



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**Evaluación del efecto potenciador de la chaperona Hsp70
sobre la toxicidad de mutantes de la proteína Cry1Ab en
el lepidóptero *Manduca sexta*.**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

TAMARA ALEJANDRINA SANCHEZ CONDE

DIRECTORA DE TESIS

DRA. BLANCA INÉS GARCÍA GÓMEZ

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2023



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Blanca Inés García Gómez.

Para este proyecto se contó con el apoyo económico para estudiantes por parte de la unidad de docencia del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Miembros del comité revisor:

Dr. Guadalupe Peña Chora

Dra. María Del Carmen Beltrán Núñez

Dra. Blanca Inés García Gómez

Dr. Ramon Suarez Rodríguez

Dr. Enrique Salas Vidal

Desde el fondo de mi corazón
a mis padres y mi abue Eve
Siempre gracias

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Alejandrina y Pedro, por siempre impulsarme a lograr lo que me propongo y apoyarme en hacer lo que más me gusta. Porque sé el inmenso esfuerzo que hacen todos los días por que no me falte nada. A mi padre por ser un ejemplo de ingenio y curiosidad desde que tengo memoria y a mi madre por inculcarme resiliencia y mucha dedicación, pero sobre todo a ambos por criarme con amor.

A mi abue Evelia porque cada día después de clases tenía la certeza de que iba a llegar a ser escuchada con paciencia y amor. Por tu apoyo económico que agradezco inmensamente y por darme los mejores consejos y enseñanzas de vida. Gracias por siempre apapacharme.

A la Dra. Blanca Inés García Gómez por abrirme las puertas para trabajar a su lado y ser un ejemplo desde el día uno de habilidad y dedicación. Por su inagotable paciencia para enseñarme desde cero mucho de lo que hoy sé y sobre todo por la confianza en mí.

Al Dr. Mario Soberón Chávez y a la Dra. Alejandra Bravo por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y depositarme su confianza en este proyecto. Además de su apoyo económico que fue fundamental en este trabajo.

A la Dra. Isabel Gómez y al Biol. Jorge Sánchez por ser indispensables en mi aprendizaje. Por resolver mis múltiples dudas y apoyarme en la correcta realización de diferentes técnicas. Gracias por su paciencia y palabras de aliento.

A la Biol. Lizbeth Cabrera encargada del insectario, por su eficiencia al proporcionar los ejemplares necesarios para la realización de este proyecto y por su amabilidad y al Técnico Laboratorista Sergio Blancas por proporcionar el material necesario para los experimentos realizados.

A los compañeros de laboratorio quienes siempre estuvieron dispuestos a guiarme y ser amigables.

A mis sinodales el Dr. Guadalupe Peña Chora, la Dra. María Del Carmen Beltrán Núñez, la Dra. Blanca Inés García Gómez, el Dr. Ramon Suarez Rodríguez y el Dr. Enrique Salas Vidal por sus consejos y sus preguntas que sin duda me hicieron mejorar y obtener el trabajo de calidad que se estaba buscando.

A esos dos amigos, que vivieron todo este viaje conmigo, que me animaron y estuvieron en los momentos más difíciles, y los mejores sin duda. Gracias por no dejarme caminar sola cuando salía tardísimo, por preocuparse por mis comidas, mis descansos y mi salud. Por hacerme reír muchísimo y por darme recuerdos que atesoraré siempre. Siempre serán mis “rayos láser”.

A cada uno de los profesores, amigos y académicos que moldearon mi camino académico, gracias.

ÍNDICE

	PAG
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Bioplaguicidas	1
1.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> como bioplaguicida.....	1
1.3 Proteínas Cry.....	2
1.3.1 Proteínas Cry1Ab	2
1.3.2 Estructura.....	2
1.3.3 Mecanismo de acción en lepidópteros.....	3
1.4 Receptores.....	5
1.4.1 Receptor Fosfatasa Alcalina (ALP).....	5
1.4.2 Receptor Aminopeptidasa-N (APN).....	5
1.4.3 Receptor Caderina	6
1.5 Mutantes de Cry1Ab.....	7
1.6 Chaperonas moleculares	7
1.7 Chaperona Hsp70.....	8
1.7.1 Estructura.....	8
1.7.2 Mecanismo de acción	9
2 ANTECEDENTES	10
2.1 Hsp70 aumenta la toxicidad de las toxinas Cry1A	10
2.2 Interacción de la mutante Cry1Ab-G439D con chaperonas moleculares	10
3 JUSTIFICACIÓN	12
4 HIPÓTESIS	12
5 OBJETIVOS.....	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos particulares	12
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
6.1 Cepas.....	13
6.2 Producción de espora cristal	13
6.3 Solubilización de las protoxinas Cry	13
6.4 Cultivo, expresión y purificación de la proteína Hsp70	13

6.5	Cultivo, expresión y purificación del fragmento de Caderina CR12.....	14
6.6	Bioensayo de toxicidad.....	14
6.7	Ensayos de unión tipo ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)15	
6.7.1	Ensayo de unión de la proteína Hsp70 a la protoxina Cry1Ab silvestre y mutantes.	15
6.7.2	Ensayo de unión de la protoxina Cry1Ab-G439D más la proteína Hsp70 al fragmento de Caderina CR12.....	15
7	RESULTADOS.....	16
7.1	Producción de protoxina silvestre y mutante Cry1Ab.....	16
7.2	Producción de la chaperona Hsp70.....	16
7.3	Producción del receptor CR12.....	17
7.4	Bioensayo de toxicidad de Cry1Ab silvestre y mutantes con chaperona Hsp70... 18	
7.5	Ensayo de unión de la chaperona Hsp70 a la protoxina Cry1Ab silvestre y mutantes.	19
7.6	Ensayo de unión de la protoxina Cry1Ab-G439D más la proteína Hsp70 al fragmento de Caderina CR12	20
8	DISCUSIÓN.....	21
9	CONCLUSIÓN.....	24
10	PERSPECTIVAS.....	25
	BIBLIOGRAFÍA	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Manduca sexta</i>	1
Figura 2. Microfotografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopio electrónico de transmisión	2
Figura 3. Modelo de la estructura tridimensional de la proteína Cry1Ab	3
Figura 4. Posición de la digestión por las proteasas	4
Figura 5. Modelo del mecanismo de acción de las Cry-3D a nivel molecular sobre larvas de lepidóptero	5
Figura 6. Organización de los fragmentos de caderina en <i>Manduca sexta</i>	6
Figura 7. Moléculas receptoras de proteínas Cry1A	7
Figura 8. Estructura abierta y cerrada de la Hsp70	9
Figura 9. Mortalidad de <i>P. xylostella</i> en presencia de protoxina Cry1Ac y Hsp70	10
Figura 11. Unión de la protoxina Cry1Ab-G439D en diferentes concentraciones al fragmento de caderina CR12 en presencia y ausencia de la chaperona Hsp90	11
Figura 10. Ensayos de mortalidad de <i>Plutella xylostella</i> utilizando protoxina Cry1AbR99E, Cry1AbE129K y Cry1AbG439D en ausencia y presencia de Hsp90.	11
Figura 12. Protoxinas silvestre y mutantes analizadas en gel SDS-PAGE al 10%.	16
Figura 13. Expresión y purificación de la chaperona Hsp70.....	17
Figura 14. Expresión y purificación del fragmento de Caderina CR12.	17
Figura 15. Ensayos de toxicidad de la protoxina silvestre Cry1Ab	18
Figura 16. Ensayos de toxicidad de las protoxinas mutantes de Cry1Ab	19
Figura 17. Unión de la chaperona Hsp70 a las protoxinas Cry1Ab silvestre, Cry1Ab-G439D, Cry1Ab-F371A, Cry1Ab-R99E y Cry1Ab-E129K	20
Figura 18. Unión de las protoxina Cry1Ab-Wt y Cry1Ab-G439D al fragmento de Caderina CR12.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS

% w/v	Por ciento peso-volumen
% v/v	Por ciento volumen-volumen
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
ALP	Receptor Fosfatasa Alcalina
APN	Receptor Aminopeptidasa-N
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CR	Repetido del receptor Caderina
Cry	Toxina en forma de cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i>
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
<i>g</i>	Gravedad
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Hora
HCT	Hydrolysate of casein tryptone
Hsp	Proteína de Choque Térmico
Kd	Constante de disociación
kDa	Kilodaltones
mL	Militro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
pH	Indicador logarítmico del número de iones de hidrógeno
PBS	Buffer de Fosfatos y Sales
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

SDS-PAGE

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio

Wt

Tipo silvestre

RESUMEN

Actualmente, las bacterias formadoras de esporas, tales como *Bacillus thuringiensis* son las más ampliamente utilizada como bioplaguicidas (Kumar et al., 2021). Su método de acción se basa en la producción de protoxinas Cry y Cyt formadoras de poro, las cuales causan la muerte del insecto hospedero.

Previamente García-Gómez y colaboradores (2019) encontraron que la chaperona Hsp70 aumenta la toxicidad de la proteína Cry1Ac al protegerla de la proteólisis en el intestino de larvas de *Plutella xylostella*. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de dicha potenciación tóxica. Para entender estos mecanismos, mediante bioensayos, se caracterizó la actividad potenciadora de la chaperona Hsp70 sobre tres proteínas mutantes de Cry1Ab que perdieron su toxicidad al lepidóptero *Manduca sexta*. Dichas mutaciones puntuales en aminoácidos específicos afectan la interacción con receptores como en el caso de la toxina Cry1Ab-G439D (Rodríguez-Almazán et al., 2009), la etapa de oligomerización como en la Cry1Ab-R99E (Jiménez-Juárez et al., 2007), o en la inserción en la membrana como en la Cry-E129K (Rodríguez-Almazán et al., 2009). En el presente trabajo se realizaron ensayos tipo ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) así como bioensayos de toxicidad que permitieron esclarecer el posible papel de la interacción de la chaperona Hsp70 con la toxina Cry1Ab y su receptor (cadherina).

1 INTRODUCCIÓN

El orden Lepidoptera es el segundo grupo más rico en cuanto a diversidad dentro de los insectos, contienen más de 200.000 especies, muchas de las cuales se consideran plagas importantes de diversos cultivos (Perotti y Gamundi, 2007; Rivas y Martínez, 2012).

Las pérdidas económicas y costos elevados dentro de la producción agrícola que estas plagas llegan a afectar han representado limitaciones de importancia mundial para la producción de cultivos (Chirinos et al., 2020), por lo que se han buscado soluciones para combatirlas. Los métodos químicos como los insecticidas son la forma más rápida de eliminar a estos insectos que, sin embargo, no son los más efectivos debido a que presenta limitaciones cuando ya se ha causado resistencia en el lepidóptero (Arce Centeno, 1990). Además, se sabe que algunas de estas sustancias químicas pueden disminuir las cosechas viables, son nocivas para los seres vivos y no son biodegradables (Arroyo Loranca, 2009).

Una alternativa al uso de insecticidas químicos es el control biológico, que se puede definir como el uso de organismos (o sus subproductos) que fungen como patógenos naturales de la plaga que se busca combatir con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las cosechas. Entre los métodos más importantes se encuentran los bioplaguicidas, productos que han tenido un aumento en su utilización debido a su gran eficiencia (Serrano Carreón y Galindo Fentanes, 2007).

1.1 Bioplaguicidas

Los bioplaguicidas han surgido como respuesta a los daños sobre la salud humana y el medio ambiente ocasionados por los agentes químicos que sirven de plaguicidas. Existe gran diversidad de estos, pero actualmente los más usados como medida para combatir plagas como *Manduca sexta* (Figura 1) son los basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt).

