



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PAPEL DE LA AMINOPEPTIDASA-1 Y CADHERINA DE  
*Spodoptera frugiperda* EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS  
TOXINAS Cry1Ca Y Cry1Fa DE *Bacillus thuringiensis***

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
FRANCISCO JAVIER PORTUGAL ROJAS**

**DIRECTOR: Dra. ISABEL GOMEZ**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**Marzo, 2021**

**“PAPEL DE LA AMINOPEPTIDASA-1 Y CADHERINA DE  
*Spodoptera frugiperda* EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS  
TOXINAS Cry1Ca Y Cry1Fa DE *Bacillus thuringiensis*”**

**Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Isabel Gómez en el Laboratorio del Dr. Mario Soberon Chávez en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

## Agradezco

Inmensamente a la Dra. Isabel Gómez por su guía y apoyo en el desarrollo de este proyecto, por su tiempo y paciencia para instruirme y lo más importante por enseñarme a forjar carácter y no darme por vencido, gracias Isa.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por los recursos y las facilidades brindadas para realizar este proyecto.

A los doctores Mario Soberon y Alejandra Bravo por abrirme las puertas y permitirme incorporarme a su equipo de laboratorio, por su apoyo y buenos consejos.

A Mary Carmen, Paulina Anaya y Jared Cenicerros por brindarme su amistad y hacer de mi estancia un bonito recuerdo.

A todos los integrantes del laboratorio por sus buenas críticas y observaciones en el proyecto y por las atenciones brindadas.

A los miembros de mi comité sinodal por seguir de cerca el desarrollo del proyecto, por sus observaciones, discusiones y comentarios para culminar este trabajo.

A todos mis amigos, compañeros y maestros por hacer de la carrera una de las mejores experiencias de mi vida. Gracias totales.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> ( <i>Bt</i> ).....	2
1.2 Toxinas Cry ( $\delta$ -endotoxinas).....	3
1.3 Mecanismo de acción de las toxinas Cry.....	5
1.4 El modelo de la vía de señalización .....	6
1.5 El modelo de formación de poro .....	6
1.6 Proteínas receptoras de las toxinas Cry .....	7
1.6.1 Cadherina.....	8
1.6.2 Aminopeptidasa (APN) .....	8
1.6.3 Fosfatasa Alcalina (ALP) .....	8
1.6.4 Transportador ABCC2.....	9
<b>2. ANTECEDENTES PARTICULARES.....</b>	<b>10</b>
2.1 Plagas agrícolas .....	10
2.2 <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	11
2.3 Resistencia a las toxinas Cry .....	12
2.4 Estrategias para disminuir resistencia.....	13
2.5 Silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi) .....	14
2.6 Antecedentes de RNA de interferencia en insectos.....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
5.1 Objetivo general .....	17
5.2 Objetivos particulares .....	17
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
6.1 Purificación de cristales de la toxina Cry1Ca y Cry1Fa.....	18
6.2 Bioensayos con larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	19

6.3	Expresión de dsRNA en <i>E. coli</i> .....	19
6.4	Alimentación de larvas de <i>S. frugiperda</i> con dsRNA .....	20
6.5	Extracción de intestino de <i>S. frugiperda</i> .....	20
6.6	Purificación de RNA total .....	20
6.7	Cuantificación del RNA total .....	20
6.8	Síntesis de cDNA .....	21
6.9	qPCR (PCR en tiempo real) .....	22
6.10	Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford .....	22
6.11	Western-Blot.....	23
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
7.1	Expresión y purificación de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa .....	24
7.2	Determinación de la LC <sub>50</sub> de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa en <i>S. frugiperda</i> .....	25
7.3	Expresión del dsRNA .....	26
7.4	Análisis del silenciamiento de APN-1 y Cadherina mediante qPCR .....	27
7.5	Análisis del silenciamiento de APN-1 y Cadherina mediante Westernblot .....	30
7.6	Efecto del silenciamiento de APN-1 y Cadherina en la susceptibilidad de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa en larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	32
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>9.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>36</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>37</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>39</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Alp	Fosfatasa alcalina
AMPC	Adenosina Monofosfato cíclico
Anti-APN1	Anticuerpo policlonal específico para aminopeptidasa1
Anti-Cad	Anticuerpo policlonal específico para Cadherina
APN	Aminopeptidasa N
APN-1	Isoforma1 de la Aminopeptidasa N
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B. mori</i>	<i>Bombix mori</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. suppressalis</i>	<i>Chilo suppressalis</i>
Dicer	Complejo enzimático de endonucleasas
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DTT	Ditiotreitol
dsRNA	RNA de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPA	Environmental Protection Agency
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
<i>H. armigera</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
<i>H. virescens</i>	<i>Heliothis virescens</i>
kDa	Kilodalton
LC <sub>50</sub>	Concentracion letal media
mAh	Miliamperios por hora
MQ	Agua Mili Q
<i>M. sexta</i>	<i>Manduca sexta</i>

Pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RISC	Complejo inductor de silenciamiento mediante RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNAm	RNA mensajero
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio- poliacrilamida
<i>S. exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>S. litura</i>	<i>Spodoptera litura</i>
siRNA	RNA pequeño interferente
UV	Ultravioleta

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Bacillus thuringiensis</i> en fase de esporulación.....	3
Figura 2: Nomenclatura de las toxinas .....	4
Figura 3: Estructura tridimensional de diferentes toxinas Cry. ....	5
Figura 4: Modelo de formación de poro.....	7
Figura 5: Especies de lepidópteros plagas comunes de arroz, algodón y maíz .....	10
Figura 6: <i>S. frugiperda</i> en estadio larval.....	11
Figura 7: Toxinas Cry reportadas contra especies del género <i>Spodoptera</i> .....	12
Figura 8: Mecanismos de resistencia en toxinas Cry de 3 dominios descritos en insectos lepidópteros.....	14
Figura 9: Proceso de regulación de la expresión de genes mediante RNAi.....	15
Figura 10: Gel de Acrilamida al 10% teñido en Coomassie. ....	24
Figura 11: Expresión del RNA de doble cadena.....	26
Figura 12: Análisis por qPCR del silenciamiento de APN-1. ....	28
Figura 13: Análisis por qPCR del silenciamiento de Cadherina. ....	29
Figura 14: Westernblot anti APN-1 .....	31
Figura 15: Análisis de la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> silenciadas en APN-1 y Cad retadas con la toxina Cry1Ca. ....	32
Figura 16: Análisis de la mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> silenciadas y retadas con la toxina Cry1Fa .....	34
Figura 17: Mapa del vector Litmus28i .....	37
Figura 18: Representación gráfica de la síntesis del dsRNA .....	38



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Listado de soluciones y medios empleados .....	18
Tabla 2: Secuencias de Oligonucleótidos .....	21
Tabla 3: Parámetros utilizados para la qPCR.....	22
Tabla 4: Concentracion letal media de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa en <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	25

## RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria capaz de sintetizar proteínas con actividad insecticida denominadas toxinas Cry, con gran potencial biotecnológico en el control de plagas agrícolas, ya que son biodegradables, específicas contra distintos órdenes de insectos e inocuas para el humano. Uno de los aspectos más abordados de las toxinas Cry es su mecanismo de acción; se han propuesto algunos modelos en los cuales participan proteínas que han sido descritas como receptores, entre ellas: Aminopeptidasas, Fosfatasas alcalinas, Cadherinas y recientemente el transportador ABCC2. Numerosos estudios indican que las proteínas de tipo Aminopeptidasa y Cadherina son receptores funcionales de toxinas Cry1 en distintas especies de lepidópteros.

En este trabajo se determinó el papel de las proteínas Aminopeptidasa-1 y Cadherina del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* en el mecanismo de acción las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa. Se lograron purificar las protoxinas Cry1Ca y Cry1Fa de *Bt* y se determinaron sus concentraciones letales medias en *Spodoptera frugiperda*. Mediante el uso de Silenciamiento genético mediado por RNA de interferencia, se diseñaron y se expresaron en *E. coli* (cepa HT115) fragmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) específicos para suprimir la expresión de APN-1 y Cad, el dsRNA se administró mediante dieta oral a larvas neonatas y 5 días después se analizó el nivel de silenciamiento mediante las técnicas qPCR y Western blot para detectar la expresión del transcrito y de la proteína. Se logro silenciar la expresión de ambas proteínas en un 90% para APN-1 y un 80% para cadherina. Otro grupo se utilizó para realizar bioensayos de mortalidad en donde se observó que la ausencia de estas proteínas tiene un papel diferencial en el mecanismo de acción, puesto que la mortalidad en las larvas silenciadas en APN-1 y Cad y retadas con la toxina Cry1Ca disminuyo un 85% y un 81.25% respectivamente mientras contra la toxina Cry1Fa la mortalidad disminuyo en un 65% en la ausencia de APN-1 y 0% en la ausencia de Cad. Estos datos indican que estas proteínas si participan como receptores para las toxinas Cry1Ca y únicamente APN-1 para Cry1Fa.

## 1. INTRODUCCION

El crecimiento poblacional demanda que la producción de alimentos sea cada vez más efectiva, tan solo en 50 años, la población mundial creció de 2.5 mil millones a 6.1 mil millones para el año 2000 y se estima que para el año 2050 ascenderá a 9.1 mil millones de personas (Carvalho, 2006). En 2014 “The State of Food and Agriculture” (FAO) reportó que más de 500 millones de familias granjeras producen el 80% de la comida a nivel mundial. Uno de los principales problemas que enfrenta la producción agrícola son las plagas; se estima que existen unas 67,000 especies de plagas diferentes incluyendo patógenos de plantas, hierbas, invertebrados y algunas especies de vertebrados; todas juntas pueden llegar a causar pérdidas hasta del 40% por año en la producción mundial (Chandler *et al.*, 2011), de los cuales los insectos representan una significativa porción de estas pérdidas y un factor importante que contribuye a su importancia dentro de las plagas agrícolas es su diversidad. Dentro del grupo animal, los insectos tienen una amplia riqueza de especies y dos tercios de las especies conocidas (>600,000) son fitófagas. La mayoría de los insectos fitófagos tienen un rango de plantas muy restringido, pero la minoría incluyen a las plagas agrícolas más importantes y pueden ocupar diferentes especies de plantas (Douglas, 2018). Ya que mantener la salud del cultivo es esencial para el éxito de producción tanto en cantidad como en calidad, se han tomado medidas dentro de las que incluyen el uso de cultivos resistentes a plagas y enfermedades, la rotación de cultivos, incluidos los que tienen pastos, para brindar interrupciones de enfermedades a cultivos susceptibles, la aplicación de prácticas de control no químicas (térmicas, mecánicas) según corresponda y, como último recurso, el uso de agroquímicos como los plaguicidas.

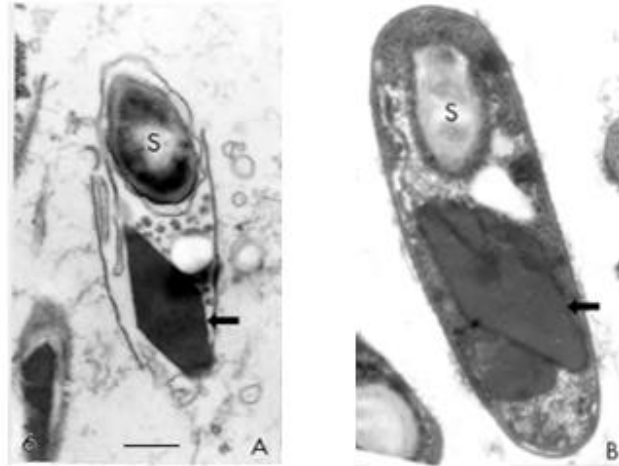
Los plaguicidas son venenos que se dispersan intencionalmente en el medio ambiente para controlar plagas, sin embargo, también actúan sobre especies no específicas, contaminan suelos y aguas, permanecen en los cultivos, en la cadena alimenticia y finalmente son consumidos por el humano (Carvalho, 2006). Uno de los más representativos es el Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), desarrollado en 1940 como el primer insecticida sintético moderno, fue bien recibido debido al bajo costo

de su producción y a su efectividad en el control de insectos. Tiempo después la publicación en 1962 de “Primavera silenciosa” de Rachel Carson estimuló la preocupación generalizada del público por los peligros del uso inadecuado de pesticidas y la necesidad de mejores controles de su uso. Fue hasta 1972 que la “Agencia de Protección Ambiental” (EPA) prohibió su uso debido a sus efectos negativos con el medio ambiente.

