UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS DEL EFECTO COMBINATORIO DE LA EXOTOXINA A DE *Pseudomonas aeruginosa* NA04 CON LA ACTIVIDAD INSECTICIDA ASOCIADA AL ÁCIDO SIRÍNGICO EN *Spodoptera frugiperda*.

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

IVAN ALEJANDRO CRUZ APARICIO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ROSALBA SALGADO MORALES

CODIRECTOR

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

CUERNAVACA, MORELOS **OCTUBRE, 2025**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos del Centro de Investigación en Biotecnología.

Comité sinodal:

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Dra. Rosalba Salgado Morales

Dr. Fernando Cuevas Remigio

M. en B. Alicia Fonseca González

Dr. Abraham Omar Rivera Ramírez

Agradecimientos

Expreso mi más sincero agradecimiento al Laboratorio de Estudios Ecogenómicos (LEE) CEIB-UAEM por brindarme los recursos, el espacio y tiempo necesario para llevar a cabo este trabajo.

Le agradezco al Dr. Edgar Dantán González por darme la oportunidad realizar este trabajo en su laboratorio, así como de sus aportaciones para fomentar mi conocimiento y habilidades de investigación.

Le agradezco profundamente a la Dra. Rosalba Salgado Morales por su guía, paciencia, confianza y apoyo constante en la elaboración de este trabajo.

Les expreso mi gratitud a mi comité sinodal por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus valiosas observaciones y por su compromiso con mi formación académica.

A mis compañeros de laboratorio por su compañerismo, al hacer más agradable mi periodo en el laboratorio y compartir conocimientos.

A mi familia por su apoyo moral y cariño incondicional, en especial a mi madre María Elena Aparicio Ocampo por siempre creer en mí y darme ánimos apoyando las decisiones que tomó incluso cuando las circunstancias no son las más favorables.

Agradecimientos técnicos

Le agradezco a la Dra. Janette Onofre Lemus por compartir sus conocimientos y brindar su apoyo técnico en el proceso de purificación de las proteínas.

Agradezco a la M. en B. Alicia Fonseca González por su valiosa colaboración al proveer las larvas de *S. frugiperda* utilizadas para el desarrollo de los experimentos en este trabajo.

Índice temático

1 INTRODUCCIÓN 7

2 MARCO TEÓRICO 9

2.1 Pseudomonas aeruginosa 9

2.2 Exotoxina A 11

2.2.1 Estructura de la Exotoxina A 12

2.2.2 Mecanismo de acción de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* 14

2.2.3 Actividad insecticida de la Exotoxina A 15

2.3 Actividad insecticida de compuestos fenólicos 16

2.3.1 Ácidos fenólicos 17

2.3.2 Ácido siríngico 18

2.3.3 Interacción de compuestos fenólicos con proteínas 21

2.4 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) 22

2.4.1 Ciclo biológico de *S. frugiperda* 23

2.5 *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) 25

2.6 Antecedentes 27

3 JUSTIFICACIÓN 32

4 HIPÓTESIS 32

5 OBJETIVOS 32

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 33

7 METODOLOGÍA: 33

7.1 Expresión heteróloga de la Exotoxina A 33

7.2 Ruptura celular 34

7.3 Purificación de la Exotoxina A por IMAC 34

7.4 Selección de fracciones enriquecidas 35

7.5 Diálisis y cuantificación de proteína 35

7.6 Bioensayos de supervivencia. 35

8 RESULTADOS 36

8.1 Resultados de la expresión y purificación de la Exotoxina A 36

8.2 Resultados de la diálisis y cuantificación de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 37

8.3 Resultados de los bioensayos 38

9 DISCUSIÓN 46
10 CONCLUSIONES 48
11 PERSPECTIVAS 49
12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

Índice de figuras

Figura 1: Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. 10
Figura 2: Actividad ADP-ribosiltransferasa de la Exotoxina A de *P. aeruginosa.* 12
Figura 3: Estructura de la Exotoxina A. 14
Figura 4: Vías moleculares de la Exotoxina A de *P. aeruginosa.* 15
Figura 5: Representación general de la biosíntesis de ácidos fenólicos derivada de la vía del ácido shikímico. 17
Figura 6: Estructura general de los ácidos hidroxibenzoicos (1) y de los ácidos hidroxicinámicos (2), con algunos representantes. 18
Figura 7: Estructura química (2D y 3D) del ácido siríngico. 19
Figura 8: Actividad de β-Glucosidasa en el contenido intestinal de los estadios larvales indicados de larvas de *S. litura* expuestas a dietas naturales tratadas con ácidos fenólicos. 20
Figura 9: Ciclo biológico de *S. frugiperda.* 24
Figura 10: Distribución del gusano cogollero *S. frugiperda*. 25
Figura 11: Representación esquemática del ciclo de vida de *G. mellonella.* 26
Figura 12: Mortalidad media en *D. magnifactella*. 27
Figura 13: Mortalidad en *G. mellonella.* 28
Figura 14: Actividad del sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04 en *G. mellonella*. 29
Figura 15: Actividad del sobrenadante en conjunto con GroEL proveniente de *A. faecalis y Xenorhabdus nematophila* SC 0516 a las 48 h en *G. mellonella.* 30
Figura 16: Análisis de la actividad sinérgica de las proteínas GroEL y la Exotoxina A. 31
Figura 17: Mapa representativo de la estrategia experimental. 33
Figura 18: SDS-PAGE 10 % teñido con azul de Coomassie. 37
Figura 19: SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. 38

Figura 20: Análisis de la sobrevivencia en *G. mellonella* en respuesta a la administración de ácido siríngico y Exotoxina A de manera individual y en conjunto. 40
Figura 21: Porcentaje de mortalidad en *G. mellonella.* 40
Figura 22: Ensayo preliminar de la sobrevivencia en *S. frugiperda* en respuesta a la administración de ácido siríngico y Exotoxina A de manera individual y en conjunto. 41
Figura 23: Análisis de la sobrevivencia en *S. frugiperda* en respuesta a la administración de ácido siríngico y Exotoxina A de manera individual y en conjunto. 43
Figura 24: Porcentaje de mortalidad en *S. frugiperda.* 43
Figura 25: Diferencias fenotípicas en *G. mellonella* y *S. frugiperda* a la administración de diferente dosis de Exotoxina A y a la combinación con ácido siríngico. 45

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *S. frugiperda.* 22
Tabla 2: Rendimiento obtenido de la Exotoxina A después de su purificación mediante IMAC y cuantificación. 38

1 INTRODUCCIÓN

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, miembro del grupo de las gamma-proteobacterias, aerobio facultativo, y es considerado un organismo modelo en la microbiología, en especial para el estudio de la virulencia, de expresión génica, quorum sensing (comunicación célula-célula), resistencia a antibióticos y formación de biopelículas (Diggle & Whiteley, 2020; Letizia et al., 2025). Su increíble versatilidad proviene de su variabilidad genética, flexibilidad metabólica y diversidad fenotípica, lo que le permite prosperar en ambientes muy diversos siendo una bacteria ubicua, que puede aislarse en una amplia variedad de nichos ambientales como agua, suelo y hospedadores como plantas e insectos, así como de muestras clínicas, ya que es considerada un patógeno oportunista de humanos. Su tolerancia y resistencia intrínseca a antibióticos, junto con la producción de múltiples factores de virulencia y rápida adaptación al entorno infeccioso, representan un gran desafío clínico (Su & Hassett, 2012). Entre el repertorio de factores de virulencia, destaca la Exotoxina A, la cual es considerada el principal factor de virulencia, debido a su elevada toxicidad y su capacidad de interferir en procesos vitales para las células hospedadoras, a través de la inactivación del Factor de Elongación 2 eucariota (eEF-2) mediante ADP-ribosilación y detiene la elongación durante la síntesis de proteínas, desencadenando finalmente en la muerte celular (Michalska & Wolf, 2015). Sin embargo, el efecto de la Exotoxina A ha sido poco explorado en insectos, así como su potencial como alternativa para el manejo de insectos plaga ante los problemas de resistencia a insecticidas químicos.

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, es un insecto lepidóptero considerado plaga altamente invasiva y de importancia económica, causante de efectos adversos en la producción de diversos cultivos y es considerado como un organismo que amenaza la seguridad alimentaria a nivel global, ya que es originaria de América, pero en años recientes se ha distribuido en algunas regiones de África y Asia (Sun et al., 2025). Es de hábitos polífagos y algunos reportes indican que puede alimentarse de alrededor de 350 especies de plantas. Aunado a la voracidad de *S. frugiperda*, se encuentran los reportes de altos niveles de resistencia a plaguicidas organofosforados como clorpirifos, carbamatos como carbaril, piretroides e incluso contra las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Tossou et al., 2025).

Entre los metabolitos secundarios producidos por plantas, destacan los compuestos fenólicos por su papel defensivo frente a herbívoros y patógenos. Algunos de ellos, como es el caso de ácido cafeíco y la quercetina han mostrado actividad insecticida en *Spodoptera litura* (Punia et al., 2023;

Herrera-Mayorga et al., 2022). En este contexto, el ácido siríngico, otro compuesto fenólico, también se ha reportado su capacidad de afectar el crecimiento, desarrollo y la actividad enzimática en larvas de *S. lituria* (Movva & Pathipati, 2017; Usha Rani & Pratyusha, 2014). Sin embargo, la complejidad biológica y la alta capacidad adaptativa de *S. frugiperda* hacen necesario evaluar estrategias que no dependan de moléculas individuales, sino de combinaciones que puedan potenciar su efecto insecticida y contribuir al desarrollo de alternativas más eficaces.

En el laboratorio de Estudios Ecogenómicos (LEE) del Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB) de la UAEM, se aisló la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* NA04 a partir de muestras del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis indica* MOR03, este hallazgo evidencio a *P. aeruginosa* NA04 como una bacteria asociada a *H. indica* siendo esta una asociación no canónica con nematodos entomopatógenos. A través de bioensayos en larvas de último instar del insecto modelo *Galleria mellonella*, se demostró que *P. aeruginosa* NA04 posee una elevada virulencia (Salgado-Morales et al., 2019). La secuenciación y la anotación del genoma de *P. aeruginosa* NA04 revelaron un arsenal de genes que codifican para factores de virulencia, entre ellos la Exotoxina A. Posteriormente, en el mismo laboratorio se determinó que la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 es capaz de establecer sinergia con otra molécula de origen proteico; la chaperona GroELXn SC 0516, una proteína multifuncional con actividad insecticida, la combinación de ambas proteínas amplifica el efecto insecticida en larvas de último instar de *G. mellonella* (Rivera-Ramírez et al., 2023).

Con base en lo descrito previamente y considerando la capacidad de la Exotoxina A de establecer interacciones sinérgicas, así como la actividad biológica del ácido siríngico, se plantea la hipótesis de que la combinación de ambas moléculas podría generar un mayor efecto insecticida contra *S. frugiperda*. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es evaluar la actividad insecticida individual y combinada de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 y el ácido siríngico sobre larvas de *S. frugiperda* y en larvas del insecto modelo *G. mellonella.* Sin embargo, cabe señalar que el presente estudio representa un acercamiento para explorar la manera en que moléculas bacterianas y metabolitos pueden interactuar y su posible efecto en insectos plaga, sin perder de vista la necesidad de evaluar rigurosamente sus implicaciones biológicas y de seguridad.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Pseudomonas aeruginosa

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es un organismo multifacético, que durante décadas, ha servido como organismo modelo en biología molecular para entender la expresión génica bacteriana, la regulación, la comunicación célula–célula (quorum sensing), la resistencia a antibióticos, la virulencia y la formación de biopelículas (Letizia et al., 2025).

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa con forma de bastoncillo, ubicua, que puede aislarse en una amplia variedad de nichos ambientales y hospedadores, principalmente en entornos clínicos, aunque también en agua, suelos, plantas e insectos. Presenta una gran versatilidad metabólica permitiéndole crecer en condiciones aerobias, microaeróbias e incluso anaerobias, utilizando aceptores alternativos de electrones como es el caso del nitrato. Mide aproximadamente 1-5 µm de largo y 0.5-1.0 µm de ancho, con un único flagelo polar para la motilidad (Su & Hassett, 2012; Whiteley et al., 2001). La bacteria *P. aeruginosa* se aisló por primera vez en 1882 a partir de vendajes tomados de las infecciones de heridas de soldados, y se observó que presentaba un color azul (Gessard, 1984).

Es capaz de presentar resistencia a múltiples antibióticos, debido a factores como su baja permeabilidad de membrana, la presencia de bombas de expulsión y la producción de enzimas modificadoras de fármacos. Además produce exoenzimas y exotoxinas que dañan tejidos del hospedador, sideróforos que le permiten captar hierro esencial, fenazinas y piocinas con efectos tóxicos. Por otro lado, tiene la capacidad para formar biopelículas, estructuras protectoras que dificultan la acción de los antimicrobianos y del sistema inmune, mediante producción de exopolisacáridos y ramnolípidos (Krell & Matilla, 2024).

Para adaptarse a entornos diversos y dinámicos*, P. aeruginosa* ajusta con precisión la expresión génica a nivel poblacional mediante la detección de quórum, que es una forma de comunicación célula-célula utilizada por muchas especies bacterianas *(quorum sensing)*, que coordinan la expresión de factores de virulencia en función de la densidad poblacional. Estas redes le otorgan la capacidad de responder de manera flexible a estímulos internos y externos, maximizando su supervivencia y su capacidad infecciosa (Letizia et al. 2025).

Su virulencia está determinada por una compleja serie de factores que le permiten infectar, persistir y causar daños en los tejidos del huésped (Figura 1). Entre ellos destacan las exotoxinas A, S, T,

U, Y, así como diversas proteasas extracelulares como LasA, LasB, AprA y PrpL. También produce ramnolípidos, fenazinas como la piocianina, hidrógeno cianuro y sideróforos como la pioverdina y pioquelinas. Además, cuenta con la formación de biopelículas, el sistema de secreción tipo III y la sobreproducción de exopolisacáridos como alginato, Pel y Psl, que en conjunto fortalecen su capacidad de colonización y resistencia (Hauser, 2009; Krell & Matilla, 2024; Letizia et al., 2025; Qin et al., 2022).

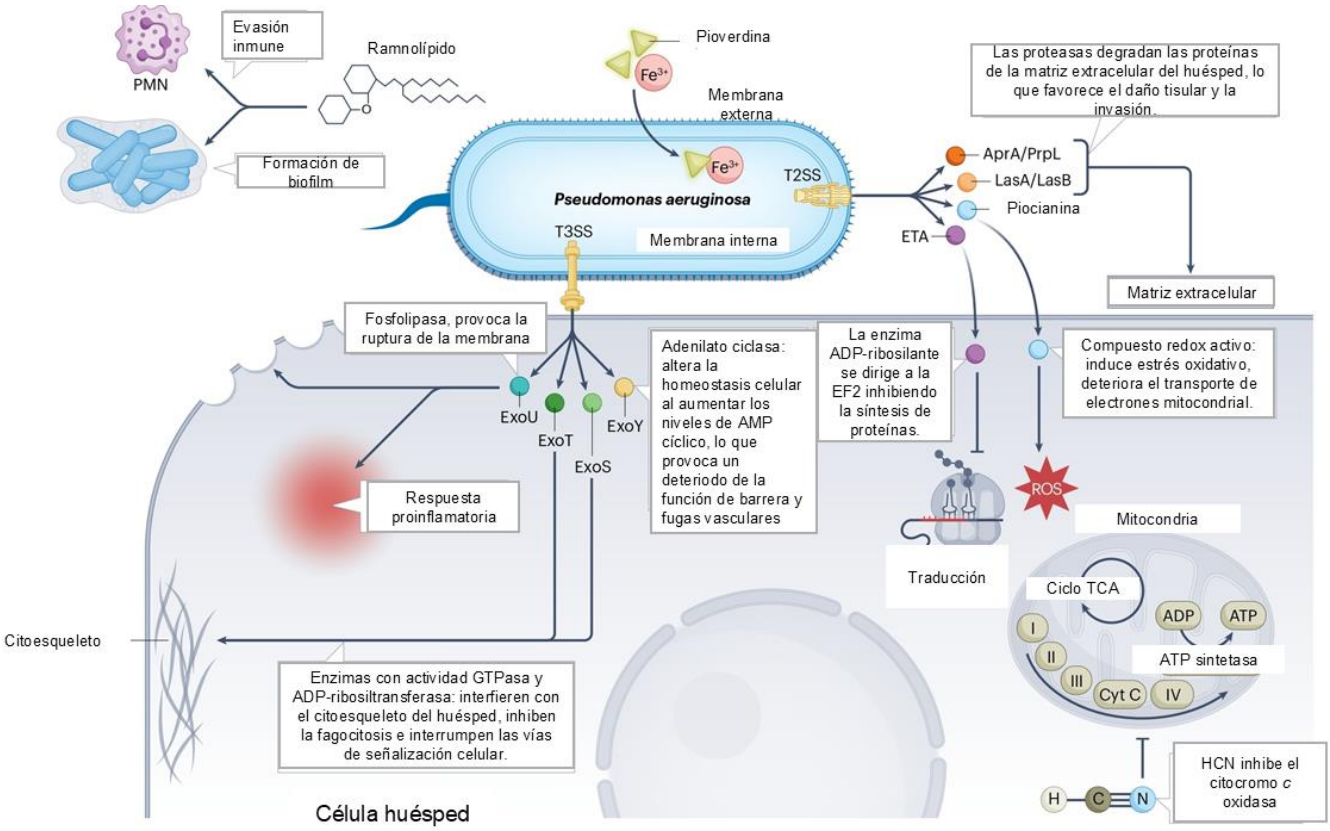


Figura 1: Factores de virulencia de *P. aeruginosa*.

El sistema de secreción tipo III (T3SS) inyecta toxinas como ExoU, ExoT, ExoS y ExoY directamente en las células huésped. La Exotoxina A, es secretada por el sistema de secreción tipo II (T2SS). Otros factores de virulencia son las proteasas (AprA, PrpL, LasA y LasB) y los ramnolípidos. Otros factores, como la pioverdina, el cianuro de hidrógeno (HCN) y la piocianina, promueven la quelación del hierro, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la apoptosis. AMP, adenosina monofosfato; EF2, factor de elongación 2; PMN, leucocitos polimorfonucleares; ROS, especies reactivas de oxígeno. Fuente: modificado de Letizia et al., 2025.

2.2 Exotoxina A

La Exotoxina A de *P. aeruginosa* es uno de los factores de virulencia más importantes de esta bacteria oportunista, responsable de infecciones graves en individuos inmunocomprometidos, pacientes con fibrosis quística, quemaduras extensas o cáncer. Es reconocida por su elevada toxicidad y su capacidad de sabotear los procesos vitales de las células hospedadoras. Estructuralmente, pertenece a la familia de las toxinas AB, donde el dominio B cumple funciones de unión al receptor celular y el dominio A ejerce la actividad catalítica, consistente en una ADP-ribosilación altamente específica. Esta proteína extracelular está codificada por el gen *toxA* que contiene 1,353 pares de bases, consta de 638 aminoácidos y pesa aproximadamente 66 kDa, posee dominios especializados que le permiten internalizar en la célula por endocitosis mediada por receptores, desplazarse hacia el citoplasma y ejecutar su actividad catalítica. Pertenece a la familia de las mono-ADP-ribosiltransferasas, cuya función esencial es transferir residuos de ADP-ribosa desde el NAD^+ hacia un blanco específico dentro de la célula eucariota (Figura 2). El objetivo principal de la Exotoxina A es el factor de elongación eucariota 2 (eEF2), un componente crítico del mecanismo de síntesis de proteínas en las células eucariotas. La Exotoxina A actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en las células huéspedes, al modificar el residuo diftamida de eEF2, bloqueando el proceso de translocación ribosomal, deteniendo de forma irreversible la producción de proteínas y desencadenando finalmente la muerte celular, esto contribuye a la capacidad de la bacteria para causar infecciones graves. La Exotoxina A está especialmente asociada con el daño tisular y la necrosis, lo que la convierte en un factor importante en la gravedad de las infecciones agudas (Yates & Merrill, 2004; Michalska & Wolf, 2015; Urgancı et al., 2022; Letizia et al., 2025).