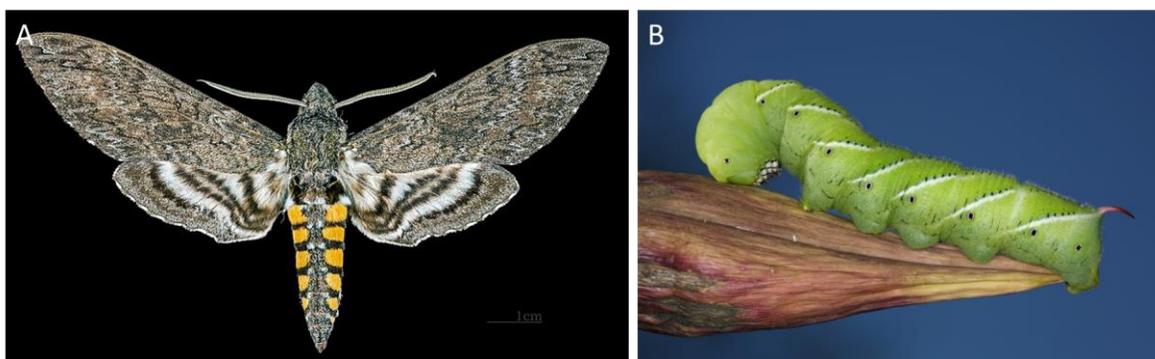


Figura 1. *Manduca sexta* A) Palomilla de estado adulto B) Estado larval (Didier Descouens, inaturalist.org).

1.2 *Bacillus thuringiensis* como bioplaguicida

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram positiva, descubierta a principios del siglo XX en Japón por Shigetane Ishiwata (Federici, 2005). Es el patógeno de insectos más exitoso utilizado para el control biológico de plagas llegando a ocupar el 53% del mercado

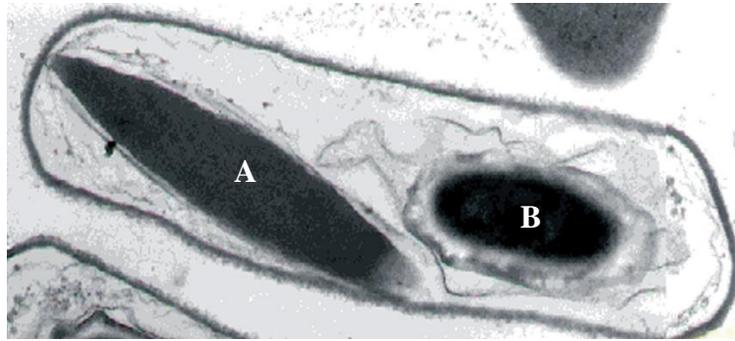


Figura 2. Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. (A) Cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry. (B) Espora en proceso. (Adaptado de Pardo-López et al., 2013).

mundial de bioinsecticidas en el 2010 (Polanczyk et al., 2017). *Bacillus thuringiensis* es casi exclusivamente activo contra etapas larvales de diferentes órdenes de insectos y causa la muerte por ruptura del tejido intestinal medio, seguido de septicemia causada, probablemente no solo por Bt, sino también por otras especies bacterianas (Raymond et al., 2010).

Esta bacteria se desarrolla en dos fases: cuando hay nutrientes suficientes para su crecimiento, la bacteria que ha producido esporas, germina dando como resultado una célula vegetativa que finalmente se reproducirá por bipartición, siendo esta la fase vegetativa. Mientras que cuando el medio en el que se desarrolla carece de uno o más de los nutrientes requeridos, la bacteria entra en la fase de esporulación, donde produce una espora, además de cristales paraesporales compuestos principalmente por proteínas Cristal (Cry) o proteínas Citolíticas (Cyt), denominadas δ -endotoxinas (Bravo et al., 2007).

1.3 Proteínas Cry

Las protoxinas Cry son un grupo de proteínas paraesporales de Bt que muestran un efecto tóxico hacia algún organismo. Pertenecen a la clase de protoxinas formadoras de poros (PFT) que se caracterizan por ser solubles en agua y sufren cambios conformacionales para insertarse en la membrana intestinal de sus huéspedes (Bravo et al., 2011).

1.3.1 Proteínas Cry1Ab

La primera clasificación de las proteínas Cry se basó en la especificidad de la actividad insecticida. En esta clasificación las toxinas Cry1 eran las que presentaban actividad contra insectos lepidópteros. Sin embargo, muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto propició que se creara una nueva nomenclatura de las toxinas basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria. En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. Cada grupo muestra una especificidad hacia ciertos tipos de insectos (Crickmore, 2017).

1.3.2 Estructura

Las toxinas Cry1A de Bt se encuentran dentro de la familia de proteínas compuestas por tres dominios, o Cry-3D. Estas proteínas son moléculas globulares que contienen tres dominios distintos conectados por enlaces individuales, son altamente específicas a su

insecto blanco, son biodegradables e inocuas para los humanos, plantas y vertebrados (Pardo-López et al., 2013).

En el dominio I o dominio N-terminal está formado por siete α -hélice, en el que la hélice central-5 es hidrofóbica y está rodeada por las hélices restantes de naturaleza anfipática; este dominio está relacionado con la inserción en la membrana y la formación de poros ya que muestra similitudes con otras toxinas formadoras de poro como la colicina Ia y N y la toxina de difteria (de Maagd et al., 2003). El dominio II consta de tres laminas β antiparalelas y tres asas expuestas que interaccionan con el receptor Caderina del intestino medio del insecto. Este es el dominio más variable en estructura y secuencia entre las toxinas Cry (de Maagd et al., 2001). El dominio III es un sándwich β , formando por dos láminas β antiparalelas (Figura 3). Este dominio interacciona con segundos receptores que son proteínas ancladas a la membrana por lípidos del tipo glicosilfosfatidil inositol (GPI), tales como la aminopeptidasa (APN) y la fosfatasa alcalina (ALP) (de Maagd et al., 2003). Las regiones expuestas en los dominios II y III están involucradas en el reconocimiento y la unión al receptor (Bravo et al., 2005).

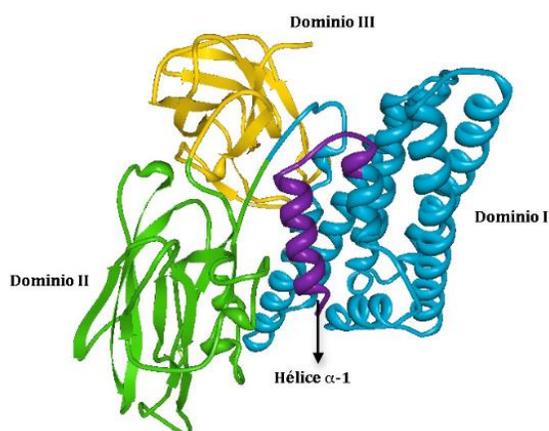


Figura 3. Modelo de la estructura tridimensional de la proteína Cry1Ab. A partir de la estructura cristalográfica de la toxina Cry1Aa. En color azul se muestra el dominio I, el dominio II en verde y el dominio III en amarillo; en color morado se muestra la hélice α -1. (Tomado de Arroyo Loranca, 2009)

1.3.3 Mecanismo de acción en lepidópteros

Cuando las larvas susceptibles ingieren la protoxina Cry 3-D, esta es solubilizada por las condiciones altamente alcalinas y reductoras del intestino medio, liberando la protoxina de aproximadamente 130kDa (Pigott y Ellar, 2007). Las proteínas Cry son producidas como protoxinas por lo que requieren ser procesadas proteolíticamente para dar lugar a la toxina activa resistente a proteasas de 60-70 kDa (Pardo-López et al., 2013). Este proceso implica la eliminación de un péptido N-terminal (25-30 aminoácidos) y aproximadamente la mitad de la proteína restante del extremo C-terminal (aproximadamente 600 aminoácidos) (**Figura 4**) (Bravo et al., 2005).

La primera interacción de unión de las toxinas Cry1A activas es una interacción de baja afinidad con los receptores de las células epiteliales del intestino medio Fosfatasa Alcalina (ALP) y Aminopeptidasa N (APN), ancladas a la membrana a través de glicosil

fosfatidil inositol (GPI). La interacción con APN ocurre a través del bucle 3 expuesto del dominio II y la interacción con ALP a través del filamento b-16 del dominio III. Estos dos receptores concentran a la toxina en las microvellosidades del intestino donde la toxina puede unirse en una interacción de alta afinidad con el receptor caderina (Arenas et al., 2010; Pardo-López et al., 2013).

Esta interacción promueve la escisión proteolítica del extremo amino terminal (la α -hélice 1 del dominio I) de la toxina, provocando la exposición de aminoácidos hidrofóbicos del mismo dominio y de esta manera a la oligomerización de la toxina (Bravo et al., 2005; Gómez et al., 2002; Pigott y Ellar, 2007).

La estructura Cry oligomérica aumenta su afinidad por los receptores ALP y APN hasta 200 veces. En esta interacción de alta afinidad, está involucrada la región del dominio II del bucle 2 de la toxina Cry1Ab (Arenas et al., 2010). El papel de las proteínas ALP y APN después de la unión de preporo es inducir su inserción en la membrana, lo que lleva a la formación de poros y finalmente a la lisis celular (**Figura 5**) (Arenas et al., 2010; Pardo-López et al., 2013).

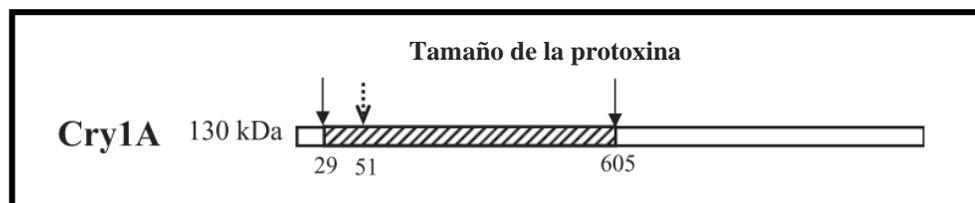


Figura 4. Posición de la digestión por las proteasas. El área sombreada representa a la toxina activada. Las flechas de color negro indican el extremo amino y carboxilo terminal. La flecha punteada indica el corte intramolecular en el residuo 51 que provoca la pérdida de la hélice α -1 y la formación del oligómero (Bravo et al., 2007).

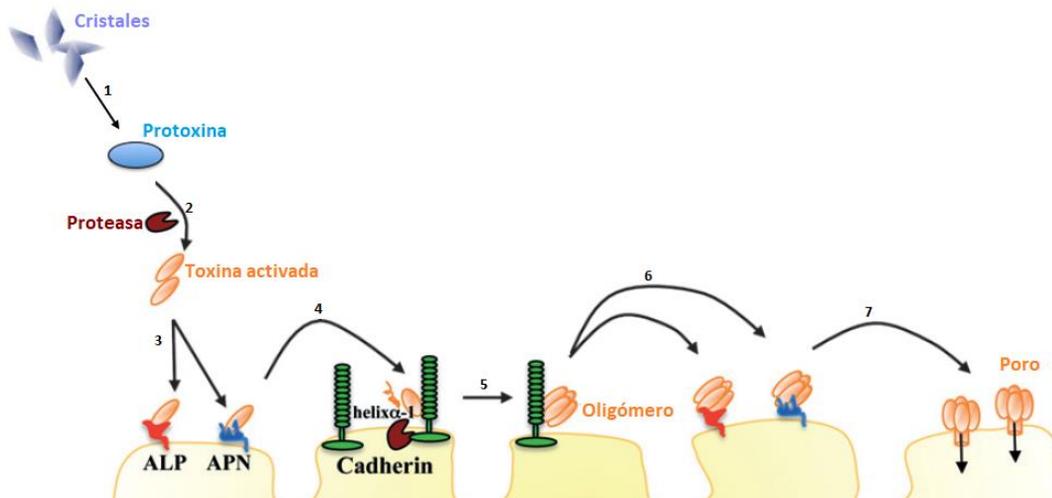


Figura 5. Modelo del mecanismo de acción de las Cry-3D a nivel molecular sobre larvas de lepidóptero. 1) Solubilización de la protoxina. 2) Proteólisis para dar lugar a la toxina activa resistente a proteasas. 3) Interacción de baja afinidad con los receptores Fosfatasa Alcalina (ALP) y Aminopeptidasa N (APN). 4) Interacción de alta afinidad con el receptor caderina. 5) Oligomerización de la toxina. 6) Interacción de alta afinidad con los receptores ALP y APN. 7) Formación del poro (adaptado de Pardo-López et al., 2013).

