

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

FALLA DE ORIGEN

MECANISMO DE ACCION DE LAS δ -ENDOTOXINAS

DE *Bacillus thuringiensis*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA LA BIOLOGA

CLAUDIA DIAZ CAMINO

CUERNAVACA, MORELOS, 1995

03072
6
28



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue llevado a cabo en el laboratorio del **Dr. Rodolfo Quintero R.**, bajo la supervisión del siguiente comité tutorial: **Dra. Alejandra Bravo de la P.**, como tutor principal, y los **Dres. Mario Soberón C.** y **Alberto Darszon I.** como cotutores. Durante la realización del mismo, la autora fue becaria del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, con el número de registro 80871.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVO	15
MATERIALES Y METODOS	16
1. Obtención y caracterización bioquímica de vesículas de la membrana apical de células epiteliales (VMACE) a partir del intestino medio de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) del sexto estadio	16
1.1. Consideraciones en la preparación de soluciones	16
1.2. Material biológico	16
1.2.1. Obtención de la región media intestinal	16
1.2.2. Purificación de las VMACE	17
1.2.3. Cargado de VMACE con sacarosa	18
1.3. Caracterización bioquímica de la preparación de VMACE	18
1.3.1. Determinación de proteína total	18
1.3.2. Determinación de la actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina	18
1.3.3. Determinación de la actividad específica de la enzima citocromo c oxidasa	19
1.3.4. Ensayos de unión tipo <i>dot-blot</i>	20
2. Toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
2.1. Toxina seleccionada	21
2.1.1. Purificación de la toxina CryIC de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21

2.1.2. Ensayos tipo <i>western-blot</i>	23
2.1.3. Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀)	23
3. Bicapas planas	25
3.1. Consideraciones en la preparación de soluciones	25
3.2. Preparación de electrodos de <i>Ag⁺/AgCl</i>	25
3.3. Cámaras para la preparación de bicapas planas	26
3.4. Lavado de las cámaras	26
3.5. Formación de bicapas planas	27
fusión 3.6. Incorporación de canales iónicos por la técnica de	28
3.7. Almacenamiento y análisis de los datos obtenidos	29
RESULTADOS	31
Obtención y caracterización de vesículas de la membrana apical de células epiteliales	31
Toxina CryIC de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
Experimentos en bicapas lipídicas planas	34
DISCUSION	41
Obtención y caracterización de vesículas de la membrana apical de células epiteliales	41
Toxina CryIC de <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
Experimentos en bicapas lipídicas planas	42

CONCLUSION 49

LITERATURA CITADA 50

MECANISMO DE ACCION DE LAS δ -ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*.

RESUMEN

Las δ -endotoxinas (o proteínas Cry) son una familia de proteínas de importancia comercial producidas por *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) que presentan actividad tóxica específica contra diferentes organismos, entre los que destacan larvas de insectos en los órdenes *Lepidoptera*, *Coleoptera* y *Diptera*, así como a nematelmintos, platelmintos, ácaros e himenópteros.

A pesar de que generalmente se acepta que las proteínas Cry de *B.t.* ejercen su efecto alterando la permeabilidad de la membrana plasmática en las células del intestino medio en el insecto susceptible, el mecanismo de acción de estas proteínas entomopáticas no ha sido definido con precisión.

En este estudio, utilizando la técnica electrofisiológica llamada "bicapas planas", se exploró el efecto de la incorporación de la proteína CryIC de *B.t.* sobre la permeabilidad inicial de vesículas obtenidas a partir de la membrana apical de células epiteliales (VMACE) del intestino medio del insecto lepidóptero *Spodoptera frugiperda* perfusionadas a una bicapa lipídica artificial.

Dos clases de respuesta fueron evidentes: la primera, que involucra la actividad de canales unitarios y la segunda, en la que puede apreciarse un incremento en la conductancia de tipo macroscópico. Se demostró que las conductancias obtenidas en presencia de un gradiente de KCl indican que los canales iónicos inducidos por la toxina CryIC de *B.t.* son catiónicos. La actividad fue observada a concentraciones de toxina que correlacionan con las dosis letales determinadas *in vivo*.

MECANISMO DE ACCION DE LAS δ -ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis*.

INTRODUCCION

Los bioinsecticidas, es decir, los organismos naturales o modificados genéticamente y/o el(los) producto(s) de sus genes usados para controlar a una población plaga son el ejemplo más importante del empleo de sistemas de control biológico. A pesar de que más de 100 especies bacterianas han sido identificadas como patógenos de insectos, sólo ciertas especies de *Bacillus* han tenido éxito comercial, entre las cuales, *Bacillus thuringiensis* se ha destacado. A la fecha, *B. thuringiensis* representa del 90 al 95% del mercado de biopesticidas, convirtiéndose en el producto comercial de mayor difusión y uso a nivel mundial. Debido a su inocuidad ambiental, a su actividad sobre insectos resistentes a insecticidas químicos y a su selectivo espectro de acción, su utilización se incrementa día a día, particularmente dentro de programas integrales de manejo de plagas (Starnes y col., 1993).

B. thuringiensis es una bacteria del suelo, Gram-positiva, microaerofílica, que se caracteriza por producir inclusiones cristalinas paraesporales durante la esporulación (figura 1), cuya forma, tamaño y constitución varían entre las diferentes subespecies (Höffe y Whiteley, 1989). Las diversas cepas de *B. thuringiensis* se clasifican de acuerdo a su caracterización serológica y fenotípica. Actualmente se tienen reportadas 34 distintas sero-variedades (de Barjac y Frachon, 1990).

Los cristales paraesporales se encuentran formados principalmente por proteínas llamadas δ -endotoxinas (o proteínas Cry). En la literatura se han descrito δ -endotoxinas que presentan actividad tóxica específica contra larvas de insectos en los órdenes *Lepidoptera* (Dulmage, 1981), *Coleoptera* (Krieg y col, 1983) o *Diptera* (Golberg y Margalit, 1977). Recientemente, Feltelson y col. (1992) citaron toxinas capaces de actuar sobre ácaros, platelmintos y protozoarios. Posteriormente, Micogen, una compañía de bioinsecticidas, reportó el descubrimiento de cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a nemátodos e himenópteros (Starnes y col., 1993). De lo anterior, puede inferirse que es posible encontrar diferentes cepas de *B. thuringiensis* específicas virtualmente para cualquier plaga, desde eucariotes unicelulares hasta el artrópodo más evolucionado. Una posible

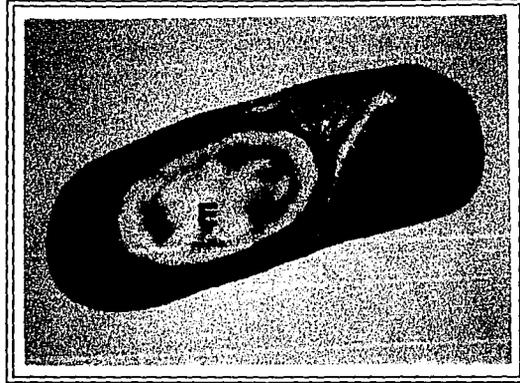


figura 1. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis*. En esta figura se muestra al bacilo en fase de esporulación tardía y puede apreciarse tanto a la espora (E) como al cristal (C), separados por el septo de esporulación (Feitelson y col., 1992).

explicación a la gran diversidad de cepas de *B. thuringiensis* encontradas en la naturaleza, es la coevolución entre la bacteria y su hésped. Cuando el insecto susceptible desarrolla resistencia ante una cepa de *B. thuringiensis*, se crea presión selectiva para generar una cepa microbiana diferente, lo que puede dar origen a una nueva variante tóxica hacia el mismo insecto (Feitelson y col., 1992).

La actividad tóxica de las toxinas de *B. thuringiensis* es muy alta comparada con algunos pesticidas químicos. Para proteger a un cultivo del ataque de insectos plaga, se aplican aproximadamente 10^{20} moléculas por acre del producto obtenido a partir de *B. thuringiensis*, mientras que los piretroides sintéticos requieren 3×10^{22} y los organofosforados 8×10^{24} moléculas por acre respectivamente, lo que representa una potencia molecular de 300 y de 80,000 veces mayor comparativamente (Feitelson y col., 1992).

A pesar de que algunas proteínas Cry han sido incluidas en formulaciones comerciales de bioinsecticidas durante las tres últimas décadas, el limitado espectro de acción ha sido discutido frecuentemente como una restricción para su uso comercial comparado con los pesticidas químicos. Por ello, diversas compañías han usado numerosas técnicas moleculares con el fin de desarrollar productos que, al combinar genes de diferentes cepas, resulten en un incremento del espectro de acción. Otra limitante recae en el hecho de la escasa permanencia de los productos de *B. thuringiensis* sobre el follaje, a causa de la relativa inestabilidad de éstos en el medio ambiente (debido a su degradación por luz ultravioleta, el lavado por lluvia, la dispersión por aire, etc.). La microencapsulación de la proteína de *B. thuringiensis* en la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas fluorescens*, la protege de su degradación ambiental, por lo que se prolonga su actividad residual. Con el fin de resolver el problema de la distribución efectiva del bioinsecticida, actualmente, por ingeniería genética, se han obtenido plantas resistentes a insectos lepidópteros y coleópteros al transformarlas con diferentes genes de *B. thuringiensis*. Estas expresan la toxina constitutivamente o bajo la inducción de promotores específicos, permitiendo el control de insectos de una manera efectiva (Brunke y Meeusen, 1991; Goldberg y Tjaden, 1990; Starnes y col., 1993).

Las toxinas de *B. thuringiensis* son sintetizadas como protoxinas inactivas, que deben disolverse y activarse en el intestino del insecto blanco antes de producir su efecto. El intestino de la larva en los insectos lepidópteros es alcalino, lo que resulta crucial para disolver a la mayoría de las protoxinas de *B. thuringiensis*, que son comúnmente solubles únicamente a pH superiores a 9.5 (Knowles y Dow, 1993). Experimentos de delecciones de aminoácidos y de inserción del transposón Tn5, han demostrado que la actividad tóxica se encuentra en la mitad amino

terminal (N-terminal) de la protoxina, y que la porción carboxilo terminal (C-terminal) no es requerida para la actividad tóxica (Wabiko y col., 1985; Wu y Aronson, 1990). Por esto, una vez que las protoxinas se encuentran en solución, son activadas por las proteasas del insecto, que cortan cerca de 500 aminoácidos del extremo C-terminal de las protoxinas de 130 kDa y 28 aminoácidos del extremo N-terminal, liberando a la porción tóxica, cuyo peso molecular varía entre 65 a 55 kDa y que es relativamente resistente a una degradación ulterior por proteasas. El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas Cry, reveló que algunas de las proteínas cuyo peso molecular es próximo a 70 kDa (CryII, CryIII A, B y D así como CryIVC y D), pueden considerarse como formas naturalmente truncadas de la mitad N-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa (Knowles y Dow, 1993) (figura 2).

Se ha propuesto una clasificación basada tanto en la homología de la secuencia de los genes que codifican para las δ -endotoxinas como en el espectro de la actividad insecticida de éstas, agrupando a dichas toxinas en seis clases principales. Cada una de estas clases contiene subclases que reagrupan a genes parcialmente relacionados entre sí (tabla 1). Hasta el momento se tiene una familia constituida al menos por 31 subclases diferentes, donde cada una de ellas es altamente específica para un blanco determinado.

Los genes *cryI*, cuyos productos tienen actividad contra lepidópteros, son los más estudiados. Se han clasificado en siete subclases (A-H), donde la primera tiene a su vez cuatro subdivisiones (a-d). Todos los genes *cryI* codifican para proteínas cuyo peso molecular oscila entre 130 a 140 kDa y generalmente, cristalizan como cuerpos bipiramidales (Chambers y col., 1991; Feitelson, 1991; Gleave y col., 1992; Höfte y Whiteley, 1989; Visser y col., 1990).

Los genes *cryII* codifican para proteínas cuyo peso molecular varía entre 65 a 70 kDa y los cristales tienen forma cuboidal. Se han clasificado en tres subclases (A-C) en donde la subclase A consiste en una proteína con actividad tóxica dual para lepidópteros y dípteros, mientras que las subclases B y C incluyen a las toxinas CryIIB y CryIIC, las cuales solo actúan sobre insectos lepidópteros. Las proteínas CryII muestran poca similitud ($\approx 25\%$) con el resto de la familia de proteínas Cry. Sin embargo, se consideran dentro de esta familia, ya que conservan algunos motivos de secuencia compartidos por todas las δ -endotoxinas (Höfte y Whiteley, 1989).

Los genes *cryIII* codifican para proteínas específicas para coleópteros, que se estructuran en forma de cristales romboidales, planos o bipiramidales. Se han reportado cinco subclases (A-E). En tres de ellas (A, B

TIPO DE PROTEINA	ESPECTRO DE ACCION	PESO MOLECULAR ^a
CryIA(a)	Lepidópteros	132.9
CryIA(b)	Lepidópteros	130.4
CryIA(c)	Lepidópteros	133.0
CryIA(d)	Lepidópteros	133.2
CryIB	Lepidópteros	139.4
CryIC	Lepidópteros	134.6
CryID	Lepidópteros	132.3
CryIE(a)	Lepidópteros	133.1
CryIE(b)	Lepidópteros	133.4
CryIF	Lepidópteros	133.4
CryIG	Lepidópteros	129.5
CryIH	Lepidópteros	129.6
CryIIA	Lepidópteros	70.7
	Dipteros	
CryIIB	Lepidópteros	70.6
CryIIC	Lepidópteros	69.6
CryIIIA	Coleópteros	73.9
CryIIIB	Coleópteros	75.0
CryIIIC <i>Gall</i>	Coleópteros	129.2
CryIIIC	Coleópteros	74.4
CryIIID	Coleópteros	72.9
CryIIIE	Coleópteros	130.8
CryIVA	Dipteros	134.3
CryIVB	Dipteros	127.6
CryIVC	Dipteros	77.6
CryIVD	Dipteros	72.2
CryVA(a)	Nemátodos	152.2
CryVA(b)	Nemátodos	141.8
CryVB	Nemátodos	142.1
CryVC	Nemátodos	88.0
CryVIA	Nemátodos	54.0
CryVIB	Nemátodos	44.0

^a El peso molecular está expresado en KDa y se calculó de la secuencia de aminoácidos de la primera publicación que describe el tipo de gen.