Actualmente una de las estrategias más efectivas es el uso de insecticidas biológicos, que se definen como productos derivados de materiales de origen natural como animales, plantas, bacterias, hongos, virus y ciertos minerales. Al final del año 2001 se registraron aproximadamente 195 ingredientes activos de bioplaguicidas, sin embargo, los más exitosos y más utilizados son subespecies y cepas de *Bacillus thuringiensis* (Wheeler, 2002).

### **1.1 *Bacillus thuringiensis* (Bt)**

Es una bacteria Gram positiva, aerobia estricta que pertenece a la familia Bacillaceae. Fue aislada por primera vez en 1901 por el biólogo japonés Shigetane Ishiwatari e identificada diez años después por el científico alemán Ernst Berliner en la localidad de Thuringia, Alemania (Ibrahim *et al.*, 2010). Presenta dos fases de crecimiento; en presencia de nutrientes crece por bipartición; sin embargo, cuando los nutrientes requeridos escasean entra en una fase estacionaria, en la que, mediante el proceso de esporulación produce una endospora y sintetiza un característico cristal proteico como se observa en la **Figura 1**. el particular interés de este cristal es que está compuesto por toxinas con actividad insecticida contra distintos órdenes de insectos como lepidópteros (polillas y mariposas) dípteros (moscas y mosquitos) y coleópteros (escarabajos) entre otros (Xu *et al.*, 2014). Los genes que codifican las toxinas Cry se encuentran en plásmidos y generalmente están flanqueados por elementos transponibles; debido a esta variabilidad genética existe una gran diversidad de cepas (Lereclus *et al.*, 1984). Hoy en día representa una herramienta importante en la agrobiotecnología como insecticida biológico alternativo para el control de las plagas de insectos.

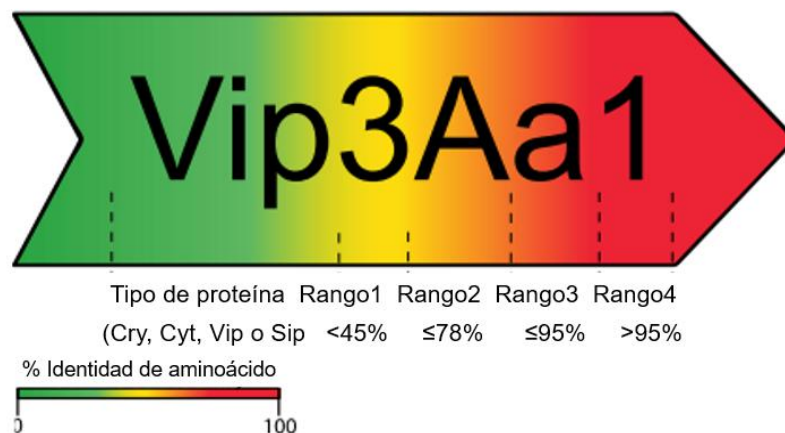


**Figura 1: *Bacillus thuringiensis* en fase de esporulación. (A) Espora e inclusión proteica madura y lista para ser liberada, (B) espora e inclusión proteica inmadura en proceso de síntesis.**

## **1.2 Toxinas Cry ( $\delta$ -endotoxinas)**

La definición de proteína Cry es cualquier proteína paraesporal de *Bt* que muestre un efecto tóxico hacia un organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry (Soberón & Bravo, 2008; Xu *et al.*, 2014).

Actualmente se han podido dividir a las toxinas Cry en varios grupos en base a su homología en secuencia de aminoácidos, donde cada protoxina adquiere un nombre que consiste en el monómero y 4 rangos jerárquicos que incluye números y letras mayúsculas y minúsculas como se aprecia en la **figura 2**. Las proteínas que comparten menos del 45% en identidad de aminoácidos comparten el rango primario (Cry1) y el 78% y 95% constituyen el rango secundario y terciario respectivamente (Cry1Aa) finalmente aquellas con más del 95% de similitud obtienen el cuarto rango (Cry1Aa1) (Palma *et al.*, 2014).

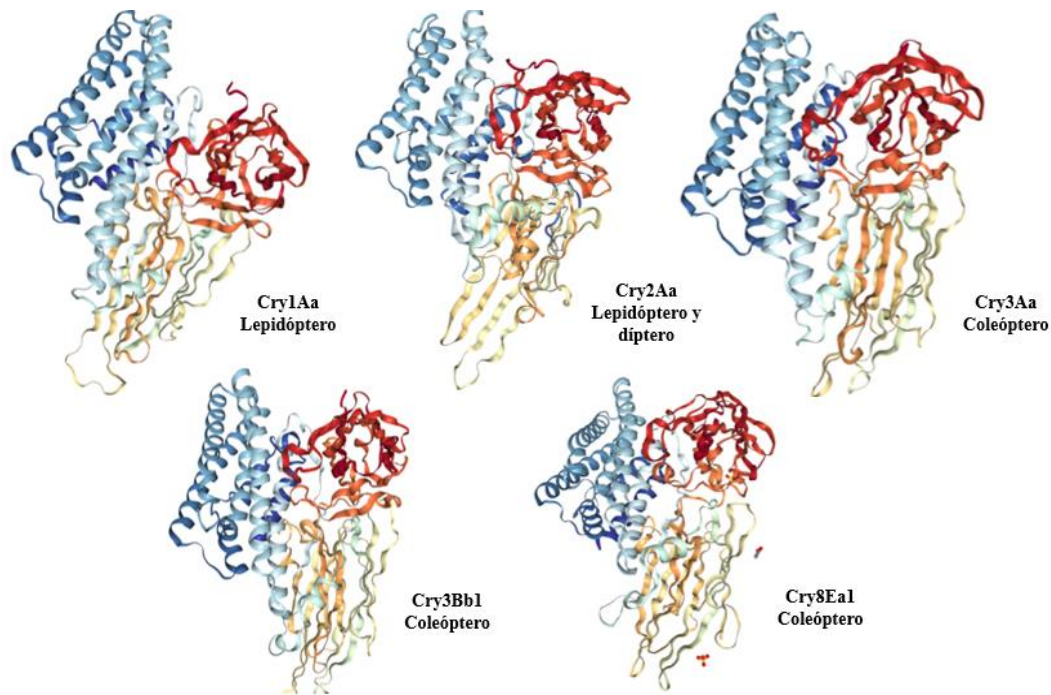


**Figura 2: Nomenclatura de las toxinas (tomada y modificada de Palma *et al.*, 2014).**

Se conocen 500 secuencias de genes Cry y han sido clasificadas en 67 grupos (Cry1-Cry67). Estas secuencias de genes se han dividido en 4 familias proteicas no relacionadas filogenéticamente que pudiesen tener diferentes mecanismos de acción; la familia de toxinas Cry tóxicas contra mosquitos (Mtx), la familia de tipo binario (Bin), la familia Cyt y la familia de tres dominios (3D-Cry) formada por al menos 40 grupos diferentes con más de 200 secuencias diferentes de genes, siendo esta familia la más grande, estudiada y caracterizada (Bravo *et al.*, 2011).

En la **figura 3** se muestran las estructuras tridimensionales reportadas para algunas toxinas Cry de 3 dominios. El **dominio I** (azul) corresponde con la región N-terminal, consiste de un manojito de 7 hélices alfa de naturaleza anfipática rodeando a la hélice alfa 5 de naturaleza hidrofóbica; este dominio es responsable de la inserción en la membrana y formación del poro, el **dominio II** o dominio central (rojo), consiste en 3 hojas  $\beta$  antiparalelas y dos hélices alfa pequeñas rodeando un núcleo hidrofóbico donde las primeras dos hojas  $\beta$  están en forma de un motivo de “llave griega”, este dominio participa en la interacción de la toxina con el receptor. Por último, el **dominio III** (Amarillo) consiste en dos hojas  $\beta$  antiparalelas retorcidas formando un emparedado con una topología de “jelly roll”, se localiza en la región C-terminal y participa en la unión a receptor y formación de poro (Palma *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014).

A pesar de que presentan notables diferencias en su secuencia de aminoácidos muestran una estructura conservada.



**Figura 3: Estructura tridimensional de diferentes toxinas Cry.  
(PDB: 1CIY, 1I5P, 1DCL, 1JI6, 3EB7)**

### 1.3 Mecanismo de acción de las toxinas Cry

Se han propuesto dos modelos en los que se describen el mecanismo por el cual las toxinas Cry provocan la muerte de los insectos: el modelo de vía de señalización y el modelo de formación de poro. Estos modelos comparten los primeros pasos, donde el insecto susceptible ingiere el cristal proteico y luego este es procesado por proteasas del intestino, activando así la forma monomérica de la toxina (Soberón *et al.*, 2005).

#### **1.4 El modelo de la vía de señalización**

Zhang y colaboradores en 2006 reportaron un estudio donde observaron que el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ab involucra la vía de señalización de la adenilato-ciclase. Su modelo propone la activación de la vía de señalización después de la unión de la toxina con el receptor tipo Cadherina, estimulando la activación de la proteína G y la adenilato ciclase, incrementando los niveles de AMPc y subsecuentemente la activación de la proteína cinasa A, proceso que culmina en la muerte celular (Zhang *et al.*, 2006)

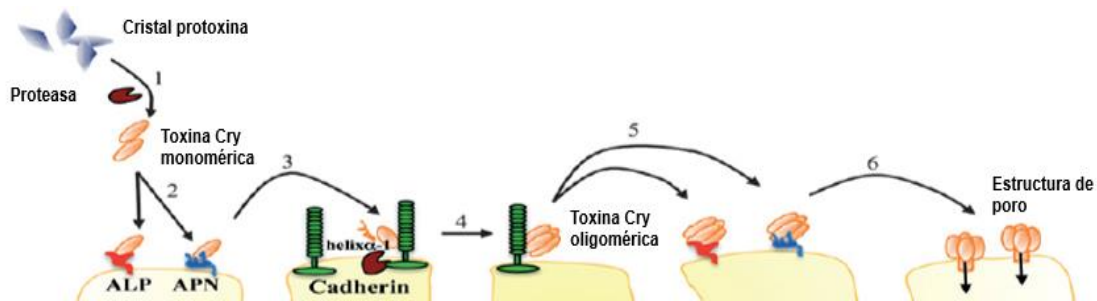
#### **1.5 El modelo de formación de poro**

Este modelo es el más estudiado y consta de diferentes pasos secuenciales: solubilización y activación, primera interacción con proteínas receptoras, unión con Cadherina y formación del pre-poro, segunda interacción con proteínas receptoras e inserción en la membrana (Xu *et al.*, 2014).

- a) Solubilización y activación: Después de que un insecto susceptible ingiere el cristal proteico, este se solubiliza gracias al ambiente alcalino y reductor del intestino de la larva, liberando así la protoxina de 130 kDa, posteriormente es digerida por proteasas, dejando al monómero en su forma activa de 60 kDa aproximadamente (Pardo-López *et al.*, 2013).
  
- b) Primera interacción con proteínas receptoras: Una vez activada la toxina, ocurre la primera interacción de baja afinidad con proteínas de tipo Aminopeptidasa (APN) o Fosfatasa alcalina (ALP) las cuales son de gran abundancia y se encuentran ancladas a la membrana mediante un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI), esta interacción provoca una concentración de monómeros en las microvellosidades de membrana del intestino del insecto para que la toxina interactúe con el receptor Cadherina (Pardo-López *et al.*, 2013).



