un efecto en la toxicidad y especificidad. Esta investigación se consiguió subclonando el gen de cryAb en pXI61TP siendo transferido a una *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* HD1 por electroporación, las mutaciones se obtuvieron introduciendo aminoácidos de diferentes cargas que reemplazan al aminoácido alanina y arginina de la toxina Cry1Ab, la producción de protoxina se logró en un medio de esporulación, se lavó, se solubilizó, se activó con tripsina, los ensayos de toxicidad se realizaron con larvas del primer estadio de *Manduca sexta* para medir los valores de CL₅₀. Los resultados de la CL₅₀ son los siguientes la Cry1Ab silvestre es 2.31(ng/cm²), las mutantes Cry1Ab A92R, Cry1Ab A92P, Cry1Ab A92G, Cry1Ab A92Y, Cry1Ab A92N, Cry1Ab A92C, Cry1Ab A92S, Cry1Ab A92T, Cry1Ab A92V, Cry1Ab A92L y Cry1Ab R93K presentan una toxicidad comparable a la Cry1Ab silvestre, la Cry1Ab R93H de 10-100 menor la toxicidad que la tipo silvestre, la Cry1Ab R93G, Cry1Ab R93A y Cry1Ab R93S 100-1000 menor la toxicidad que la tipo silvestre, la Cry1Ab A92D, Cry1Ab R93L, Cry1Ab R93I, Cry1Ab R93V, Cry1Ab R93M, Cry1Ab R93W, Cry1Ab R93T, Cry1Ab R93N y Cry1Ab R93E no se detectó toxicidad en concentraciones 1000 veces mayores que la CL₅₀ del tipo salvaje. Se concluyó que los

diferentes puntos de mutación de la toxina Cry1Ab se genera efecto directo en la toxicidad y especificidad.

Jara, Maduell y Orduz (2005), el estudio tuvo como objetivo aislar, caracterizar y realizar ensayo de toxicidad con *Spodoptera frugiperda*. Esto se logró aislando *Bacillus thuringiensis* de filoplano de muestras de suelo de maíz y frijol de tres municipalidades en Antioquia y Colombia, se evaluaron 96 muestras de filoplano y 24 de suelo, se realizaron ensayos de toxicidad con *S. frugiperda*. Como resultado se obtuvieron un total de 214 aislamientos de 96 muestras de filoplano, mientras que se recuperaron 50 aislamientos de las muestras de suelo. El 75% de Bt de filoplano y el 12% de Bt de suelo, respectivamente, mostraron actividad contra *S. frugiperda*. Estos aislados contenían proteínas δ -endotoxinas de 57 y 130 kDa. Los aislamientos más tóxicos contra *S. frugiperda* tenían el genotipo cry1Aa, cry1Ac, cry1B y cry1D, la CL₅₀ (ng/cm²) de *Bacillus thuringiensis serovar aizawai* es de 106, Bt 147-5406 es 29, Bt 147-5402 es 36, Bt 147-5501 es 36, Bt 147-5401 es 49, Bt 147-5502 es 54, Bt 147-5404 es 77, Bt 147-5403 es 192 y Bt 147-5405 es 1386. Se obtuvo como conclusión que la población predominante de *B. thuringiensis* en el filoplano albergaba el gen cry1 y presentan toxicidad frente a *S. frugiperda*.

2.1.2 Antecedentes Nacionales

Mamani (2008), la investigación tuvo como propósito formular un insecticida biológico eficaz contra plagas, basado en baculovirus PoGV, *Bacillus thuringiensis var kurstaki* o la mezcla de ambos. El tratamiento de los tubérculos de papa con fórmulas de patógenos fue por inmersión o impregnación; e inoculadas con larvas neonatales de *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*, en almacenes de papa. En los resultados las preparaciones en talco aumentan la eficacia de los patógenos, obteniendo valores CL₅₀ con menores concentraciones de PoGV (16 veces) y Btk (5-6 veces) al compararse con sus respectivas preparaciones líquidas (1,55x10⁷ gránulos/mL; IC95%: 1.26x10⁷-2.14x10⁷ y 1321 mg/L; IC95%: 1084-1555) obtenidas contra *P. operculella*; así mismo fueron 2-4 veces menores respecto a preparaciones líquidas de Btk (3095 mg/L; IC95% 1711 - 3575) en *S. tangolias*, la interacción PoGV-Btk contra *P. operculella* fue mixta, tendiendo al antagonismo ante concentraciones altas de ambos patógenos y sinérgismo a bajas concentraciones. Dos fórmulas: Btk y Btk+PoGV, preparadas y aplicadas en almacenes de papa, permitieron incrementos poblacionales, 90 días después, solo en *S. tangolias* (3,0 y 2,7%) (larvas-pupas/100 tubérculos); luego de disminuirlos a niveles de 1,7% (30 días). Se

concluye que no resulta conveniente utilizar preparaciones mixtas de Btk+PoGV por no conseguirse valores de sinergismos significantes; recomendándose el producto Btk en talco, por su mayor efecto contra ambas especies de polilla de papa.

Flores et al. (2011), el estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* de interés biotecnológico de suelos agrícolas peruanos, y evaluar su potencial entomotóxico frente a *Spodoptera frugiperda*. Se realizó colectando 385 muestras de rizosfera y material vegetal de regiones agrícolas del Perú, se aislaron sometidas a shock térmico y métodos de cultivo, la identificación de cristales paraesporales por tinción con Giemsa, la producción del complejo espora-cristal en caldo leche peptonizada y el perfil proteico de cristales por SDS-PAGE, los bioensayos de las bacterias se realizaron con *S. frugiperda*. En los resultados se aislaron 54 cepas de *B. thuringiensis* de 385, se evidenció presencia de cristales parasporales, los bioensayos realizados con *S. frugiperda*, probaron que la cepa Bt-UNMSM-42 posee una mayor toxicidad frente a las otras cepas con una media de mortalidad de 39,73% con 50 µg/mL y de 71,93% para 250 µg/mL, con una desviación estándar de 11,30 y 9,98.

Junior (2015), el estudio tuvo como objetivo aislar *Bacillus thuringiensis* con actividad entomopatógenos a partir de suelos de cultivo de brasicáceas en Menocucho, Laredo-Perú y su actividad entomopatógena a *Spodoptera frugiperda*. Para esto se recolectó 15 muestras de suelo (brasicáceas), las muestras de suelo fueron diluidas, tratadas con choque térmico, se realizaron diluciones seriadas, luego se sembraron las 2 últimas diluciones en placas con agar soya tripticasa, se observaron las características macroscópicas y morfológicas, coloración Gram, para la identificación de la toxina se realiza coloración con azul de Coomassie. En los resultados se logró aislar 21 cepas de *Bacillus thuringiensis* en 3 de 15 campos de cultivo de brasicáceas, como cada una ellas presentaron las mismas características morfológicas, se seleccionó un cultivo de CBt-4, CBt-6 y CBt-9 y se evaluó la actividad entomopatógenos frente a *S. frugiperda*, obteniéndose un promedio de tasa de mortalidad de 65, 48.5 y 71.7 para CBt-4, CBt-6 y CBt-9 respectivamente.

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 *Bacillus thuringiensis*

2.2.1.1 Historia

El biólogo Berliner en 1911, fue el primero en descubrir la bacteria *B. thuringiensis* cuando la encontró en la pupa de la mariposa del mediterráneo (*Ephestia kuefmiella*) y en otras larvas

de insectos provenientes de la ciudad Thuringen, la descripción realizada fue ser un bacilo Gram +, con flagelos peritricos, crecimiento vegetativo y con presencia de espora. (Berliner, 1911). Este microorganismo ya había sido identificado por S. Ishiwata en 1901 (Ishiwata, 1991) como un patógeno que generaría la enfermedad de sotto en la mariposa de seda (*Bombyx mori*), el cual llamo *B. sotto* (Lambert y Peferoen, 1992). En el año de 1915, Aoki y Chigasaki observaron en cultivo viejos de *B. sotto* la presencia de una toxina que era la causante de la muerte de los insectos y en 1927, Mattes verifico la observación realizada por Berliner, añadiendo que el crecimiento del cuerpo de desecho de la bacteria cambiaba también la localización de la espora. (Aizawai, 1971; Dulmage y Aizawai, 1982).

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se encuentra en todas partes y existe en diversos habitat como suelo, agua, hojas de plantas insectos muertos, etc. Se tiene registro de más de 350 secuencias diferentes de los genes Cry, esto impacta directamente en el control de insectos que afectan a la agricultura y vectores de enfermedades (Crickmore et al., 1998; Soberón y Bravo, 2008).

2.2.1.2 Ciclo de vida

Consta de 2 fases, que incluye la división de la célula vegetativa y el desarrollo de la espora. La célula vegetativa tiene forma de bastón se fragmenta en 2 células hijas que forman un tabique de división iniciado a la mitad de la membrana plasmática. La esporulación (Figura 1), incluye la división celular e involucra a 7 etapas que incluye la formación del filamento axial (etapa I), preespora y aparición del tabique (etapa II), aparición de cristales parasporales y formación de la preespora (etapa III), formación de exosporium, pared celular primordial, corteza y abrigos de esporas acompañado de transformación del nucleoide y esporas (etapas IV a VI), y la maduración de las esporas y lisis del esporangio (etapa VII) (Bulla et al., 1980).

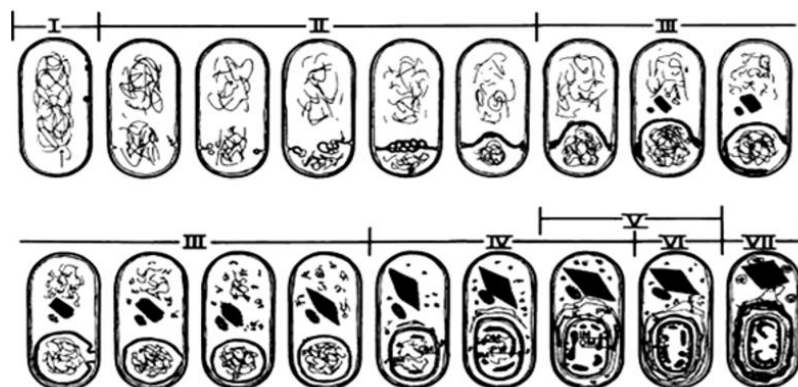


Figura 1. Diagrama de la esporulación en *B. thuringiensis* (Bulla et al., 1980).

La esporulación es inducida por una disminución de los recursos nutritivos presentes en el medio. El proceso dura entre 6 a 8 horas y originan una serie de cambios morfológicos y fisiológicos remarcables (Errington, 1993). Las observaciones efectuadas en otros trabajos sobre el crecimiento y la naturaleza del cristal paraesporal, mostraron que existe una relación entre la esporulación y la aparición de este cuerpo cristalino (Figura 2), el cual se compone principalmente de una o varias toxinas de naturaleza proteica llamadas comúnmente δ -endotoxinas (Porcar y Juárez-Pérez, 2004).

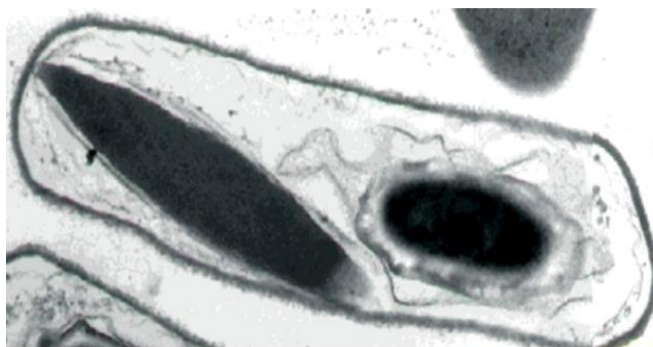


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de *B. thuringiensis* en la que se muestra una espora madura y un cuerpo cristalino (Soberón y Bravo, 2003).

2.2.1.3 Características de las δ -endotoxinas

Las δ -endotoxinas son el componente paraesporal predominante en la mayoría de subespecies de Bt (Bulla et al., 1980), donde existen variaciones en el número, la forma y la composición de estas inclusiones (Aronson, Beckman y Dunn, 1986). Estas inclusiones cristalinas contienen las proteínas Cry (crystal) y Cyt (cytolytic) de una o varias clases, las cuales les confieren un amplio y diverso espectro de acción insecticida (Porcar y Juárez-Pérez, 2004). La actividad biocida afecta a especies de insectos del orden de Lepidóptera, durante el estadio larvario. Las proteínas Cry son estructuras paraesporal de 130 a 140 KDa, que muestra un efecto tóxico hacia algún organismo, esto se verifica por ensayos de toxicidad o cualquier proteína que muestre similitud con las actuales proteínas Cry (Barloy, Delécluse, Nicolás & Lecadet, 1996).

La familia de genes que codifican para estas toxinas es la familia del gen cry (Crickmore et al., 1998; Schnepf et al., 1998), una característica común de los genes cry es su expresión durante la fase estacionaria de crecimiento. La gran mayoría de los genes cry pertenecen al grupo cry1 (Figura 3) y estos son los más estudiados (Crickmore et al., 1998).

de acuerdo a su estructura: 3d-Cry, Bin-like y Mtx-like, siendo las toxinas 3d-Cry las más abundantes (Crickmore et al., 1998).

Los miembros del grupo 3d-Cry son sintetizadas por Bt como protoxinas que pueden tener dos longitudes diferentes, 65 y 130 kDa aproximadamente. La principal diferencia entre las toxinas 3d-Cry de 65 y 130 kDa es la extensión del extremo C-terminal que se encuentra en las protoxinas de 130 kDa (De Maagd, Bravo y Crickmore, 2001). La región N-terminal de todas las proteínas 3d-Cry contienen un péptido en el extremo N-terminal (compuesto de 20-60 residuos) seguido de una región compuesta por aproximadamente 600 residuos de aminoácidos, los cuales forman la toxina activa. El fragmento activo de las toxinas 3d-Cry son moléculas globulares que contienen tres dominios distintos (Figura 4). Se ha determinado la estructura de diferentes toxinas Cry activadas, tales como Cry1Aa (específico de lepidópteros), Cry3Aa, Cry3Bb y Cry8Ea (coleóptero específico), Cry4Aa y Cry4Ba (específico de dípteros) y la Cry2Aa (específico de dípteros-lepidópteros) (Galitsky et al., 2001).

Los dominios de la toxina 3d-Cry es el dominio I que está formado por 7 α -hélices, donde una hélice central está rodeada de otras 6, este dominio participa en la formación de poros en la membrana de las células del intestino del insecto. El dominio II está formado por tres láminas β antiparalelas. Este dominio participa en la interacción con el receptor, que se encuentra en la cara apical de la membrana de células epiteliales del intestino medio del insecto blanco, determinando así la especificidad de la proteína. Finalmente, el dominio III es una estructura β -plegada que también parece estar involucrada en especificidad (Bravo y Cerón, 2004). Los dominios de la toxina Cry1Aa se observan en la Figura 4.

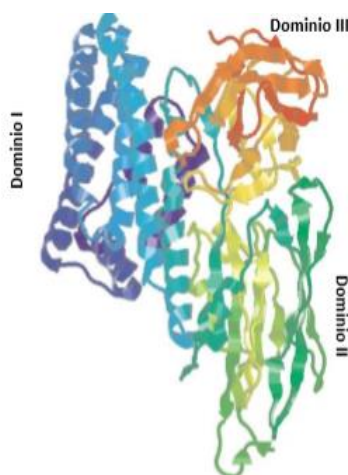


Figura 4. Estructura cristalografica de la toxina Cry1Aa (De Maagd, Bravo y Crickmore, 2001).

2.2.2.2 Modo de acción

El modelo del mecanismo de acción de las toxinas 3d-Cry, que es más aceptado y tiene mejor soporte experimental, propone que son proteínas que ejercen su efecto tóxico formando poros en las células intestinales de los insectos, los cuales provocan un choque osmótico que conducen a la lisis celular y finalmente la muerte de las larvas.

