

**ANÁLISIS MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE
VARIANTES Cry11 DE *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTROL DE *Aedes
aegypti*.**

Miguel Orlando Suárez Barrera

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2016**

**ANÁLISIS MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE
VARIANTES Cry11 DE *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTROL DE *Aedes
aegypti*.**

Miguel Orlando Suárez Barrera

Trabajo de Grado para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

ÁLVARO MAURICIO FLÓREZ ESCOBAR

PhD. Ciencias Básicas Biomédicas

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2016

DEDICATORIA

A ese ser inefable que no tiene nombre,

A María Alejandra por haberme enseñado muchas cosas, sin decirme una palabra,

A mis padres, por las cosas buenas que me enseñaron,

A la vida misma por darme cicatrices,

A todas las personas que creen en mí, y sé que seguirán haciéndolo

Gracias, por estar siempre a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Santander, UDES, por brindar mi formación como Microbiólogo Industrial, y por la financiación para la ejecución de este proyecto de investigación (0032010).

A la Universidad Industrial de Santander, UIS, por permitirme resaltar valores y atributos como profesional.

Al Dr. Álvaro Mauricio Flórez Escobar, por ser guía, consejero y formador.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS, por financiar parte de este trabajo de posgrado con los proyectos en ejecución (1299-12-16813 y 520-1545-31565).

A la secretaria de salud de Bucaramanga, por proveer huevos de *Aedes aegypti* y asesorías.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	14
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo General.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4. MARCO TEÓRICO	24
4.1 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	24
4.2 Proteínas Cry.....	25
4.2.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de Bt.....	31
4.2.2. Proteínas Cry11.....	34
5. METODOLOGÍA.....	45
5.1 Diseño del estudio:	45
5.2. HIPÓTESIS	45
5.3. Metodología.....	45
5.4 Cepas y medios de cultivo.	46
5.5. Diseño de variantes cry11.....	47
5.5.1. Obtención no racional de variantes <i>cry11</i>	47
5.6. Análisis molecular para las variantes Cry11 obtenidas por barajado de ADN.....	49
5.7. Transformación por electroporación.....	50
5.8. Preparación de las variantes en los ensayos de toxicidad contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	51
5.9. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	54
5.10. Concentración letal media (CL ₅₀).	54
5.11. Consideraciones éticas	54

6. RESULTADOS	56
6.1. Análisis molecular de variantes obtenidas por barajado de ADN.	56
6.2. Concentración letal Media (CL ₅₀)	75
7. DISCUSIÓN.....	77
8. CONCLUSIONES	84
9. RECOMENDACIONES.....	86
10. DIVULGACIONES	87
BIBLIOGRAFIA.....	88
ANEXOS	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dendograma de las proteínas Cry.....	27
Figura 2. Bloques conservados de las proteínas Cry y estructura tridimensional de Cry1Aa.	28
Figura 3. Dominio I de la toxina Cry3A.....	29
Figura 4. Dominio II de la toxina Cry1 Aa.....	30
Figura 5. Dominio III de la toxina Cry.	31
Figura 6. Aspectos principales del mecanismo de acción de las δ -endotoxinas...32	
Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas Cry11Aa, Cry11Ba y Cry11Bb.....	38
Figura 8. Esquema general para el desarrollo experimental del proyecto.	46
Figura 9. Imagen mapa del subclonaje de las variantes y genes parentales en el vector de expresión pSV2.....	48
Figura 10. Esquema del sitio de los cambios efectuados en las variantes racionales.	49
Figura 11. Esquema general para la preparación de las variantes obtenidas en los ensayos de toxicidad.	51
Figura 12. Comparación filogenética de las proteínas variantes y parentales Cry11.	60
Figura 13. Alineamiento de secuencias de proteínas.	63
Figura 14. Esquemización de las variaciones obtenidas librería de barajado de ADN, respecto a Cry11Aa.....	64
Figura 15. Corrido de electroforesis de variantes barajado, racionales y parentales subclonados en pSV2.....	66
Figura 16. Electroforesis en gel de ADN plasmídico obtenido de la transformación de cada una de las variantes de Cry11 en <i>Bt</i> BMB171	68
Figura 17. Coloración de verde de malaquita más safranina.....	70
Figura 18. Cuantificación de proteínas de las variantes y parentales empleando el método de Bradford	71