- c) Unión con Cadherina y formación de pre-poro: La unión con Cadherina promueve la remoción de la hélice  $\alpha$ -1, un paso importante para la oligomerización de la toxina (Gómez *et al.*, 2002; Soberón *et al.*, 2007).
- d) Segunda unión con proteínas receptoras e inserción en membrana: La estructura oligomérica se une nuevamente con proteínas tipo APN o ALP las cuales acarrean al oligómero a micro dominios de membrana donde ocurre su inserción (Bravo *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2009) la inserción del oligómero en la membrana crea un poro que provoca un choque osmótico culminando en la muerte del insecto (Knowles & Ellar, 1987).



**Figura 4: Modelo de formación de poro. Se representa el mecanismo de acción de las toxinas Cry en lepidópteros a nivel molecular (Tomada y modificada de Pardo-López *et al.*, 2013)**

### 1.6 Proteínas receptoras de las toxinas Cry

En el mecanismo de acción de las toxinas Cry participan proteínas para desencadenar la actividad insecticida. Se han reportado algunas proteínas de unión de las toxinas Cry, de las cuales las mejor caracterizadas son las Aminopeptidasas N (APN) y proteínas tipo Cadherinas en lepidópteros. En nemátodos se cree que los glicolípidos son una clase importante de receptores de las toxinas Cry. Otros receptores incluyen la Fosfatasa alcalina (ALP) un glicoconjugado de 270 kDa, una proteína de 252 kDa (Pigott & Ellar, 2007) y recientemente se a identificado al transportador ABCC2 (Park *et al.*, 2014).

### **1.6.1 Cadherina**

Es una glicoproteína transmembranal dependiente de calcio, la cual es altamente diversa y multifuncional llevando a cabo funciones como adhesión celular, migración celular, regulación de la organización de tejidos y morfogénesis (Ibrahim *et al.*, 2010). Estas proteínas son definidas por la presencia de repeticiones de dominios de unión a calcio o repeticiones de Cadherina de 110 aminoácidos aproximadamente. En lepidópteros se han identificado en la membrana apical de las células epiteliales del intestino y han sido ampliamente estudiadas como receptores de toxinas Cry1A con evidencia que indica que juegan un papel importante en la susceptibilidad de la toxina (Pigott & Ellar, 2007). La primera Cadherina descrita fue la de *M. sexta* que une a la toxina Cry1Ab con un peso molecular de 210 kDa la cual fue encontrada en la unión a toxinas Cry en otros insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros (Vadlamudi *et al.*, 1995).

### **1.6.2 Aminopeptidasa (APN)**

Son proteínas que han sido reportadas tanto en organismos procariontes como en eucariontes, se encargan de catalizar la hidrólisis de aminoácidos desde el extremo N-terminal de proteínas y péptidos, se encuentran tanto solubles, como ancladas a membrana mediante GPI. En el intestino de las larvas de lepidópteros trabajan en cooperación con endopeptidasas y carboxipeptidasas para digerir proteínas derivadas de la dieta de insectos (Pigott & Ellar, 2007). Análisis filogenéticos sugieren que en insectos lepidópteros hay al menos 5 familias diferentes de APN (Herrero *et al.*, 2005; Pigott & Ellar, 2007) de las cuales 3 de ellas han sido observadas que unen a las toxinas Cry1 en diferentes especies. Análisis de este complejo de receptor mediante ligand blotting sugiere que las APN de clase 1 son el mayor grupo de proteínas de unión a las toxinas Cry (Pigott & Ellar, 2007).

### **1.6.3 Fosfatasa Alcalina (ALP)**

Son enzimas comunes y abundantes que remueven grupos fosfatos de moléculas orgánicas y se localizan principalmente en células epiteliales del intestino de

insectos. Pueden ser divididas en dos grupos; solubles y ancladas a membrana. En insectos las ALPs solubles son encontradas exclusivamente en las cavidades de células goblet y en la región epitelial de células intestinales y las ALPs ancladas a membranas son localizadas en las microvellosidad media apical de células columnares y particularmente restringidas en región media y posterior del intestino. Algunas ALPs han sido propuestas y en otras se ha demostrado su función como receptor de toxinas Cry en insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros.

En lepidópteros ALP se ha asociado a la resistencia a toxinas Cry en *H. armigera* a Cy1Ac y en *S. frugiperda* a Cry1Fa. En *M. sexta* se ha identificado una ALP como proteína de unión a Cry1Ac mientras que en *S. exigua* se han identificado 3 ALPs como receptores de la toxina Cry1Ca (Ren *et al.*, 2017).

#### **1.6.4 Transportador ABCC2**

Los transportadores ABC pertenecen a una larga superfamilia responsable del transporte de moléculas específicas a través de lípidos de membranas. El multidominio de proteínas integrales de membrana de los transportadores ABC utiliza la energía producida por la hidrólisis de ATP para translocar solutos a través de la membrana celular. Análisis de secuencias de transportadores ABC en eucariotas revelaron que pueden ser divididos en 8 subfamilias involucradas en diferentes funciones. La familia C de los transportadores ABC se piensa que está involucrado en la resistencia a drogas, se ha reportado una mutación inactivada del transportador ABCC2 que ha sido asociado a la resistencia a Cry1Ac, resultando en la inhibición de la unión de Cry1Ac a vesículas de membrana (Yu *et al.*, 2017). El transportador ABCC2 se ha encontrado relacionado con el modo de acción de las toxinas Cry1A, utilizando enfoques genéticos para identificar los principales genes implicados en la resistencia en *H. virescens*, también se han encontrado mutaciones en el gen ABCC2 en colonias resistentes a Cry1A de *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni* y *Bombix mori*.

## 2. ANTECEDENTES PARTICULARES

### 2.1 Plagas agrícolas

Los lepidópteros constituyen el tercer orden de insectos con más especies descritas, después de los órdenes Coleóptera y Díptera. A pesar de que se han descrito más de 150,000 se estima que puede alcanzar las 255,000 especies. Se distribuyen por todas las tierras emergidas del globo con excepción de las regiones permanentemente heladas. Ciertos lepidópteros constituyen importantes modelos biológicos, tanto para la investigación básica como aplicada. Son también el orden de insectos con más especies consideradas de importancia económica (García *et al.*, 2015).

Se sabe que las toxinas Cry1 son el grupo de delta endotoxinas con más blancos en insectos lepidópteros; la mayoría de las proteínas de unión a las Cry1 han sido identificadas como APN, por ejemplo; para Cry1Ac en *M. sexta*, *H. virescens*, *Lymantria dispar*, y *P. xylostella*, Cry1Aa en *B. mori* y Cry1C en *M. sexta*; otras proteínas de unión identificadas han sido proteínas tipo Cadherinas que unen a Cry1Aa y Cry1Bb en *B. Mori* y a *M. sexta* respectivamente (Gilliland *et al.*, 2002).



Figura 5: Especies de lepidópteros plagas comunes de arroz, algodón y maíz.  
(Tomada y modificada de Sanahuja *et al.*, 2011)

Hoy en día hay cultivos de *Bt* que controlan a las plagas de lepidópteros más comunes de arroz, algodón y maíz. En la **Figura 5** de izquierda a derecha, plagas de arroz: barrenador de tallo amarillo (*Scirpophaga incertulas*), el defoliador del arroz (*Lerodea eufala*), el perforador de tallo rayado (*Chilo suppressalis*). Plagas de algodón: gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*), gusano del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano cogollero (*Helicoverpa armigera*). Plagas de maíz: taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), Oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*) (Sanahuja *et al.*, 2011).

## 2.2 *Spodoptera frugiperda*

*S. frugiperda* (J. E. Smith) conocido comúnmente como “cogollero del maíz” u “Oruga militar tardía” es un insecto lepidóptero que pertenece a la familia Noctuidae, presenta una amplia distribución geográfica y es considerada una especie migratoria de larga distancia, abarcando desde Argentina hasta Canadá (Huang *et al.*, 2014) Y recientemente una invasión en diferentes ciudades de África (Goergen *et al.*, 2016).

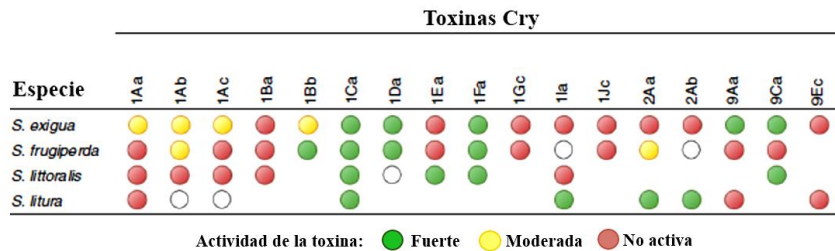


**Figura 6: *S. frugiperda* en estadio larval (Tomada de Grain Sa Fall armyworm update)**

*S. frugiperda* es una de las plagas de insectos más destructivos en el continente de América, las larvas son polífagas y dañinas de al menos 30 cultivos incluidos maíz de campo y maíz dulce, algodón, caña de azúcar, soya y hierbas. Es una larva difícil de controlar con insecticidas ya que a desarrollado resistencia a los insecticidas químicos más comunes (Blanco *et al.*, 2010). En 1979 Young y McMillian reportaron el primer caso de resistencia a carbaril en Tifton, Georgia, más tarde un estudio reveló que poblaciones de *S. frugiperda* colectadas en Florida adquirieron resistencia a varias clases de insecticidas incluyendo piretroides, organofosfatos y carbamatos, los niveles más altos de resistencia observados fueron Fluvalinato (216x), Metilparatión (271x) y Carbaril (>192x) (Yu, 1991).

Las toxinas de *Bt* fueron una opción para controlar esta plaga, se desarrollaron numerosos estudios para identificar las toxinas más competentes para su aplicación. Varios documentos han determinado la especificidad de las toxinas individuales de *Bt* contra *Spodoptera spp.* para identificar aquellas toxinas con el mayor potencial para ser utilizadas como bioinsecticidas y para el desarrollo de cultivos transgénicos para el control de *Spodoptera spp.* (Herrero *et al.*, 2016).

Bajo esta premisa, Herrero y colaboradores en el 2016 recopilaron datos de las diferentes toxinas Cry que se han reportado activas contra distintas especies de *Spodoptera*.



**Figura 7: Toxinas Cry reportadas contra especies del género *Spodoptera*. (Tomada y modificada de Herrero *et al.*, 2016)**

*S. frugiperda* es una de las especies con menor susceptibilidad a las toxinas de *Bt* (Blanco *et al.*, 2010). Como se aprecia en la **Figura 7** existen muy pocas toxinas activas contra especies del género *Spodoptera*, siendo las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa las de mayor rango.

### 2.3 Resistencia a las toxinas Cry

A pesar de que se han llevado a cabo estrategias para el control de esta plaga, como el uso de plantas transgénicas que expresan la toxina Cry1Fa, han surgido reportes de que diferentes poblaciones han generado resistencia. Jakka y colaboradores en el 2014 reportaron poblaciones de *S. frugiperda* que adquirieron resistencia a maíz transgénico que expresa la toxina Cry1Fa en Puerto Rico, mientras que Huang y colaboradores en el 2014 observaron evidencia de una población de *S. frugiperda* resistente a maíz transgénico que produce la toxina Cry1F en una región del sureste

los Estados Unidos de Norte América. En Brasil se muestrearon regiones de alta producción en cultivos de maíz en donde se observó resistencia contra la toxina Cry1F, por lo cual están implementando estrategias de manejo de control de cultivos (Farias *et al.*, 2014). La evidencia encontrada sugiere que es necesario que se busquen otras toxinas como alternativa a la Cry1Fa para la utilización en el campo y disminuir la resistencia.

