

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Toxicidad de la clase Cry1 de *Bacillus thuringiensis*
y su unión a receptores en *Trichoplusia ni***

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

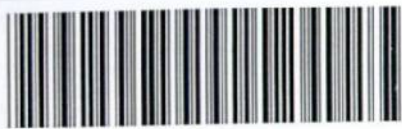
PRESENTA

MC. MARIA MAGDALENA IRACHETA CARDENAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

DICIEMBRE DE 1999

TD
QR82
.B3
I7
1999
c.1



1080124435



FONDO

TESIS DOCTORADO

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Toxicidad de la clase Cry1 de *Bacillus thuringiensis*
y su unión a receptores en *Trichoplusia ni***

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

MC. María Magdalena Iracheta Cárdenas

COMISION DE EXAMEN

Presidente: Dr. Benito Pereyra Alférez
Secretario: Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal: Dr. Luis Jesús Galán Wong
Vocal: Dr. Roberto Mendoza Alfaro
Vocal: Dr. Zacarias Jiménez Salas

Handwritten signatures of the exam commission members, written over horizontal lines. The signatures are in black ink and vary in style, with some being more cursive and others more blocky.

T

QR82

.B3

I7

1999

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Genética y Biología Molecular de Microorganismos, Lab. de Microbiología Industrial y del Suelo. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Biológicas/UANL, bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez y en el Laboratorio de Genética Bioquímica. Departamento de Genética. Facultad de Biología. Universidad de Valencia. España, bajo la asesoría del Dr. Juan Ferré Manzanero.

Indice

	Página
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Lista de abreviaturas	ii
Indice de figuras	iii
Indice de tablas	iv
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Hipótesis	5
Objetivos	5
Antecedentes	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Estructura de las toxinas Cry	7
Clasificación de las toxinas Cry	8
Anatomía y fisiología del intestino de las larvas	10
Mecanismo de acción	13
Solubilización	13
Activación	14
Unión a receptor	17
Formación de poro	22
Materiales y métodos	
Origen de los microorganismos	25
Obtención de proteínas Cry	25
Solubilización	26
Activación	26
Purificación por FPLC	26
Marcaje con NaI ¹²⁵	26

Determinación de la actividad específica de I ¹²⁵ Cry1	27
Población de <i>T. ni.</i>	27
Ensayos de toxicidad	28
Disección de intestinos	28
Ensayos de unión proteínas Cry-Receptor	
Unión de proteínas Cry-Biotiniladas Receptor	29
Unión de proteínas I ¹²⁵ Cry-Receptor	30
Obtención de anticuerpos AntiCry1Ac y AntiCry7Aa	31
Preparación de proteínas para determinar secuencia amino terminal	31
Purificación parcial de vesículas por cromatografía	32
Determinación de actividad de aminopeptidasa	32

Resultados

Producción de proteínas Cry	33
Purificación por FPLC	34
Bioensayos	35
Determinación de LC ₅₀	35
Marcaje con Na I ¹²⁵	36
Determinación de la actividad específica	37
Ensayos de unión I ¹²⁵ -Cry-Receptor	38
Determinación de la concentración óptima de vesículas	39
Ensayos de saturación	40
Competencias homólogas	41
Constantes de disociación y sitios de unión	42
Competencias heterólogas	44
Detección de receptores	45
Preparación de muestras para determinar la secuencia amino terminal	46
Obtención de Antisueros	47

Competencias proteínas Cry-Biotiniladas-Receptor	49
Separación de proteínas de vesículas por Dea-Sepharosa	50
Determinación de la actividad de aminopeptidasa	51
Discusión	52
Conclusiones	57
Literatura citada	58
Apéndices	
A. Medio CCY	67
B. Electroforesis de proteínas	68
C. Dieta artificial para el cultivo de <i>T.ni</i>	70
D. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	71
E. Análisis Probit	72
Anexo 1	82

DEDICATORIA***A mi familia******y******a mis amigos***

***Como ama el ángel dichoso
al eterno que le crió;
como el artista lo hermoso
y el poeta lo misterioso,
así, los amo yo.***

A. Nervo

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer patente mi agradecimiento a las siguientes personas e Instituciones por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de postgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, director de este trabajo, de Tesis, por su confianza y apoyo.

Al Dr. Juan Ferré Manzanero, por permitirme realizar parte del trabajo experimental en su laboratorio de la Universidad de Valencia.

A los Dres. Roberto Mendoza Alfaro, Carlos E. Hernández Luna, Zacarias Jiménez Salas y Luis J. Galan Wong, por formar parte de la Comisión de Examen y por las sugerencias realizadas para una mejor presentación del documento final de la Tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Bioquímica, y del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo y a la Unidad de Genética y Biología Molecular

A todas aquellas personas que de alguna forma me brindaron su apoyo incondicional para la culminación de este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Acido desoxirribonucleico
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grado Celsius
cm	Centimetro (s)
<i>et al</i>	y otros
FPLC	Cromatografía de alta resolución
g	Gramo (s)
h	Hora (s)
kDa	Kilodaltones
l	Litro
M	Concentración molar
mM	Concentración milimolar
mA	Miliamperes
mg	Miligramo (s)
µg	Microgramo (s)
min	Minuto (s)
µl	Microlitro (s)
ml	Mililitro (s)
ng	Nanogramo (s)
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular
PVDF	Fluoruro de polivinilo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
seg	Segundo (s)
subsp	Subespecie
X g	Aceleración de gravedad

RESUMEN

El modo de acción de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) involucra cuatro pasos: a) ingestión y solubilización del cristal; b) procesamiento proteolítico de la protoxina para generar el fragmento tóxico; c) unión a receptores específicos y d) formación de un poro en la membrana apical de células columnares, lo que conduce a la lisis y muerte celular. Aunque todas las proteínas Cry comparten el mismo modo de acción, existen diferencias sustanciales en la especificidad y nivel de toxicidad hacia diferentes insectos. Los objetivos del presente trabajo fueron i) determinar el grado de susceptibilidad de *Trichoplusia ni* hacia las toxinas clase Cry1; ii) identificar el receptor para las toxinas de la subclase Cry1A y, iii) determinar las constantes de afinidad y número de receptores para las toxinas Cry1A. Las toxinas Cry1Aa, 1Ab, 1Ac, 1B, 1Ca, 1Da, 1Ea, 1Fa, y 1J fueron producidas en medio líquido CCY. La mezcla esporas-cristales fue solubilizada en solución amortiguadora de carbonatos, y digerida con tripsina para generar el fragmento tóxico. Todos los experimentos fueron realizados con la toxina activa. Los bioensayos se realizaron con larvas neonatas de *T. ni* y se determinó la LC_{50} (ng/cm^2). Los ensayos de unión al receptor, se realizaron con vesículas del intestino medio (VIM) de *T. ni*. Las constantes de afinidad (Kd) y número de receptores (Rt) se determinaron usando VIM en competencias homólogas y heterólogas marcando una de las toxinas con I^{125} . Los experimentos para identificar al receptor se realizaron por ensayos tipo fase sólida. Los valores de toxicidad (LC_{50}) mostraron variabilidad entre las diferentes toxinas evaluadas, destacando como altamente tóxicas Cry1Ac, 1Ab y 1C con una LC_{50} de 1.1, 3.4 y 12.2 ng/cm^2 , respectivamente. Las toxinas Cry1J y 1F fueron moderadamente tóxicas con valores LC_{50} de 87.4 y 248.8 ng/cm^2 , respectivamente. Las toxinas Cry1Aa, 1B, 1D y 1E mostraron una toxicidad nula con valores de LC_{50} superiores a 2500 ng. En los ensayos para determinar la unión al receptor, se observó que Cry1Aa, 1Ab y 1Ac se unen a una proteína de ca. 106 kDa. Los resultados de saturación de receptores concuerda con los bioensayos, ya que Cry1Aa no presentó niveles de saturación, mientras que Cry1Ab y 1Ac si lo hicieron. Los valores de afinidad (Kd), fueron de 1.9 y 1.2 nM; Rt 0.59 y 0.54 pM toxina/mg VIM, para Cry1Ab y 1Ac, respectivamente. Por otra parte, los ensayos de competencia demostraron que, aunque si bien, Cry1Ac y 1Ab comparten el mismo receptor, 1Ac se une con mayor afinidad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son contrastantes con lo publicado por otros grupos de trabajo con Bt, particularmente en lo referente a la toxicidad y unión al receptor. Sin embargo, concuerdan con lo referente al número de receptores. La discrepancia en la toxicidad podría deberse, a que las colonias del insecto de prueba tienen diferentes orígenes. En el presente estudio se utilizó una colonia establecida con poblaciones de *T. ni* colectada en el norte de México, mientras que los otros grupos de investigadores han trabajado con poblaciones del insecto colectadas en Canadá. Los resultados aquí obtenidos muestran la necesidad de evaluar la susceptibilidad del insecto a diferentes toxinas, así como la unión al receptor para verificar si lo comparten o no. Esto último es de importancia por la eventual aparición del fenómeno de resistencia cruzada.

ABSTRACT

The mode of action of *Bacillus thuringiensis* (Bt) δ -endotoxin involves four steps: a) ingestion and solubilization of the crystal (inclusion crystal proteins, ICP); b) protoxin must be digested by gut proteases in order to produce the toxic fragment; c) toxic fragment finds and binds to specific receptor located in columnar cells and d) pore formation in the cell membrane. Last step leads to cellular lysis and, often the larvae die. Although Cry toxins share the mode of action, there are important differences in both specificity and toxicity towards the insect target. The objectives of this study were: i) to determine the susceptibility level of *Trichoplusia ni* to Cry1 toxins family; ii) to identify the putative receptor for subclass Cry1A, and, iii) to determine the affinity values and number of receptors for Cry1A. The toxins Cry1Aa, 1Ab, 1Ac, 1B, 1Ca, 1Da, 1Ea, 1Fa, and 1J were produced in CCY liquid medium. The spore-crystals mixtures were solubilized with carbonate buffer and digested with trypsin in order to obtain the toxic fragment. All experiments were carried out using the toxic fragment. The bioassays were performed with neonate larvae of *T. ni* and LC_{50} (ng/cm²) was determined. The receptor binding assays were evaluated by using brush border membrane vesicles (BBMV) from midgut. The affinity (Kd) and receptor number (Rt) were calculated from homologous and heterologous competition assays labeling the ICP's with I¹²⁵. The putative receptor was identified with overlay experiments using BBMV. Bioassay data showed that the Cry1 family displayed different toxicity against neonate larvae of *T. ni*. Cry1Ac, Cry1Ab and Cry1Ca were highly toxic, showing LC_{50} values of 1.1, 3.4 and 12.2, respectively. Cry1J and Cry1Fa were moderately toxic (LC_{50} = 87.4 and 248.8), and Cry1Aa, Cry1B, Cry1Da and Cry1Ea showed no toxic effects with LC_{50} values higher than 2500 ng/cm². Bioassays showed that Cry1Aa, 1Ab y 1Ac bind to a protein of ca. 106 kDa. Likewise, saturation of receptor sites were in accordance to the bioassays, since Cry1Aa showed no saturation levels, while Cry1Ab y 1Ac did. Brush border membrane vesicles were prepared from *T. ni* and used in binding assays with ¹²⁵I-labeled Cry1Ab and Cry1Ac toxins. Competition experiments indicated that Cry1Ab and Cry1Ac share the same affinity-binding site, whereas Cry1Aa and Cry1Fa bind to different sites. The Kd of Cry1Ab and Cry1Ac for the binding site were 1.9 and 1.2 nM, respectively. The mean binding-site concentrations were 0.59 for Cry1Ab and 0.54 pmol/mg of vesicle protein for Cry1Ac.

The results obtained in regard toxicity and binding sites are different from those reported by other research groups, who report that Cry1Aa not only is toxic against *T. ni*, but also binds at saturable level to BBMV. The differences may be related with the insect-colony type, because while they used a colony from Canada, the colony used in this work was reared from insect populations collected in northern México. These results support the idea that is necessary to evaluate the susceptibility of *T. ni* to several toxins, as well as to the receptor involved, in order to verify whether they share same receptor. The last issue becomes of importance particularly when cross resistance can occur.

INTRODUCCION

Los bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son la alternativa mas segura al uso de insecticidas sintéticos en el combate de insectos plaga de importancia agrícola y salud pública (Lambert y Peferoen, 1992). El éxito de esta bacteria se debe a la acción insecticida del cristal parasporal, el cual puede estar formado por una o varias proteínas llamadas δ -endotoxina o proteínas Cry. Estas proteínas pueden ser tóxicas a diferentes órdenes de insectos principalmente a lepidópteros, dípteros y coléopteros (Aronson *et al.*, 1986) y a ciertos nemátodos y protozoarios (Feitelson *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998).

Aun y cuando a nivel de estructura primaria las proteínas Cry, presentan diferencias, comparten un mismo patrón de activación y modo de acción (Peyronnet *et al.*, 1997). Este se inicia cuando los cristales son ingeridos por larvas de insectos, las toxinas son solubilizadas y procesadas en el intestino medio. Esto genera un fragmento tóxico que se une a receptores específicos de las células epiteliales, formando poros en la membrana plasmática, ocasionando un desbalance osmótico y como consecuencia lisis celular y eventualmente, la muerte (Knowles, 1994; MacIntoch *et al.*, 1991; Gould, *et al.*, 1992)

El paso que implica la unión al receptor juega, indudablemente, un papel importante en el modo de acción y éste ha sido correlacionado con la magnitud de la toxicidad (Denolf *et al.*, 1993; Estada y Ferré. 1994; Van Rie *et al.*, 1990). Sin embargo, existen ejemplos muy claros donde la toxicidad es inversamente proporcional a la unión (afinidad) (Wolfersberger. 1990) y en algunas insectos la afinidad de la toxina por el receptor no es suficiente para llegar a causar lesiones (Luo *et al.*, 1999). Asi mismo, la resistencia a Bt ha sido atribuida a una disminución en la afinidad por el receptor (Ballester *et al.*, 1999; Ferré *et al.*, 1991; Granero *et al.*, 1996), y casos de resistencia cruzada han mostrado que este evento es probablemente debido al uso de toxinas muy relacionadas, especialmente con la subclase Cry1A (MacGaughey *et al.*, 1994). Sin embargo,

reportes recientes han demostrado la aparición de resistencia cruzada en toxinas con menor grado de homología, como es el caso de *Plutella xylostella* y *Heliothis virescens* las cuales fueron seleccionadas por su resistencia a Cry1Ab, a nivel de laboratorio, para Cry1Ab, y resultaron ser resistentes también para Cry1Fa (Granero *et al.*, 1996; Tabashnik *et al.*, 1994).

La naturaleza química de los receptores que se han caracterizado, ha demostrado que esta es compleja y podría depender tanto del insecto como de la toxina en cuestión. Un ejemplo de estos receptores son una Aminopeptidasa N y un tipo de Caderina (Schnepf *et al.*, 1998), pero es muy probable que participen otro tipo de proteínas.

En general, el modo de acción de las proteínas Cry a nivel molecular, como es el reconocimiento de la toxina y la unión al receptor no es del todo clara, por lo que la caracterización de estos receptores, es un paso importante en la elucidación de este mecanismo, lo cual permitirá un mejor manejo de las toxinas de Bt, para evitar la aparición de resistencia en los insectos tratados.

Uno de los lepidópteros de mayor importancia en la agricultura es *Trichoplusia ni*, el cual es combatido con varios formulados de Bt cepa HD-1, que contiene las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A y Cry2B. En 1994, Estada y Ferré reportaron valores de susceptibilidad muy bajos para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac y demostraron la presencia de unión saturable a las vesículas del intestino medio, donde Cry1Ab y Ac comparten el mismo receptor. No obstante, también se han encontrado diferencias en la susceptibilidad de *T. ni* hacia estas toxinas, para la clase 1, se han encontrado valores de toxicidad con variaciones de 1 a 300 veces. En este punto nos preguntamos: ¿Las colonias de insectos del norte de México son igualmente susceptibles a las toxinas de la familia Cry1?, ¿A que proteínas Cry presenta mayor sensibilidad?, ¿La afinidad por el receptor es similar a diversas toxinas?

HIPOTESIS

En base a lo anteriormente expuesto, nos planteamos la siguiente hipótesis: La colonia de *T. ni* del Norte de México mostrará diferente grado de susceptibilidad a las toxinas de la clase Cry1. Así mismo, el tipo de receptor será diferente a los reportados para otras especies de lepidópteros.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue determinar el espectro de especificidad de las toxinas de la Clase Cry1 hacia *T.ni* y proponer un modelo de unión de la subclase Cry1A.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Determinar la dosis letal media (LC_{50}) de las toxinas de la clase Cry1 en *T. ni*.
- 2.- Identificar las proteínas receptoras para la subclase Cry1A en vesículas de intestino medio de *T. ni*.
- 3.- Implementar un sistema de unión y competencia homóloga y heteróloga en vesículas de *T. ni*.
- 4.- Conocer las constantes de afinidad y número de receptores para las toxinas de la subclase Cry1.
- 5.- Conocer la naturaleza química del receptor para Cry1Ac.

ANTECEDENTES

El desarrollo de la agricultura ha promovido el uso de sustancias químicas para combatir plagas, malezas y microorganismos fitopatógenos, que disminuyen grandemente el rendimiento de las cosechas, destacándose los insecticidas como los de mayor uso. Sin embargo la aparición de resistencia, la alta residualidad y toxicidad inespecífica, ha motivado la búsqueda de estrategias en el manejo de plagas, como el control biológico con entomófagos y entomopatógenos. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una prometedora alternativa para el control de algunos insectos fitófagos y vectores, ya que su espectro de toxicidad no afecta insectos benéficos, plantas o animales, incluyendo al hombre (Estada y Ferré, 1994).

Bt es un bacilo Gram-positivo, de 1.0 a 1.2 μm de diámetro y 3 a 5 μm de largo que durante la etapa de esporulación, sintetiza un cuerpo parasporal (cristal) de naturaleza proteica, que resulta tóxico para larvas de algunos insectos. Este cristal puede estar formado por uno o mas tipos de proteínas Cry o δ -endotoxinas. La actividad insecticida de Bt ha sido comprobada en dípteros (larvas y adultos), coleópteros (larvas y adultos) y en lepidópteros (larvas) y en reciente desarrollo en los órdenes: Hymenóptera (hormigas), Homóptera (áfidos), Mallophaga (piojos), también en algunos nemátodos parásitos de mamíferos y en tremátodos parásitos de animales (Ellar. 1997).

Bt puede sintetizar otras biomoléculas como las α -exotoxinas, proteínas termolábiles tóxicas para ratones y algunos lepidópteros; β -exotoxina, que son proteínas termoestables análogas de adenina; el factor *piojo*, con actividad contra ciertos piojos de mamíferos; varias exoenzimas, como quitinasas, fosfolipasa C y hemolisinas, que pueden desarrollar una patogenicidad secundaria, además, InA e InB proteínas represoras de la inmunidad en las larvas de insectos. Así mismo, se ha demostrado que algunas cepas de Bt subsp. *israelensis* y *morrisoni*, sintetizan proteínas (Cyt) con actividad lítica (*in vitro*) para eritrocitos humanos,

estas proteínas son tóxicas contra algunos dípteros y lepidópteros (Crickmore *et al.*, 1998; Haider y Ellar, 1899).

Recientemente se demostró que Bt sintetiza otro tipo de proteínas insecticidas (VIP) que son producidas tanto en fase vegetativa, como durante la esporulación, y resultan tóxicas para varios lepidópteros (Yu, *et al.*, 1997). Sin embargo, el compuesto tóxico mas importante, desde el punto de vista de actividad biológica y comercial es la δ -endotoxina.

El mecanismo por el cual las δ -endotoxinas de Bt pueden resultar tóxicas para algunos insectos, se han estudiado abordando dos áreas principales: a) estructura y estabilidad de la toxina; b) anatomía y fisiología del insecto.

a).- Estructura de las toxinas Cry: Análisis de los cristales de diferentes subespecies de Bt, muestran que los cuerpos de inclusión están formados por uno o varios polipéptidos con una masa molecular de 25-140 kDa (Höfte y Whiteley, 1989). Estas toxinas son sintetizadas en forma de protoxinas, que deberán ser procesadas proteolíticamente, para generar el fragmento tóxico. Se ha demostrado que el fragmento mínimo necesario para que las toxinas Cry1 conserven su actividad biocida, se localiza en el extremo amino terminal (N-terminal), produciendo un fragmento de 60-70 kDa (Fig.1) (Chestukina *et al.*, 1990). La porción carboxilo terminal (C-terminal) no participa en la actividad tóxica y se especula que solo participa en la formación del cristal (Bietlot *et al.*, 1990; Wabiko *et al.*, 1985).

El alineamiento y comparación de la estructura primaria de las toxinas Cry1, Cry2, Cry3 y Cry4, reveló la presencia de 5 bloques de homología en la fracción tóxica y tres en la región C-terminal (Fig. 2). Esto indica que la secuencia de aminoácidos guarda una organización muy conservada y podría deberse a que

todas las toxinas comparten características similares como son el procesamiento y plegamiento.