Se ha propuesto que las toxinas Cry inducen a la formación de canales no selectivos permeables a cationes, aniones y solutos neutros, ocasionado el influjo de agua y a su vez un desequilibrio osmótico en los enterocitos (células que recubren el intestino medio), seguido por la lisis celular (Bravo et al., 2004; de Maagd et al., 2003; Soberón et al., 2009). La muerte del insecto se produce por septicemia causando la lisis masiva de los enterocitos que provoca la ruptura de la capa epitelial del intestino medio de los insectos, permitiendo que Bt y otras bacterias invadan y proliferen (Raymond et al., 2010).

1.4 Receptores

1.4.1 Receptor Fosfatasa Alcalina (ALP)

La fosfatasa alcalina, es una proteína de aproximadamente 65 kDa anclada a la membrana de las células a través de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (**Figura 6**). Es el primer receptor de las toxinas Cry-3D monomérica, primero uniéndose con una baja afinidad $K_d = 267$ nM y posteriormente con una alta afinidad $K_d = 0.5$ nM (Gómez et al., 2007; Pigott y Ellar, 2007).

1.4.2 Receptor Aminopeptidasa-N (APN)

La aminopeptidasa-N es una exopeptidasa de aproximadamente 120 kDa anclada a la membrana de las células a través de glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (**Figura 6**). La toxina monomérica se une en primer lugar a la APN con una baja afinidad $K_d = 101$ nM, y luego de interactuar con el receptor caderina, se vuelve a unir a este, ahora con una alta afinidad $K_d = 0.6$ nM (Arenas et al., 2010; Gómez et al., 2007; Pigott y Ellar, 2007). Se ha identificado un fragmento de 63 residuos de APN involucrados en la interacción con el dominio III de la toxina Cry1A en *Bombyx mori* (lepidóptero comúnmente conocido como gusano de la seda) (Nakanishi et al., 2002).

1.4.3 Receptor Caderina

Los miembros de la superfamilia de proteínas caderina están involucrados en diversos procesos biológicos como la morfogénesis, adhesión celular, diferenciación de los tejidos y la conectividad neuronal. La clave para la función de caderina es su dominio extracelular compuesto de repetidos de caderina, que pueden mediar las interacciones involucradas en la adhesión y la señalización celular (Angst et al., 2001).

Hasta la fecha, son pocas las caderinas que se han descrito en lepidópteros, y su aislamiento e identificación está relacionado mayoritariamente con el estudio de insecticidas basados en Bt.

Estas cadherinas relacionadas con Bt descritas en lepidópteros y asociadas a los tejidos del intestino medio se componen de microdominios de aproximadamente 110 aminoácidos, llamados repetidos de Caderina (CR) (**Figura 6**) y tienen la siguiente estructura básica: un dominio extracelular, que incluye al amino terminal (N-terminal) y 9 a 12 CR; una región transmembrana; y una región intracelular que contiene al carboxilo terminal (C-terminal) (Bel y Escriche, 2006).

Esta estructura de caderina específica no coincide con las de los tipos establecidos y, en el caso de *M. sexta*, la proteína se ha clasificado como una caderina atípica del grupo de protocaderinas (Griko et al., 2004).

Los datos experimentales sugieren que, en el mecanismo de formación de poro, las caderinas no solo son receptores específicos para las toxinas, sino que también facilitan un paso de escisión proteolítica específica posterior a la unión que induce la oligomerización de toxinas y la formación final de poros eficiente (Griffitts y Aroian, 2005).

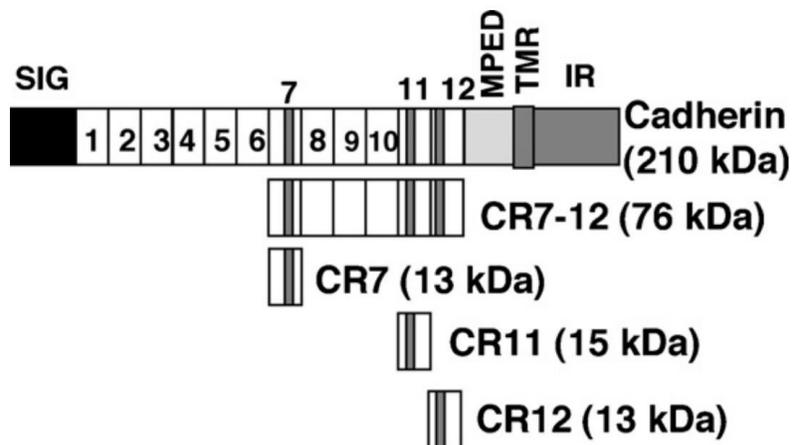


Figura 6. Organización de los fragmentos de caderina en *Manduca sexta* (Pacheco et al., 2009)

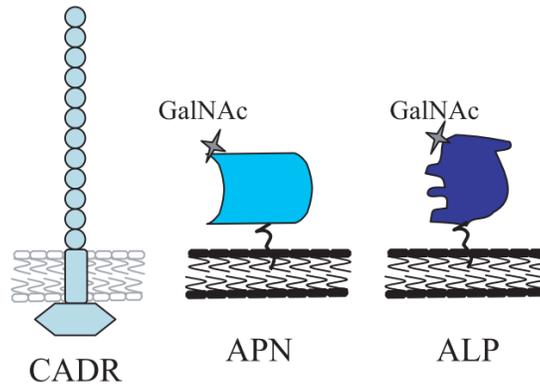


Figura 7. Moléculas receptoras de proteínas Cry1A. Receptor de caderina (CADR); aminopeptidasa-N (APN); fosfatasa alcalina (ALP) (Bravo et al., 2007).

1.5 Mutantes de Cry1Ab

En los últimos años la resistencia contra los biopesticidas se ha vuelto uno de los mayores problemas para la industria agrícola, así como para la ciencia. La búsqueda de nuevas estrategias, se han aislado y caracterizado toxinas Cry1Ab con mutaciones puntuales afectando distintos pasos de su modo de acción con el fin de comprender mejor el proceso de intoxicación y las etapas del modo de acción de estas toxinas.

Para este proyecto se seleccionaron las siguientes mutantes con base en algunas de sus características:

La toxina Cry1Ab-G439D afectada en la unión al receptor Caderina y por consecuencia en la toxicidad. Esta mutación se encuentra en el asa 3 del Dominio II, donde se sustituyó un ácido aspártico por una glicina en el residuo 439 (Rodríguez-Almazán et al., 2009).

La toxina Cry1Ab-R99E está afectada en la formación de la estructura oligomérica de 250 kDa. Esta mutación se encuentra en la α -hélice-3 del Dominio I, donde se sustituyó el ácido glutámico por la arginina en el residuo 99. Esta toxina perdió la toxicidad contra sus insectos blanco (Jiménez-Juárez et al., 2007).

Por último, la toxina Cry1Ab-E129K, se encuentra afectada en la inserción a la membrana. Esta mutación se ubica en el α -hélice-4 del dominio I, donde se sustituyó un ácido glutámico por una lisina en el residuo 129 (Rodríguez-Almazán et al., 2009).

1.6 Chaperonas moleculares

Se define como una chaperona molecular a cualquier proteína que interactúa, estabiliza o ayuda a otra proteína a adquirir su conformación funcionalmente activa, sin estar presente en su estructura final. Están involucradas en una multitud de funciones celulares, incluido el plegamiento de novo, el replegamiento de proteínas desnaturalizadas por estrés, el ensamblaje oligomérico, el transporte intracelular de proteínas y la asistencia en la degradación proteolítica. La maquinaria de chaperona celular forma redes complejas que son indispensables para el control de calidad de proteínas y el mantenimiento de la homeostasis

de proteínas y estas se encuentran distribuidas en especies de los tres dominios de la vida (Bogumil y Dagan, 2012; Hartl y Hayer-Hartl, 2009).

Existen varias clases diferentes de chaperonas estructuralmente no relacionadas en las células. Muchos de estos se conocen como proteínas de estrés o proteínas de choque térmico (HSP), ya que son regulados por las células en condiciones de estrés conformacional en las que aumenta la concentración de intermedios plegables propensos a la agregación. Dichas chaperonas se clasifican generalmente de acuerdo con su peso molecular (HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, son algunos ejemplos) (Hartl et al., 2011).

1.7 Chaperona Hsp70

Las proteínas de choque térmico de 70 kDa (Hsp70) ayudan a una amplia gama de procesos, incluido el plegamiento y el ensamblaje de proteínas recién sintetizadas, el replegamiento de proteínas mal plegadas y agregadas y el control de la actividad de proteínas reguladoras (Bukau et al., 2000). Todas estas actividades están basadas en la propiedad de Hsp70 de interactuar con segmentos de proteínas de péptidos hidrofóbicos, regulado por ATP. El amplio espectro de funciones celulares de las proteínas Hsp70 se debe a características específicas como son: la amplificación y diversificación de genes que codifican para Hsp70 en la evolución, lo que ha generado chaperonas especializadas; la capacidad de reclutar selectivamente co-chaperonas para cumplir funciones celulares específicas; y finalmente, la cooperación de las proteínas Hsp70 con otros sistemas de chaperonas para ampliar su espectro de actividad como en el caso de las chaperonas Hsp40, que funcionan como socios obligatorios de Hsp70 para regular las actividades y la especificidad funcional de Hsp70. Las proteínas Hsp70 con sus co-chaperonas y las chaperonas cooperantes constituyen una red compleja de máquinas plegadoras (Mayer y Bukau, 2005).

La importancia de estas chaperonas radica en que, junto con la familia Hsp90, son las chaperonas con mecanismo dependiente a ATP mejor conservadas, apareciendo conjuntamente en la mayoría de los organismos y los principales compartimentos celulares.

1.7.1 Estructura

La estructura de estas chaperonas consiste en un dominio de unión a nucleótidos (NBD) N-terminal de 43 kDa y un dominio de unión a sustrato (SBD) C-terminal de 27 kDa, que están conectados por un interdominio hidrofóbico altamente conservado. El NBD está relacionado con la actina y está compuesto por cuatro subdominios (IA, IB, IIA e IIB) que están dispuestos en dos lóbulos con la hendidura de unión a nucleótidos situada en el medio, en la parte inferior de la cual el ATP está unido en un bolsillo bastante hidrofílico. El SBD consiste en un subdominio β -sandwich (donde se encuentra específicamente el sitio de unión al sustrato) y una tapa α -hélice.

La unión e hidrólisis de ATP regula la afinidad por el sustrato y la unión del sustrato a su vez acelera la hidrólisis de ATP, lo que sugiere que la Hsp70 tiene al menos dos estados conformacionales y la disposición del SBD es radicalmente diferente en conformación cerrada y abierta. (Kim et al., 2013; Mayer, 2013).