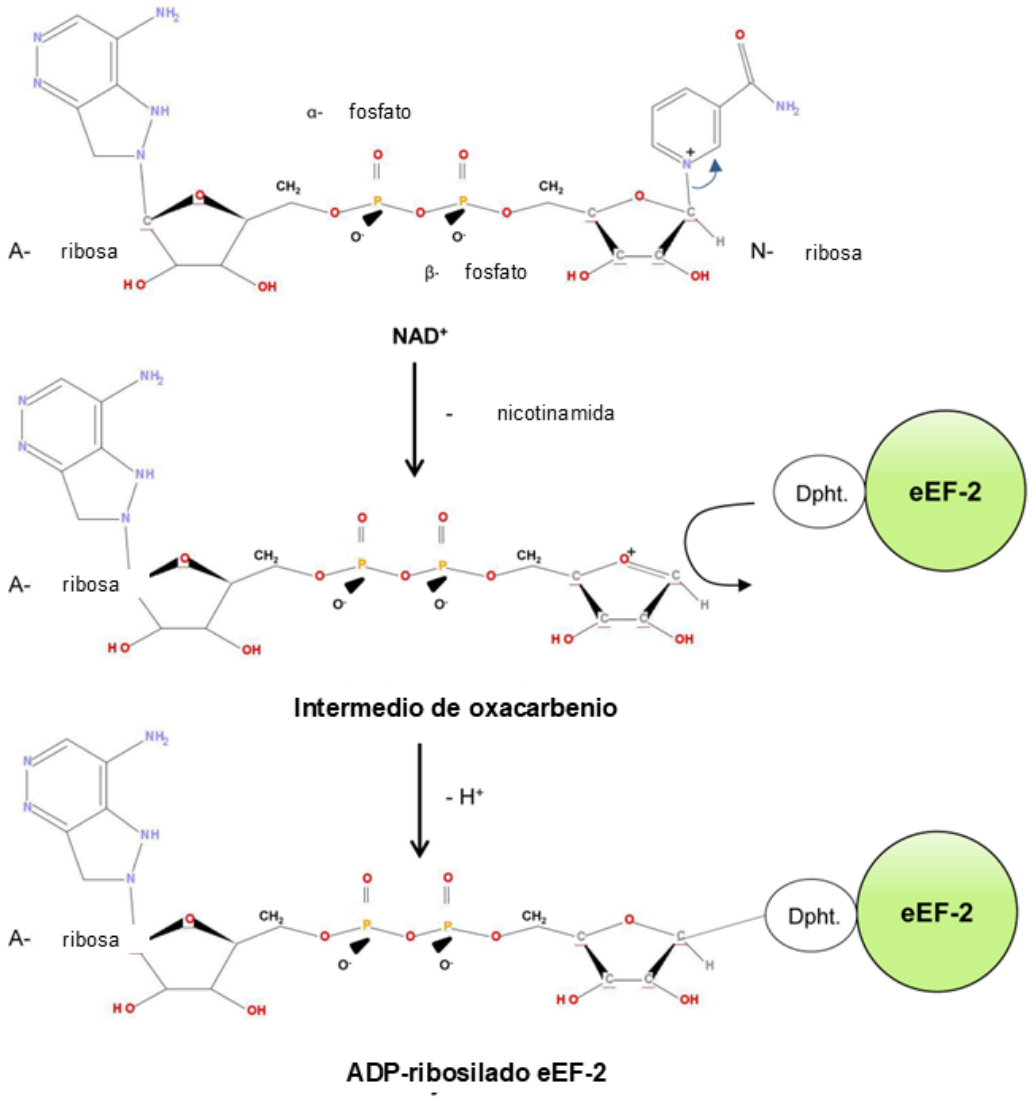


Figura 2: Actividad ADP-ribosiltransferasa de la Exotoxina A de *P. aeruginosa.*

Abreviaturas: Dpht: Diftamida. Eef-2: Factor de elongación tipo 2. ADP: adenosín difosfato. NH2: grupo amino. CH2: metileno. OH: hidróxido. Fuente: Michalska & Wolf, 2015.

2.2.1 Estructura de la Exotoxina A

La Exotoxina A de *P. aeruginosa* es una proteína con 638 aminoácidos de longitud, esta constituye uno de los principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Se han identificado tres dominios, cada uno con funciones específicas que en conjunto aseguran la internalización, procesamiento y acción tóxica dentro de la célula hospedera (Figura 3).

El dominio I, se subdivide en Ia (residuos 1-252) e Ib (residuos 365-404). Presenta una arquitectura compuesta por láminas ß antiparalelas, con trece hebras que conforman un núcleo estable. Su papel principal es mediar la unión al receptor en la superficie de la célula blanco, específicamente al receptor de α2-macroglobulina. Mutaciones en residuos críticos como Lys57 han mostrado que alteraciones en esta región reducen de forma significativa la capacidad de la toxina para reconocer y entrar en las células. Por lo tanto, este dominio es esencial para el primer contacto con el hospedero. El dominio II abarca los residuos 253-364 y está compuesto por seis hélices α que forman un haz compacto. Este dominio es el responsable del direccionamiento transmembrana y es también donde se localiza el sitio de corte por furina, una proteasa esencial para activar la toxina. A pesar de que la región del sitio de corte parece superficial, solo se vuelve accesible bajo condiciones de pH ácido, lo que sugiere que el dominio II actúa como sensor de cambios conformacionales mediados por el entorno endosomal. Además, interacciones iónicas entre este dominio y el dominio I se desestabiliza con la acidificación, facilitando la exposición al corte proteolítico y la posterior translocación del fragmento catalítico. El dominio III comprende los residuos 405-613 y constituye el corazón enzimático de la Exotoxina A. Posee un plegamiento α/β único, diferente a los motivos clásicos de unión a nucleótidos, lo que le confiere especificidad para llevar a cabo la ADP-ribosilación del factor de elongación eucariótico 2 (eEF-2). En la estructura completa de la toxina, el sitio catalítico permanece bloqueado por la interacción de un puente salino entre Arg467 y Glu348, lo que evita la unión de NAD^+. Solo tras el procesamiento proteolítico y la translocación al citoplasma, el dominio III adopta una conformación abierta que permite la catálisis. Este dominio, además de ser responsable de la inhibición de la síntesis proteica, representa el componente letal de la toxina (Michalska & Wolf, 2015; Wedekind et al., 2001).

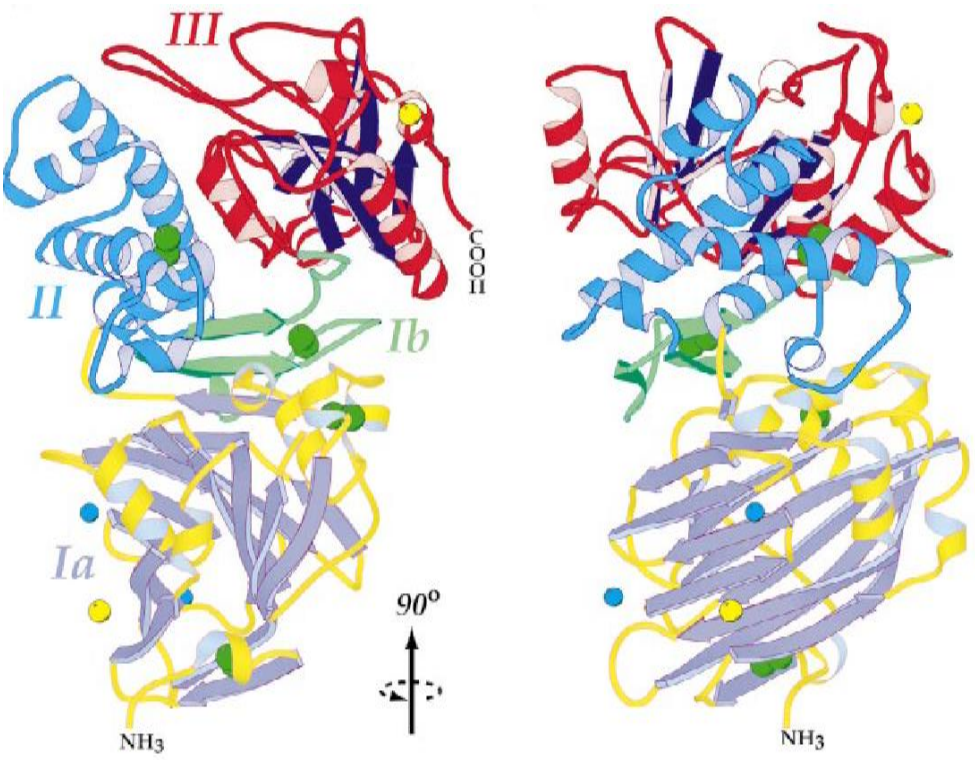


Figura 3: Estructura de la Exotoxina A.

Se muestran sus diferentes dominios IA (morado), dominio IB (verde), dominio II (Azul claro), dominio III (rojo). En el lado derecho se muestra la misma proteína rotada 90 grados. Fuente: Fuente: Wedekind et al., 2001.

2.2.2 Mecanismo de acción de la Exotoxina A de *P. aeruginosa*

El mecanismo de acción inicia con la secreción de la toxina al medio extracelular a través del sistema de secreción tipo II. Una vez liberada, se une al receptor CD91 en la superficie de las células huésped y es endocitada. En los endosomas tempranos, la toxina sufre una escisión mediada por furina, que separa un fragmento de aproximadamente 37 kDa con actividad enzimática. Este fragmento, gracias a su señal de tráfico REDL, sigue una ruta retrógrada hacia el aparato de Golgi y finalmente hacia el retículo endoplásmico (RE). Desde allí, utilizando el sistema de degradación asociada al RE (ERAD), logra translocarse al citoplasma. Una vez en el citosol, la Exotoxina A despliega su acción catalítica: ADP-ribosil en el factor de elongación eucariótico 2 (eEF-2) en su residuo de diftamida, bloqueando irreversiblemente la síntesis proteica (Figura 4). La consecuencia inmediata es la detención de la producción de proteínas y, posteriormente, la activación de vías

apoptóticas tanto intrínsecas como extrínsecas, que culminan en la muerte celular programada (Michalska & Wolf, 2015).

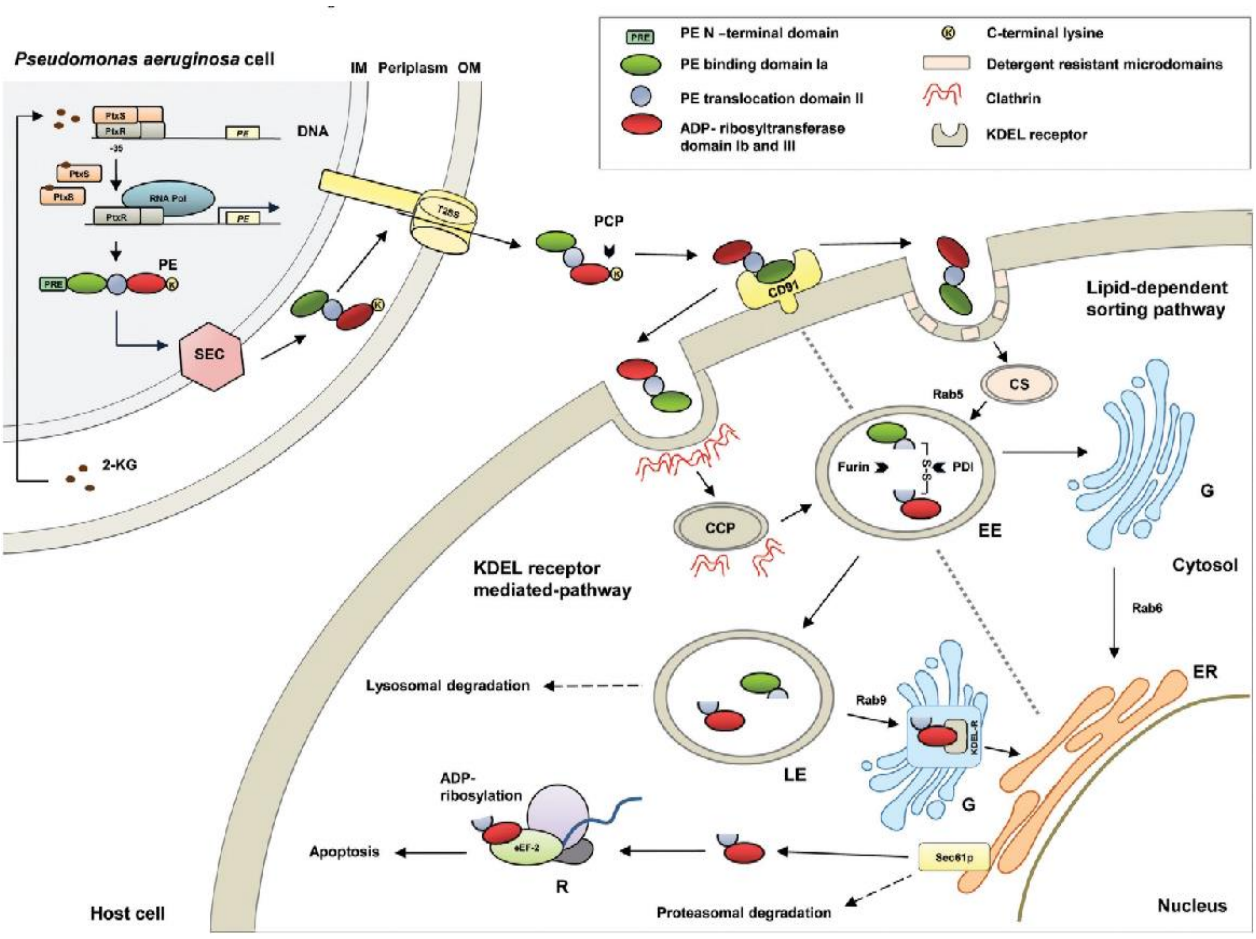


Figura 4: Vías moleculares de la Exotoxina A de *P. aeruginosa.*

Fuente: Michalska & Wolf, 2015.

2.2.3 Actividad insecticida de la Exotoxina A

Como se mencionó previamente, la Exotoxina A es un factor de virulencia de gran relevancia para *P. aeruginosa* por lo que se ha evaluado sus efectos en otros organismos como en los invertebrados entre ellos: *Bombyx mori* el gusano de la seda en donde se usaron larvas de quinto estadio, las cuales fueron inyectadas con la Exotoxina A, lo que provocó una mortalidad significativa en las larvas, con una dosis letal media (DL_{50}) de aproximadamente 140 ng/g de peso corporal a las 24 h (Hossain et al., 2006).

Se construyó una mutante de *P. aeruginosa* con el gen *toxA* inactivado (PAO1*toxA*) que codifica para la Exotoxina A para así evaluar sus efectos en ausencia de dicha proteína en *B. mori* encontraron que la ausencia de la proteína no causa muerte temprana al menos durante las primeras 120 h, evidenciando que hay otros factores de *P. aeruginosa* que causan la muerte en etapas tardías posterior a la infección. A su vez determinaron la DL_{50} de 67.1 ng/larva a las 48 h para compararla con la mutante (Chieda et al., 2011).

En larvas de último instar *G. mellonella* la administración de Exotoxina A inyectada en una concentración de 20 ng/larva reveló que altera su sistema inmune induciendo muerte celular programada (apoptosis) y necrosis, estos indicios se presentan en los hemocitos desde la 8 h, a las 24 h se observó que el 46 % de los hemocitos ya estaba en etapa de apoptosis (Iwański et al., 2023).

2.3 Actividad insecticida de compuestos fenólicos

Existen diversos compuestos de origen no proteico como los metabolitos secundarios sintetizados por plantas que presentan actividad insecticida confirmada como:

Un estudio realizado en 2022 evaluó la actividad insecticida de extractos orgánicos de *Solidago graminifolia,* en donde se encontró que un metabolito secundario; la quercetina presenta actividad insecticida al administrarse en dieta contra larvas neonatas del insecto *S. frugiperda* con una DL_{50} de 0.157 mg/ml en un tiempo de 120 h (Herrera-Mayorga et al., 2022).

El ácido cafeico, otro metabolito secundario de plantas mostró actividad insecticida al administrarse en dieta, así como afectaciones en el crecimiento, desarrollo y fisiología bioquímica en larvas de *S. litura*, presentó una DL_{50} de 385.19 ppm a las 24 h (Punia et al., 2023).

El eucaliptol es otro metabolito secundario que presentó actividad insecticida al inyectarse sobre larvas de 3er instar de la especie *Plutella xylostella* (polilla dorso de diamante) con una DL_{50} de 76.97 µl/ml a las 24 h, causando un incremento en la actividad de las enzimas desintoxicantes carboxilesterasa (CarE) y glutatión-S-transferasa (GST), ocasionando la muerte de las larvas.

2.3.1 Ácidos fenólicos

Un ácido fenólico es un compuesto químico que pertenece a una clase de metabolitos secundarios de plantas y hongos, son sintetizados a partir de la vía del ácido shikímico (Figura 5). Estos compuestos poseen al menos un anillo aromático en el cual un hidrógeno ha sido sustituido por un grupo hidroxilo. Estos compuestos se encuentran en frutas, verduras, legumbres y alimentos integrales. También se encuentran en bebidas como el té, el café, el cacao y el vino tinto (Bartel et al., 2023; Heleno et al., 2015; Robbins, 2003; Tohge & R Fernie, 2017).