NOTAS:

Existe una gran variedad de genes, aún no clasificados, que no han sido incluidos en el listado. Dentro de las subclases, se han reportados distintos tipos de variantes para algunos de los genes incluidos en la lista.

tabla 1. Clasificación de los δ -endotoxinas. La tabla muestra el espectro de acción y peso molecular de diferentes proteínas insecticidas producidas por *Bacillus thuringiensis* (adaptado de van Rie, 1991).

y D) la protoxina tiene un peso molecular de ≈ 70 kDa, mientras que en el resto (C y E) el peso molecular fluctúa entre 130 a 140 kDa (Donovan y col., 1992; Höfte y col., 1992; Höfte y Whiteley, 1989; Lambert y col., 1992; Sick y col., 1990; Foncerrada y col., Patente #0 498 537 A2).

Los productos de los genes *cryII* son proteínas contra dípteros. Las protoxinas pertenecientes a esta clase cristalizan como cuerpos ovoidales. Esta clase se ha dividido en cuatro subclases (A-D), en donde las subclases A y B presentan dominios similares a los genes *cryI* y codifican para proteínas con un peso molecular de 134 y 128 kDa respectivamente. Estas, al ser procesadas proteolíticamente, generan péptidos tóxicos cuyo peso molecular varía entre 53 a 78 kDa. Los genes pertenecientes a las subclases C y D generan péptidos de 78 y 72 kDa correspondientemente, pero sólo CryIVD, al ser procesada, da origen a un péptido con un peso molecular de 30 kDa; el cual presenta una menor similitud en secuencia con el resto de las δ -endotoxinas ($\approx 25\%$) (Höfte y Whiteley, 1989).

Recientemente se han reportado las clases CryV y CryVI, que presentan actividad biocida contra nemátodos. El aislamiento de los genes sólo ha sido descrito en patentes. Se han reportado cuatro diferentes proteínas tipo CryV que se han clasificado en tres subclases (A-C), donde la primera tiene dos subdivisiones (a-b). Los genes incluidos en la clase CryVI se han dividido en dos subclases (A-B) y han sido separados de la clase CryV, pues presentan una menor similitud en secuencia entre sí, lo que sugiere un origen evolutivo diferente (Feitelson, 1992).

El análisis de las secuencias *cry* ha permitido la identificación de cinco bloques de alta similitud distribuidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos en la región tóxica, presentes en cuatro grupos de toxinas Cry (Cry I, II, III y IV). Estos bloques se encuentran separados por secuencias hipervariables de varias longitudes (Lereclus y col., 1988) (figura 2) y han permitido definir a los genes *cry* como parte de una familia.

En general, el modelo propuesto para el mecanismo de acción de la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* involucra dos etapas. La primera consiste en la unión de la proteína a un receptor específico en la superficie de la membrana del epitelio larvario, que incrementa de manera localizada la concentración de la toxina en el microambiente de la superficie membranar (Hofmann y col., 1988; van Rie y col., 1989). La segunda incluye la formación de un poro de 10-20 Å de diámetro en la membrana celular, que conduce a un desbalance iónico con los consecuentes cambios en la diferencia de potencial y por ende, en el transporte de iones, nutrientes, agua y otros metabolitos, lo que finalmente produce la citólisis y en consecuencia, la muerte del insecto por inanición y septicemia (Knowles y

Ellar, 1987).

La estructura tridimensional de la δ -endotoxina CryIIIa de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ha sido descrita recientemente (Li y col., 1991) (figura 3). Está constituida por tres dominios distintos, los cuales son, a partir del N-terminal al C-terminal:

Dominio I. Comprendido del extremo amino terminal al residuo 290. Se encuentra constituido por un grupo de siete α -hélices, donde una hélice central (α -5) se encuentra rodeada por las seis restantes. Dichas α -hélices son de naturaleza anfipática y con una longitud capaz de atravesar la membrana celular (Li y col., 1991). Mutaciones puntuales en la región que codifica para la hélice α -5 en la toxina CryIA(c) generaron mutantes con baja o nula toxicidad. Estas toxinas siguen siendo capaces de competir con la toxina silvestre por la unión al receptor, pero pierden la capacidad de inhibir el transporte de aminoácidos dependiente de K^+ en vesículas formadas a partir de la membrana apical de células epiteliales del intestino medio (VMACE) en el insecto blanco (Sacchi y col., 1986). Por lo anterior, se propone que algún paso posterior a la unión se encuentra alterado, como son el mecanismo de inserción en la membrana y la capacidad de formación del poro.

Dominio II. Localizado a partir del residuo 291 hasta el residuo 500. Está formado por tres láminas β las cuales se constituyen a su vez por once listones β y una hélice α . Esta región corresponde con la región hipervariable, que fue definida en base a una comparación entre las secuencias de las toxinas CryIA(a), A(b) y A(c). Estas proteínas presentan una similitud en secuencia de aminoácidos superior a un 80%, y sin embargo, su espectro insecticida difiere (Geiser y col., 1986). A este dominio se le ha asignado un papel en la especificidad, debido a que cambios en las regiones que codifican para diferentes porciones de este dominio entre los genes *cryIA(a)* y *cryIA(c)*, resultan en toxinas híbridas con la selectividad de una de las toxinas implicadas (Ge y col., 1989; Ge y col., 1991; Schnepf y col., 1990). Es importante notar que los listones de las tres láminas β en este dominio terminan en *loops* en una región localizada en el ápice de la toxina. Estos *loops* correlacionan con las regiones más variables dentro del dominio II entre las toxinas CryIII y CryI y se sugiere que pueden tener un papel fundamental en la especificidad.

Dominio III. Situado a partir del residuo 501 al 644. Se trata de un β -sandwich formado por dos láminas β en antiparalelo. Este dominio también se encuentra implicado en la especificidad (Ge y col., 1991; Schnepf y col., 1990) y probablemente participa en la definición del sitio de procesamiento de protoxina a toxina (Haider y Ellar, 1989).



figura 3. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la δ -endotoxina CryIII A de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Esta proteína presenta tres dominios distintos. El dominio I (en la figura en amarillo) se encuentra compuesto por seis α -hélices anfipáticas que rodean a una α -hélice central. El dominio II (en la figura en púrpura) se constituye por tres láminas β -plegadas en cuyos extremos se distinguen *loops* localizados en el ápice de la molécula y, finalmente, el dominio III (en la figura en rojo), conformado por un arreglo β -sandwich, que contiene la región C-terminal conservada en la mayoría de las proteínas pertenecientes a esta familia (Li y col., 1991).

Las hélices anfipáticas son frecuentemente encontradas en poros transmembranales. Esto, aunado a los resultados anteriormente mencionados, conllevan a proponer que el dominio I es el responsable de la inserción y formación del poro, y que está en contacto físico con el dominio III, al que se le ha asignado además un papel en la conservación de la estructura terciaria, mientras que el dominio II contiene la porción que interacciona con el receptor de las células epiteliales del intestino larvario y por ello, confiere la especificidad de la toxina. Por otra parte, se ha observado que los cinco bloques conservados entre las diferentes proteínas tipo Cry constituyen el corazón de la toxina. Este dato sugiere que toxinas de diferentes grupos pueden tener estructuras tridimensionales semejantes, y que el mecanismo de acción pudiera ser común a todas ellas (Li y col., 1991).

Ensayos histopatológicos realizados en larvas, después de ser tratadas con la toxina, muestran que ésta se adhiere a las microvellosidades presentes en el epitelio intestinal en la región apical y no se internaliza. Distintos eventos ocurren tras la adherencia de la toxina al epitelio. Las células se hinchan, se vacuolizan, el núcleo migra a la porción apical y el retículo endoplásmico rugoso se degenera. Finalmente, las células epiteliales se desprenden de la membrana basal y se desintegran, dispersándose hacia el lumen intestinal (Bravo y col., 1992).

Se propone que la membrana plasmática de las microvellosidades intestinales contiene receptores específicos de alta afinidad para la toxina de *B. thuringiensis*, de papel fisiológico desconocido (Höfmann y col., 1988; van Rie y col., 1989). Recientemente, se reportó la purificación de una proteína de 120 kDa, mayoritaria en el insecto *Manduca sexta*, que es capaz de unirse a la toxina CryIA(c). Esta proteína fue identificada como una aminopeptidasa N y se postula que funciona como receptor para la toxina CryIC (Knight y col., 1994; Sangadala y col., 1994), ya que esta enzima, sumada a una proteína de 65 kDa (cuya naturaleza puede ser una fosfatasa) al ser incorporadas en vesículas fosfolipídicas incrementan el flujo de ^{86}Rb dependiente de concentraciones nM de toxina (Sangadala y col., 1994).

Mediante estudios de unión de las toxinas marcadas con ^{125}I a vesículas de la membrana apical de células epiteliales (VMACE), estos receptores han sido descritos como sitios de unión saturables y altamente selectivos (Höfmann y col., 1988; van Rie y col., 1989). Se ha encontrado que los receptores son distintos para cada tipo de insecto (Denolf y col., 1993; Garczynski y col., 1991; Hoffman y col., 1988; Knowles y Ellar, 1986; Oddou y col., 1991; Sanchis y Ellar, 1993), y que la afinidad de las diferentes toxinas por estas moléculas determina la especificidad, de tal manera que algunas toxinas son activas contra uno o dos grupos de insectos, pero no

contra otros, ya que se ha reportado que el efecto de la toxina es proporcional a la concentración de receptores presentes en la membrana, así como a la afinidad de la primera por los mismos (Hofmann y col., 1988; van Rie y col., 1989). Estas observaciones permiten sugerir que la unión al receptor es el determinante inicial en la toxicidad. Sin embargo, en algunos experimentos se ha observado que a pesar de que la toxina se une a la membrana apical de las células intestinales del insecto, no causan su muerte, lo que sugiere que deben existir otros factores involucrados en el mecanismo de acción de la toxina de *B. thuringiensis*, tales como la alteración en el proceso de activación de protoxina a toxina (ya sea por la carencia de proteasas específicas o por una modificación en el pH), la destrucción o inactivación de la δ -endotoxina o la modificación molecular del receptor que interactúa con ésta (Ferré y col., 1991; Ferro, 1993).

Después de que la toxina se ha unido al receptor, ésta o el complejo toxina-receptor forman un poro que constituye la lesión inicial en el mecanismo de acción.

Las células epiteliales del intestino medio en insectos lepidópteros asimilan a los aminoácidos principalmente por un mecanismo de transporte dependiente de la concentración de iones K^+ . Por ello, una manera indirecta de evaluar la alteración del gradiente de K^+ transmembranal inducido por diferentes δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, consiste en determinar la inhibición del transporte de aminoácidos acoplado a K^+ . Sacchi y col. (1986), demostraron que la inhibición del cotransportador no se debía a una interacción directa de la toxina con éste, sino a la generación de un poro inducido por la δ -endotoxina. Posteriormente, Hendrickx y col. (1990), demostraron que la absorción de 3H -L-alanina disminuye dramáticamente en VMACE de *M. sexta* en respuesta a la toxina CryIA(b), lo que implica la disrupción del gradiente de K^+ , mientras que la toxina CryIB resultó inocua. Ambos datos coinciden con la toxicidad determinada para esta especie. Wolfersberger (1991) obtuvo resultados similares al probar que el efecto inhibitorio en la asimilación de 3H -L-fenilalanina provocado por las toxinas CryIA(b) y CryIA(c) en VMACE de *Lymantria dispar* correlaciona directamente con su toxicidad.

Se propone que como consecuencia de la alteración del gradiente de K^+ transmembranal, se afecta el transporte secundario activo. Este se constituye por una bomba de K^+ electrogénica que pertenece a la familia de las ATPasas de tipo vacuolar. Al alterar el gradiente de K^+ se disipa la diferencia de potencial a través de la membrana apical (Vachon y col., 1993), lo que perturba los gradientes iónicos así como la regulación del pH

y la asimilación de nutrientes (Knowles y Dow, 1993). Por otro lado, se ha demostrado que el Ba^{++} y el Ca^{++} funcionan como agentes bloqueadores del canal formado por la toxina en intestinos obtenidos a partir de *M. sexta* y pueden prevenir la actividad tóxica de ésta (Crawford y Harvey, 1988). En estudios electrofisiológicos de *patch-clamp* llevados a cabo con una línea celular obtenida a partir del insecto lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, se manifiesta que el contacto con la toxina provoca un incremento en la concentración de Ca^{++} intracelular así como la apertura de canales aniónicos, particularmente para Cl^- , de una manera dependiente del tiempo (Schwartz y col., 1991). Este dato sugiere que la toxina de *B. thuringiensis* es capaz de generar canales aniónicos. Sin embargo, lo anterior debe ser tomado con reserva, puesto que la línea celular utilizada en este estudio proviene de tejido ovárico, por lo que posiblemente estas células carezcan del receptor, y por lo tanto, pudieran no representar lo que sucede en el intestino medio del insecto.