## **2.4 Estrategias para disminuir resistencia**

Desde que se comercializaron los cultivos transgénicos de *Bt* en 1996, disminuyó la dependencia de insecticidas sintéticos. Sin embargo, el número de especies resistentes a toxinas Cry también ha incrementado (Mohammed *et al.*, 2016). Los insectos muestran resistencia a las toxinas Cry por diferentes mecanismos; uno de los más estudiados es la alteración en alguno de los intermediarios del mecanismo de acción (Carriere *et al.*, 2016). En la **Figura 8** se muestran algunos ejemplos.

Entre las estrategias propuestas para disminuir la resistencia se manejan: las zonas de refugio: es la más comúnmente utilizada, consiste en cultivos no transgénicos rodeando a los cultivos *Bt*, esto permite a los insectos susceptibles aparearse con insectos resistentes lo que reduce el alelo resistente en las poblaciones, y la estrategia piramidal en cultivos de *Bt*, consiste en un cultivo que expresa dos o más toxinas con actividad contra la misma plaga (Mohammed *et al.*, 2016; Carriere *et al.*, 2016).

La modificación en el sitio de unión a las toxinas de *Bt* es el mecanismo de resistencia más común y se ha demostrado que es la base de la resistencia cruzada en las toxinas Cry1A (Hernández & Ferre, 2005). La resistencia cruzada ocurre debido a dos o más compuestos que actúan sobre el mismo sitio de acción o son afectados por el mismo mecanismo de resistencia. Se desarrolla más comúnmente con compuestos que tienen el mismo modo de acción. La necesidad de comprender el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ca y la Cry1Fa radica en saber si

comparten los mismos receptores o no, de esta manera poder implementar esta estrategia para utilizar ambas proteínas y así evitar la resistencia cruzada.

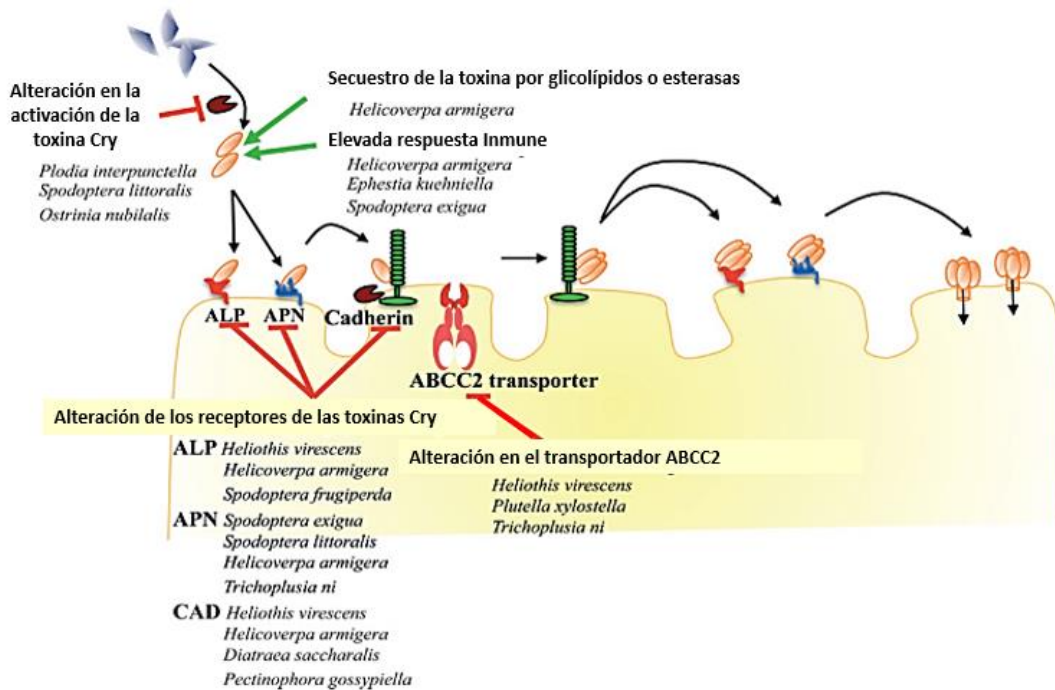


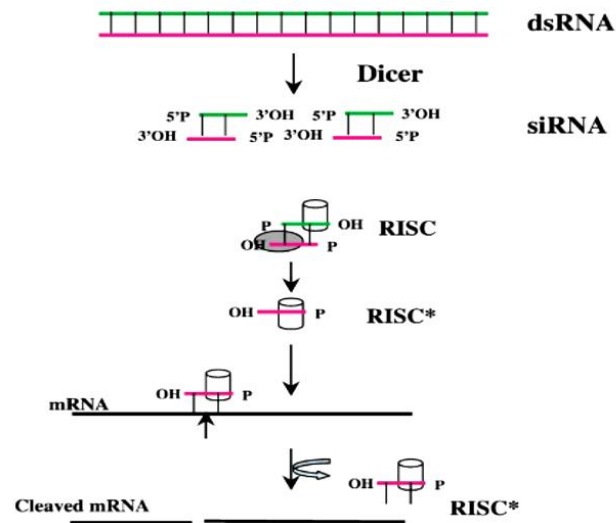
Figura 8: Mecanismos de resistencia en toxinas Cry de 3 dominios descritos en insectos lepidópteros (Tomada y modificada de Pardo-López *et al.*, 2013)

## 2.5 Silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi)

El RNAi es el proceso central de regulación de la expresión de genes y la principal defensa antiviral en eucariotas (Nandety *et al.*, 2015). Es un proceso de regulación post-transcripcional que consta en la unión específica de un RNAi con una secuencia complementaria al RNA mensajero (RNAm) blanco para la supresión de la expresión del gen y su posterior degradación. Fue descubierto por primera vez en *Caenorhabditis elegans*; sin embargo, también se ha descrito en otras especies como *Drosophila melanogaster* e incluso en humanos (Ramaswamy & Slack, 2002; Wynant *et al.*, 2014). Los primeros pasos inician cuando del dsRNA inmaduro es procesado en fragmentos de 21-23 pb, esto es mediado por una enzima miembro de la familia de las RNAsa tipo III dependiente de ATP, denominado Dicer, generando fragmentos denominados RNAs pequeños interferentes (siRNA) (Ramaswamy &



Slack, 2002). Estos fragmentos son cargados a un complejo inductor de silenciamiento mediante RNA (RISC) que relaja al siRNA y usa la cadena anti sentido como guía del mRNA complementario. Finalmente, el mRNA es escindido por una proteína Argonauta la cual es el componente catalítico de RISC (Wynant *et al.*, 2014).



**Figura 9: Proceso de regulación de la expresión de genes mediante RNAi.**  
(Tomada y modificada de Ramaswamy & Slack, 2002)

En biotecnología el silenciamiento mediante RNAi es una herramienta que se utiliza para conocer la función de algunos genes. Se ha demostrado experimentalmente que la actividad del RNAi puede ser inducida específicamente utilizando dsRNAs, siRNAs y miRNAs artificiales. El dsRNA es el inductor de RNAi más comúnmente utilizado y puede ser sintetizado en bacterias o *in vitro*. La eficiencia de usar RNAi específicamente en insectos depende de varios parámetros incluyendo: la dependencia de la dosis del inductor de RNAi, las diferentes eficiencias de inductores de RNAi contra diferentes objetivos, la forma de administración y la viabilidad del objetivo blanco (Nandety *et al.*, 2015).

La vía de administración es un parámetro importante pues te asegura la cantidad de dsRNA que está recibiendo el organismo, la microinyección en el cuerpo de los insectos a sido bien utilizado en estudios de RNAi. Sin embargo la administración

oral del inductor del RNAi mediante dieta artificial, cebos y algunos casos de insectos alimentados directamente de plantas que expresan este inductor, ha sido exitosamente aplicado ya que resulta ser menos invasiva (Nandety *et al.*, 2015).

## **2.6 Antecedentes de RNA de interferencia en insectos**

El RNAi a sido ampliamente utilizado en insectos para el estudio de la regulación, expresión y función de algunos genes (Nandety *et al.*, 2015). En el campo de las proteínas receptoras de las toxinas Cry a tenido gran impacto como herramienta de estudio.

Por ejemplo, Rajagopal y colaboradores en 2002 demostraron el papel de una APN de clase 4 de *Spodoptera litura* como receptor de la toxina Cry1C mediante el silenciamiento por RNAi. Al disminuir la expresión del transcrito de esta APN en un 95% y la expresión de la proteína en un 80%, cuando se retaron las larvas con la toxina Cry1C observaron la disminución de la mortalidad en un 75%. Mientras que estudios del silenciamiento de 6 APNs de *S. exigua* demostraron que la APN1, APN3 y APN6 disminuyen considerablemente la mortalidad al retarla con la toxina Cry1Ca (Ren *et al.*, 2014). Park y Kim en 2013, demostraron que el silenciamiento de Cadherina en *S. exigua* no tiene efectos negativos en el desarrollo pero si en la sensibilidad a la toxina Cry1C. Estudios de silenciamiento mediante RNAi en *S. exigua* demuestran que la supresión de la proteína Cadherina reduce la mortalidad en un 20% (Ren *et al.*, 2013). En 2017 Zhang y colaboradores silenciaron la expresión de dos Cadherinas en el lepidóptero *C. suppressalis*, en donde pasados 5 días de retarlas con arroz transgénico que expresa la toxina Cry1C observaron una mortalidad del 10% y 20% con respecto al 70% del grupo control.

Estos resultados demuestran que el silenciamiento de genes mediante RNAi es una vía efectiva para estudiar las interacciones toxina-receptor.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La presente investigación se centra en estudiar si la actividad insecticida de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa comparten como blanco de acción a las proteínas Aminopeptidasa-1 o Cadherina de *Spodoptera frugiperda* como su mecanismo de acción insecticida. La comprensión del mecanismo de acción de toxinas producidas por las bacterias permitirá proponer estrategias de control más eficaces.

### **4. HIPÓTESIS**

Las proteínas Aminopeptidasa-1 y Cadherina son receptores funcionales de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el papel de la Aminopeptidasa-1 y Cadherina de *S. frugiperda* en la toxicidad de las proteínas Cry1Ca y Cry1Fa de *Bacillus thuringiensis*.

#### **5.2 Objetivos particulares**

- 1.- Determinar la  $LC_{50}$  de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa.
- 2.- Silenciar la expresión del gen APN1 Y Cadherina a través de RNA de doble cadena sintetizada en *E. coli* HT115 y analizar el silenciamiento con qPCR y Western Blot.
- 3.- Evaluar la mortalidad de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa en larvas de *S. frugiperda* silenciadas en Aminopeptidasa-1 y Cadherina.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 1: Listado de soluciones y medios empleados**

Nombre	Componentes	Cantidad	Especificaciones
Amortiguador de corrida 10X	Tris Glicina SDS10%	30 g/L 14.4 g/L 10 ml/L	Filtrar
Amortiguador de transferencia	Tris Glicina Metanol	30 g/L 14.4 g/L 200 ml/L	Filtrar
Medio LB	Bactotripton Extracto de levadura NaCl	10 g/L 5 g/L 10 g/L	Ajustar el pH a 7 con NaOH y esterilizar.
Medio 2xTY	Triptona Extracto de levadura NaCl	16 g/L 10 g/L 5 g/L	Aforar a un litro con agua destilada y esterilizar.
Medio HCT	Bactotripton Casa aminoácidos	5 g/L 2 g/L	Ajustar el pH a 7.25 con KOH y esterilizar.

### 6.1 Purificación de cristales de la toxina Cry1Ca y Cry1Fa

Para realizar la purificación de los cristales fue necesario activar las cepas de *Bt* que expresan la toxina Cry1Ca y Cry1Fa, para ello se crecieron en cajas Petri con medio LB-agar suplementado con eritromicina (10µg/ml) durante 12 horas a 30 °C. Posteriormente se inocularon en medio de esporulación HCT líquido (200ml) suplementado con eritromicina (10µg/ml), se incubó a 30 °C con agitación por 3 días. Para recuperar los cristales se centrifugó el cultivo a 10,000 rpm por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 0.3 M NaCl, 0.1 M de EDTA

pH 8 y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, este paso se realizó 3 veces. La pastilla se resuspendió en agua con PMSF 1mM, se centrifugó en las mismas condiciones 3 veces y se almacenó a 4 °C.