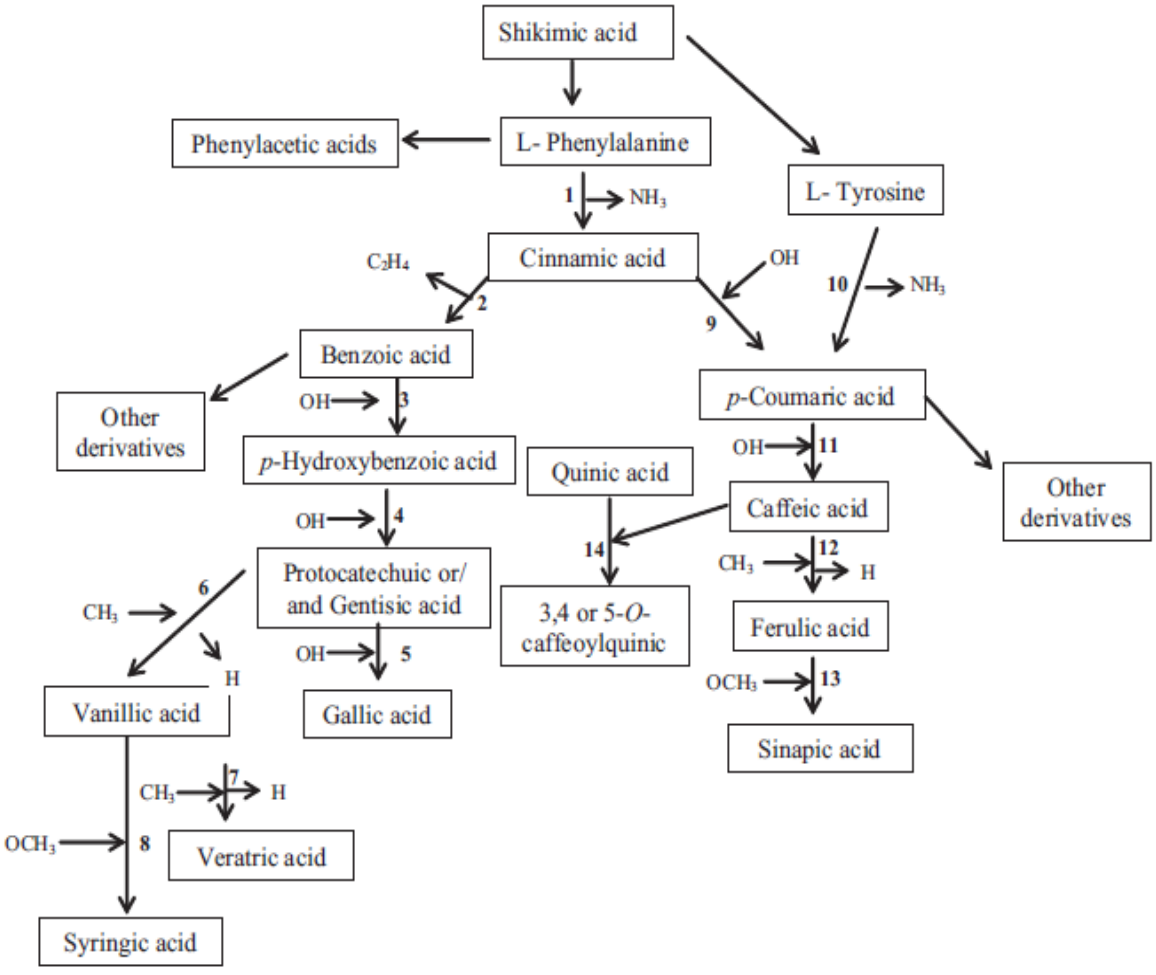
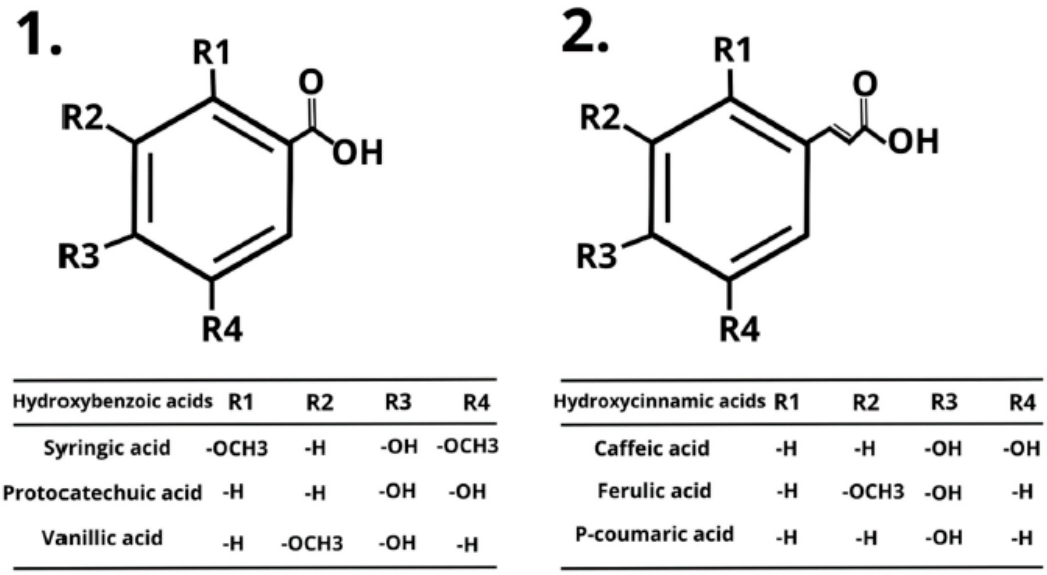


Figura 5: Representación general de la biosíntesis de ácidos fenólicos derivada de la vía del ácido shikímico.
Fuente: Heleno et al., 2015.

.

Los ácidos fenólicos se dividen en dos grupos principales, los cuales son: ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos, los cuales se derivan de moléculas no fenólicas de ácido benzoico y ácido cinámico (Figura 6), respectivamente. Se producen para la protección contra la luz ultravioleta, los insectos, los virus y las bacterias. Asimismo, ciertas especies vegetales generan compuestos fenólicos para inhibir el crecimiento de otros competidores vegetales, actividad conocida como alelopatía. Algunos ácidos fenólicos con actividad alelopática son el ácido cafeico y el ácido ferúlico (Heleno et al., 2015).



Hydroxybenzoic acids	R1	R2	R3	R4
Syringic acid	-OCH3	-H	-OH	-OCH3
Protocatechuic acid	-H	-H	-OH	-OH
Vanillic acid	-H	-OCH3	-OH	-H

Hydroxycinnamic acids	R1	R2	R3	R4
Caffeic acid	-H	-H	-OH	-OH
Ferulic acid	-H	-OCH3	-OH	-H
P-coumaric acid	-H	-H	-OH	-H

Figura 6: Estructura general de los ácidos hidroxibenzoicos (1) y de los ácidos hidroxicinámicos (2), con algunos representantes.

Fuente: Bartel et al., 2023.

2.3.2 Ácido siríngico

El ácido siríngico pertenece al grupo de los ácidos hidroxibenzoicos. Está presente naturalmente en varias plantas, alimentos de origen vegetal (las acelgas, las aceitunas, las nueces, los dátiles, las especias, la calabaza, entre muchos otros), vino tinto, el vinagre y forma parte de la lignina, un componente de la pared celular vegetal (Bartel et al., 2023; Mishra et al., 2017; Srinivasulu et al., 2018).

Este ácido es conocido por sus propiedades antioxidantes y es uno de los varios ácidos fenólicos con la capacidad de neutralizar los radicales libres, contribuyendo así a la protección celular contra el daño oxidativo. Presenta una estructura química compuesta por un anillo de benceno que contiene dos grupos metoxil (-OCH3), un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo carboxilo (-COOH) (Figura 7), Estas estructuras le permiten interactuar de manera efectiva con los radicales libres, neutralizando y evitando su acción dañina (Bartel et al., 2023; Heleno et al., 2015; Karamać et al., 2005; Mishra et al., 2017; Robbins, 2003; Srinivasulu et al., 2018).

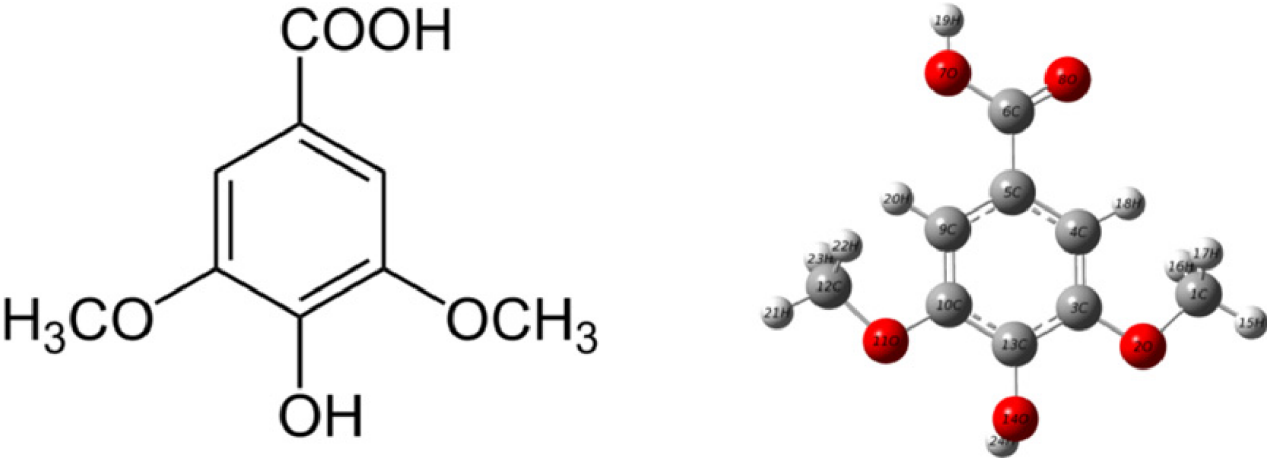


Figura 7: Estructura química (2D y 3D) del ácido siríngico.
Fuente: Srinivasulu et al., 2018.

El ácido siríngico es soluble en alcoholes (metanol y etanol) y éteres como el etílico. A su vez, presenta una solubilidad relativamente baja en agua y presenta una masa Molar: 198.17 g/mol (Srinivasulu et al., 2018; Zhou et al., 2012).

El ácido siríngico ha presentado varias propiedades biológicas importantes. Se ha demostrado que posee actividades antioxidantes, antibacterianas y hepatoprotectoras. Es capaz de actuar como inmunomoduladores en ratones con lesión hepática inducida por concanavalina A (ConA) y muestran efectos protectores en ratones con lesión hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCl4). Ambos compuestos tienen la capacidad de suprimir significativamente la fibrogénesis hepática y el estrés oxidativo inducido por CCl4. Además, cuenta con la capacidad de absorberse rápidamente en la sangre cuando se administran vía oral y mantener la viabilidad de los hepatocitos (Itoh et al., 2010).

De acuerdo con el reporte de Usha Rani (2014), la administración oral de ácido siríngico (50 µg por cada 10 cm² de hoja) en larvas de 3er instar de *Achaea janata* y *S. litura* causaron una disminución en su peso corporal. Además de que el desarrollo de la pupa se prolongó debido a la ingesta de otros fenoles en el estado larvario (ácido cumárico, ácido cinámico y ácido vainílico).
Se presentó actividad de la enzima β-glucosidasa alta en los extractos larvales tratados con ácido siríngico (Figura 8), la cual es crucial para la degradación de fenoles en el intestino de las larvas, indicando una respuesta desintoxicante a la presencia de ácido siríngico, esa investigación demostró que el ácido siríngico presenta propiedades antialimentarías y afecta el desarrollo de estos herbívoros (Movva & Pathipati, 2017).

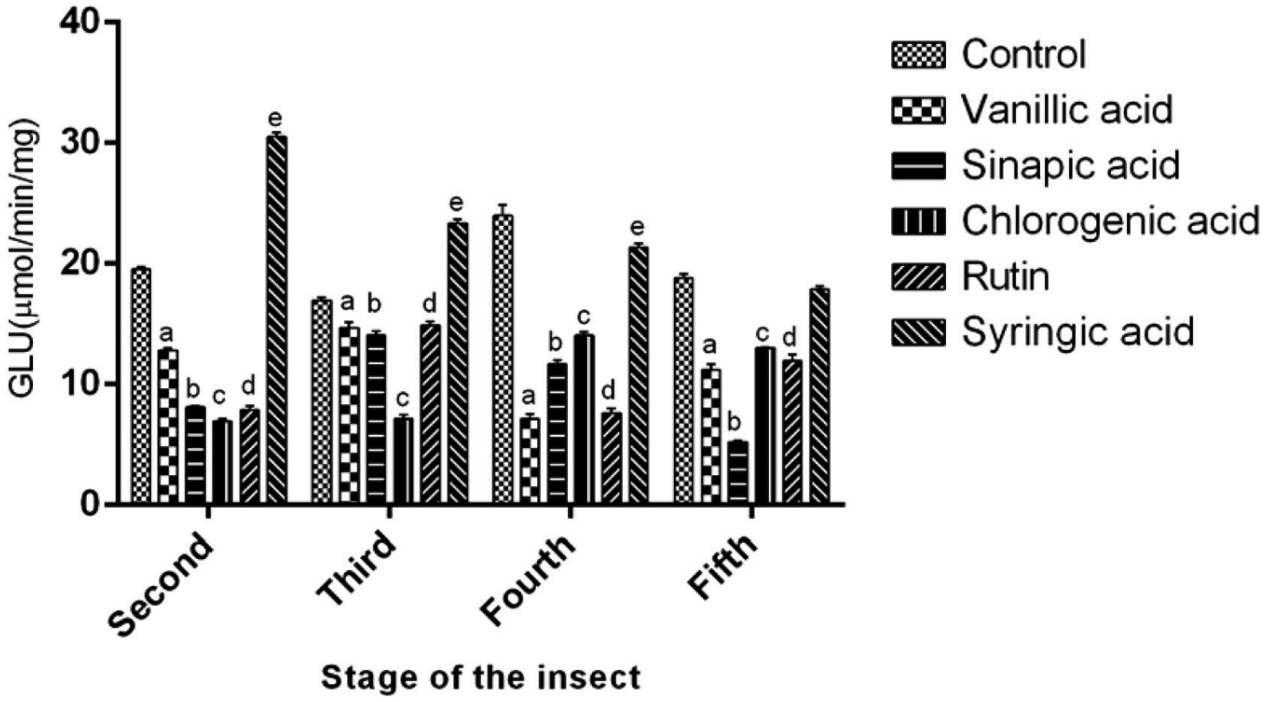


Figura 8: Actividad de β-Glucosidasa en el contenido intestinal de los estadios larvales indicados de larvas de *S. litura* expuestas a dietas naturales tratadas con ácidos fenólicos.

Las barras indican la actividad media de GLU ± EE, n = 20 réplicas. Las barras con letras minúsculas son significativamente diferentes con un valor de $P \leq 0.001$ dentro de un mismo estadio.

Fuente Movva & Pathipati, (2017).

Movva y colaboradores (2017), reportaron que el ácido siríngico inducido en plantas de *Capsicum annuum* (chile), utilizadas para alimentar larvas de *S. litura*, incrementó la actividad de la glutatina S-transferasa (GSH) y la actividad carboxilesterasa, ambas enzimas importantes en el metabolismo

y la detoxificación, concluyendo que el ácido siríngico induce un aumento de la actividad enzimática en todos los estadios larvarios analizados. Esto indica que el ácido siríngico presenta una naturaleza tóxica para los insectos lepidópteros.

2.3.3 Interacción de compuestos fenólicos con proteínas

Se ha registrado que algunos compuestos proteicos con efectos insecticidas pueden interactuar con compuestos no proteicos, como es el caso de los metabolitos secundarios producidos por plantas.

En un estudio realizado en 1991 mostró una interacción sinérgica entre delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BTk) y el ácido clorogénico, que aumenta la toxicidad de BTk hacia larvas de *Heliothis zea*. Esta sinergia ocurre porque el ácido clorogénico, en presencia de la polifenol oxidasa (PPO), se oxida formando ortoquinonas que provocan la alquilación de las delta-endotoxinas de BTk. Estas modificaciones hacen que las proteínas sean más solubles y susceptibles a la proteólisis en el tracto digestivo de las larvas, lo que facilita la liberación de fragmentos tóxicos (Ludlum et al., 1991).

En 1992 se exploró la interacción de los compuestos fenólicos resorcinol y ácido gálico con la δ-endotoxina de *Bacillus thuringiensis var. galleriae* (Bt) contra las larvas de *Heliothis armigera*. Donde se determinó que producen una interacción sinérgica al aumentar significativamente la toxicidad de la toxina, reduciendo la cantidad de alimento que consumían las larvas y su ganancia de peso. Además, la mortalidad larval fue mucho mayor en presencia de estos ácidos, lo que resultó en un menor valor de DL_{50} (Sivamani et al., 1992).

La interacción entre ésteres de ácidos hidroxicinámicos (ácido cafeico hexadecílico, ácido cumárico hexadecílico, ácido cumárico octadecílico y ácido 5-O-cafeoilquínico) y la proteína Cry7Aa1 procedente de *B. thuringiensis* (Bt) mostraron un efecto aditivo en la mortalidad en larvas de *Cylas puncticollis* y *Cylas brunneus* (Anyanga et al., 2021).

Isayama y colaboradores en 2021 analizaron los efectos del ácido tánico en conjunto con la actividad insecticida de *B. thuringiensis* (Bt), específicamente de la toxina Cry1C, sobre larvas *S. litura*. El ácido tánico redujo la efectividad de la toxina de Bt al inducir la agregación de las proteínas insecticidas, lo que disminuyó su capacidad para unirse a las membranas intestinales de las larvas, a su vez también redujo el crecimiento de las bacterias Bt, lo que lleva a una interacción antagónica entre ambas sustancias (Isayama et al., 2021).

2.4 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), comúnmente conocido como "gusano cogollero" es un insecto plaga que causa daño en el cogollo del maíz y en que en caso de que el alimento escasee, las larvas se desplazan a otros cultivos en masa (similar a un "regimiento") (Casmuz et al., 2010). Su clasificación taxonómica se observa en la Tabla 1.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *S. frugiperda.*

Clasificación taxonómica	
Phylum:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Lepidoptera
Familia:	Noctuidae
Género:	*Spodoptera*
Especie:	*Spodoptera frugiperda*

Fuente: tabla recuperada de Martínez, 2019.

Es una plaga que presenta hábitos alimenticios polífagos y voraces, causa daños severos si no se controla oportunamente debido a su plasticidad genética, alta tasa de fecundación, buena capacidad de vuelo y alta capacidad de esta especie para desarrollar resistencia a varios componentes químicos. Debido a la intensa presión para erradicar esta plaga hacen que el gusano cogollero presente resistencia hacia las principales clases de insecticidas como: Organofosforados, carbamatos, piretroides e incluso cultivos genéticamente modificados que expresan toxinas de *Bacillus thuringiensis* (del Rincón Castro et al., 2006; Gutiérrez-Moreno et al., 2019; Lezaun, 2014; Tossou et al., 2025; Tsai et al., 2020).

Debido al tipo de comportamiento que presentan en campo y su impacto se considera una de las plagas constantes que pueden causar grandes daños económicos anualmente debido a que está presente durante todo el ciclo de los cultivos. Existen 353 registros de plantas hospedantes larvarias de *S. frugiperda* pertenecientes a 76 familias de plantas registradas en América, principalmente Poaceae, Asteraceae y Fabaceae (Montezano et al., 2018; Sun et al., 2025b). Afecta cultivos esenciales que sirven como principales hospedantes para *S. frugiperda* entre los que se encuentran:

maíz, sorgo, cacahuate, caña de azúcar, arroz, frijol, algodón, soya, chile, cebolla, alfalfa, tomate, lino, papa y zacate grama (Casmuz et al., 2010).

Esta plaga puede ocasionar una reducción en la producción de los cultivos, pudiendo llegar desde un 20% hasta una pérdida total del cultivo, si ataca en periodos cercanos a la floración de este (del Rincón Castro et al., 2006; Lezaun, 2014; Tejeda-Reyes et al., 2023). Hay reportes sobre el impacto económico que presenta esta plaga para la agricultura; en Brasil se registró una pérdida económica de aproximadamente 600 millones de dólares en 2009 para controlar la plaga de *S. frugiperda* (Overton et al., 2021); se estima que las pérdidas económicas causadas por la infección incontrolada de *S. frugiperda* alcanzan hasta 9.4 mil millones de dólares anuales en la agricultura para África (Tossou et al., 2025). Kartakis y colaboradores (2025) estiman pérdidas anuales superiores a 900 millones de USD por afectaciones de *S. frugiperda* en cultivos de maíz en Europa. Se detectó el gusano cogollero por primera vez en la India durante el 2018, posteriormente se ha extendido a numerosos países, incluidos Bangladesh, Bután, Camboya, India, Indonesia entre otros países de Asia, por lo que se estiman pérdidas económicas significativas, con un costo anual de $ 10.2 mil millones en Asia (Kafle & Joshi, 2025). En china al ser una plaga relativamente nueva vista por primera vez en 2019 se estima una pérdida de más de 100 millones de USD en su agricultura (Wu et al., 2021).

2.4.1 Ciclo biológico de *S. frugiperda*

Las hembras de *S. frugiperda* ponen alrededor de 1000 huevos a lo largo de su vida, agrupados en masas que van desde los 100 a 150 por puesta (Figura 9). Los huevos son cubiertos con hilos de seda y escamas de una coloración grisácea, que secreta la hembra; a su vez se presentan forma esférica, son blanquecinos, estriados y presentan un diámetro de 0,5 mm (2-3 días de incubación). En los cultivos como el maíz, los huevos son colocados sobre las hojas, en la parte media de la planta, preferentemente en el envés o en la zona basal de las mismas (Casmuz et al., 2010; Lezaun, 2014, Martínez, 2019). El período larval dura un lapso de 2 a 6 semanas, pasando generalmente por seis estadios en un entorno de 10 °C. Cuando emergen las larvas, se alimentan del corion de los huevos, los primeros tres instares viven en forma agrupada en la parte baja de las plantas o refugiadas entre las hojas, de manera posterior, cuando la planta hospedera no es de su agrado, migran a través de un hilo de seda en busca de nuevo alimento, volviéndose solitarias y de hábitos caníbales. Se ha observado que los primeros instares se alimentan durante el día, mientras que los

últimos dos instares son más activos durante la noche. Al llegar al último instar estos consumen una mayor cantidad de alimento en comparación con los primeros tres instares anteriores, siendo el 85% de consumo alimenticio de la larva durante todo su ciclo de vida, eventualmente dejan de alimentarse para pasar al estado de pupa, donde se entierra en el suelo (10-15 días) para posteriormente emerger como adultos (Casmuz et al., 2010, Martínez, 2019).

