



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

OBTENCIÓN DE UNA POBLACIÓN HOMOCIGOTA DE *Aedes aegypti* CON
MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR CADERINA

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:
IVAN GONZAGA PÉREZ

DR. SABINO PACHECO GUILLEN

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2022

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. en el laboratorio 20 del Dpto. de Microbiología Molecular. Perteneciente a la línea de investigación: Estudio del mecanismo de acción de las toxinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. Este trabajo, fue financiado por DGAPA- PAPIIT IN206721 y CONACYT

Ciencia

de

Frontera

6693

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sabino Pacheco Guillen, primeramente; por aceptarme como su tesista, y segundo; por apoyarme en todo momento con una gran paciencia a lo largo de la realización de este proyecto, estoy infinitamente agradecido por ello.

Al grupo de la Dra. Alejandra Bravo del laboratorio 20 del Instituto de Biotecnología de la UNAM, especialmente a Liz.

A mis padres por haberme brindado la posibilidad de continuar con mis estudios y estar conmigo cuando lo necesitaba.

A mi hermana, por apoyarme en diversas cuestiones a lo largo de la carrera.

A mis familiares que ya no están aquí, por haber pasado momentos fugaces de su vida con gran felicidad conmigo.

A Dios, en quien me refugio ante la incertidumbre.

A todos con quienes conviví y formé lazos de amistad a lo largo de estos años en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, atesoro cada buen recuerdo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1. <i>Aedes aegypti</i>	2
2.1.1. Ciclo de vida.....	2
2.1.2. Hábitos	4
2.1.3. Vector de arbovirus	4
2.1.4. Distribución	5
2.1.5. Control	6
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	7
2.2.1. Generalidades de Bt.....	7
2.2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> (Bti)	8
2.2.3. Toxinas Cry	9
2.2.4. Estructura de las toxinas Cry.....	10
2.2.5. Mecanismo de acción.....	11
2.3. Receptores	13
2.3.1. Receptor caderina	14
3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	16
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS	20
7. METODOLOGÍA.....	21

7.1. Reproducción de <i>Aedes aegypti</i>	21
7.2. Extracción de ADN	21
7.3. PCR.....	22
7.4. Electroforesis	22
7.5. Digestión in vitro de ADN con Cas9	23
8. RESULTADOS	24
9. DISCUSIÓN	28
10. CONCLUSIONES.....	30
11. LITERATURA CITADA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> . Tomado de CDC (s.f.).	3
Figura 2. Ocurrencia de <i>Aedes aegypti</i> en el mundo. Tomado de Kamal et al., 2018.	6
Figura 3. Micrografía electrónica de <i>Bacillus thuringiensis</i> en esporulación. Cuerpo proteico o cuerpo paraesporal (PB) en forma de cristal formado por δ -endotoxinas y al lado se encuentra la espora (SP). Eventualmente la pared celular vegetativa se romperá liberando ambos elementos. Tomado de De Maagd et al., 2001.	8
Figura 4. Sistema de nomenclatura actual usado por el Comité de Nomenclatura de Toxinas Bt para δ -endotoxinas (Cry y Cyt) y las toxinas Vip y Sip basado en el porcentaje de identidad. Tomado de Palma et al., 2014.	10
Figura 5. Estructura de tres dominios de 4 toxinas Cry. El dominio I se muestra en rojo, el dominio II en verde y el dominio III en azul. Tomado de Pigott y Ellar 2007.	11
Figura 6. Modelo de acción de la toxina Cry1Ab en <i>Manduca sexta</i> .	12
Figura 7. Receptores de Cry1A: Caderina (CADR), aminopeptidasa N (APN) y fosfatasa alcalina (ALP). Tomado de Bravo et al., 2006.	13
Figura 8. Genotipificación de <i>Aedes aegypti</i> . Del lado izquierdo se muestra una delección de 10pb en machos, mostrando dos bandas de distintos tamaños, mientras que en el lado derecho solo se observa el alelo silvestre del receptor caderina.	25
Figura 9. Electroforesis de la generación cinco hasta la décima generación de hembras sin mostrar cambios en la expresión de la proteína caderina.	26
Figura 10. Electroforesis de la digestión con Cas9. El primer carril se observa el marcador de peso molecular. El segundo carril es la digestión del DNA en presencia del	

gRNA 114 F. El tercer carril es la digestión en presencia del gRNA 55 R. B, reacción de
digestión en ausencia de gRNA.27

RESUMEN

Las enfermedades humanas provocadas por virus que son transmitidos por vectores como *Aedes aegypti* son de particular interés para la salud pública, especialmente en zonas geográficas donde la incidencia del vector es elevada o la acción de pesticidas químicos para su control se ha visto reducida. Por ello, instituciones de investigación se han enfocado en el desarrollo de diversas opciones para atender el problema de vectores que propagan enfermedades, siendo el empleo de toxinas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* una de estas opciones factibles. Dentro del modelo de acción que se ha propuesto para las toxinas Cry se encuentran moléculas de origen proteico conocidas como receptores, los cuales han demostrado ser importantes para determinar la especificidad de la toxina.

En el presente trabajo se planteó como objetivo central demostrar la función de un receptor llamado caderina, que se encuentra distribuido en el intestino medio y posterior de *A. aegypti*. Utilizando el sistema CRISPR-Cas9 se generó una delección de 10 nucleótidos en el exón 3 del gen de caderina en un contexto genómico heterocigoto. No obstante, después de realizar cruces durante 10 generaciones no fue posible generar la población homocigota deseada para evaluar la función del receptor mencionado. Nuestro análisis nos permitió concluir que solo los machos heredan la mutación, por lo que esta característica podría estar ligada al sexo. Para resolver esta problemática se planteó realizar una nueva edición genética basada en el sistema CRISPR-Cas9, donde se diseñaron dos gRNA para realizar una microinyección de embriones de *A. aegypti* y generar la población homocigota mutante en el gen de caderina.

1. INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti es un vector muy importante de enfermedades virales por su establecimiento en diversas zonas geográficas alrededor de poblaciones humanas debido a las necesidades hematófagas de la hembra y la alta disponibilidad de recursos para su supervivencia en los asentamientos humanos. La eficiencia con la que se controla a *A. aegypti* con insecticidas químicos ha disminuido por la aparición de poblaciones resistentes a estos, por lo que urgen nuevas formas de control. El control biológico de este organismo se ha llevado a cabo utilizando formulaciones que contienen la cepa de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), la cual produce proteínas insecticidas que son conocidas como toxinas Cry y Cyt, y que se encuentran como agregados paraesporales en forma de cristales. Estas toxinas, al ser ingeridas, actúan formando poros y lisando las células del epitelio intestinal de los estadios larvarios de algunas especies de dípteros. A pesar de que el uso de Bti como larvicida se ha empleado por décadas para el control de dípteros, el mecanismo de acción de las toxinas Cry sigue analizándose. Uno de los enfoques de estudio es la identificación de los receptores que confieren la especificidad, en este sentido, proteínas de tipo caderina son componentes de la membrana de las células del epitelio intestinal que funcionan como receptores para ciertas toxinas Cry en insectos lepidópteros, coleópteros y dípteros. La caderina tiene una función muy importante, que es el desencadenamiento de la oligomerización de las toxinas Cry, formando oligómeros que se insertan en la membrana para generar un poro lítico que provocará un desbalance osmótico en el insecto, ocasionando su muerte. En el díptero *A. aegypti* se ha propuesto que la caderina es un receptor para la toxina Cry11Aa y promueve su oligomerización, mientras que la toxina Cry4Ba es capaz de oligomerizar espontáneamente. Las toxinas

Cry11Aa y Cry4Ba son las proteínas más abundantes y letales en los cristales de Bti, y es necesario conocer la relación que existe entre el receptor caderina presente en el intestino de *A. aegypti* y la toxicidad de Cry11Aa y Cry4Ba para un mejor entendimiento en el modelo de acción de ambas toxinas, en especial cuando han aparecido formas resistentes de plagas agrícolas de insectos lepidópteros con ausencia de caderina.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *Aedes aegypti*

2.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de los estados inmaduros de los mosquitos *A. aegypti* ocurre en el agua: larva y pupa (Lower, 2017). La etapa adulta es aérea y es dedicada a la alimentación, reproducción y dispersión (CENAPRESE, 2014).

La reproducción usualmente comienza cuando la hembra busca alimentarse, donde el ruido que genera al volar atrae al macho. Luego del apareamiento, un único esperma es capaz de fecundar todos los huevecillos que produce la hembra durante su vida, sin aceptar volver a ser inseminada (CENAPRESE, 2014). Más tarde, después de la alimentación hematófaga de la hembra, ésta busca zonas para depositar sus huevos en las paredes internas de recipientes que contengan agua. Depositados los huevos empezaran a incubarse, tomando algunos días. Posteriormente, estos eclosionan cuando quedan cubiertos por agua; emergiendo formas larvales que se alimentarán de materia orgánica acumulada en el fondo y de las paredes del sitio en el que se encuentren (Ibarra, 2018). Más tarde, las larvas se transformarán en crisálidas en apenas 5 días o menos transcurridos de su emergencia del huevo. Por último, las

crisálidas/pupas se transformarán en adultos pasando de 2 a 3 días aproximadamente (CDC, s.f.).