## **6.2 Bioensayos con larvas de *S. frugiperda***

Los bioensayos se realizaron con larvas de primer estadio de desarrollo en placas de 24 pozos con dieta artificial mediante el método de contaminación por superficie. Primero se colocó dieta artificial en cada pozo y se dejó secar, posteriormente se agregaron las diferentes dosis de la toxina en un volumen final de 35 µl de agua, las cajas se dejaron secar y se colocó una larva en cada pozo, después de 7 días se observó la mortalidad y se calculó la LC<sub>50</sub> mediante un análisis de *probit* con el software Polo-PC Leotra.

## **6.3 Expresión de dsRNA en *E. coli***

Los plásmidos (Anexo1) que contenían los fragmentos de los genes de APN1 y Cadherina de *S. frugiperda*, se transformaron en la cepa de *E. coli* HT115 (cepa para expresar dsRNA por la presencia de promotores-T7 polimerasa, inducible con IPTG y deficiente en RNAsa tipo III) y se tomó una colonia fresca para crecerla en medio LB a 37°C durante 12 horas. Con este cultivo se inocularon 100 ml de medio 2xTY complementado con ampicilina (100 µg/ml) y 0.1% de glucosa. El cultivo se dejó a 37°C hasta que la densidad óptica fue de 0.6 a 600 nm. En este punto se inició la expresión del dsRNA añadiendo IPTG a una concentración de 1mM final. El cultivo se mantuvo a 37°C durante 4 h. Al final se analizó la expresión del dsRNA purificando el RNA total a partir de 2 ml del cultivo con el paquete comercial: Quick-RNA Miniprep de ZymoResearch.

Los cultivos se centrifugaron 15 min a 5000 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla celular se conservó a -20 °C hasta su uso.

#### **6.4 Alimentación de larvas de *S. frugiperda* con dsRNA**

Se agregaron 2 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) a las pastillas de células que se recuperaron previamente y se sonicaron con 3 pulsos de potencia 100% en un sonicador "Ultrasonic Processor" Modelo GEX 130PB con descansos de 1 min en hielo. De esta preparación sonicada, se colocaron alícuotas de 35 µl en placas de 24 pozos que contenían dieta artificial y se dejaron secar. Se colocó una larva de *S. frugiperda* en cada pozo y se dejaron durante 72 horas. Después de este período de tiempo se formaron 2 grupos: uno para disectar y analizar el silenciamiento de cada gene y el segundo para retarlo con las toxinas Cry1Fa y Cry1Ca y analizar el fenotipo.

#### **6.5 Extracción de intestino de *S. frugiperda***

Las larvas de *S. frugiperda* se crecieron en el insectario del laboratorio con dieta artificial. Se utilizaron larvas de tercer estadio, las cuales se colocaron en hielo 5 minutos y se recuperó la porción media del intestino, se removió el exceso de comida. Cada intestino se lavó exhaustivamente en amortiguador de fosfatos (PBS 1X, PMSF 1mM) para el análisis por Western blot y para el análisis por qPCR, los intestinos se lavaron en el amortiguador "RNA Later de Sigma", finalmente se almacenaron a -20 °C.

#### **6.6 Purificación de RNA total**

El RNA total se purificó a partir de los intestinos de *S. frugiperda* utilizando el paquete comercial "RNAeasy mini kit" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.7 Cuantificación del RNA total**

La cuantificación de RNA se realizó en un equipo Nanodrop 2000, se utilizó 1 µl de agua MQ como blanco y 1 µl del RNA total purificado de cada muestra. También se verificó la integridad del RNA mediante un gel de agarosa al 1% con tiocianato de guanidina.

## 6.8 Síntesis de cDNA

La síntesis del cDNA se realizó con el kit “Gene Racer Super Script III RT Module” con el siguiente protocolo: En un volumen final de 20 µl por reacción, se utilizó una concentración de 1.5 µg de RNA total , 1 µl de Oligo dt y 4 µl de dNTPs Mix, se calentó 5 minutos a 65 °C, se incubó 1 minuto en hielo, se centrifugó 1 minuto y se agregaron 4 µl de First Strand Buffer 5X, 1 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de RNase Out y 1 µl de Super Script III, se incubo a 50 °C por una hora y se inactivó la enzima a 70 °C por 15 minutos. El producto de la síntesis se almaceno a -20 °C.

**Tabla 2: Secuencias de Oligonucleótidos**

Descripción del primer	Secuencia del primer de 5´a 3´
<b>dsRNA APN-1</b> Forward Reverse	5´-TCA GGA ATT CAG TGA GAA TCA ACC ATT CAA CGA A-3´ 5´-AAC GAA GCT TGG CGT AGT GTA GTA TAT GTC CTC T-3´
<b>qPCR APN-1</b> Forward Reverse	5´-TAT GCT CGA GGT AAC GTT GG-3´ 5´-TGT GGG AGG CCA TGT GTA GT-3´
<b>dsRNA CAD</b> Forward Reverse	5´-AAC GAA GCT TGA TAA CTC ATA ACA CTT GTA CTG AT-3´ 5´-TCA GGA ATT CCG AAA ATT AAC TAC CAA GGA ATC A-3´
<b>qPCR CAD</b> Forward Reverse	5´-CGT CTC CTC TCT CGC TGT CT-3´ 5´-GCT GGA TAT CGT GAA CAT CG-3´
<b>qPCR RPS3</b> Forward Reverse	5´-ACA GAG TGT GCT CGG AGA GA-3´ 5´-GGC AAG ACC TCC AAT GAG TT-3´

## 6.9 qPCR (PCR en tiempo real)

La reacción se preparó en un volumen final de 20  $\mu$ l por reacción, se utilizaron 8.4  $\mu$ l de agua MQ, 10  $\mu$ l de Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Máster Mix 2X, 0.6  $\mu$ l de oligos 10 pmol de APN-1 y Cad respectivamente, se añadió al final 1  $\mu$ l del templado y se centrifugó 2 min a 2000 rpm. La reacción corrió en un termociclador “Eco Real-Time PCR System” de Illumina y se utilizó el software ECO con los siguientes parámetros:

**Tabla 3: Parámetros utilizados para la qPCR**

Paso	Temperatura °C	Tiempos	No. Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	10 min	1
Apertura de la doble cadena	95°C	30 s	40
Tm	60°C	1 min	40
Curva de fusión	95°C	15 s	1
	55°C	15 s	1
	95°C	15 s	1

Los datos se analizaron con el software ECO study de Illumina.

## 6.10 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

Se tomaron 5  $\mu$ l de la muestra y se ajustó a 800  $\mu$ l con agua MQ, después se añadieron 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia a 595 nm de longitud de onda y se referenció con una curva patrón de BSA.



### 6.11 Western-Blot

A cada intestino que se extrajo de *S. frugiperda* se agregaron 50  $\mu$ l amortiguador PBS 1X, se homogenizó y centrifugó por 2 minutos, se tomaron 20  $\mu$ l del sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, se agregaron 5  $\mu$ l de mezcla lítica 4X y se calentó por 2 minutos a 100 °C. Se realizó electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% en amortiguador de corrida.

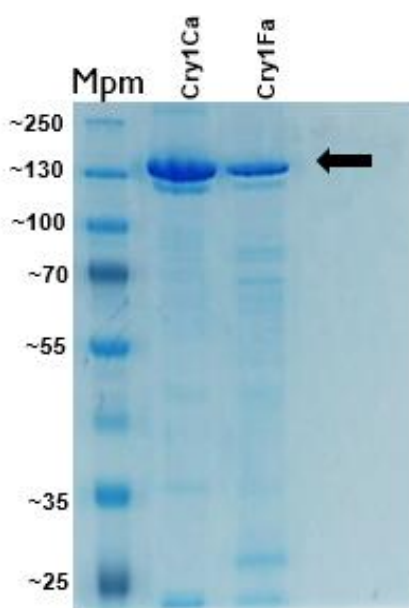
Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana PVDF en amortiguador de transferencia a 350 mA a temperatura ambiente por una hora, posteriormente se lavó la membrana en PBS 1X (30 ml) por 10 min, se lavó en PBS/Tween 0.1% (PBST) (30 ml) por 15 min, se bloqueó con PBST (30 ml) y leche al 5% por una hora, se lavó 2 veces con PBST (30 ml) por 10 min, se incubó con anti-Cad y anti-APN-1 *S. frugiperda* (expresados en conejo crecidos en el Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM) respectivamente 1:5000 en PBST (25 ml) por 1 hora, se lavó dos veces con PBST (30 ml) por 10 min, finalmente se incubó con el anticuerpo secundario IgG Anti-conejo acoplado a peroxidasa 1:25,000 en PBST (30 ml) por 1 hora, se lavó 2 veces en PBST (25 ml) por 10 min, se lavó con PBS 1X (30 ml) por 10 min, se añadió la solución de luminol "Santa Cruz" en proporción 1:1, las membranas se revelaron por medio de quimioluminiscencia para la detección de proteínas de interés.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Expresión y purificación de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa

Para determinar las concentraciones letales medias de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa fue necesario purificar los cristales de *Bt*, para esto se tomaron colonias frescas las cuales se crecieron y se indujeron a fase de esporulación con el procedimiento descrito en el apartado de materiales y métodos. Una vez obtenido los cristales de *Bt*, se analizaron mediante electroforesis.

Para determinar que la expresión y purificación de la toxina fue eficiente, los cristales se verificaron mediante un SDS-PAGE al 10% y se tiñó con Azul Brillante de Coomassie G250 por una hora, se lavó y se observó en el fotodocumentador.



**Figura 10: Purificación de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa, visualizadas en un gel de acrilamida al 10% teñido en Coomassie. Se colocó en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el carril 2 y 3 el producto de activación de las protoxinas Cry1Ca y Cry1Fa respectivamente. Los tamaños son expresados en kDa.**

Se detectaron las bandas correspondientes para ambas protoxinas con un peso molecular de 130 kDa (característico de las toxinas Cry de 3 dominios) reportados en

la base de datos Uniprot. Tampoco se apreciaron bandas adicionales, esto indica que la expresión y la purificación de los cristales es eficiente. Posteriormente se determinó la concentración de proteína de cada muestra por el método de Bradford y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

## 7.2 Determinación de la LC<sub>50</sub> de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa en *S. frugiperda*

La concentración letal media (LC<sub>50</sub>) es una medida que determina la concentración de una sustancia que puede matar a la mitad de una población. En este caso es necesario determinar la LC<sub>50</sub> de ambas toxinas para saber las concentraciones que se utilizaran en los experimentos de mortalidad.

Para determinar las LC<sub>50</sub> de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa, se prepararon 14 placas de 24 pozos con dieta artificial, se realizó una dilución seriada de los cristales expresados y purificados previamente partiendo de una concentración que mata al 100% de las larvas las concentraciones finales fueron las siguientes;

25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 y 0.78 µg/cm<sup>2</sup> de Cry1Ca y 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312, 0.015 y 0.0078 µg/cm<sup>2</sup> de Cry1Fa, las concentraciones se agregaron a las cajas observando que se cubriera toda la superficie de la dieta y se dejaron secar por una hora, por último, se colocaron larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, como control negativo de referencia se colocaron ensayos sin toxina. Finalmente, los resultados se analizaron mediante un análisis probit con el software Polo Plus.