1.7.2 Mecanismo de acción

Junto con las proteínas del dominio J (JDP) como las co-chaperonas Hsp40 de menor tamaño, y los factores de intercambio de nucleótidos (NEF), Hsp70 ayuda al plegamiento de proteínas mediante ciclos regulados por ATP de unión y liberación de sustrato (Morán Luengo et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, la afinidad por el sustrato de la chaperona Hsp70 es regulada mediante la unión e hidrólisis de ATP, y a su vez, la unión del sustrato promueve la hidrólisis de ATP. Estos hallazgos sugieren la existencia de al menos dos estados conformacionales en la Hsp70, conocidos como "abierto" y "cerrado", los cuales están determinados por la estructura de sus dominios. (Mayer, 2013) (Figura 8). Cuando el ATP se une a la chaperona, esta provoca la separación del subdominio α -hélice del subdominio β -sandwich, que, junto con el interdominio, se unen a diferentes partes del dominio de unión a nucleótidos para formar el "estado abierto" de la chaperona, facilitando así la unión del sustrato peptídico (Kim et al., 2013). En este estado, la asociación y disociación de péptidos del dominio de unión al sustrato ocurre de forma constante, es decir, que existe una baja afinidad por el sustrato (Mayer, 2013). Por el contrario, en el "estado cerrado" la hidrólisis de ATP provoca la separación del dominio de unión a nucleótidos de los subdominios en α -hélice y β -sandwich; además, los subdominios α -hélice y β -sandwich se unen, formando una tapa que ayuda a la retención del sustrato (Kim et al., 2013). Finalmente, la unión de un factor intercambiador de nucleótidos (NEF) al dominio de unión a nucleótidos cataliza el intercambio de ADP a ATP, causando la apertura del dominio de unión al sustrato y liberándolo correctamente plegado (Kim et al., 2013).

La comprensión del mecanismo de plegado de Hsp70 requiere una mirada más cercana a su modo de reconocimiento del cliente. Las propiedades hidrofóbicas de la cavidad de unión a Hsp70 conservada permiten el reconocimiento promiscuo de tramos cortos de hasta cinco residuos hidrofóbicos, típicamente ubicados en proteínas plegadas en el núcleo hidrofóbico. La unión de dichos segmentos centrales protege a la proteína de la agregación, pero también detiene el colapso hidrofóbico. El principio de especificidad de las chaperonas Hsp70 es, de hecho, el de un preventor de plegado (Morán Luengo et al., 2019).

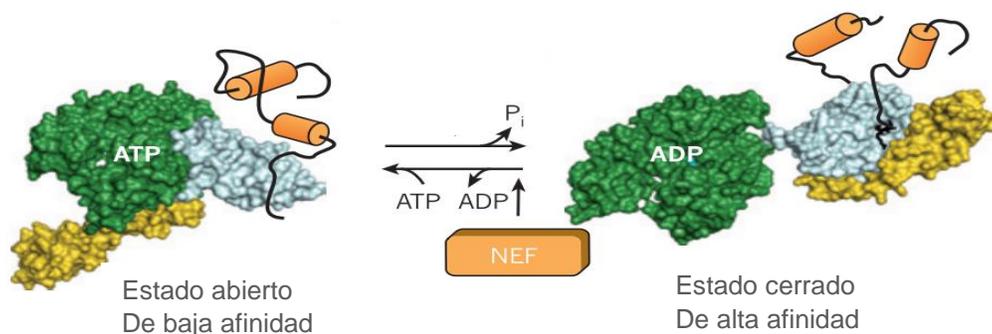


Figura 8. Estructura abierta y cerrada de la Hsp70. Donde se puede observar cómo el subdominio α -hélice funciona como una tapa, atrapando la proteína cliente en su estructura. (Adaptado de Kim et al., 2013)

2 ANTECEDENTES

2.1 Hsp70 aumenta la toxicidad de las toxinas Cry1A

En el 2019, García-Gómez y colaboradores realizaron experimentos con diversas chaperonas, entre ellas Hsp70, donde se demostró que ésta aumentó la toxicidad de la protoxina Cry1Ac hacia las larvas de *P. xylostella* de una manera dependiente de la dosis, alcanzando casi el 100% de mortalidad a 250 ng / cm² de Hsp70 (P 0.0001) (**Figura 9**). Además, se analizó la estabilidad del complejo protoxina Cry1Ab/Hsp70 a la digestión con proteasas de jugo de intestino medio, dando como resultado una alta protección a la proteólisis, compatible con su papel potencial de ayudar a las protoxinas Cry a aumentar su integridad y por lo tanto su toxicidad, en el intestino de las larvas.

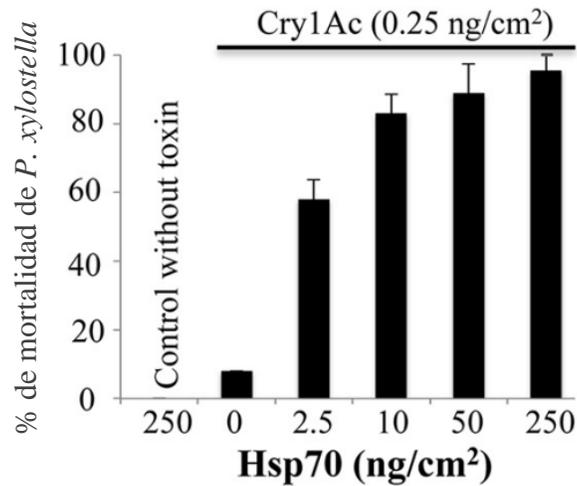


Figura 9. Mortalidad de *P. xylostella* en presencia de protoxina Cry1Ac y Hsp70. Se demostró que la chaperona Hsp70 aumenta los porcentajes de mortalidad de las larvas de *P. xylostella* tratadas con 0.25 ng/cm² de protoxina Cry1Ac en presencia de concentraciones crecientes de Hsp70 (García-Gómez et al., 2019).

2.2 Interacción de la mutante Cry1Ab-G439D con chaperonas moleculares

García-Gómez y colaboradores, también realizaron estudios sobre el acoplamiento de la chaperona molecular Hsp90 y protoxinas afectadas en distintos pasos en su modo de acción en el lepidóptero *P. xylostella* en ausencia y presencia de Hsp90. (**Figura 10**). Estos resultados demuestran que la Hsp90 ayuda a las protoxinas mutantes de Cry1Ab a recuperar su toxicidad, siendo más evidente en la Cry1Ab-G439D, lo que sugiere que la chaperona Hsp90 ayuda a la protoxina Cry1Ab a unirse a receptores.

Además, se realizaron ensayos de unión *in vitro* tipo ELISA donde nuevamente se observa que la chaperona Hsp90 aumenta la unión de la mutante Cry1Ab-G439D al receptor recombinante de Caderina CR12 (**Figura 11**), a pesar de que esta es la mutante más afectada en la unión al repetido CR12 de caderina (Rodríguez-Almazán et al., 2009).

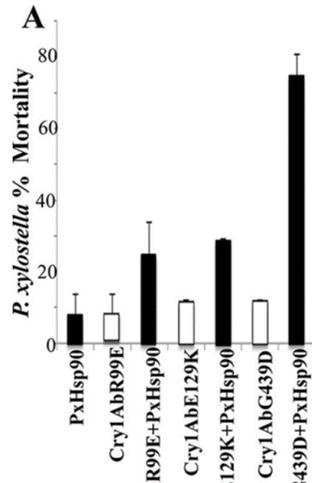


Figura 11. Ensayos de mortalidad de *Plutella xylostella* utilizando protoxina Cry1AbR99E, Cry1AbE129K y Cry1AbG439D en ausencia y presencia de Hsp90. Se observa que la mutante Cry1Ab-G439D presenta un aumento mayor de mortalidad sobre las otras mutantes (García-Gómez et al., 2019).

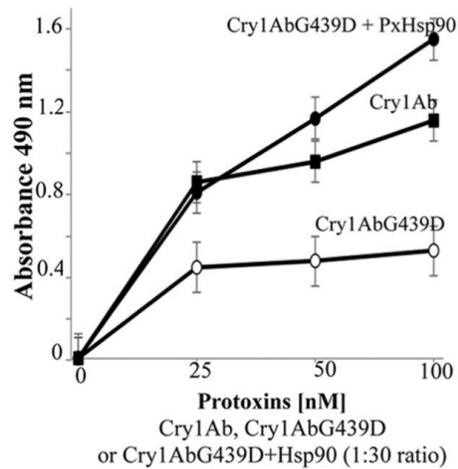


Figura 10. Unión de la protoxina Cry1Ab-G439D en diferentes concentraciones al fragmento de caderina CR12 en presencia y ausencia de la chaperona Hsp90 (García-Gómez et al., 2019).

3 JUSTIFICACIÓN

Previamente se ha demostrado que la chaperona Hsp70 incrementa la toxicidad de las toxinas Cry, y en adición las protege de la proteólisis (García-Gómez et al., 2019). Además, se ha sugerido que Hsp90 ayuda a la protoxina Cry1Ab a unirse a los receptores del intestino medio de las larvas.

4 HIPÓTESIS

La chaperona Hsp70 será capaz de potenciar la actividad de las toxinas mutantes de Cry1Ab que se encuentran afectadas en su toxicidad, siendo más evidente en la mutante Cry1AbG439D debido a la capacidad de la chaperona de estabilizar la unión de la toxina Cry1Ab mutada a su receptor en las células epiteliales de su organismo blanco, visto anteriormente en experimentos con la chaperona molecular Hsp90.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto potenciador de la Hsp70 en la toxicidad de las protoxinas mutantes de Cry1Ab, afectadas en la unión al receptor Caderina (Cry1Ab-G439D), en la oligomerización (Cry1Ab-R99E) y en la formación del poro (Cry1Ab-E129K).

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar la toxicidad de las protoxinas Cry1Ab silvestre, Cry1Ab-G439D, Cry1Ab-E129K y Cry1Ab-R99E en ausencia y presencia de la chaperona Hsp70, mediante bioensayos con larvas del tercer instar de *M. sexta*.
- Determinar la unión *in vitro* de la Hsp70 con la protoxina Cry1Ab silvestre y cada una de las mutantes de Cry1Ab (Cry1Ab-G439D, Cry1Ab-E129K y Cry1Ab-R99E).
- Determinar la unión *in vitro* de la protoxina que resulte más potenciada, en presencia la proteína Hsp70 al fragmento de Caderina CR12.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas

Las cepas se reactivaron en agar sólido Luria-Bertani (LB) con resistencia a Kanamicina (50 µg/mL) para la cepa *Escherichia coli* BL21-Hsp70, resistencia a Ampicilina (100 µg/mL) para la cepa *E. coli* ER2566-CR12 y Eritromicina (10 µg/mL) para las cepas de Bt.

6.2 Producción de espora cristal

Las cepas de Bt que contienen el gen silvestre Cry-1Ab (Rodríguez-Almazán et al., 2009), el gen mutante cry-G439D (Rodríguez-Almazán et al., 2009), el gen mutante cry-E129K (Rodríguez-Almazán et al., 2009) y el gen mutante cry-R99E (Jiménez-Juárez et al., 2007), se crecieron por tres días a 30°C en medio de esporulación HCT (Hidrolizado de caseína triptona) suplementado con Eritromicina 10 µg/mL (Zavala et al., 2011). Después de completar su esporulación, las inclusiones cristalinas se observaron en microscopía de contraste de fases. Las esporas y los cristales se lavaron tres veces en una solución salina (NaCl 300 mM y EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, 10 mM) suplementado con PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM y tres veces con agua destilada más PMSF 1mM; después de cada lavado se centrifugó a 12,857xg durante 10 min a 10°C.

6.3 Solubilización de las protoxinas Cry

Las inclusiones cristalinas de Cry1Ab silvestre y mutantes se solubilizaron en un buffer alcalino (Na₂CO₃ 100 mM pH 10.5, conteniendo β-mercaptoetanol 0.2 % v/v y PMSF 1 mM) por 50 min a 37°C y agitando a 850 rpm. Las protoxinas solubles de Cry1Ab se recuperaron después de centrifugar a 16,900xg durante 20 min a 4°C. La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino.

Para corroborar la integridad de las protoxinas (~130 kDa), estas se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10%.

6.4 Cultivo, expresión y purificación de la proteína Hsp70

El gen de la chaperona Hsp70 de larvas de *P. xylostella* se clonó en el plásmido pET28a (+) con resistencia a Kanamicina (50 µg/mL) (García-Gómez et al., 2019).. Esta construcción se transformó y se expresó en la cepa de *E. coli* BL21.