Esto inicia cuando un insecto ingiere los cristales de Bt, al llegar a intestino son solubilizados y liberan las protoxinas. Las toxinas Cry1A se producen como protoxinas de 130 kDa y se activan por acción de las proteasas, lo que da como resultado un núcleo resistente a proteólisis de 60 kDa compuesto por los tres dominios (Pardo-López, Soberón y Bravo, 2013). Posteriormente, las proteínas Cry1A experimentan interacciones secuenciales con diferentes proteínas del intestino medio del insecto, incluidas una proteína transmembrana caderina (CAD) de 210 kDa y dos proteínas ancladas con glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), la fosfatasa alcalina (ALP) de 65 kDa y la aminopeptidasa-N (APN) de 120 kDa (Gómez et al., 2014). La interacción con CAD es una interacción compleja que implica tres epítomos localizados en las regiones extracelulares denominadas CR7, CR11 y CR12, donde CR12 es el dominio proximal a la membrana. Estos epítomos de CAD interactúan con los bucles 2, 3 y α -8 del dominio II de la toxina Cry1A (Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo y Soberón, 2002; Atsumi et al., 2008). La interacción con CAD promueve la formación de una estructura oligomérica de la toxina Cry1A, la cual se inserta en la membrana para formar el poro (Pacheco, Gómez, Gill, Bravo y Soberón, 2009). Durante la oligomerización, la toxina Cry1Ab experimenta un cambio conformacional que conduce a la reorganización de las cadenas laterales de triptófano, localizadas principalmente en el dominio I de la toxina, reduciendo su accesibilidad al solvente. Tras la penetración de la membrana, se produce un segundo cambio en la conformación favoreciendo que los residuos de triptófano entren en estrecho contacto con la membrana y posiblemente anclan al oligómero a la bicapa lipídica. Estos datos muestran que el dominio I se inserta en la membrana. Además, se propuso que el extremo N-terminal que incluye la hélice α -1 se escinde (Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo y Soberón, 2002), así una proteína modificada de Cry1Ab (Cry1A Mod.) que carece del extremo N-terminal, incluyendo la hélice α -1 y parte de la hélice α -2a, es capaz de formar estructuras oligoméricas en ausencia de CAD y es activa en insectos que son resistentes debido a mutaciones ligadas a CAD y otros receptores (Soberón, Pardo-López, López, Gómez, Tabashnik y Bravo, 2007). Por otra parte, las toxinas con mutaciones en la hélice α -3, como

Cry1Ab R99E, se vieron afectadas en la oligomerización y la toxicidad, lo cual indica que ésta hélice es importante para la oligomerización (Jiménez-Juárez et al., 2007).

La oligomerización de las toxinas 3d-Cry se ha estudiado solo en un número limitado de toxinas (Cry1A, Cry3Aa, Cry4Ba y Cry11Aa). Se demostró que, al igual que las toxinas Cry1A, las toxinas Cry11Aa y Cry3Aa también requieren la unión a CAD para oligomerizar (Fabrick et al., 2009). En contraste, la toxina Cry4Ba es una excepción porque es capaz de oligomerizar in-vitro en ausencia de unión al receptor CAD (Rodríguez-Almazán et al., 2012). Las estructuras cristalográficas de las toxinas Cry4Ba y Cry5Ba han revelado una organización trimérica y carecen de las hélices α -1 y α -2a. Es notable que la escisión de estas hélices en ambas proteínas Cry4Ba y Cry5Ba fue equivalente, localizada 50 residuos corriente arriba de la hélice α -3. Además, estas estructuras muestran un cambio conformacional en la estructura de la hélice α -2b y el bucle que la conecta a la hélice α -3, que resultó en la formación de una hélice α -3 extendida en el trímero. Las hélices α -3 de las estructuras de la toxina Cry4Ba y Cry5Ba son importantes para su organización trimérica, ya que α -3 hace varios contactos con otras hélices (α -3, α -4 y α -6) de los monómeros adyacentes (Boonserm, Davis, Ellar y Li, 2005; Hui et al., 2012).

Posterior a este importante evento de formación de oligómeros, se propone que los monómeros insertan a la membrana una horquilla hidrofóbica formada por las hélices α -4 y α -5, mientras que el resto de las hélices del dominio I se extienden sobre la superficie de la membrana en forma de “paraguas” (Kumar y Aronson, 1999; Girard et al., 2009). Así el oligómero insertado en la membrana forma poros iónicos que llevan eventualmente a la lisis celular (Knowles y Ellar, 1987). Los primeros síntomas de la intoxicación son la casi inmediata parálisis de la motilidad intestinal y la detención de ingesta; después de uno o dos días, una vez que la barrera impuesta por el intestino ha sido superada, las esporas germinan en el ambiente nutritivo de la hemolinfa y el insecto muere por la inanición y septicemia. En relación al modo de acción de la toxina Cry1A, el Dr. Sabino Pacheco Guillén, propone una versión inédita (Figura 5).

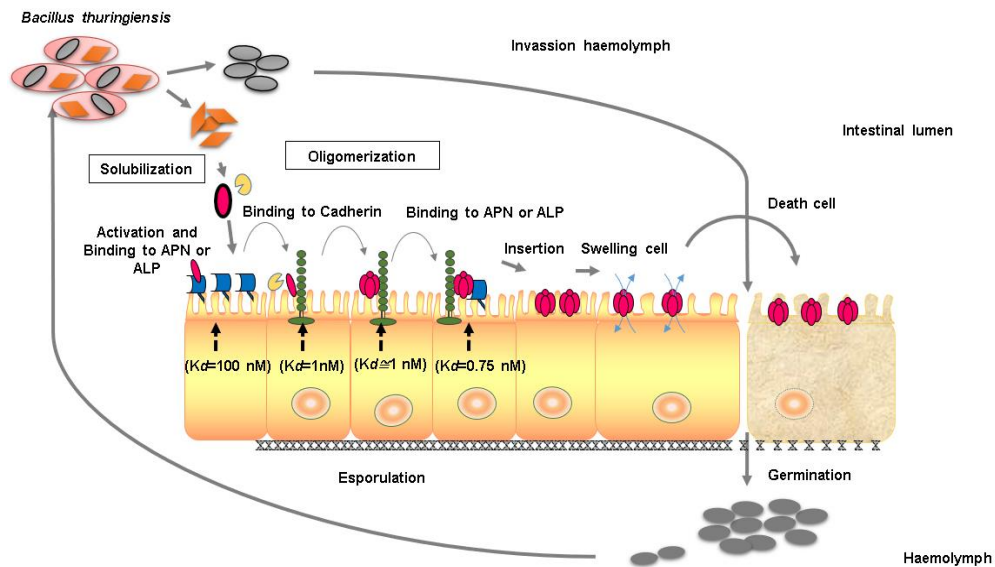


Figura 5. Modo de acción de la toxina Cry1A (Fuente inédita del Dr. Sabino, 2018).

2.2.3 *Manduca sexta*

Conocido como gusano cornudo pertenece al orden lepidóptero, atacando a plantas solanáceas, con mayor frecuencia tomate (*Solanum lycopersicum L.*), tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), berenjena (*Solanum melongena L.*), pimiento (*Capsicum annuum L.*), papa (*Solanum tuberosum L.*) (Villanueva, 2009).

2.2.3.1 Descripción del ciclo de vida

Villanueva (2009) afirma:

Presenta de 3 a 4 generaciones anuales y que el ciclo de vida suele completarse entre 30 a 50 días, pero es dependiente estos valores del clima donde se desarrolle el insecto, presenta metamorfosis completa, pasa por las etapas de huevo, larva, pupa y adulto, lo cual se describe a continuación.

Huevo: son de forma ovalada, miden alrededor de 1.5 mm en diámetro y varían en color desde verde claro hasta blanco (Figura 6). Los huevos son depositados en la superficie inferior del follaje. La duración de este estadio es de 2 a 8 días, durando en promedio 5 días.



Figura 6. Huevo de *M. sexta*.

Larva: de forma cilíndrica, presenta 5 pares de pseudopatas más 3 pares de patas torácicas. La característica más llamativa de esta larva es que posee una estructura en forma de cuerno que se localiza dorsalmente en la parte terminal del segmento dorsal. Presenta 7 líneas blancas. Estas líneas están bordeadas con negro en los bordes superiores y el cuerno usualmente es de color rojo (Figura 7). Normalmente presenta 5 estadios larvales, pero ocasionalmente pueden presentar 6. Las medidas del cuerpo son 6.7, 11.2, 23.4, 49.0 y 81.3 mm, respectivamente para cada estadio. El desarrollo larval dura en promedio 20 días.



Figura 7. Larva de *M. sexta*.

Pupa: cuando las larvas están maduras y se entierran de 10 a 15 cm donde forman una pupa. Presenta forma alargada y ovalada pero puntiaguda en el extremo posterior. Mide de 45 a 60 mm de longitud. El color de la pupa es café o café rojizo (Figura 8). La duración de esta etapa del insecto es prolongada y variable.



Figura 8. Pupa de *M. sexta*.

Adulto: es una polilla con un tamaño de aproximadamente 100 mm. Las alas delanteras son más largas que las alas traseras. Es de color grisáceo o marrón grisáceo, con 6 puntos de color naranja en el abdomen. Las alas posteriores presentan bandas claras y oscuras alternas (Figura 9).



Figura 9. Adulto de *M. sexta*.

2.2.3.2 Distribución geográfica y daños que produce

Es más común al sur de Estados Unidos, especialmente en los estados de la Costa del Golfo. Su área de distribución se extiende hacia el norte hasta Nueva York (Villanueva, 2009).

Se distribuye en Norteamérica (Canadá, México y EE.UU), Centroamérica y el Caribe (Antigua y Barbuda, Bahamas, Barbados, Belice, Islas Vírgenes Británicas, Islas Caimán Islas, Costa Rica, Cuba, Dominica, República Dominicana, Granada, Guadalupe, Guatemala, Haití, Honduras, Jamaica, Martinica, Montserrat, Nicaragua, Panamá, Puerto Rico, Trinidad y Tobago, Islas Vírgenes) y América del Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Amazonas, Paraná, Rio Grande do Sul, Chile, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Islas Galápagos, Guyana, Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay, Venezuela) (CABI, 2002).

El daño lo ocasiona la larva debido a que se alimenta de las hojas, tallos y frutos (OMS, 2003c; King y Saunders, 1984; CATIE, 1993). Aproximadamente el 90 % del consumo del follaje se produce durante el último estadio (Villanueva, 2009).

2.3 Definiciones conceptuales

Corte proteolítico: Son escisiones que ocurren en la α -hélices del dominio I de la toxina Cry1Ab por acción de las proteasas del insecto.

Cambio conformacional: Son modificaciones que presenta la toxina Cry en la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos y la cadena polipeptídica principal que suceden durante el mecanismo de acción, principalmente en las α -hélices del dominio I, como la elongación de la hélice α -3.

Oligomerización: Es el proceso que involucra la asociación de varias subunidades de la toxina Cry1Ab para la formación de una estructura oligomérica formadora del poro iónico generando la muerte del insecto.

Toxicidad: Es una sustancia que produce daños perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.

Mutación: Es cualquier alteración de la secuencia de bases de un segmento de ADN correspondiente a un gen o a un locus.

Transformación bacteriana: Asimilación de ADN exógeno (desnudo), por parte de una célula receptora.

Plásmido: Son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circulares que se replican y transmiten de manera independiente.

Oligonucleótido: Secuencia lineal de nucleótidos que se encuentran unidos por enlaces fosfodiéster.

Concentración letal media (CL₅₀): Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia que produce mortalidad, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un determinado tiempo.

Secuenciamiento de ADN: Es una técnica que te permite determinar el orden de los nucleótidos en el ADN.

Protoxina: Constituyente de una toxina que tiene mayor afinidad por la antitoxina correspondiente.

Toxina: Sustancia tóxica producida por un microorganismo.

Control biológico: Es un tipo de control donde se utiliza organismos vivos.

2.4 Formulación de la Hipótesis

2.4.1 Hipótesis General

El corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* se relacionará con la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

2.4.2 Hipótesis Especificas

La unión por medio de un enlace disulfuro por mutagénesis sitio dirigida que inmoviliza covalentemente la hélice α -1 y α -7 localizadas en el extremo N-terminal del dominio I de la

toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* se relacionará directamente con la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

La unión por medio de un enlace disulfuro por mutagénesis sitio dirigida que inmoviliza covalentemente la hélice α -2b y α -3 localizadas en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* se relacionará directamente con la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

Es necesario el corte proteolítico de la hélice α -1 y α -2a en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* se relacionará directamente con la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

La inserción de cisteína en la hélice α -1, α -2b, α -3 y α -7 por mutagénesis sitio dirigida en el extremo N-terminal del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* se relacionará directamente con la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

Capítulo III: METODOLOGÍA

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación básica-aplicada permite la obtención de nuevos conocimientos y comprensión de los fenómenos, así permitiendo generar nuevas aplicaciones inmediatas sobre una realidad circunstancial (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). El conocimiento del mecanismo molecular de la toxina Cry1Ab permitiría obtener mutantes que logren un mejor control de insectos plaga que dañan cultivos de importancia económica.

3.1.2 Nivel de investigación

El nivel de investigación explicativo establece relaciones causales entre las variables, pretende establecer las causas de los eventos que se estudian (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). Se trata de explicar si existe una relación causal entre el corte proteolítico y cambio conformacional en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

3.1.3 Diseño de investigación

El diseño de investigación de tipo experimental se utiliza cuando el investigador pretende establecer el posible efecto de la variable dependiente de una causa que se manipula la variable independiente (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). Debido a esto se manipulará la variable el corte proteolítico y cambio conformacional para ver un efecto en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

3.1.4 Enfoque de investigación

El enfoque mixto son la integración sistemática de los métodos cualitativos y cuantitativos en un solo estudio con el fin de obtener un conocimiento más completo (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). La parte cualitativa son los ensayos de oligomerización in-vitro en *Manduca sexta* y la parte cuantitativa cuando se realizan los bioensayos con *M. sexta*.

3.2 Población y Muestra

La población fue la toxina Cry1Ab, *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* SC110, cepas de *Bacillus thuringiensis* 407 que producen toxinas mutagenicas de Cry1Ab y larvas de *Manduca sexta*; brindados del cepario y criadero de insectos del Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM.

3.3 Operacionalización de variables e indicadores

“Estudio del corte proteolítico y cambio conformacional de la hélice α -1 y α -2 del dominio I de la toxina Cry1Ab de *Bacillus thuringiensis* en la oligomerización in-vitro en *Manduca sexta* (Gusano cornudo)”.

Tabla 1.

Variables, definición, dimensiones e indicadores.

Variables	Definición	Dimensiones	Indicadores
Corte proteolítico y el cambio conformacional (Variable independiente)	El corte proteolítico son escisiones que ocurren en la α -hélices del dominio I de la toxina Cry1Ab por acción de las proteasas del insecto.	Generación de mutantes	Secuenciamiento
	El cambio conformacional son modificaciones que presenta la toxina Cry en la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos y la cadena polipeptídica principal que suceden durante el mecanismo de acción, principalmente en las α -hélices del dominio I, como la elongación de la hélice α -3.	Obtención de toxinas Cry1Ab	Geles de acrilamida
Oligomerización in-vitro en <i>Manduca sexta</i> (Variable dependiente)	Es el proceso que involucra la asociación de varias subunidades de la toxina Cry1Ab para la formación de una estructura oligomérica formadora del poro lítico generando la muerte del insecto.	Análisis de la oligomerización	Quimioluminiscencia
		Fluorescencia	Medición de la intensidad de fluorescencia (RFU)

3.4 Técnicas e instrumento de recolección de datos

3.4.1 Técnicas a emplear

Las técnicas a emplear se obtuvieron del manual de protocolos del Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM, brindados por la Dra. Alejandra Bravo de la Parra y el Dr. Mario Soberón Chávez.

3.4.1.1 Diseños y síntesis de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos (elaboración propia) se utilizó el programa SnapGene Viewer 4.2.4 para diseñar los oligonucleótidos mutagénicos utilizando como templatado la secuencia del gen de la toxina Cry1Ab. Se mutagenizó los aminoácidos S39, D74, R93 y T239, sustituyéndolos por el codón TGC o TGT, los cuales codifican para el aminoácido cisteína. La síntesis de los oligonucleótidos se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

3.4.1.2 Generación de mutantes sencillas

Mutagenesis sitio dirigida por PCR

Se realizó la mutagénesis por la reacción cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 50 μ l que contendrá: 33.5 μ l de H₂O, 10 μ l de Buffer 5X HF (New England, BioLabs), 1.5 μ l de dNTPs 10 mM, 100-200 ng de plásmido templatado pHT315-Cry1Ab (Arantes y Lereclus, 1991), 20 pmol de oligonucleótido mutagénico y 1 μ l de DNA Polimerasa Phusion Recombinante. La reacción se puso en un termociclador con el siguiente programa: 1 ciclo a 98 °C por 3 minutos; 35 ciclos a 98 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 6 minutos; 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos.