**Tabla 4: Concentracion letal media de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa en *Spodoptera frugiperda*.**

Toxina	LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )
Cry1Ca	1400 (73±1800)
Cry1Fa	8.5 (5.7±13.7)

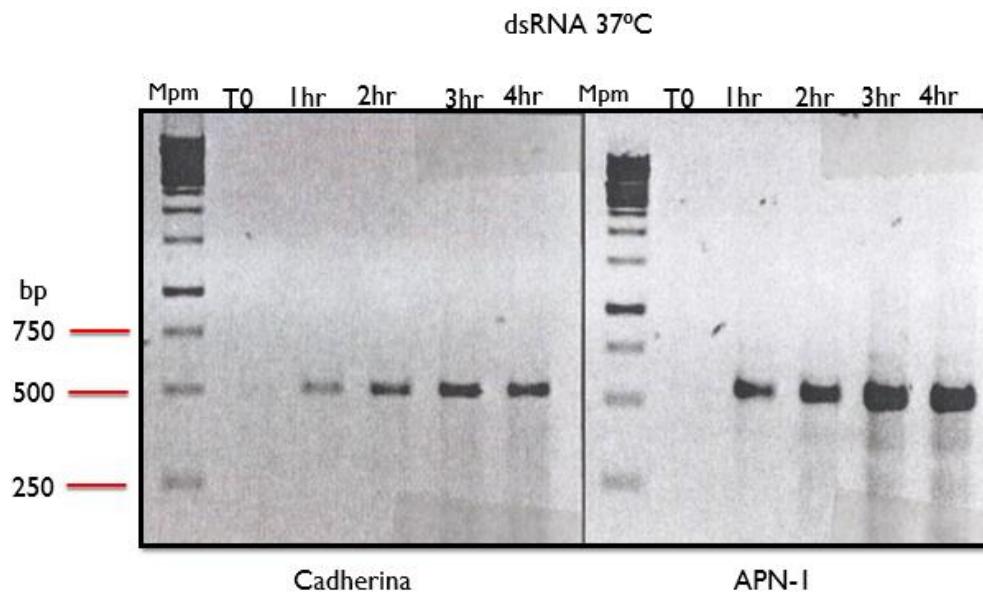
Los resultados nos indican que ambas proteínas tienen actividad contra nuestra colonia de *Spodoptera frugiperda*. Siendo la toxina Cry1Fa al menos 160 veces más potente que la toxina Cry1Ca.

Conocer la  $LC_{50}$  no solo es importante en el diseño de experimentos para investigación, sino también para futuras aplicaciones en campo de manera eficiente.

### 7.3 Expresión del dsRNA

El RNAi se diseñó tomando como molde una secuencia específica del mRNA blanco en una región que no comparte similitud con otro gene para asegurar la especificidad sobre el gene blanco, tomando para APN-1 la región que va del nucleótido 304 al 774 y para Cad la región que va del nucleótido 284 al 652.

Para comprobar la expresión del dsRNA, se purificó el RNA total con el kit comercial “Quick-RNA Miniprep” de ZymoResearch y se visualizó en un gel de agarosa al 1%.



**Figura 11: Análisis de la expresión del RNA de doble cadena de a) Cadherina y b) Aminopeptidasa-N en *E. coli* HT115 observado en gel de agarosa 1%. Muestra sin incubar (T0) Muestras que se incubaron y purificaron después de 1,2,3 y 4 horas respectivamente. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular expresado en pares de bases.**

Se observa en la **Figura 11** una banda de 500 pb correspondiente al fragmento del dsRNA de APN-1 y Cad, este tamaño diferente al del diseño del dsRNA se debe a los fragmentos del vector que lleva consigo el dsRNA ya sintetizado. La expresión del dsRNA aumenta a medida que aumenta el tiempo de incubación, viendo que a partir de las 3 horas ya no hay una variación significativa en la expresión. También se observa que el dsRNA de APN-1 se expresa más eficientemente que el de Cadherina, pero ambos se expresan aceptablemente.

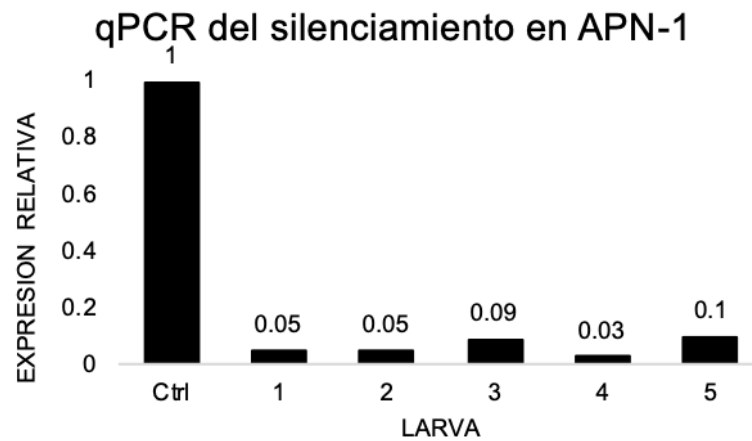
Partiendo de la eficiente expresión de los dsRNA, estos se prepararon para administrarse en las larvas por vía oral, ya que se ha demostrado la eficiencia del silenciamiento genético mediante la alimentación con células de *E. coli* que sintetizan dsRNA específico. Algunos trabajos con *E. coli* recombinante modificada para producir dsRNA, se han llevado exitosamente al silenciar con tratamiento oral al nematodo *C. elegans*, el escarabajo de la papa *Leptinotarsa decemlineata* (Nandety *et al.*, 2015) y a *S. exigua* (Kim *et al.*, 2015). Debido a que el uso de bacterias que expresan el dsRNA para inducir el silenciamiento es menos invasivo que la microinyección de los insectos y a que se ha demostrado que puede permanecer estable en la dieta de los insectos hasta por 7 días a temperatura ambiente (Nandety *et al.*, 2015), este resulta ser un sistema eficaz para inducir el silenciamiento mediante RNAi.

#### **7.4 Análisis del silenciamiento de APN-1 y Cadherina mediante qPCR**

Una vez observado que el dsRNA de Cad y APN-1 se expresó correctamente, estos se utilizaron para alimentar larvas de *S. frugiperda*, para ello se colocaron placas de bioensayo de 24 pozos con dieta artificial por triplicado para cada gen, se agregaron 35µl de dsRNA en cada pozo, se dejó secar y se colocó una larva por pozo, cabe mencionar que control negativo se alimentaron larvas con dsRNA del gen LacZ.

Las larvas que se sometieron al silenciamiento se dividieron en dos grupos: uno para hacer el análisis del silenciamiento mediante qPCR y Western blot mientras que el otro grupo se utilizó para realizar los ensayos de mortalidad.

Para el análisis de silenciamiento las larvas se analizaron individualmente después de 5 días de iniciar el ensayo, se disectaron y se recuperó el intestino medio para purificar el RNA total y sintetizar el cDNA molde para el análisis de la expresión relativa del transcrito mediante qPCR. Se utilizó el gen constitutivo RPS3 (Ribosomal Protein S3) como control para normalizar los resultados y una larva no silenciada como control de referencia. Los parámetros para realizar la qPCR se describen en el apartado de materiales y métodos.



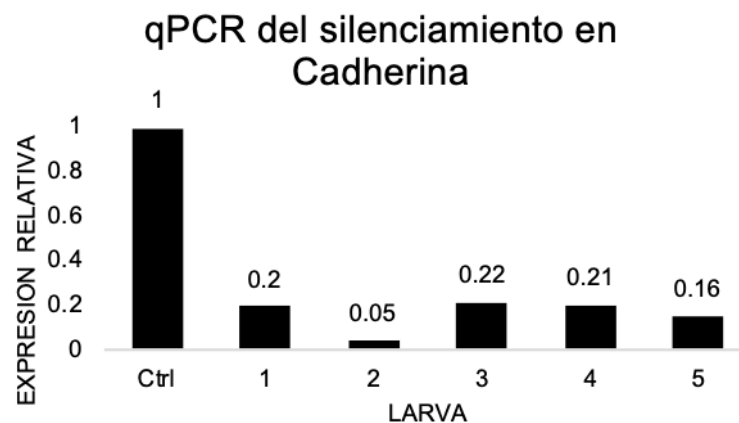
**Figura 12: Análisis de la expresión de APN-1 en larvas sometidas al silenciamiento. Larva control (carril 1), larvas sometidas al tratamiento de silenciamiento (carril 2,3,4,5 y 6). La qPCR se realizó por triplicado normalizando los datos con el gen constitutivo RPS3.**

El análisis por qPCR de APN-1 se representa en la gráfica de la **Figura 12** donde se representa únicamente una porción de las larvas analizadas, en donde se observa que las larvas que se alimentaron con el dsRNA de APN-1 muestran una disminución en la expresión de APN-1 con respecto a la larva control, este resultado nos indica una disminución de la expresión del transcrito de APN-1 al menos en un 90% aproximadamente.

A pesar de que otros autores como Rajagopal y colaboradores en el 2002 silenciaron eficientemente en un 95% la expresión de una APN de clase 4 en el lepidóptero *S. litura* mediante el tratamiento por microinyección y por otro lado Ren y

colaboradores en el 2014 silenciaron en *S. exigua* las proteínas APN1, APN3 Y APN6 en un 55.6%, 43.2% y 46% respectivamente con el método de microinyección, el tratamiento oral resulto ser igual de eficiente para el silenciamiento.

Del mismo modo, se realizó una reacción de qPCR con larvas silenciadas en Cadherina para detectar el nivel de silenciamiento. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos con el silenciamiento de APN-1, la expresión del transcrito de Cadherina fue mayor como se puede apreciar en la siguiente figura.



**Figura 13: Análisis de la expresión de cadherina en las larvas sometidas al silenciamiento. Larva del grupo control (carril 1), larvas sometidas al tratamiento (carril 2,3,4 y 5). La qPCR se realizó por triplicado normalizando los datos con el gen constitutivo RPS3.**

De la misma manera, en la primera columna se aprecia la expresión total de la larva control, mientras que las larvas que fueron sometidas al silenciamiento de Cadherina disminuyeron su expresión en un 80% aproximadamente.

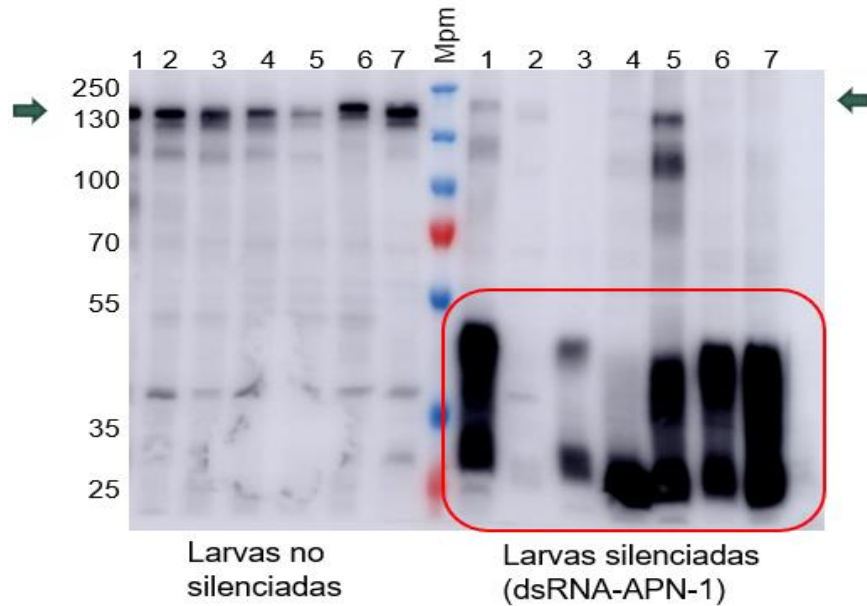
A excepción de la larva 2 en que se vio más reducida la expresión del transcrito con respecto a las otras 4 larvas, esto puede resultar por la cantidad de dsRNA consumido individualmente además de que las larvas son individuos independientes, puede variar a nivel fisiológico, es decir que se exprese más cantidad de transcrito entre individuos, así como la cantidad de dsRNA consumido por individuo.