El periodo de vida del adulto es influenciado por cuestiones climáticas, en especial la humedad y la temperatura, ya que éstas determinan las actividades de su alimentación, reproducción y reposo. Los rangos de temperatura a los cuales sobreviven deben ser mayores a 4°C y menores a los 40 °C, sobrepasando estos parámetros generalmente no sobreviven, aunque las hembras son más resistentes a los cambios de temperatura y humedad que los machos. Suelen reposar en las habitaciones o en lugares alrededor de la vivienda del ser humano, posándose sobre lugares oscuros, en cercanías del suelo. Los factores que son favorables para un incremento de la población de *A. aegypti* son las lluvias, pero también el mal manejo del agua por parte del hombre. La esperanza de vida para *A. aegypti* es de entre 15 a 30 días en condiciones naturales, con un tiempo de vida mayor en las hembras (CENAPRESE, 2014).

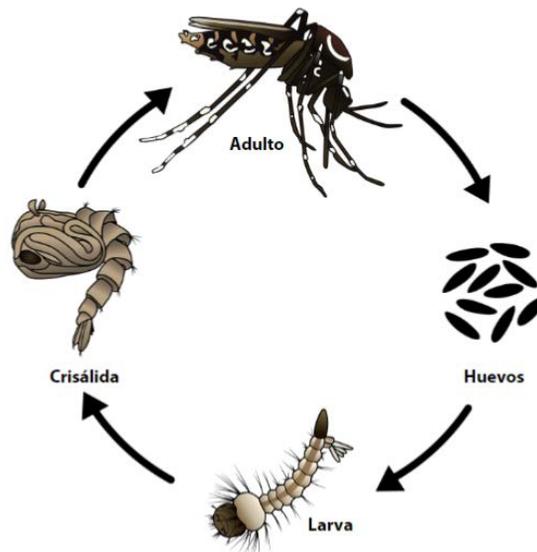


Figura 1. Ciclo biológico de *Aedes aegypti*. Tomado de CDC (s.f.).

2.1.2. Hábitos

A. aegypti se desplaza en el ambiente de acuerdo a las necesidades de su supervivencia, como son: presencia de sitios de cría, accesibilidad de alimento y a los lugares de reposo. El viento y los vehículos terrestres influye en sus movimientos y pueden desplazarlos más lejos de lo que el mosquito se mueve usualmente (CENAPRESE, 2014).

Generalmente, la actividad de picadura de la hembra es durante dos periodos de baja intensidad de luz solar, iniciando al amanecer (6:00-8:00 AM) o antes del anochecer (17:00-19:00 PM). Sin embargo, se ha observado una mayor actividad hematófaga durante el alba. Aunque, por otra parte, su actividad está condicionada con la posibilidad de obtener sangre del humano, por lo que esta se puede modificar y la hembra llega a alimentarse en cualquier momento del día (CENAPRESE, 2014).

2.1.3. Vector de arbovirus

La palabra arbovirus nació oficialmente en 1963 y fue usada para describir a los virus sin una estrecha relación filogenética que se encuentran en la naturaleza y que son transmitidos por artrópodos hematófagos a vertebrados susceptibles, como los humanos. Los primeros arbovirus reconocidos fueron los causantes de la fiebre amarilla y la fiebre pappataci, los cuales eran transmitidos al hombre a través de los géneros *Aedes* y *Phlebotomus*. Un vector de un arbovirus está definido como aquel artrópodo que transmite el virus de un hospedero vertebrado a otro a través de una picadura. Para 1967, de los 181 arbovirus que fueron analizados, 131 habían sido descubiertos en mosquitos, dentro de los cuales *A. aegypti* era uno de los vectores que presentaba la mayor cantidad, con 8 de estos (WHO, 1967).

La eficiencia de *A. aegypti* como vector puede deberse a su abundancia y a que tiene un buen alcance sobre su presa, además de que tiene un área abundante para su dispersión con factores ideales, como la temperatura, humedad y disposición de zonas donde pueda llevar a cabo su ciclo de vida, lo que favorece a su longevidad (WHO, 1967).

Las infecciones por arbovirus transmitidos por vectores ha aumentado a nivel mundial, siendo el dengue la principal infección ocasionada por estos virus en el mundo. La chikungunya, por su parte, también ha aumentado su cobertura al pasar de África y Asia, hacia áreas como Europa, el Caribe y América del Sur (Kraemer et al., 2015). El Zika tomo importancia más recientemente, cuando la OMS lo declaró una emergencia de salud pública de interés internacional en 2016 (Hasan et al., 2019), aunque ya entre el primero de enero del 2007 y el 17 de febrero del 2016 se habían reportado un total de 48 países con reportes de la enfermedad (WHO, 2016).

Aproximadamente la mitad de la humanidad se encuentra en riesgo de infección por dengue y en todo el mundo se estiman 390 millones de casos por año (Bhatt *et al.*, 2013). Para 2085 se prevé que el cambio climático contribuya a que aumenten estos números (Eiman *et al.*, 2010).

2.1.4. Distribución

Como se mencionó anteriormente, *A. aegypti* es un vector de importantes arbovirus, por lo que tener conocimientos acerca de la distribución geográfica de este mosquito es importante para hacer una predicción de nuevas áreas en las que se pudiera asentar (Kraemer et al., 2015).

A. aegypti es el vector primario en los trópicos y las zonas subtropicales (Suter *et al.*, 2017). Kraemer *et al.*, (2015) hicieron una recolección de datos mostrando el total de ocurrencias de *A. aegypti*, mostrando que su ocurrencia es en todo el mundo, solamente excluyendo la Antártida. Los resultados arrojaron 19,930 ocurrencias, donde el mayor porcentaje de estas fue de parte de Asia y Oceanía con más del 60% de registros de presencia, luego América con un 35% del total, y África y Europa solo tuvieron 575 ocurrencias registradas.

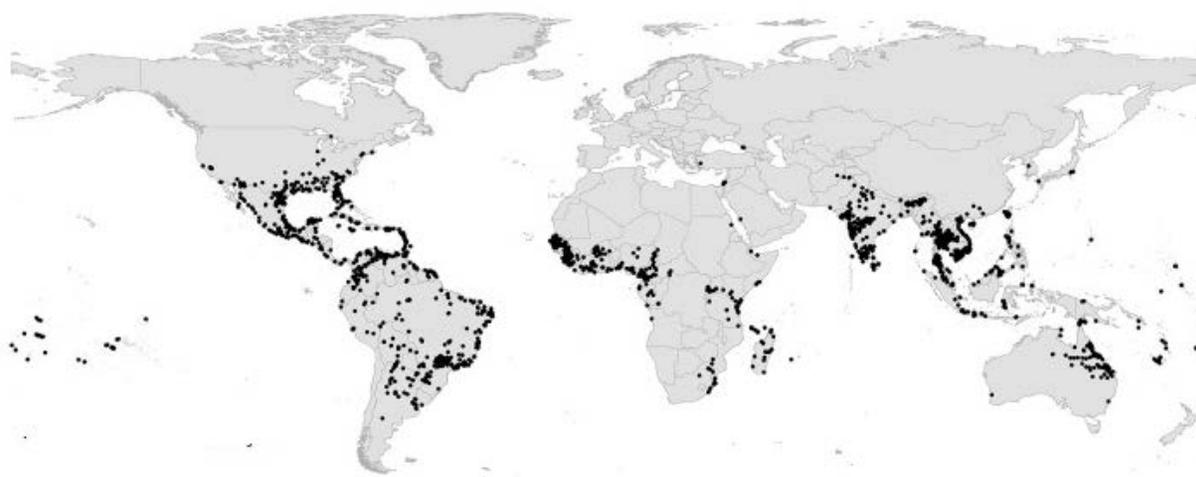


Figura 2. Ocurrencia de *Aedes aegypti* en el mundo. Tomado de Kamal *et al.*, 2018.

2.1.5. Control

Debido a que *A. aegypti* es un vector de enfermedades importantes, resulta más conveniente atacar directamente a la fuente de éstas que tratar cada enfermedad de forma individual. Sumado a esto, la historia nos habla de que pueden surgir más virus que desconocemos, cuyo reservorio bien puede ser *A. aegypti*, por lo que su control actual supondría una mayor importancia, ya que si fuera eficiente se evitaría una población, hipotéticamente hablando, de *A. aegypti* con nuevos virus que pudiera extenderse por el mundo (Powell, 2018).

Una problemática es que el control actual de *A. aegypti* por el uso de insecticidas está siendo amenazado debido a la aparición de poblaciones resistentes hacia estos, ya que se ha detectado resistencia en los 4 principales insecticidas neurotóxicos (carbamatos, organoclorados, organofosforados y piretroides) en América, África y Asia (Moyes *et al.*, 2017), por lo que se debe cambiar de enfoque hacia uno que sea más viable para el control de este vector, implementando estrategias que involucren el uso de bioinsecticidas basados en *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

2.2. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

2.2.1. Generalidades de Bt

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta y cosmopolita, en cuya fase de esporulación produce un cuerpo paraesporal en forma de cristal, el cual es de naturaleza proteínica y con actividad insecticida. El cristal está formado por proteínas llamadas δ -endotoxinas, de las cuales se agrupan en dos familias denominadas proteínas Cry y Cyt. Existen diversas cepas de Bt que producen diferentes tipos de toxinas, las cuales afectan un grupo taxonómico reducido de insectos. De estas se han encontrado algunas activas contra dípteros, como *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* contra el vector *A. aegypti* (Soberón y Bravo, 2007; Sanahuja *et al.*, 2011).