Los estudios electrofisiológicos llevados a cabo en bicapas lipídicas planas sintéticas (BLPs) en donde se han incorporado las toxinas CryIIIA y CryIA(c), muestran que dichas proteínas en ausencia del receptor pueden formar canales iónicos altamente selectivos para cationes y que la formación de estos canales sólo se observa a pH alcalinos (Slatin y col., 1990). Sin embargo, Schwartz y col. (1993), tras incorporar a la toxina CryIC en BLPs, indican que dicha toxina forma canales iónicos tanto a pH ácidos como alcalinos. Asimismo, en este trabajo, se describen múltiples estados de conductancia y se menciona que tanto éstos como las propiedades cinéticas y la selectividad iónica del canal, son dependientes del pH utilizado en la inserción de la toxina a la BLP. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos por Butko y col. (1994) en los cuales se indica que en vesículas fosfolipídicas, en ausencia del receptor, la toxina CryIC incrementa su capacidad permeabilizante tanto a pH inferiores a 5 como en presencia de fosfolípidos ácidos. Recientemente, Walters y col. (1993), en un esfuerzo por identificar el fragmento mínimo necesario para la actividad de formación de poro, incorporaron a las BLPs fragmentos estables de la región N-terminal de la toxina CryIA(c). Estos fueron obtenidos al someter a la toxina ya sea a una digestión con el fluido intestinal de *S. frugiperda* o a una hidrólisis alcalina. En dicho estudio, se demostró que ambos fragmentos (21.5 y 24.5 kDa) son capaces de generar actividad de canal iónico en ausencia del receptor, similar al que forma la toxina completa. Von Tersch y col. (1994) describen la formación de canales iónicos tanto por la toxina CryIIIB2 como por el fragmento correspondiente al dominio I de la misma, el cual fue obtenido mediante el empleo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De igual forma, en este estudio se demuestra que el comportamiento entre la toxina CryIIIB2 y el dominio I de ésta es similar. Ambos trabajos apoyan la propuesta de que es el dominio I de la toxina quien es responsable de la formación de poro. Por otro lado, se ha demostrado

que la toxina por sí sola es capaz de aumentar la permeabilidad en liposomas (Haider y Ellar, 1989; Yunovitz y Yawetz, 1988). Es importante señalar que en los estudios mencionados, se utilizan dosis cerca de tres órdenes de magnitud mayores que las necesarias para causar el efecto citolítico en experimentos *in vivo*; por lo que no necesariamente se lleva a cabo el mismo proceso.

Los datos anteriores, apoyan la hipótesis de que el papel del receptor que reconoce a la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* consiste en incrementar la probabilidad de que la toxina sea capaz de formar un poro, pero no excluyen la posibilidad de que la interacción toxina-receptor active un canal iónico preexistente en la membrana que antes de la unión permanece cerrado.

OBJETIVO

A pesar de que generalmente se acepta que las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, ejercen su efecto tóxico alterando la permeabilidad de la membrana plasmática en las células del intestino medio en el insecto susceptible, hasta ahora, no se ha demostrado la formación de canales iónicos por estas toxinas a concentraciones en las cuales es fisiológicamente activa en el insecto blanco (nM). Sin embargo, se han descrito canales iónicos formados por diferentes proteínas Cry en membranas lipídicas sintéticas y en ausencia del receptor específico, utilizando para ello concentraciones μ M (Schwartz y col., 1993; Slatin y col., 1990).

Por lo anterior, se ha propuesto que el receptor de la δ -endotoxina producida por *B. thuringiensis*, juega un papel fundamental en el proceso tóxico, al facilitar la inserción de ésta en la membrana celular. No obstante, permanece la interrogante, ya que no se ha comprobado aún si los canales formados por las toxinas de *B. thuringiensis*, observados en ausencia del receptor, representan a los canales formados *in vivo* durante la intoxicación con estas proteínas.

El objetivo de este trabajo es el de aclarar el papel del receptor que reconoce a la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* en el efecto inicial sobre la permeabilidad de la membrana, así como caracterizar el tipo de canal que induce la toxina en presencia de éste.

Para lograrlo, se requiere contar un sistema que permita estudiar finamente el efecto de la toxina en presencia de su receptor. Esto permitirá corroborar si los canales iónicos hasta ahora descritos para este tipo de proteínas, son de reelevancia fisiológica en el proceso tóxico. La técnica electrofisiológica llamada "bicapas planas" cubre estas necesidades. Utilizando este sistema, se determinará la eficiencia de la toxina (purificada a homogeneidad a partir de *E. coli* y activada mediante su digestión con tripsina) para formar canales iónicos en experimentos en los que se preincorporarán proteínas de la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio de *S. frugiperda*, obtenidas a partir de larvas del último estadio.

Hemos seleccionado como modelo a la toxina CryIC, la cual es producida por *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* y ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli*. Esta toxina resulta altamente tóxica para larvas de *S. frugiperda*, un insecto perteneciente al orden Lepidoptera.

La evaluación de la actividad biológica de la δ -endotoxina empleada se llevará a cabo por medio de bioensayos en larvas del 1^{er} estadio de *S. frugiperda*.

MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE VESICULAS DE LA MEMBRANA APICAL DE CELULAS EPITELIALES (VMACE) A PARTIR DEL INTESTINO MEDIO DE LARVAS DE *S. frugiperda* (Smith) DEL SEXTO ESTADIO

1.1 CONSIDERACIONES EN LA PREPARACION DE SOLUCIONES

Todas las soluciones utilizadas en la obtención de VMACE a partir del intestino medio de *S. frugiperda*, así como aquellas usadas para la caracterización bioquímica de las mismas, se prepararon con reactivos de grado analítico y empleando agua Milli Q (MQ).

1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron larvas de *S. frugiperda* en el último estadio de desarrollo, las cuales fueron criadas en el Laboratorio de Patología Vegetal de la Universidad Nacional Autónoma del Estado de Morelos y proporcionadas por el M. en C. Eduardo Aranda. Con el fin de obtener las vesículas que se fusionarían posteriormente a las bicapas planas, se siguieron los pasos que se describen a continuación:

1.2.1 OBTENCION DE LA REGION MEDIA INTESTINAL

El protocolo de disección diseñado fue el siguiente:

1. Las larvas se colocaron sobre hielo durante 15 min.
2. Estas fueron fijadas a una tabla de disección de corcho con alfileres entomológicos.
3. De ambos extremos de la larva se eliminaron 3 ó 4 segmentos mediante un corte transversal, y al inicio de la región media se llevó a cabo un corte longitudinal del tegumento dorsal, el cual se fijó con el fin de exponer el intestino medio de la larva.
4. Se llevaron a cabo dos cortes transversales en los extremos del intestino, separándolo.
5. El intestino medio fue abierto mediante un corte longitudinal y se enjuagó su contenido con la solución A fría (Manitol 0.3 M, EGTA 5 mM, tris-HCl 17 mM, DTT 2 mM, pH 7.4) a la que se le adicionó PMSF 0.5 mM.

6. Una vez limpios, se colocaron en la solución A, sobre hielo, hasta terminar con el lote de larvas.

7. Se lavaron dos veces con la solución A fría con PMSF 0.5 mM.

8. Se centrifugaron a 500 *g* durante 15 min y a 4 °C, con el fin de separar el tejido de la solución. Se descartó el sobrenadante y se pesó el precipitado.

9. Este fue resuspendido 1:1 en relación p/v con la solución A diluida al 50% con agua, y se congeló de inmediato en hielo seco con acetona.

10. Se guardó a -70 °C hasta su uso.

1.2.2 PURIFICACION DE LAS VMACE

La purificación de las VMACE a partir de los intestinos medios disectados en el punto 1.2.1, se llevó a cabo siguiendo el protocolo reportado por Wolfersberger y col. (1987), como se describe a continuación:

1. De los intestinos obtenidos y conservados a -70 °C, se tomó una muestra que se colocó en un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón (Potter-Helvehjem), inmerso en hielo, y se diluyeron en relación 1:10 p/v con la solución A fría.

2. Se dieron 9 golpes a 3 000 rpm con el homogenizador.

3. Se agregó un volúmen igual de MgCl₂ 24 mM, se agitó y colocó 15 min sobre hielo.

4. La mezcla resultante se centrifugó a 2 500 *g* a 4 °C durante 30 min.

5. El sobrenadante fue decantado y centrifugado a 30 000 *g* a 4 °C durante 30 min.

6. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido en la mitad del volúmen del homogenado con la solución A fría, tratado con MgCl₂ y centrifugado como el homogenado original.

7. El segundo precipitado que se obtiene tras centrifugar a 30 000 *g* constituye la preparación de las VMACE, el cual se resuspende en la solución A fría diluida 1:1 con agua MQ, en el homogenizador, dando 3 golpes a 3 000 rpm.

8. Con el fin de eliminar el Mg^{++} de la preparación, ésta se dializó una vez contra 1000 volúmenes de la solución A con EDTA 5 mM durante 12 h, a 4 °C.

1.2.3 CARGADO DE VMACE CON SACAROSA

Este paso tiene como objetivo generar un gradiente osmótico favorable para su fusión con una bicapa lipídica preformada (Finkelstein, 1986; Miller y Racker, 1976 en Liévano, 1989). Para lograrlo, se utilizó la siguiente técnica:

1. Se tomó una alícuota de la fracción membranar (de 2 a 3 mg de proteína total por cada mL).

2. Se le agregaron 9 volúmenes iguales de sacarosa 1 M.

3. Se agitó la mezcla con el fin de homogenizarla y se sonicó por períodos de 30 s con 30 s de descanso, hasta un total de 2 min, a 4 °C en un sonicador de baño (Cole Parmer, modelo 8850-00) a 81 watts de potencia.

4. Una vez sonicadas, las vesículas se separaron en fracciones de 25 μ L, se caracterizaron bioquímicamente y se guardaron a -70 °C hasta su uso.

1.3 CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA PREPARACION DE VMACE

1.3.1 DETERMINACION DE PROTEINA TOTAL

La concentración de proteína total del homogenado y de todas las fracciones fue determinada por el método de Bradford modificado para proteínas de membrana (Bradford, 1987) utilizando el reactivo de Bio-Rad y albúmina sérica bovina (Sigma) como estándar. Con el fin de disolver la membrana plasmática y exponer así las proteínas embebidas en ésta, la muestra se incubó con N-hexyl- β -glucopiranosido (a una concentración final del 10%) durante 5 min; posteriormente, se desarrolló el método en la forma acostumbrada.

1.3.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA

La determinación de la actividad específica de la enzima fosfatasa alcalina, un marcador enzimático de la membrana plasmática, se llevó a cabo de acuerdo al protocolo citado por Harlow y Lane (1988), con

modificaciones, de la siguiente manera:

1. Se disolvió 1 mg/mL de *p*-nitrofenil fosfato en la solución de sustrato compuesta por tris.HCl 0.1 M, MgCl₂ 0.5 mM, pH 9.5, conteniendo el 0.02% de triton X-100.
2. Se agregaron 10 µL de cada muestra a 500 µL de la solución anterior.
3. Se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 20 min.
4. Para detener la reacción, se agregaron 500 µL de EDTA 0.25 M, pH 8.0.
5. Se tomó lectura a 405 nm en un espectrofotómetro simple (Pharmacia LKB Ultrospec II), utilizando celdas de poliestireno de 1 cm.
6. Se refirió la absorbancia obtenida contra una curva estándar de *p*-nitrofenol, desarrollada simultáneamente, considerando que una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de mg de proteína necesarios para transformar 1 nmol de *p*-nitrofenol fosfato en 1 min.

1.3.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CITOCROMO *c* OXIDASA

La determinación de la actividad de la enzima citocromo *c* oxidasa, un marcador enzimático de la membrana mitocondrial, y por ello, un marcador negativo en nuestra preparación, se llevó de acuerdo al protocolo citado por García-Soto y col. (1988), con modificaciones, de la siguiente manera:

1. El citocromo *c* de corazón de caballo, tipo XII, fue reducido previamente con ascorbato (10 mM) y dializado durante 12 h contra 100 volúmenes de tris.HCl 20 mM, pH 7.4, a 4 °C, con el fin de eliminar el exceso del agente reductor.
2. La actividad de la citocromo *c* oxidasa se determinó en una solución compuesta por KCl 0.1 M, tris.HCl 20 mM, triton X-100 al 0.02%, pH 7.4, a la cual se le adicionó el citocromo *c* reducido como sustrato a una concentración final de 9 µM, esto fue considerado como el blanco del ensayo.
3. A 1 mL de la solución anterior se le añadieron 20 µg de cada muestra.
4. La oxidación del citocromo *c* se siguió a 550-540 nm, en un espectrofotómetro de longitud de onda dual (SIM AMINCO DW-2000), utilizando celdas de poliestireno de 1 cm.

5. Se calculó la actividad enzimática específica a partir de la gráfica de la cinética obtenida, considerando que una unidad se define como la cantidad de mg de proteína necesarios para oxidar 1 nmol de citocromo c reducido en 1 min.

1.3.4 ENSAYOS DE UNIÓN TIPO *DOT-BLOT*

1. 20 µg de la proteína total de la preparación final de las VMACE así como 20 µg del homogenado inicial, se incubaron con 0, 10 y 20 nM de la toxina CryIC en la solución 1 (tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM), durante 1 h a temperatura ambiente.

2. Se diluyó 12 veces con la solución 1 y se centrifugó a 150 000 *g* durante 1 h a 20 °C.

3. Se descartó el sobrenadante y el precipitado (que contiene a las VMACE unidas a la toxina) fue resuspendido en 10 µL de la solución 1, tras lo cual, cada una de las muestras fueron colocadas sobre una membrana de nitrocelulosa.

4. Con el fin de bloquear la unión no específica, la membrana se incubó con la solución 2 (tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, albúmina sérica bovina al 1%, tween 20 al 0.05%) a temperatura ambiente durante 1 h.

5. Se lavó la membrana con la solución 3 (tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, tween 20 al 0.05%) durante 5 min y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal 20A6E9, que es específico para la proteína CryIC, diluido en relación 1:5 000 en la misma solución.

6. El anticuerpo no unido se descartó al lavar 2 veces durante 5 min con la solución 3.

7. La membrana fue incubada durante 1 h con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (Anticuerpo de conejo anti-ratón -DAKO-) y diluido en relación 1:1 000 en la solución 3.

8. El anticuerpo no unido se eliminó enjuagando una vez con agua MQ, lavando dos veces durante 5 min con la solución 3 y una vez por una solución compuesta por tris-HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM.

9. Los complejos receptor-toxina-anticuerpo se revelaron con una solución compuesta por diaminobencidina (1 mg/mL) y H₂O₂ al 0.03%, disueltos en la solución anterior.

2. TOXINA DE *B. thuringiensis*

2.1 TOXINA SELECCIONADA

La toxina seleccionada para el desarrollo de este trabajo fue la toxina CryIC, que es altamente tóxica a larvas de lepidópteros, particularmente para *S. frugiperda*. Esta es producida por *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* y ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli*.