Posteriormente se purificó el producto de la PCR con el Kit MinElute PCR Purification (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante y se realizó una reacción de digestión de ADN con 10 μ l de producto de PCR purificado, 1.2 μ l de Buffer Tango 10X (Thermo Scientific) y 1 μ l de enzima DpnI (10U/ μ l). La reacción se incubó por 2 horas a 37 °C y posteriormente se purificó con el Kit MinElute PCR Purification (Qiagen).

A una alícuota de 100 μ l con *Escherichia coli* DH5 α electrocompetentes se añadió 5 μ l de la reacción de digestión de ADN con DpnI y se puso en una celda de electroporación GenePulser de 0.2 cm (Bio-Rad), previamente enfriada a 4 °C. Se aplicó un pulso eléctrico de 2.5 V con 400 Ω de resistencia en un electroporador GenePulser (Bio-Rad).

Se añadió 900 µl del medio Luria-Bertani (LB) y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación de 600 rpm. Posteriormente se sembró 100 µl de bacterias en agar LB con ampicilina a 100 µg/µl y se incubó a 37 °C por 12 horas.

Se seleccionó al azar 3 colonias de *E. coli* DH5α de cada mutagénesis (Cry1Ab S39C, Cry1Ab R93C, Cry1Ab D74C y Cry1Ab T239C), se sembró en 5 ml de caldo LB con ampicilina y se incubó a 37 °C durante 12 horas. Se recuperó las bacterias por centrifugación a 13,000 rpm durante 1 minuto y la extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el kit Wizard® Minipreps (PROMEGA), siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, los plásmidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Scientific).

Se envió a secuenciar los plásmidos por el método de Sanger con el oligonucleótido FFTc (5' TCACGGATCCGGAGAAAGAATAGAAACTGG3') a la Unidad de Servicio de Secuenciamiento del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, se analizó las secuencias en el programa BioEdit y en el servidor Clustal Omega se detectó las mutaciones introducidas.

3.4.1.3 Generación de mutantes dobles

Se realizó mutagénesis sitio dirigida como se describió anteriormente, pero utilizando como plásmido templado una mutante sencilla de Cry1Ab. La mutante Cry1Ab S39C-T239C se obtuvo utilizando como templado la mutante Cry1Ab S39C e introduciendo la mutación T239C con el oligonucleótido mutagénico; la mutante Cry1Ab D74C-R93C se obtuvo utilizando como templado la mutante Cry1Ab D74C e introduciendo la mutación R93C con el oligonucleótido mutagénico.

Los plásmidos pHT315-Cry1Ab con las mutaciones deseadas se utilizaron para transformar por electroporación con *Escherichia coli* SCS110 siguiendo el protocolo de transformación descrito anteriormente y posteriormente se hizo una extracción del plásmido. Se obtuvo ADN plasmídico sin metilaciones, ya que la cepa *E. coli* SCS110 no tiene las metilasas Dcm y Dam.

Se realizó un pre-inóculo de la cepa acristalifera *Bacillus thuringiensis* 407 en agar LB por estrías confluentes e incubó a 30 °C por 4 horas o hasta que se observó el crecimiento de la cepa. Se inoculó en 50 ml de medio BHIG una asada de la cepa e incubó a 30 °C por 2 horas o hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.5. Posteriormente se recuperó las células centrifugando por

5 minutos a 5,000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió las células suavemente en 20 ml de solución EB (Sacarosa 0.625 M y MgCl₂ 1 mM), se recuperó las células centrifugando a 5,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió las células en 1 ml de solución EB.

Para la transformación se mezcló 200 µl de células de *B. thuringiensis* 407 electrocompetentes con 5 µg de ADN plasmídico no metilado en celdas de electroporación de 0.4 mm (BioRad), se dejó reposar durante 10 minutos a 4 °C, se dio un pulso eléctrico de 2.5 V con una resistencia de 1000 Ω y se dejó reposar por 10 minutos. Se agregó 800 µl de medio de cultivo BHIG y se incubó a 30 °C por 1 hora con agitación de 600 rpm. Finalmente se sembró 200 µl en agar LB con eritromicina a 10 µg/ml y se incubó a 30°C por 12 horas.

3.4.1.4 Obtención de toxinas Cry1Ab

Producción, solubilización y activación

Se realizó un pre-inóculo de las cepas de *Bacillus thuringiensis* 407 transformadas en agar LB con eritromicina a 10 µg/ml por 12 horas. A partir de este pre-inoculo, se sembró en el medio de esporulación HCT con eritromicina a 10 µg/ml, se incubó a 30 °C por 48 a 72 horas para que las bacterias se diferencien a esporas. Se recuperó la biomasa, se realizó 3 lavados con 25 ml de Buffer de lavado (NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) y 3 lavados con 30 ml de H₂O/PMSF 1 mM. Finalmente, se resuspendió la biomasa en 5 ml de H₂O con PMSF 1mM. Se realizó un SDS-PAGE para analizar la integridad de las toxinas producidas. Las mutantes que no produjeron espora-cristal en medio HCT se sembraron en otros medios de esporulación como EMBRAPA, agar LB ½, medio SP y caldo LB ½,

Los cristales de las toxinas fueron solubilizados en una solución Bicar (Na₂CO₃/NaHCO₃ 100 mM, β-mercaptoetanol 0.02%, pH 10.5), se incubó a 37°C por 1 hora a 600 rpm. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se neutralizó el pH añadiendo Tris-HCL 1 M, pH 8.0 en una proporción 1:5 (v/v). Se observó las protoxinas en SDS-PAGE y se cuantificó la proteína por espectrofotometría con la técnica Bradford (Bio-Rad) utilizando una curva estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA). Posteriormente se adicionó tripsina en proporción de 1:20 (p/p) para activar las protoxinas y se incubó a 37°C por 1 hora a 600 rpm. Finalmente se adicionó PMSF 1 mM para inactivar la proteasa y se analizó las proteínas en SDS-PAGE. Los cristales que no solubilizaron con la solución Bicar se reemplazó por NaOH (25, 50 y 100 mM) y las que no pudieron ser activadas con tripsina 1:20 p/p se les aumentó la concentración (1:50 y 1:100 p/p).

Purificación de las toxinas por intercambio iónico

Se equilibró la columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP Sepharose® (GE Healthcare Life Science) con 5 ml de Buffer A ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, NaCl 50 mM, pH 8.5). Se pasó por la columna 1 ml de la toxina Cry1Ab activada y se lavó con 5 ml de Buffer A. Posteriormente se eluyó la toxina con 5 ml de Buffer B ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, NaCl 600 mM, pH 8.5) y se colectó 4 fracciones de 1 ml, las cuales se analizó en SDS-PAGE.

3.4.1.5 Preparación y cuantificación de proteínas de BBVM de *Manduca sexta*

Se preparó las vesículas de membrana de la microvellosidad apical (BBVM) a partir de intestinos de larvas del tercer estadio de *M. sexta*. Se disectó el intestino de las larvas con instrumentos de disección entomológicos y se eliminó los 3 segmentos del extremo anterior (cabeza) y dos del posterior (cola). Se realizó un corte transversal con tijeras y un corte longitudinal en la región media, se separó el intestino medio ayudándose con una pinza y se vació el contenido intestinal con ayuda de las pinzas.

Se depositó el tejido en Buffer I (Manitol 300 mM, y Tris-HCl 17mM, pH a 7.4) frío. Ambos, tejido y Buffer I se depositaron en un homogeneizador de vidrio estéril inmerso en hielo y se diluyó 1/10 (p/v). Se colocó el émbolo de teflón del homogeneizador estéril y se dio 9 golpes a 2,250 rpm en el homogeneizador (WiseStir), se agregó 1 volumen de una solución de MgCl_2 24 mM y se dejó reposar en hielo 15 minutos. Se centrifugó a 4,500 rpm por 15 minutos a 4 °C en un rotor Beckman JA-20. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 16,000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se resuspendió el precipitado en ½ volumen de Buffer I y ½ de Cl_2Mg 24 mM, se centrifugó igual a los dos pasos anteriores. Se resuspendió el precipitado en 1 ml de Buffer I diluido con agua destilada estéril 1:1 y se dio 3 golpes con el homogeneizador a 2,250 rpm. Se realizaron alícuotas y se almacenó a -70 °C.

Se cuantificó la proteína por el método de Lowry el cual consiste en una muestra de BBVM con el Kit DC™ Protein Assay (Bio-Rad), se mezcló la solución Reagent A (1 ml) con Reagent S (20 µl) para obtener la Solución I. Se adicionó 10 µl de las muestras en 125 µl de la Solución I, se agitó e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente se agregó la solución Reagent B (1 ml), se agitó e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y se leyó la absorbancia a 750 nm. Se utilizó una curva estándar de BSA como referencia para determinar la concentración de proteína.

3.4.1.6 Expresión, purificación y cuantificación del fragmento de caderina CR7-CR12

Se realizó un cultivo durante 12 horas de la cepa *Escherichia coli* ER2566 que contiene el plásmido de expresión pET22b/CR7-12 en medio 2XTY suplementado con ampicilina 100 µg/ml y glucosa 0.1 %. Posteriormente se inoculó 1 ml del pre-inóculo a 50 ml de 2XTY/Ampicilina/Glucosa y se incubó a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5 a 0.6. Se adicionó IPTG 1 mM y se incubó a 30°C por 5 horas a 200 rpm. Se recuperó la biomasa por centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos y se resuspendió en 5ml de Urea 8 M (3.45 g de NaH₂PO₄, 0.3 g de Tris-base, 120.125 g de urea para 250 ml) a pH 8.0. Las células se sonicaron con un Ultrasonificador Sonics-CV 188, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Para la purificación del fragmento de caderina CR7-CR12 se equilibró una columna de Níquel-Agarosa (Quiagen) con 10 ml de PBS/Imidazol 20 mM, se pasó los 5 ml del lisado celular y se lavó con 10 ml de PBS/Imidazol 35 mM. El fragmento CR7-CR12, se eluyó en 4 fracciones de 1 ml con 2 ml de PBS/Imidazol 250 mM y 2 ml de PBS/Imidazol 500 mM. Las fracciones se observaron en SDS-PAGE y se cuantificó la fracción con mejor integridad con la técnica Bradford.

3.4.1.7 Bioensayos con *Manduca sexta*

Se realizó los tratamientos con las toxinas de Cry1Ab y mutantes con las concentraciones de 0.3, 0.6, 1.25, 2.5 y 5 ng/cm² frente a larvas del primer estadio de *M. sexta*, se utilizó 24 larvas por concentración de toxinas y un control negativo (sin toxina). Las placas se incubaron a 28 °C con un 65% ± 5% de humedad relativa y un fotoperiodo de claro a oscuro de 16:8 horas. La mortalidad se registró después de 7 días y la concentración letal media (CL₅₀) se estimó utilizando el programa LdP Line, las toxinas mutadas que no se pudo estimar la CL₅₀ se les realizó los bioensayos con estas concentraciones (0.6, 1.25, 2.5, 5, 10,125, 250, 500 y 1000 ng/cm²).

3.4.1.8 Análisis de la oligomerización

Las estructuras oligoméricas de las toxinas Cry1Ab, Cry1Ab S39C-T239C y Cry1Ab D74-R93C, se obtuvieron incubando 2 µg de toxina o protoxina purificada por intercambio iónico con el fragmento recombinante de caderina CR7-CR12 en una proporción 1:4 (p/p) o 10 µg de BBMV en tampón Bicar (NaH₂CO₃/Na₂CO₃ 100 mM a pH 10.5) durante 1 hora a 37°C en un volumen final de 50 µl en presencia o ausencia de

0,5 µg de tripsina, sin o con agentes reductores (β -Mercaptoetanol y ditioneitol). Finalmente se adicionó PMSF 1 mM para detener la reacción.

3.4.1.9 Ensayos de Western Blot

Se añadió 10 µl de tampón Laemmli 4X (alternativamente se utilizó el mismo tampón sin agente reductor) a la reacción de oligomerización y se incubó por 5 minutos a 50°C. Posteriormente las muestras se separaron por SDS-PAGE en un gel al 8% y las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) durante 45 min a 350 mA. La membrana se bloqueó con leche descremada 2% en tampón PBS pH 7.4 durante 1 hora, seguido de una incubación de 1 h con anticuerpo policlonal de conejo anti-Cry1Ab (1: 25,000), y luego 1 h con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG HRP (1: 25,000) (Santa Cruz, Biotechnology). Finalmente se adicionó el sustrato quimioluminiscente Western Blotting Luminol Reagente (ImmunoCruz) siguiendo las instrucciones del fabricante y se visualizó en el fotodocumentador Amersham Imager 600 (GE, Healthcare LifeScience).

3.4.1.10 Marcaje de la toxina Cry1Ab S39C con fluoróforos extrínsecos

La toxina Cry1Ab S39C, previamente se purificó por intercambio iónico, se incubó con el fluoróforo Alexa Fluor 546 succinimidyl ester que marco lisina (Thermo Scientific) en una proporción 1:20 (p/p) y se incubó por 1 hora a 25°C en tampón PBS a pH 7.4. Posteriormente se pasó por una resina de Sephadex 25, para eliminar el excedente de fluoróforo no acoplado a la toxina. Se realizó un segundo marcaje con el fluoróforo Alexa Fluor 488 maleimida que marco cisteína (Thermo Scientific) en una proporción 1:20 (p/p) durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS/Urea 2 M. Finalmente la muestra se dializó en 1 L de PBS con un cassette Slide-A-Lyzer 10K (Thermo Scientific) para eliminar la urea y el fluoróforo no acoplado a la toxina. Se realizó un SDS-PAGE y el gel se visualizó en el fotodocumentador Amersham Imager 600 a una excitación de 488 y 546 nm para evaluar la toxina acoplada covalentemente a los fluoróforos.

Se evaluó el estado estructural de la toxina Cry1Ab S39C después de ser marcada con Alexa Fluor 546 succinimidyl ester y Alexa Fluor 488 maleimida y desnaturalizada con urea, se realizó lecturas de triptofano en un lector de microplacas Infinite® M1000 Pro (Tecan) dando valores de excitación 285 nm y de emisión de 300-400 nm, comparando dichos valores con la toxina Cry1Ab. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 6.

Se realizó un ensayo de oligomerización como se describió anteriormente utilizando la toxina Cry1Ab S39C acoplada a los fluoróforos Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 546.

3.4.1.11 Ensayos de transferencia de energía resonante entre fluoróforos (FRET)

Para evaluar el transferencia de energía (FRET) la reacción de oligomerización se transfirió a una microplaca de 96 pozos y se hizo un registro de los espectros de emisión de fluorescencia en un rango de 500-620 nm en un lector de microplacas Infinite® M1000 Pro (Tecan). La longitud de onda de excitación de los fluoróforos Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 546 fueron de 488 nm y 546 nm, respectivamente. Los datos fueron analizados con el software GraphPad Prism 6.