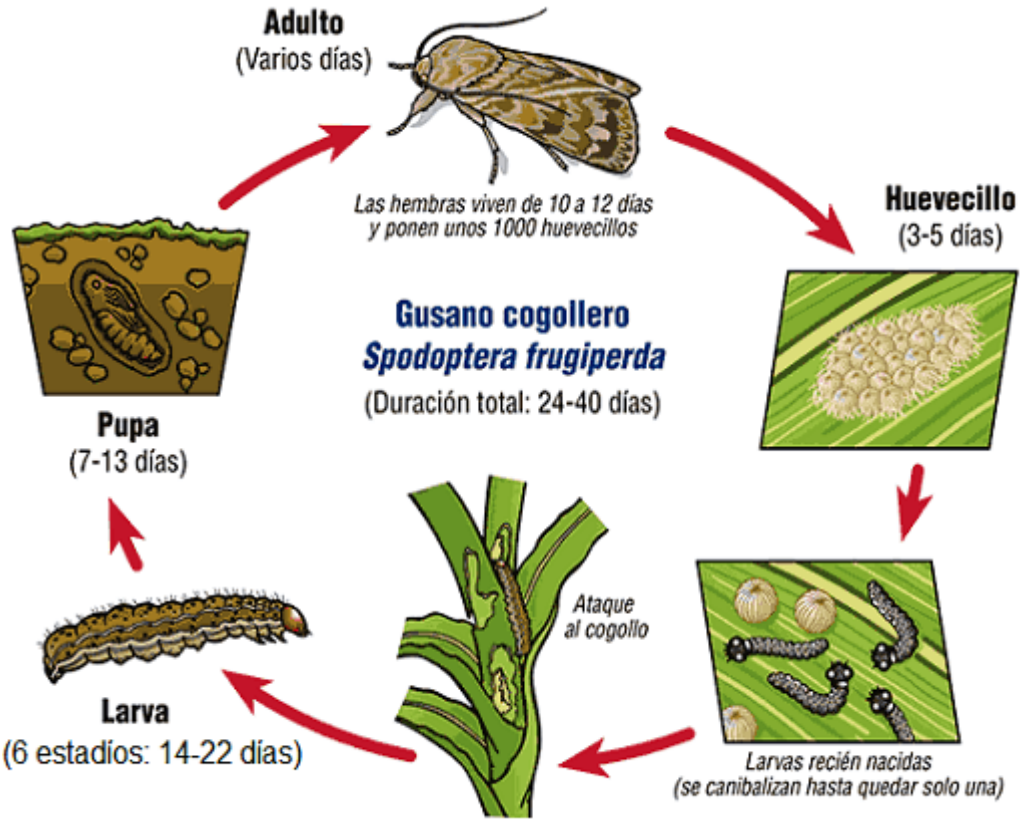


Figura 9: Ciclo biológico de *S. frugiperda.*

Fuente: Lezaun, 2014.

La especie *S. frugiperda* es nativa del continente americano y se distribuye principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, desde el sur de Canadá hasta Chile y Argentina añadiendo también todas las islas del Caribe. Tiene presencia en todos los estados de la República Mexicana. A partir del 2016 su distribución se expandió a otras regiones del mundo como África, el sur y este de Asia, la península de Indochina y China (Figura 10) (Casmuz et al., 2010; Tsai et al., 2020).

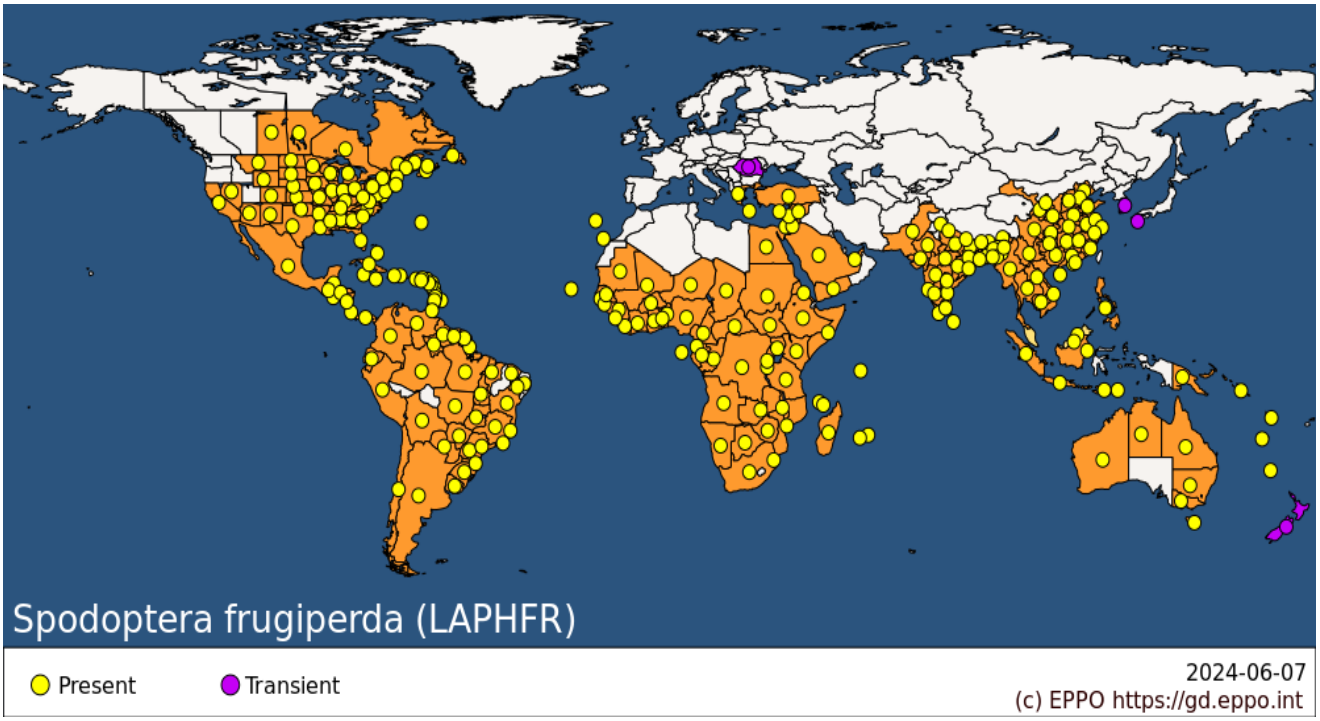


Figura 10: Distribución del gusano cogollero *S. frugiperda*.

Recuperado de EPPO 2024. Puntos amarillos: Presente, puntos morados: en transición.

2.5 *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

La polilla mayor de la cera *G. mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae), es un insecto holometábolo que atraviesa cuatro etapas durante su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. *G. mellonella* es un insecto plaga de las colonias de abejas. Sus larvas, con cuerpo segmentado y adaptado para la masticación, constituyen la fase más activa y dañina, desarrollándose en un periodo aproximado de 45 días dependiendo de las condiciones ambientales. Posteriormente pasan a la etapa de pupa, que puede durar de 8 a 50 días según la temperatura y humedad. Los adultos presentan piezas bucales atrofiadas, por lo que no se alimentan y su vida es corta, de 7 a 30 días, enfocada en la reproducción (Figura 11) (Burd et al., 2025; Kumar & Khan, 2018).

Esta especie es un parásito de panal de abejas, especialmente de *Apis mellifera* y *Apis cerana*, donde sus larvas consumen la cera, miel y polen almacenados (Kwadha et al., 2017). Su presencia en colmenas y en la cera almacenada genera un daño conocido como galleriosis, lo que la convierte en una plaga apícola de relevancia. Desde un punto de vista económico, *G. mellonella* tiene una gran importancia. Representa un problema para la apicultura al destruir panales y afectar la

producción de miel y cera (Wojda et al., 2020). Por otro lado, sus larvas se han vuelto valiosas en la investigación científica como modelo experimental en estudios de patogenicidad y virulencia, inmunidad, microbiología y toxicidad. La cría de *G. mellonella* se puede reproducir fácilmente en laboratorio, tiene ciclos cortos y tolera temperaturas similares a las del cuerpo humano, lo que permite evaluar la virulencia de patógenos y la eficacia de nuevos antimicrobianos. Además, se ha demostrado que poseen una notable capacidad para degradar polietileno, lo cual tiene implicaciones ecológicas al ofrecer una vía para enfrentar la contaminación por plásticos (Boschi et al., 2024; Wojda et al., 2020).

En cuanto a su distribución, *G. mellonella* es una especie cosmopolita, se encuentra en casi todos los continentes, con excepción de la Antártida, y su presencia está estrechamente ligada a la actividad apícola y a los lugares donde se almacenan productos de la colmena. Se ha registrado en más de 70 países de África, Asia, Europa, América y Oceanía, con una expansión favorecida por el comercio y el cambio climático (Kwadha et al., 2017; Wojda et al., 2020).

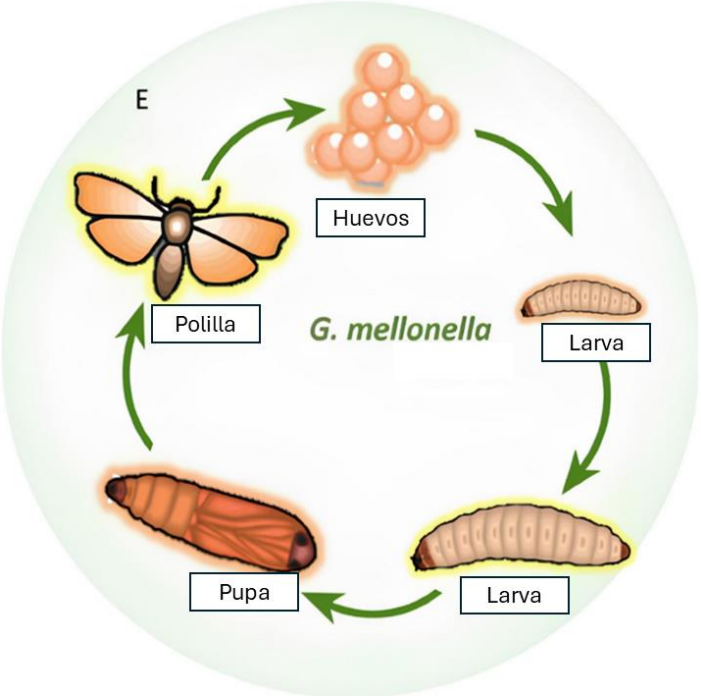


Figura 11: Representación esquemática del ciclo de vida de *G. mellonella.*

Fuente: Modificado de Burd et al., 2025.

2.6 Antecedentes

En el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (LEE, UAEM) se aisló a la bacteria *P. aeruginosa* NA04 y *Photorhabdus luminescens* HIM3 a partir del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis indica* MOR03, recolectado en suelo cultivado con caña de azúcar en Morelos, México. La cepa de *P. aeruginosa* NA04 fue secuenciada y el análisis del genoma reveló que contiene genes relacionados con la virulencia, entre ellos destacan los que codifican para Exotoxina A. Se evaluó el potencial insecticida de *P. aeruginosa* NA04 y *P. luminescens* HIM3, mediante la administración de diferentes dosis de UFC en larvas de *G. mellonella* y *Diatraea magnifactella*. No se presentó mortalidad en larvas de *D. magnifactella* a las 24 h con 3,000 y 10,000 UFC, mientras que a las 36 h se observó una mortalidad del 100% en larvas infectadas por *Photorhabdus luminescens*, y con *P. aeruginosa* apenas alcanzó el 10% de mortalidad (Figura 12). En el caso de las larvas de *G. mellonella,* con 25 a 400 UFC de *P. aeruginosa*, se alcanzó una mortalidad cercana al 100% con todas las concentraciones a las 24 h (Figura 13). La virulencia de NA04 esta relacionada con la especificidad de sus toxinas, mecanismos de acción y susceptibilidad de los insectos (Salgado-Morales et al., 2019).

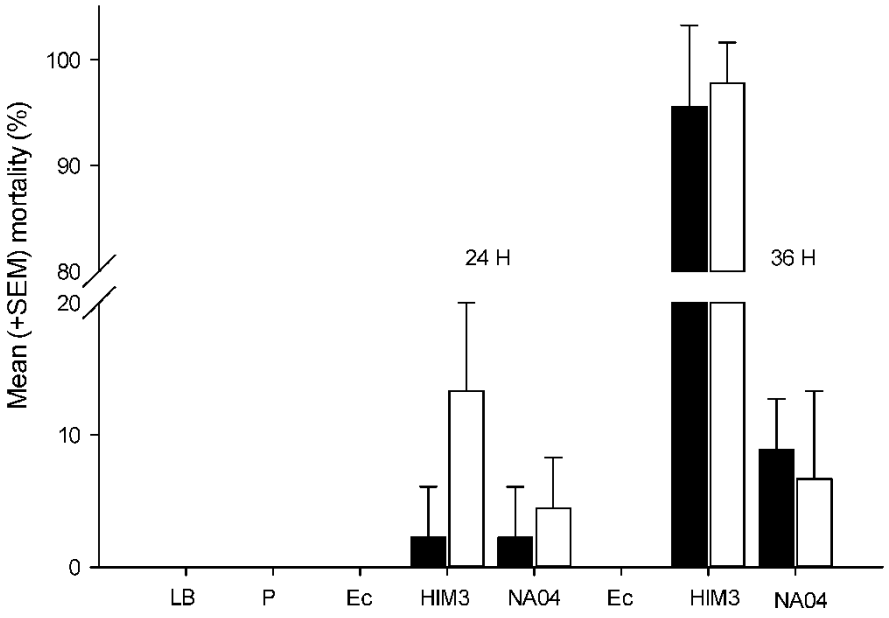


Figura 12: Mortalidad media en *D. magnifactella*.

Mortalidad media (± SEM) de *D. magnifactella* a las 24 y 36 h después de la inoculación con HIM3 y NA04 a las 3000 (barras vacías) y 10.000 UFC (barras sólidas), respectivamente. Las barras de error son el SEM. LB = caldo de Luria-Bertani, P = punción, Ec =*Escherichia coli* (3000 y 10,000 UFC) HIM3 = *P. luminescens* HIM3, NA04 = *P. aeruginosa* NA04 (Tomado de Salgado-Morales et al., 2019).

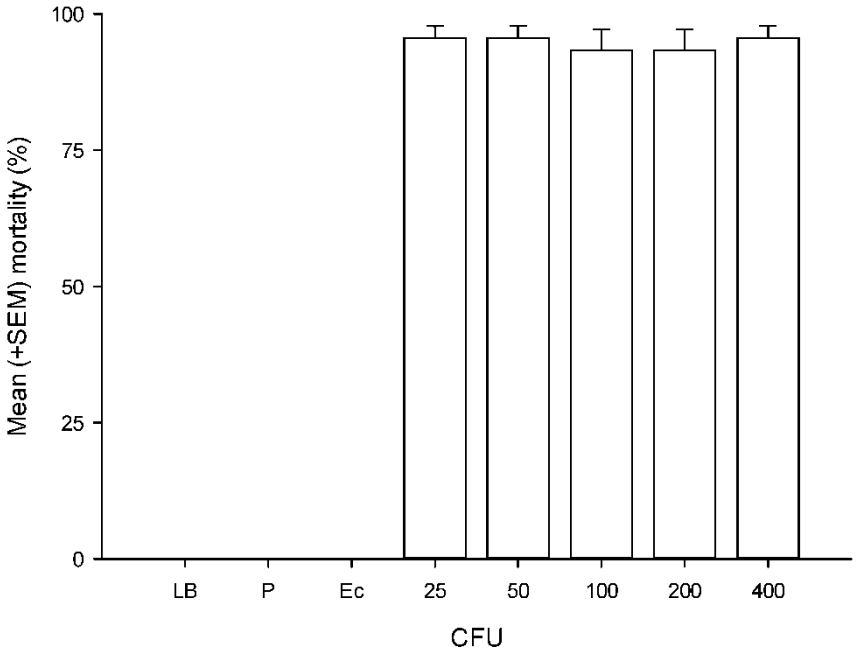


Figura 13: Mortalidad en *G. mellonella.*

Mortalidad media (± SEM) de *G. mellonella* después de la inoculación con *P. aeruginosa* NA04. LB = caldo de Luria-Bertani, P = punción, Ec = *E. coli* DH5α (25, 50, 100, 200 y 400 UFC) (Tomado de Salgado-Morales et al., 2019).

En otra investigación posterior del LEE se evaluó la actividad insecticida del sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04 en larvas de *G. mellonella* utilizando diferentes diluciones; 7:10, 1:2, 3:10 y 1:10. En la dilución 1:10 no se mostró mortalidad a las 24 h, mientras que para las diluciones de 7:10, 1:2 y 3:10, los porcentajes de mortalidad fueron superiores al 80%, 50% y 10% respectivamente a las 24 h (Figura 14), se mostró que la actividad insecticida se debía mayormente a componentes proteicos, debido a que la toxicidad disminuyó drásticamente al tratar las fracciones sometidas a 100 °C. Se realizaron experimentos para analizar la capacidad aditiva o sinérgica entre las proteínas secretadas por *P. aeruginosa* NA04 y la proteína GroEL de bacterias asociadas a nemátodos entomopatógenos, utilizando GroEL de *A. faecalis* y *X. nematophila*, a dosis de 200 ng y 100 ng respectivamente. La administración inyectada de 200 ng de GroEL de *A. faecalis* provoco un 20% de mortalidad, mientras que la administración de 100 ng de GroEL de *X. nematophila* un 40% mortalidad a las 48 h. Al administrar la combinación del sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04 (3:10) con GroEL de *A. faecalis* se registró un 70% de mortalidad, mientras que la combinación del sobrenadante *P. aeruginosa* NA04 (3:10) con GroEL de *X. nematophila* causo un 90% de mortalidad a las 48 h (Figura 15). Mediante un análisis bioinformático se detectaron diversas

proteínas de *P. aeruginosa* NA04 que pueden ser secretadas al medio extracelular con potencial de presentar toxicidad, debido a que son considerados factores de virulencia, como: la Exotoxina A, Proteasa IV y Fosfolipasa C, por lo que se sugirió que alguna de estas proteínas del sobrenadante de P. aeruginosa NA04 provoca un efecto sinérgico o aditivo desencadenado un aumento en la actividad tóxica sobre los insectos utilizados (Bahena-Sanches, 2023).

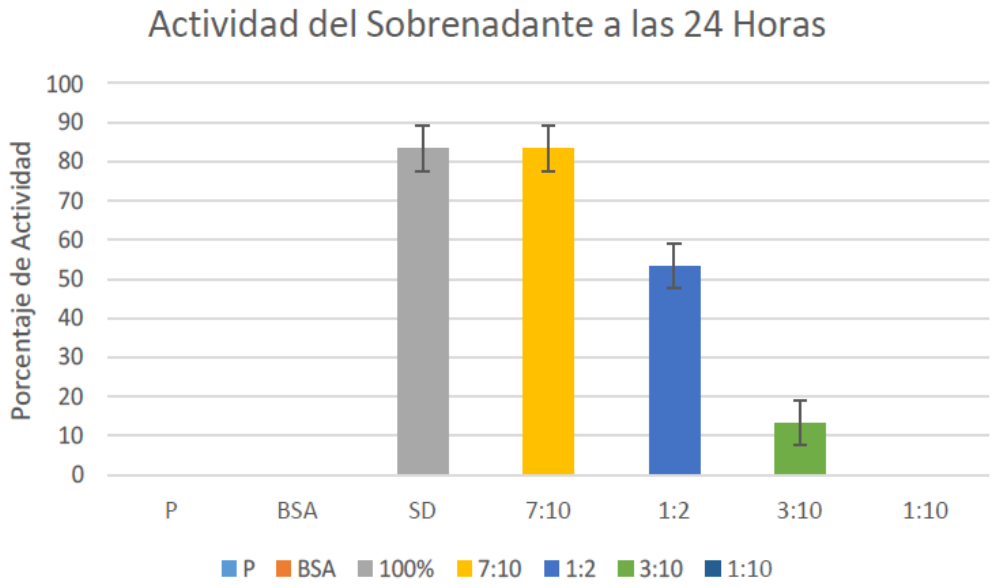


Figura 14: Actividad del sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04 en *G. mellonella*.