Bt ha sido la bacteria más usada en el mundo como bio-pesticida, ya sea sola o en sinergia con pesticidas químicos (López, 2011). Sus usos se basan en las toxinas que producen, y de las cuales se han aplicado en tres campos principalmente: en el control de plagas defoliadoras en la silvicultura, en el control de mosquitos vectores de enfermedades humanas, y en la agricultura para controlar insectos plaga (Bravo *et al.*,

2007). Las ventajas que tiene el uso de Bt son varias, destacando el largo historial de alta seguridad ambiental y humana, y la gran eficiencia que tiene su empleo contra el insecto plaga sobre el que actúa con alta especificidad (Betz et al., 2000)

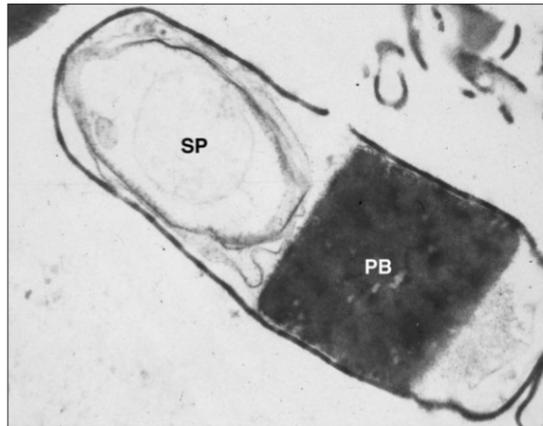


Figura 3. Micrografía electrónica de *Bacillus thuringiensis* en esporulación. Cuerpo proteico o cuerpo paraesporal (PB) en forma de cristal formado por δ -endotoxinas y al lado se encuentra la espora (SP). Eventualmente la pared celular vegetativa se romperá liberando ambos elementos. Tomado de De Maagd et al., 2001.

2.2.2. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti)

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (Bti) es una bacteria que fue descubierta en Israel por Goldberg y Margalit en 1977 en el desierto de Negev (Federici, 1995). Esta bacteria mata a las larvas de algunas especies de dípteros de la familia Culicidae, siendo la primera cepa de *Bacillus thuringiensis* usada eficazmente como control biológico en larvas de mosquitos vectores de enfermedades como *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*. Su actividad larvicida se debe a que produce varias toxinas Cry y Cyt, de las cuales las proteínas de mayor abundancia tienen un peso molecular de 134, 128, 72 y 27 kDa (Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa, respectivamente). Los genes que codifican estas proteínas se encuentran en el plásmido pBtoxis de Bti, el cual tiene un

tamaño de 128 kb. Bti se ha utilizado durante más de 30 años y ha resultado ser una bacteria muy útil para el control biológico de los vectores de dengue y malaria, esto en parte gracias a la sinergia observada entre las toxinas Cyt con las toxinas Cry (Berry et al., 2002; Soberón y Bravo, 2007; Ben-Dov, 2014;).

2.2.3. Toxinas Cry

Bt produce un arsenal de proteínas insecticidas durante su ciclo de vida, las proteínas que produce en la fase vegetativa son secretadas, mientras que las que se producen durante la diferenciación a espora se acumulan en agregados paraesporales en forma de cristales. Recientemente se acordó una nomenclatura basada en la estructura tridimensional de las proteínas para clasificarlas (Crickmore *et al.*, 2020), en la cual se estableció que las toxinas Cry son aquellas que contienen tres dominios estructurales en su forma activada. Además, la nomenclatura de una toxina Cry se basa en la similitud de la secuencia primera y se nombran con base en el grado de identidad; se les agrega un número arábigo si su identidad corresponde hasta el 45% (Ej. Cry1); se asigna una letra mayúscula si corresponde a una identidad que va de 45 a 78% (Ej. Cry1A); para el tercer rango se agrega una letra minúscula si corresponde a una identidad de 78 a 95% (Ej. Cry1Aa), y por último se agrega un número arábigo al final cuando corresponden a más del 95% de identidad (Ej. Cry1Aa1) (Soberón y Bravo, 2007).

La patogenicidad de Bt como insecticida ha sido documentada desde el año 1901. Sin embargo, Bt no tiene historial significativo de patogenicidad en mamíferos, y la investigación de esta bacteria se ha centrado en la actividad insecticida de las proteínas cristalinas, ya sean las proteínas Cry o Cyt (De Maagd et al., 2001).

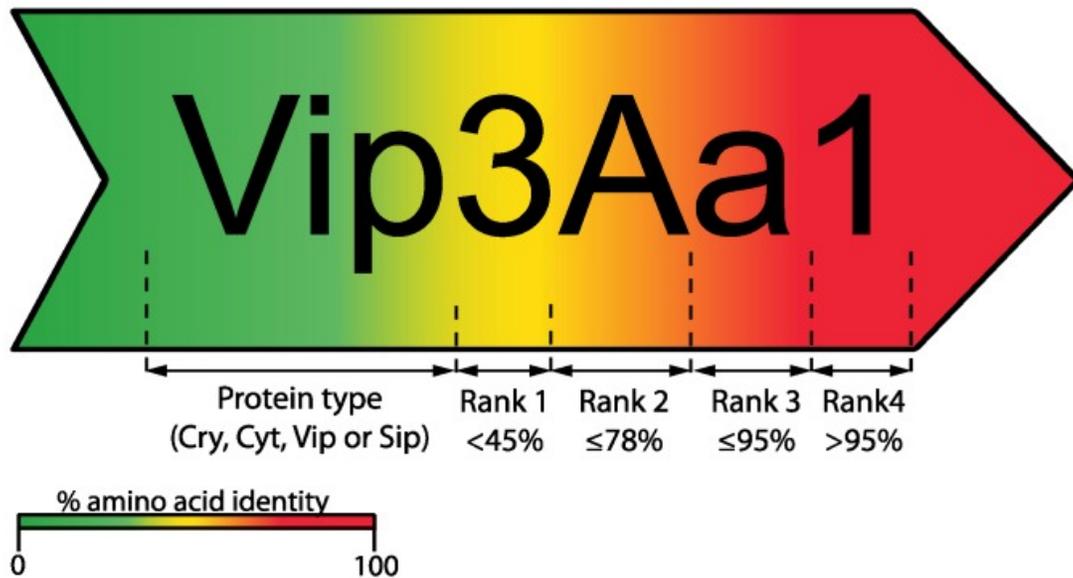


Figura 4. Sistema de nomenclatura actual usado por el Comité de Nomenclatura de Toxinas Bt para δ -endotoxinas (Cry y Cyt) y las toxinas Vip y Sip basado en el porcentaje de identidad. Tomado de Palma et al., 2014.

2.2.4. Estructura de las toxinas Cry

Se han resuelto las estructuras de varias toxinas Cry por cristalografía de rayos X, en los que se observó que tienen una topología estructural bastante similar formada de tres dominios antes mencionados. El dominio I consta de siete α hélices (seis hélices anfipáticas alrededor de una hélice hidrofóbica central). El dominio II tiene un plegamiento llamado "prisma β ", el cual consta de tres láminas β que tienen una conformación de "llave griega". El dominio III consta de dos láminas β antiparalelas en forma de sándwich. El dominio I tiene actividad en la inserción de la membrana y la formación de poros, mientras que los dominios II y III están involucrados en el reconocimiento y la unión del receptor (De Maagd et al., 2001).

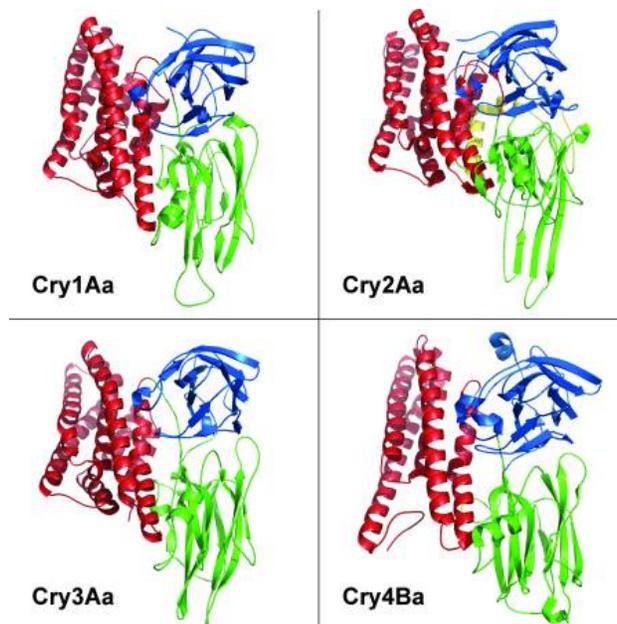


Figura 5. Estructura de tres dominios de 4 toxinas Cry. El dominio I se muestra en rojo, el dominio II en verde y el dominio III en azul. Tomado de Pigott y Ellar 2007.

2.2.5. Mecanismo de acción

Los modelos de acción propuestos de las toxinas Cry pueden diferir de cierto de modo, sin embargo, en sus pasos iniciales comparten aspectos comunes. Las toxinas Cry se producen como protoxinas de 130 kDa y están contenidas dentro del cristal paraesporal de Bt; al ser ingerido se solubiliza en el intestino medio de la larva del insecto y por acción de proteasas se producirá una toxina activada de 60 kDa, la cual está formada por los tres dominios (Li et al., 1991; Soberón et al., 2015).