A continuación, se presenta el diagrama de flujo del proyecto de tesis (Figura 10):

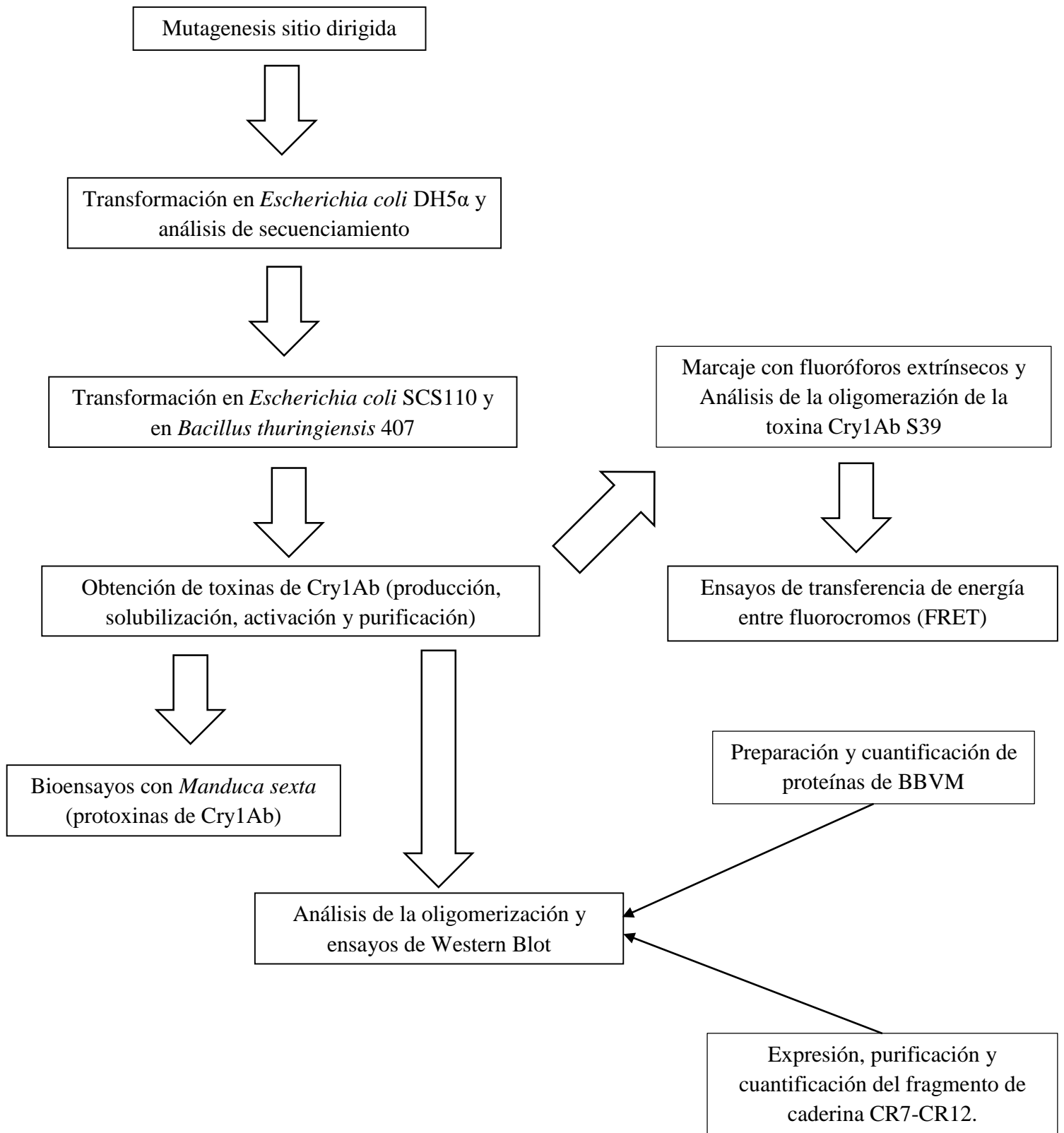


Figura 10: Flujograma del proyecto de tesis (elaboración propia).

3.4.2 Descripción de los instrumentos

Se describe a continuación los instrumentos divididos por fases que se utilizó en el proyecto de tesis.

Primera fase: generación de mutantes

- SnapGene Viewer 4.2.4: es un software que permite simular cortes con enzimas de restricción, PCR convencional, extensión de superposición PCR, clonación, alineación de secuencias de ADN, diseñar oligonucleótidos y visualizar secuencias de ADN (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>).
- Termociclador Applied Biosystems-Thermal Cycler 2720: es un equipo usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.
- Electroporador BIO-RAD: es un equipo que es utilizado en el proceso de electroporación provocando un aumento de la conductividad eléctrica y de la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico, así permitiendo introducir principalmente ADN plasmídico.
- Mini Spin Eppendorf: es un equipo que sirve para separar soluciones acuosas de diferentes densidades en recipientes de reacción homologados.
- Cámara de electroforesis horizontal Hoefer-HE33: es un equipo que genera la migración de las moléculas a través de una matriz y que con un campo eléctrico genera la migración de estas, separando por tamaño o peso molecular, se trabaja principalmente con ADN, en geles de agarosa.
- Transluminador Amersham Imager 600: es un equipo que posee sensores sensibles y robustos para imágenes digitales de alta resolución de muestras de proteínas y ADN en geles.
- Fuente de poder GE Healthcare- EPS301: es una fuente de alimentación que cubre una amplia gama de aplicaciones de electroforesis y transferencia.
- Espectrofotómetro Thermo Scientific- NanoDrop 2000: es un equipo de espectro completo utilizados para cuantificar y evaluar la pureza del ADN, ARN, proteínas y más, con la menor cantidad de muestra de 0.5µl.
- Incubadora Biocientífica-ECF41: es un equipo que permite obtener la temperatura que se programe para el crecimiento de microorganismos.

Segunda fase: obtención de toxinas Cry1Ab y bioensayos con *M. sexta*

- Balanza analítica Ohaus-Pioneer PA224C: es un equipo que te permite medir pequeñas masas (0,0001 g o 0,1 mg).
- Columna de intercambio aniónico GE Healthcare-HiTrap Q HP Sepharose: es un equipo que permite la separación de iones y moléculas polares basado en las propiedades de carga de las moléculas, se pueden usarse para proteínas grandes y nucleótidos y aminoácidos pequeños.
- Espectrofotómetro Beckman Coulter-DU650: es un equipo que permite realizar lectura en espectro UV-visible generalmente es utilizada en la valoración cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos, ambos absorben la luz.
- Cámara de electroforesis vertical Pharmacie Biotech-SE280: es un equipo que genera la migración de las moléculas a través de una matriz y que gracias a un campo eléctrico estas migran por el peso molecular, se trabaja principalmente con proteína, en geles de acrilamida.
- LdP Line: es un software libre que se utiliza para relacionar estímulo y respuesta en estudios toxicológicos y biológicos (<http://www.ehabsoft.com/ldpline/>).
- Formato de guía de observación 1: ficha que permite recolectar los datos de mortalidad de *Manduca sexta* (Anexo).

Tercera fase: Obtención de BBVM y caderina CR7-CR12 de *Manduca sexta*

- Centrifugadora Eppendorf-5804R: es un equipo que pone en rotación una muestra por fuerza centrífuga acelerando la decantación o la sedimentación de sus componentes o fases (generalmente una sólida y una líquida), según su densidad.
- Homogeneizador WiseStir-HS30E: es un equipo utilizado para la homogeneización de distintos tipos de materiales, permiten romper las células, con el menor daño a la membrana plasmática, siendo así esencial antes del análisis de ácidos nucleicos y proteínas, o del estudio de células, metabolismo, agentes patógenos y otros muchos objetivos.
- Incubadora con agitación orbital Excella-E25: es un equipo que permite agitación e incubación confiables y de alto rendimiento en cultivos celulares, estudios de solubilidad, suspensiones bacterianas y procedimientos de extracción.

- Ultrasonicador Sonics-CV 188: es un equipo que permite sonicar utilizando la energía del ultrasonido para agitar las partículas de una muestra, se utilizan a menudo para romper las membranas celulares y conseguir la liberación del contenido celular, debido a la intensa agitación producida.

Cuarta fase: análisis de la oligomerización y transferencia de energía entre fluorocromos (FRET)

- Tanque de unidad de transferencia Hoefer-TE22: permite que se pueda transferir las proteínas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF).
- Lector de microplacas Tecan-Infinite M1000PRO: es un equipo que permite la detección de absorbancia, fluorescencia top, fluorescencia bottom, polarización de fluorescencia y luminiscencia, con 4 monocromadores para un amplio espectro de lectura, presentando una alta sensibilidad y exactitud.
- GraphPad Prism 6: es un software que te permite la aplicación en el procesamiento de datos y gráficas de todo tipo, presentando una extensa biblioteca de análisis de común a altamente específico: regresión no lineal, pruebas t, comparaciones no paramétricas, ANOVA de una, dos y tres vías, análisis de tablas de contingencia, análisis de regresión, análisis de supervivencia y mucho más (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).
- Formato de guía de observación 2: ficha que permite recolectar los datos de presencia o ausencia de la banda del oligómero en los análisis de oligomerización in-vitro en *Manduca sexta* (Anexo).

3.5 Técnicas para el procesamiento de la información

El análisis de los datos de los bioensayos con *Manduca sexta*, se realizó con el programa LdP Line que elaboró la matriz de varianza-covarianza y desarrollo la prueba de bondad de ajuste de Chi-cuadrado para dar valores finales de concentración letal media (CL₅₀) con un nivel de confianza del 95%.

Capítulo IV: RESULTADOS

La toxina Cry1Ab después de ser activada por proteasas, contiene tres dominios estructurales que carecen de cisteínas. En nuestro diseño experimental generamos dobles mutantes con cisteínas para establecer enlaces covalentes por medio de puentes disulfuro entre las hélices α -1 con α -7 del dominio I (Cry1Ab S39C-T239C) para impedir el desprendimiento de la hélice alfa-1 durante el procesamiento proteolítico en la oligomerización; y la mutante Cry1Ab D74C-R93C, la cual establece un puente disulfuro entre las hélices α -2b y α -3, con el propósito de impedir el cambio conformacional de la hélice α -2b en la oligomerización. Por otra parte, también generamos la mutación S39C en la toxina Cry1Ab para analizar el desprendimiento de la hélice α -1 por medio de FRET.

4.1 Diseño y síntesis de oligonucleótidos

Para generar las sustituciones por cisteínas se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos con ayuda del programa SnapGene Viewer. Cada oligonucleótido contiene el codón TGC o TGT, el cual codifica para una cisteína, flanqueado por 13-15 nucleótidos que hibridan en las regiones adyacentes al sitio que se desea mutagenizar y procurando una temperatura de fusión (T_m) de 55°C (Tabla 2).

Tabla 2.

Secuencia de oligonucleótidos que se diseñaron con el programa SnapGene Viewer, su localización, cambio y su secuencia respectiva.

Oligonucleótidos	Localizacion	Cambio	Secuencia (3' \longrightarrow 5')
Cry1Ab S39C	Hélice α -1	Serina por cisteína	CC CCA ATC GAT ATT TGC TTG TCG CTA ACG C
Cry 1Ab R93C	Hélice α -2b	Arginina por cisteína	A GAA GAA TTC GCT TGC AAC CAA GCC ATT TCT
Cry 1Ab D74C	Hélice α -3	Ácido aspártico por cisteína	GGT CCC TCT CAA TGG TGC GCA TTC TTG TAC A
Cry 1Ab T239C	Hélice α -7	Treonina por cisteína	GA GAA TTA ACA CTA TGT GTA TTA GAT ATC G

4.2 Generación de mutantes simples y dobles de la toxina Cry1Ab

La estrategia utilizada para analizar los eventos moleculares que participan en la oligomerización fue producir mutantes dobles a partir de mutantes simples de la toxina Cry1Ab, sustituyendo residuos específicos localizados en el dominio I por cisteínas que potencialmente puedan formar puentes disulfuro que impidan la posible separación de la hélice α -1 y el cambio conformacional de la hélice α -2b que podrían ocurrir en la oligomerización de la toxina Cry1Ab. Para estudiar el desprendimiento de la hélice α -1 se construyó y se caracterizó la mutante doble Cry1Ab S39C-T239C (Figura 11A), la cual forma un puente disulfuro entre las hélices α -1 y α -7 y para el cambio conformacional de la hélice α -2b se diseñó la mutante Cry1Ab D74C-R93C (Figura 11B), la cual forma un puente disulfuro entre las hélices α -2b y α -3. La mutagénesis se confirmó analizando las secuencias de los plásmidos que contienen el gen de la toxina Cry1Ab y que fueron sometidos a mutagénesis sitio dirigida. Con el programa BioEdit se identificaron los codones que codifican para cisteína, que son TGT y TGC (Figura 12). Con esto confirmamos la correcta introducción de codones que codifican para cisteínas en las mutantes simples y dobles de la toxina Cry1Ab.

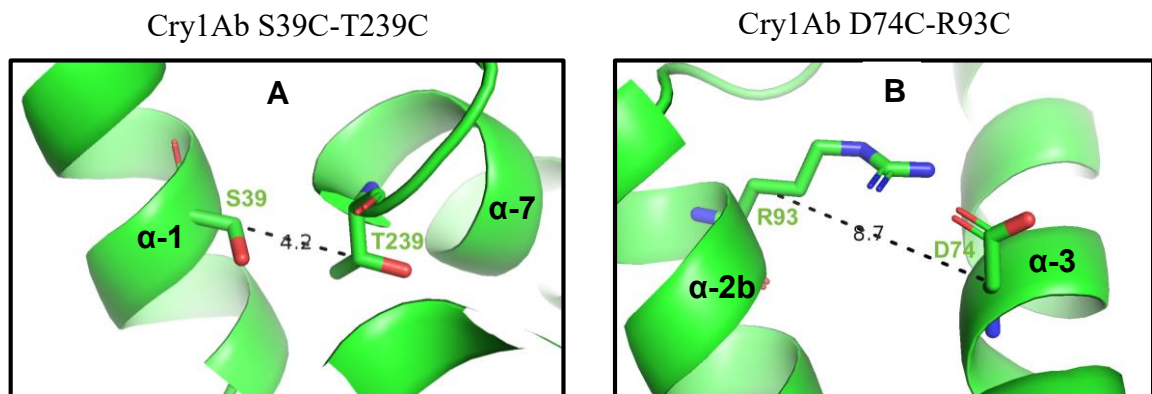
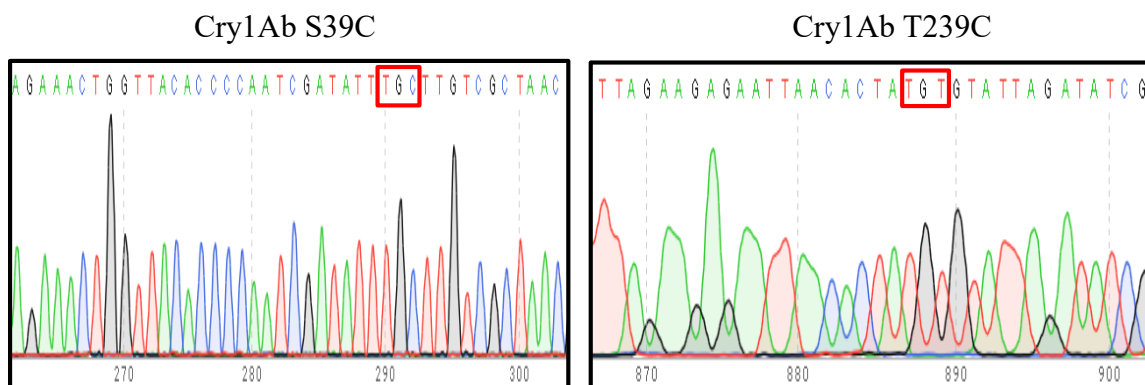


Figura 11. Se observa la unión por enlace disulfuro de las hélices. **A.** α -1 y α -7 (Cry1Ab S39C-T239C) y **B.** α -2b y α -3 (Cry1A D74C-R93C).