Comparado con los antecedentes en donde Ren y colaboradores en el 2013 silenciaron una Cadherina de *S. exigua* en un 80% mediante alimentación oral y Zhang y colaboradores en 2017 que silenciaron dos Cadherinas en un 60% en el lepidóptero *C. suppressalis* mediante siRNA con tratamiento oral, nuestros resultados demuestran que el silenciamiento mediante el tratamiento oral con bacterias que expresan el dsRNA es un método eficaz y que puede ser utilizado para silenciar en *S. frugiperda*. La importancia de probar la efectividad del silenciamiento por RNAi inducido con dsRNA expresado en *E. coli* y administrado con tratamiento oral permite diseñar nuevos experimentos de silenciamiento con este método en otros insectos lepidópteros.

### **7.5 Análisis del silenciamiento de APN-1 y Cadherina mediante Westernblot**

Al mismo tiempo se tomó el otro grupo de larvas silenciadas para realizar la detección de proteína por Western blot utilizando anticuerpo policlonal específico para APN-1 y Cadherina respectivamente. Las larvas se disectaron y se recuperó el intestino medio para obtener las proteínas las cuales se separaron en un SDS-PAGE al 10% y se electrotransfirieron a una membrana PVDF. La membrana se trató como se indica en la sección de materiales y métodos.





**Figura 14: Identificación de la proteína APN-1 de *S. frugiperda* mediante Western blot. Del lado izquierdo siete muestras de larvas control, del lado derecho siete larvas sometidas al silenciamiento. Se utilizo anticuerpo específico anti-APN-1 para la detección. Marcador de peso molecular se expresa en kDa.**

Del lado izquierdo se analizó el grupo de las larvas no silenciadas en donde se puede observar una banda de 170 kDa aproximadamente correspondientes a la proteína APN-1 de *S. frugiperda*, mientras que del lado derecho se observa como la intensidad de las bandas correspondientes a la APN-1 disminuye considerablemente en comparación con las larvas control.

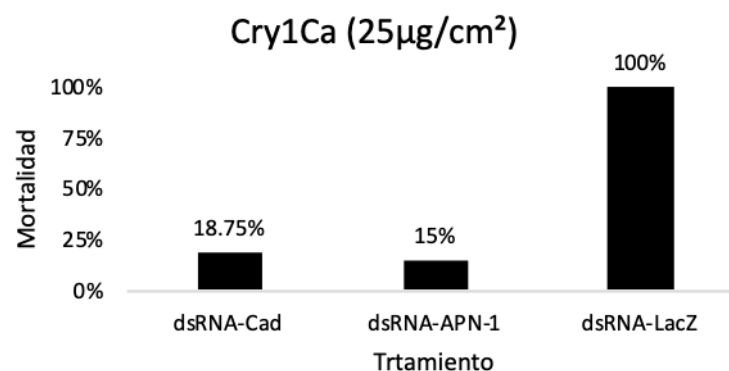
Sin embargo, también se pueden apreciar bandas inespecíficas del lado de las larvas que fueron sometidas al silenciamiento, que indican que existen detecciones inespecíficas por parte del anticuerpo, una explicación es que las proteínas silenciadas si lograron expresarse, pero no de manera funcional, dejando pequeños péptidos que dan señal.

No se muestra el western blot de Cad ya que no se logró realizar, debido a que no se logró que el Anti-cad detectara a la proteína cadherina incluso en el grupo control.

## 7.6 Efecto del silenciamiento de APN-1 y Cadherina en la susceptibilidad de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa en larvas de *S. frugiperda*

Para determinar el efecto de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa, las larvas silenciadas en APN-1 y Cadherina se retaron con 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de cada toxina de manera independiente. Se prepararon placas de 24 pozos con dieta artificial por triplicado para cada tratamiento, se añadieron las cantidades de toxina correspondientes verificando que se cubriera el total de la superficie, se dejó secar y se colocaron las larvas una en cada pozo finalmente analizó el fenotipo de las larvas después de 7 días de exposición con las toxinas.

En la siguiente gráfica (**Figura 15**) se presenta el porcentaje de mortalidad de las larvas silenciadas al ser retadas con 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de la toxina Cry1Ca.



**Figura 15:** Análisis de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* silenciadas y retadas con la toxina Cry1Ca. De izquierda a derecha: larva silenciada en Cadherina, larva silenciada en APN-1, larva silenciada en LacZ.

Los resultados del bioensayo muestran una disminución en la mortalidad, el silenciamiento de la proteína APN-1 y Cadherina redujo considerablemente la mortalidad hasta en un 80% con respecto al grupo control.

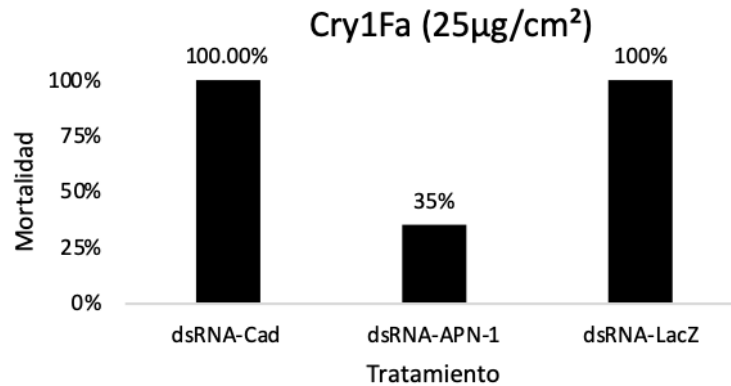
Este resultado tiene relación con nuestros antecedentes, ya que al menos en *S. litura* se sabe que APN es receptor de la toxina Cry1C (Rajagopal *et al.*, 2002), Herrero y colaboradores en el 2005 demostraron mediante hibridación sustractiva

por supresión que la pérdida en la expresión de APN-1 en *S. exigua* confería resistencia a la toxina Cry1Ca. Finalmente, Ren y colaboradores en el 2014 reportaron 3 APNs (APN-1, APN-3 y APN-6) de *S. exigua* como receptores de la toxina Cry1Ca.

Otras APN's de clase 1 han sido reportadas como proteínas de unión a toxinas Cry1, en *H. virescens* se encontró una APN-1 de 170 kDa que se reportó como una proteína de unión a la toxina Cry1A (Pigott & Ellar, 2007) y en *S. exigua* se identificaron 6 APNs de las cuales únicamente una APN de clase 1 se identificó como proteína de unión a la toxina Cry1Ac y a la toxina Cry1Ca (Qiu *et al.*, 2017).

Mientras que para la proteína Cadherina los antecedentes indican que es un receptor funcional para la toxina Cry1Ca, con los trabajos de Park y Kim en el 2013 donde silenciaron la expresión de una proteína Cadherina en *S. exigua* y observaron que reduce significativamente la susceptibilidad a la toxina Cry1Ca y Ren y colaboradores en el 2013 al silenciar una proteína Cadherina en *S. exigua* y observaron que disminuye la toxicidad de la toxina Cry1Ca en un 20%. Al menos para la toxina Cry1Ca diversos estudios indican que tanto APN como Cadherina son proteínas que participan en el mecanismo de acción de la toxina en otras especies de *Spodoptera*. Nuestros resultados soportan que tanto APN-1 y Cadherina de *S. frugiperda* participan en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ca.

Sin embargo, el tratamiento con la toxina Cry1Fa tiene resultados diferentes, pues al silenciar APN-1, disminuye la mortalidad en un 70%, pero, al retar las larvas que fueron silenciadas en Cadherina no se observa ningún cambio, teniendo un comportamiento igual al tratamiento control con una mortalidad del 100% como se puede observaren la **Figura 16**. Este resultado es interesante ya que sugiere que la toxina CryCa y Cry1Fa no comparten a la proteína Cadherina en su mecanismo de acción.



**Figura 16: Análisis de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* silenciadas y retadas con la toxina Cry1Fa. De izquierda a derecha: larva silenciada en Cadherina, larva silenciada en APN-1, larva silenciada en LacZ.**

A diferencia de la toxina Cry1Ca, existe poca información de receptores reportados para la toxina Cry1Fa en *Spodoptera spp.* Algunos estudios indican que las poblaciones de *S. frugiperda* resistentes a la toxina CryFa están asociadas a la reducción de la expresión en fosfatasa alcalina (Jakka *et al.*, 2016) y a mutaciones en el transportador ABCC2 (Flagel *et al.*, 2018). Aunque en otros lepidópteros como *H. virescens* se demostró mediante experimentos por cromatografía de afinidad que la toxina Cry1Fa reconoce proteínas Aminopeptidasas de 110, 120 y 170 kDa y una proteína de 210 kDa similar a la proteína Cadherina de *M. sexta* (Banks, 2002) no hay reportes para especies del género *Spodoptera* que indiquen si estas proteínas participan como los receptores para la toxina Cry1Fa.

Finalmente, la correlación del análisis del silenciamiento con los bioensayos de mortalidad demuestra que la ausencia de estas proteínas tiene un efecto diferencial en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa.

Aun así, es necesario abrir la brecha de estudio en otras proteínas que pudiesen estar involucradas en el mecanismo de acción de estas toxinas en esta especie para realizar un esquema general en donde se propongan estrategias eficientes para el mejor uso y reducir la resistencia en las poblaciones.

## 8. CONCLUSIONES

- El silenciamiento por RNAi inducido mediante dsRNA expresado en *E. coli* HT115 y administrado mediante alimentación oral es un método eficaz para suprimir la expresión de genes en *Spodoptera frugiperda*.
- La proteína APN-1 participa en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Ca y Cry1Fa mientras que Cadherina participa únicamente en el mecanismo de acción de la toxina Cry1Fa.
- Se demostró que las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa no comparten a la proteína Cadherina en su mecanismo de acción.
  - a) El hecho de saber que no comparten este receptor es de gran interés debido a que se pueden proponer estrategias de uso para disminuir la resistencia cruzada.

## 9. PERSPECTIVAS

- Identificar mediante silenciamiento genético en *S. frugiperda* si otras proteínas tales como Fosfatasa alcalina o el transportador ABCC2 participan en el mecanismo de acción de las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa.
- Identificar de manera *in vitro* si las toxinas Cry1Ca y Cry1Fa compiten por la proteína APN-1 y Cadherina a nivel de sitio de unión.



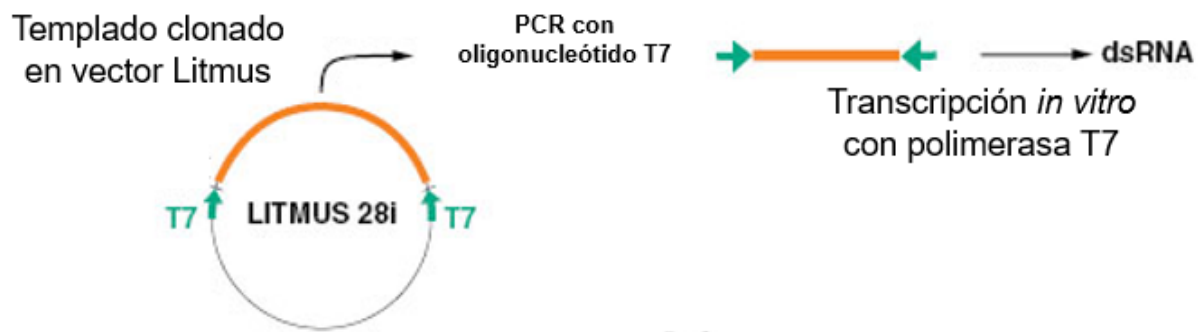


Figura 18: Representación gráfica de la síntesis del dsRNA (Tomado y modificado de: HiScribe T7 *in vitro* transcription kit)



## 11. REFERENCIAS

- Banks, D. J.** (2002). Identification, cloning and expression of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa  $\delta$ -endotoxins, *31*, 909–918.
- Blanco, C. A., Portilla, M., Luis, J.-F. J., Sánchez, J. F., Viteri, D., Vega-Aquino, P. Jackson, R.** (2010). Susceptibility of Isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Southwestern Entomologist*, *35*(3), 409–415.
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., ... Soberón, M.** (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1667*(1), 38–46.
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M.** (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, *49*(4), 423–435.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M.** (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(7), 423–431.
- Carrière, Y., Fabrick, J. A., & Tabashnik, B. E.** (2016). Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to Bt Crops? *Trends in Biotechnology*, *34*(4), 291–302.
- Carvalho, F. P.** (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy*, *9*(7–8), 685–692.
- Chandler, D., Bailey, A. S., Mark Tatchell, G., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P.** (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *366*(1573), 1987–1998.