Figura 19. SDS-Page 10 % 74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividad toxica de proteínas Cry11 nativas y recombinantes.....	36
Tabla 2. Características generales de los genes y proteínas Cry11 de <i>B. thuringiensis</i>	36
Tabla 3. Cepas recombinantes de <i>Bt</i> que contienen genes <i>cry11</i>	39
Tabla 4. Porcentaje de identidad y similitud de las variantes obtenidas mediante barajado de ADN respecto a los genes parentales.	56
Tabla 5. Cambios en los dominios de las variantes barajado.	58
Tabla 6. Cambios en la secuencia aminoacídica de las variantes obtenidas por barajado de ADN.	62
Tabla 7. Eficiencia de transformación en DE3BL21.....	65
Tabla 8. Eficiencia de transformación en BMB171.	67
Tabla 9. Resultados obtenidos en el ensayo grueso para las variantes obtenidas por barajado de ADN.	69
Tabla 10. Conteo de número de esporas por ml de las variantes.	70
Tabla 11. Promedio de la estimación del peso seco de las cepas variantes y recombinantes de Cry11.....	72
Tabla 12. Determinación de la proporción peso seco y proteína solubilizada a partir de cristales.	73
Tabla 13. Pesos moleculares obtenidos para cada una de variantes y controles Cry11Aa y Cry11Bb.	75
Tabla 14. Valores de CL ₅₀ obtenidos por la prueba ProBit.....	76
Tabla 15. Conteo de larvas vivas, de las dos replicas llevadas a cabo para calcular la concentración letal media (CL ₅₀).	104

RESUMEN

TITULO: ANÁLISIS MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA DE VARIANTES Cry11 DE *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTROL DE *Aedes aegypti*.*

AUTOR: Miguel Orlando Suárez Barrera**

PALABRAS CLAVE: *Bacillus thuringiensis*, barajado de ADN, *Aedes aegypti*, Cry11, mutagénesis sitio dirigida, concentración letal media (CL₅₀).

DESCRIPCIÓN:

Bacillus thuringiensis es utilizado como controlador biológico debido a las propiedades de las toxinas que produce. Las Cry11 han demostrado tener actividad tóxica contra *Aedes aegypti*. A partir de una librería obtenida de barajado de ADN de los genes *cry11Aa*, *cry11Ba* y *cry11Bb*, se analizaron cinco variantes: 1, 8, 23, 79 y 81; mediante una aproximación racional, se generaron A92D y C157R a partir de dos mutaciones en el dominio I de la toxina Cry11Bb. Con el objetivo de determinar actividad tóxica contra *A. aegypti*, las variantes se expresaron en la cepa acristálfera de *Bt* BMB171 y se comparó frente a los controles Cry11Aa y Cry11Bb. Los resultados indican que las variantes presentaron altos porcentajes de similitud e identidad con *cry11Aa* y además, inserciones, deleciones y mutaciones puntuales a lo largo de las secuencias. Todas las variantes presentaron deleciones en el amino terminal del Dominio I, la región que codifica para el Dominio II fue la más conservada, mientras que la que codifica para el Dominio III presentó el mayor número de sustituciones. La variante 79 fue la más variable (20%) y la 23 presentó una identidad del 99% con respecto a la parental. La 23 y 81 disminuyeron la actividad tóxica 6.9 y 11.6 veces respectivamente, la 1 y 79, mantuvieron una toxicidad similar a Cry11Aa. La 8 aumentó su toxicidad en 3,8 veces más que Cry11Bb y 6 veces más que Cry11Aa. La A92D redujo la toxicidad en 13,7 veces y C157R no presentó actividad detectada (>500ng/ml). Los resultados evidencian la importancia de estas mutaciones en los dominios II y III relacionados con la actividad tóxica de Cry11Aa contra *A. aegypti*, así como la conservación A92D y C157R en Cry11Bb. Esta información es importante en el diseño de proteínas Cry11 para el control de vectores.

* Trabajo de Grado

**Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Álvaro Mauricio Flórez Escobar PhD Ciencias Básicas Biomédicas

ABSTRACT

TITLE: MOLECULAR ANALYSIS AND TOXIC DETERMINATION OF Cry11 VARIANTS FROM *Bacillus thuringiensis* IN THE CONTROL OF *Aedes aegypti**

AUTHOR: Miguel Orlando Suárez Barrera**

KEY WORDS: *Bacillus thuringiensis*, DNA shuffling, *Aedes aegypti*, Cry11, Site directed mutagenesis, Half lethal concentration (LC₅₀).