2.1.1 PURIFICACION DE LA TOXINA CryIC de *B. thuringiensis*

1. Se sembró una asada de la cepa seleccionada en 20 mL de medio LB (peptona de caseína 10 g/L, NaCl 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L) con ampicilina (300 mg/L) que se incubó por 14 h a 37 °C y 250 rpm en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

2. El cultivo anterior se inoculó en 500 mL de medio LB, con el antibiótico señalado, en un matraz Fernbach de 2 L, y se incubó a 30 °C y 120 rpm durante 3 h.

3. Se adicionó isopropil β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 100 μM e incubó 14 h bajo las condiciones citadas en el paso 2.

4. El cultivo fue centrifugado a 10 000 rpm durante 20 min.

5. El precipitado obtenido se lavó con 10 mL de PBS (PO₄³⁻ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2) y esta suspensión se centrifugó a 10 000 rpm por 20 min.

6. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 10 mL de TES (tris-HCl 25 mM; pH 8.0, EDTA 10 mM, sacarosa al 15%) y se congeló a -70 °C durante 30 min.

7. A esta suspensión se le adicionó 1 mL de solución de lisozima (10 g/L en tris-HCl 10 mM, pH 8.0) por cada 500 mL de cultivo y se incubó por 30 min a 37 °C.

8. La suspensión se sonicó con 5 pulsos de 1 min cada uno.

9. Posteriormente, ésta fue centrifugada a 12 500 rpm durante 30 min.

10. El precipitado se resuspendió en 10 mL de TTN (tris-HCl 20 mM, pH 7.2, NaCl 1 M, triton X100 al 1 % v/v) y se incubó por 15 min a 25 °C con agitación suave.

11. La suspensión se centrifugó a 12 500 rpm por 40 min.
12. Se repitieron los pasos 10-11, cuatro veces.
13. El precipitado fue lavado, dos veces, con PBS-acetona (5:1 v/v) y se centrifugó a 12 500 rpm durante 40 min.
14. El precipitado se lavó dos veces con PBS y la suspensión se centrifugó a 12 500 rpm por 40 min.
15. El precipitado se resuspendió en 10 mL de solución alcalina (Na_2CO_3 50 mM, ditionitrol 10 mM, EDTA 5 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonil -PMSF- 1 mM, pH 10.0) e incubó durante 14 h a 37 °C y 250 rpm.
16. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm por 30 min. El sobrenadante obtenido contiene a la toxina soluble.
17. Posteriormente, se llevó a cabo la determinación de la concentración de proteína total por el método de Bradford, utilizando el reactivo de Bio-Rad y albúmina sérica bovina como estándar.
18. El sobrenadante obtenido en el paso 16 fue dializado contra 400 volúmenes de TCS (tris-HCl 20 mM, pH 8.6, NaCl 0.2 M).
19. Se adicionó 1 mg de tripsina (disuelto en HCl 1 mM, CaCl_2 20 mM) por cada 50 mg de proteína total al sobrenadante dializado y se incubó durante 5 h a 37 °C con agitación suave. La reacción se detuvo con PMSF a una concentración final de 1 mM.
20. La fracción obtenida se analizó por electroforesis en un gel de acrilamida-SDS al 10 %, tñiendo con azul de Commasie (Laemmli, 1970).
21. Posteriormente, ésta se desaló por cromatografía en columna empleando G-25 (Pharmacia) y se eluyó en tris-HCl 50 mM, pH 8.5, KCl 50 mM. Se analizó por electroforesis, bajo las condiciones previamente citadas.
22. La fracción de interés se resolvió por cromatografía de intercambio iónico en una columna de 1 mL, empacada con DEAE-*sepharose fast flow* (Pharmacia) que había sido equilibrada previamente con la solución anterior. Se llevaron a cabo dos lavados con una solución compuesta por tris-HCl 50 mM, pH 8.5, KCl 100 mM. El desplazamiento se realizó con tris-HCl 50 mM, pH 8.5, KCl 150 mM.
23. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis, bajo las condiciones anteriores. Aquellas que contuvieron a la toxina CryIC, se analizaron mediante ensayos tipo *Western-blot*.

2.1.2 ENSAYOS TIPO *WESTERN-BLOT*

Con el fin de corroborar la identidad de la proteína purificada, las fracciones obtenidas por el método descrito en el inciso 1.1 fueron sometidas a este tipo de análisis, tal y como se señala a continuación:

1. 1 μg de proteína total de la fracción purificada, fue analizada electroforéticamente y electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa (Towin y col., 1979), a 400 mA y 4 °C durante 1 h.
2. La unión no específica se bloqueó incubando la membrana con la solución *a* (PBS, tween 20 al 2%), dos veces, durante 5 min a temperatura ambiente con agitación suave.
3. Esta fue lavada con la solución *b* (PBS, tween 20 al 0.05%), dos veces, durante 5 min a temperatura ambiente con agitación suave.
4. Posteriormente, la membrana fue incubada en la solución *b* con el anticuerpo monoclonal 20A6E9 en relación 1:1 000, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
5. La membrana de nitrocelulosa se enjuagó brevemente con agua MQ.
6. El anticuerpo no unido fue eliminado totalmente al lavar tal y como se señala en el inciso 3.
7. La membrana fue incubada durante 1 h con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (anticuerpo de conejo anti-ratón -DAKO-) y diluido en relación 1:1 000 en la solución *b*, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
8. El anticuerpo no unido se descartó al enjuagar una vez con agua MQ, lavando dos veces durante 5 min con la solución *b* y una vez durante 5 min con PBS.
9. El complejo toxina-anticuerpo se reveló con una solución compuesta por diaminobencidina (1 mg/mL) y H_2O_2 al 0.03%, disueltos en PBS.

2.1.3 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION LETAL MEDIA (CL_{50})

Se utilizó una de las fracciones de la toxina CryIC purificada, la cual fue enviada al Laboratorio de Patología Vegetal perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, donde se llevó a cabo dicho estudio.

El bioensayo se realizó de la siguiente manera:

1. En cada uno de los 24 pozos de una placa de poliestireno, se adicionaron 2 mL de la dieta meridica descrita por Singh (1977) y modificada por Mihn (1984).

2. Una vez que solidificó, se agregó el volumen adecuado de la solución de toxina para obtener la cantidad deseada de proteína por unidad de área (ng/cm²). Posteriormente, se agitó con el fin de lograr una distribución homogénea y se secó a temperatura ambiente.

3. Se colocó una larva neonata de *S. frugiperda* en cada uno de los 24 pozos de la placa.

4. La placa se cubrió con plástico autoadherible, perforando la superficie con un alfiler, con el objeto de permitir la entrada de aire. Se colocó la tapa de plástico acojinado y se sujetó con ligas, con la finalidad de evitar que las larvas escapen.

5. Se incubó durante 7 días a 28 °C, con 65% de humedad relativa y bajo un fotoperíodo luz:oscuridad de 16:8 h.

6. El 7º día, se cuantificó el número de larvas vivas y muertas, así como la talla de las larvas sobrevivientes.

7. Los datos de mortalidad fueron sometidos a un análisis de varianza, así como a un análisis probit con el objetivo de determinar la DL₅₀.

3. BICAPAS PLANAS

3.1 CONSIDERACIONES EN LA PREPARACION DE SOLUCIONES

Todas las soluciones utilizadas se prepararon con reactivos de calidad analítica, en agua MQ bidestilada. La cristalería empleada, tanto para el almacenamiento del agua como para las soluciones hechas con ella, se enjuagó de manera exhaustiva con agua bidestilada y se horneó durante 2 h a 175 °C, o fue calentada con un mechero de gas, con el fin de quemar cualquier residuo de materia orgánica que estuviese pegado a las paredes. Una vez preparadas las soluciones, éstas fueron esterilizadas en el autoclave y conservadas a 4 °C.

3.2 PREPARACION DE ELECTRODOS DE $Ag^+/AgCl$

Para la fabricación de electrodos no polarizables de plata clorada se utilizó la técnica clásica que se describe a continuación:

1. Se cortaron un par de alambres de plata pura (Goodfellow Metals Science Park) de aproximadamente 4 cm de largo y 1 mm de diámetro.
2. Se limpiaron calentándolos al rojo con una flama, hasta que la superficie quedó brillante.
3. Un extremo de los alambres se engrosó al fuego, hasta que se obtuvo una esfera de 3 a 4 veces el diámetro del alambre.
4. Los electrodos de plata fueron soldados a los conectores metálicos utilizados para conectarlos eléctricamente (Dagan Corporation).
5. Estos se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex^{MR}) durante al menos 30 min (con esto se logra una capa homogénea de cloruro de plata sobre la superficie de los electrodos, que es evidente por el color sepia generado, el cual debe ser homogéneo y la superficie de los electrodos debe quedar de aspecto lustroso).
6. Los electrodos ya preparados, se enjuagaron profusamente y se secaron con papel absorbente.

3.3 CAMARAS PARA LA FORMACION DE BICAPAS PLANAS

Para la formación de las PLBs, se utilizaron cámaras de teflón descritas en Liévano (1989). Esta tiene dos compartimentos de 500 μL , interconectados por un orificio central de aproximadamente 0.3 cm, en el que se montó la película plástica, la cual presenta un orificio hidrofóbico que tiene un diámetro entre 200 y 300 μm , éste se forma de la manera siguiente:

1. La película se montó sobre una pieza cilíndrica de teflón que tenía una pequeña apertura en la parte central.
2. El cilindro de teflón fue colocado entre dos electrodos metálicos, cada uno de ellos a aproximadamente 1 cm de distancia de la película plástica. Uno de los electrodos se conectó a una bobina de encendido automotriz (Prestolite^{MR}, modelo P5-13) que estaba en paralelo con un condensador de encendido automotriz (de aproximadamente 300 nF), mientras que el otro se conectó a la tierra del sistema.
3. Para generar una chispa a través de la película plástica, se cerró el circuito entre la bobina y una batería de 12 V.

La principal ventaja de este método es que los orificios quedan casi circulares y con bordes regulares, que permiten la formación de PLBs muy estables.

3.4 LAVADO DE LAS CAMARAS

Para el lavado de las cámaras, se siguieron los pasos citados por Liévano (1989), y son los siguientes:

1. Las partes de teflón se hirvieron durante 20 min en NaOH 1 M.
2. Se descartó la solución anterior, y se hirvieron nuevamente, esta vez en HCl 1 M, durante 20 min.
3. Se eliminó esta solución, y se hirvieron durante 20 min en agua pura.
4. Entre las paredes de la cámara y la película plástica, se depositó una capa delgada de vaselina refinada (Vaseline^{MR}) con un hisopo limpio de algodón, con el objetivo de sellar perfectamente la unión y evitar de esta manera corrientes espúreas.
5. La cámara se lavó de manera exhaustiva con los siguientes solventes, en forma secuencial: agua, etanol, metanol, cloroformo:metanol (2:1), cloroformo, y, finalmente, hexano.

3.5 FORMACION DE BICAPAS PLANAS

Se utilizaron PLBs formadas de acuerdo a la técnica de Müller y Rudin (1963), la cual consistió básicamente en depositar una pequeña cantidad de fosfolípido, disperso en un solvente alifático no volátil, tal como *n*-decano, en un orificio hecho en un septo hidrofóbico e inmerso en un medio acuoso.

Una vez que el fosfolípido se deposita en el septo, el exceso de solvente se drena hacia la periferia formando el "torus" de la bicapa, hasta que las monocapas externas que están en contacto con el medio acuoso coalescen, formando una pequeña zona de bicapa, que actúa como foco de formación para una mayor área de bicapa (Jain, 1972 y White, 1986 en Liévano, 1989).

Se empleó difitanolfosfatidilcolina (DPPC) como el lípido disperso (sintética, Avanti Polar Lipids) a una concentración final de 20 mg/mL en *n*-decano, que se separó en fracciones de 25 μ L y se guardaron a -20 °C. En el transcurso del experimento, esta preparación se mantuvo en un baño de hielo.

La técnica de formación de bicapas utilizada fue la siguiente:

a. Pretratamiento:

Una vez montada la cámara de formación de bicapas y después de haberse lavado con solventes, se pretrató el orificio en el que se "pinta" la bicapa de la siguiente manera:

1. Se depositó con un pincel muy fino (#0) una pequeña capa de la dispersión de fosfolípido en ambos lados del orificio que se utiliza para formar la bicapa.
2. Se hizo pasar una corriente de N₂ a través de este durante 2-7 min; con el fin de evaporar una pequeña cantidad de solvente.
3. Inmediatamente después, se añadieron 300 μ L de la solución a utilizar en cada uno de los compartimentos de la cámara, evitando que se formaran burbujas.
4. Se conectaron los electrodos de plata clorurada en cada compartimento, al generador de voltaje (lado *trans*) y al transductor de voltaje (lado *cis*), que es el lado de la bicapa que se encuentra virtualmente a tierra, de tal manera que se tuvo a la bicapa en condiciones de fijación de voltaje.

b. Formación de bicapas planas:

Para "pintar" la bicapa en el orificio del septo hidrofóbico, se utilizó la siguiente técnica:

1. Con una punta amarilla para pipetas "Gilson", que tenía el extremo estrecho sellado y redondeado al fuego, se tomó una pequeña cantidad de la dispersión de fosfolípidos y se depositó cuidadosamente en el orificio que se utiliza para formar la bicapa.

2. La deposición del lípido se siguió eléctricamente como un aumento súbito en la resistencia, que se midió registrando la brusca disminución de la corriente iónica resultante de la aplicación de un pequeño pulso triangular de voltaje de 1 a 5 mV.

3. Por otro lado, la formación de la bicapa se siguió observando mediante el incremento de la capacitancia, lo que se asocia con el adelgazamiento de la película lipídica.