P: Pinchazo, BSA: Inyección de 1 mg de BSA, SD: Inyección del sobrenadante sin diluir, 7:10 – 1:10: Inyección de diluciones del sobrenadante denotado como a: b, a partes del volumen del sobrenadante respecto al volumen total b (Tomado de Bahena Sanches, 2023).

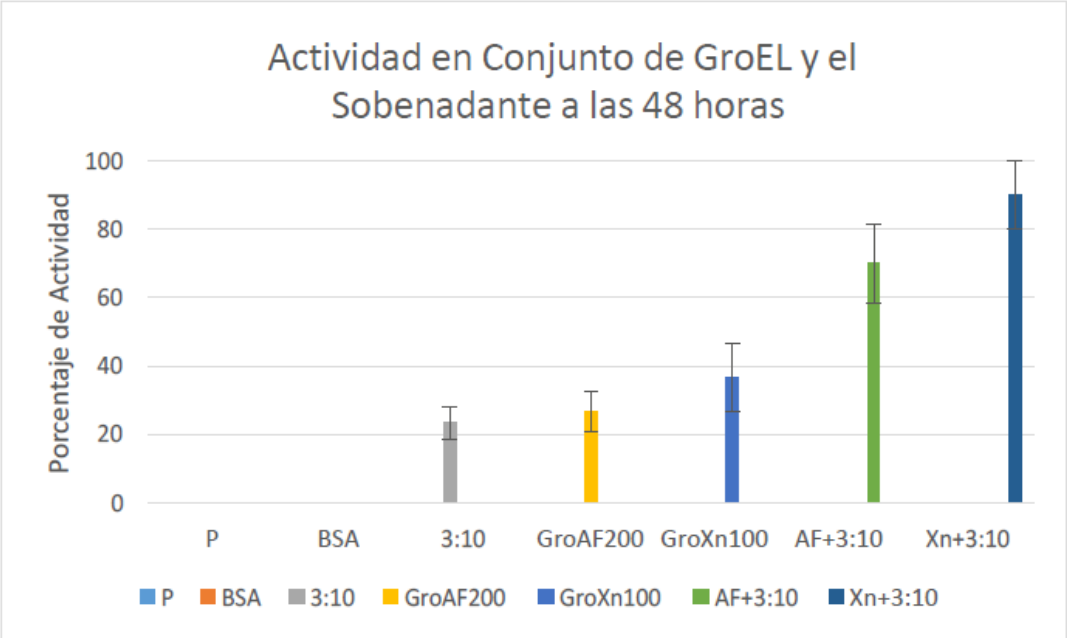


Figura 15: Actividad del sobrenadante en conjunto con GroEL proveniente de *A. faecalis y Xenorhabdus nematophila* SC 0516 a las 48 h en *G. mellonella.*

P: Pinchazo, BSA: Inyección de 1 mg de BSA, 3:10: Inyección de la dilución 3:10 del sobrenadante de *P. aeruginosa* NA04, GroAF200: Inyección de 200 ng de GroEL de *Alcaligenes faecalis*, GroXn100: Inyección de 100 ng de GroEL de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516, AF+3:10: Inyección de GroEL de *A. faecalis* y la dilución 3:10 del sobrenadante, Xn+3:10: Inyección de la dilución 3:10 del sobrenadante más GroEL de *Xenorhabdus nematophila* SC 0516 (Tomado de Bahena Sanches, 2023).

En otro estudio realizado en el LEE se evaluó la actividad insecticida de la Exotoxina A procedente de la cepa de *P. aeruginosa* NA04, obteniendo la toxina purificada. Se confirmó como un factor de virulencia con actividad entomopatógena en larvas de *G. mellonella*. Se utilizaron seis concentraciones de la Exotoxina A (600, 300, 150, 100, 75, 50, 37.5 ng de proteína purificada) para administrar mediante inyección en las larvas, determinando una DL_{50} de 101.608 ng por larva a las 72 h después de la inyección. La Exotoxina A se confirmó como una toxina letal y dosis dependiente. Además, se observaron cambios fenotípicos en las larvas, como oscurecimiento progresivo y pérdida de movilidad, hasta llegar a una desintegración tisular visible, evidenciando que la Exotoxina A tiene un papel central en la mortalidad de insectos, y que su acción, aunque más lenta que la del sobrenadante bacteriano, resulta altamente efectiva para inducir la muerte del hospedero (Ramírez-Segura, 2023).

También se evaluó en el LEE la capacidad de la proteína GroEL para interactuar con otra sustancia tóxica de origen proteico, siendo la Exotoxina A (Figura 16). Evaluando el tipo de actividad con la proteína GroELXn y GroELAf de manera individual en larvas de *G. mellonella*, demostrando un aumento drástico en su capacidad insecticida y determinando que las proteínas GroEL en conjunto con la Exotoxina A son capaces de cooperar de manera sinérgica aumentando su actividad insecticida (Rivera-Ramírez et al., 2023).

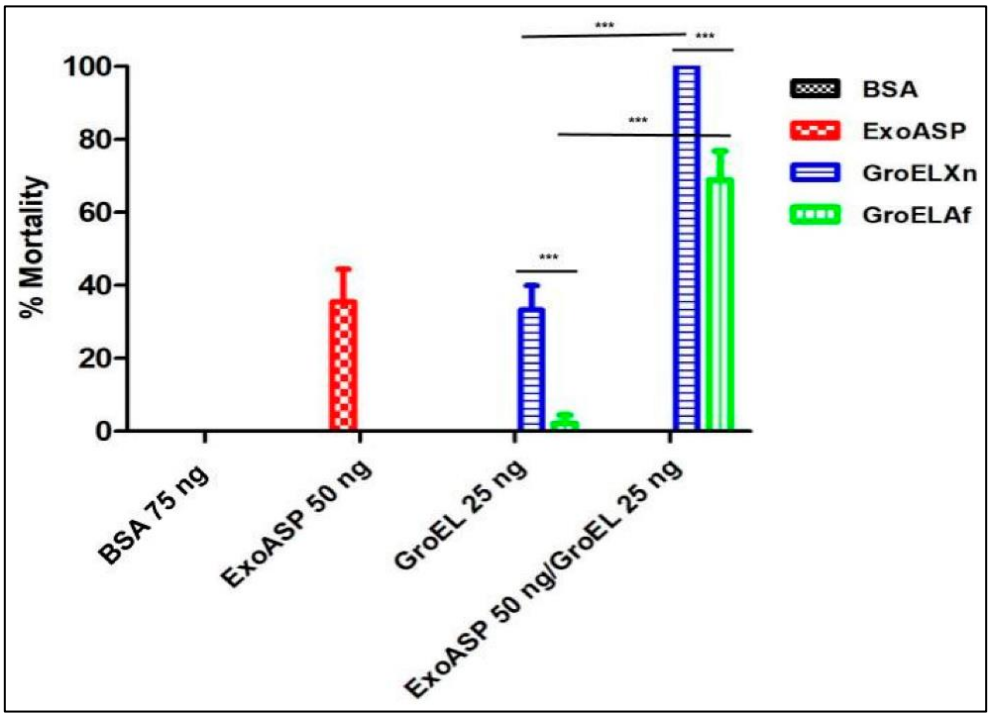


Figura 16: Análisis de la actividad sinérgica de las proteínas GroEL y la Exotoxina A.

Porcentaje de mortalidad de las proteínas GroEL (25 ng/larva) frente a *G. mellonella* en presencia de la proteína A (ExoA 50 ng/larva). Se utilizó suero fetal bovino (BSA 75 ng/larvas) como control. Los datos con desviaciones estándar representan las medias de tres tratamientos utilizando 15 larvas por tratamiento en cada repetición. Los valores de $p < 0,05$ indicaron diferencias estadísticamente significativas: ***.

(Tomado de Rivera-Ramírez *et al*., 2023).

Estos antecedentes son de gran importancia debido a que en este trabajo se utilizará la Exotoxina A que proviene de la cepa de *P. aeruginosa* NA04 debido a su alta actividad insecticida reportada previamente, así como por la importancia en la capacidad que puede presentar la Exotoxina A para interactuar de manera cooperativa con otras sustancias, como es en el caso previamente reportado con a la proteína GroEL.

3 JUSTIFICACIÓN

El gusano cogollero del maíz (*S. frugiperda*), es una plaga devastadora para cultivos como el maíz, sorgo y algodón. Es considerada una plaga de importancia económica por lo que su manejo es crucial para la seguridad alimentaria y la agricultura sostenible. La Exotoxina A es producida por el 90% de las cepas de *P. aeruginosa*, además es uno de sus factores de virulencia de gran importancia, más allá de su papel en la toxicidad en larvas de *G. mellonella,* investigaciones sugieren que la Exotoxina A de *P. aeruginosa* puede interactuar con otros compuestos de origen proteico, particularmente con la proteína GroEL. Sin embargo, se desconoce si la Exotoxina A de *P. aeruginosa* presenta la capacidad para cooperar con otras moléculas de naturaleza no proteica. Por lo tanto, resulta interesante evaluar su capacidad cooperativa con moléculas de origen no proteico como los metabolitos secundarios procedentes de plantas, denominados compuestos fenólicos. Entre ellos, se encuentra el ácido siríngico que muestra cierto potencial insecticida, esperando que la interacción entre ambas moléculas genere un efecto cooperativo, abriendo paso a nuevas estrategias para el manejo integrado de este insecto plaga.

4 HIPÓTESIS

La Exotoxina A que proviene de la cepa de *P. aeruginosa* NA04 con actividad insecticida en combinación con moléculas no proteicas como el ácido siríngico presentará un efecto cooperativo en larvas de *G. mellonella* y *S. frugiperda.*

5 OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la actividad cooperativa de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 en combinación con el ácido siríngico en larvas de *G. mellonella* y *S. frugiperda.*

Objetivos específicos:

Determinar la DL_{50} de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 en *S. frugiperda*.

Determinar la DL_{50} del ácido siríngico en *S. frugiperda*.

Evaluar la actividad conjunta del ácido siríngico y la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 en *G. mellonella.*

Evaluar la actividad conjunta del ácido siríngico y la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 en *S. frugiperda.*

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

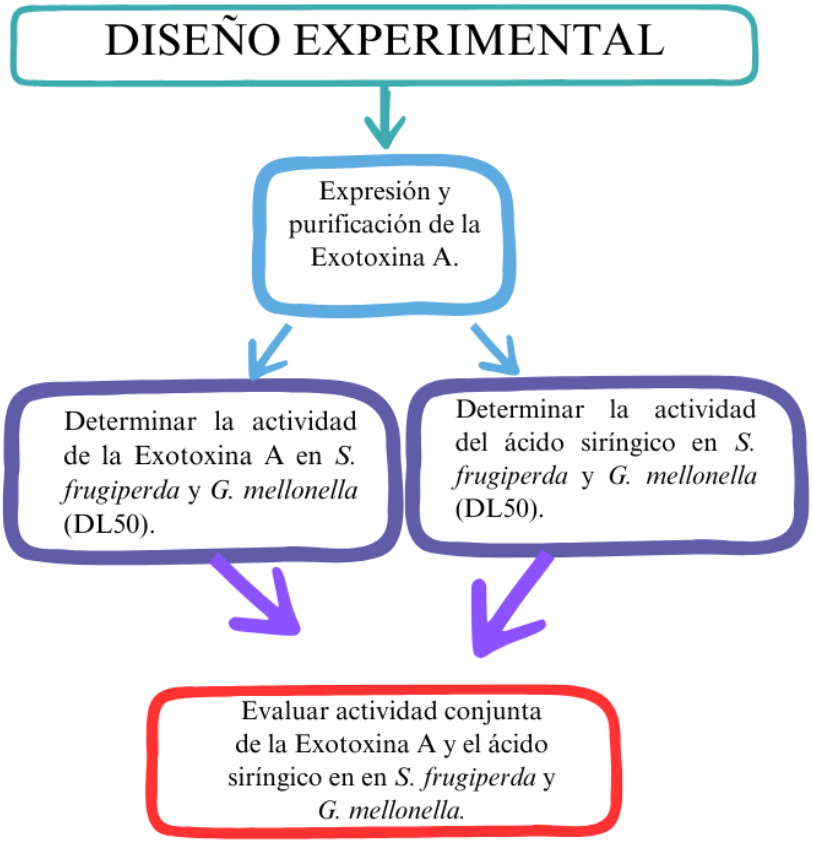


Figura 17: Mapa representativo de la estrategia experimental.

7 METODOLOGÍA:

7.1 Expresión heteróloga de la Exotoxina A

La expresión heteróloga de la Exotoxina A se realizó en células de *E. coli* BL-21 transformadas con el plásmido pET-28a/exoA (Rivera-Ramírez, 2022). Se preparó un preinóculo de la cepa *E. coli* BL-21 pET-28a/exoA en un matraz de 150 ml que contenía 30 ml de medio LB adicionado con kanamicina a una concentración de 30 µg/ml, incubado a 37 °C y 200 rpm durante toda la noche. A partir del preinóculo, se realizó una inoculación 1/100 en 300 ml de medio LB contenido en un matraz de 1L, adicionado con 30 µg/ml kanamicina e incubado a 37 °C con 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO600) =0.6, esta densidad celular se alcanza

aproximadamente a las 3 h después de la inoculación. La expresión de *exoA* se induce adicionando 1 ml de isopropil-ß-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 100 mM e incubando a 30 ºC con 200 rpm durante 4 h. Posteriormente la pastilla celular es recuperada por centrifugación a 4,000 rpm, durante 10 minutos a 4 ºC en tubos de 50 ml. Finalmente se descarta el sobrenadante y las células son almacenadas a -20°C, hasta continuar con el proceso de purificación.

7.2 Ruptura celular

Se realizó la ruptura celular a partir de una pastilla celular recuperada al tomar 150 ml del cultivo previamente inducido y se resuspendió en 6 ml de buffer Trizma 50 mM pH 8.5 con 8 M de urea, las células fueron homogeneizadas con un ultrasonicador, utilizando el siguiente programa: 5 pulsos de 40 segundos x 40 segundos de descanso, a una ampliación de 60% por 5 ciclos, el proceso se realizó manteniendo la muestra a 4º C. Posteriormente, el lisado resultante se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante manteniendo la muestra a 4º C. Posteriormente se añadieron 7 ml de Trizma 50 mM pH 8.5 al extracto total y se procedió a realizar la purificación en mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).

7.3 Purificación de la Exotoxina A por IMAC

Del extracto total se toman 50 µl para su uso posterior, aproximadamente 7 ml del extracto intracelular previamente centrifugado se pasó por una columna cromatográfica que contenía 10 ml de resina de afinidad con níquel-nitrilotriacético, el filtrado fue recuperado y se pasó nuevamente por la columna, este proceso se repitió 3 veces. Posteriormente, se tomó una muestra de 50 µl del filtrado denominado como no unido. Se realizó un lavado con 50 ml de Trizma 50 mM pH 8.5. Para despegar a las proteínas que se pegan de manera inespecífica en la resina se realizó un lavado con 50 ml de Trizma 50 mM pH 8.5 con 20 mM de imidazol. Posteriormente se añadieron 5ml de Trizma 50 mM pH 8.5 con 250 mM de imidazol para eluir, esto ocasiona el desplazamiento de las moléculas de la Exotoxina A que fueron unidas de manera específica permitiéndonos su recolección, la cual fue en fracciones de 1 ml. Posteriormente se añadió 5 ml de Trizma 50 mM con 500 mM de imidazol para desplazar a las proteínas que se unieron de manera específica más fuertemente, para finalmente se recolectó por fracciones de 1 ml.

7.4 Selección de fracciones enriquecidas

La fracciones enriquecidas con la Exotoxina A fueron seleccionadas, a través de la visualización en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10%. La electroforesis SDS-PAGE se realizó con 15 µl de cada una de las muestras + 5 µl de mezcla lítica (Tris, glicerol, SDS, azul de bromofenol y ß- mercaptoetanol), las muestras fueron hervidas a 96 °C por 5 minutos. El volumen total de cada muestra (20 µl), fue colocado en cada pozo y en el carril 1 un volumen de 3 µl de marcador de peso molecular (MPM) PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific. Se tiñe el gel con azul de Coomassie 30 min y se usa solución de desteñir 30 min. Posterior a la tinción, se seleccionan las fracciones con proteína más abundante y se procede a realizar una diálisis para retirar el imidazol.

7.5 Diálisis y cuantificación de proteína

Las membranas con microporos de 12-14 kDa se sumergieron en Trizma 10 mM, antes de ser utilizadas, posteriormente las fracciones seleccionadas son colocadas en las membranas y se colocan en un vaso de precipitado con 4 L de Trizma 10 mM con agitación a 200 rpm durante toda una noche, a 4 ºC, se realiza un recambio de buffer Trizma 10 mM, si es necesario. Posteriormente las muestras dializadas se transfieren a tubos de 15 ml para realizar la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford. La cuantificación se realizó usando 200 µl de reactivo de Bradford + 5 µl de Trizma 10 mM para el blanco y 5 µl de muestra con proteína, utilizando 6 réplicas para cada muestra. La cuantificación se estimó utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) de 0.03 a 1 mg y en caso de tener valores por debajo del rango, se utilizó una micro curva estándar de BSA en el rango de 2 a 30 ug, utilizando 20 µl reactivo de Bradford + 20 µl de Trizma 10 mM para el blanco sin proteína y 20 µl para la muestra. Después de adicionar el reactivo de Bradford las muestras fueron agitadas en un vórtex durante 5 segundos e incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posterior a la incubación la muestra es agitada y 2 µl de cada muestra es cuantificada en el nanodrop. Se corren geles de poliacrilamida utilizando 1, 2 y 3 µg de BSA como referencia para corroborar los datos.

7.6 Bioensayos de supervivencia.

La actividad insecticida de la Exotoxina A fue evaluada en larvas de 4to instar de *S. frugiperda* mediante la administración por inyección de un volumen final de 10 µl de cada tratamiento, que

fue inyectado directamente entre el primer y segundo par de propatas con ayuda de una jeringa de insulina de 31GX6mm. Con la finalidad de determinar la toxicidad fueron utilizados los siguientes tratamientos: 8 µg/larva de ácido siríngico, 50 ng/larva de la Exotoxina A y 150 ng/larva de la Exotoxina A, 50 ng/larva de la Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico y 150 ng/larva de la Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico y como control fue usado buffer Trizma 10 mM. El bioensayo se realizó utilizando 10 larvas por tratamiento, de *G. mellonella* y *S. frugiperda*, 60 larvas por bioensayo, las cuales fueron confinadas de manera individual en cajas Petri de 6 x 1.5 cm, sin dieta e incubadas a 30 ºC. La mortalidad fue registrada cada 24 h durante un periodo de 72 h. El bioensayo fue repetido tres veces.

8 RESULTADOS

8.1 Resultados de la expresión y purificación de la Exotoxina A

Se logró expresar la Exotoxina A en *E. coli* BL-21 pET-28a/exoA en 300 ml del medio de cultivo LB con 30 µg/ml kanamicina e incubado a 37 °C, posteriormente inducido mediante IPTG por 4 h para su sobreexpresión. Las células sobreexpresadas fueron sometidas a ultrasonicación y centrifugación permitiéndonos la obtención del extracto intracelular para su posterior purificación por IMAC siguiendo la metodología previamente descrita.

Mediante la IMAC se obtuvieron los diferentes extractos de la purificación procedente del lisado celular con la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 expresada en *E. coli* BL21 pET-28a/exoA los cuales fueron: extracto no unido, extracto con imidazol 20 mM, 5 fracciones con imidazol 250 mM y 5 fracciones con imidazol 500 mM. Las cuales fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10% para la selección de las fracciones enriquecidas con la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 (Figura 18), en donde se visualizó que las fracciones más enriquecidas con la Exotoxina A se encontraron a partir de la fracción 3 de 250 mM aumentando hasta la fracción 2 de 500 mM y empezando a descender en la fracción 4 y 5.