El modelo secuencial propone que toxinas Cry activadas se unen a diversas proteínas del intestino medio que actúan como receptores, como la aminopeptidasa N (APN) y la fosfatasa alcalina (ALP), las cuales se encuentran ancladas a la membrana gracias a un glicolipido llamado glicosilfosfatidilinositol (GPI). (Upadhyay y Singh, 2011). Las proteínas APN y ALP son receptores que promueven que los monómeros de toxina

activada se concentran en las microvellosidades del intestino medio antes de la interacción con un tercer receptor; la caderina (Arenas et al., 2010).

El proceso de la oligomerización se desencadena cuando el receptor caderina se une a la toxina activada (Gómez et al., 2002); una vez que se termine este proceso el oligómero conformado de 3-4 subunidades se une de nuevo a APN y ALP, los cuales funcionarán como receptores secundarios debido a su alta afinidad y facilitarán la inserción del oligómero en la membrana, esta inserción desencadenará la formación de poros que provocará lisis osmótica de las células y la posterior muerte de las larvas (Pacheco et al., 2009; Arenas et al., 2010).

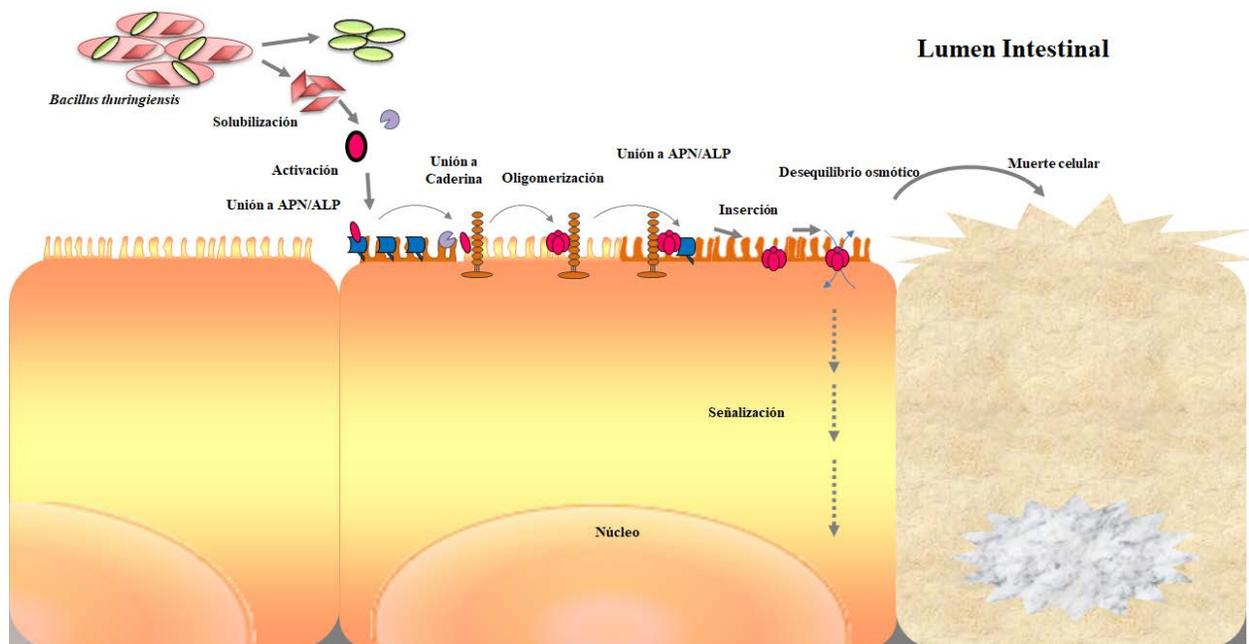


Figura 6. Modelo de acción de la toxina Cry1Ab en *Manduca sexta*.

2.3. Receptores

Varias proteínas que se encuentran en las células epiteliales del intestino de los insectos funcionan como potenciales receptores y son esenciales para la especificidad de las toxinas Cry (Pigott y Ellar, 2007). Las primeras moléculas que se identificaron como potenciales receptores para las toxinas Cry en lepidópteros fueron proteínas tipo caderina y aminopeptidasa-N. Más tarde, se caracterizó otro receptor; una fosfatasa alcalina (Fernández *et al.*, 2006; Soberón y Bravo, 2007); y recientemente se ha propuesto que los transportadores ABC también pueden funcionar como tales. En total, se han identificado cuatro grupos de proteínas como receptores: caderina, fosfatasa alcalina (ALP), aminopeptidasa-N (APN) y transportadores ABC (Chen *et al.*, 2017). En *A. aegypti* sólo se ha documentado la participación de caderina, APN y ALP como receptores de las toxinas Cry.

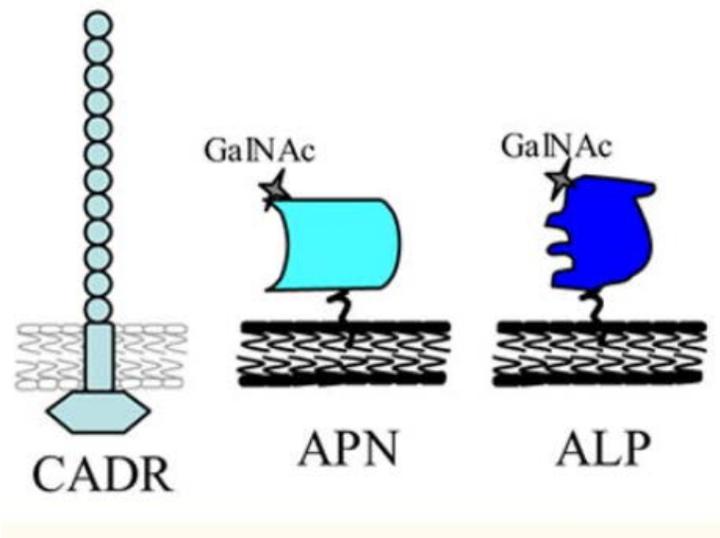


Figura 7. Receptores de Cry1A: Caderina (CADR), aminopeptidasa N (APN) y fosfatasa alcalina (ALP). Tomado de Bravo et al., 2006.

2.3.1. Receptor caderina

En un principio se pensaba que las proteínas llamadas caderinas eran solo moléculas de adhesión celular, pero ahora se sabe que tienen diversas funciones biológicas; como el reconocimiento celular, la señalización celular, la comunicación celular, la morfogénesis, la angiogénesis, la migración, la organización citoesquelética, y probablemente también tienen un papel en la neurotransmisión. La expresión de estas proteínas está bastante regulada, pudiendo ser particular a un solo tipo de célula. (Angst et al., 2001; Gumbiner, 1996), Las caderinas normalmente son proteínas transmembranales de adhesión celular que tienen gran similitud en su secuencia y que exhiben unión homofílica dependiente del calcio. Éstas se encuentran ancladas a la membrana por un único dominio transmembranal, aunque se han encontrado siete variantes de dominios transmembranales, o incluso algunas están ancladas a la membrana a través de un GPI (Vestal y Ranscht, 1992). La región extracelular de las caderinas está formada por dominios repetidos (CR's).

En 1993, por primera vez una nueva proteína similar a caderina se aisló del epitelio del intestino medio de *Manduca sexta*, la cual interactúa con Cry1Ab (Vadlamudi et al., 1993). Con los años se han identificado otras caderinas en lepidópteros con una organización estructural similar (Pigott y Ellar, 2007).

Las caderinas clásicas principalmente están presentes en las uniones adherentes, que median la adhesión célula-célula dependiente del calcio (Angst et al., 2001), en cambio las caderinas que se han identificado en lepidópteros se encuentran en la membrana apical de las células epiteliales cilíndricas del intestino medio (Aimanova et al., 2006), el cual es el sitio de unión a toxinas Cry (Bravo et al., 1992; Chen et al., 2005). Sin embargo, se desconoce la función fisiológica exacta de estas caderinas. Una propuesta

ha sido que tienen importancia en el mantenimiento de la organización epitelial del intestino medio debido al control estricto de sus niveles en el desarrollo larvario de *M. sexta* y su nula aparición en huevos y adultos (Midboe y Bulla, 2003).

Las caderinas de lepidópteros se han estudiado como receptores de algunas toxinas Cry, y se ha documentado gran cantidad de evidencia que indican que tienen un papel fundamental en la toxicidad (Pigott y Ellar, 2007). Como se mencionó antes, la primera proteína identificada de este grupo fue de *M. sexta*, la cual fue nombrada Bt-R1. La secuenciación de ésta mostró entre el 20 y 40% de identidad con respecto a otros miembros de la familia de las caderinas (Vadlamudi, 1995). También se demostró que esta proteína se une a las toxinas Cry1Aa y Cry1Ac, pero no a Cry3Aa y Cry11Aa, las cuales no son tóxicas para *M. sexta* (Keeton et al., 1997).

Otra proteína similar a caderina identificada en *Bombyx mori* fue Bt-R175, teniendo una identidad del 69.5% con la súper familia de las caderinas, la cual también es receptor de la toxina Cry1A (Nagamatsu et al., 1998; Nagamatsu et al 1999).