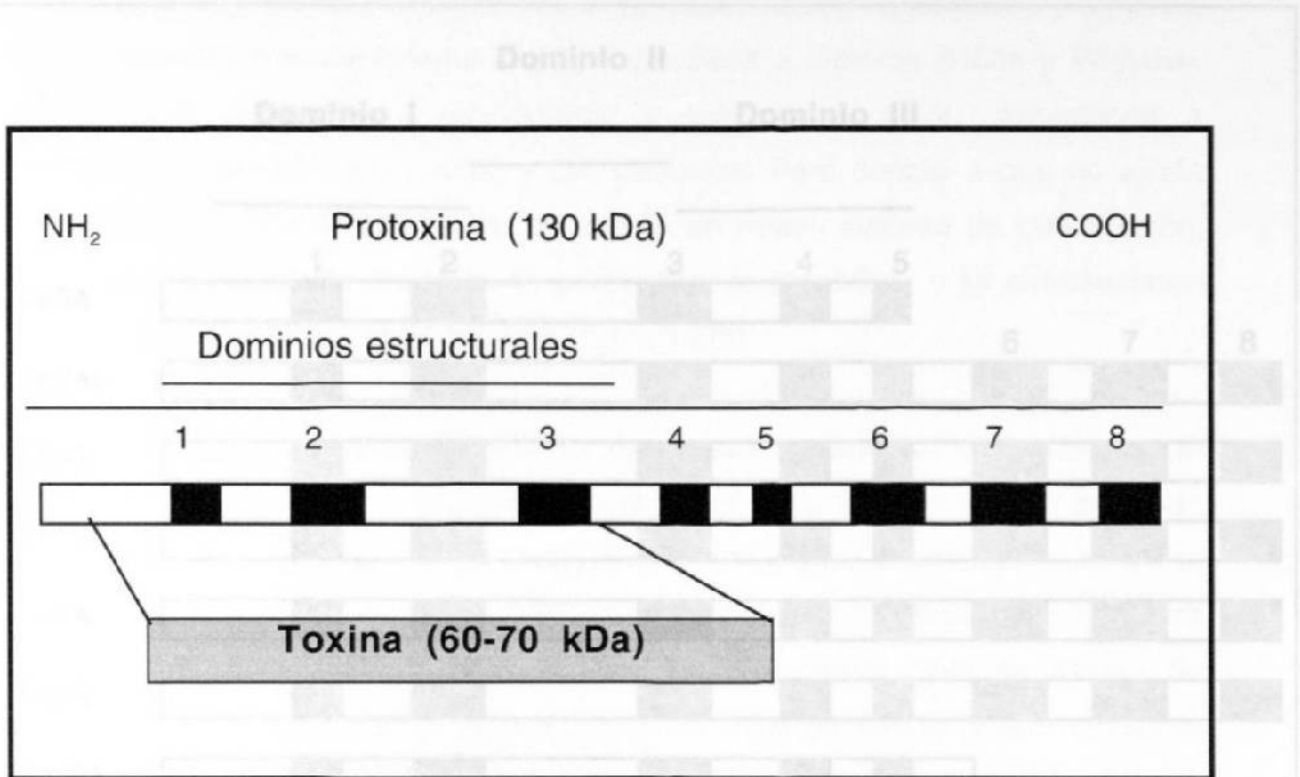


Figura. 1. Estructura de las δ -endotoxinas clase Cry1. La protoxina consta de alrededor de 1180 residuos y la toxina de 590-612.

Clasificación: Los esfuerzos por clasificar las diferentes cepas de Bt, estuvieron basados en serología flagelar (H). De esta manera, hoy en día se conocen alrededor de 54 diferentes grupos y más de 80 serovariedades (Lecadet, 1994). Sin embargo, con el aislamiento de nuevas cepas y la clonación de un gran número de genes *cry*, este sistema se vio sensiblemente limitado, ya que no establece correlación alguna entre el serotipo y la gama de hospedero. Por tal motivo, se recurrió a un nuevo sistema, basado en la talla molecular de las proteínas Cry y en la especificidad hacia el hospedero (Höfte y Whiteley. 1989).

Figura 2. Representación esquemática de los bloques de homología en la familia de proteínas Cry. Los bloques están representados un número y el tamaño relativo de cada uno.

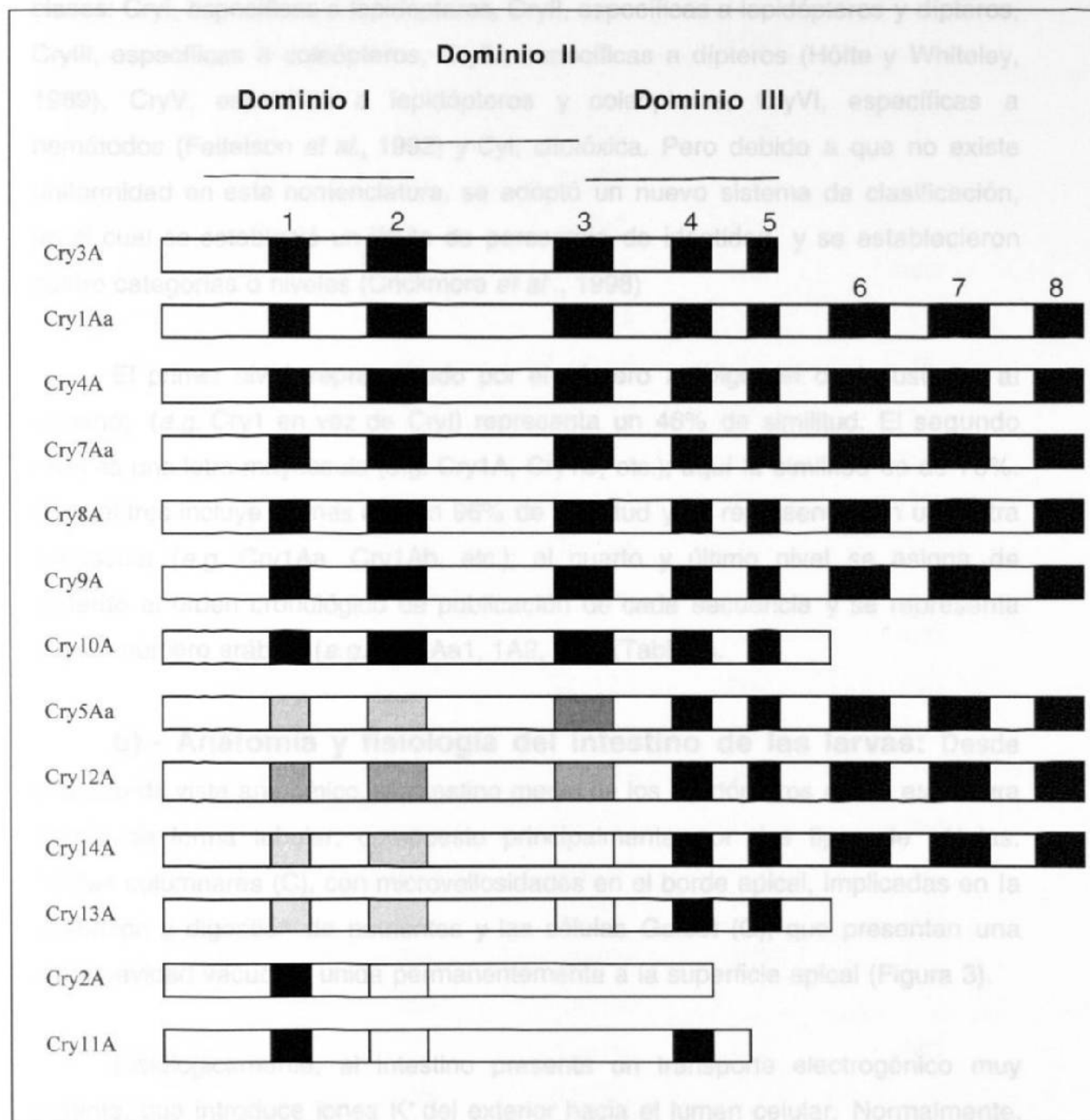


Figura 2. Representación esquemática de los bloques de homología en la familia de proteínas Cry. Los bloques están representados un número y el tamaño relativo de cada uno.

De acuerdo a la comparación múltiple de la secuencia de aminoácidos, a partir de la secuencia nucleotídica del gen, la clasificación se dividió en seis clases: CryI, específicas a lepidópteros, CryII, específicas a lepidópteros y dípteros, CryIII, específicas a coleópteros, CryIV, específicas a dípteros (Höfte y Whiteley, 1989), CryV, específica a lepidópteros y coleópteros, CryVI, específicas a nemátodos (Feitelson *et al.*, 1992) y Cyt, citotóxica. Pero debido a que no existe uniformidad en esta nomenclatura, se adoptó un nuevo sistema de clasificación, en el cual se estableció un límite de porcentaje de identidad, y se establecieron cuatro categorías o niveles (Crickmore *et al.*, 1998)

El primer nivel, representado por el número arábigo (el cual sustituye al romano; (e.g. Cry1 en vez de CryI) representa un 46% de similitud. El segundo nivel es una letra mayúscula (e.g. Cry1A, Cry1B, etc.); aquí la similitud es de 78%. El nivel tres incluye toxinas con un 96% de similitud y se representa con una letra minúscula (e.g. Cry1Aa, Cry1Ab, etc.); el cuarto y último nivel se asigna de acuerdo al orden cronológico de publicación de cada secuencia y se representa con un número arábigo (e.g. Cry1Aa1, 1A2, etc.) (Tabla 1).

b).- Anatomía y fisiología del intestino de las larvas: Desde el punto de vista anatómico, el intestino medio de los lepidópteros es una estructura simple de forma tubular, compuesto principalmente por dos tipos de células: células columnares (C), con microvellosidades en el borde apical, implicadas en la absorción y digestión de nutrientes y las células Golbet (G), que presentan una larga cavidad vacuolar, unida permanentemente a la superficie apical (Figura 3).

Fisiológicamente, el intestino presenta un transporte electrogénico muy potente, que introduce iones K^+ del exterior hacia el lumen celular. Normalmente, un intestino puede generar hasta 150 mV y producir $2mA\text{-cm}^2$, a nivel eléctrico esto lo convierte en uno de los tejidos epiteliales más activo (Knowles y Dow, 1993).

Tabla 1. Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Toxina	Peso Molecular (kDa)	Hospedero	Toxina	Peso Molecular (kDa)	Hospedero
Cry1A	133	L	Cry8C	130	C
Cry1B	139	L	Cry9A	129	L
Cry1C	135	L	Cry9B	126	L
Cry1D	133	L	Cry9C	130	L
Cry1E	133	L	Cry9D	ND	ND
Cry1F	133	L	Cry10A	78	D
Cry1G	132	ND	Cry11A	72	D
Cry1H	133	ND	Cry11B	80	D
Cry1I	81	L	Cry12A	142	N/A
Cry1J	133	ND	Cry13A	88	N
Cry1K	138	ND	Cry14A	72	D/C
Cry2A	71	L/D	Cry15A	34	L
Cry3A	74	C	Cry16A	ND	ND
Cry3B	75	C	Cry17A	ND	ND
Cry3C	73	C	Cry18A	ND	ND
Cry4A	134	D	Cry19A	65	D
Cry4B	128	D	Cry19B	ND	ND
Cry5A	152	N/A	Cry20A	86	D
Cry5B	139	C	Cry21A	ND	ND
Cry6A	54	N/A	Cry22A	ND	ND
Cry6B	44	N/A	Cyt1A		
Cry7A	129	C	Cyt1B	ND	ND
Cry8A	131	C/A	Cyt2A		
Cry8B	133	C	Cyt2B		D

A: ácaros, C: coleópteros, D: dípteros, L: lepidópteros, N: nemátodos, ND: no determinado. Adaptado de Crickmore et al., 1998.

En este sentido, se ha demostrado que la δ -endotoxina afecta inicialmente a las células columnares, ya después de envenenamiento, los pliegues basales desaparecen a consecuencia de un hinchamiento generalizado; lo que ocasiona un mecanismo de regulación osmótica inefectivo, a tal grado que el citoplasma se ve translúcido y las células llegan a lisarse. Las células G, aparentemente no sufren un daño directo, por lo que cualquier efecto es resultado de efecto secundario de las células C (Knowles y Ellar, 1987; Endo y Nishiitsutsuji-Uwo, 1980).

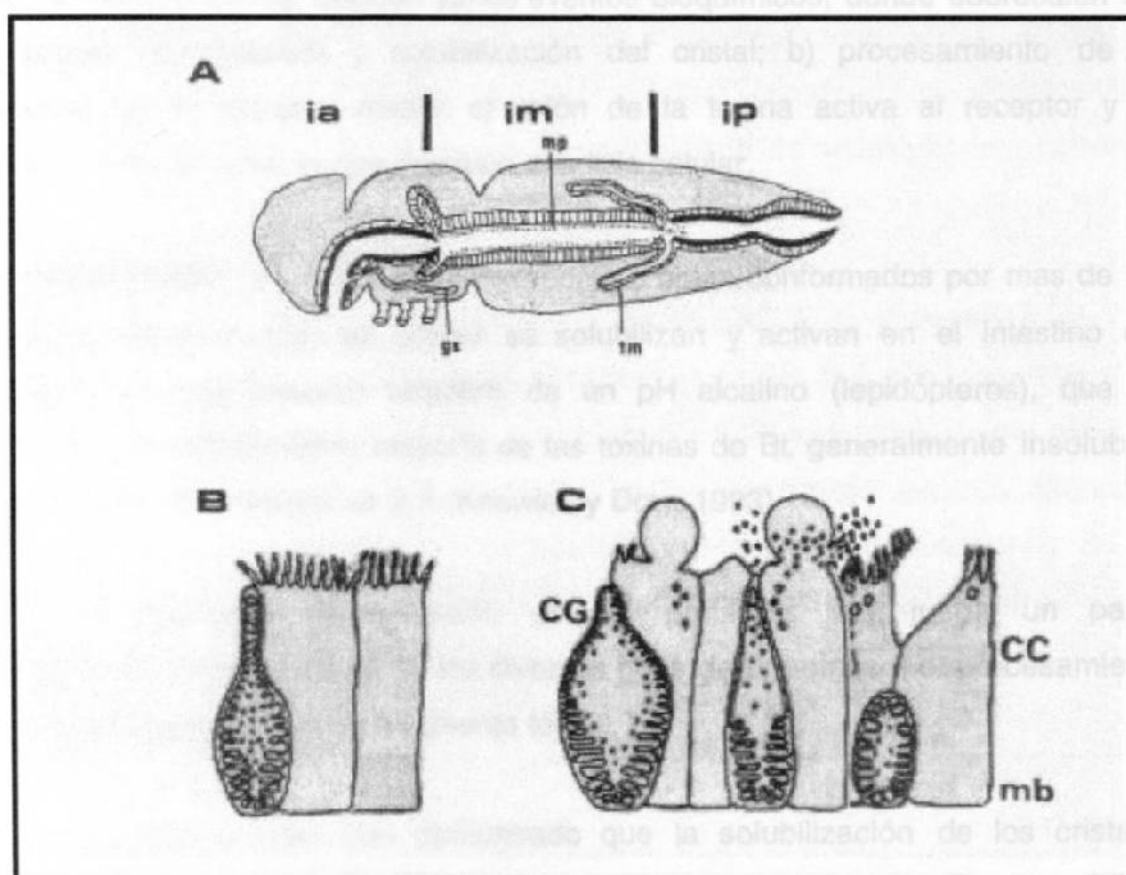


Figura 3. Esquema representativo de la morfología celular del intestino de larvas de lepidópteros y de las lesiones causadas por la ingestión de esporas-cristales de Bt por larvas susceptibles. **A**, larva; **B**, intestino sano; **C**, intestino lesionado por las toxinas de Bt. **ia**, intestino anterior; **im**, intestino medio; **ip**, intestino posterior; **gs**, glándulas salivales; **tm**, tubulos de Malpigy; **mp**, membrana peritrófica; **mb**, membrana basal; **CC**, células columnares; **CG**, células Golbet.

MECANISMO DE ACCION: Para que las toxinas de Bt ejerzan su acción letal, es necesario que la larva ingiera la mezcla espora-cristal y una vez que ha ocurrido esto, los síntomas visibles son: la larva cesa de alimentarse, rejurgita contenido intestinal, se mueve lentamente, sufre parálisis del tracto digestivo, parálisis total y finalmente, la muerte (Bai *et al.* , 1993).

Aunque si bien, las δ -endotoxinas pueden atacar a diversos órdenes de insectos, éstas actúan de manera muy similar. Para que se lleve a cabo su acción letal, es preciso que se realicen varios eventos bioquímicos, donde sobresalen los siguientes: a) ingestión y solubilización del cristal; b) procesamiento de la protoxina en el intestino medio; c) unión de la toxina activa al receptor y d) formación de un poro, lo que conduce a la lisis celular.

Solubilización: Los cristales paraesporales están conformados por más de mil unidades de protoxina, las cuales se solubilizan y activan en el intestino del insecto, que este proceso requiere de un pH alcalino (lepidópteros), que es esencial para solubilizar la mayoría de las toxinas de Bt, generalmente insolubles a valores de pH menores de 9.5 (Knowles y Dow, 1993).

La adecuada solubilización de las proteínas Cry juega un papel fundamental en la liberación de los diversos tipos de proteínas y el procesamiento proteolítico para generar el fragmento tóxico.

Estudios *in vitro*, han demostrado que la solubilización de los cristales depende de la composición de las proteínas que lo conforman. En *Bt aizawai* (HD-133), el cristal está formado por tres toxinas (Cry1Ab, Cry1C y Cry1D) donde la presencia de Cry1Ab da como resultado un cristal más soluble, el cual incrementó la toxicidad hacia larvas de *S. frugiperda*, pero no para *P. interpunctella*, donde se observó un efecto contrario (Aronson *et al.* , 1991)

Otro factor que puede influir en la solubilización de los cristales, se ha relacionado con el contenido de enlaces disulfuro, este efecto solo se ha observado en algunas proteínas Cry que carecen de actividad insecticida y no se ha generalizado hacia proteínas Cry tóxicas (Du *et al.*, 1994)

Por otra parte, se ha visto que la solubilización podría ser un factor determinante en el probable desarrollo de resistencia, tal y como se ha sugerido para *P. interpunctella* (Schnepf *et al.*, 1998)

En otros insectos, como coleópteros y dípteros, este efecto no se ha demostrado, ya que el conocimiento básico es muy limitado. En *L. decemlineata* se reportó que para que Cry3A pueda ser solubilizada es necesaria una hidrólisis previa con proteasas tipo quimiotripsina (Carrol *et al.*, 1997).

Activación: Una vez solubilizadas, las protoxinas son procesadas por las proteasas presentes en el intestino de la larva. En las proteínas Cry1 el procesamiento proteolítico remueve los primeros 28-29 aminoácidos del extremo amino terminal, en el extremo carboxilo, el procesamiento es más intenso y extenso ya que se remueven los últimos 600 aminoácidos en secciones de 10 kDa, originando un fragmento de 55-65 kDa resistente a posteriores digestiones (Fig. 4) (Chestukina *et al.*, 1990; Choma *et al.*, 1991).

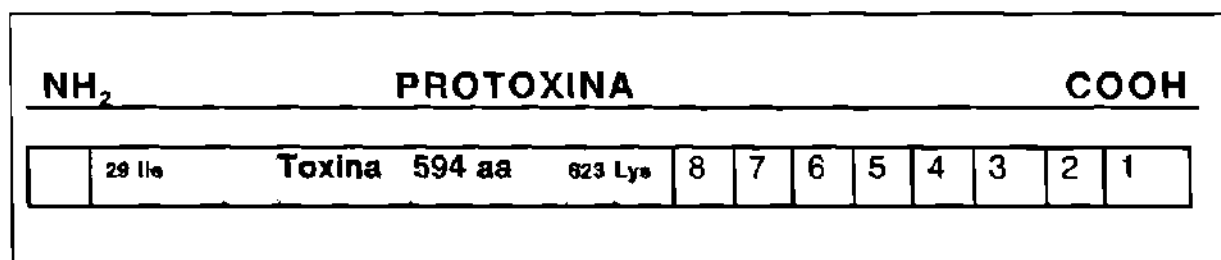


Figura 4. Esquema del procesamiento proteolítico de Cry1Ac. Los números del 1-8 representan los fragmentos que son eliminados por el procesamiento.

En las proteínas Cry1, algunos residuos localizados al centro de la toxina pueden ser blanco del ataque de proteasas tipo tripsina o quimiotripsina, como los dipéptidos arginil-isoleucina en la posición 526 y 601; leucin-leucina en 157, 628 y 721; o glicina-isoleucina en la posición 689 de la protoxina. En general, arginina, Leucina y Glicina pueden ser determinados como los sitios de corte de estas proteasas (Ogiwara *et al.*, 1992).

Un procesamiento similar se ha visto en las protoxinas Cry 4A y Cry4B, donde el procesamiento se da en el extremo carboxilo. En cambio, las protoxinas Cry 2A, son hidrolizadas fuertemente en el extremo amino terminal y el extremo carboxilo es hidrolizado poco o nada (Ellar, 1997).

Evidencias muestran que en el intestino de la larva, el procesamiento proteolítico de la protoxina, tiene un papel importante en el desarrollo de la actividad larvicida, esto se ha visto en Bt var. *aizawai* IC1(Cry1Ab) (Haider y Ellar, 1989). Esta toxina tiene actividad dual contra *P. brassicae* y *Aedes aegypti*. Sin embargo, esta actividad depende del procesamiento, cuando se procesa con tripsina resulta ser tóxica para el lepidóptero pero cuando se digiere con el contenido intestinal del mosquito, la actividad cambia y ahora lo es para *A. aegypti*. Este cambio en la especificidad está determinado por el extremo C-terminal de la toxina, por los residuos 524-558 para el díptero y 558-595 para el lepidóptero.

En el contenido intestinal de *H. virescens* y *A. aegypti*, las proteasas que realizan este procesamiento se han identificado principalmente como preteinasas tipo tripsina y tipo quimiotripsina y en niveles muy bajos se ha encontrado actividad de elastasa (Johnston *et al.*, 1995; Yang y Davies, 1991). En *Tenebrio molitor* se ha detectado actividad proteolítica de cisteína y serin proteasas y en *L. decemlineata* proteasas tipo quimiotripsina (Ellar, 1997).

Deficiencias en el procesamiento proteolítico de las δ -endotoxinas, pudieran ser un posible mecanismo en el desarrollo de resistencia en algunos insectos. En una colonia de *P. interpunctella* resistente a *Bt* subsp. *entomocidus*, se han detectado niveles de quimi tripsina 13 veces menores de los encontrados en larvas sensibles (Zhu *et al.*, 1997); y en *P. interpunctella* resistente a *Bt* HD-198, la escasa actividad proteolítica después de inducir la resistencia, puede ser atribuida a una baja concentración, una alteración en la estructura o una inhibición de la actividad catalítica de las proteasa involucradas en la activación (Oppert *et al.*, 1994).

En *C. fumiferana*, se ha identificado una proteína de 75 kDa con actividad de elastasa, que precipita las protoxinas de *Bt* subsp. *softa*, esta precipitación limita la proteólisis de la protoxina y consecuentemente causa la pérdida de actividad larvicida (Milne *et al.*, 1995; Milne *et al.*, 1998).

Otro elemento que puede influir con el procesamiento es el ADN. Este efecto se ha encontrado en Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, donde se ha reportado que fragmentos de 20 kpb de ADN están asociados a la mitad carboxilo terminal de las proteínas del cristal. Mediante análisis del cristal se ha encontrado que 3 pb de ADN están asociados por molécula de protoxina y que solamente una pequeña región del extremo amino-terminal de la toxina interactúa con el ADN. Este no es susceptible a la degradación con nucleasas o disolución con NaCl, a menos que la protoxina sea removida o proteolizada a toxina, por lo que se propone que el ADN es esencial para mantener la integridad conformacional del cristal y generación de la toxina. (Bietlot *et al.*, 1993; Clairmont *et al.*, 1998).