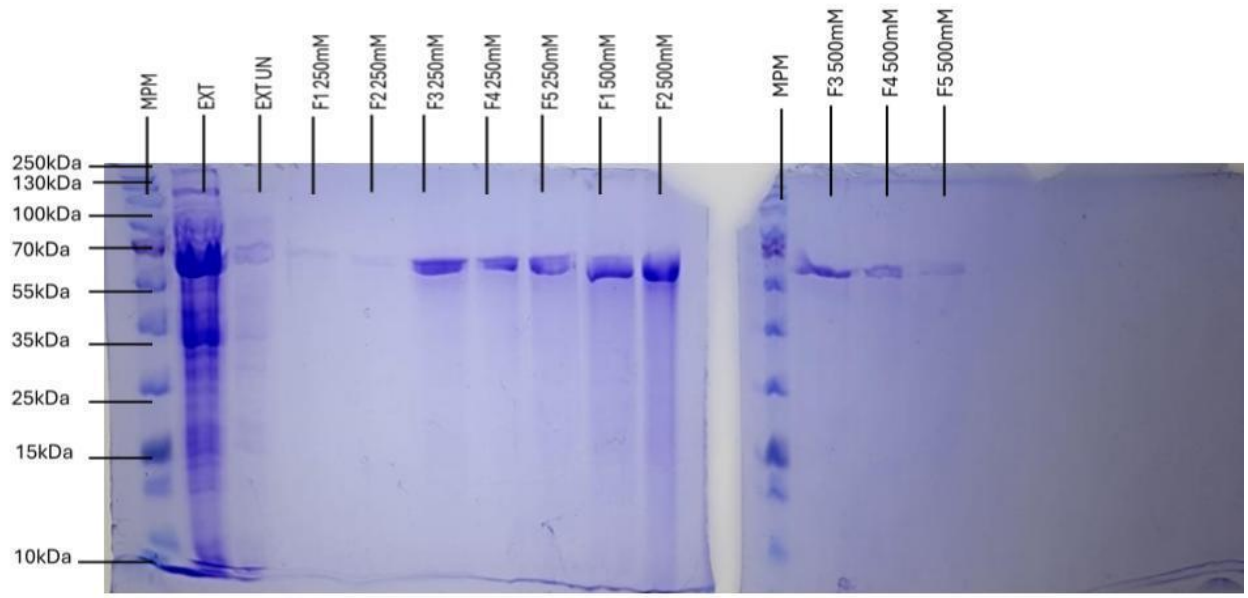


Figura 18: SDS-PAGE 10 % teñido con azul de Coomassie.

MPM: marcadores de peso molecular, EXT: extracto del lisado celular, EXT N U: extracto no unido a la columna cromatográfica, 20 mM: elución imidazol 20 mM, F1 250 mM a F5 250 mM: fracciones de la elución de imidazol 250 mM, F1 500 mM a F5 500 mM: fracciones de la elución de imidazol 500 mM.

8.2 Resultados de la diálisis y cuantificación de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04

Tras la visualización y selección de las muestras enriquecidas con la Exotoxina A, estas fueron colocadas en una membrana con microporos de 12-14 kDa y dializada en una solución de buffer Trizma 10 mM durante un periodo aproximado de 24 h a 4 °C, realizando un recambio de la solución usada para la eliminación del imidazol en las muestras, así obteniendo la muestra dializada. Tras el dializado de las muestras se realizó su cuantificación siguiendo el método de Bradford descrito previamente. Posterior a la cuantificación se corrió la muestra dializada en geles de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10% para corroborar los datos obtenidos de la cuantificación mediante su visualización, se utilizó 1, 2 y 3 µg de BSA como referencia a diferentes volúmenes 4 µl, 8 µl y 12 µl (Figura 19). Se calculó el rendimiento de la Exotoxina A que se obtuvo a partir de un cultivo de 150 ml inducido con IPTG 1 mM por las 2 veces que la Exotoxina A fue purificada mediante IMAC y cuantificada como se muestra en la Tabla 2.

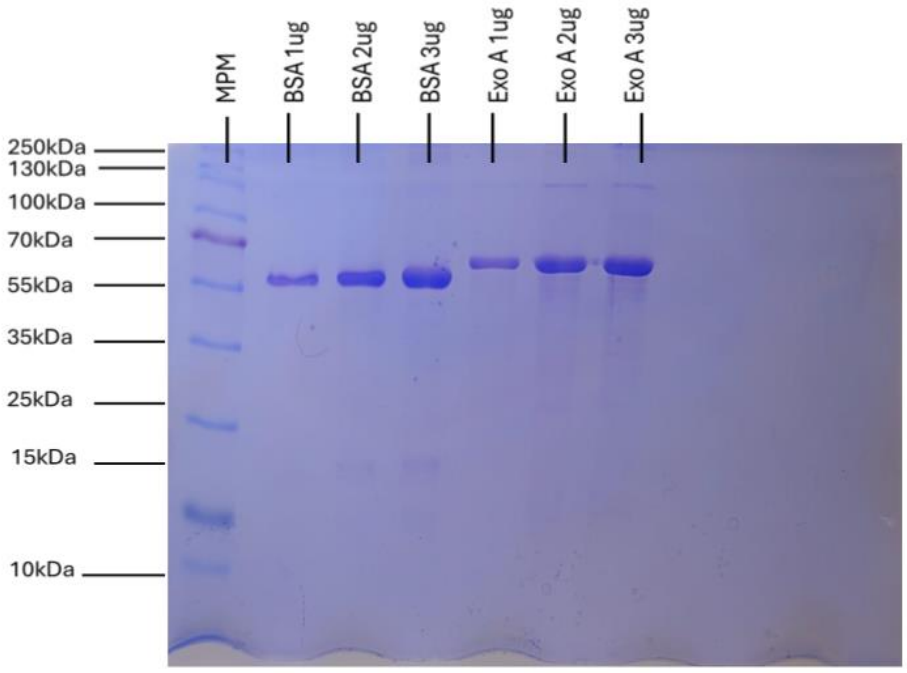


Figura 19: SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie.

MPM: marcadores de peso molecular, BSA 500 ng/µl: 4 µl, 8 µl, 12 µl, Exotoxina -A dializada 1, 2 y 3 µg.

Tabla 2: Rendimiento obtenido de la Exotoxina A después de su purificación mediante IMAC y cuantificación.

Cultivo	Proteína recuperada (µg/ml)
150 ml	2631.36
150 ml	2148.3
Rendimiento	2390.15

8.3 Resultados de los bioensayos

Para evaluar la actividad insecticida del ácido siríngico y la Exotoxina A individual y en combinación fueron realizados experimentos de sobrevivencia con duración 72 h en larvas de 4to

instar de *G. mellonella* mediante inyección de un volumen final de 10 µl en 6 tratamientos: 8µg ácido siríngico, 50 ng Exotoxina A y 150 ng Exotoxina A, 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 150 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y como control se usó buffer Trizma 10 mM en un total de tres réplicas. El porcentaje de sobrevivencia fue registrado a las 24, 48 y 72 h mediante las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier (Figura 20). La sobrevivencia en el control de Trizma 10 mM fue de 100% a las 72 h postinyección, el tratamiento con ácido siríngico individualmente mantuvo una sobrevivencia del 100%. durante las 72 h postinyección, En los tratamientos de 50 ng Exotoxina A, 150 ng Exotoxina A, 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 150 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico el porcentaje de sobrevivencia fue del >90%, 60%, 70% y 60% respectivamente a las 24 h postinyección. Posteriormente a las 48 h postinyección el porcentaje de sobrevivencia en los tratamientos de 50 ng Exotoxina A, 150 ng Exotoxina A, 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 150 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico fue del 60%, <10%, 40% y >10% respectivamente. Al transcurrir las 72 h todos los tratamientos que contenían Exotoxina A tuvieron un porcentaje de sobrevivencia del 0%.

De acuerdo con el Test de Log-rank (Mantel-Cox) $P \leq 0.05$, las curvas de sobrevivencia de las tres réplicas con los tratamientos de 50 ng Exotoxina A no es significativamente diferente de la curva de sobrevivencia con el tratamiento combinado de 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico (df=1, X2=1.364) estos resultados indican que el efecto producido por estas concentraciones no causa un posible efecto sinérgico en *G. mellonella.* Mientras las curvas de sobrevivencia de las tres réplicas con los tratamientos 150 ng Exotoxina A y 150 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico no mostraron diferencia significativa de acuerdo con el Test de Log-rank (Mantel-Cox) $P > 0.05$ (df=1, X2= 0.8265). Sin embargo, es posible que con las concentraciones de Exotoxina A utilizadas en el bioensayo no permitan observar esas diferencias y sea necesario utilizar dosis subletales. Los resultados también fueron graficados en función a su porcentaje de mortalidad (Figura 21).

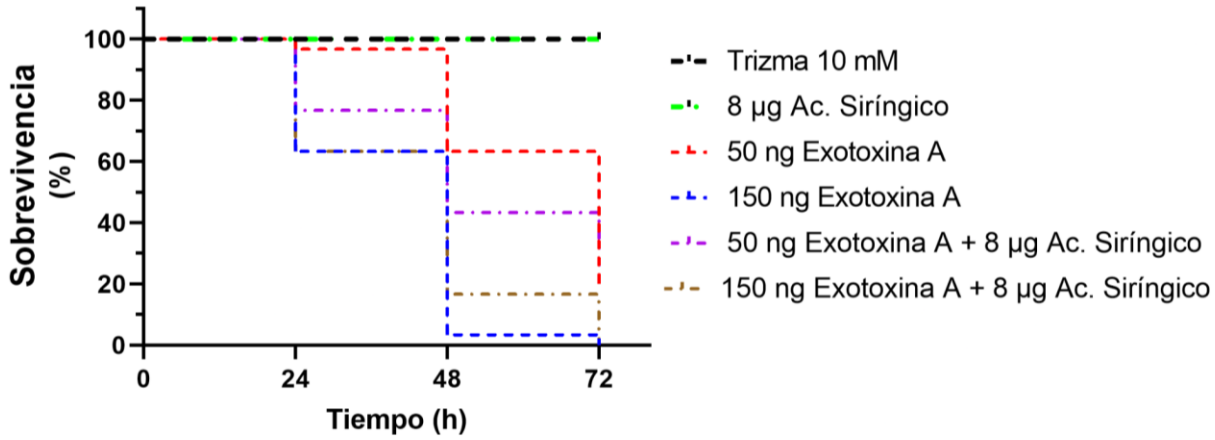


Figura 20: Análisis de la sobrevivencia en *G. mellonella* en respuesta a la administración de ácido siríngico y Exotoxina A de manera individual y en conjunto.

Se utilizó Trizma 10 mM como control negativo. Para evaluar la actividad de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 de manera independiente, se administraron los siguientes tratamientos: 50 ng/larva y 150 ng/larva de la Exotoxina A; 8 ug/larva de ácido siríngico. Para evaluar el efecto combinatorio, se administraron 50 ng de la Exotoxina A+ 8 µg de ácido siríngico y 150 ng de la Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico. En todos los casos, la administración se realizó vía inyección en un volumen de 10 µl. La sobrevivencia se registró a las 24, 48 y 72 h postinyección. Los experimentos se realizaron utilizando 10 larvas por tratamiento (n = 180) (tres réplicas). Las diferencias estadísticas entre las curvas se realizaron $P < 0.05$.

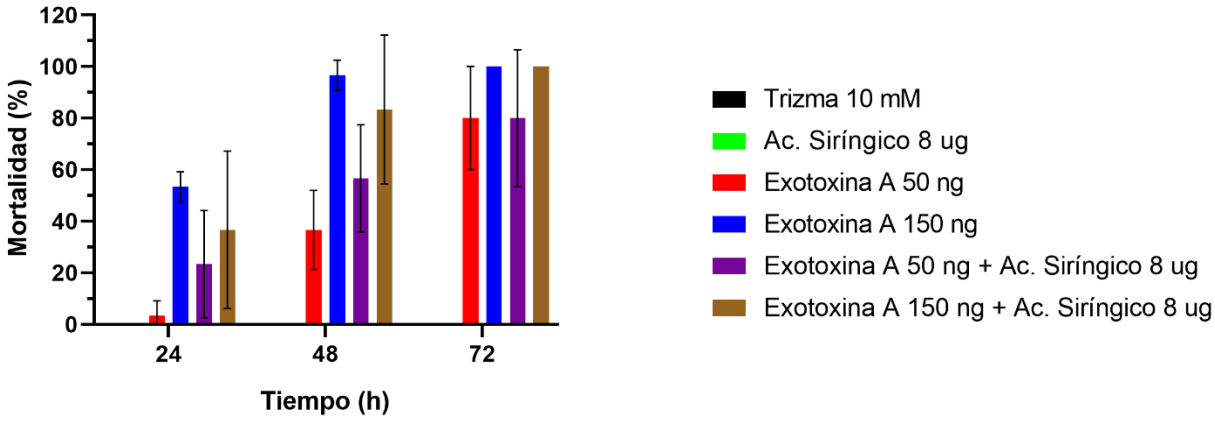


Figura 21: Porcentaje de mortalidad en *G. mellonella.*

Se utilizó Trizma 10 mM como control negativo. Para evaluar la actividad de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 de manera independiente, se administraron los siguientes tratamientos: 50 ng/larva y 150 ng/larva de la Exotoxina A; 8 ug/larva de ácido siríngico. Para evaluar el efecto combinatorio, se administraron 50 ng de la Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico y 150 ng de la Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico. En todos los casos, la administración se realizó

vía inyección en un volumen de 10 µl. La mortalidad se registró a las 24, 48 y 72 h postinyección. . Las barras de error representan la desviación estándar (SD) para tres bioensayos con 10 larvas por tratamiento (n = 180).

Para evaluar la actividad insecticida del ácido siríngico y la Exotoxina A individual y en combinación fue realizado una réplica preliminar de sobrevivencia con duración 72 h en larvas de 4to instar de *S. frugiperda* mediante inyección de un volumen final de 10 µl en 6 tratamientos: 8 µg ácido siríngico, 50 ng Exotoxina A y 150 ng Exotoxina A, 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 150 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y como control se usó buffer Trizma 10 mM. El porcentaje de sobrevivencia se registró a las 24 y 48 h. La sobrevivencia en el control de Trizma 10 mM y en el tratamiento de + 8 µg ácido siríngico fue de 100% a las 48 h postinyección. Mientras que en los tratamientos que contenían Exotoxina A fue del 0% de sobrevivencia a las 48 h postinyección (Figura 22). El porcentaje de sobrevivencia se registró a las 24 y 48 h mediante las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier.

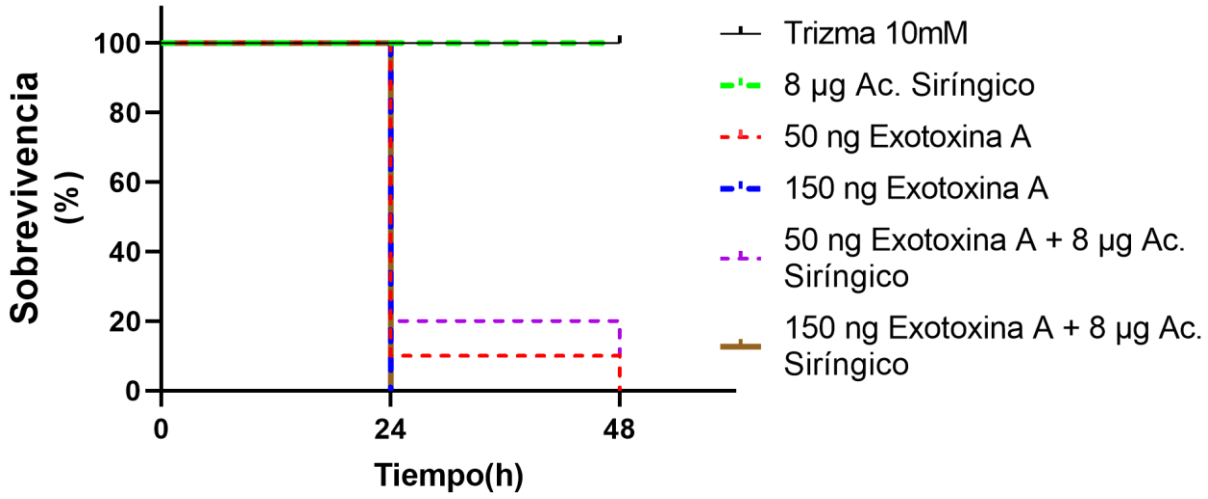


Figura 22: Ensayo preliminar de la sobrevivencia en *S. frugiperda* en respuesta a la administración de ácido siríngico y Exotoxina A de manera individual y en conjunto.

Se utilizó Trizma 10 mM como control negativo. Para evaluar la actividad de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 de manera independiente, se administraron los siguientes tratamientos: 50 ng/larva y 150 ng/larva de la Exotoxina A; 8 ug/larva de ácido siríngico. Para evaluar el efecto combinatorio, se administraron 50 ng de la Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico y 150 ng de la Exotoxina A+ 8 µg de ácido siríngico. En todos los casos, la administración se realizó vía inyección en un volumen de 10 µl. La sobrevivencia se registró a las 24 y 48 h postinyección. El experimento se realizó utilizando 10 larvas por tratamiento (n = 60) (una réplica).

Los experimentos de sobrevivencia fueron realizados con tratamientos reducidos de la Exotoxina A debido a que los tratamientos previos con 50 ng y 150 ng resultaron muy letales, por lo que fueron reducidos a 10 ng y 25 ng. Para evaluar la actividad insecticida del ácido siríngico y la Exotoxina A individual y en combinación los experimentos fueron realizados con una duración 72 h en larvas de 4to instar de *S. frugiperda,* mediante inyección de un volumen final de 10 µl en 6 tratamientos: 8 µg ácido siríngico, 10 ng Exotoxina A y 25ng Exotoxina A, 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 25 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y como control se usó buffer Trizma 10 mM en un total de tres réplicas. El porcentaje de sobrevivencia fue registrado a las 24, 48 y 72 h mediante las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier (Figura 23). La sobrevivencia en el control de Trizma 10 mM fue de 100% a las 72 h postinyección, el tratamiento con ácido siríngico individualmente mantuvo una sobrevivencia del 100%. durante las 72 h postinyección. En los tratamientos de 10 ng Exotoxina A, 25 ng Exotoxina A, 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 25 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico el porcentaje de sobrevivencia fue del 90%, >60%, 50% y >30% respectivamente a las 24 h postinyección. Posteriormente a las 48 h postinyección el porcentaje de sobrevivencia en los tratamientos de 10 ng Exotoxina A y 25 ng Exotoxina A, 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 25 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico fue del >10%, 10%, <10% y >10%, respectivamente. Al transcurrir las 72 h todos los tratamientos que contenían Exotoxina A tuvieron un porcentaje de sobrevivencia del 0%.

De acuerdo con el Test de Log-rank (Mantel-Cox) $P \leq 0.05$, las curvas de sobrevivencia de las dos réplicas con los tratamientos de 10 ng Exotoxina A es significativamente diferente de la curva de sobrevivencia con el tratamiento combinado de 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico (df=1, X2=6.603), estos resultados indican que la administración combinada causa un posible efecto sinérgico en *S. frugiperda.* Las curvas de sobrevivencia de las dos réplicas con los tratamientos 25 ng Exotoxina A y 25 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico mostraron diferencia significativa de acuerdo con el Test de Log-rank (Mantel-Cox) $P > 0.05$ (df=1, X2= 4.898). Estos resultados mostraron que hay diferencias significativas entre los tratamientos y que podría estar ocurriendo un posible efecto sinérgico. Los resultados también fueron graficados en función a su porcentaje de mortalidad (Figura 24).