La capacitancia fue calculada directamente por el transductor, y no es más que el resultado de la siguiente fórmula:

$$C = \int_{-\infty}^{\infty} i dt / \Delta V$$

donde ΔV es el valor del pulso aplicado en volts, i es la corriente iónica resultante en amperes y dt es el diferencial de tiempo en que ocurre la relajación de la corriente en la espiga capacitiva. Conociendo el área del orificio en que se formó la bicapa, se puede calcular la capacidad específica ($\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$). El área de los orificios utilizados durante este trabajo, fueron medidos con un micrómetro. Con esta técnica, se obtuvieron bicapas con valores de capacitancia en el rango de 0.4 a 0.8 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$, que es cercano a 1 $\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$, valor típico de las membranas biológicas (Jain, 1972 en Liévano, 1989).

3.6 INCORPORACION DE CANALES IONICOS POR LA TECNICA DE FUSION

Para la incorporación de las VMACE a la PLB por la técnica de fusión, se siguieron los siguientes pasos:

Teniendo formada la bicapa, se dejaba 10 min sin perturbar, pasados los cuales se aplicaban un par de pulsos; el primero de +100 mV y el

segundo, de 100 mV durante el mismo lapso de tiempo, con la intención de verificar que la bicapa era estable y que no presentaba artefactos de ninguna índole.

Con el fin de fusionar las VMACEs a la BLP, el potencial se fijó a +50 mV, se adicionó un gradiente iónico compuesto por KCl al lado *cis* de la cámara y se agregó una pequeña cantidad de la preparación de VMACE en el mismo compartimento (que se encontraba bajo agitación constante), con la idea de incorporar los fragmentos de membrana por la técnica de fusión (Miller y Racker, 1976 en Liévano, 1989). Una vez agregada la fracción membranal, se esperaba hasta que ocurriera la fusión de una vesícula que tuviese un canal iónico, que era evidente por la aparición de típicos saltos de corriente asociados con la actividad de canales iónicos en virtud del voltaje aplicado. Posteriormente, se llevaba a cabo el cambio de solución en el lado *cis* de la cámara, con el objeto de eliminar el resto de las VMACE suspendidas en ésta y evitar eventos de fusión posteriores. Una vez restablecido el gradiente iónico, y tras el registro de la actividad iónica a distintos potenciales de membrana, se adicionaba la toxina CryIC y se esperaba a que ocurriera la incorporación de ésta, hecho que se interpretó como la aparición de actividad iónica distinta a la inicial, tras lo cual se llevó a cabo el registro bajo las condiciones antes mencionadas.

Con el fin de verificar la actividad iónica generada únicamente por la toxina CryIC, ésta fue incorporada a bicapas planas. Para este tipo de experimentos, las bicapas planas se formaron con DPPC o con una dispersión lipídica constituida por una mezcla de fosfatidiletanolamina/ fosfatidilserina (purificados, Avanti Polar Lipids) en una relación molar 1:1 (a una concentración final de 25 mg/mL en *n*-decano). Una vez verificada la integridad de la bicapa lipídica formada, y tras la adición del gradiente de KCl, el potencial de membrana se fijó a +50 mV. La incorporación de la toxina CryIC a las bicapas planas se obtuvo tanto por eventos de incorporación espontánea como por eventos de incorporación inducida, entendiendo estos últimos como la formación de la bicapa plana en presencia de la toxina en solución. El registro de la actividad iónica obtenida se llevó a cabo a distintos voltajes.

3.7 ALMACENAMIENTO Y ANALISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS

Las corrientes de canales unitarios fueron registradas con un amplificador de *patch-clamp* Dagan 3900A (Dagan Corp., MN). La corriente obtenida en cada experimento, fue filtrada a 200 o 500 Hz y digitalizada en línea a 1 o 2 KHz, respectivamente. Los datos almacenados, fueron analizados en una computadora personal utilizando la interface *Digidata 1200* y los programas computacionales *Axotape*, *pClamp* (Axon Instruments, CA) y *Axum 1.02* (Timetrix Inc., CA). El diagrama del sistema empleado se ilustra en la figura 4.

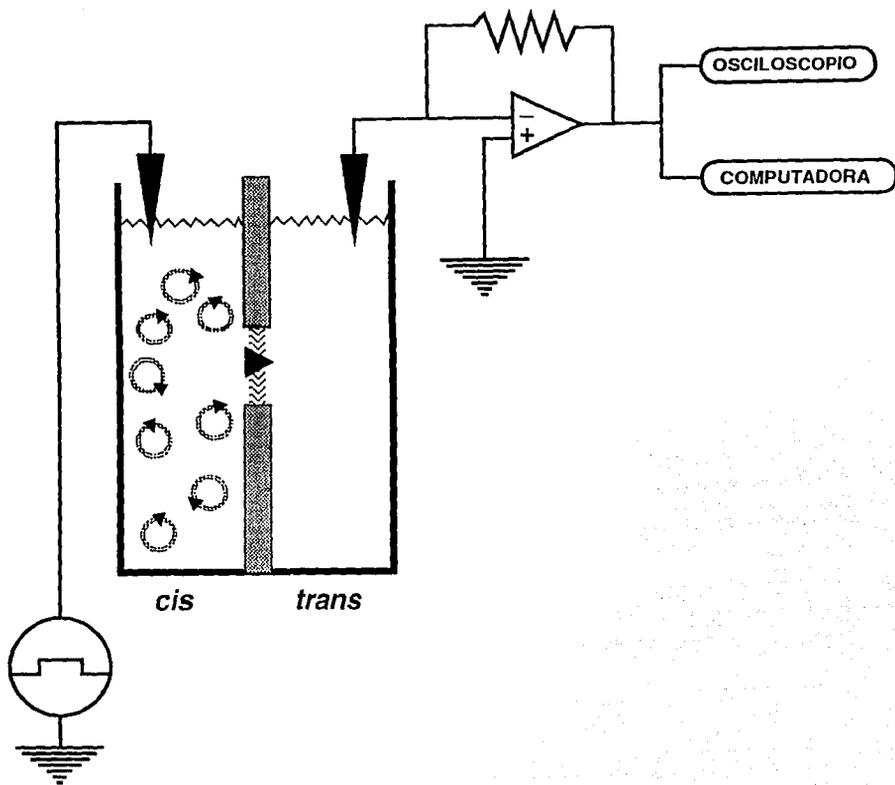


figura 4. Diagrama del sistema de "bicapas planas" utilizado. Este sistema consiste de dos compartimentos acuosos llamados *cis* y *trans*. El lado de la membrana al cual se agregan las vesículas se define como el lado *cis*, mientras que el lado opuesto, *trans*, se conectó al convertidor corriente-voltaje y por ello, fue la tierra virtual. La señal de la corriente procesada, mediante el uso del convertidor analógico digital, fue almacenada, para su análisis posterior, en la computadora designada.

RESULTADOS

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE VESICULAS DE LA MEMBRANA APICAL DE CELULAS EPITELIALES

El rendimiento de tejido intestinal fresco obtenido por cada 100 larvas disectadas fue de aproximadamente 2 g ($n=5$). La membrana de la microvellosidad apical, que contiene al receptor para las δ -endotoxinas, fue obtenida a partir de este material mediante un proceso de purificación por el método de precipitación diferencial con $MgCl_2$, tal y como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. El rendimiento final de recuperación por concentración de proteína total fue cercano al 3% ($n=5$) (tabla 2).

Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de las VMACE obtenidas. La caracterización se dividió en dos etapas: la enzimática y la de inmunodetección.

Los resultados concernientes a la caracterización enzimática obtenidos en las tres últimas preparaciones (que fueron las utilizadas en los experimentos de fusión a bicapas planas) indicaron un enriquecimiento de 9.3 veces en la actividad de la fosfatasa alcalina con respecto a la de la citocromo *c* oxidasa (tabla 2).

Con el objeto de establecer qué porcentaje de la preparación de VMACE contenía el marcador positivo (la enzima fosfatasa alcalina), orientado hacia la cara extracelular, al igual que el receptor de la δ -endotoxina de *B. thuringiensis*, se planteó un experimento adicional que permitiera conocer la vectorialidad de las vesículas en la preparación. Para ello, fue necesario disolver las membranas de tal forma que todas las moléculas de la enzima quedaran expuestas al reactivo del ensayo. Se empleó tritón X100 al 0.02% y se cuantificó la actividad enzimática en presencia y en ausencia de éste. Los resultados señalan que en la preparación, aproximadamente un 90% se encuentra orientado correctamente.

Por último, con el propósito de comprobar que el receptor se encontraba en estado funcional, es decir, capaz de unir específicamente a la toxina CryIC, se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección tipo *dot-blot*, utilizando a la toxina CryIC activada contra una concentración constante de proteína total. Esto se hizo tanto en la preparación final de VMACE como en el homogenado inicial. La toxina unida al receptor se reveló mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal *anti*-CryIC y un segundo anticuerpo *anti*-IgG de ratón acoplado a la enzima peroxidasa. Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 5.

Rendimiento final de VMACEs en base a la concentración de proteína total	2.6 %
Actividad de la enzima fosfatasa alcalina * determinada en la preparación de VMACE	114.8
Actividad de la enzima citocromo <i>c</i> oxidasa * determinada en la preparación de VMACE	13.6
Factor de enriquecimiento en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina con respecto a la actividad de la enzima citocromo <i>c</i> oxidasa	9.8

tabla 2. Promedio de los resultados obtenidos en las últimas tres preparaciones de VMACE obtenidas a partir del tejido intestinal medio de *S. frugiperda* en el último instar.

- * La actividad específica está expresada como nmol/min/mg de proteína.

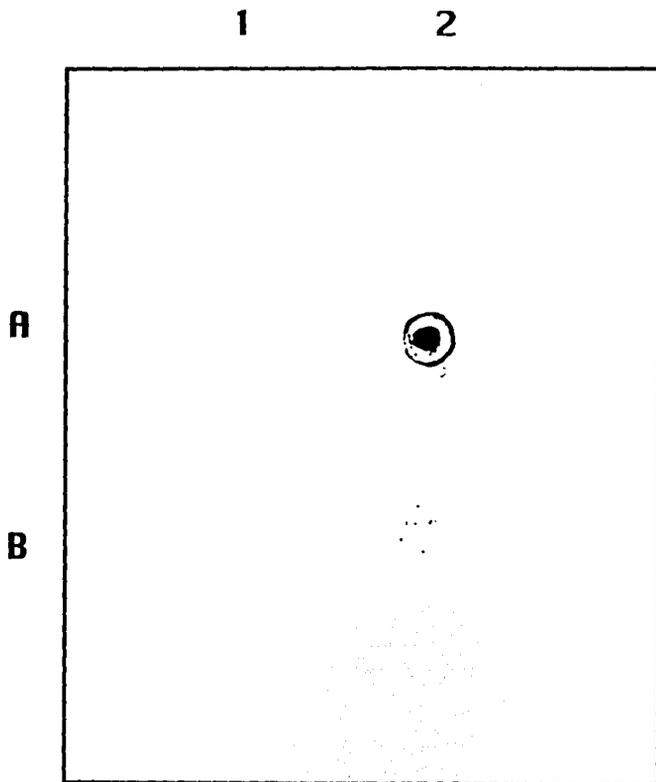


figura 5. Unión de la toxina CryIC a VMACEs (obtenidas a partir de *S. frugiperda* en el último instar) analizada por experimentos tipo *dot-blot*. A1. 20 μ g de VMACE; A2. 20 μ g de VMACE incubados con 10 nM de la toxina. B1. 20 μ g del homogenado inicial; B2. 20 μ g del homogenado incubados con 10 nM de la toxina. La presencia del receptor en estado funcional, para la toxina CryIC en la preparación de VMACE, se demostró por la capacidad de éstas para unir a la toxina de manera específica. La señal obtenida se reveló mediante el uso de un anticuerpo monoclonal, específico para la toxina CryIC y un segundo anticuerpo *anti*-iIgG de ratón acoplado a la enzima peroxidasa.

Los datos anteriores señalan que en las preparaciones de VMACE obtenidas, la membrana de la microvellosidad apical se encuentra enriquecida y presenta al receptor de la toxina CryIC funcional y orientado correctamente.

TOXINA CryIC DE *B. thuringiensis*

La toxina CryIC fue purificada a homogeneidad de acuerdo al protocolo de purificación previamente mencionado en la sección de Materiales y Métodos. El patrón electroforético de ésta demuestra que su peso molecular es próximo a 60 kDa (figura 6) y que la purificación prácticamente carece, tanto de proteínas contaminantes como de productos de degradación (figura 6 y 7).

La determinación de la CL_{50} fue de 361.38 ng/cm² en larvas de *S. frugiperda* pertenecientes al 1er estadio.

Estos resultados indican que la toxina CryIC obtenida cumple con las exigencias planteadas para la realización de este trabajo.

EXPERIMENTOS EN BICAPAS LIPIDICAS PLANAS

Las BLPs obtenidas con difitanoilfosfatidilcolina, fueron estables por más de 1 h ($n=10$) en la solución empleada (KCl 150 mM, tris-HCl 50 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0, en ambos compartimentos).

Bajo las condiciones mencionadas previamente en la sección de Materiales y Métodos, fue posible obtener cotidianamente eventos de fusión de las VMACEs. La figura 8 ilustra los eventos de canal unitario más frecuentemente detectados tras la fusión de las VMACEs a las BLPs (panel A). Estos experimentos se desarrollaron en presencia de un gradiente de KCl 3.7 veces mayor en el compartimento *cis*. A partir de una relación entre el potencial de membrana aplicado y la corriente obtenida (curvas I/V), se calcularon conductancias a nivel de canal unitario de 31, 47, 80 y 91 pS (figura 8, panel B). Los dos primeros, presentan un potencial de inversión cercano a 15 mV, mientras que para los dos últimos, éste fue próximo a -20 mV.

El efecto tras la adición de la toxina CryIC se ilustra en la figura 9. Dos tipos de respuesta se manifiestan independientemente. La primera (panel A), involucra la actividad de canales unitarios, mientras que la segunda (panel B) se revela como un incremento en la conductancia macroscópica, que cae incluso en el rango de nS (inserto en el panel D). Las curvas I/V obtenidas en presencia de un gradiente de KCl 3.7:1 en *cis* con respecto a *trans*, también se presentan en esta figura (panel D).