DESCRIPTION:

Bacillus thuringiensis is used as biological control due to the bio insecticide properties based on their toxins. Among these, Cry11 toxins have shown toxic activity against *Aedes aegypti*. From a DNA shuffling library obtained by recombination between *cry11Aa*, *cry11Ba* and *cry11Bb* genes, five variants: 1, 8, 23, 79 and 81 were analyzed. Additionally, two point mutations in the region encoding for domain I from Cry11Bb were generated obtaining two variants, A92D and C157R. In order to determine if these variants exhibit toxic activity towards *A. aegypti*, they were expressed in acrysaliferous *Bt* strain (BMB171) and compared their toxic activity against parental proteins Cry11Aa and Cry11Bb. The results indicate that five variants showed high similarity and identity with *cry11Aa* gene, and insertions, deletions and point mutations throughout the sequences were also found. All variants showed deletions in the region encoding N-terminal for domain I. The region encoding for domain II was less variable whereas the region coding for domain III, showed a highest number of substitutions. Variant 79 was the most variable and 23 was the less with respect to Cry11Aa. Variants 23 and 81 reduced the toxic activity in 6.9 and 11.6 times, respectively. Variants 1 and 79, maintained a similar toxicity compared to Cry11Aa. Interestingly, the variant 8 increased toxicity in 3.8 times more than Cry11Bb and 6 times more than Cry11Aa. Moreover, the variant A92D decreased toxic activity 13.7 times and C157R variant did not present detected activity (>500 ng/ ml). The results obtained in this study demonstrate the importance of these mutations in domains II and III of the toxins Cry11Aa as well as the conservation of A92D y C157R from Cry11Bb in their possible role in toxic activity against *A. aegypti*. The information is valuable for design of new Cry11 toxins for vector control.

*Master's thesis

**Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director: Álvaro Mauricio Flórez Escobar PhD Ciencias Básicas Biomédicas

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es un bacilo Gram-positivo, ubicuo, formador de espora, que durante su fase de esporulación produce inclusiones en forma de cristal, razón por la cual reciben el nombre de toxinas Cry o δ endotoxinas y que tienen capacidad insecticida contra diferentes órdenes de insectos (Hofte and Whiteley 1989).

Hasta el momento se han descrito 71 subespecies de *Bt* clasificadas con base en el antígeno flagelar (H) (Khyami-Horani, Hajaij et al. 2003) de las cuales se distingue *Bt*subsp. *Israelensis* (*Bti*) (H14) como la primera subespecie encontrada con actividad tóxica contra dípteros. *Bti* produce cuatro protoxinas en forma de cristal entre las que se encuentra la toxina Cry11Aa y se sabe que, mediante una acción sinérgica, produce la muerte de larvas de mosquitos. De acuerdo a la similitud entre secuencias y el grado de divergencia filogenética, Cry11Aa comparte homología con otras dos toxinas: Cry11Ba, *Bt*subsp. *Jegathesan* (*Btjeg*) y Cry11Bb, *Bt*subsp. *Medellin* (*Btmed*) (Orduz, Realpe et al. 1998)(http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) y así mismo, poseen actividad tóxica contra dípteros, específicamente contra *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* (Delecluse, Rosso et al. 1995, Orduz, Realpe et al. 1998).

De acuerdo con la estructura cristalográfica de las distintas toxinas Cry descritas hasta el momento (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1) (Li, Carroll et al. 1991, Grochulski, Masson et al. 1995, Derbyshire, Ellar et al. 2001, Galitsky, Cody et al. 2001, Morse, Yamamoto et al. 2001, Boonserm, Davis et al. 2005, Guo, Ye et al. 2009, Hui, Scheib et al. 2012), éstas comparten tres dominios conservados. El dominio I está compuesto por siete a ocho α hélices