- Douglas, A. E.** (2018). Strategies for Enhanced Crop Resistance to Insect Pests. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 637–660.
- Fall Armyworm Update** (2017), Grain SA, Recuperado de <https://www.grainsa.co.za/pages/grain-research/fall-armyworm-update>.
- Farias, J. R., Horikoshi, R. J., Santos, A. C., & Omoto, C.** (2014). Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 107(6), 2182–2189.
- Flagel, L., Lee, Y. W., Wanjugi, H., Swarup, S., Brown, A., Wang, J., Head, G.** (2018). Mutational disruption of the ABCC2 gene in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, confers resistance to the Cry1Fa and Cry1A.105 insecticidal proteins. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
- García, E., Romo, H., Sarto, V., Munguira, M. L., Baixeras, J., Vives, A., & Yela García, J. L.** (2015). CLASE INSECTA Orden Lepidóptera. *Revista IDE@-SEA*, Nº, 65, 1–21.
- Gilliland, A., Chambers, C. E., Bone, E. J., & Ellar, D. J.** (2002). Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1  $\delta$  endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1509–1515.
- Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., & Tamò, M.** (2016). First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. *Plos One*, 11(10), e0165632.
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., & Soberón, M.** (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*, 513(2–3), 242–246.

- Hernández, C. S., & Ferre, J. (2005).** Common Receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5627–5629.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P. L., Moar, W. J., & de Maagd, R. A. (2005).** *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*, 6(i), 1–10.
- Herrero, S., Bel, Y., Hernández-Martínez, P., & Ferré, J. (2016).** Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. *Current Opinion in Insect Science*, 15, 89–96.
- Huang, F., Qureshi, J. A., Meagher, R. L., Reisig, D. D., Head, G. P., Andow, D. A., Dangal, V. (2014).** Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single gene versus pyramided *Bt* maize. *PLoS ONE*, 9(11).
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010).** *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50.
- Jakka, S. R. K., Knight, V. R., & Jurat-Fuentes, J. L. (2014).** *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to *Bt* maize are susceptible to *Bt* pesticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, 122, 52–54.
- Jakka, S. R. K., Gong, L., Hasler, J., Banerjee, R., Sheets, J. J., Narva, K., ... Jurat-Fuentes, J. L. (2016).** Field-evolved mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1023–1034.
- Kim, E., Park, Y., Kim, Y., & Ling, E. (2015).** A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin  $\beta 1$  enhances *Bt* Toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *PLoS ONE*, 10(7), 1–15.

- Knowles**, B. H., & Ellar, D. J. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Lereclus**, D., Ribier, J., Klier, a, Menou, G., & Lecadet, M. M. (1984). A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 3(11), 2561–2567.
- Mohammed**, E. A. E. (2016). Resistance to Bt Crops; Influence, mechanisms and management strategies. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 11(1), 1–5.
- Nandety**, R. S., Kuo, Y. W., Nouri, S., & Falk, B. W. (2015). Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered*, 6(1), 8–19.
- Pacheco**, S., Gómez, I., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2009). Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides*, 30(3), 583–588.
- Palma**, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6(12), 3296–3325.
- Pardo-López**, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3–22.
- Park**, Y., & Kim, Y. (2013). RNA interference of cadherin gene expression in *Spodoptera exigua* reveals its significance as a specific Bt target. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(3), 285–291.
- Park**, Y., González-Martínez, R. M., Navarro-Cerrillo, G., Chakroun, M., Kim, Y., Ziarsolo, P., Herrero, S. (2014). ABCC transporters mediate insect resistance to multiple Bt toxins revealed by bulk segregant analysis. *BMC Biology*, 12, 1–15.

- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007).** Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255–281.
- Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., & Bhatnagar, R. K. (2002).** Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 46849–46851.
- Ramaswamy, G., & Slack, F. J. (2002).** siRNA: A Guide for RNA Silencing RNAi is routinely used to eliminate gene activity for. *Chemistry & Biology*, 9(02), 1053–1055.
- Ren, X. L., Chen, R. R., Zhang, Y., Ma, Y., Cui, J. J., Han, Z. J., Li, G. Q. (2013).** A *Spodoptera exigua* cadherin serves as a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin and shows differential enhancement of Cry1Ca and Cry1Ac toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Ren, X. L., Ma, Y., Cui, J. J., & Li, G. Q. (2014).** RNA interference-mediated knockdown of three putative aminopeptidases N affects susceptibility of *Spodoptera exigua* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca. *Journal of Insect Physiology*, 67, 28–36.
- Ren, X. L., Hu, H. Y., Jiang, W. L., Ma, X. Y., Ma, Y. J., Li, G. Q., & Ma, Y. (2017).** Three GPI-anchored alkaline phosphatases are involved in the intoxication of Cry1Ca toxin to *Spodoptera exigua* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151(February 2017), 32–40.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011).** *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283–300.
- Soberón, M., & Bravo, A. (2008).** Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Una Ventana Al Quehacer Científico*, 25, 303–314.

- Soberón, M., Gill, S., & Bravo, A. (2005).** Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1100–1108.
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B. E., & Bravo, A. (2007).** Engineering Modified *Bt* Toxins to Counter Insect Resistance. *Science*, 318(December), 1640–1642.
- The State of Food and Agriculture - Family Farming. (2014).**
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Ji, T. H., & Bulla, L. A. (1995).** Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*.
- Wheeler, W. B. (2002).** Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4151–4155.
- Wynant, N., Santos, D., & Vanden Broeck, J. (2014).** Biological Mechanisms Determining the Success of RNA Interference in Insects. *International Review of Cell and Molecular Biology* (1st ed., Vol. 312).
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014).** Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* (Vol. 6).
- Yu, S. J. (1991).** Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39(1), 84–91.
- Yu, H. Z., Xu, J. P., Wang, X. Y., Ma, Y., Yu, D., Fei, D. Q., ... Wang, W. L. (2017).** Identification of four ATP-binding cassette transporter genes in *Cnaphalocrocis medinalis* and their expression in response to insecticide treatment. *Journal of Insect Science*, 17(2).
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R., & Bulla, L. A. (2006).** A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by

the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 9897–9902.

**Zhang, Z., Teng, X., Ma, W., & Li, F. (2017).** Knockdown of two Cadherin genes confers resistance to Cry2A and Cry1C in *Chilo suppressalis*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8.



Cuernavaca, Morelos a 8 de febrero de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **Francisco Javier Portugal Rojas**, con el título del trabajo: **PAPEL DE LA AMINOPEPTIDASA-1 Y CADHERINA DE *Spodoptera frugiperda* EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS TOXINAS Cry1Ca Y Cry1Fa DE *Bacillus thuringensis***

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE

\_\_\_\_\_

VOCAL: DRA. ISABEL GÓMEZ GÓMEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: BIÓL. HUGO SUÁREZ CONTRERAS

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DR. SABINO PACHECO GUILLÉN

\_\_\_\_\_





Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2021-03-08 14:12:41 | Firmante**  
 IC0aryeO73fqGNIakuyfAErK0DZalOavIEqbLgXhN5a9oT8mwl531V77ITiUuUy9N6Z0vX5QRIRIH3cNVVPV4EJD7ZwM2UTMz+o06RUuglWv7Y95qQJ8Hni0Pmg1x1z0FuVN9xxBAzT9RkOUJ0KlXmVvWd+hIrc8IKZ7F1OaQRVPcCg5bPK0obXnEnRqIQQTamHNTv8WmMIDD88XJCa4AhhxJUEYUfWHRWuMgKFPuJC1BT4TSSgPaVeYtqkZUgTOleSMuRHqCXgS0u0mz8B6Jr8nZRNu6JNB2yIqFEZoPeEDR0CR9PW0BL7KN7B1cZ8EV67UoZr3+HMxds==

**MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2021-03-08 16:12:17 | Firmante**  
 sgUjUv+YcJUH+HRJqzdXXc2soEaR3w0MgSDTrG0atzH0Kx1S6zGobT898ZWDAc8aRIFRrH4ZJbvyyuq1E844m+4E15IqH/QqQiq6AhwYtkmYSrN1ABC5CicWIKDz0KuaHCU8/AACNpgfVU/xGvACT+T2LJIDaGeTTWMSHanPhDJNIAJiuAyzeIhMCZq2YCL++JcWzDo4ISHm586Nj7JTLN6QoPa4R6e1WNeWckwIDc53c1Ih8vaUfVpZMpI8zvkctb8HyabjK8f4AATDNkI3LPm40GPFK3eddsQ1wU6uEQWvcM5dDh5oFRW5xp2Tofnr8P8FKQ0A==

**ISABEL GÓMEZ GÓMEZ | Fecha:2021-03-08 11:17:48 | Firmante**  
 Q8Z16oAr7pMID3Uc04n7pMXW5GXVZ64O4Vx3m96ku+ge8sDTsUGJ+uYpLl5jI0XvGe1N16vVMmSPaHG79QpwbkbgQk3xwWMtjDGCNw8x8PbEIQiGaLMuYIMADjPp8/85qjWUOM4DIWbMKM8mC7i7Auc08nFggTahIFXEORNCiMnzeFy7VUsLF94ch9WmxFusbQKd/ndAc1PBRINZzJIsBLDIUfYih4WSxtnVL7yw2gibj0OKk13LMUS0AQF+bZ2g38ZkxHYOCX3pspDIDe+FjGLStoOaGjs9B0TT154fqNwz7GFRWwN4QJ1dGh9YSZK0Jz+AAADA==

**SABINO PACHECO GUILLÉN | Fecha:2021-03-08 12:18:05 | Firmante**  
 PUTTsqjVmwWC2h0ReosVjPHqcnQnjQH8sLmKBjELh3K5aalHw6p9m10CuCzj6lx1H6ZSAD2u9IaZUWPA+PABiThivZob0BE5d2AgP14ErVQC5K8GevlodhrGfUwF8S0Kk07aamRFJAWRFczon8ko5s059Y9YUg8nj11PpY9QJLuU78rewo4RuYmWlv7DgYZ22Uy9GaniEa4IEYLtixvYtoYHVWuYy+KHzuN7949qH4MefvzAD3Xm1R0YJLH02dZJVR5Aprm806V6PguMv9vIB5XpUoQeZDL9RM4RnJWZAPKfLZZ8Sc5AzEuVLojAxe00Zy6Zg==

**HUGO SUAREZ CONTRERAS | Fecha:2021-03-11 12:13:55 | Firmante**  
 ZQB8atAqCX8akABPv+oISXECVYHaZgPzqj6Zz00lr+cXpV0+zC5ZQcXGkFYn8Obeu8dHsL5IqHdmUdqvTWS+fwIMq6+O1Tz3wuZfAAK9hR5Dzhm9RAZghr8fwgggAhhcL6bM5aYj10JCYUzH8Kua7JVd6+rt0jICFDXk3XC0MhWmXggpdmUvUv+Yidh1AyIOFIENVBjAQewEUIBIMqz8eSEFoXcuuqK7mMj6cG5UzW3vNjyNEXEMgFOOQSDpL5aVaJ6wX7N6lxkgn4amq3YU+d1zIVHgY3IXch++RIFYG8qyWbPpsTDW41sstMGwu0J0STA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



61m8T

<https://efirma.uaem.mx/hoRepuIdo/PULpTionP1x9WWMiauX8BW24KvzsaM>



Una universidad de excelencia

RECTORIA  
2017-2023