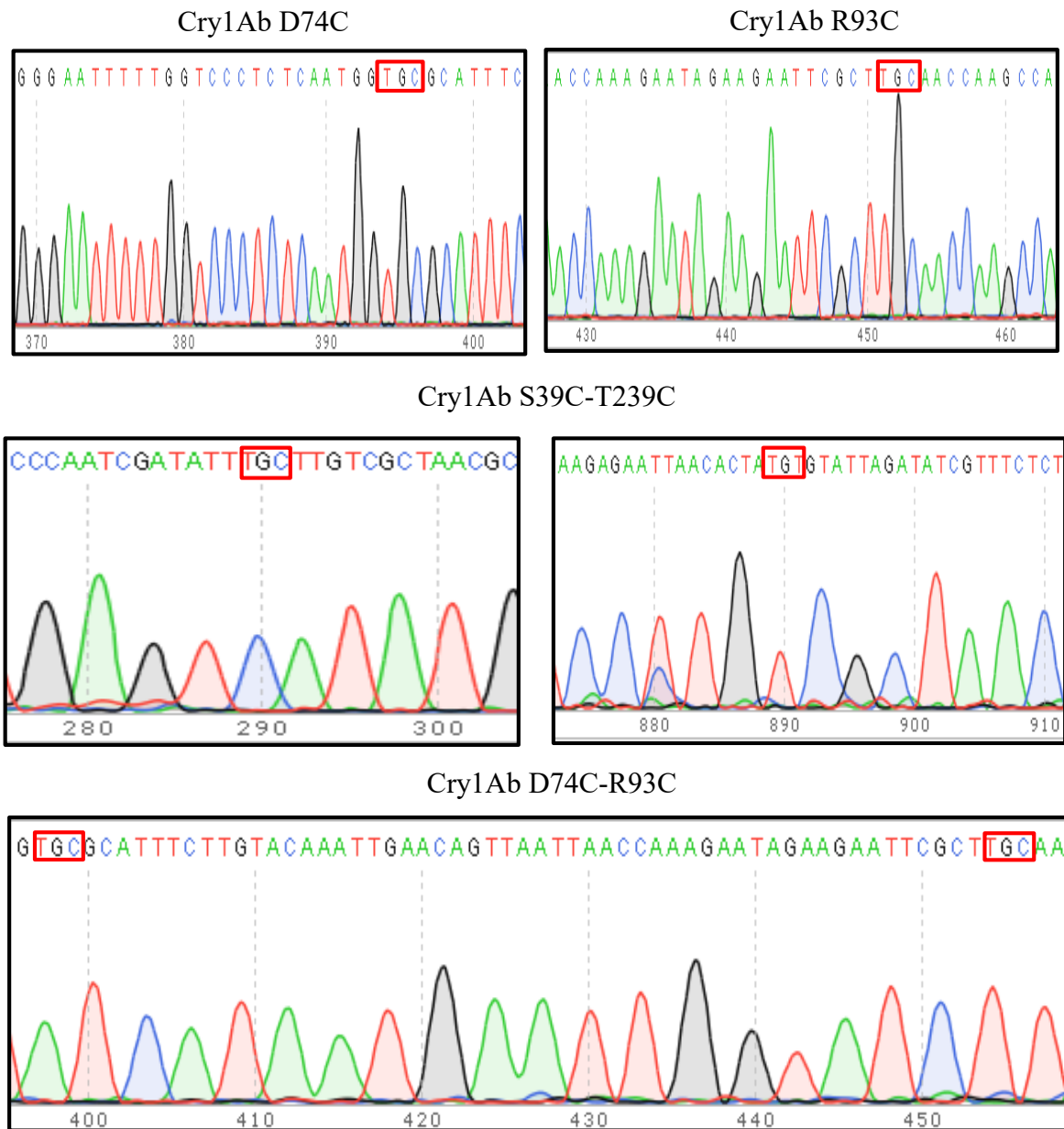


Figura 12. Cromatograma de secuencias de las mutantes Cry1Ab S39C, Cry1Ab T239C, Cry1Ab D74C, Cry1Ab R93C, Cry1Ab S39C-T239C y Cry1Ab D74C-R93C.

4.3 Obtención de toxinas Cry1Ab

Las toxinas de tipo silvestre y mutantes de Cry1Ab se expresaron en cepas transformantes *Bacillus thuringiensis* 407 acristalifera. Los cristales paraesporales se produjeron en medio de esporulación HCT y posteriormente se realizó un SDS-PAGE en donde observamos una banda que corresponde a la protoxina, con un peso molecular de 130 kDa en la Cry1Ab silvestre, Cry1Ab S39C y Cry1Ab S39C-T239C. Las mutaciones T239C, D74C, R93C y D74C-R93C afectaron drásticamente la producción de la toxina (Figura 13A). Se probaron otros medios de esporulación como EMBRAPA, agar LB ½, medio SP y caldo LB ½, para obtener cristales de las mutantes que no fue posible producirlas en

medio HCT. Esta estrategia nos permitió obtener la mutante Cry1Ab D74C-R93C en caldo LB ½ (Figura 13B y 14A). Una vez obtenida la protoxina, estos se solubilizaron en amortiguador alcalino de bicarbonatos y se activaron mediante tratamiento con tripsina en proporción 1:20 p/p. Las toxinas activadas fueron analizadas en SDS-PAGE y dieron como resultado proteínas de 60 kDa en Cry1Ab, Cry1Ab S39C y Cry1Ab S39C-T239C (Figura 14B). Debido a que no fue posible obtener los cristales de Cry1Ab D74C-R93C utilizando el procedimiento de rutina, se decidió realizar una solubilización con NaOH a 25, 50 y 100 mM (Figura 15B) y luego se trató con tripsina en proporciones 1:20, 1:50 y 1:100 p/p (Figura 15C). Utilizando estas condiciones se logró solubilizar parcialmente los cristales con NaOH 25 mM, sin embargo, la protoxina no resistió el tratamiento con tripsina.

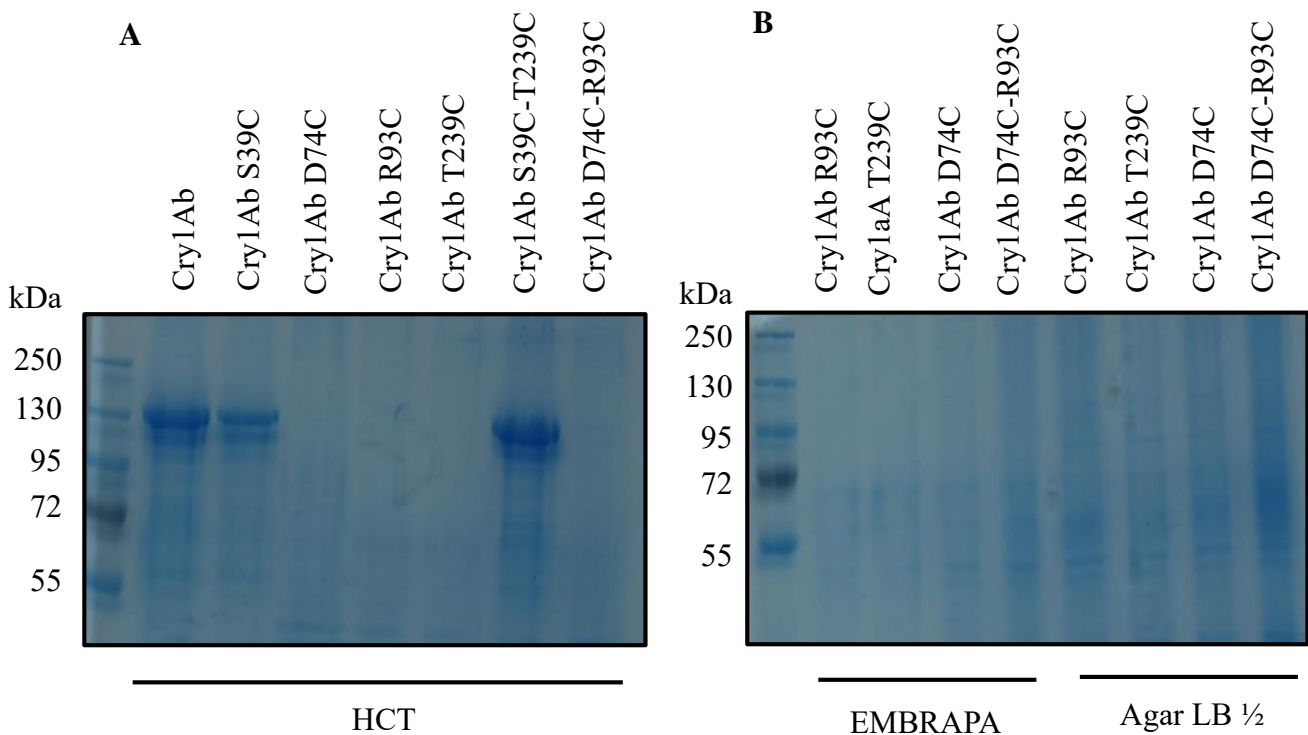


Figura 13. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de diferentes mutantes Cry1Ab en células *Bacillus thuringiensis* 407. **A.** las protoxinas Cry1Ab y mutantes en el medio HCT. **B.** protoxinas de mutantes de Cry1Ab en el medio EMBRAPA y Agar LB 1/2.

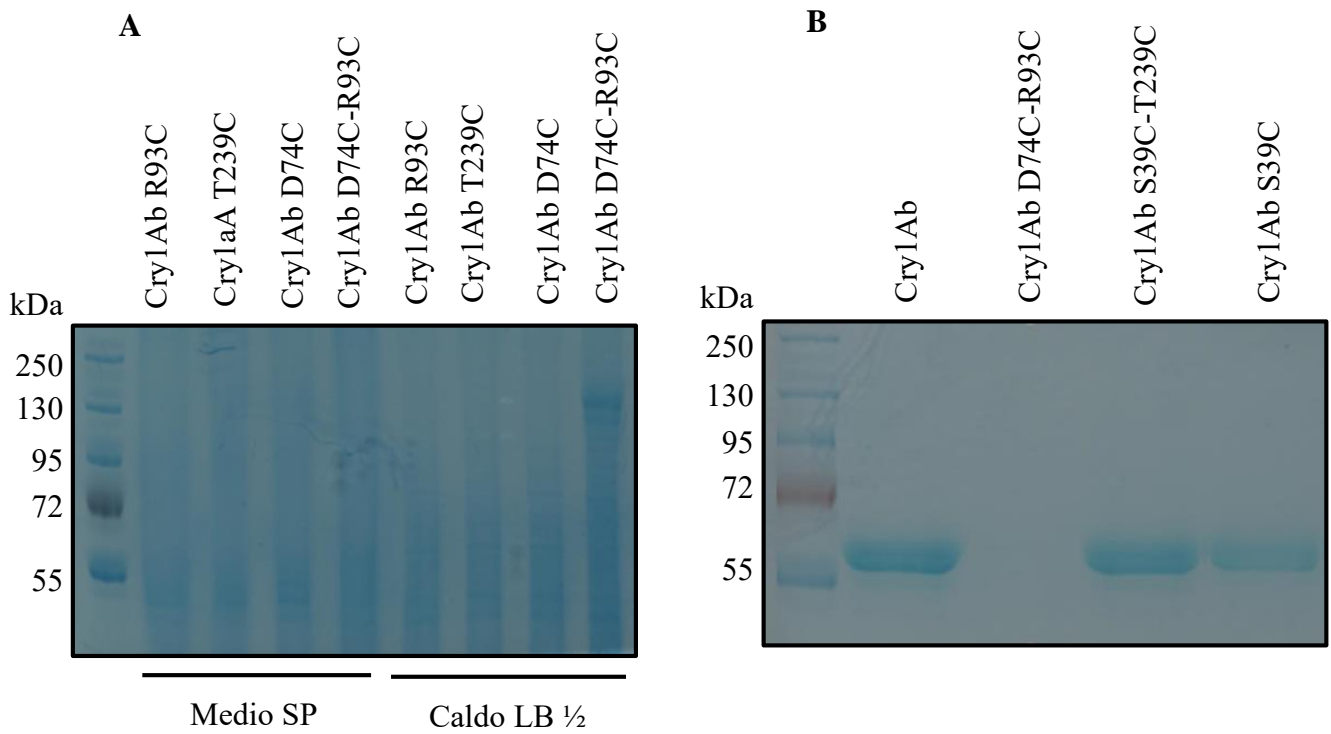


Figura 14. Análisis de la expresión en SDS-PAGE **A.** diferentes mutantes Cry1Ab en células *Bacillus thuringiensis* 407 en el Medio SP y Caldo LB ½. **B.** toxinas activadas de Cry1Ab y de diferentes mutantes.

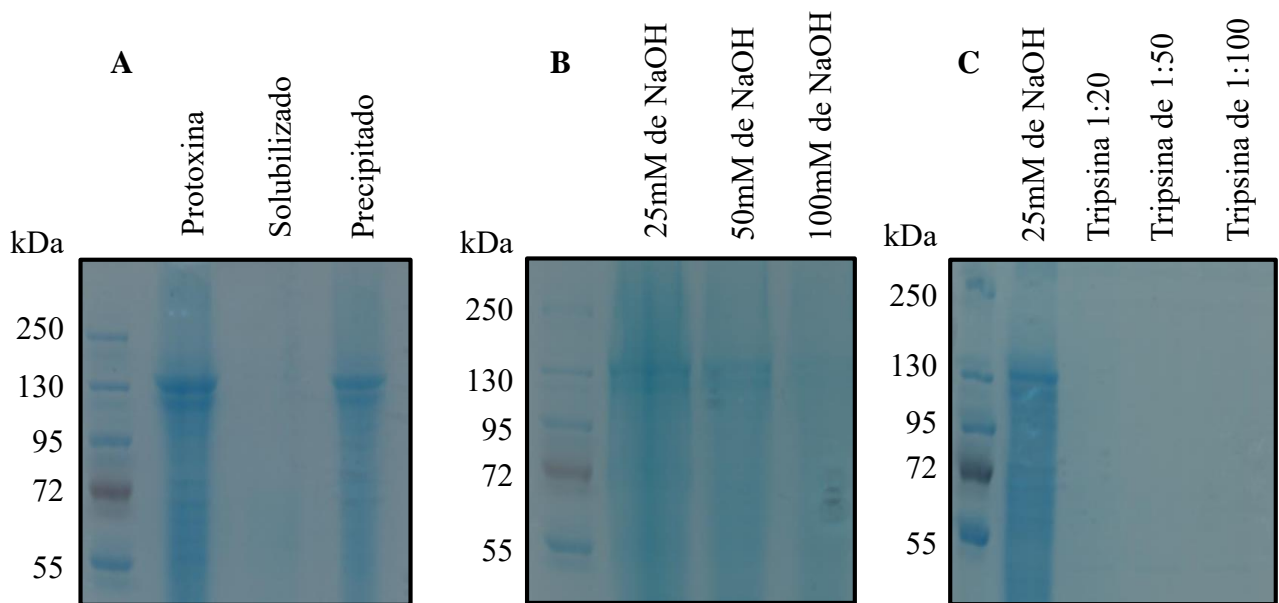


Figura 15. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de la mutante Cry1Ab D74C-R93C. **A.** prototoxina, solubilizado y precipitado en amortiguador alcalino de bicarbonatos. **B.** solubilización a diferentes concentraciones de NaOH. **C.** solubilizado y activación a diferentes concentraciones de tripsina.

La cuantificación de los cristales producidos en *Bacillus thuringiensis* 407 revelaron que las mutantes Cry1Ab S39C y Cry1Ab S39C-T239C tuvieron un rendimiento de producción comparable con la toxina Cry1Ab silvestre. La mutante D74C-R93C, aunque fue posible producirla en caldo LB ½, el rendimiento de producción fue muy bajo (Tabla 3), es necesario conocer las concentraciones para los bioensayos y el análisis de oligomerización.

Tabla 3.

Cuantificación de la toxina Cry1Ab y mutantes con la técnica Bradford.

Toxina	Cristales (µg/µl)	Activada y purificada (µg/µl)
Cry1Ab	1.43	0.41
Cry1Ab S39C	1.9	0.41
Cry1Ab S39C-T239C	1.64	0.29
Cry1Ab D74C-R93C	0.08	-----

4.4 Preparación y cuantificación de proteínas de BBMV de *Manduca sexta*

Se prepararon vesículas de membrana de la microvellosidad apical (BBMV) a partir de intestinos de larvas del tercer estadio de *M. sexta* y se cuantificó la proteína por el método de Lowry obteniendo una concentración de 4.6 µg/µl, estas BBMV fueron utilizadas para el análisis de oligomerización.

4.5 Expresión, purificación y cuantificación del fragmento de caderina CR7-CR12

La expresión se realizó en la cepa de *Escherichia coli* ER2566 que contiene el plásmido de expresión pET22b/CR7-12. El CR7-CR12 es un fragmento del receptor caderina de *M. sexta* que contiene el sitio de unión para las toxinas Cry1A's y que corresponde a los dominios extracelulares 7 al 12 con un peso molecular de 80 kDa. La purificación de este fragmento recombinante se realizó por afinidad a columnas de Níquel-Agarosa y las fracciones de elusión obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 16). En la cuantificación de proteína de la fracción 1 (F₁) se obtuvo una concentración de 0.36 µg/µl y ésta fue utilizada en el análisis de oligomerización.