Un homólogo de Bt-R175 que se identificó en *Heliothis virescens* fue el nombrado HevCaIP, el cual tiene un 70% de identidad con respecto a Bt-R175. Esta proteína es capaz de unirse a la toxina Cry1Aa, inclusive a las toxinas Cry1Ab o Cry1Ac, pero no a Cry1Fa (Gahan et al., 2001; Jurat-Fuentes et al., 2004).

Otras proteínas similares a las caderinas se han identificado en el intestino medio de otras especies de lepidópteros, mostrando una identidad alta con respecto a la súper familia de las caderinas, y las cuales también son proteínas de unión para ciertas toxinas Cry (Pigott y Ellar, 2007).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* produce cuatro toxinas Cry y tres Cyt de distintos pesos en su fase de esporulación (Berry et al., 2002), siendo Cry11Aa la más activa de esta cepa frente a *A. aegypti* (Chen et al., 2009). En 2006, Fernandez et al., identificaron que una proteína de membrana se unía a la toxina Cry11Aa. Esta proteína tiene un peso molecular semejante al tamaño de las caderinas, identificadas previamente como receptores en insectos lepidópteros (Chen et al., 2009).

Para caracterizar la naturaleza de la caderina, Chen et al., (2009) desarrollaron un anticuerpo anti-AaeCad, el cual detectó una proteína de 250 kDa en inmunotransferencias de BBMV (vesículas de membrana de la microvellosidad apical). Por otra parte, en ensayo de unión competitiva, el anticuerpo anti-AeCad inhibió la unión de la toxina Cry11Aa a las BBMV, demostrando así su especificidad. Y finalmente, dicho anticuerpo también fue utilizado para hacer inmunolocalización de la caderina en el intestino de las larvas de *A. aegypti*. Los resultados mostraron que la caderina se encuentra distribuida en la membrana apical del ciego distal y proximal, y en las células epiteliales del intestino medio posterior, los cuales son sitios en los que se une Cry11Aa. Los resultados también mostraron que el fragmento de caderina con los dominios repetidos del 7 al 11 (CR7-11) contiene el sitio de unión a Cry11Aa con una afinidad aparentemente de $K_d = 16.7$ nM. Además, se observó que el sitio de unión a Cry11Aa es compartido con las toxinas Cry11Ba y Cry4Aa, pero no para Cry4Ba. Lo anterior sugiere que la proteína de caderina de *A. aegypti* puede tener un papel como receptor, y también que exista un mecanismo de acción de la toxina Cry11Aa parecido al descrito en insectos lepidópteros.

Rodriguez-Almazan et al., (2012) mostraron que la toxina Cry4Ba tiene una afinidad de unión 9 veces menor con el fragmento CR7-11, si se compara con Cry11Aa. Demostraron también que Cry4Ba era capaz de formar oligómeros luego de la activación proteolítica in vitro y en ausencia del fragmento CR7-11, lo cual no sucedió con Cry11Aa. Estudios electrofisiológicos mostraron que estos oligómeros formados por Cry4Ba en ausencia de CR7-11 eran funcionales para la formación de poros. Por último, el silenciamiento del gen de la caderina por ARNbc (ARN bicatenario) confiere una mayor tolerancia a las larvas frente a la toxina Cry11Aa, pero no para Cry4Ba, la cual mostraba niveles tóxicos comparables a los de las larvas control, por lo que se piensa que la unión de caderina con Cry11Aa es importante para la toxicidad frente a larvas de *A. aegypti*, pero no es necesaria en el mecanismo de acción de Cry4Ba (Rodriguez-Almazan et al., 2012)

Con los estudios anteriores se ha respaldado que la caderina tiene un papel importante en el mecanismo de acción de algunas proteínas Cry. En 2015 Lee et al., buscaron demostrar si la caderina de *A. aegypti* es necesaria en la toxicidad in vivo de las proteínas mosquitocidas Cry11Aa, Cry11Ba, Cry4Aa y Cry4Ba, producidas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. En dicho estudio se utilizaron dos enfoques experimentales; una línea celular que exprese la proteína caderina de forma estable y de longitud completa, y una población de mosquitos transgénicos cuya expresión de la caderina es silenciada por un RNA de interferencia codificado en un transposon. En ambos casos, los resultados obtenidos mostraron que el papel de la caderina en la toxicidad de Cry11Aa se considera importante. No obstante, se piensa que se requiere de un receptor adicional para que se ponga de manifiesto una elevada toxicidad, debido a que la mortalidad fue baja en las células que expresan caderina. Por otra parte, la

línea celular no fue sensible a Cry4Ba, pero si a Cry4Aa y Cry11Ba, y en comparación con los mosquitos transgénicos que no expresaban caderina, solamente se mostró un incremento de la tolerancia a la toxina Cry11Aa, pero no se observaron diferencias de toxicidad en Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Ba, por lo que la caderina de *A. aegypti* puede intervenir en la toxicidad de Cry4Aa y Cry11Ba, pero no es el receptor principal de estas dos, ni de Cry4Ba, donde parece que no tiene algún papel en su toxicidad.

Por ahora, los tres grupos de proteínas que se han identificado como receptores de la toxina Cry11Aa en *A. aegypti* han sido caderina, fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa N (APN) (Chen et al., 2017). Los mosquitos de *A. aegypti* con expresión silenciada de caderina son 3.7 veces más resistentes a la toxina Cry11Aa que aquellos con eliminación de ALP1, atribuyéndole una función de receptor primario (Chen et al., 2017).

Reegan et al., (2016) hicieron una recopilación bibliográfica de estudios donde realizaron modificaciones genéticas en mosquitos a través de la técnica CRISPR/Cas9 para proponer estrategias de control de poblaciones de mosquitos transmisores de virus. Uno de los atributos de esta técnica es que las mutaciones generadas en *A. aegypti* pueden ser transmitidas a generaciones posteriores, ideal para obtener una población estable homocigota.

4. JUSTIFICACIÓN

La necesidad de atender una problemática global como lo es la transmisión de virus importantes para la salud humana a través de vectores como *Aedes aegypti*, de los cuales han surgido poblaciones resistentes a insecticidas químicos comunes, nos obliga a buscar alternativas seguras para el ambiente y la salud pública, y que además sean específicas y eficientes para la plaga. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) surge como una opción ideal para atender el problema. En los insectos blanco existen receptores importantes en la interacción con ciertas toxinas Cry. La investigación con respecto al papel de receptores en *A. aegypti* ha mostrado buenos avances, sin embargo, existe un receptor llamado caderina, del cual ya se ha estudiado, que todavía se requiere revisar más para conocer con certeza su papel en la toxicidad de proteínas Cry de Bti y así poder generar estrategias de control eficientes para la plaga a nivel práctico, al contribuir al mejor entendimiento de la relación de algunas toxinas Cry con los receptores presentes en el insecto.

5. HIPÓTESIS

Una población homocigota de *Aedes aegypti* deficiente en la expresión de la proteína caderina puede ayudar a la descripción de la forma de acción y toxicidad de proteínas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*.

Se obtendrá una población homocigota de *Aedes aegypti* deficiente en la expresión de la proteína caderina con la cruce de machos mutados y hembras silvestres.

La cruce entre machos mutados en el gen que expresa la proteína caderina y hembras silvestres permitirá una recombinación genética entre ambos, por lo que se obtendrá una población homocigota donde la expresión de la proteína caderina se encuentre interrumpida.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Obtener una población homocigota con mutación en el receptor caderina de *Aedes aegypti*.

OBJETIVO PARTICULAR

- Evaluar el carácter hereditario de una mutación en el gen de caderina de *Aedes aegypti*
- Mantener una población viable de *Aedes aegypti* con mutación en el gen para caderina.

7. METODOLOGÍA

7.1. Reproducción de *Aedes aegypti*

Se trabajó con una población de machos con una mutación en el receptor caderina y una población de hembras silvestres de *A. aegypti*. Los huevos obtenidos de las diferentes generaciones de mosquitos se colocaron en un recipiente con agua; al cabo de 2-3 días los huevos eclosionaron en su forma de larva y se alimentaron hasta diferenciarse en pupas; estas fueron separadas individualmente y después de dos o tres días comenzaron a emerger los adultos, los cuales fueron separados en parejas en vasos de plástico y dentro de cada vaso se colocará un pequeño recipiente húmedo para la deposición de huevos. Se alimentaron con dieta de sacarosa 10% y ácido propiónico 0.1%. El apareamiento comenzó casi en seguida, pero se dejó cuatro días aproximadamente para que haya cúpulas exitosas; luego se alimentó a la hembra con sangre de bovino suplementada con EDTA.