La cepa con el plásmido recombinante *E. coli* BL21-Hsp70 se precultivó durante la noche y se inoculó 5 mL de éste precultivo en 500 mL del medio 2xYT (Triptona 1.6% w/v, Extracto de Levadura 1% w/v, y NaCl 0.5% w/v) suplementado con Kanamicina 50 µg/mL. El cultivo se creció a 30°C en agitación, hasta la DO600 de 0.6. La expresión de la proteína se indujo usando IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 0.5 mM, durante toda la noche a 30°C en agitación. Las células se obtuvieron centrifugando una vez a 3,220xg durante 15 min a 10°C. El precipitado celular se homogeneizó en 80 mL de agua destilada y se recuperó con un volumen equivalente en seis tubos cónicos Falcon (15 mL), por centrifugación a 12,857xg durante 15 min a 10°C.

A las proteínas expresadas contenidas en un tubo Falcon se les agregaron 9 mL de una solución desnaturizante (Fosfato de Sodio Monosódico, NaH_2PO_4 100 mM; Tris Base, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 10 mM; Urea, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 8 M) y se lisaron por sonicación (4 veces por 50 segundos a una amplitud de 100%, en hielo separados por intervalos de 1 min). Se recuperó el sobrenadante (libre de restos celulares) por centrifugación a 247,000xg durante 40 min a 10°C. La proteína se purificó por una columna de intercambio iónico de Ni-Agarosa, esto de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen), y se eluyeron con una solución de Imidazol 250 mM suplementado con ATP y MgSO_4 1 mM en PBS (para el experimento de dependencia de ATP, la proteína Hsp70 se recuperó con una solución de Imidazol 250 mM en PBS sin ATP y MgSO_4). La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino.

6.5 Cultivo, expresión y purificación del fragmento de Caderina CR12

El gen del fragmento de la proteína Caderina (CR12) de *M. sexta*, se clonó en el plásmido pET22b. Esta construcción se transformó y se expresó en la cepa de *E. coli* ER2566 con resistencia a Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Pacheco, Gómez, Arenas, et al., 2009; Soberón et al., 2007).

La cepa con el plásmido recombinante *E. coli* ER2566-CR12 se precultivó durante la noche, y se inóculo una centésima parte en 50 mL del medio 2xYT (Triptona 1.6% w/v, Extracto de Levadura 1% w/v, y NaCl 0.5% w/v) suplementado con Ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.1% de glucosa. El cultivo se creció a 37°C en agitación, hasta la DO_{600} de 0.7. La expresión de la proteína se indujo usando IPTG 1 mM (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) por 5 h a 30°C en agitación. Las células se obtuvieron por centrifugación a 12,857xg durante 15 min a 10°C en dos tubos cónicos Falcon (15 mL) con un volumen equivalente.

A las proteínas expresadas se les agregaron 5 mL de una solución desnaturizante (Fosfato de Sodio Monosódico, NaH_2PO_4 100 mM; Tris Base, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 10 mM; Urea, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 8 M) y se lisaron por sonicación (4 veces por 40 segundos a una amplitud de 100%, en hielo separados por intervalos de 1 min). Se recuperó el sobrenadante (libre de restos celulares) por centrifugación a 247,000xg durante 40 min a 10°C. La proteína se purificó por una columna de intercambio iónico de Ni-Agarosa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen) y se eluyeron con una solución de Imidazol 250 mM en PBS. La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando una curva estándar de albúmina de suero bovino.

6.6 Bioensayo de toxicidad

El dato de la toxicidad de cada una de las mutantes se obtuvo por medio de bioensayos utilizando como modelo de estudio a *Manduca sexta*. Las larvas del tercer instar se alimentaron con protoxinas Cry1Ab silvestre y mutantes afectadas en su unión al receptor Caderina (G439D), en la oligomerización (R99E) y en la inserción en la membrana (E129K).

Además, se determinó el efecto potenciador de la Hsp70 en la actividad tóxica de cada una de las mutantes de Cry1Ab. Los bioensayos se realizaron mediante el método de contaminación de la dieta artificial. En cada pozo se colocó una larva del primer instar de *M. sexta*. Una dosis constante de proteínas solubles (5 ng/pozo de las protoxinas silvestre y

mutantes) y la chaperona Hsp70 en tres diferentes dosis crecientes (5ng/pozo, 20ng/pozo, y 150ng/pozo) (las muestras que contenían protoxina y Hsp70 se incubaron previamente durante 10 minutos a 30 °C). Además de tratamientos con protoxina sola (sin Hsp70) en una concentración constante (5ng/pozo) se aplicaron sobre la superficie de la dieta (caseína 8.6 g, sacarosa 9.1 g, germen de trigo 11.8 g, sales de Wesson 2.4 g, alphacel 1.74 g, metil parabeno 0.36 g, ácido sórbico 0.26 g, agar 7 g, vitaminas 2.4 g, aceite de linaza 1.8 mL, ácido fosfórico 1.4 mL, tetraciclina 0.14 mL) contenida en placas de poliestireno de 24 pozos (Corning Glass Works, Corning, Nueva York) y se dejó secar. La mortalidad se registró después de 7 días a 25°C. El bioensayo se realizó una vez por duplicado, produciendo un tamaño de muestra total de 48 larvas criadas en la dieta tratada con Cry1Ab y Hsp70. Los resultados se analizaron con el Programa Microsoft Excel.

6.7 Ensayos de unión tipo ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

6.7.1 Ensayo de unión de la proteína Hsp70 a la protoxina Cry1Ab silvestre y mutantes.

En una placa de ELISA de 96 pozos, se incubó con la protoxina Cry1Ab silvestre y Cry1Ab-mutantes 0.5 µg/pozo en PBS pH 7.2 durante 12 horas a 4°C, seguido por tres lavados con PBS. La placa se incubó con leche 2% m/v en PBS por 2 h a 37°C y se lavó tres veces con PBS. La placa ELISA se incubó con diferentes concentraciones de Hsp70 por 1 h a 37°C y se lavó tres veces con PBS. La chaperona Hsp70 unida a las protoxinas Cry1Ab se detectó con anticuerpo anti-polihistidina acoplado a peroxidasa (1:5000) por 1 hora a 37°C y la placa se lavó con PBS. La actividad enzimática se reveló con un sustrato recién preparado (ortofenilendiamina (Sigma) 5 mg/mL, H₂O₂ 0.08% v/v, en K₂HPO₄ 100 mM pH 5). La reacción se detuvo utilizando HCl 5 M y la absorbancia se leyó a 490 nm con SOFTmax PRO3.0. Los datos representan medias de 4 pocillos y este experimento tuvo dos repeticiones. Los resultados se analizaron con el Programa Microsoft Excel.

6.7.2 Ensayo de unión de la protoxina Cry1Ab-G439D más la proteína Hsp70 al fragmento de Caderina CR12

En una placa de ELISA de 96 pozos, se incubó el fragmento de Caderina (CR12) 1µg/pozo en PBS pH 7.2 durante 12 h a 4°C, seguido por tres lavados con PBS. La placa se incubó con leche 2% m/v en PBS por 2 h a 37°C y se lavó tres veces con PBS. La placa ELISA se incubó con 50nM de la protoxina silvestre como control, y 6 nM, 12 nM, 25 nM y 50 nM, de la protoxina Cry1Ab-G439D mezclada con la proteína Hsp70, en una relación 1:30 (antes de colocar la dilución sobre la placa, se incubó las proteínas de Cry1Ab más la Hsp70 durante 10 min a 30 °C) por 1 h a 37°C y se lavó tres veces con PBS conteniendo Tween 20 al 0.1% v/v (buffer A). Las protoxinas Cry1Ab unidas al fragmento de Caderina (CR12) se detectaron utilizando el anticuerpo primario anti-1Ab (1:10,000) y el anticuerpo secundario anti-conejo-HRP (1:10,000) por 1 h a 37°C, la placa se lavó tres veces con buffer A después de cada incubación. La actividad enzimática se reveló con un sustrato recién preparado (ortofenilendiamina 5 mg/mL (Sigma), H₂O₂ 0.08% v/v en K₂HPO₄ 100 mM pH 5). La reacción se detuvo utilizando HCl 5 M y la absorbancia se leyó a 490 nm con SOFTmax PRO3.0. Los datos representan medias de 4 pocillos y este experimento tuvo dos repeticiones. Los resultados se analizaron con el Programa Microsoft Excel.

7 RESULTADOS

7.1 Producción de protoxina silvestre y mutante Cry1Ab

Las protoxinas, resultado de la solubilización, se analizaron en un gel de SDS-PAGE al 10%, corroborando el peso molecular esperado de aproximadamente 130 kDa como se muestra en la **Figura 12**.

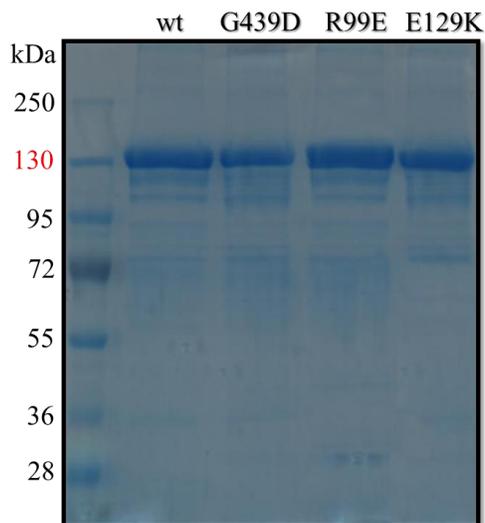


Figura 12. Protoxinas silvestre y mutantes Cry1Ab analizadas en gel SDS-PAGE al 10%. Se utilizó una cantidad de 10µg de proteína soluble Cry1Ab y se separaron en un gel SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie.

7.2 Producción de la chaperona Hsp70

Después de obtener el gen de la chaperona Hsp70 del lepidóptero *P. xylostella* reportado en los materiales y métodos, este se expresó en las células *E. coli* BL21/Hsp70 y posteriormente se purificaron. En la **Figura 13** se observa la expresión (a) y purificación (b) de la chaperona Hsp70, ambas se analizaron en geles de SDS-PAGE al 10% corroborando el peso molecular esperado de aproximadamente 70 kDa.

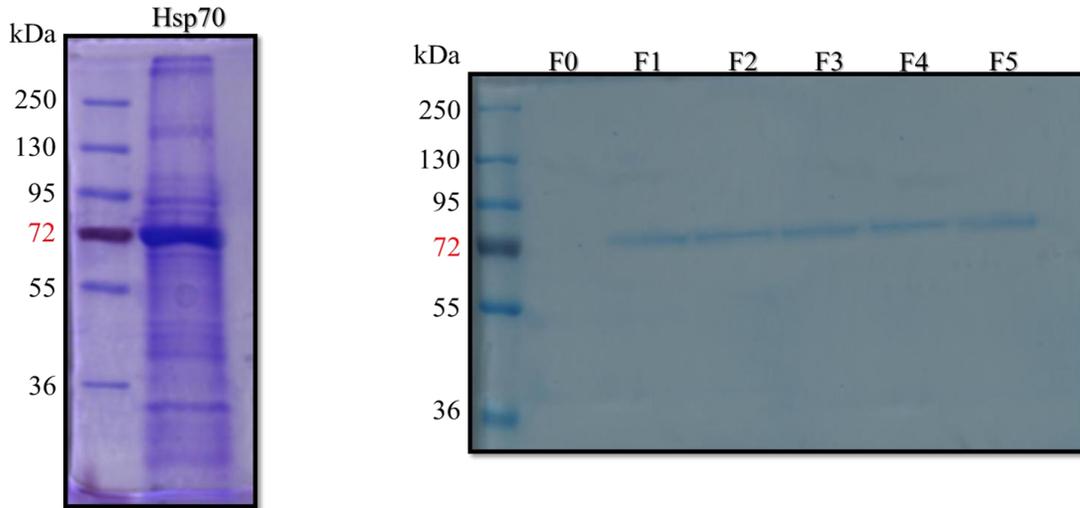


Figura 13. Expresión y purificación de la chaperona Hsp70. **A)** Expresión de la chaperona Hsp70 de aproximadamente 70 kDa. Se utilizaron 15 μ l del cultivo expresado y se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul brillante de Coomassie. **B)** Fracciones purificadas (F0-F5) de la chaperona Hsp70 de un peso aproximado de 70 kDa, obtenidas de una columna de Ni-Agarosa (Qigen, GmbH, Germany) y separadas en un gel de SDS-PAGE al 10% teñido con azul brillante de Coomassie. Este es un experimento representativo de tres repeticiones, bajo las mismas condiciones.