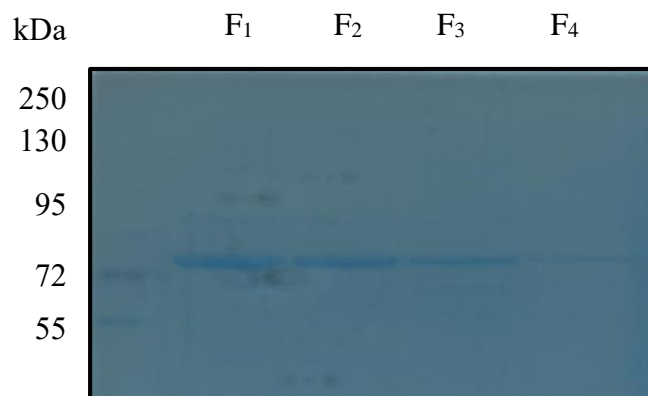


Figura 16. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de fragmento de caderina de CR7-CR12 en diferentes fracciones (F₁, F₂, F₃ y F₄).

4.6 Bioensayos con *Manduca sexta*

Para determinar la actividad insecticida de las toxinas mutantes se realizaron bioensayos con larvas del primer estadio de *M. sexta*, las cuales son sensibles a la toxina silvestre. Se utilizaron una serie de concentraciones de toxina contaminando la superficie de la dieta de los insectos y después de 7 días se determinaron los valores de concentración letal media (CL₅₀) con el programa Ldp Line con un nivel de confianza del 95% (Tabla 4).

Tabla 4.

Valores de CL₅₀ en bioensayos con larvas de *M. sexta* con toxina silvestre y mutantes.

Toxina	CL ₅₀ (L _{min} -L _{max}) ^a
Cry1Ab	1.81 (1.34-2.57)
Cry1Ab S39C	0.93 (0.66-1.26)
Cry1Ab S39C-T239C	0.86 (0.65-1.12)
Cry1Ab D74C-R93C	17.53 (14.72-21.15)

^a Valor de CL₅₀ en ng toxina /cm² dieta.

Los valores CL₅₀ de las mutantes S39C y S39C-T239C mostraron que estas toxinas son más tóxicas que la toxina Cry1Ab silvestre. La toxina Cry1Ab D74C-R93C mostró una CL₅₀ de 17.53 ng/cm², lo que significa una reducción de su potencia de 10 veces, este efecto probablemente sea porque los cristales son poco solubles y la protoxina es sensible a degradación proteolítica.

4.7 Análisis de oligomerización

Para determinar la oligomerización en condiciones in vitro de las mutantes Cry1Ab S39C-T239C y Cry1Ab D74C-R93C, la toxina activada y protoxina fueron purificadas por

intercambio iónico respectivamente y se indujo la oligomerización en presencia de BBMV (Figura 17A) o el fragmento recombinante de caderina CR7-CR12 (Figura 17B), en presencia o ausencia de agentes reductores (β -Mercaptoetanol o ditioneitol). Posteriormente, los oligómeros fueron visualizados por Western blot y se observaron complejos proteicos de 180-200 kDa detectados con un anticuerpo policlonal anti-Cry1Ab. Estos complejos de alto peso molecular corresponden al oligómero de la toxina Cry1Ab.

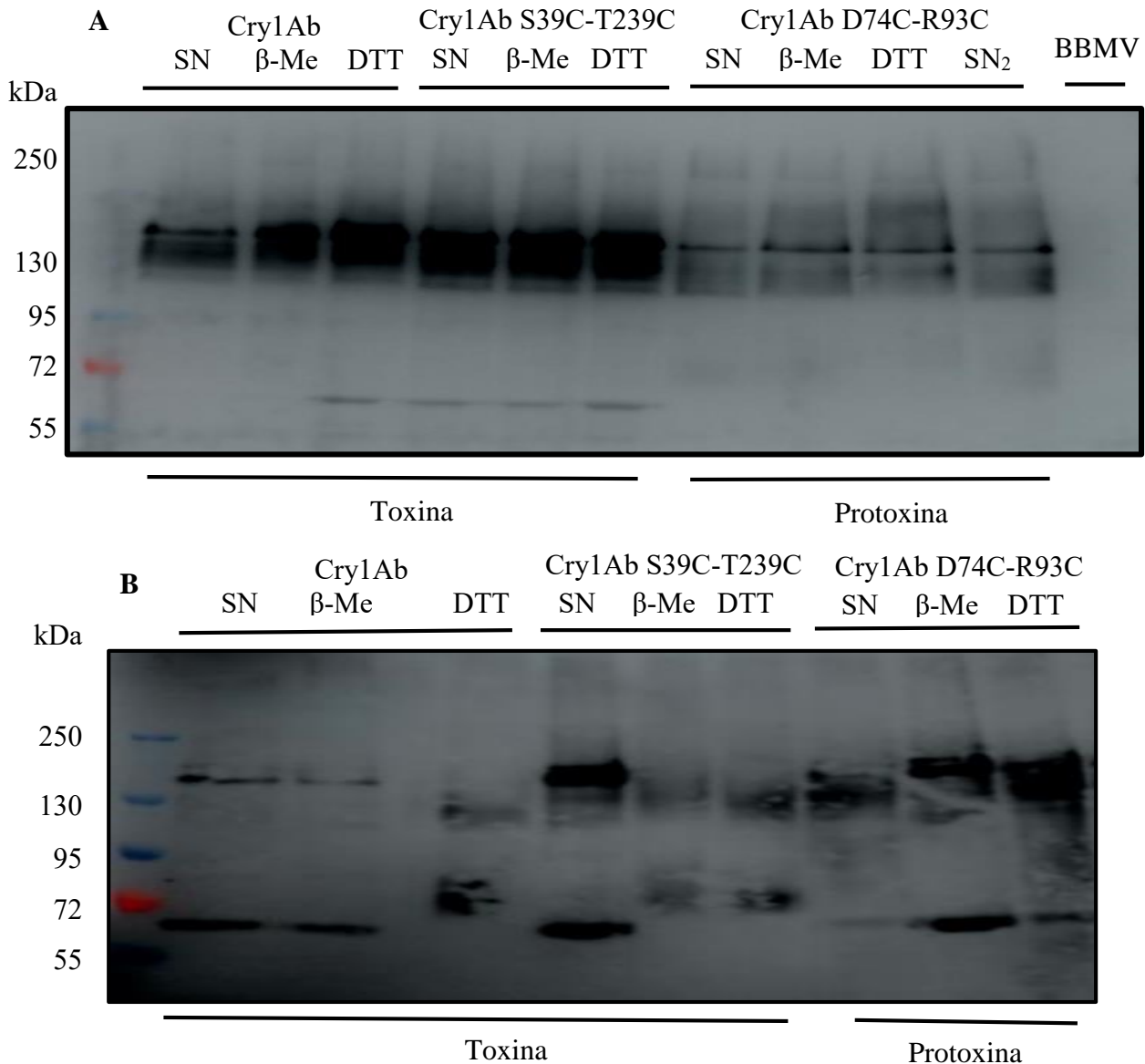


Figura 17. Análisis de oligomerización con Cry1Ab (toxina activada), Cry1Ab S39C-T239C (toxina activada) y Cry1Ab D74C-R93C (protoxina), sin agentes reductores (SN) y con agentes reductores (β -Mercaptoetanol y ditioneitol). **A.** con BBMV. **B.** con el fragmento recombinante de caderina CR7-CR12.

4.8 Marcaje de la toxina Cry1Ab S39C con fluoróforos extrínsecos

La toxina mutante Cry1Ab S39C se acopló covalentemente a dos fluoróforos extrínsecos: Alexa Fluor 546 y Alexa Fluor 488. El fluoróforo Alexa Fluor 546 contiene un grupo químico “succimidil éster”, el cual forma complejos covalentes con los grupos amino de las proteínas, reaccionando así con el aminoácido lisina (Lys). La toxina Cry1Ab contiene 3 lisinas, de las cuales las lisinas 403 y 490 están expuestas al solvente y se marcaron con Alexa Fluor 546. El fluoróforo Alexa Fluor 488 contiene el grupo químico maleimida, el cual reacciona con grupos sulfhidrilo de las cisteínas presentes en las proteínas. La cisteína 39 de la mutante, introducida por mutagénesis, es el único aminoácido que se acopló covalentemente con el fluoróforo Alexa Fluor 488.

La eficiencia de marcaje de la mutante Cry1Ab S39C con ambos fluoróforos fue analizadas por SDS-PAGE y posteriormente visualizado en un analizador de imágenes que permitió identificar la emisión de ambos fluoróforos en canales de emisión de fluorescencia independientes (Figura 18).

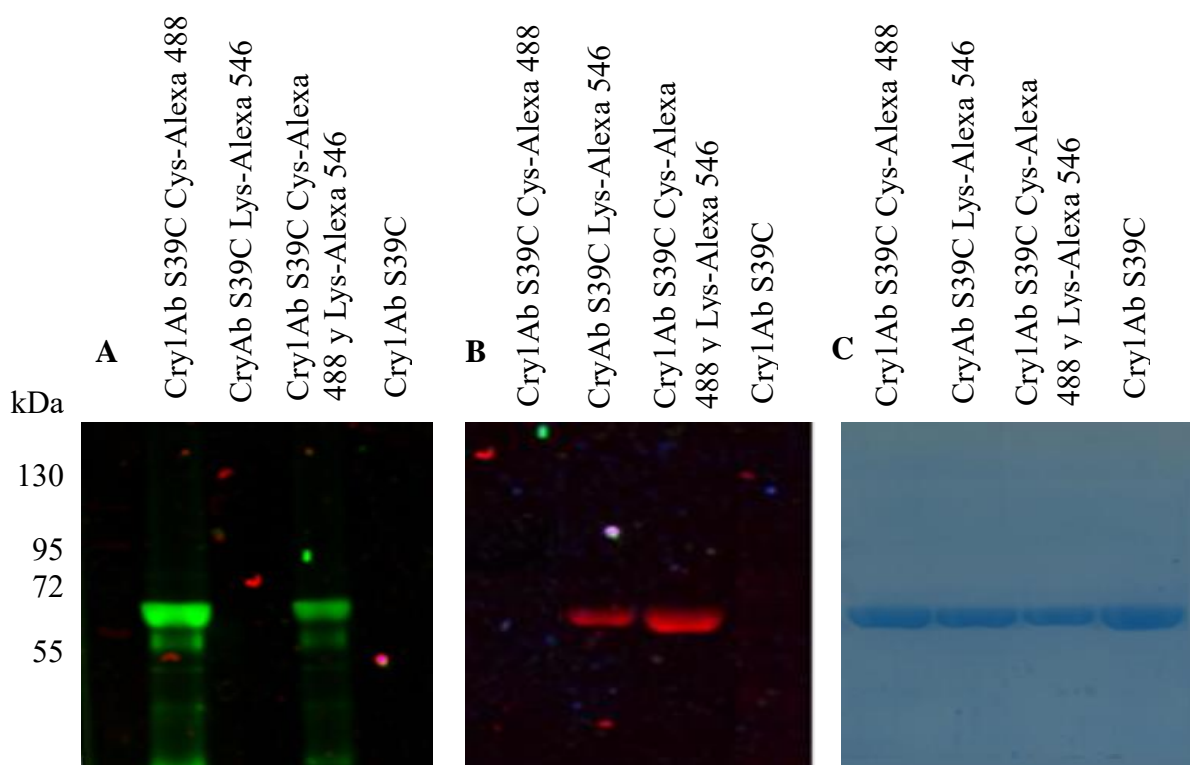


Figura 18. Marcaje de la toxina Cry1Ab S39C sin y con fluoróforos extrínsecos visualizado en SDS-PAGE. **A.** excitado a 488 nm. **B.** excitado a 546 nm. **C.** con azul de Coomassie.

Finalmente, para evaluar el estado estructural de la toxina Cry1Ab S39C después de ser marcada con los fluoróforos Alexa Fluor 546 y Alexa Fluor 488, se realizó un registro del espectro de emisión de fluorescencia de los triptófanos intrínsecos de la toxina. El triptófano es un marcador estructural de proteínas, ya que la emisión de su fluorescencia es sensible al ambiente, es decir pequeñas variaciones en el ambiente hidrofóbico o hidrofílico tiene consecuencias en su espectro de emisión. La longitud de onda de excitación del triptófano fue de 285 nm y el registro del espectro de emisión de 300-400 nm (Figura 19A).

Los espectros de la toxina Cry1Ab S39C antes y después del marcaje con los fluoróforos extrínsecos son similares, lo que significa que tratamiento para acoplar los fluoróforos no alteró el estado estructural de la toxina. Adicionalmente se realizó un ensayo de oligomerización utilizando BBMV de *M. sexta* y se evidenció que la toxina es capaz de formar estructuras oligoméricas (Figura 19B).

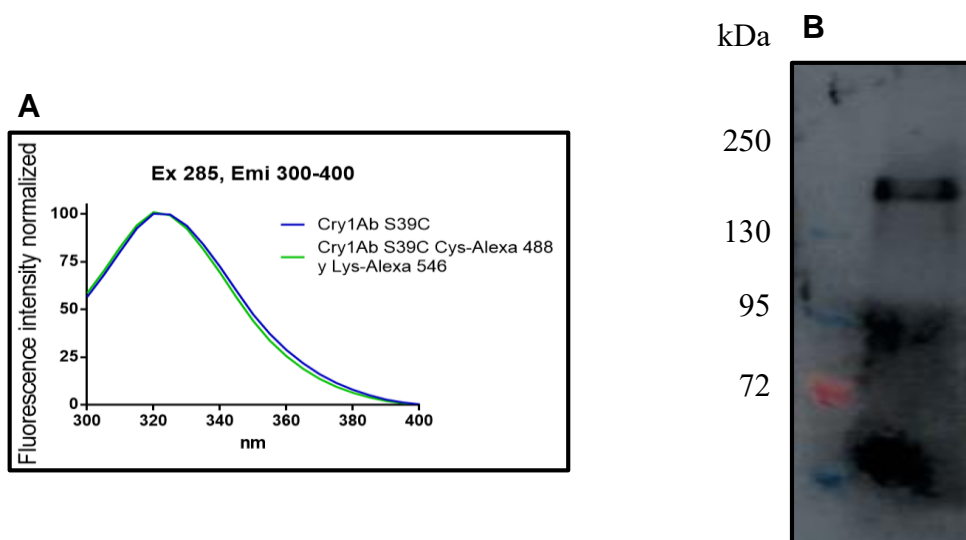


Figura 19. **A.** Espectro de emisión de los triptófanos de la toxina Cry1Ab y Cry1Ab S39C marcada con fluoróforos extrínsecos. **B.** Análisis de oligomerización de Cry1Ab S39C con BBMV.

4.9 Ensayos de transferencia de energía resonante entre fluoróforos (FRET)

El ensayo de FRET es una técnica que se utiliza para determinar la distancia molecular entre dos fluoróforos. Esta se basa en la transferencia de energía de una molécula donadora a una molécula aceptora que se encuentra a una distancia menor a 90 Armstrong (\AA). Aparte de la distancia molecular entre ambos fluoróforos, otra condicional para que exista FRET es que el espectro de emisión de la molécula donadora se sobrelape con el espectro de excitación de la molécula aceptora. En consecuencia, si existe transferencia de energía, la emisión del

donador disminuye y la del aceptor aumenta, sin que este último haya sido excitado, ya que la emisión del donador excita al aceptor. Este enfoque fue utilizado en este trabajo para analizar la separación de la hélice α -1 durante la oligomerización de la toxina. En este caso, el fluoróforo Alexa Fluor 488 funciona como donador y se encuentra acoplado a la cisteína 39 localizada en la hélice α -1, mientras que dos moléculas del fluoróforo Alexa Fluor 546 funcionan como aceptores, y está acopladas a las lisinas 403 y 490. La distancia molecular entre la Cys39 y Lys403 o Lys490 es menor a 30 Å y el espectro de emisión de Alexa Fluor-488 sobrelape con el espectro de excitación de Alexa Fluor-546.

Se realizaron ensayos de oligomerización con la toxina Cry1Ab S39C acoplada a ambos fluoróforos en presencia de BBMV y CR7-12. Posteriormente se hizo un registro de los espectros de emisión de fluorescencia de 500-620 nm excitando al donador Alexa Fluor 488 a una longitud de onda de 488 nm. Se utilizó como referencia de FRET (-) la toxina acoplada exclusivamente al donador Alexa Fluor 488. Al comparar el espectro de emisión de la referencia con la toxina monómerica se observó una clara disminución de la fluorescencia del donador y aumento de aceptor indicando un FRET (+).

Este resultado coincide con nuestro diseño experimental, ya que la distancia entre ambos fluoróforos es menor a 30 Å, como se mencionó anteriormente. Interessantemente, la presencia de BBMV o CR7-CR12 mostraron un FRET (+) comparable a la toxina monomérica, indicando que la hélice α -1 permanece unida al oligómero (Figura 20).