No obstante la importancia que representa la activación como un paso determinante en el desarrollo de la actividad insecticida, en algunos casos, las proteasas no intervienen en los mecanismos de resistencia. Por ejemplo, en *P. interpunctella* sensible y resistente, se ha visto que al digerir cristales de HD-1 y

HD-73 con contenido intestinal de estos insectos, los patrones de digestión son similares (Johnson *et al.*, 1990). Esto es apoyado por ensayos realizados con el contenido intestinal de *B. mori*, *S. littura*, *P. xylostella*, *Adoxphyes sp* y *Musca domestica*, los cuales muestran que la activación del cristal de las cepas HD-1 y HD-73 genera fragmentos de 55 kDa para ambas toxinas, los cuales resultaron tóxicos para *P. xylostella* y no tóxicos para *M. domestica*. Estos datos sugieren que la activación no es el factor limitante en la resistencia observada en mosca, y que posiblemente en este insecto existen otros factores que intervienen posteriormente (Ogiwara *et al.*, 1992).

Unión al receptor: Posterior a la activación, el fragmento tóxico penetra la membrana peritrófica y se une a sitios específicos localizados en las microvellosidades de la membrana apical de las células columnares. Esta unión es la etapa determinante de la especificidad de las toxinas Cry. Hofmann (1989) y Van Rie (1989), mediante estudios de unión y competencia con 1Aa, 1C y 1E, demostraron correlación entre la afinidad de la toxina y la actividad insecticida, concluyendo que una alta afinidad era garantía de toxicidad, contrastando con una baja o nula unión en insectos no susceptibles. Para Cry1Aa, se observó una unión saturable con vesículas de *M. sexta* y *H. virescens*, para los cuales esta proteína es altamente tóxica, en cambio con *S. littoralis* no se observó esta unión, lo que correlaciona con la escasa o nula actividad tóxica.

En ensayos similares las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, indican que las diferencias en toxicidad son debidas a la afinidad por un sitio de unión y también a la concentración de éstos. Los resultados demuestran que para *M. sexta*, que es igualmente sensible a las tres toxinas, y para *H. virescens*, que presenta diferente sensibilidad, las constantes de unión son semejantes, pero la concentración de sitios para cada toxina son significativamente diferentes (Van Rie *et al.*, 1990).

Aunque si bien, la unión es requisito para la toxicidad, ésta no siempre es dependiente del grado de afinidad de la toxina por el receptor, tal y como se

demostró con las toxinas HD1-9 y HD-73 en *L. dispar*, donde se encontró una correlación inversa entre la unión al receptor y la toxicidad. Los valores de unión fueron muy semejantes, pero HD1-9, mostró constantes de disociación casi 20 veces mayor, a pesar de ser 400 veces más tóxica que HD-73 (Wolfersberger, 1990).

Con *S. frugiperda*, se ha reportado que Cry1Ac se une de manera saturable a vesículas de intestino medio, pero esta proteína es atóxica contra este lepidóptero (Luo *et al.*, 1999).

Otro raro ejemplo de ausencia de correlación entre la afinidad y la actividad insecticida, fue reportado por Liang y Dean (1995), quienes evaluaron las constantes de afinidad y disociación de Cry1Aa, Cry1Ab, y Cry1Ac, con vesículas del intestino medio de *L. dispar*, confirmando que la afinidad de Cry1Ab no está directamente relacionada con la actividad de la toxina y encontraron una correlación directa entre el rango de unión y toxicidad.

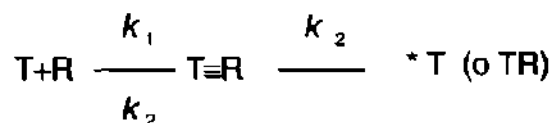
La unión toxina-receptor involucra dos pasos secuenciales: a) unión reversible, esto es la unión entre la toxina y el receptor y b) unión irreversible, exclusivamente asociada con la inserción de la toxina en la membrana apical (Hofmann *et al.*, 1988).

Análisis de las cinéticas de unión reversible e irreversible permiten proponer la siguiente ecuación para una unión estrictamente reversible:



donde, T, Toxina; R, Receptor; T≡R, unión reversible entre la Toxina y el Receptor; K_d , Constante de disociación (Schnepf *et al.*, 1998).

Y cuando realmente la toxina llega a estar asociada irreversiblemente con la membrana apical por inserción es representada por la ecuación cinética:



donde, *T, Toxina unida irreversiblemente y probablemente insertada en la membrana, sin asociarse al receptor; *TR, Toxina unida irreversiblemente con el receptor. (Schnepf *et al.*, 1998).

Estudios de unión de Cry1Ab y Cry1Ac con el receptor purificado de *M. sexta* han mostrado unión irreversible (Masson *et al.*, 1995) también para Cry1Ac en *L. dispar* (Valaitis *et al.*, 1997).

Recientes reportes de moléculas de Cry1Ab truncadas, conteniendo solamente el dominio II y III pueden aun unirse a los receptores intestinales, pero solamente en forma reversible, esto apoya el hecho de que la unión irreversible requiere de la inserción del dominio I (Flores *et al.*, 1997).

Se han sugerido modelos muy variados de como se inserta la toxina en la membrana apical, teniendo en cuenta la estructura tridimensional de la toxina, el tipo de lesión, la proporción y tamaño de los poros. Paralelo a esto, numerosas investigaciones han abordado los temas de identificación de receptores, su caracterización bioquímica y posteriormente la clonación de algunos de ellos.

Las proteínas receptoras para diferentes proteínas Cry, se han identificado mediante ensayos con toxinas marcadas radiactivamente e inmunodetecciones. (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas receptoras para algunas δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* en vesículas del intestino medio de insectos.

Toxina	PROTEINA kDa										Referencia	
	<i>H.v</i>	<i>H.z</i>	<i>S.l.</i>	<i>S.e</i>	<i>S.lt</i>	<i>M.s</i>	<i>L.d</i>	<i>T.m</i>	<i>A.s</i>	<i>T.o</i>		
Cry1Aa	170	170	160	200	150						Oddou <i>et al.</i> , 1990	
				180							Martínez <i>et al.</i> 1994	
						210					Francis y Bulla, 1997	
Cry1Ab	170	170	160	200	150						Oddou <i>et al.</i> , 1993	
				180							Vadlamudi <i>et al.</i> ,1993	
						210					Francis y Bulla,1997	
						210					Oddou <i>et al.</i> , 1993	
		140	150	125	130	125						
	120	140	125	115								
Cry1Ac	150	150			148	120					Garczynzki <i>et al.</i> , 1991	
	120	120										
	105	105										
	90	90										
	81	64										
	64											
			120									Sanchis <i>et al.</i> , 1994
			140									
						120						Sangadala <i>et al.</i> , 1994
						65						
					120						Kgnith, <i>et al.</i> , 1994	
					210						Francis y Bulla, 1997	
							100				Valaitis <i>et al.</i> , 1995	
							100				Lee <i>et al.</i> , 1996	
Cry1C	40		40	40	40						Oddou <i>et al.</i> , 1993	
			65								Sanchis <i>et al.</i> , 1993	
			40									
					106						Lou <i>et al.</i> ,1996	
Cry3								144			Bellifore <i>et al.</i> , 1994	
Cry4D									148		Feldman <i>et al.</i> , 1995	

H.v, *Heliothis virescens*; *H.z*, *Helicoverpa zea*; *S.l.*, *Spodoptera litoralis*; *S.e*, *Spodoptera exigua*, *S.lt*, *Spodoptera litua*; *M.s*, *Manduca sexta*; *P.b*, *Pieris brassicae*; *L.d*, *Lymantria dispar*; *T.m*, *Tenebrio molitor*; *A.s*, *Anopheles stephensi*; *T.o*, *Tipuca oleacea*.

En diferentes insectos, se han reportado proteínas de muy variada talla molecular como las encargadas de reconocer y unir a las toxinas Cry, en *H. virescens*, por ejemplo, se reporta una proteína única que reconoce a Cry1Aa y para Cry1Ab y Cry1Ac un complejo de varias proteínas. En cambio, en *T. molitor*, Cry3 reconoce a una sola proteína (Tabla 2).

Algunos de los receptores identificados se han caracterizado bioquímicamente como:

a). Aminopeptidasa N (APN): Las APN son una familia de proteínas localizadas generalmente, en células del tracto digestivo. Existe evidencia que sugiere su participación como receptores para algunos hongos y virus, como coronavirus y herpesvirus (Knight *et al.*, 1995). Las APN han sido localizadas en el intestino medio de diversos lepidópteros y se ha demostrado que unen algunas proteínas Cry (Tabla 3). Algunas de estas APNs han sido clonadas y deducida la secuencia de aminoácidos. La APN de *M. sexta*, presenta una secuencia de 40 residuos, 20 hidrofóbicos, típicos de la secuencia-señal de las proteínas de membrana y 4 potenciales sitios de glicosidación en el extremo N-terminal, mientras que el C-terminal, contiene un glicosilfosfatidilinositol, lo que sugiere que éste podría ser utilizado como medio de anclaje a la membrana (Knight *et al.*, 1995; Sanchis y Ellar, 1994).

b). Caderina: La proteína receptora para Cry1Ab (BT-R₁), fue el primer receptor que se clonó y expresó a partir de un cDNA de *M. sexta*, este receptor mostró un 30 - 60% de similitud y un 20- 40% de identidad a los miembros de la familia de las caderinas, que son glicoproteínas transmembranales encargadas de mediar la agregación celular, dependiente de calcio; pueden estar involucradas en el transporte membranar, posiblemente esta función es similar al transporte de péptidos en las proteínas tipo caderinas de humanos (Vadlamudi *et al.*, 1995).

Existen reportes donde se sugiere la participación de otro tipo de proteínas, específicamente una fosfatasa de 65 kDa, la cual unió a Cry1Ac en *M. sexta*

(Sangadala *et al.*, 1994). Sin embargo, no se ha demostrado actividad similar en otros insectos.

Tabla 3.- Receptores para proteínas Cry.

Toxina	Insecto	(kDa)	Referencia
Cry1Aa	<i>B. mori</i>	120 A	Yaoi <i>et al.</i> , 1997
	<i>B. mori</i>	180 C	Keeton <i>et al.</i> , 1998
	<i>M. sexta</i>	210C	Keeton y Bulla, 1997
Cry1Ab	<i>M. sexta</i>	120 A	Denolf <i>et al.</i> , 1997
		210 C	Vadlamudi <i>et al.</i> , 1995
	<i>P. xylostella</i>	120 A	Denolf <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ac	<i>M. sexta</i>	120 A	Knight <i>et al.</i> , 1995
		65 F	Sangadala <i>et al.</i> , 1995
	<i>H. virescens</i>	170 A	Luo <i>et al.</i> , 1997
	<i>L. dispar</i>	120 A	Valaitis <i>et al.</i> , 1997
	<i>P. xylostella</i>	120 A	Luo <i>et al.</i> , 1997
Cry1C	<i>M. sexta</i>	106 A	Luo <i>et al.</i> , 1996

A, Aminopeptidasa N; C, Caderina; F, Fosfatasa

Formación de poro: Posterior a la unión al receptor, la toxina forma un poro o canal iónico. Sin embargo, la naturaleza de éstos es aún controversial, se han descrito como un poros líticos que no son específicos para algunos iones en particular y alternativamente, como canales específicos de iones, que interumpen el potencial membranal, pero no necesariamente lisa las células (Schnepf *et al.*, 1998).

Mediante una variedad de sistemas como: medición de circuitos electrostáticos en intestinos aislados; estudios de permeabilidad en vesículas y liposomas, en

líneas celulares de insectos y formación de canales iónicos en bicapas lipídicas, se han evaluado las lesiones causadas por las toxinas Cry de Bt y han demostrado que las lesiones son:

1. K⁺ selectivas.
2. Permeables a cationes.
3. Permeable a cationes y pequeñas moléculas como alanina.
4. Permeable a pequeños solutos sin carga, como sacrosa.

(Sacchi *et al.*, 1986; Wolfersberger, 1989; Wolfersberger, 1989; Knowles y Ellar, 1987).

De acuerdo a la estructura de las δ -endotoxinas, se han propuesto dos modelos que expliquen su inserción en la membrana plasmática de las células columnares: Modelo del cortaplumas, Holdman y Ellar (1990), propusieron a las hélices $\alpha 5$ y $\alpha 6$ como las encargadas de insertarse en la membrana y formar poros. Por las características anfipáticas de las α hélices, $\alpha 5$ y $\alpha 6$, se encuentran al extremo del dominio I, del lado opuesto de la membrana y por lo tanto, podrían saltar del dominio I, parecido a un cortaplumas abierto. El resto del dominio I, no requiere un rearreglo posterior aunque $\alpha 4$, probablemente podría girar hacia el lado de $\alpha 3$.

Modelo del paraguas, un par de α hélices ($\alpha 6$ y $\alpha 7$ ó $\alpha 4$ y $\alpha 5$), permanecen del lado exterior del dominio I, hasta insertarse dentro de la membrana, mientras el resto de las hélices sufren un rearreglo conformacional, quedando separadas en la superficie de la membrana, semejando la varilla de un paraguas. Recientemente se ha postulado que el par de α hélices que se inserta en la membrana de forma antiparalela son $\alpha 4$ y $\alpha 5$, mientras $\alpha 7$ sirve como un monitoreador de la inserción para iniciar el rearreglo estructural del dominio formador del poro (Gaitz, *et al.*, 1998).

En ambos modelos la inserción de parte del dominio I, puede estar acompañada de la formación de oligómeros de varias moléculas de toxina, que originarán los poros con un canal central acuoso.

MATERIALES Y METODOS

Origen de los microorganismos: Se utilizaron cepas de *B. thuringiensis* recombinantes que expresan un solo tipo de toxina, obtenidas de la colección de cepas del Laboratorio de Genética Bioquímica de la Facultad de Biología, Universidad de Valencia. La cepa HD-73 se obtuvo de la colección del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas utilizadas para la producción de proteínas Cry.

TOXINA	CEPA	MARCADOR
Cry1Aa	EG 1273	Tetraciclina, 10 µg/ml
Cry1Ab	EG 7077	Tetraciclina, 10 µg/ml
Cry1Ac	EG 11070	Cloranfenicol, 3 µg/ml
Cry1Ac	HD-73	Ninguno
Cry1B	EG 11916	Eritromicina, 3 µg/ml
Cry1Ca	EG 1081	Cloranfenicol, 3 µg/ml
Cry1Da	EG 7300	Cloranfenicol, 3 µg/ml
Cry1Ea	EG 11901	Cloranfenicol, 3 µg/ml
Cry1Fa	EG 11069	Cloranfenicol, 3 µg/ml
Cry1J	EG 7279	Cloranfenicol, 4 µg/ml

Almacenadas a 20°C en glicerol al 50%.

Obtención de proteínas Cry: Las cepas se inocularon en cajas con agar CCY que contenía el marcador de selección adecuado para cada cepa y se incubó a 29°C hasta esporulación (3-4 días). Una vez comprobada la producción de cristales característicos, el cultivo fue centrifugado y el paquete celular, fue resuspendido en agua y pasteurizado 30 min/70°C. Con esta suspensión se inocularon matraces conteniendo caldo CCY más el marcador de selección, se incubaron a 29°C en agitación constante hasta esporulación (48-96 h). Mediante centrifugación se separó la mezcla esporas-cristales, la cual se llevó a NaCl 1M,

e inmediatamente se centrifugó a 7 000 Xg , el precipitado se lavó dos veces con NaCl 1M, EDTA 5 mM frío y se resuspendió en KCl 10 mM.

Solubilización: El precipitado obtenido en la fermentación, se resuspendió en tampón carbonatos (Na_2CO_3 , 50 mM; NaCl, 0.1 M; DTT, 10 mM) pH 11.5 y se incubó por 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14 000 Xg y se separó el sobrenadante.

Activación: El sobrenadante se ajustó a pH 8.0 con HCl concentrado y se adicionó tripsina tipo XIII, tratada con TPCK, en una relación de 1: 20 (mg tripsina / mg de toxina solubilizada) esto se incubó 2 h a 37°C. Posteriormente, se centrifugó a 14 000 Xg. Al sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas mediante Bradford. Los productos de la digestión enzimática se observaron en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, y fueron almacenados a -20°C.

Purificación por FPLC: Las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm de diámetro de poro, y se purificaron mediante FPLC con una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) equilibrada con Tampón A (Tris 20 mM pH 8.6) y la elución se realizó mediante un gradiente de 0-60% de Tampón B (Tris 20 mM, NaCl 1M pH 8.6). Las fracciones recogidas se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%.

Marcaje con NaI^{125} : El marcaje de Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se llevó a cabo mediante cloramina T, con la técnica descrita por Van Rie y col., (1989). A 5 μl de NaI^{125} (0.5 mCi) se le añadió en el siguiente orden de reacción: Cloramina T, 5 mg/ml; proteína Cry, 12 μg , después de 30 segundos, se adicionó metabisulfito sódico 23 mM y NaCl 1M, ambos en una proporción del 25 % del volumen final. Una vez terminada la reacción, la mezcla se separó en una columna de 1.7 X 18 cm empacada y equilibrada con poliacrilamida (Biogel P-30) y se eluyó con

tampón de marcaje (Tris-HCl, 20 mM; NaCl, 150 mM; pH 8.6 y 0.1% BSA). Las fracciones recolectadas se midieron en un contador gamma (Compugamma-1282, LKB). Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, con las muestras que presentaron mayor cantidad de emisión, para ello se ajustó cada muestra a 20 000 cpm, el gel se secó y se dejó en exposición con una placa fotográfica X-Omat S Film (XS 5) por 4 h. Las fracciones elegidas se mezclaron y se mantuvieron a 4°C en recipientes de plomo.

Determinación de la actividad específica de I^{125} -CryIAc: La actividad específica se determinó mediante la técnica de ELISA (Voller y Col., 1976). Se recubrieron las placas de ensayo con un anticuerpo policlonal contra las toxinas Cry1, diluido en tampón PBS, con sacarosa 6% y polietilenglicol 1% y se incubó a 4°C por 48 h. Posteriormente se adicionó la toxina Cry en PBS-BSA1% en una serie de diluciones desde 50 a 0.39 ng e incubó 1 h. Agregamos el anticuerpo monoclonal 4D-6 en PBS-BSA 1%, seguido de un Anti-IgG-ratón acoplado con fosfatasa alcalina, se uso PBS- Tween 80, 0.1% como tampón de lavado. La reacción se reveló con p-nitrofenilfosfato en dietanolamina 10%, $MgCl_2$ 0.1%. La densidad óptica (absorbancia) fue medida a 405 nm.

Población de *Trichoplusia ni*: Procedencia de la colonia: muestras de los insectos en estadio de pupa fueron enviados de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Mantenimiento en el laboratorio: La población se mantuvo en una cámara a 25°C y 80% de humedad relativa, con un fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 oscuridad, en estas condiciones la colonia de insectos cumplió ciclos completos (huevecillo-adulto) cada 25- 27 días. La dieta utilizada para su manutención se describe en el Apéndice A.

Ensayos de toxicidad: Los ensayos de toxicidad se realizaron con larvas neonatas de *T. ni*, para ello se prepararon cinco diluciones de cada una de las proteínas Cry a evaluar, en PBS-BSA 0.1%. Alícuotas de 50 μ l de cada dilución se aplicaron sobre la dieta artificial que previamente se depositó en placas de 24 pocillos circulares (2 cm² de superficie) y se dejó secar. Posteriormente se depositó una larva neonata por pocillo y al cabo de 5 días se determinó el porcentaje de mortalidad, y la LC₅₀ se determinó por análisis probit mediante el programa POLO-PC (Russell y col., 1977). Para cada dilución se realizaron tres repeticiones con 12 larvas, e igual número de experimentos se realizaron con PBS-BSA 0.1% como control.

Disección de intestinos: Los intestinos se obtuvieron a partir de larvas del quinto estadio, las cuales fueron puestas en hielo hasta que permanecieron inmóviles, mediante unas pinzas de disección se jaló un extremo de la larva, hasta sacar el intestino completo y se depositó inmediatamente en tampón MET frío (Manitol 0.3M, EGTA 5mM, Tris 17 mM pH 7.5). Se desecharon ambos extremos del intestino y al fragmento restante, se cortó transversalmente retirando completamente el alimento. Los intestinos medios fueron congelados en nitrógeno líquido, y posteriormente se almacenaron a -80°C.

Preparación de vesículas a partir de intestinos: Los intestinos almacenados en congelación se mezclaron con Tampón MET y se homogenizaron por 5 min, mantenidos en hielo. Posteriormente, añadimos un volumen de MgCl₂ 24 mM y se incubó durante 15 min en hielo, se centrifugó a 1600 Xg por 15 min y se desechó el precipitado. El sobrenadante fue centrifugado a 20 000 Xg durante 30 min/ 4°C, el precipitado obtenido se resuspendió en 0.5 vol con MET y se realizaron dos centrifugaciones idénticas a las anteriores, el precipitado final se resuspendió en MET diluido al 50% en agua, y se repartió en alícuotas que se mantuvieron a -80°C. La concentración de las proteínas de vesículas obtenidas, se calculó mediante el método de Bradford, utilizando una serie de diluciones de

concentración conocida de BSA, y el rendimiento de BBMV's se calculó a partir de los mg obtenidos / g de intestinos.

Ensayos de unión proteínas Cry- Receptor: 50 mg de proteínas de vesículas se separaron en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturizantes, éstos fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa, y se incubaron en TBS (NaCl, 150 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) mas Tween 20, 0.05%, leche, 1%, por 30 min a temperatura ambiente. Los filtros se incubaron toda la noche con las toxinas Cry activadas a una concentración de 1.5 mg/ml, se lavaron dos veces por 5 min con TBS, Tween 0.2% e incubados con un anticuerpo policlonal por 1h, se repitió el proceso de lavado e incubó con un anticuerpo Anti IgG-Conejo conjugado con fosfatasa alcalina por 1 h, la reacción se visualizó mediante la incubación con solución cromogénica (Tris-HCl, 100 mM; NaCl, 100 mM; MgCl₂, 50 mM; NBT, 10 mg; BCIP 5 mg).