7.3 Producción del receptor CR12

Se utilizó el fragmento de Caderina CR12, en la **Figura 14** se exhibe la expresión (A) y purificación (B) de este fragmento, las muestras se separaron en gel de SDS-PAGE al 15% corroborando el peso molecular esperado de aproximadamente 13 kDa.

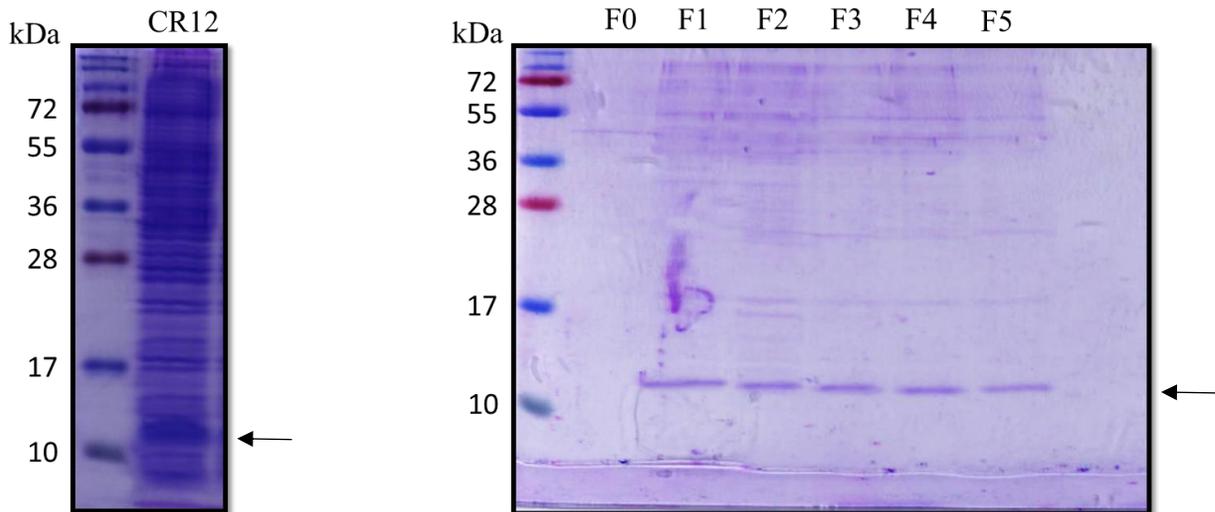


Figura 14. Expresión y purificación del fragmento de Caderina CR12. **A)** Expresión del fragmento de Caderina CR12 (~13 kDa), se utilizó cultivo expresado y se separó en un gel de SDS-PAGE al 15% teñido con azul brillante de Coomassie; **B)** Fracciones purificadas (F0-F5) del fragmento de Caderina CR12 (~13 kDa) obtenidas en una columna de Ni-Agarosa (Qigen, GmbH, Germany) y separadas en un gel de SDS-PAGE al 15% teñido con azul brillante de Coomassie. Este es un experimento representativo de dos repeticiones, bajo las mismas condiciones.

7.4 Bioensayo de toxicidad de Cry1Ab silvestre y mutantes con chaperona Hsp70

Se realizaron bioensayos usando larvas de tercer instar de *M. sexta*, en las que se realizaron tratamientos con una concentración constante de protoxina silvestre (5ng/pozo) en ausencia y presencia de Hsp70 en 3 diferentes concentraciones: (a) 5ng/pozo, (b) 20ng/pozo, (c) 150ng/pozo. En la **Figura 15** se observa que las protoxinas silvestre aumenta su toxicidad en presencia de la chaperona Hsp70, llegando a ser casi del 80% con el tratamiento c, en comparación con el tratamiento sin dicha chaperona.

Se realizó el mismo procedimiento con las protoxinas mutantes de Cry1Ab, observándose también un aumento en su toxicidad (**Figura 16**). En el caso de la Cry1Ab-G439D más la chaperona Hsp70, se registró una mortalidad del 25%, es decir, las larvas se volvieron casi 3 veces más susceptibles con respecto a las larvas tratadas con protoxina, pero sin chaperona. Finalmente, la toxicidad de Cry1Ab-R99E y Cry1Ab-E129K incrementó hasta un 16% en presencia de la Hsp70. Estos resultados demuestran que la Hsp70 ayuda a las protoxinas mutantes de Cry1Ab a recuperar su toxicidad, siendo más evidente en la Cry1Ab-G439D, pero mencionando que no recupera la toxicidad en comparación con los niveles obtenidos de la protoxina Cry1Ab silvestre. Como control negativo se usaron 2µg/pozo de Hsp70, y se observó que no tiene un efecto tóxico por sí misma sobre estos lepidópteros.

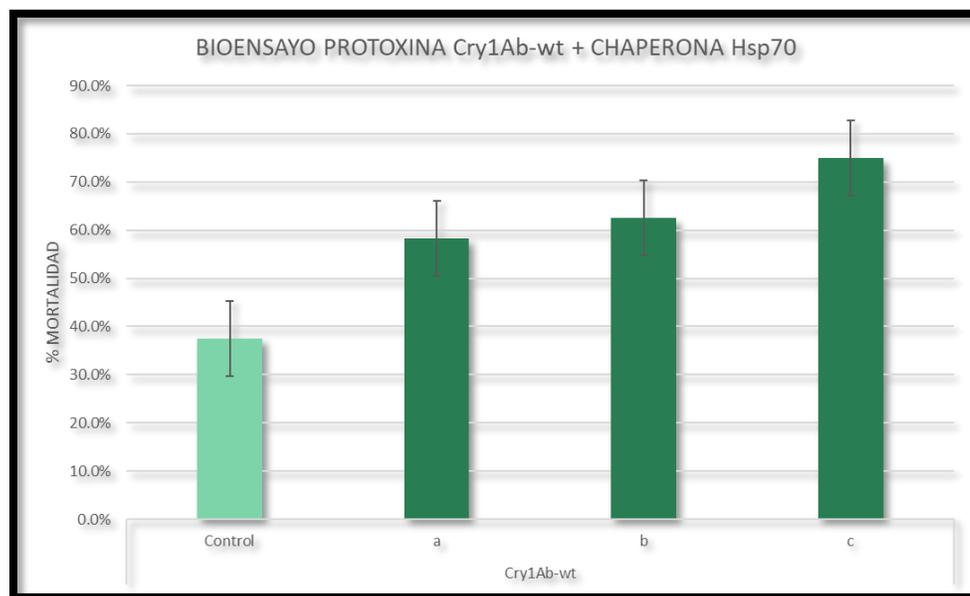


Figura 15. Ensayos de toxicidad de la protoxina silvestre Cry1Ab. Para realizar los bioensayos se utilizaron 5ng/pozo de la proteína silvestre Cry1Ab; se analizaron cuatro tratamientos (sin Hsp70 como control, y tres condiciones en presencia de Hsp70 en concentraciones crecientes (a) 5ng/pozo, (b) 20ng/pozo, (c) 150ng/pozo) en larvas de tercer instar de *M. sexta*. Este experimento completo se realizó una vez por duplicado.

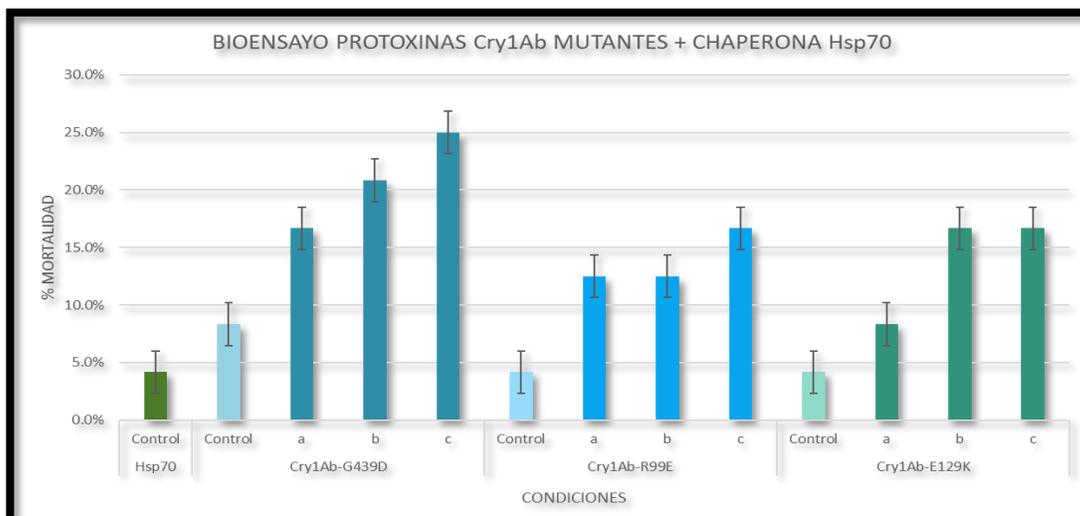


Figura 16. Ensayos de toxicidad de las protoxinas mutantes de Cry1Ab. Se realizó un control negativo usando la concentración máxima de Hsp70 utilizada en los bioensayos (150ng/pozo) en ausencia de protoxina Cry. Se utilizó una concentración constante de las proteínas mutantes de Cry1Ab (5ng/pozo) y se analizaron 4 tratamientos para cada mutante (sin Hsp70 como control, y tres condiciones en presencia de Hsp70 en concentraciones crecientes (a) 5ng/pozo, (b) 20ng/pozo, (c) 150ng/pozo) en larvas del tercer instar de *Manduca sexta*. Este experimento completo se realizó una vez por duplicado.

7.5 Ensayo de unión de la chaperona Hsp70 a la protoxina Cry1Ab silvestre y mutantes.

Para corroborar los datos obtenidos en 2019 por García-Gómez y colaboradores, donde se reporta que la chaperona Hsp70 es capaz de incrementar la toxicidad de la toxina Cry1Ab silvestre se realizaron uniones *in vitro* de tipo ELISA, que buscaron comprobar la unión de la chaperona Hsp70 (250 nM y 500 nM) a la protoxina silvestre y mutantes de Cry1Ab (0.5 µg/pozo). En la **Figura 17** se muestra que la chaperona Hsp70 es capaz de unirse a las protoxinas Cry1Ab, tanto a la silvestre (wt) como a las mutantes (G439D, F371A, R99E y E129K). Como control negativo se utilizó la chaperona Hsp70 en ausencia de protoxina en su concentración más alta utilizada en este experimento (500nM).