7.2. Extracción de ADN

Una vez que las hembras hayan ovipositado, se realizó una extracción del DNA genómico de los mosquitos adultos. Se separaron individualmente cada mosquito y se procedió a extraer el DNA. Se utilizó el kit Quick-DNA Microprep Plus Kit” (Zymo Research) para realizar la extracción de DNA. Para esto se agregaron 95 µl de agua, 95 µl de Buffer de tejido sólido y 10 µl de proteinasa K; se mezcló y se homogenizó el tejido del mosquito para incubarse a 55°C durante 1-3 horas. Pasado el tiempo de incubación se agregaron dos volúmenes de *Genomic Binding Buffer* (tampón de unión de ADN genómico) y se mezcló; se transfirió la mezcla a una columna montada en un tubo de colección para centrifugarse a 13,000 rpm/min; se desechó lo filtrado y se

realizaron tres lavados a 13,000 rpm/min, el primer lavado fue con 400 µl de Buffer de PreLavado de gDNA, el segundo fue de 700 µl de Buffer de Lavado gDNA y el tercero fue de 200 µl de Buffer de Lavado gDNA; seguido de esto se transfirió la columna a un nuevo tubo y se añadió 40 µl de Buffer de elución de DNA. Se dejó incubar por 5 min. a temperatura ambiente y se centrifugo a 13,000 rpm/min para eluir el DNA. El gDNA se eluido se cuantificó en NonoDrop 2000 (ThermoScientific Fisher) y se almacenó a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

7.3. PCR

Se hizo una reacción de PCR para amplificar una región del exón 3 del gen de caderina. La reacción contenía 4 µl de Buffer Phusion GC 5X, 0.4 µl de dNTP's al 10 mM c/u, 0.4 µl del oligonucleótido *Exon3-F* a 20 µM, 0.4 µl del oligonucleótido *Exon3-R* a 20 mM, 0.5 µl de la enzima Phusion DNA-polimerasy 13 µl de agua y 100 ng de gDNA templado; en seguida se procedió a hacer la PCR en el termociclador.

7.4. Electroforesis

Se hizo un gel de acrilamida en Buffer TBE adicionando 8.9 ml de agua, 3 ml de acrilamida al 30%, 3 ml de TBE al 10%, 100 µl de APS al 10% y 15 µl de TEMED. Para preparar las muestras se agregaron 2-3 µl de Buffer de carga de DNA a cada una, posteriormente se agregó un marcador al primer pozo del gel de acrilamida y se agregaron las muestras a los demás pozos; se dejó que el gel corra a 100 V; luego de la electroforesis se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas con un Transiluminador.

7.5. Digestión in vitro de ADN con Cas9

Previamente en el laboratorio fueron diseñados y sintetizados dos sgRNA para hacer microinyección de embriones de *A. aegypti* y nuevamente generar mutagénesis sitio dirigida basado en el sistema de edición CRISPR-Cas9.

Para conocer la viabilidad de los gRNA's llevó a cabo una digestión in vitro de ADN. Para ello se amplificó por PCR una región del gen caderina de 981 pb con los siguientes oligonucleotidis: -0.7Kb CAD-F; GGTGGAATTCTCCTTGGAACATTT y -0.3Kb CAD-R; CCCTCACTGTACATCGATGGC. Se prepararon una mezcla de reacción con 3 µl Buffer 3 NEB, 16.2 µl de agua estéril, 1 µl de Cas9 y 10 µl del fragmento de caderina amplificado. El mix resultante se homogenizó y se separó en 3 reacciones independientes con 10 µl cada una. A dos reacciones se agregó 0.1 µl de un respectivo gRNA, el gRNA 114-F y g RNA 55-R, y a una tercera reacción no se le adicionó gRNA. Se mezcló el contenido y se incubaron a 37°C por 1 hora. El análisis de las muestras se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1%.

8. RESULTADOS

Previamente en el laboratorio se realizó microinyección de huevos de *A. aegypti* para la eliminación de caderina mediada por CRISPR/Cas9. El primer intento de edición genética mostró que la mayoría de las mutaciones en la primera generación de insectos (G0) fueron mutaciones somáticas. También se logró obtener una población de *A. aegypti* heterocigota en la primera generación (G1) con una delección de 10 bases en el exón 3 del gen caderina, lo cual implica un corrimiento en el marco de lectura del mRNA y en consecuencia la traducción se interrumpe. La generación (G1) mostró una población de mosquitos *Aedes aegypti* cuyos machos contienen la mutación. Por otra parte, no existía esta mutación en las hembras, por lo que se propuso reproducir machos mutados con hembras silvestres para generar una población homocigota al haber recombinación cromosómica entre ambos.

Durante 3 generaciones se formaron 5 parejas de mosquitos y se obtuvo su descendencia. Posteriormente los insectos parentales fueron sacrificados para obtener el gDNA y realizar la genotipificación por PCR. El análisis consistió en realizar una reacción de PCR para amplificar un fragmento del gen de caderina con un tamaño de 160 pb, el cual contiene la mutación en el exón 3. El análisis de los productos de la PCR en una electroforesis nos permitió identificar 2 fragmentos de DNA, el alelo silvestre con un tamaño de 160 pb y el alelo mutante con un tamaño de 150 pb. En las primeras tres generaciones se observó que no se heredó la mutación a las hembras, pero si a los machos (Figura 8).

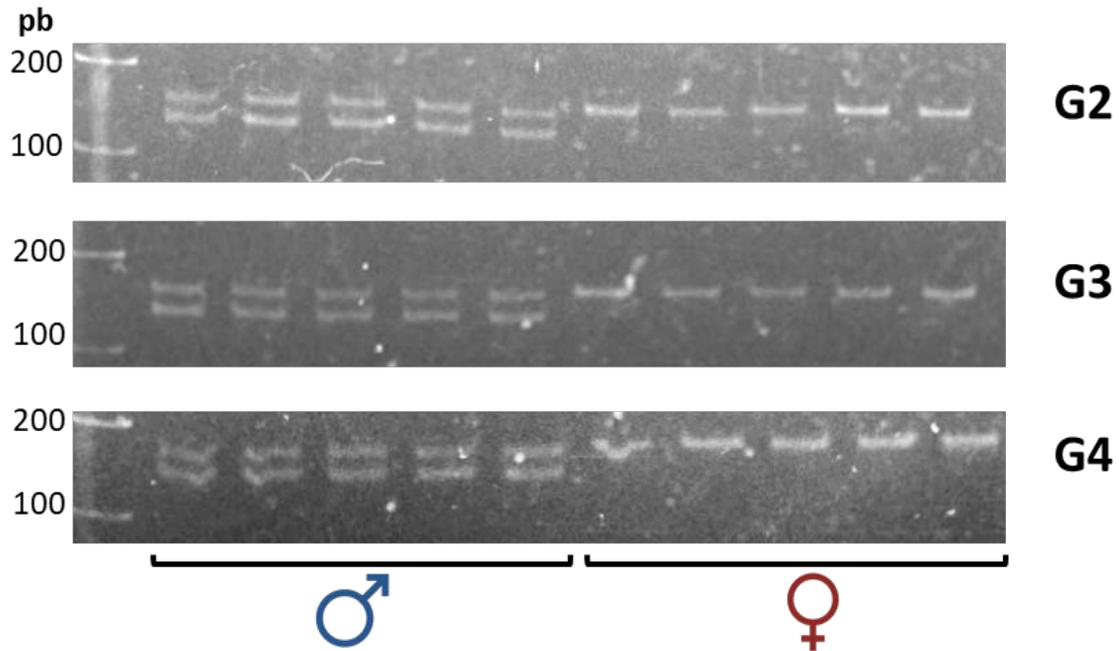


Figura 8. Genotipificación de *Aedes aegypti*. Del lado izquierdo se muestra una delección de 10pb en machos, mostrando dos bandas de distintos tamaños, mientras que en el lado derecho solo se observa el alelo silvestre del receptor caderina.

Se continuó formando parejas, y se decidió sólo analizar las hembras en cada generación y así obtener una hembra con la mutación. En el caso de los machos teníamos la certeza que siempre aparecía la mutación. Se analizaron 10 parejas de insectos durante seis generaciones, y después de haber ovipositado, las hembras fueron genotipificadas. Sin embargo, en ninguna generación se pudo observar que presentaran la delección en el gen de caderina, en todos los casos solo se observó el alelo silvestre del receptor (Figura 9).

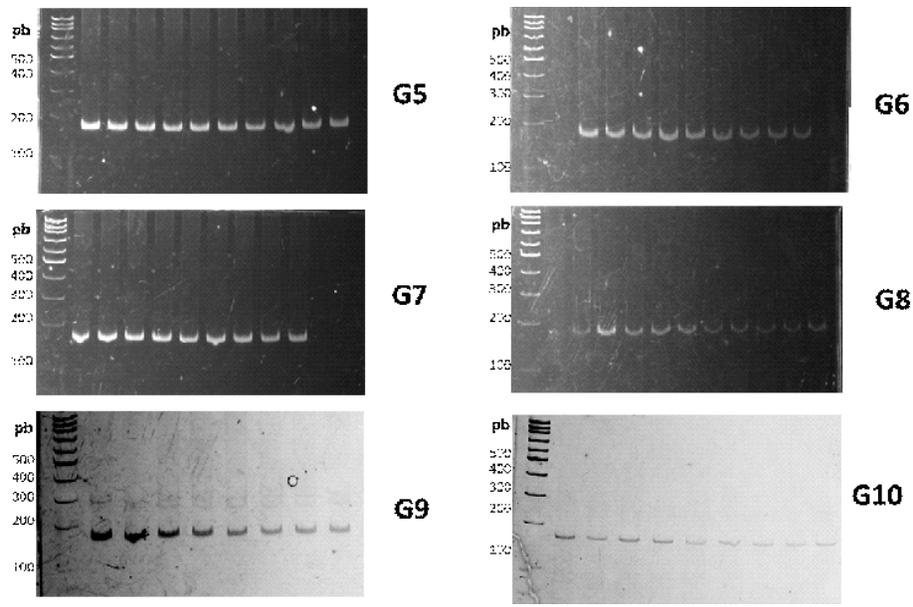


Figura 9. Electroforesis de la generación cinco hasta la décima generación de hembras sin mostrar cambios en la expresión de la proteína caderina.