Unión de Proteínas Cry biotiniladas-Receptor (ECL): Las proteínas de vesículas almacenadas a -80°C se descongelaron inmediatamente antes de usarse y se centrifugaron a 13 000 Xg a 4°C, el precipitado se resuspendió en el volumen necesario de PBS-BSA 0.1%, para llevar a una concentración final de 1 mg/ml. Los componentes de la reacción se adicionaron en el siguiente orden: tampón PBS-BSA 0.1%, proteína Cry biotinilada (10 ng) y proteínas de vesículas (10µg), para la realización de competencias se añadió un exceso de toxina no marcada (500 ng), el volumen de la mezcla de reacción fue de 100 µl y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 3 000 Xg, y se lavó con 500 µl de PBS-BSA 0.1%.

El precipitado se resuspendió en 20 µl de mezcla de lisis (Tris-HCl, 100 mM pH 6.8; SDS, 4.0%; glicerol, 20%; DTT, 100 mM; azul bromofenol 0.01%), y se hirvió durante 5 min. Estas muestras se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa,

las cuales se incubaron toda la noche en 100 mM ácido málico, 150 mM NaCl, 1% blocking reagent (Boehringer). Se lavaron con TBS (20 mM, Tris-HCl; 137 mM NaCl, pH 7.5) conteniendo 0.2% Tween 20 e incubaron durante 45 min con un conjugado estreptavidin-peroxidasa diluido 1:1000 en TBS-BSA 0.1%. La membrana fue lavada tres veces por 10 min con TBS, Tween 0.2% y se adicionó la solución de detección (luminol) por 1 min. La membrana fue secada y expuesta por 2 min a película fotográfica X-Omat S Film (X 5S).

Unión I^{125} -Cry- Receptor (I^{125} -Cry1Ab y I^{126} -Cry1Ac): Para los ensayos de unión, los componentes de la reacción se adicionaron en el siguiente orden: PBS- BSA 0.1%, I^{125} -Cry y por último las vesículas que fueron descongeladas inmediatamente antes de su uso, éstas fueron centrifugadas a 14 000 Xg y el tampón se reemplazó por PBS-BSA 0.1%. El volumen de reacción fue de 100 μ l y se incubaron a temperatura ambiente. Para las reacciones de competencia, se adicionó un exceso de toxina no marcada previamente a la toxina radiactiva y a las proteínas de las vesículas. Se realizó una determinación de la emisión radiactiva en el contador gamma antes de completar el tiempo de incubación y las reacciones se pasaron por una unidad de filtración a vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F que fueron previamente incubados en PBS-BSA 0.5%. La muestra se lavó inmediatamente con 5 ml de PBS-BSA 0.1% frío, los filtros se depositaron en tubos y se midió la radiactividad. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Ligand (Munson y Rodbard, 1980).

Obtención de anticuerpos anti-Cry1Ac y Anti Cry7Aa: Una mezcla de esporas-cristales de HD-73 (Cry1Ac) y GM-33 (Cry7Aa), se separó mediante electroforesis en geles preparativos de poliacrilamida al 10%, el gel se tiñó con azul de Coomasie para visualizar la banda correspondiente a las proteína Cry, la banda fue cortada y se homogeneizada manualmente y separada nuevamente en poliacrilamida bajo las mismas condiciones. Se prepararon alicuotas de

100 µg y con ellas se inmunizaron conejos de 6 meses de edad. En total se realizaron 3 inmunizaciones, la primera con adyuvante completo de Freund, y las dos posteriores con adyuvante incompleto, en un intervalo de 15 días cada una. Se retó con una última inmunización, y a los siete días posteriores se obtuvo la sangre del animal.

Se separó el suero total y mediante precipitación con sulfato de amonio saturado se separaron las γ -globulinas. A 2 ml de suero se adicionaron 8 ml de sulfato de amonio y se centrifugó a 8 000 rpm, se separó el sobrenadante y el precipitado, se trató de igual manera; se resuspendió en 2 ml de agua bidestilada y se le agregaron 8 ml de sulfato de amonio, se centrifugó nuevamente a 8 000 rpm y el precipitado se resuspendió en PBS 1/2 X. Posteriormente se dializó contra el mismo buffer y se determinó la especificidad de estos antisueros.

Preparación de muestras para determinación del extremo Amino-terminal: 50 µg de proteínas de vesículas fueron separadas en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de PVDF en condiciones semisecas, en buffer de transferencia (Glicina, 39 mM; Tris-HCl, 48 mM; SDS, 0.037% y Metanol, 20%) a 0.8 v/ cm². Se cortó un de los carriles y después de bloquear fue incubada con Cry1Ac (5 µg/ml). La inmunodetección fue realizada como se describió previamente. Una vez que se visualizó la señal se comparó con la membrana de PVDF y se cortó la banda correspondiente. Estos fragmentos se depositaron en tubos y se enviaron a determinar la secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal con un equipo automático.

Purificación parcial por DEA-sepharosa: 1 mg de vesículas se separó en una columna empacada y equilibrada de Dea-sepharosa de 12 X 1 cm. Las proteínas se eluyeron mediante un gradiente diferencial de NaCl (0.5, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 1.0 M). Las fracciones recolectadas se dializaron y se visualizaron en

geles de poliacrilamida al 10%. De igual forma se separaron vesículas solubilizadas en CAPS (1M) , Deoxicolato de sodio (0.46%) y Tritón X-100 (1%).

Determinación de la actividad de aminopeptidasa: A las fracciones separadas por cromatografía, se les determinó actividad de aminopeptidasa utilizando el sustrato sintético leucine-pnitroaniline en buffer de fosfatos (leucine p-nitroaniline , 25 mM en Fosfato de sodio 50 mM a pH 7.2). La mezcla de reacción contenía 100 μ l de cada fracción, 900 μ l de buffer, 100 μ l de sustrato, se incubó 15 min y se leyó absorbancia a 405 nm.

RESULTADOS

Producción de proteínas Cry: Se obtuvieron proteínas Cry solubilizadas y activas de 55-66 kDa, con concentraciones desde 0.1– 1.0 mg/ml. Todas las proteínas fueron separadas en alícuotas y almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso. Las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (PGS), fueron proporcionadas por Plant Genetic Systems, previamente solubilizadas y activadas (Figura 5).

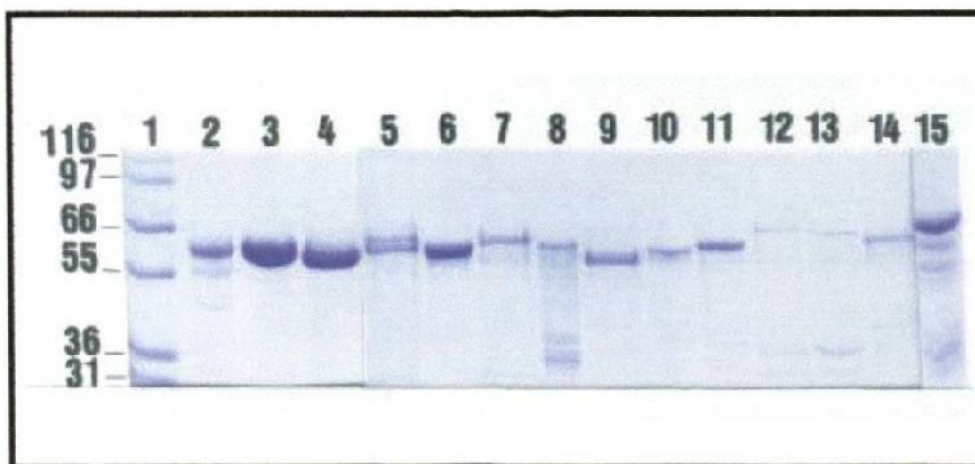


Figura 5. Electroforesis en poliacrilamida al 10% de las toxinas Cry. Carril 1. Marcadores de peso molecular; 2, Cry1Aa; 3, Cry1Ab; 4, Cry1Ac; 5, HD-73; 6, Cry1Aa; 7, Cry 1Ab; 8, Cry1Ac; 9, Cry1B; 10, Cry 1Ca; 11, Cry 1Da; 12, Cry 1Ea; 13, Cry 1Fa; 14, Cry1Ja y 15, Cry2A. Carriles 2, 3, 4, (PGS); 5-13 (EG).

Purificación por FPLC: La purificación de las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac se realizó por cromatografía de intercambio aniónico, mediante el sistema FPLC. Las fracciones eluidas entre 25 y 30 min, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 6) y aquellas que visualmente presentaron mayor contenido de proteína fueron mezcladas y determinada la concentración de proteína.

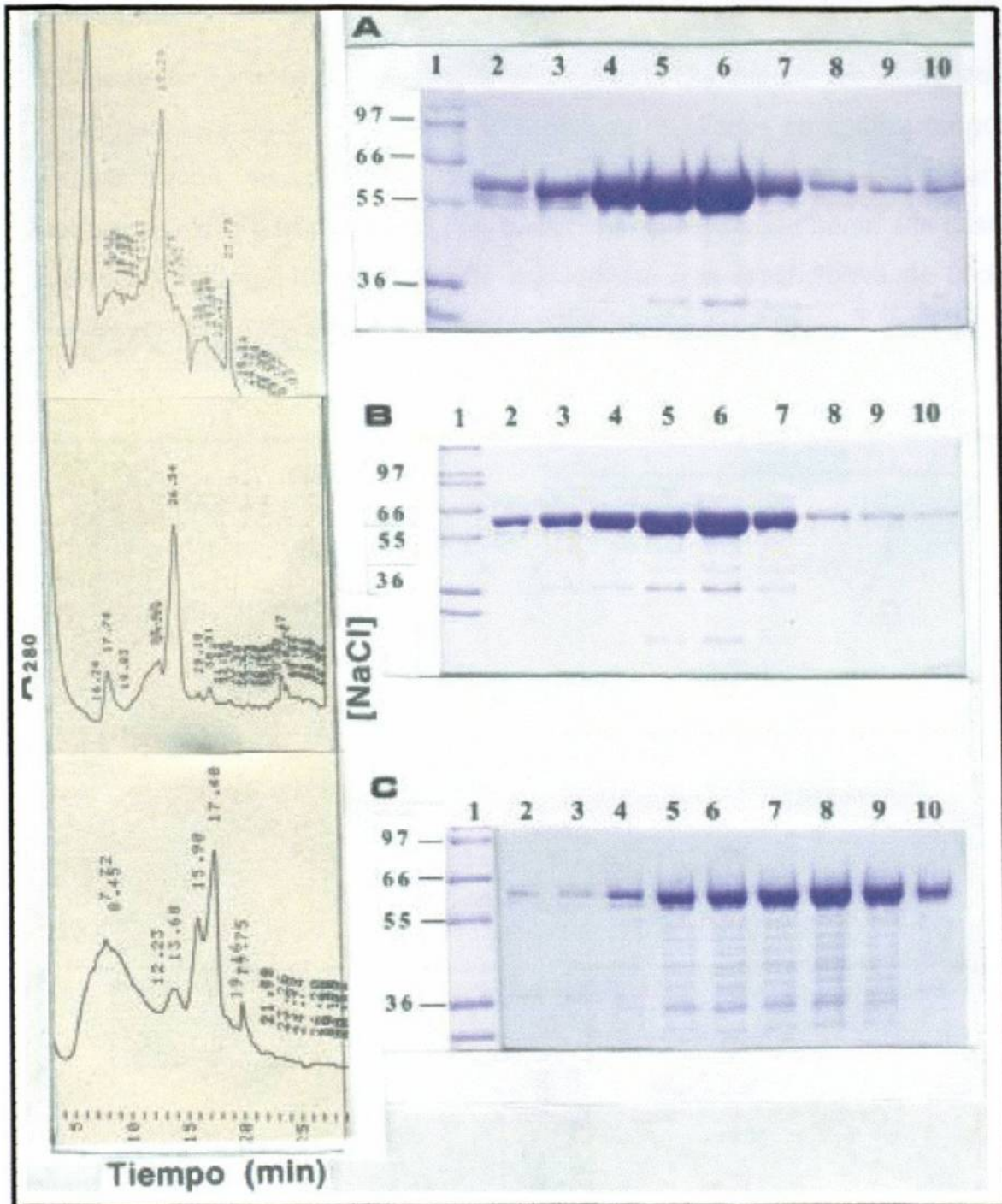


Figura 6. -Perfil cromatográfico de la purificación de Cry1Aa (A), Cry1Ab (B) y Cry1Ac (C), por FPLC y electroforesis de las fracciones eluidas, visualizadas en poliacrilamida al 10%. Cry 1Aa fracciones 23- 31, Cry 1Ab fracciones 24- 32 y Cry1Ac fracciones 27-35.

Bioensayos: Ensayos de toxicidad de las proteínas Cry, fueron realizados con larvas neonatas de *T. ni*, en dieta artificial. Los resultados se analizaron por análisis Probit mediante el programa POLO-PC (Apendice A), y para representarlos se graficaron el log del porcentaje de mortalidad frente a la dosis expresada en ng/cm^2 de dieta. Se representan tres repeticiones de cada bioensayo, realizados en ciclos diferentes de *T. ni* (Figuras 7-9).

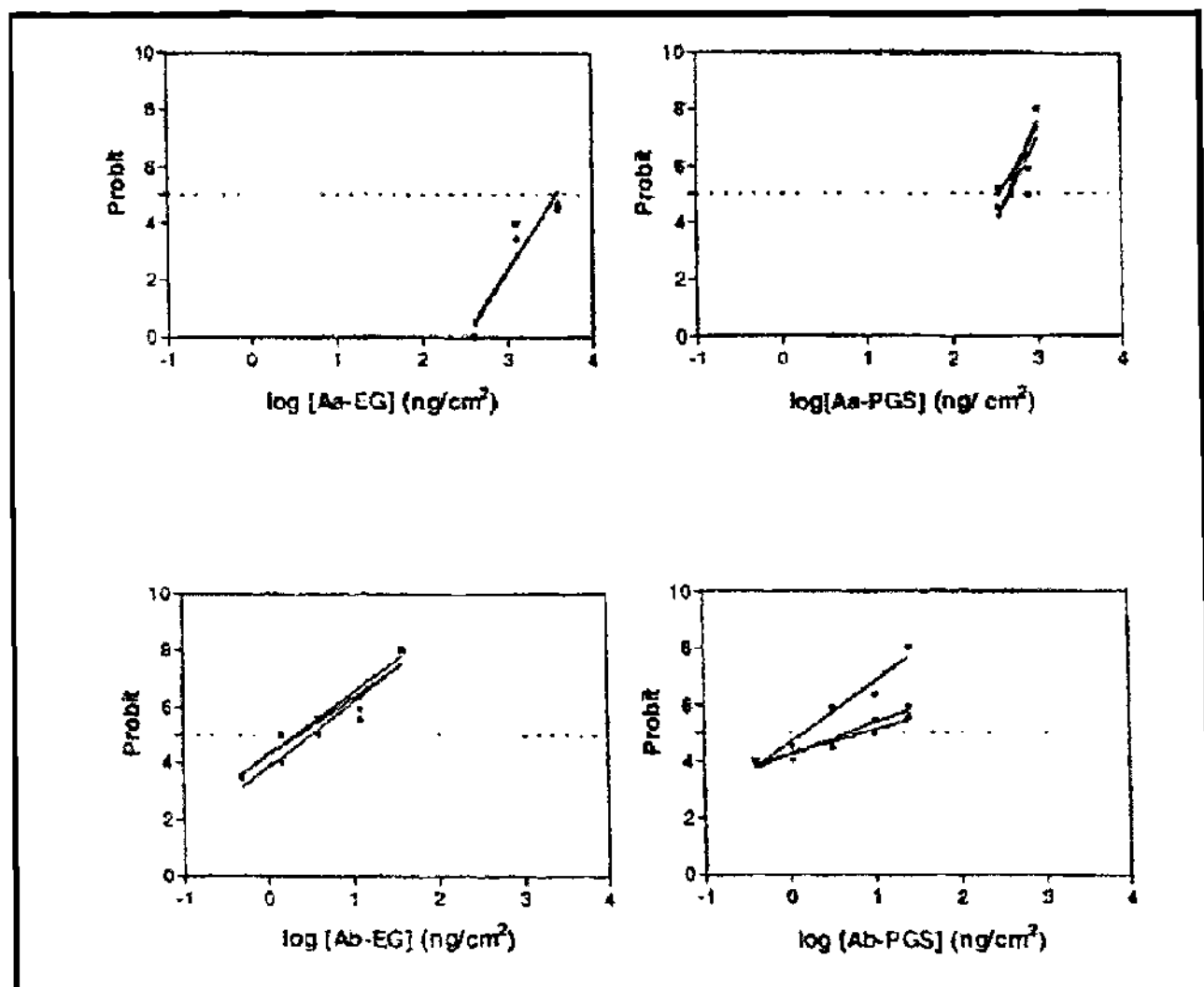


Figura 7.- Curvas de mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad hacia *T. ni*. Cry1Aa-EG, Cry1Aa-PGS; Cry1Ab-EG y Cry1Ab-PGS.

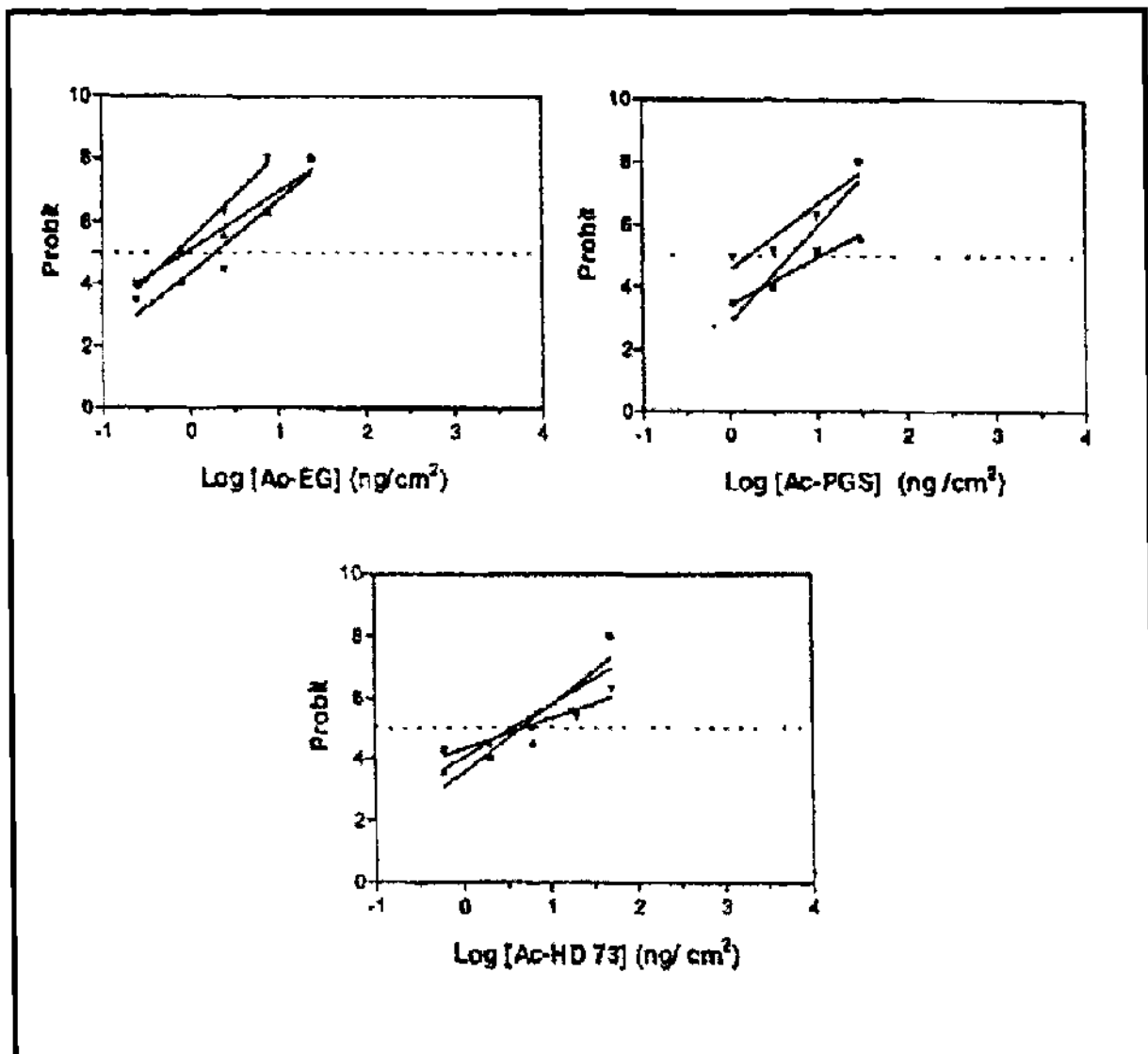


Figura 8. Curvas de Mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad hacia *T. ni*. Cry1Ac-EG; Cry1Ac-PGS; Cry1Ac-HD-73.

Un total de 36 a 48 larvas neonatas, se usaron en los experimentos de toxicidad, el probit del porcentaje de mortalidad representado en las figuras 7, 8 y 9 muestra que no hay una diferencia considerable entre el numero de repeticiones.