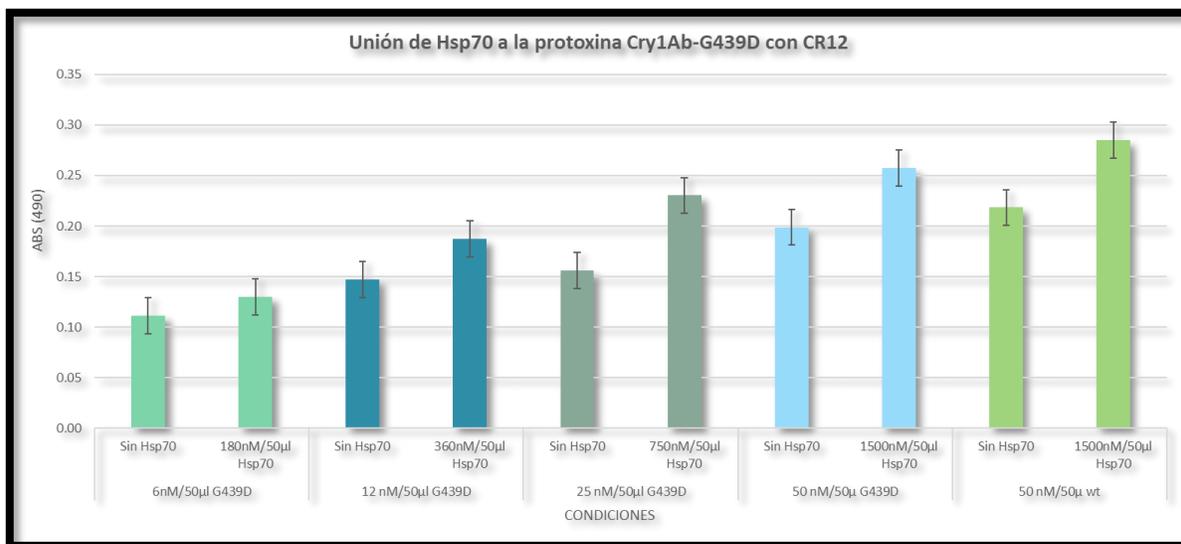


Figura 17. Unión de la chaperona Hsp70 (250 nM y 500 nM) a las protoxinas Cry1Ab silvestre, Cry1Ab-G439D, Cry1Ab-F371A, Cry1Ab-R99E y Cry1Ab-E129K (0.5 µg/pozo).

7.6 Ensayo de unión de la protoxina Cry1Ab-G439D más la proteína Hsp70 al fragmento de Caderina CR12

Se realizaron ensayos tipo ELISA Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) donde se analizaron las uniones de las protoxinas Cry1Ab (silvestre y la mutante G439D) en cuatro concentraciones crecientes al receptor Caderina (1 µg/pozo) en ausencia y presencia de la chaperona Hsp70 (en una concentración 1:30 con respecto a la protoxina). En la **Figura 18** se muestra que las protoxinas se unen al fragmento de Caderina CR12. Sin embargo, la mutante tiene uniones muy bajas al receptor Caderina CR12, lo que incrementa en presencia de Hsp70.

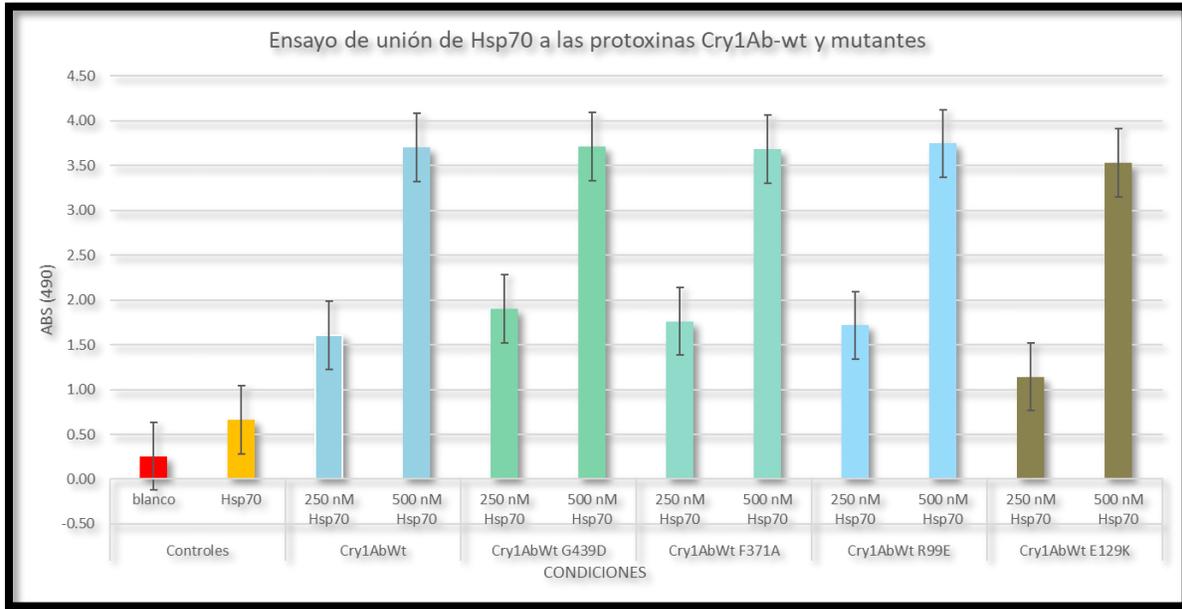


Figura 18. Unión de las protoxina Cry1Ab-Wt y Cry1Ab-G439D al fragmento de Caderina CR12 en presencia de la chaperona Hsp70 (1:30). Se evaluaron 4 concentraciones crecientes de protoxina (6 nM, 12 nM, 25 nM y 50 nM) al fragmento de Caderina CR12 (1 µg/pozo) en presencia y ausencia de Hsp70 (relación 1:30). Se utilizó anti-1Ab (10,000) como anticuerpo primario y anti-conejo-HRP (10,000) como anticuerpo secundario. Experimento representativo de dos repeticiones.

8 DISCUSIÓN

Con el fin de entender a detalle el proceso que se lleva a cabo en la intoxicación de los insectos blanco a través de las proteínas Cry, se han caracterizado diferentes proteínas con mutaciones puntuales afectadas en diferentes pasos de su modo de acción, como es el caso de la mutante Cry1Ab-G439D (afectada en la unión al receptor Caderina) (Rodríguez-Almazán et al., 2009), la Cry1Ab-R99E (afectada en la formación de la estructura oligomérica de 250 kDa) (Jiménez-Juárez et al., 2007) y la Cry1Ab-E129K (afectada en la inserción a la membrana) (Rodríguez-Almazán et al., 2009). En este trabajo se buscó entender más a detalle los procesos que se llevan a cabo en el mecanismo de intoxicación de estas proteínas en su interacción con la chaperona Hsp70.

Anteriormente, se realizaron trabajos de estudio enfocados a otras chaperonas moleculares donde se incluyeron ensayos con la chaperona Hsp70, en los cuales se demostró que dicha chaperona es capaz de proteger a la protoxina Cry1Ab-wt de la degradación por proteasas intestinales, además de aumenta la toxicidad de Cry1Ac contra el lepidóptero *P. xylostella* (García-Gómez et al., 2019).

En el presente proyecto, se exploró más ampliamente a la chaperona Hsp70. Para ello, se realizaron bioensayos de toxicidad donde se pusieron a prueba las protoxinas silvestre y tres mutantes (Cry1Ab-G439D, Cry1Ab-R99E y Cry1Ab-E129K) seleccionadas debido a las mutaciones puntuales que le otorgaban nula toxicidad ante su insecto blanco. Se encontró que, en todos los casos, en presencia de la chaperona molecular Hsp70, la toxicidad de cada una de las protoxinas se potenciaba. En el caso de la protoxina Cry1Ab-Wt, se obtuvo una mortalidad de hasta el 80% de los insectos blanco, siendo esto más del doble de mortalidad en contraste a los experimentos en ausencia de la chaperona. Para la protoxina Cry1Ab-G439D, se halló el mayor aumento de la mortalidad en contraste al tratamiento sin chaperona, pasando de un 8% de mortalidad, a un 25% de mortalidad, siendo la mortalidad más alta entre todas las mutantes. Para las protoxinas Cry1Ab-R99E y Cry1Ab-E129K, se obtuvieron resultados similares, pasando del 4% al 16% de mortalidad en los tratamientos con chaperona.

Recordando que la protoxina Cry1Ab-G439D, es la que se encuentra afectada en la unión a Caderina, estos resultados sugieren que la chaperona Hsp70 estabiliza de alguna forma la unión de esta mutante con su receptor caderina, lo que concuerda con resultados obtenidos anteriormente por García-Gómez y colaboradores en el 2019, donde se encontró que la chaperona Hsp90 es capaz de estabilizar la unión de la protoxina Cry1Ab-G439D al receptor de Caderina.

Las chaperonas moleculares están involucradas en el plegamiento de novo, el replegamiento de proteínas desnaturalizadas por estrés, así como el ensamblaje oligomérico, entre otras funciones. Esta puede ser la causa del aumento de toxicidad de las mutantes Cry1Ab-R99E (afectada en la formación de la estructura oligomérica) y Cry1Ab-E129K (afectada en la inserción a la membrana).

En el trabajo de García-Gómez del 2019, se realizaron ensayos con jugo gástrico de *P. xylostella*, donde se probó que la chaperona Hsp70 protege contra la proteólisis a la

protoxina Cry1Ab. Esto puede ser la razón por la cual se potencie la toxicidad de la protoxina. Se especula que en el proceso *in vivo*, la razón puede ser que probablemente, las primeras protoxinas Cry llegan a la pared intestinal del insecto, rompiendo dichas células y liberando el contenido intracelular, donde se encuentran las chaperonas, entre ellas la chaperona Hsp70. Al ocurrir esto, la chaperona se une a la protoxina, estabilizando su interacción con el receptor de Caderina y aumentando así la inserción en la membrana y así también su toxicidad.

En el caso de los ensayos de tipo ELISA, se encontró que la chaperona Hsp70 es capaz de unirse a las protoxinas Cry1Ab, tanto a la silvestre (wt) como a las mutantes (G439D, F371A, R99E y E129K). Cabe destacar que se descartó el uso de la mutante Cry1Ab-F371A porque en el proceso de elaboración de los bioensayos, se advirtió que tenía una alta tasa de mortalidad (similar a la de la silvestre).

También se realizaron ensayos tipo ELISA en presencia del fragmento de Caderina (CR12) y la chaperona, solo con la protoxina silvestre y la mutante Cry1Ab-G439D, debido a que era la de mayor interés por los resultados obtenidos en los bioensayos. En este ensayo, se encontró que la chaperona Hsp70, aumenta la unión de la mutante Cry1Ab-G439D al fragmento de Caderina CR12.

Aun no se sabe con exactitud la ruta que lleva a la chaperona a recuperar la toxicidad de la mutante Cry1Ab-G439D, sin embargo, se cree que puede deberse a que la chaperona fija al loop 3 del dominio II de la mutante, lo que ocasiona que se establezca su interacción con el receptor de Caderina.

Esta información será útil en la creación de nuevos o mejores bioplaguicidas, así como para la comprensión de los mecanismos de toxicidad, logrando así el avance en herramientas biotecnológicas de los cuales nos podamos beneficiar en un futuro.

9 CONCLUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede establecer de manera concluyente que la chaperona molecular Hsp70 favorece la unión de la mutante Cry1Ab-G439D, (la cual se está afectada en su capacidad de unirse al fragmento CR12) con su receptor cadherina específico. Este evento de interacción molecular, así como la protección a la degradación por proteasas de la protoxina antes demostrado, resulta en la potenciación de la toxicidad de la mutante Cry1Ab-G439D en las larvas del tercer instar del lepidóptero *M. sexta*.

10 PERSPECTIVAS

- 1) Determinar el mecanismo de acción por el cual la chaperona Hsp70 lleva a la recuperación de la toxicidad en la protoxina Cry1Ab-G439D.
 - a) Ensayos *in vitro* de oligomerización de la protoxina Cry1Ab-G439D en presencia de la Hsp70.
 - b) Localización de protoxinas/Hsp70 marcadas con fluorescencia en tejidos intestinales de *M. sexta* usando técnicas de microscopia.

- 2) Comprobar si la actividad de chaperona tiene un efecto directo en la capacidad de recuperar la toxicidad de la protoxina Cry1Ab-G439.
 - a) Construir chaperonas Hsp70 mutantes deletando el sitio de unión a ATP y observar su interacción con la protoxina Cry1Ab-G439.