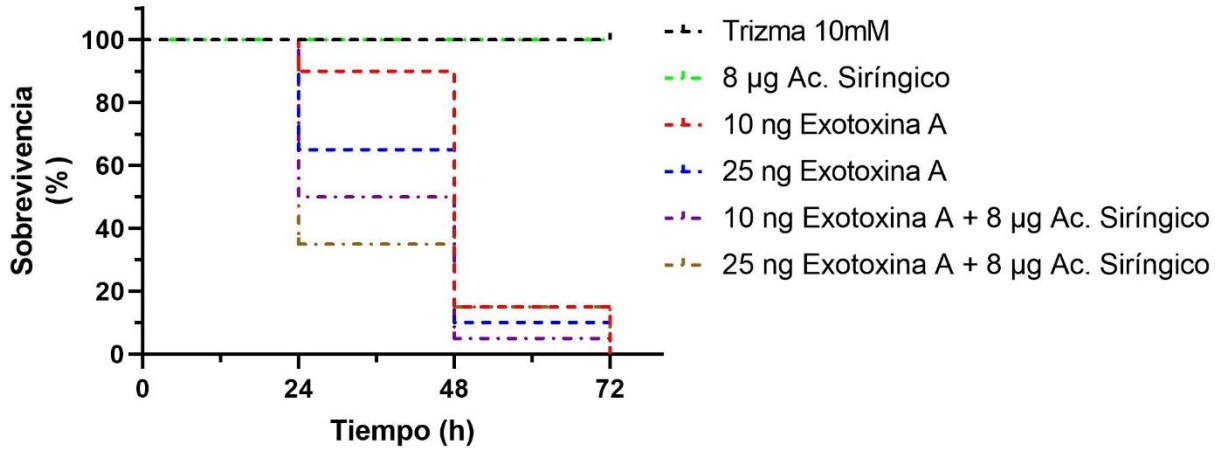


Figura 23: Análisis de la sobrevivencia en *S. frugiperda* en respuesta a la administración de ácido siríngico y Exotoxina A de manera individual y en conjunto.

Se utilizó Trizma 10 mM como control negativo. Para evaluar la actividad de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 de manera independiente, se administraron los siguientes tratamientos: 10 ng/larva y 25 ng/larva de la Exotoxina A; 8 ug/larva de ácido siríngico. Para evaluar el efecto combinatorio, se administraron 10 ng de la Exotoxina A+ 8 µg de ácido siríngico y 25 ng de la Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico. En todos los casos, la administración se realizó vía inyección en un volumen de 10 µl. La sobrevivencia se registró a las 24, 48 y 72 h postinyección. Los experimentos se realizaron utilizando 10 larvas por tratamiento (n = 120) (dos réplicas). Las diferencias estadísticas entre las curvas se realizaron $P < 0.05$.

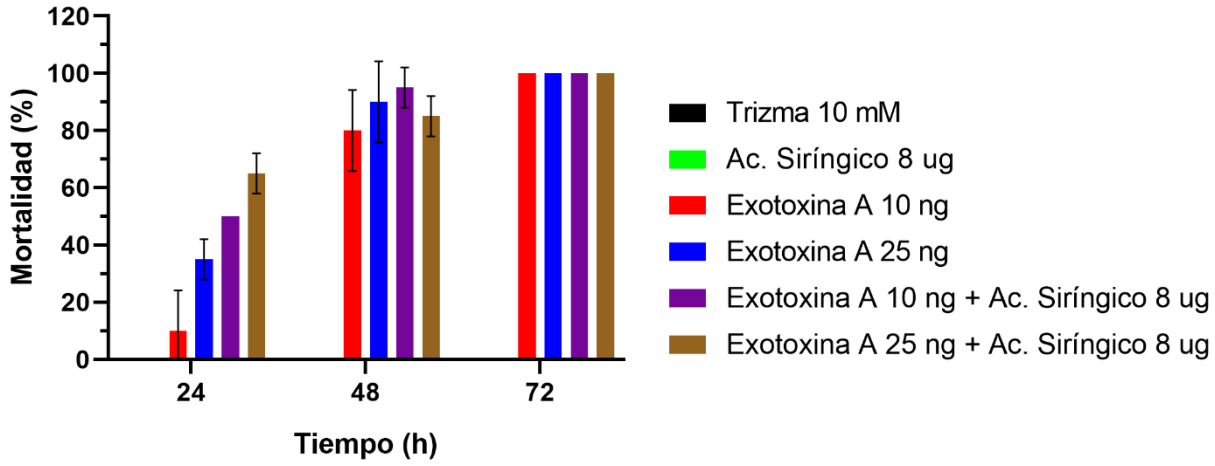


Figura 24: Porcentaje de mortalidad en *S. frugiperda.*

Se utilizó Trizma 10 mM como control negativo. Para evaluar la actividad de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 de manera independiente, se administraron los siguientes tratamientos: 10 ng/larva y 25 ng/larva de la Exotoxina A; 8 ug/larva de ácido siríngico. Para evaluar el efecto combinatorio, se administraron 10 ng de la Exotoxina A+ 8 µg de ácido siríngico y 25 ng de la Exotoxina A+ 8 µg de ácido siríngico. En todos los casos, la administración se realizó vía

inyección en un volumen de 10 µl. La mortalidad se registró a las 24, 48 y 72 h postinyección. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) para dos bioensayos con 10 larvas por tratamiento (n = 120) (dos réplicas).

En el transcurso de estos bioensayos se observaron diferencias fenotípicas a la administración de la Exotoxina A individualmente y en combinación del ácido siríngico al monitorear las larvas de *G. mellonella* y *S. frugiperda* (Figura 25). En *G. mellonella* se observó a las 24 h postinyección que algunas larvas adquieren una tonalidad ligeramente grisácea, mientras que la mayoría presenta un color claro al administrar tratamientos de 50 ng Exotoxina A y al transcurrir las 48 h adquieren una tonalidad grisácea y empiezan a morir; con el tratamiento de 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico se observó que algunas larvas adquieren una tonalidad ligeramente grisácea a las 24 h postinyección similar a la adquirida sin la administración del ácido siríngico y al transcurrir las 48 h poco más de la mitad de las larvas ya habían muerto y presentaban una tonalidad más gris, algunas se notaban un poco flácidas. En *S. frugiperda* se observó a las 24 h postinyección que las larvas tratadas con 10 ng Exotoxina A adquirían una tonalidad rosada y se veían un poco hinchadas, al transcurrir las 48 h ya se encontraban muertas y tenían un tono rosado más intenso, a su vez estaban flácidas; las larvas tratadas con 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico a la 24 h postinyección en su mayoría ya se veían con una tonalidad rosada ligeramente intensa y estaban flácidas, a las 48 h postinyección casi todas las larvas ya habían muerto y mostraban la tonalidad rosada intensa y empezaban a ennegrecerse.

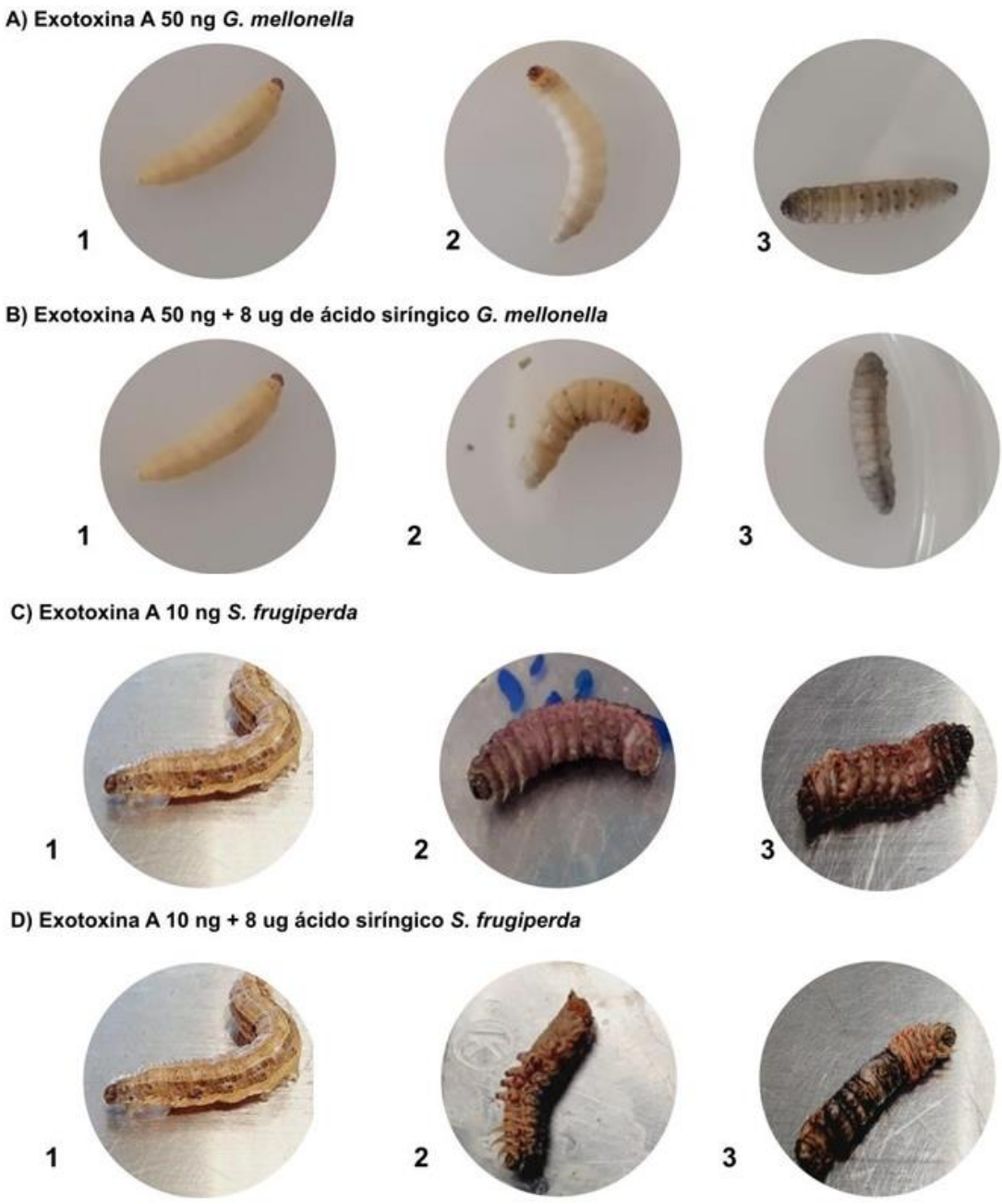


Figura 25: Diferencias fenotípicas en *G. mellonella* y *S. frugiperda* a la administración de diferente dosis de Exotoxina A y a la combinación con ácido siríngico.

A) larvas 4to instar de *G. mellonella* tratadas con 50 ng de Exotoxina A, 1: larva sin tratamiento 2: larva 24 h postinyección, 3: larva 48 h postinyección. B) larvas 4to instar de *G. mellonella* tratadas 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico, 1: larva sin tratamiento 2: larva 24 h postinyección, 3: larva 48 h postinyección. C) larvas 4to instar de *S. frugiperda* tratadas con 10 ng Exotoxina A, 1: larva sin tratamiento 2: larva 24 h postinyección, 3: larva 48 h postinyección. D) larvas 4to instar de *S. frugiperda* tratadas con 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico, 1: larva sin tratamiento 2: larva 24 h postinyección, 3: larva 48 h postinyección.

9 DISCUSIÓN

En esta investigación se evaluó la actividad insecticida individual y combinada de la Exotoxina A de *P. aeruginosa* NA04 y el ácido siríngico sobre larvas del insecto modelo *G. mellonella* y de la plaga *S. frugiperda.* Se eligió realizar los bioensayos de sobrevivencia primero en las larvas de *G. mellonella* por su mayor disponibilidad. No se calculó una DL_{50} en *G. mellonella* debido a que ya había una realizada previamente por el LEE correspondiente a 135.778 ng Exotoxina A para las 72 h, reportan los datos no publicados, por lo que se eligieron las dosis de 50 ng y 150 ng para *G. mellonella*, mientras que en ensayos preliminares para *S. frugiperda* al usar dosis de 50 ng y 150 ng eran muy letales y terminaron provocando la muerte de casi todos los individuos a las 24 h por lo que se decidió reducirlas a 10 ng y 25 ng tomado como referencia una dosis subletal reportada para *G. mellonella* de 20 ng (Iwański & Andrejko, 2022). Por otra parte, no se pudo calcular una DL_{50} para ácido siríngico debido a que no presentó efecto insecticida de manera individual con el tratamiento de 8 ug que fue el punto máximo de saturación del compuesto, durante las 72 h. Debido a la falta de disponibilidad de las larvas de *S. frugiperda* no se realizaron bioensayos para calcular la DL_{50} de la Exotoxina A.

En los bioensayos realizados en el modelo *G. mellonella* se utilizaron tratamientos de 50 ng y 150 ng de Exotoxina A individualmente, se observó una sobrevivencia >90%, 60% respectivamente a las 24 h postinyección, mientras que en los tratamientos 50 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 150 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico se observó una sobrevivencia 70% y 60% respectivamente a las 24 h. En los bioensayos de *S. frugiperda* se utilizaron tratamientos de 10 ng y 25 ng Exotoxina A individualmente, se observó una sobrevivencia de 90% y >60% respectivamente a las 24 h postinyección, mientras que en los tratamientos de 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 25 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico se observó una sobrevivencia del 50% y >30% a las 24 h postinyección.

En los bioensayos se destacó que las larvas de *S. frugiperda* son susceptibles al efecto insecticida provocado por la Exotoxina A, se realizó un ensayo preliminar con 50 ng y 150 ng donde la sobrevivencia fue menor al 10% a las 24 h para ambos tratamientos, por lo que se decidió reducir los tratamientos a 10 ng y 25 ng de la toxina. Por otro lado se halló que la administración en combinación de la Exotoxina A y el ácido siríngico mostraron diferencias estadísticas significativas en la sobrevivencia de las larvas de *S. frugiperda* en tratamientos con 10 ng y 25 ng de la Exotoxina A en combinación con 8 µg del ácido siríngico de acuerdo con el Test de Log-rank (Mantel-Cox).

En los tratamientos usados en *G. mellonella* de 50 ng y 150 ng de Exotoxina A en combinación con 8 µg ácido siríngico no se encontraron estadísticas significativas de acuerdo con el Test de Log-rank (Mantel-Cox). Sé conoce que la Exotoxina A causa daño celular por lo que su uso en dosis altas como las usadas en *G. mellonella* 150 ng y en *S. frugiperda* 25 ng puede llegar a enmascarar efectos combinatorios, en este caso del ácido siríngico. Baranek et al., (2020) describieron algunos efectos combinatorios entre proteínas: el efecto aditivo, como el efecto teórico que se espera de la combinación de múltiples agentes; el efecto el sinérgico, como un efecto mayor al efecto teórico que se espera de la combinación de múltiples agentes; el efecto antagónico, como un efecto menor que el efecto teórico esperado. Siguiendo estas descripciones podemos decir que en las larvas de *S. frugiperda* se presenta un efecto sinérgico, debido a que individualmente el ácido siríngico 8 µg no presenta disminución alguna en la sobrevivencia de las larvas, la Exotoxina A en tratamientos con 10 ng y 25 ng presentan una sobrevivencia del 90% y >60% a las 24 h respectivamente, en los tratamientos en combinación de 10 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico y 25 ng Exotoxina A + 8 µg ácido siríngico se observó una disminución de su sobrevivencia 50% y >30% a las 24 h. Por lo que se muestra un efecto mayor al efecto de las sumas individuales provocado por las moléculas, apoyado por el Test de Log-rank (Mantel-Cox) en donde mostró diferencias significativas en las moléculas administradas individualmente y las moléculas en combinación.

La actividad insecticida reportada para la Exotoxina A administrada por vía inyectable difiere entre las especies probadas. Un estudio realizado por Hossain et al., (2006) reportó una DL_{50} para la Exotoxina A de 140 ng en larvas de 5to instar de *B. mori* a las 24 h postinyección, mientras que en ratones adultos presentó una DL_{50} de 3 ng/g a las 24 h postinyección (ratón adulto promedio 20 g). En contraste Chieda et al., (2011) reportaron una DL_{50} para la Exotoxina A de 67.1 ng en larvas de 4to instar de *B. mori* a las 48 h postinyección. Por otro lado, Iwański & Andrejko, (2022) reportaron una dosis subletal de la Exotoxina A en larvas de último instar de *G. mellonella* de 20 ng a las 72 h postinyección. Posteriormente se identificó que a esa dosis subletal de 20 ng de la Exotoxina A al inyectarse en las larvas de *G. mellonella* provoca cambios severos en la inmunidad celular sin causar una muerte inmediata de las larvas al inducir la apoptosis en los hemocitos (Iwański et al., 2023).

En esta investigación se encontraron diferencias fenotípicas a la administración de la Exotoxina A individualmente y en combinación del ácido siríngico en las larvas de *G. mellonella* y *S. frugiperda,*

al mostrar que las larvas pertenecientes a *G. mellonella* empezaban a tener una tonalidad ligeramente grisácea a las 24 h postinyección, en comparación las larvas con los tratamientos combinados se veían aún más hinchadas y grisáceas a las 24 h postinyección. Las larvas de *S. frugiperda* adquirieron una tonalidad rosada y se veían hinchadas a las 24 h postinyección en comparación de las larvas con los tratamientos combinados en donde se veían más flácidas y con una tonalidad rosada oscura, esto nos sugiere que la especie *S. frugiperda* es susceptible a la Exotoxina A representando un efecto en el sistema inmune de este insecto al cambiar drásticamente su fenotipo. El ácido siríngico, al ser un compuesto fenólico con capacidad antioxidante, podría estar interfiriendo en la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) en *Spodoptera frugiperda*. Debido a que la PPO participa en los mecanismos de defensa de los insectos, su alteración podría debilitar la respuesta inmune. Por lo que la combinación del ácido siríngico podría generar un entorno favorable para la acción de la Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* NA04, exacerbando su efecto citotóxico sobre las larvas de *Spodoptera frugiperda*.

La Exotoxina A es uno de los principales factores de virulencia de *P. aeruginosa* para los organismos por lo que su uso no es apto para ser aplicado en el control de plagas debido a que conlleva implicaciones biológicas y de seguridad.

10 CONCLUSIONES

El ácido siríngico no presenta actividad insecticida en larvas de *G. mellonella* y *S. frugiperda* en una concentración de 8 ug/larva durante las 72 h del bioensayo.

La administración combinada de 50 ng Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico y de 150 ng Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico en larvas de *G. mellonella* no presentaron efectos sinérgicos en los tratamientos usados a las 24 h.

Las larvas de *S. frugiperda* son susceptibles a los tratamientos usados de la Exotoxina A (10 ng y 25 ng).

La administración combinada de 10 ng Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico y de 25 ng Exotoxina A + 8 µg de ácido siríngico presentan un efecto sinérgico en larvas de *S. frugiperda* a las 24 h postinyección.

11 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos permiten plantear que el ácido siríngico tiene un papel sobre la respuesta inmune de larvas de 4to instar *S. frugiperda*. Por lo que en futuras investigaciones sería interesante evaluar la actividad de la PPO en las larvas de 4to instar de los insectos de *G. mellonella* y *S. frugiperda* en presencia ácido siríngico y en combinación con la Exotoxina A con el fin de analizar cómo podría estar interviniendo el ácido siríngico y provocando el aumento de la toxicidad de la Exotoxina A.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anyanga, M. O., Farman, D. I., Ssemakula, G. N., Mwanga, R. O. M., & Stevenson, P. C. (2021). Effects of hydroxycinnamic acid esters on sweetpotato weevil feeding and oviposition and interactions with Bacillus thuringiensis proteins. *Journal of Pest Science*, *94*(3), 783–794. https://doi.org/10.1007/s10340-020-01297-5

Bahena Sanches, R. (2023). *Análisis de la capacidad aditiva de proteínas GroEL, de bacterias asociadas a nematodos, en la actividad insecticida de la bacteria Pseudomonas aeruginosa NA04*.

Baranek, J., Pogodziński, B., Szipluk, N., & Zielezinski, A. (2020). TOXiTAXi: a web resource for toxicity of Bacillus thuringiensis protein compositions towards species of various taxonomic groups. *Scientific Reports*, *10*(1), 19767.