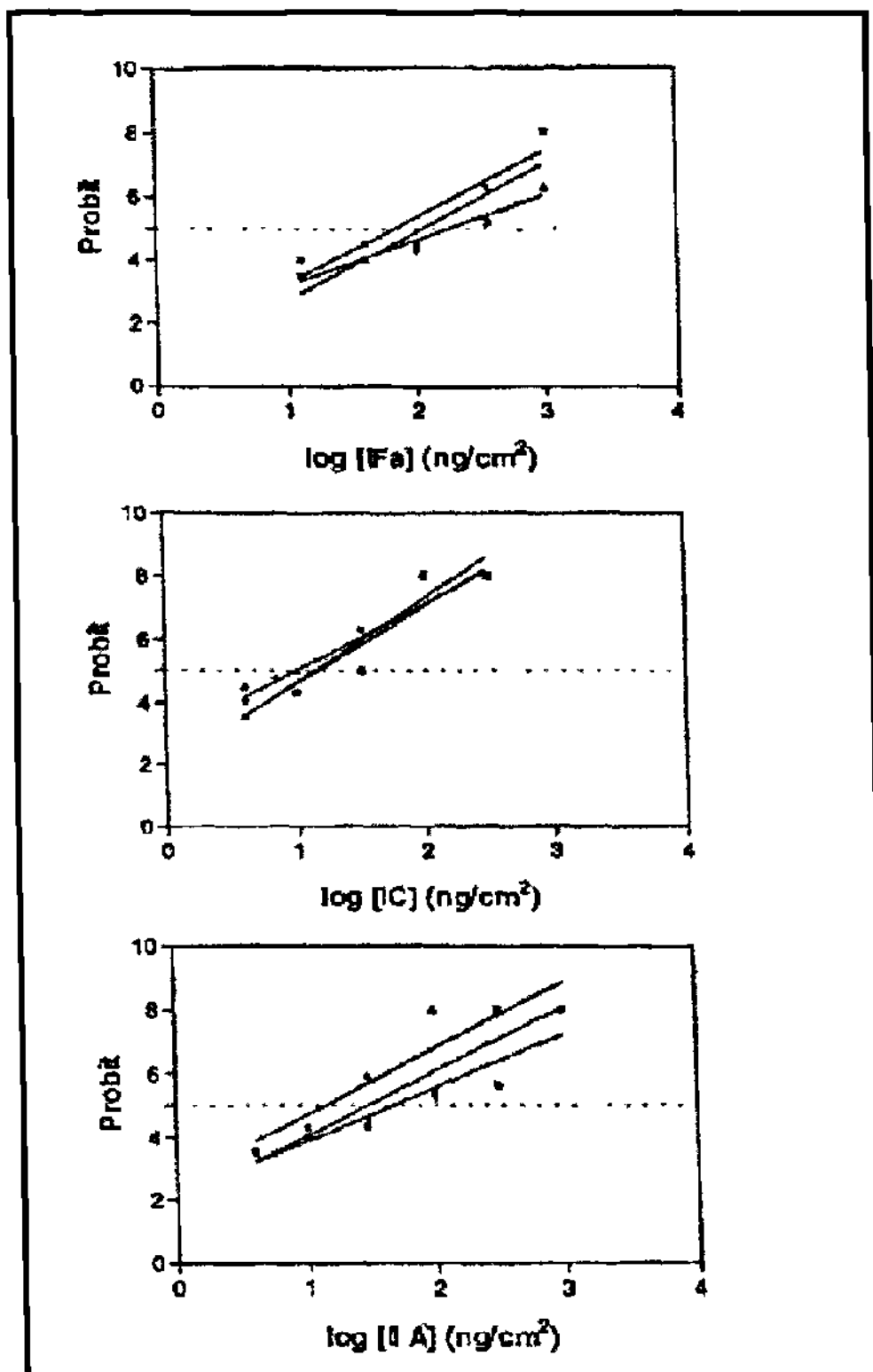


Figura 9. Curvas de mortalidad obtenidas en los ensayos de toxicidad hacia *T. ni*. Cry1Ca; Cry1Fa;Cry2A.

Los valores de LC_{50} mostraron grandes diferencias en la susceptibilidad de *T. ni* hacia las diferentes toxinas evaluadas (Tabla 5). Las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac (independientemente de la fuente), Cry1C y Cry1J resultaron altamente tóxicas, con valores de LC_{50} menores a 100 ng/cm². Cry 1F resultó moderadamente tóxica con LC_{50} de 248.8 ng/cm² y las toxinas restantes no mostraron toxicidad, aún a concentraciones mayores de 2 500 ng/cm² (Cry 1B, 1Da y 1Ea). De las toxinas Cry1Aa, la obtenida a partir de la cepa de Ecogen resultó ser no tóxica para *T.ni*. Para asegurar la calidad de esta toxina, se realizaron bioensayos con larvas del tercer estadio de *P. xylostella* y se calculó una LC_{50} de 2,8 µg/ml, que es lo normalmente encontrado para este insecto. De esta manera, se demostró que la toxina era activa.

Tabla 5.- Toxicidad de las proteínas Cry activadas en larvas neonatas de *Trichoplusia ni*.

TOXINA	LC_{50}	FL_{95}	PENDIENTE
Cry1Aa (EG)	8145.6	4 719 - 25 851	1.8
Cry1Aa (PGS)	420.4	310.2 - 503.4	3.3
Cry1Ab (EG)	3.4	2.3 - 4.0	1.9
Cry1Ab (PGS)	4.4	1.9 - 8.3	1.2
Cry1Ac (EG)	1.1	0.7 - 1.7	1.7
Cry1Ac (PGS)	4.1	2.4 - 6.6	1.6
Cry1Ac (HD-73)	7.5	3.9 - 15.7	1.1
Cry1B (EG)	>6,200		
Cry1Ca (EG)	12.2	5.0 - 20.5	1.7
Cry1Da (EG)	>2,500		
Cry1Ea (EG)	>6,200		
Cry1Fa (EG)	248.8	117 - 463.5	3.24
Cry1J (EG)	87.4	37.8 - 189.0	0.9
Cry2A	34.2	22.0 - 51.8	1.4

FL: límites de confianza al 95%.

Marcaje con Nal^{125} y determinación de la actividad específica para I^{125} .

Cry1Ac: El marcaje de las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, se realizó por el método de Cloramina T y la toxina unida al I^{125} se purificó por exclusión

molecular. Las fracciones con mayor radioactividad fueron alícuotadas y almacenadas. Con estas muestras se realizaron todos los experimentos de saturación de vesículas y competencias homólogas y heterólogas. En la figura 10, se muestra la emisión obtenida en de las fracciones colectadas de Cry1Aa y la visualización de las mismas, por exposición y revelado a una película fotográfica. se observa que no hay deradación aparente de las proteínas, patrones similares se obtuvieron al marcar Cry1Ab y Cry1Ac, las cuales se observan en el panel C.

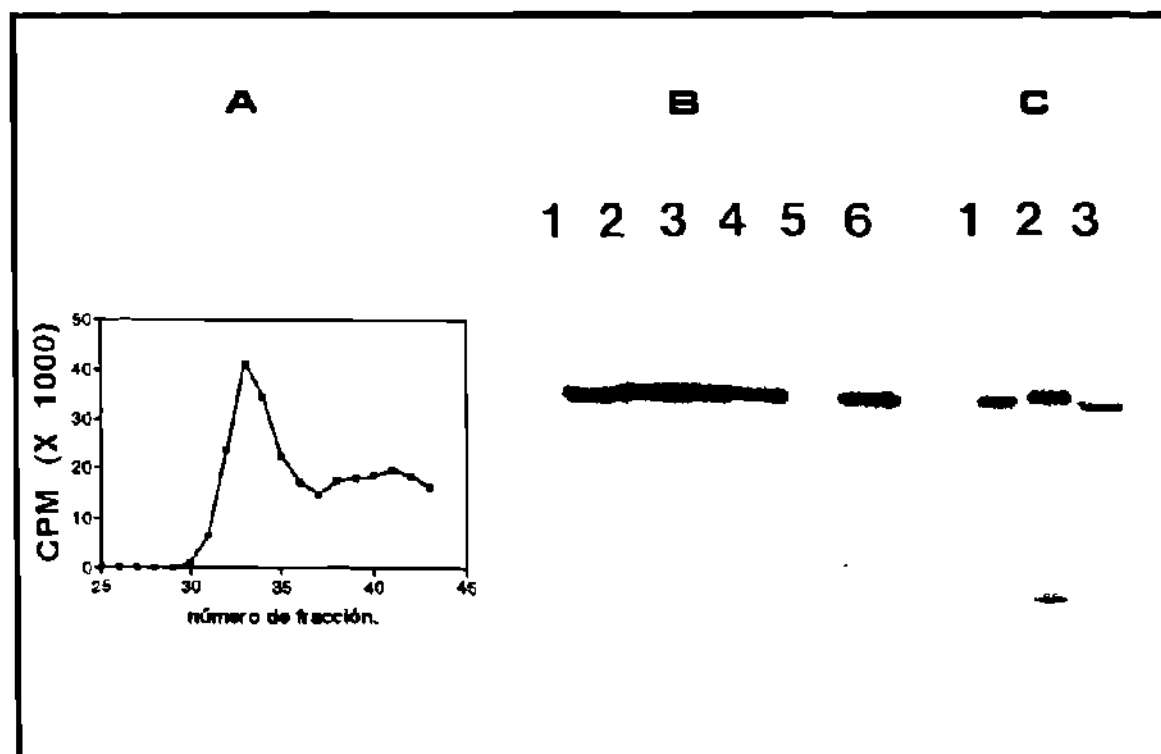


Figura 10.- Autorradiografía de las toxinas marcadas: (A), curva de radiactividad de las fracciones eluidas de Cry1Aa; (B), fracciones 32 - 37 de Cry1Aa; (C) ,1, Cry1Aa; 2, Cry1Ab y 3, Cry1Ac.

Determinación de la actividad específica para 125 -Cry1Ac: La concentración de 125 Cry1Ac, fue determinada por ensayos tipo ELISA a partir de una solución patrón que emitía 5, 200 cpm/ μ l. A partir de la toxina sin marca, se calculó la concentración de toxina radiactiva que retuvo la marca. Las concentraciones de

la curva estándar y los cálculos realizados para determinar la actividad específica se detallan en la Tabla 6. La actividad específica encontrada fue de 2.2 mCi/ mg.

Tabla 6.- Absorbancia de la curva patrón de Cry1Ac y I^{125} Cry1Ac determinados por ELISA y actividad específica de la toxina marcada.

Cry1Ac ng/ μ l	A°	A° I^{125} Cry1Ac	Dilución	promedio de la dilución	cpm	mCi/mg
50.0	0.42	0.46	659	1042	4990	2.2
25.0	0.40	0.35	676			
12.5	0.40	0.29	1342			
6.2	0.31	0.33	1491			
3.1	0.30		3443			
1.5	0.24					
0.7	0.23					
0.3	0.22					

A°= absorbancia

Ensayos de unión proteína I^{125} Cry- Receptor: Se determinó la concentración óptima de I^{125} -Cry1 y vesículas, mediante ensayos de desplazamiento, para esto se mantuvo fija la cantidad de proteínas de vesículas (15 μ g), y se varió la cantidad total de radiactividad añadida de I^{125} -Cry1 desde 2,500 a 45,000 cpm. Los resultados mostraron una gama de unión lineal, por lo que se decidió realizar los ensayos con 30,000 cpm para Cry1Ab y 10,000 cpm para Cry1Ac (Figura 11).

Determinación de la concentración óptima de proteínas de vesículas: se determinó mediante experimentos de saturación de vesículas, para las toxinas I^{125} -Cry1Aa, I^{125} -Cry1Ab, y I^{125} -Cry1Ac. Se variaron las concentraciones de proteínas de vesículas desde 0.25 a 30 μ g/ml y se mantuvo constante la cantidad de I^{125} -Cry1 previamente determinada.

Para I^{125} -Cry1Aa se obtuvo un porcentaje de unión total casi del 5%, sin embargo el porcentaje de unión específica no pudo determinarse, como para

poder realizar posteriormente experimentos de competencia. Para ^{125}I -Cry1Ab el porcentaje de unión máximo fue del 7.5% y el de unión inespecífica de 0.8%, y para ^{125}I -Cry1Ac se encontró un porcentaje máximo de unión de 8.0% y 2.5% de unión inespecífica. Basado en estos experimentos se decidió realizar los ensayos de unión con 10 μg y 7.5 μg de vesículas para Cry1Ab y Cry1Ac respectivamente (Figura 12).

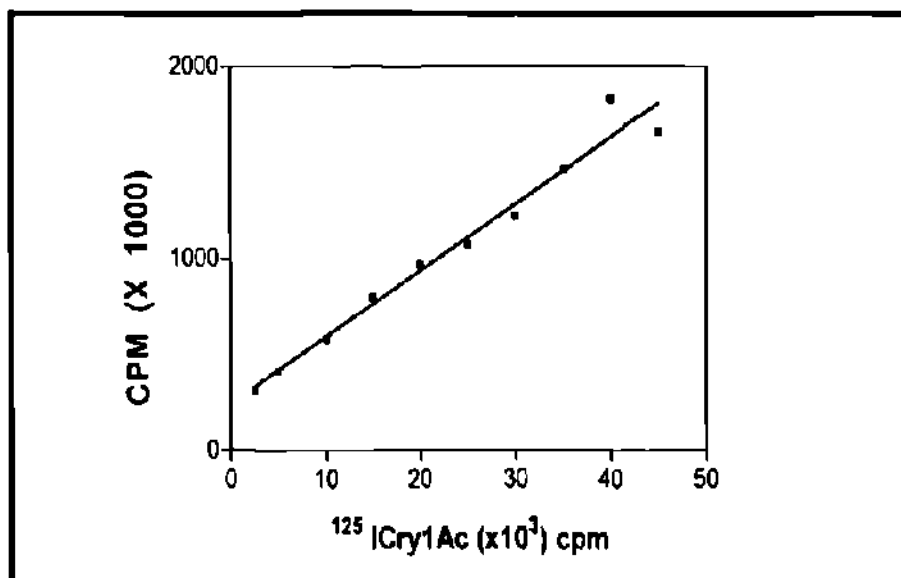


Figura 11.- Determinación de la concentración óptima de ^{125}I -Cry1Ac para los ensayos de unión toxina-receptor.

Competencias Homólogas: Ensayos de competencia se realizaron para evaluar la unión a un nivel cuantitativo, entre ^{125}I -Cry1Ab y un exceso de competidor Cry1Ab sin marca, lo mismo para ^{125}I -Cry1Ac y su homólogo sin marca (Fig. 13). Los resultados muestran claramente un desplazamiento por la toxina homóloga fría, ^{125}I -Cry1Ab es desplazada por su homóloga a concentración de 0.1nM y a 10 nM alcanza un máximo de desplazamiento del 74%. Para ^{125}I -Cry1Ac, el desplazamiento se inicia a una concentración de competidor de 0.5 nM y el máximo se alcanza a 10 nM, alcanzando un desplazamiento del 60 %.

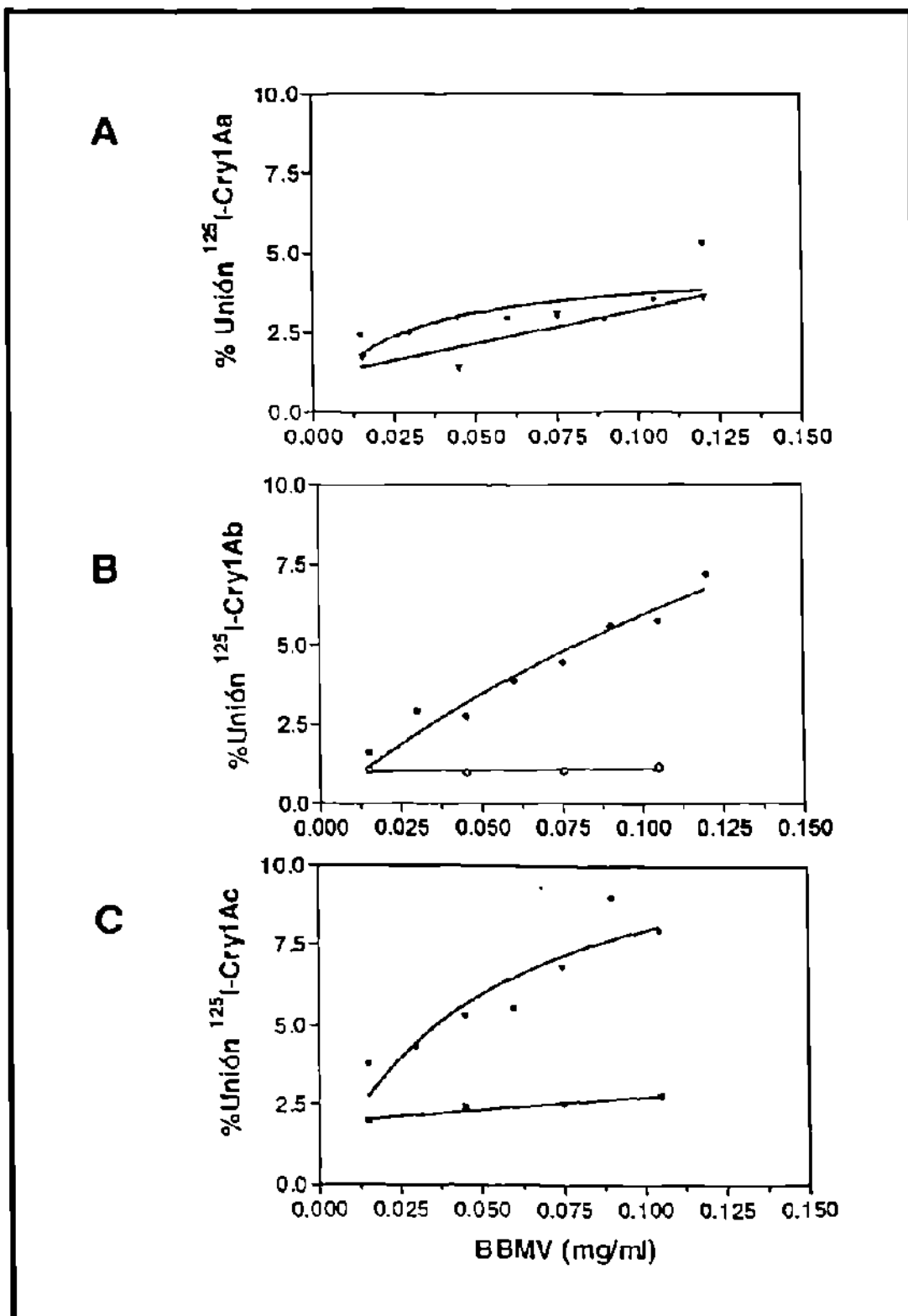


Figura 12.- Unión de las toxinas ^{125}I -Cry1Aa (A); ^{125}I -Cry1Ab(B); y ^{125}I -Cry1Ac (C), como función de la concentración de vesículas de intestino medio de *T. ni*. (●) Unión específica, (○) Unión inespecífica.

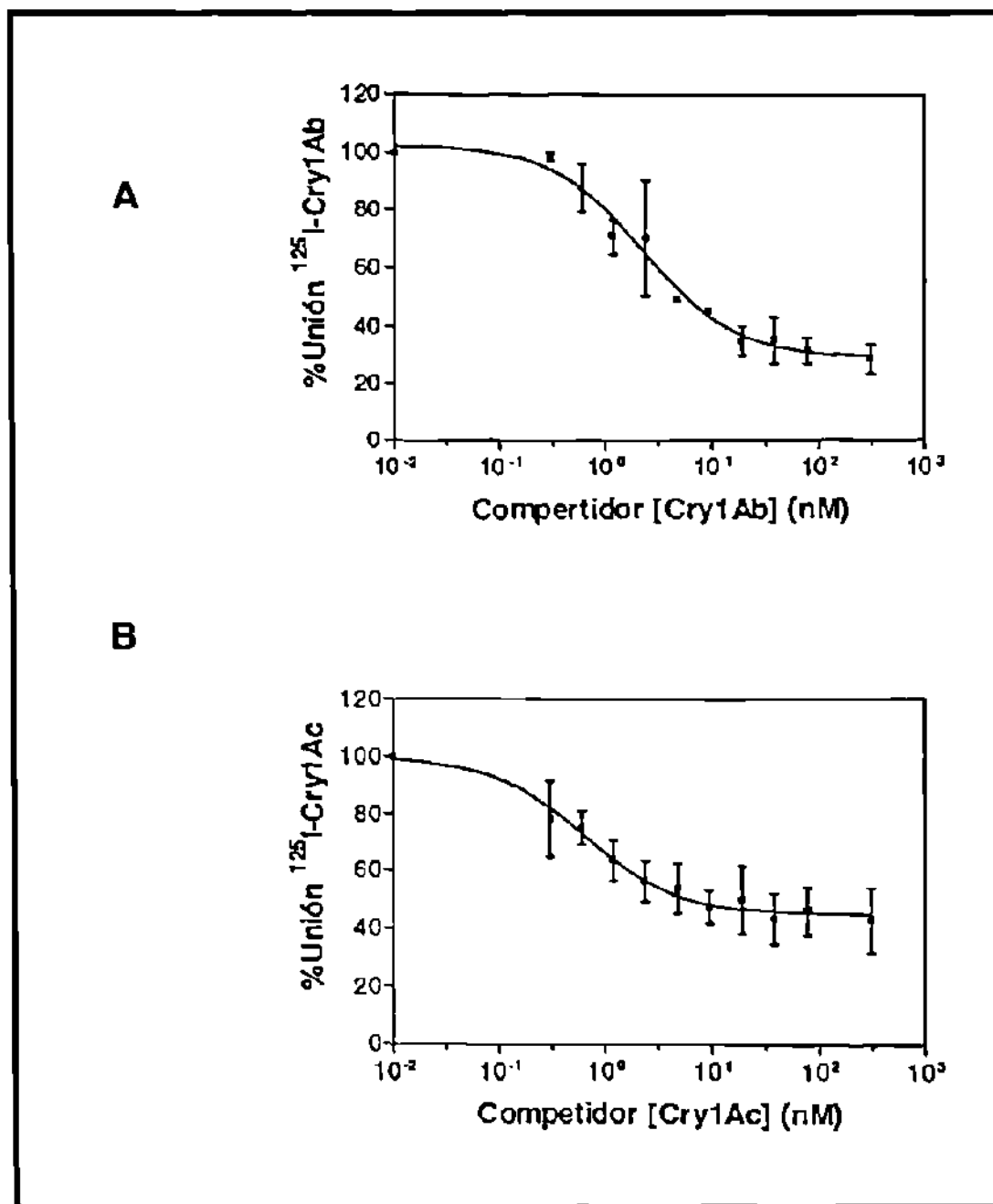


Figura 13.- Competencias homólogas entre ^{125}I Cry1Ab-Cry1Ab y ^{125}I Cry1Ac- Cry1Ac.

Con los resultados de los experimentos de competencias homólogas, se calculó la constante de afinidad (K_d) y la concentración de los sitios de unión (R_t) para las interacciones toxina-membrana. Para esto se utilizó el programa

LIGAND. Las constantes de disociación y el número de sitios de unión calculados para ambas toxinas resultó muy similar, K_d de 1.9 y 1.2; R_t de 0.59 y 0.54 para Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente (Tabla 7).

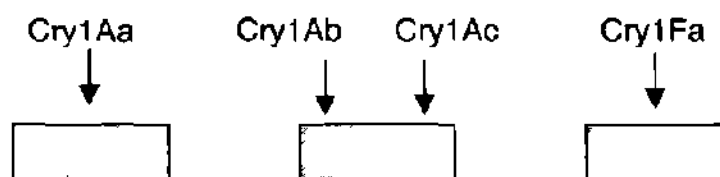
Tabla 7.- Constante de disociación y concentración de sitios de unión para las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac con proteínas de vesículas de *T. ni*.