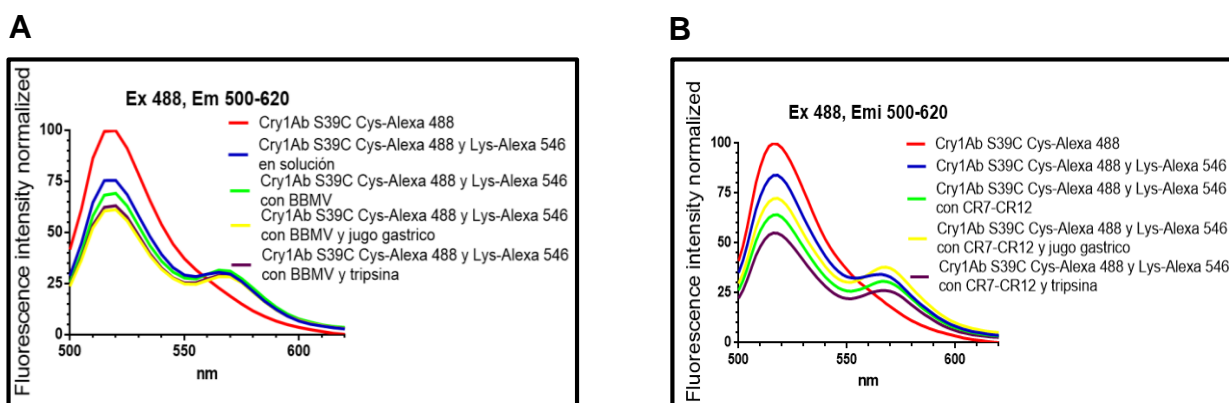


Figura 20. Gráficos de fluorescencia con Ex 488 nm y Emi 500-620 nm de Cry1Ab S39C marcadas con fluoroforos extrínsecos. **A.** con BBMV. **B.** con el fragmento de caderina CR7-CR12.

Capítulo V: DISCUSION, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Discusión

El modo de acción de las toxinas Cry implica la solubilización, la activación proteolítica, la unión al receptor, la oligomerización de la toxina, la inserción de la membrana y finalmente, la formación de poros, lo que lleva a la inflamación y lisis de las células (Schnepf et al., 1998). Se considera que la oligomerización es un evento fundamental en la toxicidad de estas toxinas (Pacheco, Gómez, Gill, Bravo y Soberón, 2009). Se cree que existen eventos moleculares que ocurren en la oligomerización y precisamente en estos eventos ocurren cortes proteolíticos y cambios conformacionales. Sin embargo, estos cortes y cambios son aún desconocidos en las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

En el presente trabajo se buscó elucidar estos eventos moleculares que permitan comprender la oligomerización en la toxina Cry1Ab. Previos estudios han mostrado que la incubación de la toxina Cry1Ab con BBMV o fragmentos de caderina CR7-CR12 inducen la formación de complejos de alto peso molecular que son considerados como oligómeros de la toxina Cry1Ab (Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo y Soberón, 2002; Pacheco, Gómez, Gill, Bravo y Soberón, 2009). La secuenciación del extremo N-terminal del oligómero reveló que estas estructuras carecen de la hélice α -1 (Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo y Soberón, 2002) y posteriores estudios han sugerido que existe un cambio conformacional de la hélice α -2b para que se lleve a cabo el ensamblaje del oligómero (Pacheco et al., 2018).

En este trabajo proporcionamos evidencias que la mutante Cry1Ab S39C-T239C, la cual contiene un enlace disulfuro entre las hélices α -1 y α -7, no se vio afectada en la formación del oligómero, lo que sugiere que la eliminación de la hélice α -1 y α -2a no son prescindibles para su formación. Con respecto a los ensayos de FRET con la mutante Cry1Ab S39C, que fue marcada con Alexa Fluor 546 y Alexa Fluor 488, se evidenció un aumento de la transferencia de energía entre ambos fluoróforos (FRET) cuando se formó el oligómero en comparación al monómero, lo cual implicaría la no liberación de la hélice α -1. Estos resultados parecieran no correlacionar con los obtenidos por Gómez, et al. (2002), en donde se comparó la secuencia del extremo N-terminal del monómero y el oligómero de la toxina Cry1Ab, y se observó que el monómero contiene la secuencia de aminoácidos de las hélices α -1 y α -2a, mientras que dicha secuencia no fue encontrada en el oligómero, por lo tanto, se sugirió que su eliminación era necesaria para la oligomerización de las toxinas Cry. Este último fue apoyado con la obtención de las estructuras cristalinas de las toxinas Cry4Ba y

Cry5Ba, que revelaron una organización trimérica donde las hélices α -1 y α -2a de ambas toxinas se perdieron durante el proceso de cristalización. Es importante mencionar que, en los estudios hechos por Gómez, Sánchez, Miranda, Bravo y Soberón (2002), la secuencia del extremo N-terminal del oligómero fue obtenida a partir de una muestra que fue sometida a un SDS-PAGE, lo cual podría suponer que en dicho tratamiento el péptido correspondiente a la hélice α -1, al no estar unido covalentemente a la toxina, pudo separarse del oligómero durante su migración en el gel en condiciones desnaturalizantes. En contraste con nuestro enfoque de FRET, el cual se realizó en condiciones nativas, permitiendo así que el péptido de la hélice α -1 permanezca unido al complejo oligomérico. La mutante Cry1Ab D74C-R93C que fue diseñada para formar un enlace disulfuro entre las hélices α -2b y α -3, no se vio afectada en la formación del oligómero. Sin embargo, la eficiencia de oligomerización fue mucho menor que la toxina Cry1Ab silvestre. Este dato sugiere que el cambio conformacional de la hélice α -2b no son prescindibles para la oligomerización, como fue propuesto por la investigación de Pacheco et al. (2018), que se planteó que las toxinas Cry1Ab, Cry1Fa, Cry4Ba y Cry5Ba tienen un cambio conformacional de la hélice α -2b en el proceso de formación del oligómero. Sin embargo, se requiere un análisis más exhaustivo con el diseño de mutantes diferentes que tengan un fenotipo de producción y procesamiento proteolítico similar a la toxina silvestre, ya que la mutante Cry1Ab D74C-R93C al ser evaluada en condiciones in vitro, resultó afectada en solubilización y activación, y en condiciones in vivo resultó menos tóxica que la toxina Cry1Ab silvestre.

Con respecto a los bioensayos con larvas de *Manduca sexta* las mutantes Cry1Ab S39C y Cry1Ab S39C-T239C presentaron ser más tóxicas en comparación a la Cry1Ab E129K (Chavez et al., 2015), Cry1Ab R99E, Cry1Ab E10EK, Cry1Ab R99E-E101R, Cry1Ab R99E-N85D-R87K (Pacheco et al., 2018), la Cry1Ac y las mutantes afectadas desde los residuos de aminoácidos 503 a 525 (Lee, You, Gould y Dean, 1999), las mutantes de Cry1Ab (Wu y Aronson, 1992), porque presentaron valores menores de CL_{50} por lo tanto serían candidatas para un mejor control de *M. sexta*.

5.2 Conclusiones

Las mutaciones T239C, D74C y R93C en la toxina Cry1Ab afectaron la producción de cristales paraesporales en *Bacillus thuringiensis*, posiblemente estas mutaciones alteran la estructura de la toxina y en consecuencia su estabilidad. Interesantemente, la combinación

de las mutaciones T239C y S39C, así como D74C y R93C, reconstituyen su producción, lo que indica que el enlace disulfuro estaría involucrado en su estabilización.

El análisis de oligomerización de la mutante Cry1Ab S39C-T239C, junto con los estudios de FRET con la mutante S39C muestran que una vez que se lleve a cabo el corte proteolítico entre las hélices α -2a y α -2b, no es necesario la separación de las hélices α -1 y α -2a para formar el oligómero de la toxina Cry1Ab.

La mutante Cry1Ab D74C-R93C mostró que probablemente el cambio conformacional de la hélice α -2b, no es necesario para formar el oligómero. Sin embargo, se tendría que validar esta conclusión con otras mutantes dobles que tengan mayor estabilidad.

Las mutantes Cry1Ab S39C y Cry1Ab S39C-T239C presentan mayor toxicidad frente a larvas de *Manduca sexta* que la Cry1Ab silvestre, esto representaría una alternativa de un mejor control de dicha plaga.

5.3 Recomendaciones

Promover la investigación de ciencia básica-aplicada, porque permitiría estudiar el estado del arte del mecanismo molecular y generar bacterias mejoradas genéticamente (mutantes) que podrían ser candidatas para un mejor control de insectos plagas que afecten a la agricultura.

Se recomienda realizar bioensayos con las mutantes obtenidas en *Spodoptera frugiperda* “gusano cogollero del maíz”, *Plutella xylostella* “polilla del repollo”, *Phthorimaea operculella* “polilla de la papa”, etc, para probar el grado de toxicidad que presentan frente a estos insectos plagas.

Debido a que está afectado la solubilización y activación de la mutante Cry1Ab D74C-R93C se recomienda el diseño y la construcción de la mutante Cry1Ab W73C-I97C que tiene como objetivo estudiar el cambio conformacional de la hélice α -2b, además cumple con las características adecuadas para la formación del puente disulfuro y se espera que presente un fenotipo de producción y procesamiento proteolítico similar a la toxina Cry1Ab silvestre.

Capítulo VI: FUENTES DE INFORMACIÓN

5.1 Fuentes Bibliográficas

Aizawai, K. (1971). Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. En: Microbial control of insects and mites, Burges D. y H. Hussey (eds.), Academic Press, London, 655-672.

Alomar, O. (2005). Control Biológico de plagas: biodiversidad funcional y gestión de agrosistema. Biojournal 1:1-9.

Arantes, O., y Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. Volume 108, Issue 1, 115-119.

Aronson, A., Beckman, W., y Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50, 1-24.

Aronson, A., y Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiol. Lett. 195: 1-8.

Atsumi, S., Inoue, Y., Ishizaka, T., Mizuno, M., Yoshizawa, Y., Kitami, M., y Sato, R. (2008) Ubicación del sitio de unión a proteínas tipo caderina de 175 kDa de *Bombyx mori* en la toxina Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis*. FEBS J 275: 4913-4926.

Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L., y Lecadet, M. (1996). Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans subs. malasya*, encoding a new mosquitocidal protein which homologues to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxinas. J. Bacteriol. 178:3099-3105.

De Barrera, H, J. (2010) Metodología de la investigación: guía para la comprensión holística de la ciencia (4a. edi.). Venezuela: Quirón Ediciones, 771-775.

Berliner, E. (1911). Über die Schlafsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis n.sp.* Zeitschrift für angewandtes Entomology 2:29-56.

Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., y Li, J. (2005). Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. Journal Mol. Biol. 348, 363–382.

- Bulla, L., Bechtel, D., Kramer, K., Shethna, Y., Aronson, A., y Fitz-James, P. (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*. *CRC Crit Rev. Microbiol*; 8: 147-204
- Bravo, A., y Cerón, J. (2004). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Universidad Nacional de Colombia, Editorial Buena Semilla, Bogotá, Colombia. ISBN 958-701-401-4.
- Bravo A., Likitvivatanavong, S., Gill, S., y Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41:423-431.
- Carreras, B. (2003). Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario. Tesis en opción al título de Maestro en Microbiología General, Universidad de La Habana.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). (1993). Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de chile dulce. Programa de mejoramiento de cultivos tropicales. Turrialba, Costa Rica. 144p. (Serie Técnica. Informe Técnico n°. 201).
- Chavez, C., Recio-Tótoro, B., Flores-Escobar, B., Lanz-Mendoza, H., Sánchez, J., Soberón, M., y Bravo, A. (2015). Nitric oxide participates in the toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to kill *Manduca sexta* larvae. *Peptides*, 68, 134–139.
- Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., y Dean, D. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev*; 62:807–813.
- De Maagd, R., Bravo, A., y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Apr*; 17(4):193-199.
- Dulmage, H., y Aizawai, K. (1982). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. En: *Microbial and viral pesticides*, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker. New York, N.Y. pp 209-237.
- Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. University of Oxford, United Kingdom. *Microbiol Rev*. 1993 Mar; 57(1):1-33.
- Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M., Morris, K., Oppert, B., y Jurat-Fuentes, J. (2009). A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem*. 284, 18401–18410.

- Ferré, J., y Van Rie, J. (2002). Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533.
- Flores, A., Egúsqüiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, J., Benavides, E., Godoy, J., Huerta, D., Jesús, Y., y Patiño, A. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. *Ciencia e Investigación;* 14(1): p-p 29-34.
- Galitsky, N., Cody, V., Wojtczak A., Ghosh, D., y Luft, J.R. (2001). Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta. Crystallogr; D* 57:1101– 1109.
- Gatehouse, A., Hilder, V., y Boulter, D. (1992). Potential of plant derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance, in: *Biotechnology in Agriculture No 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. CAB International, pp. 155-181.
- Girard, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Schwartz, J., Masson, L., y Laprade, R. (2009). La modificación química de mutantes de cisteína individuales de toxina Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis* revela la importancia de los elementos estructurales del dominio I en el mecanismo de formación de poros. *Biochem Biophys Acta* 1788: 575-580.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., y Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242–246.
- Gómez, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Matus, V., Gill, SS., Soberón, M., y Bravo, A. (2014). Las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* son proteínas versátiles con múltiples modos de acción: dos pre-poros distintos están implicados en la toxicidad. *Biochem. J.* 459, 383 – 396.
- Granados, S. (1995). *Ecología e impacto ambiental*. SEP. SEIT. DGETA. México.
- Hernández, S., Fernández, C., y Baptista, L. (2010). *Metodología de la investigación*. México: Editorial Mc Graw Hill.
- Hui, F., Scheib, U., Hu, Y., Sommer, R., Aroian, R., y Ghosh, P. (2012). Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B. *Biochem.* 51, 9911–9921.
- Ishiwata, S. (1901). On a lind of severe flasherie (sotto disease). *Dainhan Sanbshi Kaiho* 9:1-5.

- Jara, S., Maduell, P., y Orduz, S. (2005). Diversidad de cepas de *Bacillus thuringiensis* en el filoplano de maíz y frijol y sus respectivos suelos en Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, p.p 117-124.
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J., Gill, SS., Soberón, M., y Bravo, A. (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *J. Biol. Chem.* 282, 21222–21229.
- Junior, J.C. (2015). Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* con actividad entomopatógena a partir de suelo de cultivos de brasicáceas en Menocucho, Laredo-Perú (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- King, A.B., y Saunders, J.L. (1984). Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central: Una guía para su reconocimiento y control. London: Overseas Development Administration. CATIE: Turrialba, Costa Rica. 182pp.
- Knowles, B. H., y Ellar, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different specificity. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 924:509–518.
- Kumar, A., y Aronson, A. (1999) Analysis of mutations in a pore forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *J Bacteriol* 181: 6103–6107.
- Lambert, B., y Peferoen, M. (1992). Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience* 42:112-122.
- Lee, M., You, T., Gould, F., y Dean, D. (1999). Identificación de residuos en el dominio III de la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* que afectan la unión y la toxicidad. *Applied and Environmental Microbiology*, p.p 4513-4520.
- Mamani, D. (2008). Control biológico e interacción de nucleovirus PoGV, y *Bacillus thuringiensis* var *Kurstaki* sobre polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen) (grado de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- OMS (Organización Panamericana de la Salud). (2003c). Cultivemos tomate con menos riesgo. Gráfica Editores. Managua, Nicaragua. 37pp.

Pacheco, S., Gómez, I., Gill, SS, Bravo, A. y Soberón, M. (2009). Mejora de la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxinas por fragmentos de una toxina vinculante caderina se correlaciona con la formación de oligómeros. *Péptidos*. 30, 583-588.

Pacheco, S., Gómez, I., Sánchez, J., García-Gómez, B., Czajkowsky, D., Zhang, J., Soberón, M., y Bravo, A. (2018). Los puentes salinos intermoleculares de la hélice α -3 y los cambios conformacionales son esenciales para la toxicidad de la familia de toxinas Cry de 3D de *Bacillus thuringiensis*. *Scientific Reports* volume 8, Article number: 10331

Pardo-López, L., Soberón, M., y Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticida 3-dominio Cry toxinas: Modo de acción, resistencia a los insectos y consecuencias para la protección de los cultivos. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 3-22.