Digestión in vitro de ADN con Cas9

A este punto del proyecto se decidió realizar una microinyección de embriones de *A. aegypti* con el propósito de seleccionar hembras con mutaciones en el gen de caderina. Para esto se utilizaron dos sgRNA que previamente fueron diseñados y sintetizados en el laboratorio, y que fueron nombrados como gRNA 114-F y gRNA 55-R. En un ensayo in vitro se analizó la eficiencia del complejo Cas9-gRNA para dirigir el corte de la doble hélice del DNA. La digestión se realizó usando una región del gen de caderina con un tamaño de 981 pb que fue obtenida por una reacción PCR. El fragmento de DNA fue incubado con la endonucleasa Cas9 en presencia de los gRNA's 114-F y 55-R. Posteriormente la reacción se analizó en un gel de agarosa al 1% para visualizar los productos de la digestión. Los resultados mostraron que cuando se utilizó el gRNA 114-F se observó un corte intramolecular, generando dos fragmentos de DNA con tamaños

de 660 pb y 221 pb; por otra parte, al utilizar el gRNA 55-R se observó que se generaron dos fragmentos con tamaños de 610 pb y 371 pb. Estos cortes y tamaños de fragmentos de DNA son coherentes con la predicción teórica e indica que los gRNA son funcionales y específicos, dando pauta para continuar con las futuras microinyecciones de embriones de *A. aegypti* para eliminar el receptor caderina.

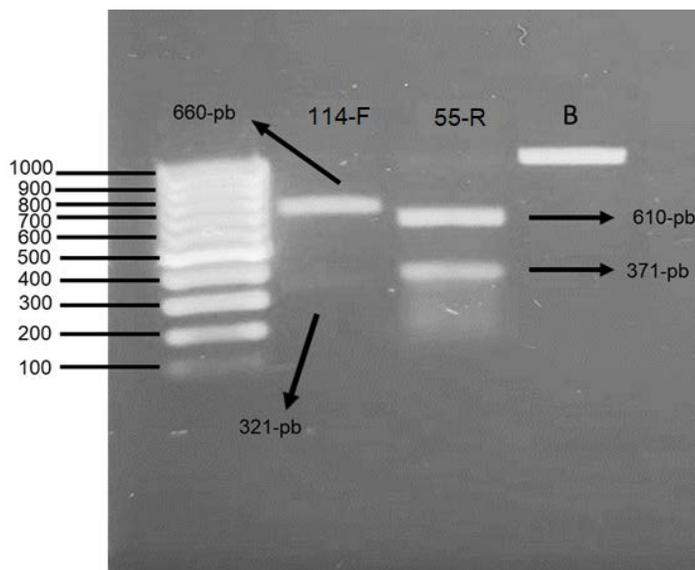


Figura 10. Electroforesis de la digestión con Cas9. El primer carril se observa el marcador de peso molecular. El segundo carril es la digestión del DNA en presencia del gRNA 114 F. El tercer carril es la digestión en presencia del gRNA 55 R. B, reacción de digestión en ausencia de gRNA.

9. DISCUSIÓN

El genoma de *A. aegypti* ha sido secuenciado y se encuentra disponible en el servidor *online* www.vectorbase.com. El genoma consiste de tres pares de cromosomas nucleares (nombrados del 1 al 3) y un cromosoma mitocondrial circular. Durante el desarrollo del proyecto observamos que una delección de 10 pb en el exón 3 del gen de caderina fue exclusiva en machos. La falta de mutación en las hembras hasta la décima generación puede deberse a que el gen de caderina se encuentra dentro de una región cromosomal ubicada en su factor M del cromosoma 1, llamado locus M (similar al cromosoma Y en humanos), y que es el determinante del sexo del macho, por lo que solo se encuentra en ellos. El locus M se encuentra en una región del cromosoma proximal al centrómero. Durante la segregación cromosomal en la división celular se ha observado que las regiones cercanas al centrómero son las que mejor se conservan, evitando así recombinación cromosómica. La reproducción de parejas de *A. aegypti* entre machos mutados y hembras silvestres no bastó para que ocurriera una recombinación genética donde el cromosoma sexual de la hembra se recombinara con el material genético del locus M, por lo que los entrecruzamientos azarosos entre alelos distintos son insuficientes para generar nuestra población homocigota con la mutación que esperábamos.

Aunque la organización genómica de *A. aegypti* pareciera muy simple (tres cromosomas), los estudios genéticos en este organismo son muy escasos y conocemos poco sobre el carácter hereditario de sus genes. Usualmente realizamos analogías con la especie más cercada y mejor estudiada, *Drosophila melanogaster*. No es extraño que mutaciones generadas con el sistema CRISPR-Cas9 no sean heredadas. Reegan et al., (2016) señaló que Dong et al., usó este sistema utilizando dos gRNA para dirigir

mutaciones a diferentes regiones del gen que codifica para la proteína fluorescente ECFP en *A. aegypti* transgénicos. En dicho estudio de los 23 grupos inyectados para la edición genética, obtuvo solo 4 grupos (G0) que produjeron larvas G1 con mutaciones donde no expresaron la proteína ECFP. Al realizar la genotipificación observaron que en un grupo una sola hembra fue la responsable para producir mosquitos G1 mutados. A diferencia del locus M, el transgen ECFP no se encuentra en una región cromosomal crítica, sin embargo el carácter hereditario resultó extremadamente regulado, evitando recombinación cromosomal. En nuestro caso, una situación que puede explicar por qué sólo hubo mutación en un solo sexo puede ser que el locus M se encuentra cerca del centrómero para evitar reareglos cromosómicos y asegurar la distinción del sexo en *A. aegypti*. Basados en esta hipótesis como perspectiva planteamos realizar nuevamente la microinyección del complejo Cas9-gRNA y hacer una selección tanto de hembras y machos con mutaciones en el gen de caderina. Una vez obtenidos los dos sexos con mutaciones entonces realizar cruza para obtener los organismos mutantes homocigotos. En este trabajo evaluamos la eficiencia de dos potenciales gRNA para hacer la microinyección. Al hacer la digestión de un fragmento del gen de caderina con la endonucleasa Cas9 en ausencia o presencia del gRNA114F y 55R, observamos un corte específico. En futuros intentos de microinyección de embriones de *A. aegypti* se utilizará una mezcla de Cas9 y los dos gRNA que son ideales para ser usados en experimentos posteriores.

10. CONCLUSIONES

El carácter hereditario de mutaciones en genes de una población de *A. aegypti* puede ser posible, sin embargo, es muy difícil que se lleve a cabo este proceso si la mutación afecta un determinante del sexo en los mosquitos, particularmente en el locus M.

La población de machos no se vio afectada en su comportamiento sexual, vuelo, alimentación o esperanza de vida, con la delección de 10 pb en el gen que expresa caderina, por lo que una población viable de homocigotos mutados si puede ser posible.

La limitante para evaluar el papel del receptor caderina en la toxicidad de proteínas Cry producidas por Bti fue la falta de obtención de una población homocigota mutada en el gen que expresa caderina. No obstante, el diseño de los nuevos gRNA y su fiabilidad demostrada en un ensayo in vitro, nos permitirán intentar microinyecciones para obtener el objetivo central de este proyecto.

11. LITERATURA CITADA

- Aimanova, K. G., Zhuang, M., y Gill, S. S. (2006). Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. *Journal of invertebrate pathology*, 92(3), 178-187.
- Angst, B. D., Marcozzi, C., y Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of cell science*, 114(4), 629-641.
- Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., y Gómez, I. (2010). Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Journal of biological chemistry*, 285(17), 12497-12503.
- Ben-Dov E. (2014). *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins*, 6(4), 1222–1243.
- Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., Holden, M. T., Harris, D., Zaritsky, A., & Parkhill, J. (2002). Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 5082–5095.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507.

Bravo, A., Gill, S. S., y Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 49(4), 423–435.

Cantón, P. E., Zanicthe Reyes, E. Z., Ruiz de Escudero, I., Bravo, A., y Soberón, M. (2011). Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, 32(3), 595–600.

Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas. (Sin fecha). Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/spanish/MosquitoLifecycle-sp.pdf>

CENAPRESE (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades). 2014. Enfermedades transmitidas por vector. Dengue Vector. Recuperado de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector.htm>

Chen, J., Aimanova, K. G., Fernandez, L. E., Bravo, A., Soberon, M., & Gill, S. S. (2009). *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochemical Journal*, 424(2), 191-200.

Chen, J., Aimanova, K., y Gill, S. S. (2017). Functional characterization of *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 involved in the toxicity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *jegathesan*. *Peptides*, 98, 78–85.

- Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., y Bonning, B. C. (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of invertebrate pathology*, 107438.
- De Maagd, R. A., Bravo, A., y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17(4), p.193-9.
- Eiman, M., Introini, V., y Ripoll, C. (2010). Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti*. Dirección de Enfermedades Transmitidas por Vectores. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, p. 7.
- Fernandez, L. E., Aimanova, K. G., Gill, S. S., Bravo, A., y Soberón, M. (2006). A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *The Biochemical journal*, 394(Pt 1), 77–84.
- Gahan, L. J., F. Gould, and D. G. Heckel. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293:857–860
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., y Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS letters*, 513(2-3), 242-246.
- Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84(3), 345-357.