Toxina	K_d	R_t	R_t/K_d
Cry1Ab	1.9 (0.35)	0.59 (0.7)	0.31
Cry1Ac	1.2 (0.60)	0.54 (1.7)	0.45

K_d (nM); R_t (μ mol/mg)

Competencias Heterólogas: Los experimentos de competencias heterólogas para las toxinas 125 I-Cry1Ab y 125 I-Cry1Ac con las toxinas Cry 1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1Fa, indican que hay un evidente desplazamiento de las toxinas marcadas por Cry1Ab y Cry1Ac, por lo que comparten los mismos sitios de unión, en cambio no hay desplazamiento por Cry1Aa o Cry1Fa (Fig. 14).

Estos resultados indican que Cry1Ab y Cry1Ac compiten por el mismo sitio de unión, mientras Cry1Aa y 1Fa, ambas presentan un sitio distinto, aunque Cry1Fa, aparentemente tiene una baja afinidad por el sitio de 1Ab, ya que a concentraciones mayores de 100 nm, esta puede llegar a ser desplazada. Con estos datos se propone un modelo de unión donde:



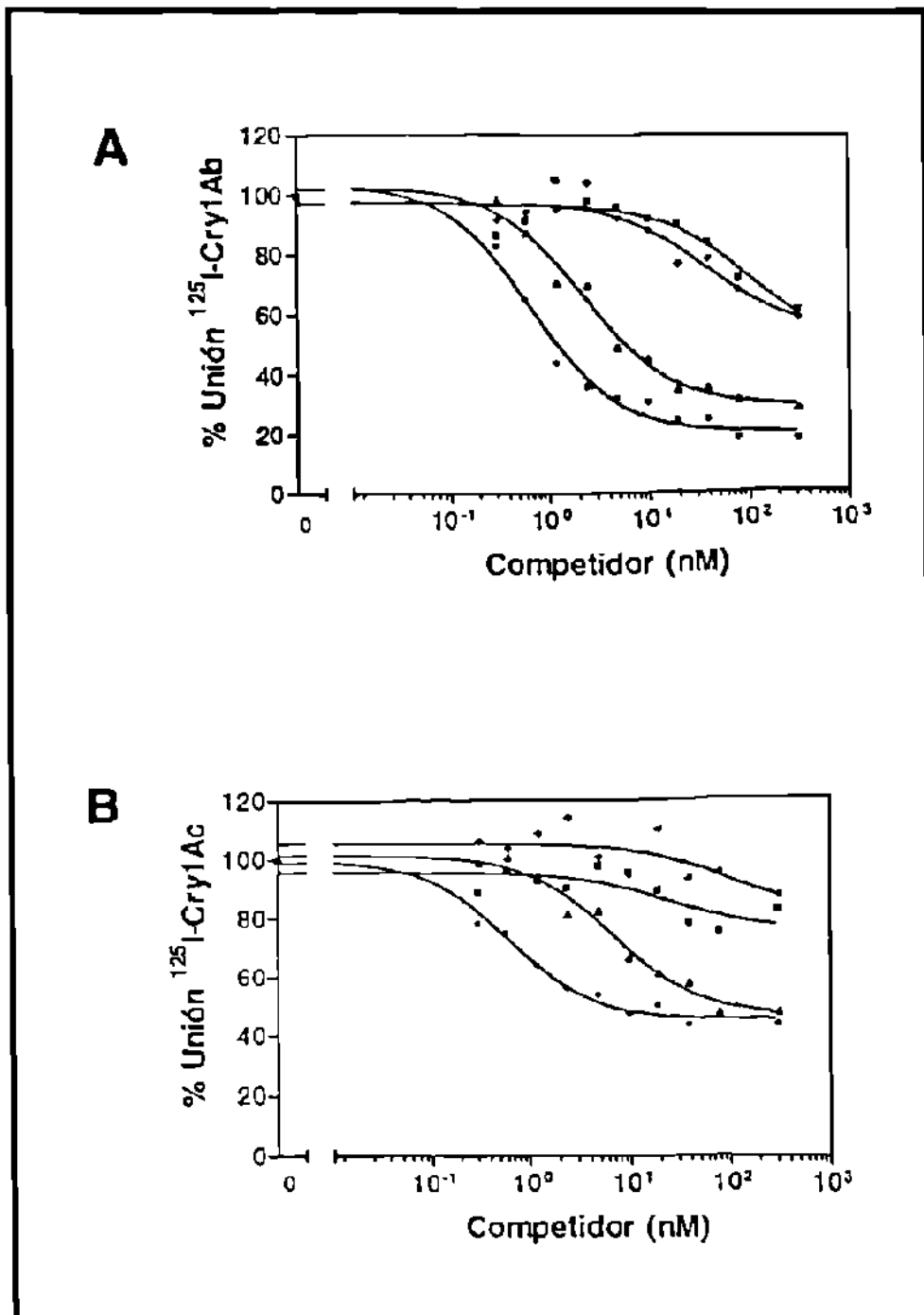


Figura 14.- Unión de ^{125}I Cry1Ab y ^{125}I Cry1Ac a vesículas de *T. ni* como una función de la concentración de competidor sin marca. (◆) Cry1Aa; (▲) Cry1Ab; (●) Cry1Ac; (■)Cry1Fa.

Detección de proteínas de *T. ni* con capacidad de unir a Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac: La inmunodetección de las toxinas unidas a las proteínas de vesículas se detectó mediante la incubación con un anticuerpo policlonal, seguido de un segundo anticuerpo acoplado con fosfatasa alcalina. Los resultados mostraron, que las todas las toxinas de la subclase Cry1A (HD-73, PGS y EG) reconocieron a una proteína de un peso molecular de 106 kDa (Fig. 15). No se detectó unión inespecífica por el anticuerpo AntiCry, ni por el conjugado con fosfatasa. Cabe resaltar que para Cry1Ac (HD-73), se observa una unión a otras proteínas de menor talla molecular.

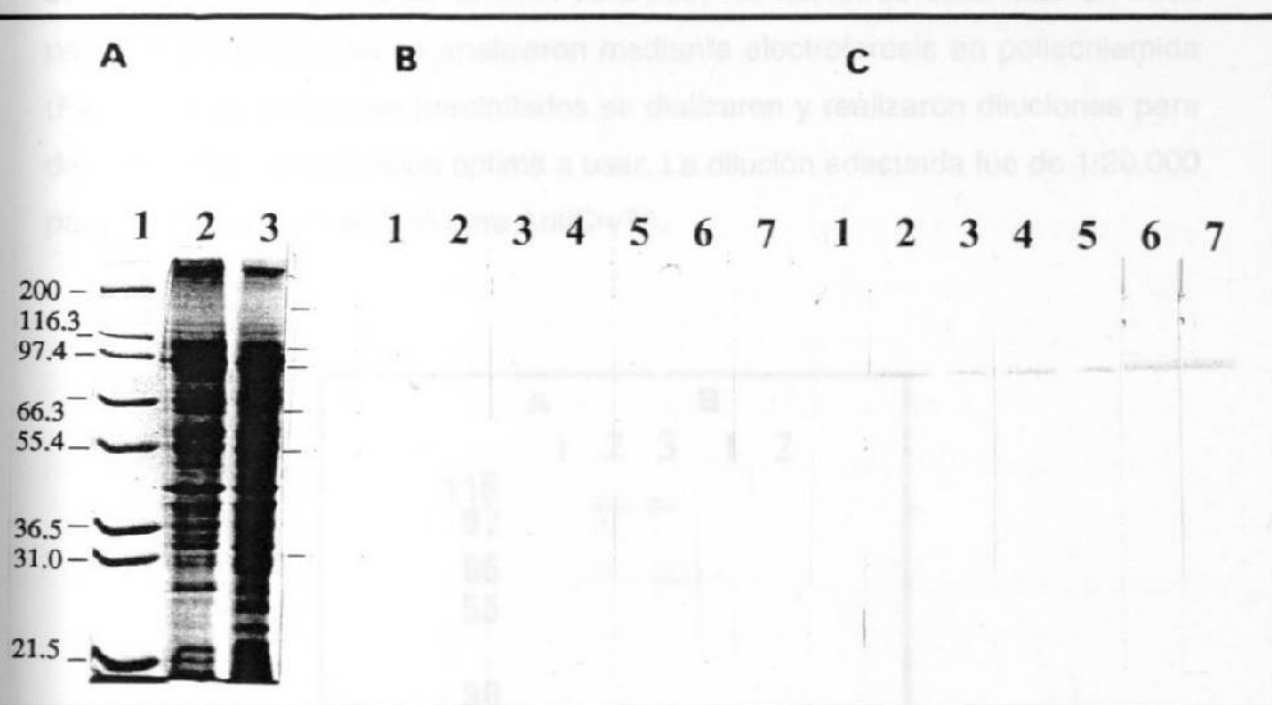


Figura 15.- Inmunodetección de proteínas de *T. ni* con Cry 1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac. (A), Electroforesis de las vesículas. Carril 1, marcadores de peso molecular; 2 y 3 proteínas de vesículas. (B), Inmunodetección con Cry1Aa carriles (1, 2), Cry1Ab (3, 4), Cry1Ac (5, 6), cepas de EG; sin toxina(7). (C), Inmunodetección con Cry1Aa (1), Cry1Ab (2, 3), Cry1Ac (4, 5) cepas de PGS, Cry1Ac HD-73 (6, 7).

Preparación de proteínas receptoras para determinar la secuencia del extremo N-terminal: Las preparaciones de vesículas que se usaron para

identificar las proteínas receptoras que unen a las proteínas Cry, fueron transferidas a filtros de PVDF, cortadas y enviadas para determinar la secuencia N-terminal (Fig. 16). La inmunodetección (panel B) permitió seleccionar los fragmentos correspondientes al las proteínas que unen a Cry1Ac, sin embargo al procesar estas muestras en el secuenciador automático, no se obtuvieron resultados positivos, por lo tanto no fue posible comparar esta proteína por su secuencia terminal con otros receptores.

Obtención de anticuerpos AntiCry: El suero total de los animales inmunizados se precipitó con sulfato de amonio saturado, las muestras obtenidas en cada paso de la purificación se analizaron mediante electroforesis en poliacrilamida (Fig. 17). Los antisueros precipitados se dializaron y realizaron diluciones para determinar la concentración óptima a usar. La dilución adecuada fue de 1:20,000 para AntiCry1Ac y 1:60,000 para AntiCry7A.

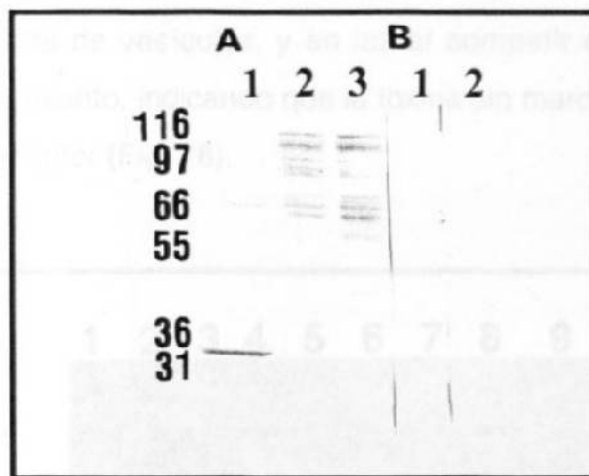


Figura 16.- Preparación de proteínas para determinar la secuencia del extremo N-terminal. (A) Filtro de PVDF teñido con azul de Coomassie; 1, marcadores; 2, 3, vesículas. (B), Inmunodetección.

Figura 17.- Cristalizaciones Homólogas: 1, *Cry1Ac; 2, *Cry1Ac-vesículas; 3, *Cry1Ac-1Ac; 4, *Cry1Ab; 5, *Cry1Ab-vesículas; 6, *Cry1Ab-Ab; 7, vesículas; 8, *Cry1Ac; 9, *Cry1Ac-vesículas; 10, *Cry1Ac-Ac.

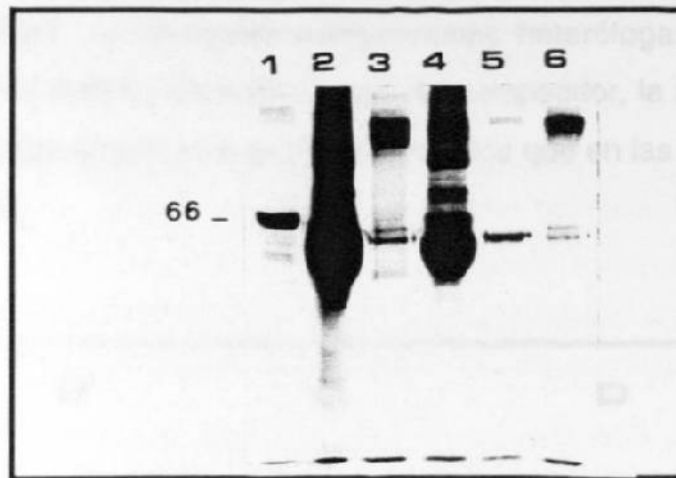


Figura 17.- Purificación de AntiCry1Ac. Carril 1, albúmina de suero bovino; 2, suero completo; 3, 1ª. precipitación; 4, sobrenadante; 5, 2ª. precipitación; 6, sobrenadante; 7, antiCry1Ac

Competencias de proteínas Cry biotiniladas-Receptor (ECL). Los ensayos se realizaron incubando vesículas y toxinas marcadas, para esto previamente se determinó la concentración de vesículas (20 μ g) y el tiempo (1h), son ñas condiciones óptimas. Los resultados mostraron claramente la unión específica entre toxina-proteínas de vesículas, y en las al competir con su homólogo se aprecia un desplazamiento, indicando que la toxina sin marca en exceso compite fácilmente por el receptor (Fig. 18).

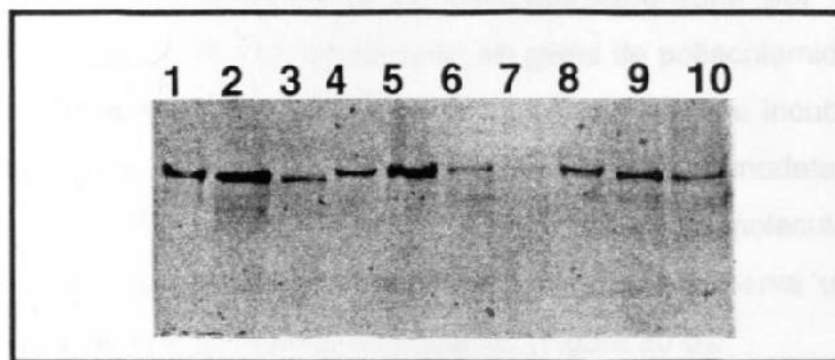


Figura 18.- Competencias Homólogas: 1, *Cry1Aa; 2,*Cry1Aa-vesículas, 3,*Cry1Aa-1Aa; 4,*Cry1Ab; 5, *Cry1Aab-vesículas, 6, *Cry1Ab-Ab; 7, vesículas; 8, *Cry1Ac; 9, *Cry1Ac-vesículas; 10, *Cry1Ac-Ac.

De la misma manera, se realizaron competencias heterólogas entre estas toxinas, a una concentración única de exceso del competidor, la separación de proteínas y el revelado se procedió de manera idéntica que en las competencias homólogas (Fig. 19).

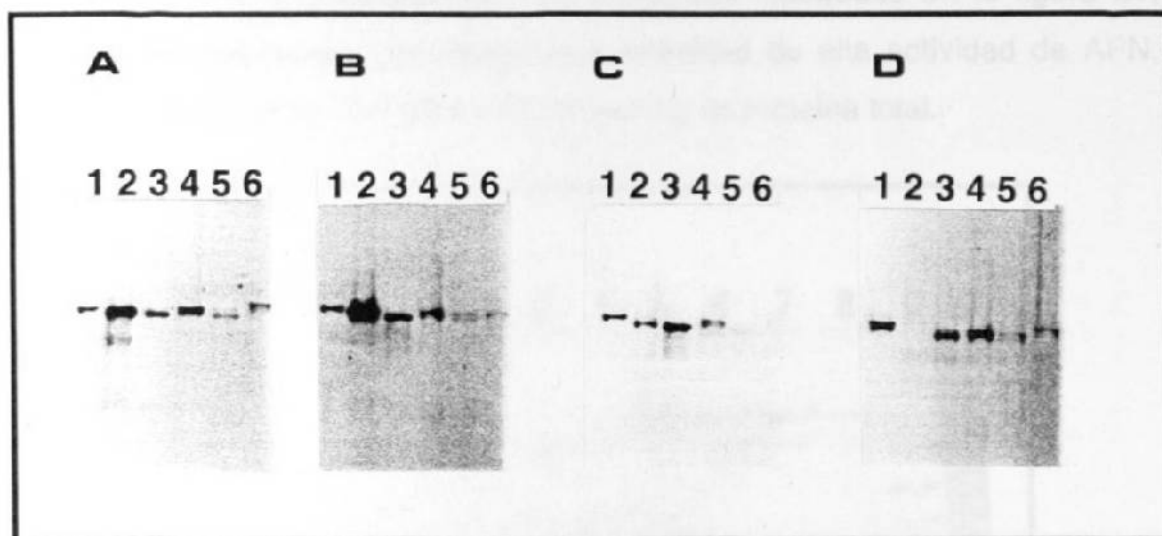


Figura 19.- Competencias heterólogas: (A): *Cry1Aa; (B): *Cry1Ab; (C): *Cry1Ac; (D): *Cry1Fa (1) . Competidor sin marca en exceso: 2, 1Aa; 3,1Ab; 4, 1Ac; 5,1Fa.

Purificación parcial de las proteínas de vesículas mediante cromatografía de intercambio aniónico: proteínas de vesículas separadas por de DEAE-sepharosa 6L, se dializaron y se visualizaron en geles de poliacrilamida al 10% (Figura 20 A). De igual forma, se transfirieron a nitrocelulosa, e incubaron con Cry1Ac. La unión de la toxina fue visualizada mediante una inmunodetección. En las fracciones 3, 5 y 7 se detectaron proteínas de variada talla molecular que se unieron a la toxina, en el resto de las fracciones no se observa una unión aparente de la toxina a las proteínas del intestino. (Figura 20 B).

Se realizó el mismo procedimiento de separación con las vesículas solubulizadas con los CAPS, Deoxicolato y Tritón, apesar de presentar los mismos patrones de

proteínas, mediante las inmunodetecciones realizadas estas proteínas no son capaces de unirse a la toxina Cry1Ac.

Determinación de la actividad de aminopeptidasa terminal N (APN): Las fracciones eluidas de las proteínas solubilizadas, fueron sometidas a ensayos de actividad de aminopeptidasa. Los resultados mostrados en la figura 21, señalan las fracciones que presentaron actividad de alta actividad de APN, encontrándose valores de 0.59 a 3.25 nM por mg de proteína total.

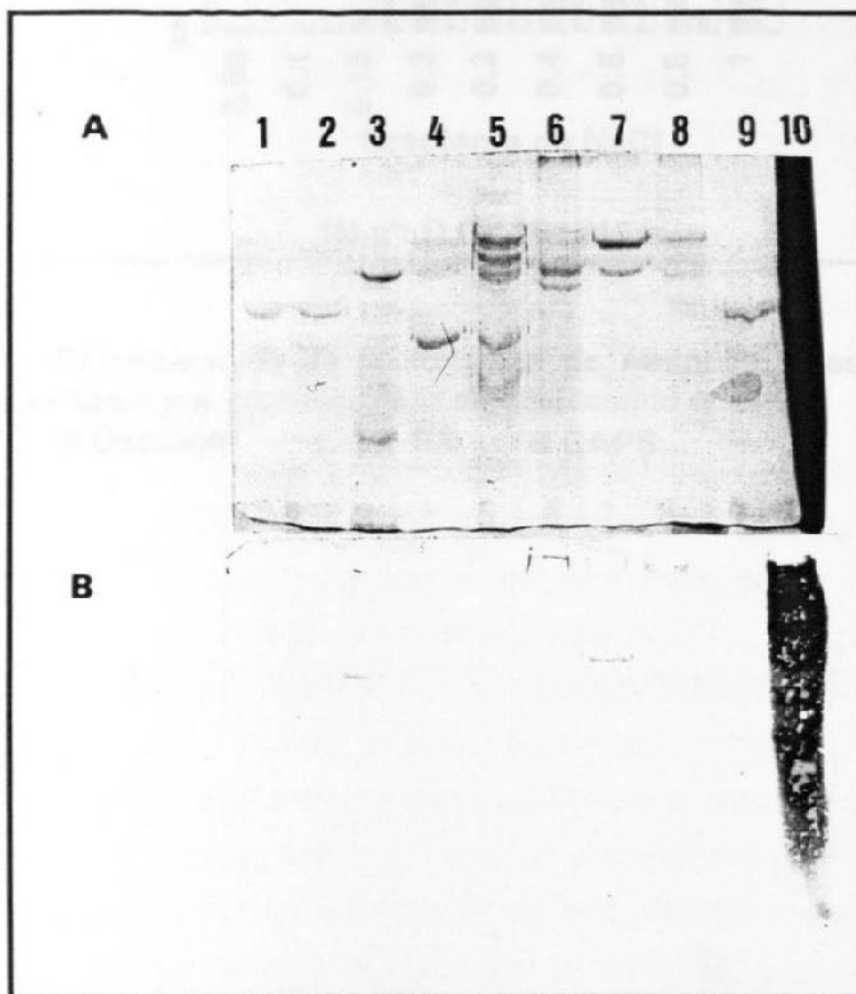


Figura 20.- Electroforésis de las fracciones separadas por DEAE-sepharosa. (A) Eluidas con un gradiente de NaCl 1, 0.1, 0.1; 2, 0.15; 3, 0.2; 4, 0.3; 5, 0.4; 6, 0.5; 7, 0.6; 8, 0.7; 9, 0.8; 10, 1.0. (B) Inmunodetección de Cry1Ac que se une a estas fracciones.