anfipáticas las cuales rodean una hélice de carácter hidrofóbico (hélice α -5) que se encuentra involucrada en la formación del poro (Li, Choi et al. 2007). El dominio II que consiste de tres hojas β antiparalelas con bucles expuestos. Este dominio está involucrado en la interacción con receptores de membrana del intestino medio de insectos (Nair, Liu et al. 2008; Grochulski, Masson et al. 1995, Li, Choi et al. 2007). El dominio III que tiene una estructura en β sándwich formada por dos hojas β antiparalelas y está involucrado en la estabilidad proteica y la unión a receptores de membrana (Derbyshire, Ellar et al. 2001, de Maagd, Bravo et al. 2003). Si bien estos dominios mantienen una estrecha relación con su modo de acción, aún no se conocen los mecanismos citotóxicos, ni tampoco se cuenta con un modelo estándar del modo de acción que culmina con la muerte del insecto (Melo, Soccol et al. 2016). De los dos modos de acción existentes, el modo de unión secuencial es el más aceptado (Bravo, Gill et al. 2007, Pardo-Lopez, Munoz-Garay et al. 2009, Soberon, Pardo et al. 2010). Actualmente se sabe que este modo ocurre cuando las δ endotoxinas son ingeridas en forma de protoxinas y luego solubilizadas por acción de proteasas en el intestino de los insectos exponiendo la parte activa de la toxina. Una vez entran en contacto con los receptores de membrana, la toxina activa sufre cambios conformacionales que facilitan su oligomerización y la inserción en la membrana aumentando la permeabilidad resultando en desbalance osmótico, provocando la muerte del insecto (Melo, Soccol et al. 2016).

El otro modo de acción denominado vía de señalamiento, ocurre de dos formas: la primera; una forma lítica, produciendo reacciones sucesivas que alteran el metabolismo celular sin generar apoptosis, debido a que no siempre las proteínas insecticidas se unen a la membrana (Zhang, Zhao et al. 2005) y la segunda, generando estímulos. Esta forma infiere que después de la unión de las Cry a los receptores N-aminopeptidasa y cadherina, se produce un estímulo activando una vía de señalización y estimulando la proteína G que resulta en la activación de los canales de magnesio en la membrana plasmática ocasionando un flujo anormal de iones lo que conduce a la destrucción de la membrana (Zhuang, Oltean et al. 2002)

y provocando la muerte celular (Lemeshko and Orduz 2013, Zhang, Candas et al. 2006, Melo, Soccol et al. 2016).

Bt ha demostrado ser amigable con el ecosistema y no representa un riesgo para otros seres vivos incluyendo el hombre (Roh, Choi et al. 2007, Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011, Pardo-Lopez, Soberon et al. 2013). Sin embargo, si bien existe controversia sobre su aplicación y uso en cultivos transgénicos, así como los efectos que estos tendrían en el medio ambiente, ello no ha sido un obstáculo para su aplicación en programas de control de enfermedades transmitidas por vectores, como ocurre con *Bti* (Rosso and Delecluse 1997, Fillinger and Lindsay 2006, Park, Pino et al. 2013, Guan, Dai et al. 2014, El-Kawokgy, Hussein et al. 2015) o para el uso de *Bt* en plantas transgénicas que expresan toxinas específicas para insectos (Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011). Frente a nuevos aislamientos de *Bt*, así como el diseño de toxinas más potentes e innovaciones en la formulación y aplicación, *Bt* sigue siendo una alternativa con potencial biotecnológico importante (Lacey, Grzywacz et al. 2015).

En una reciente revisión se recoge evidencia científica sobre las estrategias empleadas para aumentar la eficacia de las toxinas Cry como son: intercambios de dominios, mutagénesis sitio dirigida, uso de péptidos sintéticos y bibliotecas de fagos (Deist, Rausch et al. 2014). También en otra reciente revisión se explican los avances en técnicas de barajado de ADN (*DNA shuffling*) y el diseño asistido por computador (Lucena, Pelegrini et al. 2014). En paralelo, se han reportado estrategias dirigidas al control directo del vector *A. aegypti* creando mosquitos transgénicos (Carvalho, Costa-da-Silva et al. 2014) o la liberación de zancudos portadores de *Wolbachia*, bacteria que impide la transmisión del virus del Dengue (Endersby and Hoffmann 2013) y en prospectiva hacia la prevención de la enfermedad, la vacuna desarrollada por Sanofi Pasteur (CYD-TDV) que ha mostrado una eficacia moderada hasta el momento (Wilder-Smith and Gubler 2015).