Bartel, I., Mandryk, I., Horbańczuk, J. O., Wierzbicka, A., & Koszarska, M. (2023). Nutraceutical Properties of Syringic Acid in Civilization Diseases. *Nutrients*, *16*(1), 10.

Boschi, A., Scieuzo, C., Salvia, R., Arias, C. F., Perez, R. P., Bertocchini, F., & Falabella, P. (2024). Beyond microbial biodegradation: plastic degradation by Galleria mellonella. *Journal of Polymers and the Environment*, *32*(5), 2158–2177.

Burd, B. S., Mussagy, C. U., Bebber, C., Brasil, G. S. P., Dos Santos, L. S., Guerra, N. B., Persinoti, G. F., Jucaud, V., Goldbeck, R., & Herculano, R. D. (2025). Can the insects Galleria mellonella and Tenebrio molitor be the future of plastic biodegradation? *Science of The Total Environment*, *969*, 178879.

Casmuz, A., Juárez, M. L., Socías, M. G., Murúa, M. G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E., & Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, Spodoptera

frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, *69*(3–4), 209–231.

Chieda, Y., Iiyama, K., Lee, J. M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C., & Shimizu, S. (2011). Virulence of an exotoxin A-deficient strain of Pseudomonas aeruginosa toward the silkworm, Bombyx mori. *Microbial Pathogenesis*, *51*(6), 407–414.

del Rincón Castro, M. C., Lozano, J. M., & Ibarra, J. E. (2006). Caracterización de cepas nativas de Bacillus thuringiensis con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*, *45*(2), 157–164.

Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, *166*(1), 30–33.

Gessard, C. (1984). On the blue and green coloration that appears on bandages. *Reviews of Infectious Diseases*, *6*(Supplement_3), S775–S776.

Gutiérrez-Moreno, R., Mota-Sanchez, D., Blanco, C. A., Whalon, M. E., Terán-Santofimio, H., Rodriguez-Maciel, J. C., & DiFonzo, C. (2019). Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, *112*(2), 792–802.

Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of Pseudomonas aeruginosa: infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, *7*(9), 654–665.

Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, *173*, 501–513.

Herrera-Mayorga, V., Guerrero-Sánchez, J. A., Méndez-Álvarez, D., Paredes-Sánchez, F. A., Rodríguez-Duran, L. V., Niño-García, N., Paz-González, A. D., & Rivera, G. (2022). Insecticidal activity of organic extracts of Solidago graminifolia and its main metabolites (quercetin and chlorogenic acid) against Spodoptera frugiperda: an in vitro and in silico approach. *Molecules*, *27*(10), 3325.

Hossain, M. S., Hamamoto, H., Matsumoto, Y., Razanajatovo, I. M., Larranaga, J., Kaito, C., Kasuga, H., & Sekimizu, K. (2006). Use of silkworm larvae to study pathogenic bacterial toxins. *Journal of Biochemistry*, *140*(3), 439–444.

Huang, X., Huang, Y., Yang, C., Liu, T., Liu, X., & Yuan, H. (2021). Isolation and insecticidal activity of essential oil from Artemisia lavandulaefolia DC. against Plutella xylostella. *Toxins*, *13*(12), 842.

Isayama, S., Suzuki, T., Nakai, M., & Kunimi, Y. (2021). Influence of tannic acid on the insecticidal activity of a Bacillus thuringiensis serovar aizawai formulation against Spodoptera litura fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, *157*. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104558

Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Watari, A., Kobayashi, M., Tamesada, M., & Yagi, K. (2010). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl4-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *33*(6), 983–987.

Iwański, B., & Andrejko, M. (2022). Host-pathogen interactions: The role of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A in modulation of Galleria mellonella immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*, *187*, 107706.

Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., & Andrejko, M. (2023). Pseudomonas aeruginosa exotoxin A induces apoptosis in Galleria mellonella hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, *197*, 107884.

Kafle, L., & Joshi, R. C. (2025). Fall armyworm threatens Asian rice security: A review of sustainable management strategies. *CABI Reviews*, *20*(1), 0017.

Karamać, M., Kosińska, A., & Pegg, R. B. (2005). *Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids.*

Kartakis, S., Horrocks, K. J., Cingiz, K., Kriticos, D. J., & Wesseler, J. (2025). Migration extent and potential economic impact of the fall armyworm in Europe. *Scientific Reports*, *15*(1), 17405.

Krell, T., & Matilla, M. A. (2024). Pseudomonas aeruginosa. *Trends in Microbiology*, *32*(2), 216–218.

Kumar, G., & Khan, M. S. (2018). Study of the life cycle of greater wax moth (Galleria mellonella) under storage conditions in relation to different weather conditions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *6*(3), 444–447.

Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., & Fombong, A. T. (2017). The biology and control of the greater wax moth, Galleria mellonella. *Insects*, *8*(2), 61.

Letizia, M., Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2025). Pseudomonas aeruginosa: ecology, evolution, pathogenesis and antimicrobial susceptibility. *Nature Reviews Microbiology*, 1–17.

Lezaun, J. (2014). Oruga militar o Gusano cogollero un problema para los cultivos de maíz y sorgo. *Obtenido de Oruga Militar o Gusano Cogollero Un Problema Para Los Cultivos de Maíz y Sorgo: Https://Www. Croplifela. Org/Es/Plagas/Listado-Deplagas/Gusano-Cogollero Fecha de Consulta*, *18*.

Ludlum, C. T., Felton, G. W., & Duffey, S. S. (1991). PLANT DEFENSES" CHLOROGENIC ACID AND POLYPHENOL OXIDASE ENHANCE TOXICITY OF Bacillus thuringiensis SUBSP. kurstaki TO Heliothis zea. In *Journal of Chemical Ecology* (Vol. 17, Issue 1).

Martínez, M. (2019). *Gusano cogollero Spodoptera frugiperda (JE Smith)(Lepidóptera: Noctuidae)*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/635234/Gusano_cogollero_en_ma_z_y_arroz.pdf

Michalska, M., & Wolf, P. (2015). Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 963.

Mishra, V., Jana, A. K., Jana, M. M., & Gupta, A. (2017). Improvement of selective lignin degradation in fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse using synergistic CuSO4-syringic acid supplements. *Journal of Environmental Management*, *193*, 558–566.

Montezano, D. G., Sosa-Gómez, D. R., Specht, A., Roque-Specht, V. F., Sousa-Silva, J. C., Paula-Moraes, S. V. de, Peterson, J. A., & Hunt, T. E. (2018). Host plants of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology*, *26*(2), 286–300.

Movva, V., & Pathipati, U. R. (2017). Feeding-induced phenol production in Capsicum annuum L. influences Spodoptera litura F. larval growth and physiology. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *95*(1), e21387.

Overton, K., Maino, J. L., Day, R., Umina, P. A., Bett, B., Carnovale, D., Ekesi, S., Meagher, R., & Reynolds, O. L. (2021). Global crop impacts, yield losses and action thresholds for fall armyworm (Spodoptera frugiperda): A review. *Crop Protection*, *145*, 105641.

Punia, A., Singh, V., Thakur, A., & Chauhan, N. S. (2023). Impact of caffeic acid on growth, development and biochemical physiology of insect pest, Spodoptera litura (Fabricius). *Heliyon*, *9*(3).

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 199.

Rivera-Ramírez, A., Salgado-Morales, R., Onofre-Lemus, J., García-Gómez, B. I., Lanz-Mendoza, H., & Dantán-González, E. (2023). Evaluation and Characterization of the Insecticidal Activity and Synergistic Effects of Different GroEL Proteins from Bacteria Associated with Entomopathogenic Nematodes on Galleria mellonella. *Toxins*, *15*(11), 623.

Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 2866–2887.

Salgado-Morales, R., Martínez-Ocampo, F., Obregón-Barboza, V., Vilchis-Martínez, K., Jiménez-Pérez, A., & Dantán-González, E. (2019). Assessing the pathogenicity of two bacteria isolated from the entomopathogenic nematode Heterorhabditis indica against Galleria mellonella and some pest insects. *Insects*, *10*(3), 83.

Sivamani, E., Rajendran, N., Senrayan, R., Ananthakrishnan, T. N., & Jayaraman, K. (1992). Influence of some plant phenolics on the activity of δ-endotoxin of Bacillus thuringiensis var. galleriae on Heliothis armigera. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *63*(3), 243–248. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb01580.x

Srinivasulu, C., Ramgopal, M., Ramanjaneyulu, G., Anuradha, C. M., & Kumar, C. S. (2018). Syringic acid (SA)–a review of its occurrence, biosynthesis, pharmacological and industrial importance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *108*, 547–557.

Su, S., & Hassett, D. J. (2012). Anaerobic Pseudomonas aeruginosa and other obligately anaerobic bacterial biofilms growing in the thick airway mucus of chronically infected cystic fibrosis patients: an emerging paradigm or "Old Hat"? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *16*(9), 859–873.

Sun, C., Shao, Y., & Iqbal, J. (2025a). A comprehensive cell atlas of fall armyworm (Spodoptera frugiperda) larval gut and fat body via snRNA-Seq. *Scientific Data*, *12*(1), 250.

Sun, C., Shao, Y., & Iqbal, J. (2025b). A comprehensive cell atlas of fall armyworm (Spodoptera frugiperda) larval gut and fat body via snRNA-Seq. *Scientific Data*, *12*(1), 250.

Tejeda-Reyes, M. A., Rodríguez-Maciel, J. C., Díaz-Nájera, J. F., Vargas-Hernández, M., Bautista-Martínez, N., Hernández-Hernández, S., Mendoza-Espinoza, I. M., Ramírez-Fernández, T. M., Rojas-Rosales, A. G., & Vera-Barreto, P. (2023). Efficacy of selected insecticides in combination with economic thresholds in managing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in maize grown in Mexico. *Journal of Entomological Science*, *58*(2), 166–186.

Tohge, T., & R Fernie, A. (2017). An overview of compounds derived from the shikimate and phenylpropanoid pathways and their medicinal importance. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *17*(12), 1013–1027.

Tossou, E., Tepa-Yotto, G. T., Goergen, G., Tchigossou, G. M., Tchouakui, M., Nguete, D. N., Amadou, L., Noussourou, M., Bokonon-Ganta, A. H., & Wondji, C. (2025). Genetic variation

associated with increased lambda-cyhalothrin resistance in Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in West Africa. *Scientific Reports*, *15*(1), 21812.

Tsai, C.-L., Chu, I.-H., Chou, M.-H., Chareonviriyaphap, T., Chiang, M.-Y., Lin, P.-A., Lu, K.-H., & Yeh, W.-B. (2020a). Rapid identification of the invasive fall armyworm Spodoptera frugiperda (Lepidoptera, Noctuidae) using species-specific primers in multiplex PCR. *Scientific Reports*, *10*(1), 16508.

Tsai, C.-L., Chu, I.-H., Chou, M.-H., Chareonviriyaphap, T., Chiang, M.-Y., Lin, P.-A., Lu, K.-H., & Yeh, W.-B. (2020b). Rapid identification of the invasive fall armyworm Spodoptera frugiperda (Lepidoptera, Noctuidae) using species-specific primers in multiplex PCR. *Scientific Reports*, *10*(1), 16508.

Urgancı, N. N., Yılmaz, N., Alaşalvar, G. K., & Yıldırım, Z. (2022). Pseudomonas aeruginosa and its pathogenicity. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *10*(4), 726–738.

Usha Rani, P., & Pratyusha, S. (2014). Role of castor plant phenolics on performance of its two herbivores and their impact on egg parasitoid behaviour. *BioControl*, *59*, 513–524.

Wedekind, J. E., Trame, C. B., Dorywalska, M., Koehl, P., Raschke, T. M., McKee, M., FitzGerald, D., Collier, R. J., & McKay, D. B. (2001). Refined crystallographic structure of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *Journal of Molecular Biology*, *314*(4), 823–837.

Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., & Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Nature*, *413*(6858), 860–864.

Wojda, I., Staniec, B., Sułek, M., & Kordaczuk, J. (2020). The greater wax moth Galleria mellonella: biology and use in immune studies. *Pathogens and Disease*, *78*(9), ftaa057.

Wu, P., Wu, F., Fan, J., & Zhang, R. (2021). Potential economic impact of invasive fall armyworm on mainly affected crops in China. *Journal of Pest Science*, *94*(4), 1065–1073.

Yates, S. P., & Merrill, A. R. (2004). Elucidation of eukaryotic elongation factor-2 contact sites within the catalytic domain of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. *Biochemical Journal*, *379*(3), 563–572.

Zhou, W., Zhang, Y., Ning, S., Li, Y., Ye, M., Yu, Y., & Duan, G. (2012). Automated on-line SPE/multi-stage column-switching and benzoic acid-based QAMS/RODWs-HPLC for oral pharmacokinetics of syringic acid and salicylic acid in rats. *Chromatographia*, *75*, 883–892.

Sitios Web

European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2024, agosto 26). *Spodoptera frugiperda (LAPHFR) [World distribution]*. En EPPO Global Database. Recuperado de https://gd.eppo.int/taxon/LAPHFR/distribution

ANEXOS

Preparación medio LB

Reactivo	1 L	300 ml
Peptona	10 g	3 g
Extracto de levadura	5 g	1.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g	3 g

Se esteriliza en autoclave.

Buffer Trizma 100 mM

Reactivo	**1 L**
Trizma HCL	4.83g
Trizma base	8.402g
H2O	1L

Filtrar y esterilizar en autoclave.

Gel separador de poliacrilamida SDS-PAGE 10% 15ml

Reactivo	ml
H2O	5.9 ml
Mix de acrilamida 30%	5.0 ml
Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	3.8 ml
SDS (10%)	0.15 ml
Persulfato de amonio 10%	0.15 ml
TEMED	0.008 ml

Gel concentrador de poliacrilamida SDS-PAGE 5% 6ml

Reactivo	ml
H2O	4.1 ml
Mix de acrilamida 30%	1.0 ml
Tris-HCl (1 M, pH 6.8)	0.75 ml
SDS (10%)	0.08 ml

Persulfato de amonio 10%	0.06 ml
TEMED	0.008 ml

Mezcla lítica 10ml

Reactivo		
Tris-HCl (1 M, pH 6.8)	2.5 ml	250 mM
Glicerol puro	4 ml	40%
SDS	.04 g	4%
Azul de bromofenol 10%	50 ul	0.05 g
ß- mercaptoetanol	200 ul	2 %
H2O	Aforar para completar 10 ml	

El azul de bromofenol 10% (100 mg/ml etanol 20%)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Morelos a 13 de octubre de 2025

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/la Pasante de Biólogo: **IVAN ALEJANDRO CRUZ APARICIO, (10011775)** con el título del trabajo: **ANÁLISIS DEL EFECTO COMBINATORIO DE LA EXOTOXINA A DE *Pseudomonas aeruginosa* NA04 CON LA ACTIVIDAD INSECTICIDA ASOCIADA AL ÁCIDO SIRÍNGICO EN *Spodoptera frugiperda*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, damos voto de aprobado y consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Tesis y Examen Profesional como lo marca el artículo 6° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR		**FIRMA**
PRESIDENTE:	DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO	E-FIRMA
SECRETARIO:	DR. FERNANDO CUEVAS REMIGIO	E-FIRMA
VOCAL:	DRA. ROSALBA SALGADO MORALES	E-FIRMA
SUPLENTE:	M. EN C. ALICIA FONSECA GONZÁLEZ	E-FIRMA
SUPLENTE:	DR. ABRAHAM OMAR RIVERA RAMÍREZ	E-FIRMA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ALICIA FONSECA GONZALEZ | Fecha:2025-10-15 15:30:08 | FIRMANTE

QM1A4JV4UyJO0oU9nkg2u0EBPf88N1HQ3ogyJBOuotTX43NDop92nBLYb2BGXsVmA8AJ8DsI4zKTWgtRuMOKG4LzyIRiE1DxLkxZqfEPGVzHwBtmcDc1bg53VYlJB+jy1E8pWE0mllpN1yoWr7fE4s33motssM5q/TymtZFdm4hiiupsPTvLRT6LHAu48fuc41iQTbteGlobbV6SIZNCkw3nU1xbXshcLD8mixSChhKStKwf0O89s0n2nae4p12dvmC521V8fMXVr3LdYxWLgWT+AHrdevltPupqCKQZdb8mhR+r9UoiZ2JeAZwT7SoaJIU17dLmZdLvsu165JT0Kg==

ROSALBA SALGADO MORALES | Fecha:2025-10-16 11:44:17 | FIRMANTE

lEtUWiyEh+RHetFGjckALjTSV58PgmteRtxhJQWaQr2mRsTIeGSuHJG61Vo3UaY0bDbDDO336pzW7Q1g6vDLCHlsIpcf5WS/1+hOL/48rmuWk0N5k9/b7jSNX+DNdNI5Y3RP/BM+qKTxJsqg28Q5lIA4fUkPaQnA95zdrOiIF7e64ch42xjxWGgFce2Rf8jHjuFopr6K8AyjxE+zHIIEhROgpnG7CZ7Ph65BZ6JK9HTYOn80toNPXXQKqEyyXMjk1Syf3utNLaZ+wxg4agyny4Fg08XbxY1Wf60wg4u71Hr02t3xhwe66BYEsa1xNS+F9R9kU+vlGpLbfaqTpZW6RQ==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2025-10-20 09:58:06 | FIRMANTE

ax+m2/GxRK60uUgwe7bMtV0SKFY23vTzb0ZkY85FusvFC6hpxj4AyASXEY+aFWydGasbxoV5XwKEh7ABglkI7NXrpUgYE6yUEYy7j/NB86seEQX7sEpX7Tnk3k11/ce7dRgkADUzcMVq1ZhfD01A5Mn72a9oYMUumOvgajfti7krZQZVFAgcH8LgJoqibIMOLxvKw+koKzeRiHDcmraezg66yTWO1LUHxM6BqPJyZaUwHYvn02CzsbsvKkXZSvRjEa91WWJqreZyiQKUVo7g+8VlyOg23Jf0zhebIevMBu6CuL9gLBKhW0rxPQZ7f42UFmjZUQ58roM3kO200WGA+A==

FERNANDO CUEVAS REMIGIO | Fecha:2025-10-20 10:04:05 | FIRMANTE

cpkjg1/YLXlVjweNur4PA9+x3C/3B5W1OO1K9/jvjFzZ1iyPxHvV7tm7FE1aPuOQzeopDxHXfnUyhf6ZGnCODPlShEoZeDAhstVv/7tNENgDTToU4J58As1MxSNFqCYncFPD5mVRfR13PJ2/Z0djlnfBkodpbYBNVsWZsOlXXlwWcA2wI1ssNMtLWqQc0HOURi+wAkroSR95blfBKNK6Lzusx3/Mop8oeLoyGWHlGeVR3lz5/P0afNSkz++RASKj28kBrqLBdaA2L5FGphKv37Y6IpWps9zUV1vEAZaowX5CKXnksUqZ5A/doUzwJltOQuzsZnzVjRq1/CcNMNn28A==

ABRAHAM OMAR RIVERA RAMÍREZ | Fecha:2025-10-20 11:23:29 | FIRMANTE

ptLBMDWdFz/CmJI4CoooECo4ekbJqBauGQ1sOSykEwp9fnYr7vioVEQw/vqyxblaf2EHqvNbnfZqjBs3kvJkXwQUSH2tyV4twBkOGaCZPZrZO8AC+wupvljijg/gDduiBzRrmZ1kusU5vzEe6+P+GjeJIWzicrBSb6osy1LBfnfT2RlgKLGBpOxpGa0r+76ibR+jauAYO+XcZnsb5Tmjbvya7dSkQ8K7IhYFfg3MAhESRofsUGngRgXOD1BeQJ0Qy9n4sbJ5bSK0yUOOYb0gWQGiSwv1RiWKHrrvi0QT33idFGHa9m7V+RLpDQHPIMGohJooXi75vsDi0vcUuLFNSA==

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

RhECJ1bT6

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/VrvU2qpJFSIToBISRyogPm0smLlQRIMs