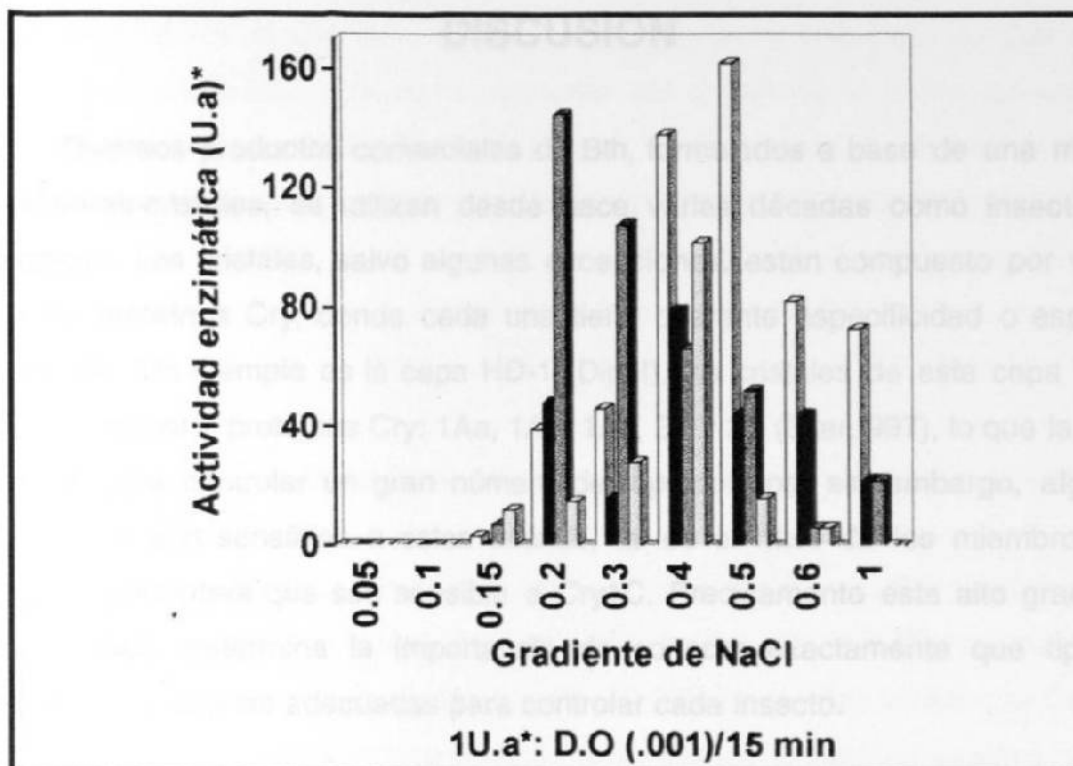


Figura 21.- Determinación de la actividad de Aminopeptidasa en las fracciones eluidas por cromatografía de intercambio aniónico.

□ Tris ■ Deoxicol □ TX-100 ■ CAPS

DISCUSION

Diversos productos comerciales de Bth, formulados a base de una mezcla de esporas-cristales, se utilizan desde hace varias décadas como insecticidas biológicos. Los cristales, salvo algunas excepciones, están compuesto por varios tipos de proteínas Cry, donde cada una tiene diferente especificidad o espectro insecticida. Un ejemplo es la cepa HD-1 (Dipel), los cristales de esta cepa están constituidos por 5 proteínas Cry: 1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A y 2B (Ellar, 1997), lo que la hace eficiente para controlar un gran número de lepidópteros; sin embargo, algunos insectos no son sensibles a estas toxinas, tal es el caso de los miembros del género *Spodoptera* que son sensible a Cry1C. Precisamente este alto grado de especificidad, determina la importancia de conocer exactamente que tipo de proteínas Cry son las adecuadas para controlar cada insecto.

En el caso de *T. ni*, el grado de susceptibilidad a las proteínas de la clase Cry1 presentó una amplia gama de toxicidad. Un resultado inesperado fue encontrar que la susceptibilidad hacia Cry1Aa podría depender de la procedencia de la proteína. De esta manera, la toxina de Ecogen (EG) resultó ser 20 veces menos tóxica que la procedente de Plant Genetic Systems (PGS) (LC_{50} = 8145 y 420 ng/cm² para EG y PGS, respectivamente). Sin embargo, ambas toxinas pueden considerarse como no tóxicas (Tabla 5). Este resultado fue sorprendente ya que reportes previos habían demostrado que, aunque a diferente nivel, *T. ni* es susceptible a esta toxina (Estada y Ferré, 1994; Höfte y Whiteley, 1989; Van Frankenhuisen, 1993). En un principio se sospechó que la variación en toxicidad podría deberse a la procedencia y tratamientos proteolíticos, por tal razón se realizaron bioensayos contra *P. xylostella*. El resultado demostró que Cry1Ac-EG presentó una LC_{50} de 2.8 µg/ml, lo que indica que la toxina fue procesada de forma eficiente.

Al comparar la toxicidad de Cry1Aa con Cry1Ab y 1Ac, para las que no se encontraron diferencias independientemente del origen de la toxina, se observó que 1Ab y 1Ac fueron 380 veces más tóxicas. Estos valores de toxicidad difieren con los reportados anteriormente por Estada y Ferré (1994), quienes encontraron LC_{50} de 570, 480 y 320 ng/cm² para Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente. La notable diferencia de sensibilidad para la subclase Cry1A en *T. ni*, no es del todo novedosa, ya que para Cry1Ac se ha reportado que es 1.7 (Estada y Ferré, 1994); 22.6 (Wu y Aronson, 1992); y 55 (Moar *et al.*, 1990) veces más tóxica que 1Aa; sin embargo, en este estudio se encontró que es 382 veces más potente.

En otros insectos como *H. virescens* estos patrones de toxicidad han mostrado diferencias en la toxicidad entre la subclase Cry 1A. Se han publicado valores de LC_{50} para Cry1Ac de 29, 56, 48 y 2 000 veces más tóxica que Cry1Aa. Sin embargo en *M. sexta* y otros insectos estas toxinas presentan exactos niveles de toxicidad (Von Terch *et al.*, 1991; Wu y Aronson, 1991; Schnepf y Withely, 1990; Lee y dean, 1995).

Las diferencias en la sensibilidad de los insectos hacia las proteínas Cry, pueden ser debidos, en gran parte a tres aspectos involucrados en la evaluación de la toxicidad:

- a) Condiciones en las que se realiza el bioensayo (incorporación de la toxina en la dieta, extensión en superficie; tiempo de incubación).
- b) Fuente de las toxinas (diferentes toxinas se expresan en cepas recombinantes de *E. coli* o en Bt).
- c) La colonia del insecto (origen geográfico, distribución y migración).

Este último podría ser el factor más importante en la determinación de la sensibilidad de un insecto hacia diferentes toxinas Cry, sin embargo todos los factores involucrados en la patogenicidad hacia las larvas deben ser considerados. Una vez que las toxinas han sido activadas en el intestino de la

larva, éstas pueden sufrir proteólisis posteriores o precipitación en el intestino. Esto se ha visto en los lepidópteros *Choristeneura fumiferana* y *L. dispar* donde se encontró que el jugo intestinal formaba un complejo proteico que causaba precipitación selectiva para toxinas de la clase Cry1A (Peyronet *et al.*, 1997; Milne y Kaplan, 1993). Es posible que un evento similar ocurra en *T. ni* y que esto sea el motivo por el cual se observó la diferencia tan grande en la susceptibilidad hacia la subclase Cry1A.

La toxicidad encontrada de la subclase Cry1A hacia *T. ni*, se correlaciona claramente con los ensayos de unión usando vesículas marcadas radioactivamente, donde se encontró que Cry1Aa, que es no tóxica, no se une de manera saturable a las proteínas de vesículas, en cambio Cry1Ab y Cry1Ac, que resultaron altamente tóxicas presentan una unión altamente específica, con valores de K_d y R_t muy similares entre ambas. Estos valores concuerdan con los publicados anteriormente por Estada y Ferré, no obstante presentar valores de toxicidad mucho menores.

Con estos ensayos de unión y competencia, se puede establecer un modelo de unión en los receptores de *T. ni*, donde Cry1Ab y Cry1Ac comparten el mismo sitio de unión, Cry1Aa y Cry1Fa, presentan un sitio independiente de unión, aunque con menos afinidad Cry1Fa comparte el sitio de Cry1Ab. La unión al mismo receptor en este tipo de ensayos de competencia, se ha visto en otros insectos, en *M. sexta*, *Chilo suppressalis* y *Sciropophaga incertulas* se ha demostrado que la subclase Cry1A (Aa, Ab y Ac) comparten el mismo sitio de unión (Lee y Dean 1996). En *P.xylostella* Cry1Ac y Cry1F comparten el mismo sitio de unión (Granero *et al.*, 1996), en *H. virescens* Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac comparte un mismo receptor, Cry1Ab y Cry1Ac compiten por un segundo sitio de unión y Cry1Ac (Oddou *et al.*, 1993), tiene un receptor adicional a los anteriores, esta complejidad no es exclusiva de estos insectos y con estas toxinas, hasta el momento no es posible establecer un patrón común de unión para las toxinas de la subclase 1A.

Por otro lado, en los ensayos de unión en fase sólida encontramos que las toxinas CryAa, Cry1Ab y Cry1Ac se unen a la misma proteína de c. a. 106 kDa. La unión de Cry1Aa, a la misma proteína que Cry1Ab y Cry1Ac, a pesar de las diferencias en toxicidad entre estas proteínas, podría explicarse por una baja afinidad de la toxina por el receptor o deficiencias en los mecanismos de inserción. Ya que puede unirse en ensayos de fase sólida, pero requiere de altos valores de LC_{50} para llegar a ser toxica. Esta aparente discrepancia en la unión en fase sólida de las tres toxinas al mismo receptor, con los resultados de competencias, ha sido reportada anteriormente para *H. virescens*, donde comparten el mismo receptor en ensayos de competencia (Van Rie *et al.*, 1989; Van Rie *et al.*, 1988, Hofmann *et al.*, 1988), pero se unen a receptores de diferente talla molecular, Cry1Aa y Cry1Ab se unen a una proteína de 170 kDa y Cry1Ac a otras de 140 y 120 kDa (Oddou *et al.*, 1991). Otro caso similar es *M sexta*, se ha visto que a pesar de que la subclase 1A compite por el mismo receptor, se unen a proteínas de 210 (Cry1Ab) y 120 (Cry1Ac) (Van Rie *et al.*, 1989; Oddou *et al.*, 1993; Lee y Dean, 1996).

Mediante otras técnicas, como resonancia de superficie usando receptores purificados (Masson *et al.*, 1995), se han encontrado resultados muy similares, que correlacionan con las competencias heterólogas, por ello el uso de una sola técnica para examinar los sitios de unión no es suficiente para concluir un modelo de unión.

Considerando el alto grado de identidad y homología entre las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac (Crickmore *et al.*, 1998), se pondría suponer que actúan a través de un receptor común y tendrían un modo de acción idéntico. Sin embargo, se ha demostrado que el dominio III de Cry1Ac podría ser el responsable para determinar la especificidad en *M. sexta*, pero no en Cry1Aa y Cry1Ab (Keeton *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

- 1.- La susceptibilidad de *T. ni* hacia las toxinas de la clase 1 es muy variable y puede depender de la procedencia de la toxina.
- 2.- Las toxinas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry2A son altamente tóxicas; Cry1Fa y Cry1J son moderadamente tóxicas, mientras que Cry1Aa, Cry1B, Cry1Da y Cry1Ea son atóxicas.
- 3.- La unión a VIM y toxicidad correlacionan para la subclase Cry1A. Cry1Aa no es tóxica ni se une de manera saturable, mientras que Cry1Ab y Cry1Ac si lo hacen.
- 4.- Cry1Ab y Cry1Ac comparten el mismo receptor. Mientras, Cry1Aa y Cry1Fa se unen a un receptor distinto.
- 5.- Las toxinas de la subclase Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) reconocen una proteína de ca. 106 kDa.

LITERATURA CITADA

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

Aronson, A. L., E.-S. Han, W. McGaughey y D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 981-986.

Bai, C., D. Degheele, S. Jansen y B. Lambert. 1993. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker) J. *Invertebr. Pathol.* **62**:211-215.

Ballester, V., B. Escriche, J. L. Ménsua, G. W. Riethmacher y J. Ferré. 1994. Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to CryIA(b). *Biocontrol Sci. Technol.* **4**:437-443.

Ballester, V., F. Granero, B. Tabashnik, T. Malvar y J. Ferré. 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1413-1419.

Belfiore, C. J., R. K. Vadlamudi, Y. A. Osman y A. Bulla. 1994. A specific binding proteins from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **200**:359-364.

Bietlot, H. P., I. Vishnubhatla, P. R. Carey, M. Pozsgay y H. Kaplan. 1990. Characterization of the cystein residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* **267**:309-315.

Bietlot, H.P., J. P. Scherthaner, R. E. Milne F. R. Clairmont, R. S. Bhella y H. Kaplan. 1993. Evidence that the Cry1A crystal protein from *Bacillus thuringiensis* is associated with DNA. *J. Biol. Chem.* **268**: 8240-8245.

Carrol, J., D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie y D. J. Ellar. 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* **70**:41-49.

Chestukina, G. G., S.A. Tyurin, L. I. Kostina, A. L. Osterman, I. A. Zalunin, O. A. Kodova y V. M. Stepanov. 1990. Subdomain organization of *Bacillus thuringiensis* entomocidal proteins N-terminal domains. *J. Protein. Chem.* **9**:501-507.

- Choma C. T., W. K. Surewicz y H. Kaplan.** 1991. The toxic moiety of the *Bacillus thuringiensis* protoxin undergoes a conformational change upon activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**: 933-938.
- Clairmont, F. R., R. E. Milne, V. T. Pham, M. D. Carriere y H. Kaplan.** 1998. Role of DNA in the activation of the Cry1A insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **273**:9292-9296.
- Clark, M. F., R. M. Lister y M. Bar-Joseph.** 1986. ELISA Techniques. *Methods Enzymol.* **18**:743-767.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Fitelson, E. Schepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean.** 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:807-813.
- Denolf, P., K. Hendrickx, J. Van Damme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele y J. Van Rie.** 1997. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **248**:748-761.
- Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele y J. Van Rie.** 1993. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1828-1837.
- Du, C., P. A. W. Martin y K. W. Nickerson.** 1994. Comparison of disulfure contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3847-3853.
- Ellar, D. J.** 1997. The structure and function of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and prospects for biopesticide improvement. British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68. Surrey. U.K.
- Endo, Y. y J. Nishiitsutsuji-Uwo.** 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. *J. Invertebr. Pathol.* **36**: 90-103.
- Estada, U. y J. Ferré.** 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3840-3846.
- Fitelson, J. S., J. Payne y L. Kim.** 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* **10**:271-275.

Feldman, F., A. Dulleman y C. Waalwijk. 1995. Binding of CryIVD toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to larval dipteran midgut proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2601-2605.

Ferré, J., B. Escriche, Y. Bel y J. Van Rie. 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **132**:1-7.

Ferré, J., M. D. Real, J. Van Rie, S. Jansens y M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* biopesticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:51191-5123.

Finney, D. J. 1962. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge.

Fiuza, L. M., C. Nielsen-Leroux, E. Gozé, R. Frutos y J.-F. Charles. 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1544-1549.

Flores, H., X. Soberón, J. Sánchez y A. Bravo. 1997. Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. *FEBS Lett.* **414**: 313-318.

Francis, B. R y L. A. Bulla, Jr. 1997. Further characterization of Bt-R₁, the cadherin like receptor for Cry1Ab toxin in tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midguts. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **27**: 541-550.

Gaitz, E., P. La Rocca, M. S. P. Sansom y Y. Shai. 1998. The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12289-12294.

Garczynski, S. F., J. W. Crim y M. J. Adang. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2816-2820.

Gould, F., A. Martínez-Ramírez, A. Anderson, J. Ferré, F. J. Silva y W. J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:7986-7990.

Granero, F., V. Ballester y J. Ferré. 1996. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **224**:779-783.

- Haider, M. Z y D. J. Ellar. 1989.** Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Acta.* **978**:216-22.
- Hendrickx, K., A. De Loof y H. van Melaert. 1989.** Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* **95**:241-245.
- Hodgman, T. C. y D. J. Ellar. 1990.** Models for structure and function of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins determined by compilation analysis. *DNA Seq.* **1**:97-106.
- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansen y H. Van Mellaert. 1988.** Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7844-7848.
- Höfte, H. y H. R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:242-255.
- Johnson, D. E., G. L. Brookart, K. L. Kraner, B. D. Barnett y W. H. McGaughey. 1990.** Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the indian meal moth, *Plodia interpunctella*: Comparison of midgut proteinases from susceptible and resistant larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **55**:235-244.
- Johnston, K. A., M. J. Lee, C. Brough, V. A. Hilder, A. M. R. Gatehouse y J. A. Gatehouse. 1995.** Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **25**:375-383.
- Keeton, T. P y L. A. Bulla Jr. 1997.** Ligand specificity and affinity of BT-R₁, the *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor from *Manduca sexta*, expressed in mammalian and insect cell cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3419-3425.
- Keeton, T. P., B. R. Francis, W. S. A. Maaty y L. A. Bulla, Jr. 1998.** Effects of Midgut-protein-preparative and ligand binding procedures on the toxin binding characteristics of BT-R₁, a common high-affinity receptor in *Manduca sexta* for Cry1A *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2158-2165.
- Knight, P. J. K., B. H. Knowles y D. J. Ellar. 1995.** Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) toxin. *J. Biol. Chem.* **270**: 17765-17770.

- Knight, P. J. K., N. Crickmore y D. J. Ellar.** 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11**:429-436.
- Knowles, B. H.** 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* **24**:275-308.
- Knowles, B. H. y J. A. T. Dow.** 1993. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioassays* **15**: 469-476.
- Knowles, B. H y D. J. Ellar.** 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta.* **924**: 509-518.
- Lambert, B. y M. Peferoen.** 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis* facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* **42**:112-122.
- Lecadet, M. M.** 1994. Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* (classified by H serotypes). International entomopathogenic Bacillus Center. Instituto Pasteur.
- Lee, M. K. y D. H. Dean.** 1996. Inconsistencies in determining *Bacillus thuringiensis* toxin binding sites relationship by comparing competition assays with ligand blotting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**: 575-580.
- Li, J., J. Carroll y D. J. Ellar.** 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* **353**: 815-821.
- Liang, Y., S. S. Patel y D. H. Dean.** 1985. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* **270**: 24719-24724.
- Luo, K., Y. J. Lu y M. J. Adang.** 1996. A 106 kDa from of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **26**: 783-791.
- Luo, K., S. Sangadala, L. Masson, A. Mazza, R. Brousseau y M. J. Adang.** 1997. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as "receptor A" by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**: 735-743.
- Luo, K., D. Banks y M. J. Adang.** 1999. Toxicity, binding, and permeability analysis of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane

vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. Appl. Environ. Microbiol. **65**:457-464.

MacIntosh, S. C., T. B. Stone, R. S. Jakerst y R. L. Fuchs. 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**:8930-8933.

Martínez-Ramírez, A. C., S. González-Nebauer, B. Escriche y M. D. Real. 1994. Ligand blot identification of a *Manduca sexta* midgut binding protein specific to three *Bacillus thuringiensis* Cry-type ICPs. Biochem. Biophys. Res. Comm. **201**:782-787.

Masson, L., Y. J. Lu, A. Mazza, R. Brrousseau y M. J. Adang. 1995. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. J. Biol. Chem. **270**: 20309-20315.

McGaughey, W. H y D. E. Johnson. 1994. Influence of crystal protein composition of *Bacillus thuringiensis* strain on cross-resistance in Indian-meal moths (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. **80**:535-540.

Milne, R. E., A. S. D. Pang y H. Kaplan. 1995. A protein complex from *Choristeneura fumiferana* gut-juice involved in the precipitation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. Insect. Biochem. Mol. Biol. **25**:1101-1114.

Milne, R. E., T. Wright, H. Kaplan y D. Dean. 1998. Spruce budworm elastase precipitates *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by specifically recognizing the C-terminal region. Insect. Biochem. Mol. Biol. **28**:1013-1023.

Moar, W. J., L. Masson, R. Brousseau y J. T. Trumble. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2480-2483.

Munson, P. y D. Rodbard. 1980. LIGAND: a versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. Anal. Biochem. **107**:220-239.

Oddou, P., H. Hartmann y M. Geiser. 1991. Identification and characterization of *Heliothis virescens* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. Eur. J. Biochem. **202**:673-680.

Oddou, P., H. Hartmann, F. Radecke y M. Geiser. 1993. Immunologically unrelated *Heliothis sp.* and *Spodoptera sp.* midgut membrane proteins binding *Bacillus thuringiensis* Cry IA(b) δ -endotoxins. Eur. J. Biochem. **212**:145-150.

- Ogiwara, K., L. S. Indrasith, S. Asano y H. Hori. 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *krustaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **60**:121-126.
- Oppert, B., K. J. Kramer, D. E. Johnson, S. C. MacIntoch y W. H. McGaughey. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 940-947.
- Pietrantonio, P. V. y S. S. Gill. 1992. The parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *shandongensis*: characterization and screening for insecticidal activity. *J. Invertebr. Pathol.* **59**:296-302.
- Peyronnet, O., V. Vachon, R. Brosseau, D. Baines, J-L. Schwartz y R. Laprade. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1679-1684.
- Sacchi V. F., P. Parenti, G. M. Hanzot, B. Giordana, P. Lüthy y M. G. Wolfersberger. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺ gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *FEBS Lett.* **204**: 213-218.
- Sanchis, V. y D. J. Ellar. 1993. Identification y partial purification of a *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxins binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS Lett.* **316**:264-268.
- Sangadala, S., F. S. Walters, L. H. English y M. J. Adang. 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and ⁸⁶Rb⁺-K⁺ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**:10088-10092.
- Schnepf, E. H., K. Tomczac, J. P. Ortega y H. R. Whiteley. 1990. Specificity determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **265**:20923-20930.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler y D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:775-806.
- Stewart, G. S. A., K. Johnstone, E. Hagelberg y D. J. Ellar. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate. *Biochem. J.* **198**:101-106.
- Tabashnik, B., N. Finson, M. W. Johnson y D. G. Heckel. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4627-4629.