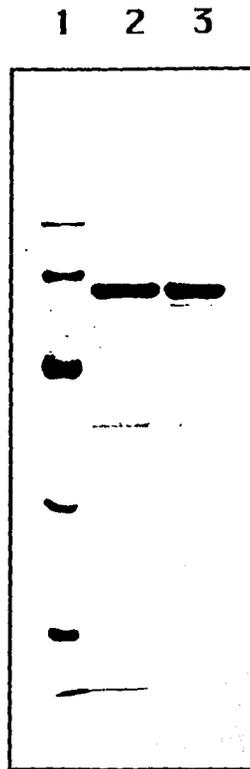


figura 6. Análisis por electroforesis de las purificaciones utilizadas en el desarrollo de este trabajo. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: Marcadores de peso molecular*. Carril 2 y 3. Diferentes preparaciones obtenidas de la toxina CryIC de *B. thuringiensis*. Se utilizó en ambos casos tris-HCl 50 mM, pH 8.5, KCl 150 mM como buffer de elución.

* En orden decreciente: Fosforilasa B 97.4 kDa, Albúmina sérica 66.2 kDa, Ovoalbúmina 45 kDa, Anhidrasa carbónica 31kDa, Inhibidor de tripsina 21.5 kDa, Lisozima 14.4 kDa.

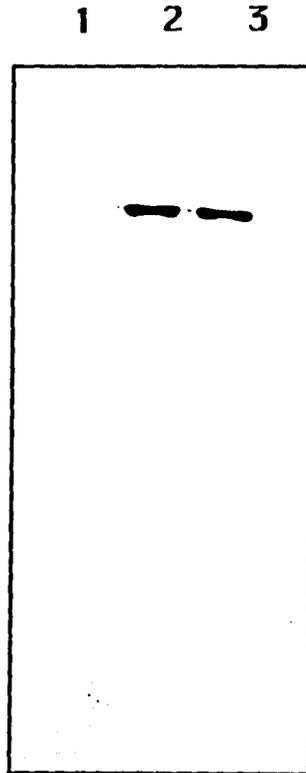


figura 7. Ensayo tipo *western-blot* de las diferentes purificaciones utilizadas en el desarrollo de este trabajo. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes. Carril 1. Marcadores de peso molecular.* Carril 2 y 3. Diferentes preparaciones de la toxina CryIIc de *B. thuringiensis*. La señal obtenida se reveló mediante el uso de un anticuerpo monoclonal, específico para la toxina CryIIc y un segundo anticuerpo *anti*-IgG de ratón acoplado a la enzima peroxidasa.

* En orden decreciente: Fosforilasa B: 97.4 KDa, Albúmina sérica 66.2 kDa, Ovoalbúmina 45. KDa, Anhidrasa carbónica 31KDa, Inhibidor de tripsina 21.5 KDa, Lisozima 14.4 kDa.

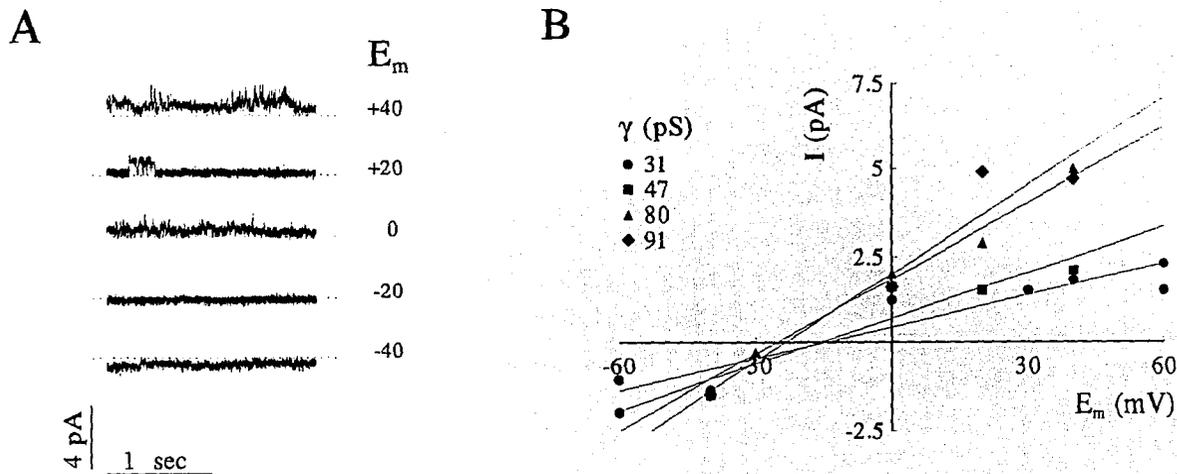


figura 8. Registros de canal unitario representativos (A) y curvas I/V de las transiciones más comunes (B) de VMACEs de *S. frugiperda* fusionadas a BLPs formadas con DPPC. Los registros se obtuvieron en presencia de KCl 550 mM, tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0 en *cis* y KCl 150 mM, tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0 en *trans*. Los potenciales de mantenimiento (E_m) están expresados en mV y se indican a la derecha de cada registro. El nivel cero de corriente se encuentra señalado por líneas punteadas. Se distinguen dos E_R , el primero, cercano a -15 mV, el segundo, próximo a -20 mV.

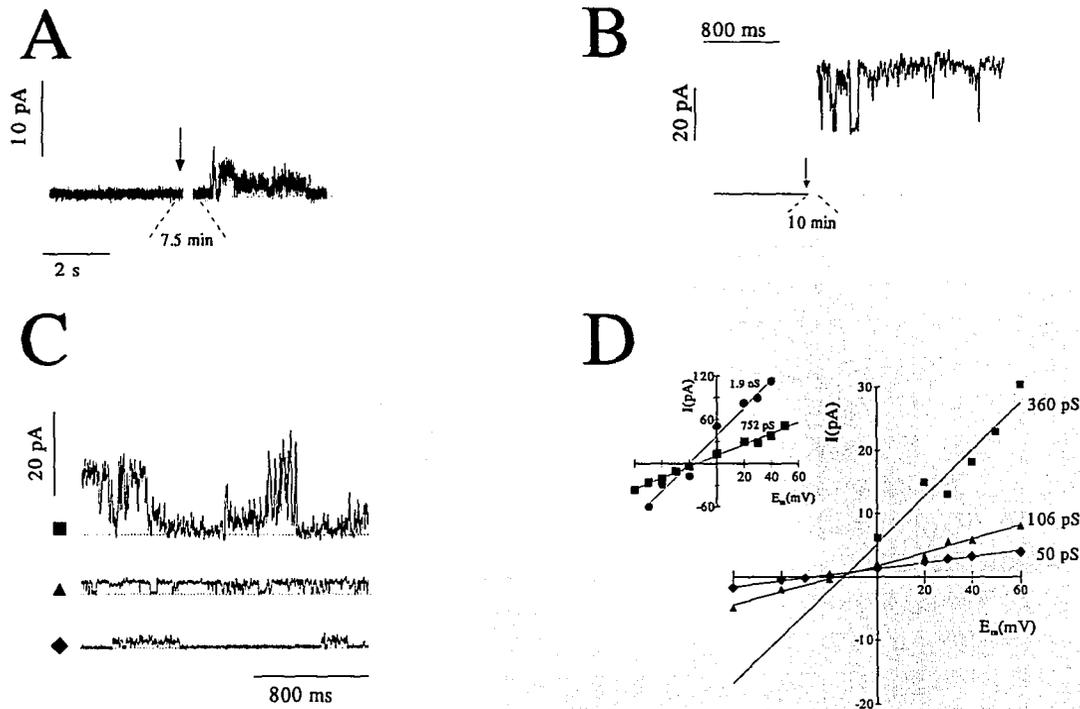


figura 9. Canales catiónicos formados por la toxina CryIC en bicapas con VMACE prefusionadas. Los registros se obtuvieron en presencia de KCl 550 mM, tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0 en *cis* y KCl 150 mM, tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0 en *trans*. (A) transiciones de canal unitario observadas 7.5 min después de la adición de 10.6 nM de la toxina CryIC. (B) respuesta macroscópica observada tras 10 min de la adición de la misma concentración de toxina. Las flechas verticales en A y B indican la adición de la toxina. (C) transiciones de canal unitario representativos a 0 mV de BLPs que contenían VMACEs expuestas de 1.3 a 10.6 nM de la toxina CryIC. Las líneas punteadas indican el nivel cero de corriente. El E_R fue cercano a -20 mV. (D) Curvas I/V de las transiciones de canales unitarios presentadas en la figura C. El inserto colocado en el extremo izquierdo superior de la misma, muestra la curva I/V de la respuesta macroscópica ($\gamma = 1.9$ nS).

señalando un potencial de inversión, para ambos tipos de respuesta, próximo a -20 mV. El análisis del registro de los canales unitarios indica conductancias estimadas de 50, 106 y 360 pS ($n=5$) (panel C y D).

Con el propósito de verificar la capacidad formadora de poro en la toxina CryIC, ésta fue incorporada a bicapas planas, en ausencia de VMACEs y bajo las mismas condiciones que los experimentos descritos anteriormente. La conductancia principal evaluada para este canal fue de alrededor de 100 pS con, al menos, dos estados de subconductancia de 48 y 90 pS. El potencial de reversión fue cercano a -30 mV ($n=3$) (figura 10).

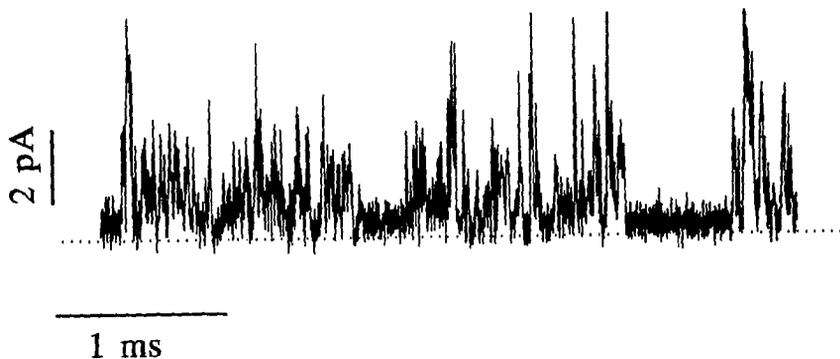


figura 10. Registro de canales unitarios representativos observados tras la adición de la toxina CryIC al lado *cis* de la BLP. El registro se obtuvo en presencia de KCl 550 mM, tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0 en *cis* y KCl 150 mM, tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0 en *trans*. El potencial de mantenimiento para esta sección del registro fue de 60 mV. La línea punteada indica el nivel cero de corriente.

DISCUSION

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE VESICULAS DE LA MEMBRANA APICAL DE CELULAS EPITELIALES

La pureza en las preparaciones de vesiculas de la membrana apical de células epiteliales (VMACE), obtenidas a partir del tejido medio intestinal de *S. frugiperda*, fue caracterizada enzimática e inmunológicamente.

La caracterización enzimática, consistió en el seguimiento de un marcador de la membrana apical y otro de la membrana mitocondrial. Este sistema es una forma común de monitorear proteínas de membrana en procesos de purificación (Evans, 1990; Thomas y McNamee, 1990). La fosfatasa alcalina, aquí empleada como marcador de la membrana apical de las células del epitelio intestinal, ha sido previamente utilizada como un marcador enzimático en microvellosidades de vertebrados y su actividad, en insectos, se encuentra restringida a la porción media intestinal (Wolfersberguer, 1984). De aquí su utilidad para el presente ensayo. Por otra parte, se ha reportado que el contaminante mas frecuente en este tipo de preparaciones es la mitocondria (Wolfersberguer, 1984). Debido a que la citocromo *c* oxidasa es una enzima integral típica de membrana mitocondrial, su actividad fue elegida como un indicador del grado de contaminación en las preparaciones. En las preparaciones obtenidas de VMACE, la actividad de la fosfatasa alcalina fue enriquecida 9.3 veces al compararla con la actividad de la citocromo *c* oxidasa (tabla 2). Dentro de este contexto, factores de enriquecimiento similares han sido reportados para otras especies de insectos lepidópteros (Hoffman y col., 1988; Wolfersberguer y col., 1987).

El proceso de fusión membranal conserva la vectorialidad original (Zimmerberg y col., 1980). Con el fin de asegurar que los ensayos *in vitro* fuesen confiables, fue necesario determinar en la preparación de VMACE el porcentaje que presentaba el receptor para la δ -endotoxina de *B. thuringiensis* orientado correctamente. El método mas común para determinar la ubicación de una proteína de membrana, consiste en medir algún aspecto de su función en presencia y ausencia de un detergente solubilizante (Jones y col., 1990). Nuestros resultados señalan que, en la preparación, aproximadamente un 90% de las vesiculas se encuentra orientado correctamente, por lo que la probabilidad de fusión de una vesicula cuya vectorialidad fuera errónea, fue aceptablemente baja.

Se ha descrito que tras la unión a un receptor específico, localizado en la microvellosidad de las células del epitelio intestinal en el insecto susceptible, la toxina se inserta de manera irreversible en la membrana celular (Knowles y Dow, 1993). Los resultados de los ensayos inmunológicos llevados a cabo durante el desarrollo del presente trabajo, diseñados en

base a esta característica, muestran que la señal es evidente en la preparación de VMACE incubada con la toxina (figura 5, sección A2), lo que no sucede con el homogenado inicial (figura 5, sección B2). Lo anterior indica que en la preparación obtenida, el receptor que reconoce a la toxina CryIC se encuentra enriquecido y en estado funcional.

TOXINA CryIC de *B. thuringiensis*

La pureza de la toxina activada usada en este estudio (figura 6 y 7), reduce la probabilidad de que el efecto sobre la actividad eléctrica se deba a la acción de otro tipo de proteínas. El peso molecular obtenido para esta proteína recombinante coincide con el peso molecular esperado (Honée, G. y col., 1988).