Porcar, M., y Juárez-Pérez, V. (2004). Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis* en el control biológico (Eds. A. Bravo y J. Cerón) Editorial Buena Semilla. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Razo, F.E. (1990). Escalamiento de un proceso por lote de nivel de laboratorio la planta piloto para la producción de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Departamento de Biotecnología. México.

Rodríguez-Almazán, C., Reyes, E., Zúñiga-Navarrete, F., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Evans, AM., Likitvivatanavong, S., Bravo, A., Gill, SS., y Soberón, M. (2012). Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis subs. israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 443, 711–717.

Rosas-García, N. M., y De Luna-Santillana, E. (2006). Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Revista internacional de contaminación ambiental* 22:135-142.

Rosas-García, N. M. (2008). Avances en el desarrollo de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10:39-63.

Rozas, M.E. (1999). Catastro de conflictos ambientales por plaguicidas Bolivia – Perú– Chile. Santiago de Chile: Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D., y Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*; 62: 775-806.

Soberón, M. y Bravo, A. (2003). *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Instituto de Biotecnología. UNAM.

Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B., y Bravo, A. (2007). Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318: 1640–1642.

Soberón, M., y A. Bravo. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En: López-Munguía, A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25° aniversario, capítulo 27. México, D.F. UNAM. pp 303-314

Wu, D., y Aronson, A. (1992). La mutagénesis localizada define las regiones de *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxina involucrada en la toxicidad y especificidad. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 267, p.p 2311-2317.

Zahm, S., y Blair, A. (1993). Cancer among migrant and seasonal farmworkers: an epidemiologic review and research agenda. *Am J Ind Med*; 24(6): 753-66.

5.2 Fuentes Electrónicas

CABI (Distribution maps of plant pests). (2002). Recuperado de <http://www.cabi.org/dmpp/?loadmodule=review&page=4049&>.

Villanueva, J.R. (2009). Tobacco hornworm *Manduca sexta* (Linnaeus) (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae). University of Florida. Recuperado de <http://entnemdept.ifas.ufl.edu>.

ANEXOS

Datos obtenidos

- Formato de guía de observación 1: Brindado por el Dr. Sabino Pacheco Guillén.
 1. Laboratorio: Microbiología Molecular.
 2. Localización: Instituto de Biotecnología-UNAM.
 3. Observador: Jean Piere Jesús Quiliche Duran.
 4. Guía de observación de Bioensayos con *Manduca sexta*.

Protoxina	Concentración (ng/cm ²)	Observación despues de 7 días	
		Vivos	Muertos
Cry1Ab	0.3	19	5
	0.6	16	8
	1.25	14	10
	2.5	3	21
	5	0	24
Cry1Ab S39C	0.3	19	5
	0.6	16	8
	1.25	8	16
	2.5	3	21
	5	0	24
Cry1Ab S39C- T239C	0.3	22	2
	0.6	13	11
	1.25	7	17
	2.5	4	20
	5	0	24
Cry1Ab D74C- R93C	0.6	24	0
	1.25	24	0
	2.5	24	0
	5	24	0
	10	23	1
	125	1	23
	250	0	24
	500	0	24
	1000	0	24

- Formato de guía de observación 2: Brindado por el Dr. Sabino Pacheco Guillén.
 1. Guía de observación para análisis de oligomerización in-vitro en *Manduca sexta*.

Toxina	Observación	
	Presencia	Ausencia
Cry1Ab	x	
Cry1Ab S39C	x	
Cry1Ab S39C-T239C	x	
Cry1Ab D74C-R93C	x	

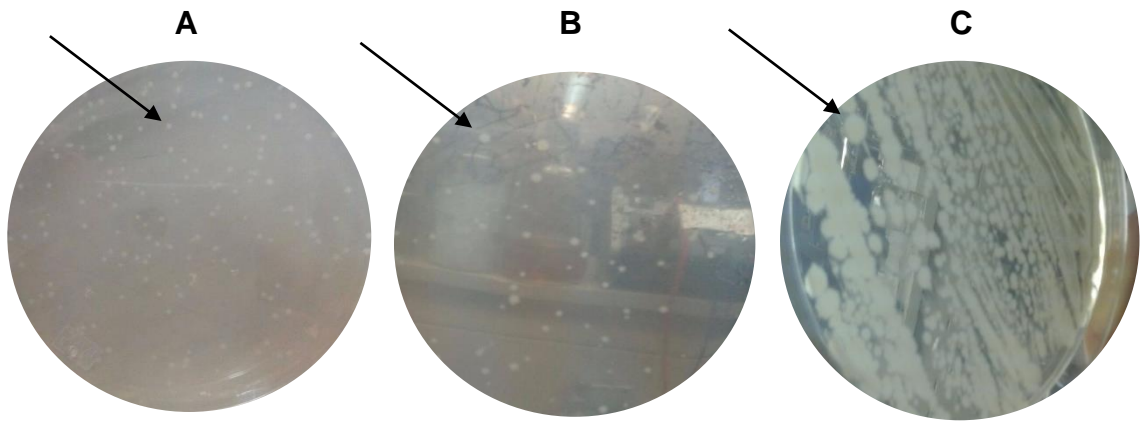


Figura 21. Colonias en Agar Luria Bertani. **A.** *Escherichia coli* DH5α. **B.** *Escherichia coli* SC110. **C.** *Bacillus thuringiensis* 407.

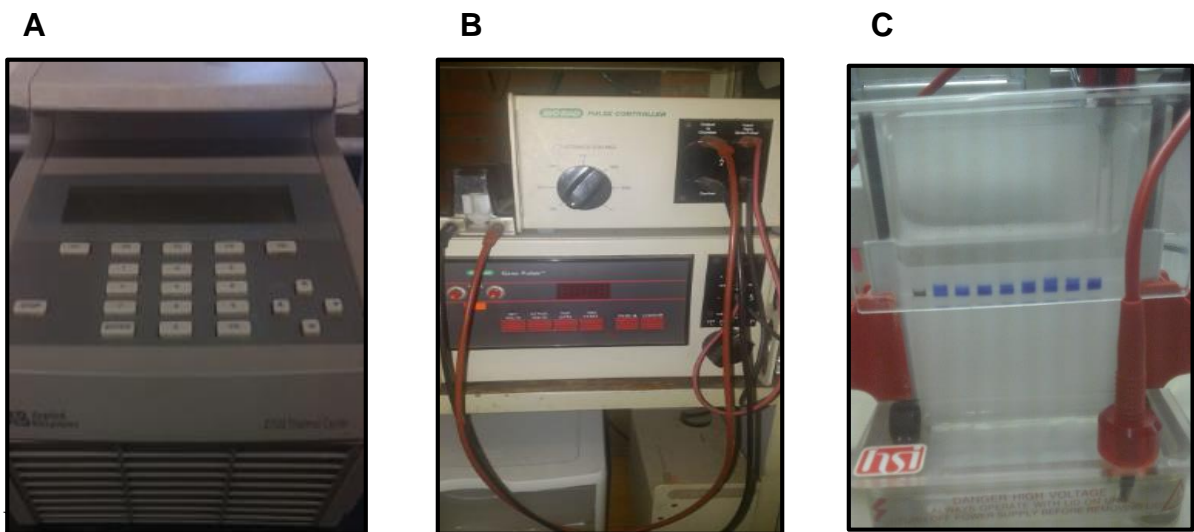


Figura 22. **A.** Mutagénesis sitio dirigida por PCR en el termociclador. **B.** Electroporación para introducir plásmidos mutagénicos. **C.** Corrida de SDS-PAGE.

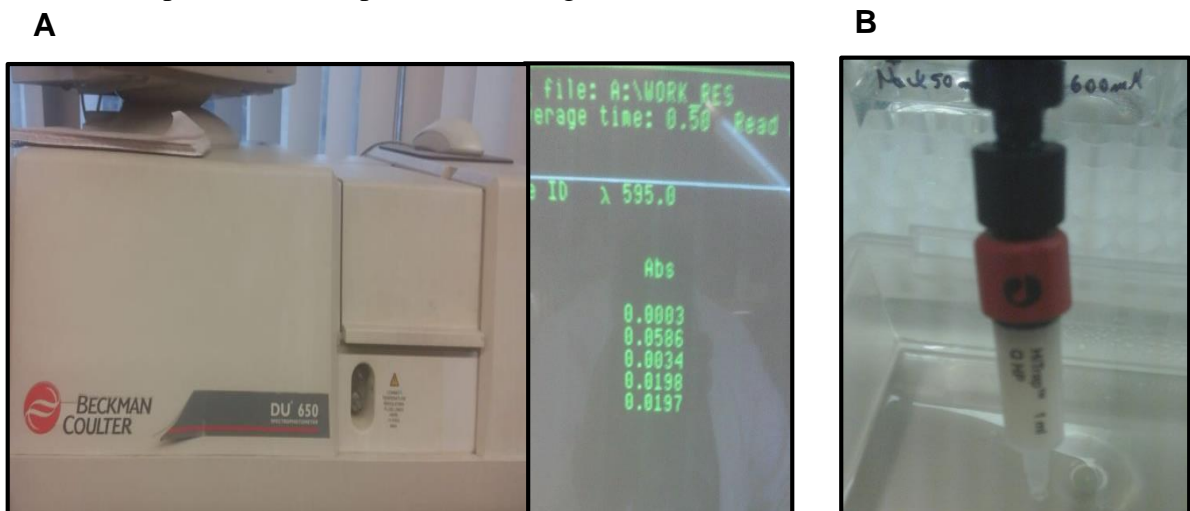


Figura 23. **A.** Cuantificación de toxinas por espectrofotometría. **B.** Purificación de toxinas en columna de intercambio aniónico.

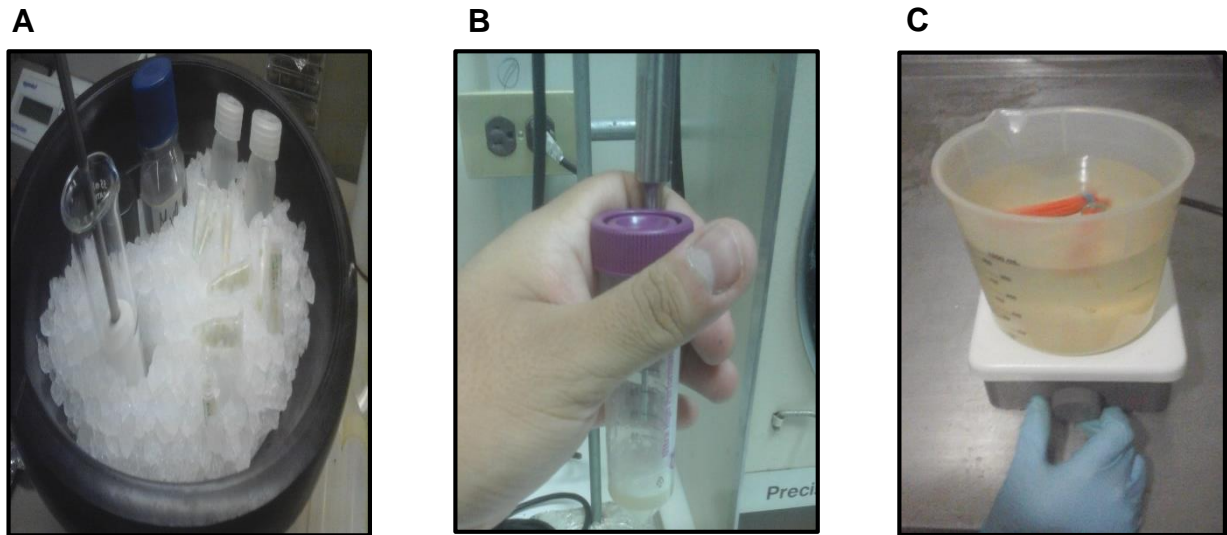


Figura 24. A. Preparación de BBMV de *Manduca sexta*. B. Sonicación de *Escherichia coli* ER2566 que expresa fragmento de caderina CR7-CR12. C. Diálisis de la toxina Cry1Ab S39C para eliminación de urea y fluoróforo no acoplado a toxina.

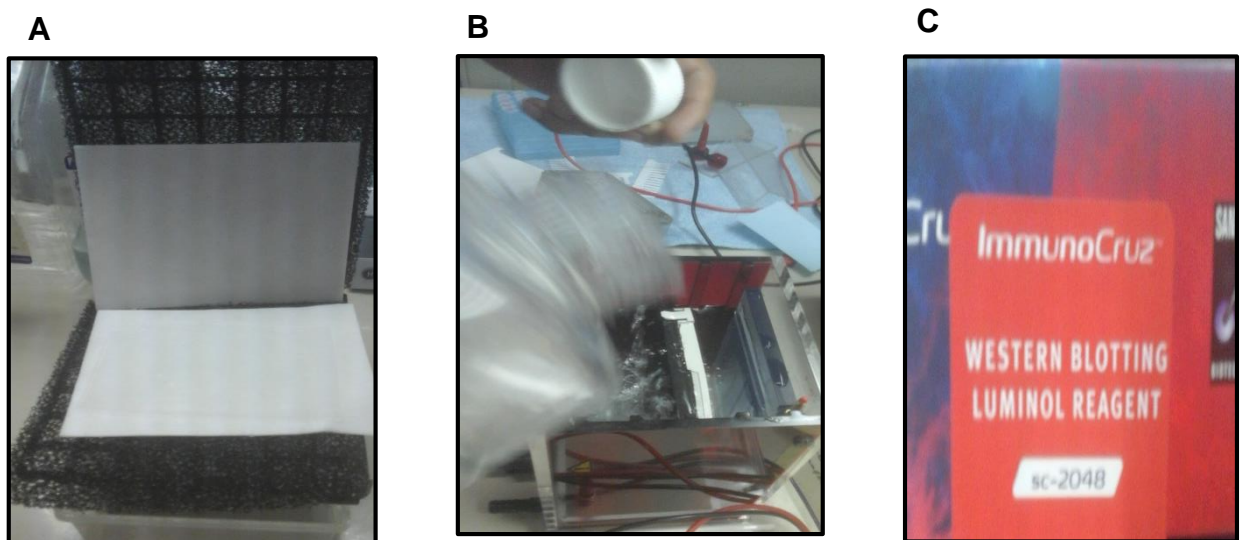


Figura 25. A. Preparación del “sandwich” para Western Blot. B. Buffer de transferencia en cámara de transferencia. C. Revelador quimioluminiscente Western Blotting Luminol Reagente (ImmunoCruz).

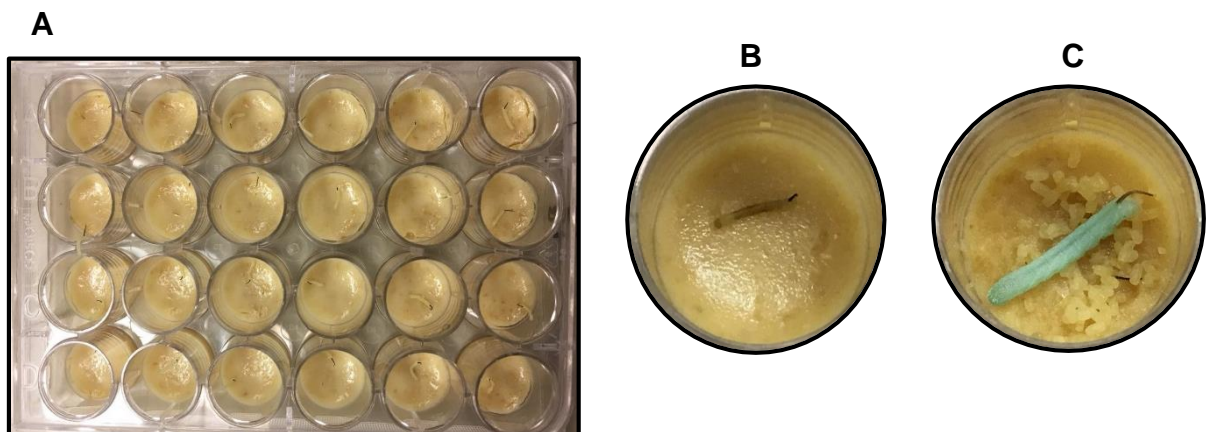


Figura 26. Bioensayos con *Manduca sexta*. A. Placas de 24 pocillos con dieta y larvas del primer estadio. B. Larva muerta. C. Larva viva.