En estudios previos desarrollados por el grupo de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Santander, UDES, se obtuvo una librería de 84 variantes a partir la recombinación aleatoria de barajado de ADN entre tres genes parentales *cry11Aa*, *Ba* y *Bb*. De esta librería se identificaron 5 variantes: 1, 8, 23, 79 y 81 las cuales por análisis de secuencia, se logró determinar que tienen un tamaño molecular entre 2,5 a 3 kb con alta homología con genes *cry11*. Sin embargo, de estas variantes no se conoce las características moleculares ni la actividad que poseen frente a *A. aegypti*. Así mismo, se propuso conocer si dos mutaciones A92D y C157R, que han mostrado tener efecto en Cry1Ab en el control de *Manduca sexta* (Alzate, Hemann et al. 2009) y que se han descrito también en Cry1Aa y 1Ac (Wu and Aronson 1992), afectan la toxicidad en Cry11Bb frente *A. aegypti*. En este trabajo se reportan las características moleculares y la actividad tóxica contra larvas de *A. aegypti* de 7 variantes obtenidas por barajado de ADN y mutagénesis sitio dirigida.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las toxinas Cry de *Bt* tienen actividad tóxica contra distintos órdenes de insectos y que por su inocuidad frente a los demás seres vivos y con el medio ambiente, vienen siendo utilizadas comercialmente en el mundo (Melo, Soccol et al. 2016). *Bt* constituye casi el 2% del mercado de insecticidas y para el año 2011 se reportaron por lo menos 32 compañías relacionadas en la producción de bioinsecticidas a base de *Bt* con aplicaciones en agricultura (Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011, Sanahuja, Banakar et al. 2011). El uso de *Bt* como controlador biológico disminuye la aplicación de insecticidas químicos y aunque se ha reportado que *Bt* no produce efectos negativos para la salud humana y al medio ambiente (Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011) aún no pueden considerarse inocuas por los posibles efectos que producen en los mamíferos (Rubio-Infante and Moreno-Fierros 2015).

Para el mejoramiento de las toxinas Cry se vienen empleando diversas estrategias fundamentadas en su mayoría, en aproximaciones racionales como las reseñadas por (Florez, Osorio et al. 2012) utilizando la ingeniería de proteínas, así mismo intercambios de dominios (Sun, Zhao et al. 2014) y uso de péptidos sintéticos involucrados en el mejoramiento de la estabilidad proteica (Mehlo, Gahakwa et al. 2005). También se han empleado aproximaciones no racionales basadas en evolución dirigida como barajado de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (RCP) propensa a error (*Error-prone PCR*) (Lucena, Pelegrini et al. 2014), como también microarreglos usando librería de fagos, entre otras (Knight, Broadwell et al. 2004; Craveiro, Gomes Junior et al. 2010; Oliveira, Silva et al. 2011). Mediante estas aproximaciones, además de obtener variantes mejoradas, ha permitido identificar mecanismos de activación de las toxinas dependiente del insecto blanco, estabilidad, oligomerización y modulación de la interacción con receptores de la

membrana en células epiteliales del intestino medio de insectos, entre otras (Deist, Rausch et al. 2014). Dentro de un grupo de mutaciones puntuales, también se ha descrito en Cry1Ab y Cry1Ac, las variantes A92D, L157R y L157C que han mostrado tener una toxicidad variable en el control lepidópteros (Wu and Aronson 1992, Alzate, Hemann et al. 2009).

Estudios de evolución dirigida empleando barajado del ADN ha permitido la obtención de proteínas potenciadas contra *Spodoptera exigua* (Lassner and Bedbrook 2001), *Lucilia cuprina*, *Epiphyas postvittana* (Knight, Broadwell et al. 2004) y *Telchin licus licus* (Craveiro, Gomes Junior et al. 2010). Estos trabajos destacan la importancia esta técnica como una herramienta útil, tanto en la construcción de proteínas mejoradas, así como una herramienta para generar conocimiento sobre la relación estructura-función de las proteínas Cry.

Dadas las propiedades de las toxinas Cry11 para matar dípteros, entre ellos los vectores del Dengue, Malaria, Fiebre Amarilla, Chikungunya y Zika, existe suficiente evidencia que demuestra que es posible crear toxinas más potentes. Sin embargo, los estudios en toxinas Cry11 son escasos y de los dos existentes, ninguno logró demostrar aumento de la actividad tóxica a partir de las modificaciones realizadas en las proteínas contra *A. aegypti* (Pao-intara, Angsuthanasombat et al. 1988); (Pang, Frutos et al. 1992). Otro estudio de menor relevancia, muestra la obtención de proteínas quiméricas entre Cry11, hallando algunos dominios que interfieren en la formación de los cuerpos de inclusión pero que tampoco lograron aumentar la actividad tóxica contra *Culex quinquefasciatus* y *A. aegypti* (Sun, Zhao et al. 2014).