EXPERIMENTOS EN BICAPAS LIPIDICAS PLANAS

Entre los principales atractivos que ofrece la técnica de bicapas planas, se encuentran su capacidad para mediciones eléctricas de alta resolución y el acceso y control sobre el medio ambiente a ambos lados de la membrana. Su principal aplicación en trabajos de reconstitución han sido sobre el estudio de funciones de membrana asociadas con la translocación de cargas a través de la bicapa lipídica, esto es, en canales y bombas. A pesar de tratarse de membranas extremadamente estables, suerte y una extraordinaria paciencia son requeridas (Darszon, 1983).

Las BLPs formadas con la dispersión lipídica utilizada, fueron estables por más de 1 h en las condiciones usadas (KCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.5 mM, pH 9.0, en ambos compartimentos, a un $E_m +50$ mV), tiempo suficiente para que el experimento se lleve a cabo. El criterio de "estabilidad" usado fue la ausencia de cambios en conductancia no específicos.

Se ha propuesto que el proceso de fusión se lleva a cabo debido al contacto de una vesícula surgente con la BLP, con la subsecuente ruptura de ambas en la zona de contacto (Cohen y col., 1980). Con la finalidad de provocar dicha surgencia en la preparación de vesículas, se llevó a cabo el precargado de las mismas con sacarosa (Finkelstein, 1986; Miller y Racker, 1976 en Liévano, 1989). Asimismo, se ha señalado como requisito esencial para el evento de fusión, la existencia de un gradiente osmótico a través de la BLP, con el lado *cis* (el compartimento que contiene a las VMACE) hiperosmótico con respecto al lado *trans* (Cohen y col., 1980). En este trabajo, el precargado de VMACE con sacarosa, así como la creación del gradiente salino transmembranal (3.7 veces mayor en *cis* con respecto a *trans*), incrementaron notablemente la frecuencia de fusión entre las VMACE y las BLPs preformadas.

Bajo las condiciones experimentales usadas en este estudio, el análisis de la actividad iónica propia de las VMACE fusionadas a las BLPs, arrojó valores estimados en conductancia de 31, 47, 80 y 91 pS (figura 8, panel B). Todos los ensayos se llevaron a cabo teniendo una concentración de KCl 3.7 veces más alta en *cis* que en *trans*. El potencial de inversión (o potencial de corriente-cero) determinado para este tipo de transiciones unitarias, fue cercano a -15 mV en los dos primeros y próximo a -20 mV para los dos últimos. El potencial de inversión puede ser empleado para calcular la selectividad del canal entre los iones implicados en el gradiente salino, en este caso, entre iones K⁺ (cationes) y entre iones Cl⁻ (aniones). Las transiciones analizadas pertenecientes a canales cuyo potencial de inversión fue cercano a -15 mV son catión selectivos, con una P_K⁺/P_{Cl}⁻ = 4.3, mientras que aquellos que presentaron un potencial de inversión próximo a -20 mV, son catión selectivos con una P_K⁺/P_{Cl}⁻ = 5.7. En estudios de monitoreo de potencial de membrana, utilizando una sonda fluorescente, llevados a cabo paralelamente en este laboratorio, se determinó que la selectividad de los canales intrínsecos en las VMACE sigue la siguiente serie: NH₄⁺>Cs⁺>K⁺>Li⁺>Na⁺=Rb⁺.

Es importante señalar que en el 60% de los casos (n=20), los canales endógenos de las VMACE perdieron su actividad tras el evento de fusión (*rundown*) y en un 20% restante, la actividad iónica se "lavó" en los primeros minutos (*washout*), por lo que fue imposible caracterizar finamente este tipo de canales iónicos en la mayoría de los experimentos realizados. Este comportamiento ha sido frecuentemente reportado en la literatura en preparaciones obtenidas a partir de diferentes tejidos tanto de moluscos como de vertebrados (Byerly y Hagiwara, 1982; Fenwick y col., 1982 en Hille, 1991) y se ha demostrado que este efecto puede retardarse o incluso revertirse temporalmente, al adicionar ATP, Mg⁺⁺, cAMP o la unidad catalítica de la proteína-quinasa tipo A (Byerly y Hagiwara, 1988; Chad y col., 1987; Doroshenko y col., 1982; Kostyuk y col., 1981 en Hille, 1991). La recuperación en el transiente insinúa que el fenómeno de "lavado" se debe, en parte, a la pérdida de fosforilación. Lo anterior sugiere que dentro de la población de canales iónicos propios de las VMACEs, existen canales regulados por factores celulares importantes para modular o mantener a los canales activos.

El efecto tras la adición de la toxina CryIC a las BLPs con VMACEs prefusionadas a ésta se ilustra en la figura 9. Dos tipos de respuesta se manifiestan de manera independiente. La primera (panel A) involucra la actividad de canales unitarios, mientras que la segunda (panel B) se revela como un incremento macroscópico en la conductancia. Tomando en cuenta que se parte de una preparación heterogénea, es decir, de la membrana apical de las células epiteliales y no de una proteína purificada, es posible que esta variación se deba, fundamentalmente, a la naturaleza o al número de VMACEs preincorporadas a las BLPs, lo que se relaciona directamente con el número de receptores disponibles para la toxina

CryIC durante el ensayo.

El tiempo de respuesta dependió de la concentración de la toxina. Al adicionar bajas concentraciones de ésta (0.6-3 nM) se requirió más de 45 min de espera ($n=13$) antes de observar cualquier tipo de efecto, mientras que a concentraciones mayores (5-10 nM), la respuesta fue inmediata u observada dentro de los primeros 10 min ($n=3$). Esto probablemente se relacione con la probabilidad de encuentro entre la toxina en suspensión y el receptor incorporado a la BLP. A altas concentraciones, la probabilidad de interacción es mayor, lo que disminuye el tiempo de reacción.

Una de las principales aportaciones de este trabajo, radica en la demostración de la actividad iónica de la toxina a concentraciones nM en presencia del receptor preincorporado a la membrana sintética usada. A altas dosis (μM), algunas toxinas Cry, aparentemente, son capaces de dispensar del receptor e insertarse en bicapas fosfolípicas artificiales, provocando la aparición de canales iónicos (English y col., 1991; Haider y Ellar, 1989; Slatin y col., 1990; Yunovitz y Yawetz, 1988). Sin embargo, en presencia de la membrana de la microvellosidad epitelial, obtenida a partir del insecto susceptible, se reduce la dosis de toxina requerida en, al menos, tres órdenes de magnitud. Los resultados obtenidos en este trabajo, coinciden con datos anteriormente reportados, en otros sistemas (English y col., 1991), probando además que el cambio en la permeabilidad se debe a la formación de canales iónicos por la toxina CryIC.

El análisis del registro de los canales unitarios señala conductancias estimadas de 50, 106 y 360 pS ($n=5$) (figura 9, panel C y D). Diversos grupos de investigación, al trabajar con distintas toxinas Cry en ausencia del receptor, han señalado un comportamiento similar. Slatin y col. (1990), tras incorporar a las toxinas CryIA(c) y CryIIIA y observar en ellas más de un nivel de conductancia, sugirieron que éstos probablemente se deben a diferentes estados de agregación en las proteínas. Schwartz y col. (1993), al incorporar a la toxina CryIC, reportaron la formación de varios tipos de canales iónicos, con diferentes comportamientos cinéticos. Al respecto proponen que el modo de formación del canal, dependiendo de las condiciones prevalientes al momento de la inserción, pudiera formarse por una sola proteína o por una asociación oligomérica. Walters y col. (1993), al incorporar en BLPs a la toxina CryIA(c) así como a fragmentos obtenidos a partir de ésta por hidrólisis enzimática (los que, presumiblemente, pertenecen al dominio I de la toxina completa), discuten que los estados de conductancia obtenidos, son el resultado de la agregación y/o del disparo cooperativo de pequeñas unidades formadoras de poro. Por lo anterior, y en base a nuestros resultados, es plausible pensar que las diferencias en los valores de conductancia se deben a distintos estados de agregación en la toxina, que culminan con la

formación de un poro estable.

Las curvas I/V obtenidas a partir tanto de los eventos unitarios como de la respuesta macroscópica, medidos en presencia del gradiente salino, indican que los canales activados por la toxina son catiónicos (figura 9, panel C y D). Diversas δ -endotoxinas han sido incorporadas a BLPs en ausencia del receptor (Schwartz y col., 1993; Slatin y col., 1990; Von Tersch y col., 1994; Walters y col., 1993). A pesar de que la selectividad de cationes sobre aniones varía para cada una de ellas, en todos los casos, los canales formados son de naturaleza catiónica. Nuestros resultados únicamente contrastan con aquellos reportados en experimentos de permeabilidad directa medidos sobre líneas celulares (Knowles y Ellar, 1987) y sobre vesículas obtenidas a partir de la microvellosidad epitelial (Carroll y Ellar, 1993), donde se concluye que las toxinas Cry probadas inducen la formación de un poro permeable a cationes, aniones y moléculas no cargadas de un tamaño incluso mayor a la sacarosa. Sin embargo, este tipo de ensayos analizan la respuesta tras 1 h de incubación con la toxina. Schwartz y col. (1991), al trabajar con la línea celular Sf9 de *S. frugiperda*, proveniente de tejido ovárico señalan, como efecto inicial de la toxina CryIC, un incremento en la concentración de Ca^{++} intracelular. Este evento se encuentra asociado al desencadenamiento de múltiples procesos que incluyen la activación de diversos canales iónicos. Es por esto que el análisis del efecto tóxico debe evaluarse en los primeros minutos. Una interpretación posterior debe ser considerada con reservas. Los estudios de monitoreo de potencial de membrana, llevados a cabo paralelamente en este laboratorio, concluyen que la selectividad de los canales formados por la toxina CryID sigue el siguiente patrón: $K^+ > NH_4^+ > Na^+ > Rb^+ > Li^+ > Cs^+$.

La respuesta a la toxina CryIC se observó en 15/17 casos, lo que representa el 88% de los experimentos realizados. La conductancia total en estos ensayos, evaluada por medio de histogramas de amplitud (considerando en éstos el valor de la corriente máxima), fue incrementada en un rango de 2 a 40 veces. Si se llevaran a cabo estudios similares, a concentraciones constantes tanto de la toxina CryIC como del receptor, de ésta purificado a homogeneidad, se debiera generar el mismo tipo de respuesta inmediata.

Durante el desarrollo de este trabajo, se estudió la formación de canales iónicos por la toxina CryIC en ausencia del receptor. Se demostró que el producto del gen *cryIC*, activado mediante la digestión con tripsina, es capaz de formar canales iónicos en bicapas planas. Al igual que en el caso de otras proteínas Cry, los canales obtenidos son selectivos a cationes y no se observó actividad iónica a menos que una concentración mayor a 5 μ M se adicionara ($n=25$) (Schwartz y col., 1993; Slatin y col., 1990; Von Tersch y col., 1994; Walters y col., 1993). El estado de conductancia principal así como los estados de subconductancia

evaluados, rinden valores próximos a los reportados anteriormente para esta toxina ($n=3$) (Schwartz y col., 1993). El complejo patrón de actividad, juzgado por el ruido en los estados abiertos del canal formado, pudiera deberse a la inestabilidad de la toxina en la membrana sintética (Von Tersch y col., 1994).

El efecto tóxico inicial producido por las δ -endotoxinas involucra teóricamente, al menos, tres etapas: la recepción de la proteína por una molécula específica, localizada en la superficie del epitelio intestinal en el insecto susceptible (esto es, el receptor para la δ -endotoxina de *B. thuringiensis*); la intercalación de la toxina en la membrana plasmática y, finalmente, la formación del poro, que conducirá al desbalance iónico cuya consecuencia será la citólisis (English y Slatin, 1992).

El papel del receptor dentro del mecanismo de acción propuesto para las toxinas Cry, ha sido ampliamente discutido. En el trabajo de Knowles y Dow (1993) se proponen las siguientes alternativas:

a. El receptor, por sí mismo, es un canal transmembranal inactivo, cuya actividad depende de su unión a la toxina.

Si esto fuese cierto, sin excepción, debería existir una correlación directa entre la unión de la toxina al tejido blanco con la formación del poro. Sin embargo, se ha reportado que la toxina CryIA(c) se une con alta afinidad a membranas obtenidas a partir del insecto *S. frugiperda*, ante el cual, no es tóxica. Lorence y col. (1995) demostraron que esta toxina fue incapaz de alterar la permeabilidad en VMACE obtenidas a partir de este mismo insecto. Por otra parte, las toxinas CryIA(b) y CryIA(c) que se unen al mismo receptor en *L. dispar*, muestran una relación inversa al comparar su afinidad de unión, *versus* su capacidad para incrementar la permeabilidad en la membrana (Knowles y Dow, 1993).

b. El complejo toxina-receptor forma el poro.

Si esta hipótesis fuera correcta, las características de los canales observados en presencia y en ausencia del receptor deberían ser distintas. Posiblemente, este proceso se lleve a cabo *in vivo*, sin embargo, existen pocos datos al respecto. Wolfersberguer (comunicación personal en Knowles y Dow (1993)), al incorporar a la proteína CryIA(c) en BLPs, tanto en presencia como en ausencia de VMACEs obtenidas a partir del insecto susceptible *M. sexta*, señala que los canales iónicos formados son distintos, tanto en conductancia como en propiedades cinéticas. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo son similares a los anteriormente citados. La magnitud de los estados conductivos desplegados por la toxina en presencia de la membrana epitelial, se encuentran dentro de un intervalo mas amplio que los determinados al

analizar la actividad iónica producida únicamente por la toxina CryIC. La selectividad a cationes es mayor en los canales formados por la toxina en ausencia del receptor. El comportamiento cinético que exhiben los canales, en ambas condiciones, igualmente difiere. Finalmente, la inestabilidad mostrada en los canales formados por la toxina CryIC en presencia de la membrana de la microvellosidad, juzgada por el "ruido" en los estados abiertos del canal, es menor que la observada en canales generados tras la incorporación de esta proteína a la BLP en ausencia de VMACEs, lo que sugiere un estado conformacional distinto en ambas condiciones.

c. El receptor incrementa la concentración efectiva de la toxina en la superficie de la membrana sin participar en la formación del poro.