- 3) Determinar si existe alguna interacción entre la chaperona Hsp70 y el receptor caderina para comprender mejor su interacción en presencia de las protoxina Cry.

- 4) Entender la sinergia entre las chaperonas Hsp70 y Hsp90 para potenciar la toxicidad de Cry1Ab-G439D, realizando algunos de los experimentos antes mencionados en presencia de ambas chaperonas.

BIBLIOGRAFÍA

- Angst, B. D., Marcozzi, C., & Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 4), 629–641. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.4.629>
- Arce Centeno, J. M. (1990). Comparacion de la eficiencia de tres insecticidas para control de palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.) en brocoli y coliflor en el Cebaj, Celaya, GTO. <http://132.248.9.195/ptd2017/septiembre/0765928/Index.html>
- Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., & Gómez, I. (2010). Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), 12497–12503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085266>
- Arroyo Loranca, R. G. (2009). Análisis de unión de toxinas Cry1A silvestres y modificadas en larvas resistentes y sensibles a toxinas Cry de *Pectinophora gossypiella* y *Plutella xylostella*. (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/229660>
- Bel, Y., & Escrache, B. (2006). Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. *Gene*, 381(1–2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.07.001>
- Bogumil, D., & Dagan, T. (2012). Cumulative impact of chaperone-mediated folding on genome evolution. *Biochemistry*, 51(50), 9941–9953. <https://doi.org/10.1021/bi3013643>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49(4), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S., & Soberón, M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1667(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.013>
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Bravo, A., Soberón, M., & Gill, S. (2005). *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use. In *Comprehensive molecular insect science* (pp. 175–205). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00081-8>

- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., & Craig, E. A. (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, *101*(2), 119–122. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80806-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80806-5)
- Chirinos, D. T., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Bravo, S. P., Solis, L., & Geraud-Pouey, F. (2020). Insecticides and agricultural pest control: The magnitude of its use in crops in some provinces of Ecuador. *Ciencia Tecnologia Agropecuaria*, *21*(1), 1–16. https://doi.org/10.21930/RCTA.VOL21_NUM1_ART:1276
- Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis* toxin classification. In *Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol* (pp. 41–52). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8>
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., & Schnepf, H. E. (2003). Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, *37*(1), 409–433. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143042>
- de Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, *17*(4), 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)
- Federici, B. A. (2005). Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, *89*(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.06.007>
- García-Gómez, B. I., Cano, S. N., Zagal, E. E., Dantán-Gonzalez, E., Bravo, A., & Soberón, M. (2019). Insect Hsp90 chaperone assists *Bacillus thuringiensis* Cry toxicity by enhancing protoxin binding to the receptor and by protecting protoxin from gut protease degradation. *MBio*, *10*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.02775-19>
- Gómez, I., Pardo-López, L., Muñoz-Garay, C., Fernandez, L. E., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M., & Bravo, A. (2007). Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, *28*(1), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.013>
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A., & Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*, *513*(2–3), 242–246. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02321-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02321-9)
- Griffitts, J. S., & Aroian, R. V. (2005). Many roads to resistance: How invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays*, *27*(6), 614–624. <https://doi.org/10.1002/bies.20239>
- Griko, N., Candas, M., Zhang, X., Junker, M., & Bulla, L. A. (2004). Selective antagonism to the cadherin BT-R1 interferes with calcium-induced adhesion of epithelial membrane vesicles. *Biochemistry*, *43*(5), 1393–1400. <https://doi.org/10.1021/bi0355692>

- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(6), 574–581. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1591>
- Jiménez-Juárez, N., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Saab-Rincon, G., Damian-Almazo, J. Y., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. (2007). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21222–21229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701314200>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. In *Annual Review of Biochemistry*. 82, Issue (1). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. *Plants (Basel)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/plants10061185>
- Mayer, M. P. (2013). Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(10), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.001>
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(6), 670–684. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- Morán Luengo, T., Mayer, M. P., & Rüdiger, S. G. D. (2019). The Hsp70–Hsp90 chaperone cascade in protein folding. *Trends in Cell Biology*, 29(2), 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.004>
- Nakanishi, K., Yaoi, K., Nagino, Y., Hara, H., Kitami, M., Atsumi, S., Miura, N., & Sato, R. (2002). Aminopeptidase N isoforms from the midgut of *Bombyx mori* and *Plutella xylostella* - Their classification and the factors that determine their binding specificity to *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin. *FEBS Letters*, 519(1–3), 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02708-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02708-4)
- Pacheco, S., Gómez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodríguez-Almazán, C., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2009). Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “Ping Pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 284(47), 32750–32757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024968>
- Pacheco, S., Gómez, I., Gill, S. S., Bravo, A., & Soberón, M. (2009). Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. *Peptides*, 30(3), 583–588. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.08.006>

- Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 3–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>
- Perotti, E., & Gamundi, J. C. (2007). Evaluación del daño provocado por lepidópteros defoliadores en cultivos de soja determinados e indeterminados (GM III, IV, V) con diferentes espaciamientos entre líneas de siembra. *Protección Vegetal INTA EEA Oliveros*, 120–125.
- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255–281. <https://doi.org/10.1128/mubr.00034-06>
- Polanczyk, R. A., van Frankenhuyzen, K., & Pauli, G. (2017). The american *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market. In L. M. Fiuza, R. A. Polanczyk, & N. Crickmore (Eds.), *Bacillus Thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus: characterization and use in the Field of Biocontrol*. 173–184 pp. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8>
- Raymond, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology*, 18(5), 189–194. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.006>
- Rivas, A., & Martínez, M. de los A. (2012). Consumo y coeficiente de utilización del alimento de *Heliothis* spp. y *Manduca sexta* (Butler) en el cultivar de tabaco. *Protección Vegetal*, 27(1), 8–12.
- Rodríguez-Almazán, C., Zavala, L. E., Muñoz-Garay, C., Jiménez-Juárez, N., Pacheco, S., Masson, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2009). Dominant negative mutants of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin function as anti-toxins: demonstration of the role of oligomerization in toxicity. *Plos One*, 4(5), e5545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005545>
- Serrano Carreón, E., & Galindo Fentanes, L. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*, 77–87. [http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control Biologico Ciencia.pdf](http://www.ibt.unam.mx/Geg/lineas/Control%20Biologico%20Ciencia.pdf)
- Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(8), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8330-9>
- Soberón, M., Pardo-López, L., López, I., Gómez, I., Tabashnik, B. E., & Bravo, A. (2007). Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, 318(5856), 1640–1642. <https://doi.org/10.1126/science.1146453>
- Zavala, L. E., Pardo-López, L., Cantón, P. E., Gómez, I., Soberón, M., & Bravo, A. (2011). Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent

after insertion of part of domain I into the membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 19109–19117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.202994>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de Calidad

Acreditado por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 5 de octubre de 2023

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

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. TAMARA ALEJANDRINA SANCHEZ CONDE**, con el título del trabajo: **Evaluación del efecto potenciador de la chaperona Hsp70 sobre la toxicidad de mutantes de la proteína Cry1Ab en el lepidóptero *Manduca sexta*.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

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

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: DR. GUADALUPE PEÑA CHORA

SECRETARIO: DRA. MA. DEL CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ

VOCAL: DRA. BLANCA INÉS GARCÍA GÓMEZ

SUPLENTE: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

SUPLENTE: DR. ENRIQUE SALAS VIDAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

MA DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ | Fecha:2023-10-05 16:45:00 | Firmante

A4rTWFjwCtVh4xmQao0AjNu7AULLi3UVr6uStYOFcyJkIMw3XgsfosGdfZ6EZBlv7TIRons6BPsnZejHekI3+NRrgDA13ZLZTAkvhb5X+IAU0S0Ts7ccPC85jWF3+5xsdTQpzdKXT4o+dc4FICGhCXmQmP5PETpjtz5oKBXd42lvGC99EJ8L2L8tLDKsqN+nJl65hQ0B+4HhEmcOkiSlw1O+Gc1IptRRRkRmzhXhaMvJULjxGLp68FdgooocRfeo/gDrBn0f7L67leJeLSBzs wgymlf/Xradu2hyU+VwnfolePBMN8Wl4tomulTA41mKuvYlFvdCB2tnGd0A12VMJQ==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2023-10-05 16:52:18 | Firmante

gfaobyOFtx2crVCYX4LS6wA+jwMzGxwA5pzwFSmfVYObWm3GOPnZFXcv6+DDqR8coBMnMln/qiaplxvZqXKRmahsARUTs5EZEKculDa8pyA1xyXSiLkIXRf3H32yDCZ666qQF GHuXZR8fNGHQW1I53sAPXGjhUU3NF9rQztI0eM14+a7Mgrrb8ETfCyNsPbVklkWSuK1WryvVOZ4b7N+yydu8YRLT/SqKWA96m1m+y9z/k4W0DjC+d1CGQGH9XkRpTRpjv6 SjlY11L4n/1kqH+NU44nQMqMqmpRQTUhmEq5Eph0pLHypoE4C7qlRrHoKoTKF2BYmctArV2osaQ==

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2023-10-05 17:20:45 | Firmante

YGsc3dD/j64eDjdUhb0zJkvZiBaTYttgMNI6w/H8sTCTW8bVOj7kL8CoNTgUzOPOfJBabYM9X9WMSXHPV2Gdm6tf1A0S4ohS6yyDi59MGisGjHVausyNti8li6pPmj/oBRODyqLTLF qbj4cfVZfm4SU/bOuT3zNbP01ySj6N4A5TmstYgc9D8YnJOuCXpc/JrTViMjrcrCkbaA/zlAIRQMrbpZmz0b7BqPGXht4aguNvly1Cpr8ZIMLzQiu7VkvFo9bQZzi424XTIfJIDlw4tfjFih 5WqPqlAnVqK2NsVgMYWU/188YU6hUEBzBQRUWzxU/ojw9pH2e903EYRTs3JA==

ENRIQUE SALAS VIDAL | Fecha:2023-10-05 22:20:33 | Firmante

rLRRzH8n87ZSjmCwPHZtq9sY+3aolrGeQ3+gsN7iZewXV3/bz5k/Jbs+Jebcp04MeBFkdXPZF/tjmqzBUPIh2XFSSbS01ueR7emGsour68nrpAGTVv3bbwMAavawiWLBK+ndBz+U Mwzou8n5+AQcNhdFqVcKcFuWip1DqeJTn6+2K9w4voGpax8/QBB16p2KWLTE+6Bh2ndf8r12CCK/ucj2+83tNc+BcJMa+pVq3/FH8HVZ/qlik14Jbo9fHxnpd3rMceHYduNDTHsTXT rJ29Mml0/sMm/OneKydVlGWI/1TshQOef9D0xbNWKwyoAii+cf1qqNwRn39emSUhuwov==

BLANCA INES GARCIA GOMEZ | Fecha:2023-10-06 09:34:28 | Firmante

NFKsoJqAXPuSYpRLiKSn173fNoXwJZo/68lyFCVp52SmQ4/ZFCtMrAQa5N6DIRO7yRztZoSkUwiz9L260wflbDkb5izdgmOiw2lcepZ+nDxoGkmYm8K4NBNN+2wn6NQRl59ai7 SLOeWfuOUsbAq4NnwoafBM714Clntvoqj34ahON88V68fgNsJb8AY3Mj5ijidZK4v/FMwlk36X/lmhqTYCxr6cYz9W4G3Hv4Zh6QmbLu9v3Ku7+oPguqsxktqWv8A5n3xJZmA9S/L ZcaiOBkKip/PEQoW+H46JTyOhqF7ktDasZEMzWu9dwi+L+0s1N9a5+/cfWnSk2Q51zGQ==

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



a6OLcTg32

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4uUIH3LWojVbGpOScUvk2cpHluMDU13Z>