- Tang, J. D., A. M. Shelton, J. Van Rie, S. Roeck, W. J. Moar, R. T. Roush, y M. Peferoen.** 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:564-569.
- Thomas, W. y D. J. Ellar.** 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal δ -endotoxin. *FEBS Lett.* **154**:362-368.
- Vadlamudi, R. K., T. H. Ji y L. A. Bulla, Jr.** 1993. A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *J. Biol. Chem.* **268**:12334-12340.
- Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji y L. A. Bulla, Jr.** 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**:5490-5494.
- Valaitis, A. P., A. Mazza, R. Bronsseau y D. H. Dean.** 1997. Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**:529-539.
- Van Frankenhuisen, K.** 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*, p. 1-35. *In Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey, and S. Higgs (Ed.). John Wiley & Sons LTD. England.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert.** 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* **186**:239-247.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert.** 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinant of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1378-1385.
- Von Tersch, M. A., H. L. Robins, S. C. Jany y T. B. Johnson.** 1991. Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*: gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(c). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:349-358.
- Wabiko, H., K. C. Raymond y L. A. Bulla, Jr.** 1986. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. *DNA.* **5**:305-314.
- Wolfersberger, M.G.** 1989. Neither barium nor calcium prevents the inhibition by *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins of sodium or potassium gradient dependent

amino acid accumulation by tobacco hornworm midgut brush border membrane vesicles. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **12**:267-277.

Wolfersberger, M. G. 1990. Toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites of midgut brush border membranes for the toxins. *Experientia* **46**:475-477.

Wolfersberger, M., P. Luetny, A. Maurer, P. Parenti, F. V. Sacchi, B. Giordana y G. M. Hanoztt. 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86**:301-308.

Wu, D. y A. I. Aronson. 1992. Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**:2311-2317.

Yang, Y. J. y D. M. Davies. 1971. Digestive enzymes in the excreta of *Aedes aegypti* larvae. *J. Insect Physiol.* **17**: 2119- 2123.

Yaoi, K., T. Kadotani, H. Kuwana, A. Shinkawa, T. Takanashi, H. Iwahana y R. Isato. 1997. Aminopeptidase N from *Bombix mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Eur. J. Biochem.* **246**: 652-657.

Yu, Cao-Guo., M. A. Mullins, G. W. Warren, M. G. Koziel y J. J. Estruch. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:532-536.

Zhu, Y-C., B. Oppert, K. Kramer, W. H. MacGaughey y A. K. Dowdy. 1997. cDNAs for a chymotrypsinogen-like protein from two strains of *Plodia interpunctella*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **27**:1027-1037.

APENDICE A

MEDIO CCY PARA ESPORULACION DE *Bacillus thuringiensis*

Tomado de Stewart et al., 1981

El medio deberá ser preparado como sigue:

1. SOLUCION AMORTIGUADORA BASE

13 mM KH_2PO_4

26mM K_2HPO_4

2. A la solución amortiguadora base se le añaden 120 ml por litro de la siguiente solución nutritiva base:

L-Glutamina	200 mg
Hidrolizado ácido oxoide de caseina	10 gm
Castona	10 gm
Extracto de levadura	4 gm
Glicerol	6% peso/peso
Agua destilada	aforar a 100 ml

Esterilice por AUTOCLAVE

3. Inmediatamente antes de uso, al medio se le añade 1 ml por litro de la siguiente solución de sales:

1 litro de la solución de sales contiene:

ZnCl_2	0.05M	(6.8 gm)
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5M	(101.65 gm)
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01M	(1.97 gm)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2M	(29.4 gm)
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05	(13.5 gm)

Una vez preparada la solución anterior, añadir 1 ml de HCl concentrado por cada 100 ml de solución y esterilice por FILTRACION. La solución deberá tener un color amarillo brillante. Almacene en volúmenes de 100 ml.

APENDICE B

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

I. Preparación del gel (Utilizar cámara Mighty Small SE 22245/HOEFER)

Se toman dos placas de vidrio, dos separadores y un peine. Se limpian con jabón y luego con etanol (use guantes, evite tocar el material con los dedos). Se montan y a continuación se prepara el gel separador 10%. Mezclar la acrilamida/bisacrilamida, Tris y agua. Desgasear durante aproximadamente 10 minutos. Añadir seguidamente el SDS, persulfato de amonio y 7.5 μ l de TEMED. Agitar bien. Verter la solución entre las placas de vidrio con la ayuda de una pipeta Pasteur, hasta que con el peine puesto quede a nivel de unos 3 cm del fondo de los pocillos. Añadir por encima isobutanol saturado con agua, aproximadamente 7 mm de altura, para que la acrilamida no esté en contacto con el aire y pueda polimerizar (mezclar 1:1 v/v isobutanol y agua, agitar bien, dejar reposar y usar la fase superior que es el isobutano saturado de agua). Poner el peine y dejar polimerizar el gel aproximadamente 1 hora.

Eliminar el isobutanol por decantación y enjuagar con agua cuatro veces. Preparar el gel concentrador 5% y verterlo por el centro de las placas de vidrio, con el peine puesto, hasta rebosar. Dejar polimerizar durante aproximadamente una hora y media.

	Separador	Concentrador
H ₂ O	4ml	2.25ml
Tris 3M, pH 8.8	0.785ml	-----
Tris 1M, pH 6.8	-----	0.625ml
SDS 10%	75 μ l	50ul
APS 10%	25 μ l	16.5 μ l
Acrilamida 30%+		
Bisacrilamida 0.8%	2.5 ml	800 μ l
Sacarosa 60%	-----	1.25 ml
Volumen total	7.4 ml	5 ml

Nota: 1) Después de desgasear 15 minutos el gel separador y 5 minutos el gel concentrador se añaden 7.5 μ l de TEMED.

2. La sacarosa se filtra con filtros Millipore tipo HV, tamaño de poro 0.45 μ m.

3. La mezcla de acrilamida/bisacrilamida, se guarda en nevera y protegida de la luz.

II. Tampón de muestra: TESADS (Guardar como max. 1 semana)

Tampón TESA (0.1 azul de bromofenol, 5mM EDTA, 200mM Tris-HCl pH 6.8 y sacarosa 1 M). A 900 μ l de tampón TESA se añaden 300 μ l de SDS 10% y 18 μ l de DTT 0.5 M, de esa manera se obtiene el TESADS.

En 10 ml de Tampón TESA: 10 mg de azul de bromofenol, 19 mg EDTA, 2 ml Tris-HCl 1 M y 33.4213 g sacarosa.

III. Tampón de electroforesis (5X)

Tris 0.25 M pH 8.5

Glicina 1.92 M

SDS 0.5%

Nota: No hace falta ajustar el pH, pues ya sale el requerido

IV. Preparación de muestras.

A la cantidad correspondiente de cada muestra (10 μ l) se le añaden 20 μ l de tampón de muestra. En cada Eppendorf se realiza una punción con una aguja y se calientan las muestras en baño de arena durante 10 minutos, con el fin de liberar los gases producidos. Es conveniente igualar el volumen y poner en el gel la misma cantidad de muestra en cada pocillo.

V. Tinción Coomassie.

Destinción 10% Acido acético
25% Metanol

Tinción: Azul Coomassie 0.1%
50% Metanol
10% Acido acético

El gel se sumerge en la solución de tinción durante 40 minutos, en agitación constante. A continuación se decanta la solución colorante y se substituye por la decolorante. El gel se mantiene en esta última hasta que se obtenga un fondo mas o menos transparente (aprox. Toda la noche en agitación). La solución decolorante se puede reemplazar a conveniencia, a medida que ésta vaya adquiriendo color.

APENDICE C

Composición de la dieta artificial para *T. ni*

Ingredientes	g/l
Harina de soja	71.0
gérmen de trigo	31.0
ácido sórbico	10.6
ácido ascórbico	4.3
sacarosa	13.0
metil paraben	1.6
agar-agar	14.0
formalina al 10%	4.4
cloruro de colina	1.09
vitaminas	3.5
eritromicina	0.6

Mezcla de vitaminas:

pantotenato de calcio, 12 mg; ácido nicotínico, 6 mg; riboflavina, 3 mg;
 ácido fólico, 3 mg; tiamina, 1.5 mg; pirridoxina, 1.5 mg; biotina, 0.12 mg;
 vitamina B₁₂, 0.12 mg; Agua bidestilada, 1 litro.

Preparación de la dieta:

Mezclar el agar-agar con el agua y calentar hasta ebullición, cuando el agar este completamente disuelto, agregar: harina de soja, gérmen de trigo, sacarosa, ácido sórbico y ascórbico, homogenizar o liquar, hasta uniformizar la mezcla. Una vez que la mezcla se encuentre aproximadamente a 60 °C, agregar el resto de los ingredientes y depositar en los recipientes correspondientes.

APENDICE D

CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

1. Preparar una solución de BSA a 20 mg/ 100 ml en agua bidestilada, la concentración exacta se determina espectrofotométricamente teniendo en cuenta $E^{1\%}(280\text{nm})=6.60$
2. Para construir una recta patrón preparar 6 tubos con las cantidades indicadas en la tabla:

Tubo #	Agua (μl)	REACTIVO (μl)	BSA (μl)
0	800	200	0
1	798	200	2
2	796	200	4
3	794	200	6
4	792	200	8
5	790	200	10

4. Preparar 2 tubos para la muestra problema con cantidades idénticas de agua y reactivo de Bradford a los de la curva patrón, adicionar 5 μl y 10 μl , en lugar de albumina
5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y leer absorbancia a 550 nm
6. Con los datos de la curva patrón graficar absorbancia contra concentración y analizar mediante una regresión lineal
7. Interpolar los datos de absorbancia de la muestra problema y calcular la concentración

APENDICE E**Análisis Probit**

PROBIT

TCXINA: CryIAc(HD-73)

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
HD-73 TR	.00000	.000000	36.	2.	.000
	18.00000	1.255273	12.	9.	.750
	6.00000	.778151	12.	6.	.500
	2.00000	.301030	12.	2.	.167
	.60000	-.221849	12.	1.	.083
	18.00000	1.255273	12.	9.	.750
	6.00000	.778151	12.	4.	.333
	2.00000	.301030	12.	4.	.333
	.60000	-.221849	12.	3.	.250
	18.00000	1.255273	12.	8.	.667
	6.00000	.778151	12.	6.	.500
	2.00000	.301030	12.	4.	.333
	.60000	-.221849	12.	3.	.250

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.55	0.99
LD10 HD-73 TR	.56332	lower	.08233	.04009	.00376
		upper	1.31720	1.47938	1.80958
LD50 HD-73 TR	7.54495	lower	4.44529	3.92464	2.88743
		upper	13.47942	15.71378	23.68461
LD90 HD-73 TR	101.05	lower	40.663	35.950	29.066
		upper	814.22	1783.7	23663.

t.ni

HD-73 TR subjects 144 controls 36

log(L)=-93.18 slope=1.157+- .292 nat.resp.=.061+- .042
heterogeneity=.48 g=.253

LD50=7.545 limits: 3.925 to 15.714

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
Aa PGS	.00000	.000000	24.	2.	.167
	1200.00000	3.079181	12.	12.	1.000
	800.00000	2.903090	12.	10.	.833
	533.00000	2.726727	12.	9.	.750
	355.00000	2.550228	12.	4.	.333
	1200.00000	3.079181	12.	12.	1.000
	800.00000	2.903090	12.	10.	.833
	533.00000	2.726727	12.	6.	.500
	355.00000	2.550228	12.	4.	.333
	1.00000	.000000	12.	1.	.083
	1200.00000	3.079181	12.	11.	.917
	800.00000	2.903090	12.	10.	.833
	533.00000	2.726727	12.	10.	.833
	355.00000	2.550228	12.	8.	.667

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 Aa PGS	190.70775	lower	105.77643	87.93962	53.27675
		upper	259.18481	270.70829	292.01732
LD50 Aa PGS	420.47044	lower	331.84501	310.29722	260.82768
		upper	490.59336	503.48746	529.06297
LD90 Aa PGS	927.04876	lower	779.53242	758.56698	721.45051
		upper	1240.17018	1351.61508	1696.56002

T.NI

Aa PGS subjects 156 controls 24
 log(L)=-78.25 slope=3.732+- .761 nat.resp.=.084+- .046
 heterogeneity=.80 g=.160
 LD10=190.708 limits: 87.940 to 270.708
 LD50=420.470 limits: 310.297 to 503.487
 LD90=927.049 limits: 758.567 to 1351.615

AB ECOGE	.00000	.000000	48.	1.	.000
	50.00000	1.698970	12.	12.	1.000
	15.00000	1.176091	12.	12.	1.000
	5.00000	.698970	12.	3.	.250
	1.50000	.176091	12.	2.	.167
	.50000	-.301030	12.	1.	.083
	50.00000	1.698970	12.	12.	1.000
	15.00000	1.176091	12.	11.	.917
	5.00000	.698970	12.	9.	.750
	1.50000	.176091	12.	6.	.500
	.50000	-.301030	12.	1.	.083
	50.00000	1.698970	12.	12.	1.000
	15.00000	1.176091	12.	10.	.833
	5.00000	.698970	12.	9.	.750
	1.50000	.176091	12.	6.	.500
	.50000	-.301030	12.	1.	.083
	50.00000	1.698970	12.	12.	1.000
	15.00000	1.176091	12.	10.	.833
	5.00000	.698970	12.	6.	.500
	1.50000	.176091	12.	1.	.083
	.50000	-.301030	12.	0.	.000

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 AB ECOGE	.75451	lower	.40129	.33509	.20925
		upper	1.15090	1.23887	1.42989
LD50 AB ECOGE	3.45110	lower	2.53765	2.35524	1.97219
		upper	4.55982	4.84124	5.52608
LD90 AB ECOGE	15.78511	lower	11.08032	10.39519	9.15765
		upper	26.16450	30.12723	43.34877

T.NC

AB ECOGE subjects 240 controls 48
 log(L)=-56.27 slope=1.941+- .231 nat.resp.=.021+- .020
 heterogeneity=1.31 g=.082
 LD10=.755 limits: .335 to 1.239
 LD50=3.451 limits: 2.355 to 4.841
 LD90=15.785 limits: 10.395 to 30.127

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
ABPGS	.00000	.000000	36.	3.	.083
	30.00000	1.477121	12.	10.	.833
	10.00000	1.000000	12.	8.	.667
	3.30000	.518514	12.	5.	.417
	1.10000	.041393	12.	2.	.167
	.37000	-.431798	12.	2.	.167
	30.00000	1.477121	12.	9.	.750
	10.00000	1.000000	12.	6.	.500
	3.30000	.518514	12.	4.	.333
	1.10000	.041393	12.	3.	.250
	.37000	-.431798	12.	2.	.167
	30.00000	1.477121	12.	12.	1.000
	10.00000	1.000000	12.	11.	.917
	3.30000	.518514	12.	10.	.833
	1.10000	.041393	12.	4.	.333
	.37000	-.431798	12.	2.	.167

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 ABPGS	.43327	lower	.08193	.04347	.00454
		upper	1.01087	1.16068	1.51393
LD50 ABPGS	4.40041	lower	2.34165	1.93298	1.07173
		upper	7.31724	8.23119	11.02053
LD90 ABPGS	44.69128	lower	22.74196	20.25555	16.09441
		upper	155.86523	247.72364	1261.11950

T.NI

ABPGS subjects 180 controls 36
 $\log(L) = -108.6$ slope = $1.273 \pm .229$ nat.resp. = $.082 \pm .043$
 heterogeneity = 1.28 $g = .194$
 LD10 = 4.433 limits: .043 to 1.161
 LD50 = 4.400 limits: 1.933 to 8.231
 LD90 = 44.691 limits: 20.256 to 247.724

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
AC PGS	.00000	.000000	48.	0.	.000
	30.00000	1.477121	12.	12.	1.000
	10.00000	1.000000	12.	7.	.583
	3.30000	.518514	12.	2.	.167
	1.10000	.041393	12.	1.	.083
	.37000	-.431798	12.	0.	.000
	30.00000	1.477121	12.	9.	.750
	10.00000	1.000000	12.	7.	.583
	3.30000	.518514	12.	2.	.167
	1.10000	.041393	11.	1.	.091
	30.00000	1.477121	12.	12.	1.000
	10.00000	1.000000	12.	11.	.917
	3.30000	.518514	12.	7.	.583
	.37000	-.431798	12.	0.	.000
	30.00000	1.477121	12.	12.	1.000
	10.00000	1.000000	12.	11.	.917
	3.30000	.518514	12.	7.	.583
	1.10000	.041393	12.	6.	.500
	.37000	-.431798	12.	1.	.083

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 AC PGS	.72397	lower	.29321	.21872	.09179
		upper	1.23805	1.35636	1.61997
LD50 AC PGS	4.11937	lower	2.76053	2.49838	1.94465
		upper	6.07659	6.67176	8.38760
LD90 AC PGS	23.43904	lower	13.98107	12.79528	10.75857
		upper	55.44251	73.19727	166.31278

T.NI

AC PGS subjects 215 controls 48
log(L)=-94.27 slope=1.697--.194 nat.resp.--.000+--.000
heterogeneity=2.32 g=.137
LD10=.724 limits: .219 to 1.356
LD50=4.119 limits: 2.498 to 6.672
LD90=23.439 limits: 12.795 to 73.197

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
AC ECOGE	.00000	.000000	36.	0.	.000
	8.00000	.903090	12.	11.	.917
	2.50000	.397940	12.	4.	.333
	.80000	-.096910	12.	2.	.167
	.25000	-.602060	12.	1.	.083
	8.00000	.903090	12.	11.	.917
	2.50000	.397940	12.	9.	.750
	.80000	-.096910	12.	7.	.583
	.25000	-.602060	12.	2.	.167
	2.50000	.397940	12.	11.	.917
	.80000	-.096910	12.	6.	.500
	.25000	-.602060	12.	2.	.167

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 AC ECOGE	.18130	lower	.04700	.02594	.00169
		upper	.34733	.38860	.48739
LD50 AC ECOGE	1.18606	lower	.74035	.64353	.40604
		upper	1.92224	2.22401	3.63006
LD90 AC ECOGE	7.78527	lower	4.02342	3.59138	2.85747
		upper	30.83190	56.58645	923.87203

T.NI

AC ECOGE subjects 132 controls 36
 log L = -68.89 slope = 1.570 ± .257 nat.resp. = .000 ± .000
 heterogeneity = 1.76 g = .241
 LD10 = .181 limits: .026 to .389
 LD50 = 1.188 limits: .644 to 2.224
 LD90 = 7.785 limits: 3.591 to 56.586

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
IC	.00000	.000000	36.	4.	.167
	330.00000	2.518514	12.	12.	1.000
	111.00000	2.045323	12.	12.	1.000
	37.00000	1.568202	12.	11.	.917
	12.30000	1.089905	12.	10.	.833
	330.00000	2.518514	12.	12.	1.000
	111.00000	2.045323	12.	11.	.917
	37.00000	1.568202	12.	6.	.500
	12.30000	1.089905	12.	6.	.500
	4.10000	.612784	12.	4.	.333
	330.00000	2.518514	12.	12.	1.000
	111.00000	2.045323	12.	12.	1.000
	37.00000	1.568202	12.	10.	.833
	12.50000	1.096910	12.	6.	.500
	4.10000	.612784	12.	3.	.250

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 IC	2.21406	lower	.51027	.28980	.03726
		upper	4.65239	5.25426	6.64290
LD50 IC	12.20378	lower	6.34884	5.08205	2.40608
		upper	18.83082	20.56258	25.04371
LD90 IC	67.26664	lower	42.58097	39.01136	32.32654
		upper	141.39390	183.83669	453.82358

T.NI

IC subjects 168 controls 36
log(L)=-77.02 slope=1.729+-.310 nat.resp.=.113+-.053
heterogeneity=1.26 g=.193
LD10=2.214 limits: .290 to 5.254
LD50=12.204 limits: 5.082 to 20.563
LD90=67.267 limits: 39.011 to 183.837

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
IIA	.00000	.000000	36.	0.	.000
	1000.00000	3.300000	12.	12.	1.000
	350.00000	2.544068	12.	9.	.750
	110.00000	2.041393	12.	8.	.667
	30.00000	1.477121	12.	3.	.250
	12.00000	1.079181	12.	2.	.167
	4.00000	.602050	12.	1.	.083
	1000.00000	3.000000	12.	12.	1.000
	350.00000	2.544068	12.	12.	1.000
	110.00000	2.041393	12.	12.	1.000
	30.00000	1.477121	12.	10.	.833
	12.00000	1.079181	12.	3.	.250
	1.00000	.000000	12.	1.	.083
	1000.00000	3.000000	12.	12.	1.000
	350.00000	2.544068	12.	12.	1.000
	110.00000	2.041393	12.	7.	.583
	30.00000	1.477121	12.	4.	.333
	12.00000	1.079181	12.	3.	.250
	4.00000	.602060	12.	1.	.083

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 IIA	4.22335	lower	1.65658	1.24845	.57172
		upper	7.67924	8.52158	10.44735
LD50 IIA	34.22200	lower	22.08237	19.83980	15.29369
		upper	51.82361	56.98058	71.05718
LD90 IIA	277.30175	lower	160.00446	145.16418	119.74805
		upper	543.40394	827.51784	1651.14904

T.NI

IIA subjects 216 controls 36
log(L)=-86.66 slope=1.410+- .161 nat.resp.=.000-- .000
heterogeneity=1.76 g=.103
LD10=4.223 limits: 1.248 to 8.522
LD50=34.222 limits: 19.840 to 56.981
LD90=277.302 limits: 145.164 to 827.518

Probit

toxina: Cry IFa

preparation	dose	log-dose	subjects	responses	resp/subj
IFa	.00000	.000000	36.	2.	.083
	370.00000	2.568202	12.	7.	.583
	120.00000	2.079181	12.	3.	.250
	40.00000	1.602060	12.	2.	.167
	370.00000	2.568202	12.	7.	.583
	120.00000	2.079181	12.	4.	.333
	40.00000	1.602060	12.	2.	.167
	13.00000	1.113943	12.	1.	.083
	370.00000	2.568202	12.	11.	.917
	120.00000	2.079181	12.	4.	.333
	40.00000	1.602060	12.	4.	.333
	13.00000	1.113943	12.	2.	.167

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 IFa	31.15008	lower	2.85195	.79735	
		upper	67.08052	73.86329	
LD50 IFa	224.53648	lower	135.99886	117.20267	
		upper	387.13580	463.57493	
LD90 IFa	1618.5	lower	727.94	658.90	
		upper	19905.	76071.	

T.NI

IFa subjects 132 controls 36

log(L)=-81.06 slope=1.494+- .495 nat.resp.=.069+- .047
heterogeneity=.87 g=.421

LD50=224.536 limits: 117.203 to 463.575