Ibarra, P. M., Galindo, M. G., Contreras C., y Gonzalez, R. (2018). "Ficha técnica del vector *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)", pp. 105-118. En: Ma. Guadalupe Galindo Mendoza y Carlos Contreras Servín, coord., Geomedicina y la tecnología espacial aplicada al caso de los vectores en salud humana. UASLP-CIACyT-LAGES, ISBN: 978-607-535-065-3, (2018). 234 pág.

Jurat-Fuentes, J. L., and M. J. Adang.2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.*271:3127–3135.

Pigott, C.R. and D.J. Ellar, Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007. 71(2): p. 255-81.

Keeton, T. P., and 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.

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R., Teng, H. J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., Wint, G. R., ... Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife*, 4, e08347.

Likitvivanavong, S., Chen, J., Evans, A. M., Bravo, A., Soberon, M., y Gill, S. S. (2011). Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2829–2838.

Li, J., Carroll, J., y Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353(6347), 815-821.

López-Pazos, S. A. (2011). *Actividad biológica de proteínas Cry recombinantes de Bacillus thuringiensis sobre larvas de primer instar de Hypothenemus hampei Ferrari (Coleóptera: Scolytidae)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).

Lower, H. M. (2017). Métodos de monitoreo de *Aedes aegypti* para su control en Entre Ríos: un enfoque hacia un ordenamiento ambiental y un ecosistema urbano saludable (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica Nacional.

Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J. P., & Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7), e0005625.

Nagamatsu, Y., Toda, S., Koike, T., Miyoshi, Y., Shigematsu, S., & Kogure, M. (1998). Cloning, sequencing, and expression of the *Bombyx mori* receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA (a) toxin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(4), 727-734.

Nagamatsu, Y., Toda, S., Yamaguchi, F., Ogo, M., Kogure, M., Nakamura, M., ... & Katsumoto, T. (1998). Identification of *Bombyx mori* midgut receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA (a) toxin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(4), 718-726.

- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., ... y Soberón, M. (2009). Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(47), 32750-32757.
- Pigott, C. R., y Ellar, D. J. (2007). Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 71(2), 255–281.
- Powell J. R. (2018). Mosquito-Borne Human Viral Diseases: Why *Aedes aegypti*?. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(6), 1563–1565.
- Rodríguez-Almazán, C., Reyes, E. Z., Zúñiga-Navarrete, F., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Evans, A. M., ... Soberón, M. (2012). Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *The Biochemical journal*, 443(3), 711–717.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. y Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), p.283-300.
- Soberón, M., y Bravo, A. (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*, 14, 303-314.
- Soberón, M., García-Gómez, B. I., Pacheco, S., Sánchez, J., Tabashnik, B. E., y Bravo, A. (2015). Countering pest resistance with genetically modified Bt toxins. In *Bt Resistance: Characterization and Strategies for GM Crops Producing Bacillus thuringiensis Toxins* (pp. 150-161).

Suter, T., Crespo, M. M., de Oliveira, M. F., de Oliveira, T., de Melo-Santos, M., de Oliveira, C., ... Silva-Filha, M. (2017). Insecticide susceptibility of *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from Brazil and the Swiss-Italian border region. *Parasites & vectors*, 10(1), 431.

Upadhyay, S. K., y Singh, P. K. (2011). Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnology letters*, 33(10), 2027-2036.

Vadlamudi, R. K., Ji, T. H., y Bulla, L. A. (1993). A specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12334-12340.

Vadlamudi, R. K., E. Weber, I. Ji, T. H. Ji, and L. A. Bulla, Jr. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 270:5490–5494.

Vestal, D. J., y Ranscht, B. (1992). Glycosyl phosphatidylinositol--anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion. *The Journal of cell biology*, 119(2), 451-461.

World Health Organization. Scientific Group on Arboviruses, & Human Disease. (1967). *Arboviruses and Human Diseases: Report of a WHO Scientific Group*.

World Health Organization. Recuperado de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/40664/WHO_TRS_369.pdf?sequence=1&isAllowed=y

World Health Organization (WHO). (2016). Zika virus microcephaly and guillain-barré syndrome. Recuperado de: http://www.health.gov.bt/wp-content/uploads/moh-files/2016/02/WHO-Zika-Situation-Report_19-02-2016.pdf



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de

Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 26 de septiembre de 2023

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: **C. GONZAGA PÉREZ IVÁN**, con el título del trabajo: **OBTENCIÓN DE UNA POBLACIÓN HOMOCIGOTA DE *Aedes aegypti* CON MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR CADERINA.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° 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: DR. VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ

SECRETARIO: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCÍA

VOCAL: DR. SABINO PACHECO GUILLEN

SUPLENTE: DR. GUADALUPE PEÑA CHORA

SUPLENTE: M. EN B. EMMANUEL DUNSTAND GUZMÁN DÍAZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

SABINO PACHECO GUILLÉN | Fecha:2023-09-26 12:58:17 | Firmante

DDTJeeclP3FwHDG4tL/QciD9HqW4xzPKWWMK5DK5D5TotrMmoya27i22K3DZqBKyUbLxGhhdLYolho57KgZpznf32BN+/F0TwjAog1V8fk9EFyEP66rVmSFoX8xtwRTuyOmW+E
KAR32P2X9FkclVAj2AFheFpzSIH0+eDu/xuazsKClhcAL8j4qvfGksZ4C44gawQZheqa1WZryH1aVL2G1L3dVep+TOQIM5D0LJPvL7DqeD2E7FijYyfQ10DP7Wj5IRyRoy19WM
XexQvKZCHerBJ6vUWwNcEHOM73Ss0t9M/I6bPCQqRerXuTdsiY0iAPfHD8JAA55q6quUi1sg==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-09-26 13:29:23 | Firmante

O1K6ZGvl46p57xp0yLyQ/8RcGt1XELCtsqJL/i71wuZYkICKSY7KJOn9Xovxz7kiMbh0jwnPas9Esur6rhWybHiNmS1gTCRFGwux590f4HyHMdxV/NFUVCGaCbAMVgIUx8bZl1RM
GvUOJwGQFf+vm26CYcEhzmwnWPC23AaOBWBM1E8JJJEfh0DI1PJKZL2C42xbBo/EiSSiz1XpzRaAmz7mesCiUBU9KWiRH7c0PIWCEwVQr6Zas7T91oy41Mk0dcccWcxgJ6E
yy5atk3I9IWBpV01dXKbma+QpFbZVg0NBq8waviQsR8glwnjizPAuUARlqB68tzRuGNle9fllw==

EMMANUEL DUNSTAND GUZMÁN DÍAZ | Fecha:2023-09-30 07:42:29 | Firmante

XVUyQ+QkbjvPjS9MHZpLshQIMdJPOvCLM1I9efBzdX1FHyMOHuY8h9AYsqs32Z7KRH05J3gqcYDAIUcVujuPYeZCMY1o8r+0AKHBrVmJkzsdSOAcUiznB1gRB7D9b5SW+xEUo
51EpT8yikVoH41dy83egBOFGNrgBCPa7LfCGmus6F/YTpvVybU527t8WEXHvZHKbZul5e2d9KA2/6dYdE+HSRafseF8kVfm4JjWEn0PEriLRq8PLwY2WLPvaANvr5g8+4yVgPgc
4iqXGCRYvJ8RmR7r9huXxu0ZWI+nY5JPP9hholfbS/8kAPT6VpSwBzWiyU7pgevX2fx0AtJAW==

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2023-10-10 14:11:26 | Firmante

DdLar2zj1hEhuG7HTaFFNk0YABUT1Uuuot53iE7p8jWT2jg/Fxq7JMZJtJRxaDZDuS3FcYs1L1AgiRfvv/BfUbhL3rjwuxzeAVU/I8zklsvqJCKEGNE5Bjawz90SDzIXuBhK6411mfBG
HBaCxCALTQFEMLoKEFsybqg78nP/zfa/GfllFms5x3Hx4yvNE9UQtF/hkgk0VFBc66sGv7lu29ki0BObAfDbYHjozdF3A+U+DDFRBYaorSX1gFWVwMjjfFxs8ttQL/jBC0bJuKuUVM
AkKzzXSnuQRK3XVgnIHbg/cvx9xt6BmujQ1sl5STsPA41AZw30ciGpXMPNL1A==

LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2023-10-24 18:02:13 | Firmante

R/aA9VgzQ09Zj3eZeE9w37x1gBPXpsCaXnzDulurB3YkZ+3Ycl2EawCJ9vIITuIgEaAooiXjCYnl3IQXKl9hcE9+GbWr3ic/SpWNm5rNGnNTDTyt91RTzBUKg50jinqKb9Urv4+c9nGu
6ig86l/zl1PebGK7nhW++TDKxSK5hWbAyBW84T9hf7ZxPP7YfLxALe6zU2FmmnflRkIDhCO1d62XVah6B19oDYSV2GP0+/4UsVpnZ3anp6pir4pBbjGbh9ltXK79zYcilVoE7PYZ1N
mCbzLM46h4kiPDKNwO2J5kxknjvjuze4StCeG1Tsrke45Be57w0uPGzuWOes1qg==

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



hLS76zMfP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VMfSw24HGVMwfmGLXY3cdEKEU1DhL9>