Se ha discutido que una posible función del receptor, sea la de catalizar la formación del canal, favoreciendo la inserción de la toxina en la membrana mediante un arreglo oligomérico especial. De esta forma, igual se podría explicar la divergencia encontrada entre los canales formados en presencia y en ausencia de la membrana epitelial. Esta hipótesis aclararía la capacidad de distintas δ -endotoxinas para formar canales iónicos en BLPs en ausencia del receptor, siempre y cuando se empleen altas concentraciones de la toxina (Lorence y col., 1995; Schwartz y col., 1993; Slatin y col., 1990; Von Tersch y col., 1994; Walters y col., 1993).

d. La unión al receptor dispara un cambio conformacional en la toxina, que la capacita para insertarse en la membrana.

Este modelo implica que el receptor es esencial para la formación del poro, ya que sin éste, la toxina no podría insertarse en la membrana. Se ha propuesto que un cambio conformacional pudiera ser alternativamente generado por el pH alcalino prevaleciente en el intestino del insecto, o bien, por la proximidad de la toxina a la membrana hidrofóbica (Knowles y Dow, 1993). Butko y col. (1994) demuestran, en vesículas fosfolípidicas en ausencia del receptor, que la capacidad de inserción en la toxina CryIC se incrementa de manera notable al probar pH ácidos o bien, fosfolípidos ácidos. Lo anterior sugiere que la unión entre el receptor y la toxina de *B. thuringiensis*, a pesar de ser importante, no es el único factor involucrado en el proceso tóxico.

En este trabajo, se demuestra que el receptor juega un papel fundamental en la actividad insecticida de las δ -endotoxinas producidas por *B. thuringiensis*. Los datos aquí presentados, apoyan la propuesta según la cual el papel del receptor no solo se limita a la unión específica con la toxina de *B. thuringiensis* (incrementando la concentración local de la misma), sino también, cataliza la formación del canal, estabilizándolo.

Probablemente el receptor participe de manera directa en la formación del poro, y debido a esto, las características de los canales formados en presencia y ausencia de VMACE presenten diferencias entre sí. Si bien es cierto que diversas δ -endotoxinas son capaces de exhibir actividad formadora de poro, debemos considerar que la dosis requerida para observar dicho efecto es mil veces mayor. Este hecho, aunado a las claras diferencias en la magnitud, selectividad, y propiedades cinéticas de los canales formados en presencia de la membrana epitelial, pudieran sugerir que el mecanismo de formación del poro, es distinto en ausencia del receptor. Estudios en distintos sistemas experimentales, en los que se estudie el efecto de diversas toxinas en presencia del receptor purificado, resolverían el papel del receptor en el proceso tóxico. Por último, atendiendo a los esfuerzos llevados a cabo por distintos grupos involucrados en el esclarecimiento de la naturaleza del receptor, es probable que, *in vivo*, la formación del canal dependa de distintos componentes de membrana, necesarios para catalizar la intercalación efectiva de la toxina en ésta.

CONCLUSION

En este trabajo se presenta evidencia adicional que sustenta la propuesta según la cual las membranas aisladas de la microvellosidad apical a partir del tejido intestinal (VMACE), en el insecto susceptible, contienen al receptor funcional, para la toxina de *B. thuringiensis*.

En bicapas lipídicas sintéticas, tras la interacción de la toxina CryIC con su receptor, se induce un incremento en la permeabilidad de la membrana a cationes mediante la formación de canales iónicos. Los canales observados, difieren en magnitud, selectividad y propiedades cinéticas con aquellos formados en ausencia del receptor.

La respuesta a la toxina CryIC en presencia de VMACE se obtuvo a dosis nM, lo que correlaciona con la concentración letal determinada por medio de bioensayos en larvas del insecto susceptible; *S. frugiperda*.

Los resultados sugieren que el proceso de citólisis en la larva del insecto susceptible, es la consecuencia de la formación del poro catiónico, mediado por el receptor e inducido por la toxina.

LITERATURA CITADA

- de Barjac y E. Frachon (1990). Clasificación de *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, **35**: 233-240.
- Bradford, M. (1987). Adaptación de the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopiranoside detergents. *Anal. Bioch.*, **162**: 11-17.
- Bravo, A. y col. (1992). Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invert. Pathol.*, **60**: 247-253.
- Brunke, K. J. y R. L. Meeusen (1991). Insect control with genetically engineered crops. *TibTech*, **9**: 197-200.
- Butko, P. y col. (1994). Membrane interactions and surface hidrophobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIC. *FEBS Lett.*, **340**: 89-92.
- Chambers, J. A. y col. (1991). Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *alzawaili*. *J. Bacteriol.*, **173**: 3966.
- Cohen, F. y col. (1980). Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. II. Incorporation of a vesicular membrane marker into the planar membrane. *J. Gen. Physiol.*, **75**: 251-270.
- Crawford, D. N. y W. R. Harvey (1988). Barium and calcium block *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* δ -endotoxin inhibition of potassium current across isolated midgut of larval *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, **137**: 277-286.
- Darszon, A. (1983). Strategies in the reassembly of membrane proteins into lipid bilayer systems and their functional assay. *J. Bioenerg. and Biomem.*, **15**: 321-334.
- Denolf, P. y col. (1993). Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Env. Microbiol.*, **59**: 1828-1837.
- Donovan, W. P. y col. (1992). Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to coleoptera species. *Appl. Env. Microbiol.*, **58**: 3921-3927.

Dulmage, H. T. (1981). Insecticidal activity of isolated of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. EN Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980. Editor H. Burges. Academic Press. Inglaterra. pp. 193-222.

English, L. H. y col. (1991). Delta-endotoxin-induced leakage of $^{86}\text{Rb}^{+}\text{-K}^{+}$ and H_2O from phospholipid vesicles is catalysed by reconstituted midgut membrane. *Insect Biochem.* **21**: 177-184.

English, L. H. y S. L. Statin (1992). Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**: 1-7.

Evans, H. (1990). Organelles and membranes of animal cells. EN Biological membranes - a practical approach -. Editores C. Findlay y H. Evans. IRL Press at Oxford University Press. EUA. pp. 19-21, 29-31.

Feitelson, J. S. y col. (1992). *Bacillus thuringiensis* : Insects and beyond. *Bio/Technology.* **10**: 271-275.

Ferré, J. y col. (1991). Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 5119-5123.

Ferro, D. (1993). Potential for resistance to *Bacillus thuringiensis* colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) : a model system. *Am. Entomol.* **39**: 38-44.

Foncerrada, L. y col. (1992). Novel coleopteran-active *Bacillus thuringiensis* isolate and a novel gene encoding coleopteran-active toxin. *Eur. Pat. Appl. N.* 498 537 A2.

García-Soto, J. y col. (1988). Sea urchin sperm head plasma membranes: characteristics and egg jelly induced Ca^{2+} and Na^{+} uptake. *Biochem. Biophys. Acta.* **944**: 1-2.

Garczynski, S. F. y col. (1991). Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 2816-2820.

Ge, A. Z. y col. (1989). Location of the *Bombyx mori* specificity domain on a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4037-4041.

Ge, A. Z. y col. (1991). Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 17951-17958.

Geiser, M. y col. (1986). The hypervariable region in the genes coding entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Nucleotide sequence of the *kurdh1* gene of subsp. *kurstaki*. *Gene*. **48**: 109-118.

Giveave, A. P. y col. (1992). Identification of insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* DS1R517 with significant sequence difference from previously described toxins. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 844-851.

Golberg, L. y J. Margalit (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sarengelii*, *Uranatena unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosquito News*. **37**: 355-358.

Goldburg, J. R. y G. Tjaden (1990). Are B. t. k. plants really safe to eat? *Bio/Technology*. **8**: 1011-1015.

Haider, M. Z. y D. J. Ellar (1989). Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin. Single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. *J. Mol. Biol.* **208**: 183-194.

Haider, M. Z. y D. J. Ellar (1989). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*. **978**: 216-222.

Harlow, E. y D. Lane (1988). EN Antibodies - a laboratory manual - . *Cold Spring Harbor Laboratory*. EUA. p. 597.

Hendrickx, K. y col. (1990). Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin on the permeability of brush border membrane vesicles from tobacco hornworm (*Manduca sexta*) midgut. *Comp. Biochem. Physiol.* **95C**: 241-245.

Hille, B. (1991). Ionic channels of excitable membranes. 2a ed. *Sinauer Associates Inc.* EUA. pp. 90, 178-180.

Hofmann, C. y col. (1988). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**: 7844-7848.

Höfte, H. y H. R. Whiteley (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**: 242-255.

Höfte, H. R. y col. (1992). Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Env. Microbiol.* **58**: 2536-2542.

Honée, G. y col. (1988). Nucleotide sequence of a crystal protein gene isolated from *Bacillus thuringiensis* subspecies *entomocidus* 60.5 coding for a toxin highly active against *Spodoptera* species. *Nucleic Acid Res.* **16:** 6240-6240.

Jones, O. y col. (1990). Solubilization and reconstitution of membrane proteins. En *Biological membranes - a practical approach - Editores C. Findlay y H. Evans. IRL Press at Oxford University Press.* EUA. pp. 160-161.

Knight, P. y col. (1994). The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* **11:** 429-436.

Knowles, B. H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect Physiol.* **24:** 275-308.

Knowles, B. H. y D. J. Ellar (1986). Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific δ -endotoxin. *J. Cell Sci.* **83:** 89-101.

Knowles, B. H. y D. J. Ellar (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificities. *Biochem. Biophys. Acta.* **924:** 509-518.

Knowles, B. H. y J. A. T. Dow (1993). The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays.* **15:** 469-476.

Krieg, A. y col. (1983). *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: Ein neuer gegenüber Larven von Coleopteran wirksamer pathotyp. *Z. Angew. Entomol.* **96:** 500-508.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London).* **227:** 680-685.

Lambert, B. y col. (1992). Nucleotide sequence of gene *cryIIID* encoding a novel Coleoptera-active crystal protein from strain BT1109P of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Gene.* **110:** 131-132.

Lereclus, D. y col. (1989). Role, structure, and molecular organization of the genes coding for the parasporal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. En *Regulation of prokaryotic development. Editores I. Smith, R. Speckley y J. Setlow. Am. Soc. Microbiol.* EUA. pp. 256-276.

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

Liévano, A. (1989). Caracterización de canales de calcio de la membrana plasmática del espermatozoide de erizo de mar. TESIS DOCTORAL. CINVESTAV.

Lorence, A. y col. (1995). δ -endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspension and in planar lipid bilayers. ACEPTADO EN: *FEBS Lett.*

Minh, J. (1984). Técnicas eficientes para la crianza masiva de infestación de insectos, en la selección de plantas hospedantes para resistencia al gusano de la mazorca o elotero *Heliothis zea*. Folleto técnico. Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y Trigo.

Müller, P. y D. O. Rudin (1969). EN Laboratory techniques of membrane biophysics. Editores M. Passow y R. Stampfli. Alemania. pp. 141-156.

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

Sacchi, V. F. y col. (1986). *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient dependent-amino acid transport across the brush border membrane of *Pteris brassicae* midgut cells. *FEBS Microbiol. Lett.* **204**: 213-218.

Sanchis, V. F. y D. J. Ellar (1993). Identification and partial purification of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin binding protein from *Spodoptera littoralis* gut membranes. *FEBS*. **316**: 264-268.

Sangadala, S. y col. (1994). A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and ⁸⁶Rb⁺-K⁺ efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**:10088-10092.

Schnepf, H. E. y col. (1990). Specificity-determining regions of a lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **265**: 20923-20930.

Schwartz, J.-L. y col. (1991). Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: involvement of calcium and anionic channels. *Biochem. Biophys. Acta.* **1065**: 250-260.

Schwartz, J.-L. y col. (1993). Lepidopteran-specific crystal toxins from *Bacillus thuringiensis* form cation- and anion-selective channels in planar lipid bilayers. *J. Mem. Biol.* **132**: 53-62.

Singh, F. (1977). Artificial diets for insects, mites and spiders. *Plenum Publishing Co. New York.*

Slatin, S. L. y col. (1990). Delta-endotoxins form cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **169**: 765-772.

Starnes, L. R. y col. (1993). History, use, and future of microbial insecticides. *Am. Entomol.* **39**: 83-93.

Thomas, T. y M. McNamee (1990). Purification of membrane proteins. EN Guide to protein purification. *Editor M. Deutscher, Academic Press. EUA.* p. 503.

Towbin, H. y col. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350-4354.

Vachon, V. y col. (1993). *Biophys. J.* **64**: A14 (M-PM-H3).

van Rie, J. y col. (1989). Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins - Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects -. *Eur. J. Biochem.* **186**: 239-247.

Visser, B. y col. (1990). A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua* specific crystal protein. *J. Bacteriol.* **172**: 6783-6788.

von Tersch, M. A. y col. (1994). Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIb2 and CryIIIb2 domain I peptide. *Appl. Env. Microbiol.* **60**: 3711-3717.

Wabiko, H. y col. (1985). Only part of the protoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 is necessary for insecticidal activity. *Appl. Env. Microbiol.* **49**: 706-708.

Walters, F. S. y col. (1993). Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **196**: 921-926.

Wolfersberger, M. (1984). Enzymology of plasma membranes of insect intestinal cells. *Am. Zool.* **24**: 187-197.

Wolfersberger, M. (1991). Short communication -Inhibition of potassium-gradient-driven phenylalanine uptake in larval *Lymantria dispar* midgut by two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins correlates with the activity of the toxins as gypsy moth larvicides -. *J. Exp. Biol.* **161**: 519-525.

Wolfersberger, M. y col. (1987). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**: 301-308.

Wu, D. y A. I. Aronson (1990). Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin involved in toxicity and specificity. *J. Biol. Chem.* **267**: 2311-2317.

Yunovitz, H. y A. Yawetz (1988). Interaction between the δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* ssp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Lett.* **230**: 105-108.

Zimmerberg, J. y col. (1980). Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. I. Discharge of vesicular contents across the planar membrane. *J. Gen. Physiol.* **75**: 241-250.