Considerando este escenario y dado el potencial que tienen para el control de vectores, se hace necesario la obtención de variantes de proteínas Cry11 no solo más efectivas y más potentes, sino que permitan entender su estructura y su función, así como brindar información que permita entender eventos de resistencia de insectos contra *Bt* y contribuir al desarrollo de insecticidas más seguros y letales (Zhang, Candas et al. 2006, Melo, Soccol et al. 2016).

Como una primera aproximación, el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Santander obtuvo una librería de variantes Cry11 mediante barajado de ADN, pero de la cual no se conoce la actividad que tendrían contra *A. aegypti*. De igual forma, por análisis previos, las mutaciones A92D, L157R y L157C, suponen una conservación entre las toxinas Cry y que debido a los efectos que producen a nivel de inserción en la membrana por parte de la hélice α -5 en el dominio I, sugieren un posible papel en la actividad tóxica de la toxina Cry11Bb contra *A. aegypti*.

1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Tienen las variantes Cry11 obtenidas por barajado de ADN y mutagénesis sitio dirigida actividad tóxica contra larvas de *A. aegypti*?

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar que el potencial de *Bt* ha sido explotado por un largo tiempo para la producción de plantas modificadas genéticamente, como controlador de plagas y de vectores de enfermedades en humanos, investigaciones sobre este microorganismo siguen estando incompletas. No obstante, cada año se genera nuevo conocimiento sobre *Bt* que sirve de base para la formulación de nuevos productos con un potencial biotecnológico aplicados a los campos de la industria, de la salud humana y la agricultura (Melo, Soccol et al. 2016).

En América Latina hasta el 2014, la enfermedad predominante transmitida por especies de *Aedes* era el Dengue (DENV) (Alfaro-Toloza, Clouet-Huerta et al. 2015). Luego, el Chikungunya (CHIKV) emerge como una enfermedad secundaria producida por un arbovirus y de alta diseminación en la región. Esta enfermedad que es transmitida por el mismo vector del Dengue, permite la co-circulación de ambos virus y abre la posibilidad de co-infecciones en zonas endémicas (Schilling, Emmerich et al. 2009, Alfaro-Toloza, Clouet-Huerta et al. 2015). En el 2015 se reportaron los primeros casos de infección por picadura de *A. aegypti* del virus del Zika (ZIKV) en Brasil, país en el cual se ha determinado una relación entre la presencia del virus y microcefalia en neonatos (Ventura, Maia et al. 2016). Hasta el momento, en Colombia existe un caso de un paciente de 49 años proveniente de una zona endémica, el cual por pruebas inmunológicas y moleculares reportó la presencia de los tres virus (Villamil-Gomez, Gonzalez-Camargo et al. 2016). Este escenario plantea un reto para la salud pública, en el control de vectores y aparición de virus emergentes debido al calentamiento global y donde las mayores implicaciones en las regiones endémicas están en la atención y en la prestación de servicios de salud. Sumado a ello y frente a la carencia de información respecto de CHIKV y ZIKV hace necesario que el control sea dirigido contra el vector (Villamil-Gomez, Gonzalez-Camargo et al. 2016).

En el mundo se han adelantado varias alternativas para el control de *A. aegypti* que van desde el uso de químicos hasta medidas biológicas. Estas últimas, sin efecto recalcitrante y nocivo al ambiente. Algunas medidas recientes incluyen desde la liberación de zancudos portadores de *Wolbachia*; bacteria que impide la transmisión del virus (Endersby and Hoffmann 2013) hasta la creación de mosquitos transgénicos (Carvalho, Costa-da-Silva et al. 2014). A pesar de lo anterior, la producción de toxinas insecticidas no se detiene, incluyendo las toxinas Cry las cuales son específicas y que se han usado para el control de dípteros por largo tiempo (Rosso and Delecluse 1997, Fillinger and Lindsay 2006, Park, Pino et al. 2013, Guan, Dai et al. 2014, El-Kawokgy, Hussein et al. 2015). Dentro de estas, se encuentran las Cry11 que han demostrado tener actividad tóxica contra mosquitos transmisores de enfermedades (Orduz, Realpe et al. 1998) pero cuyas actividades no son comparables con otras toxinas modificadas como es el caso de la toxina Cry4 y Cry19 (Abdullah, Alzate et al. 2003, Abdullah and Dean 2004). Es por esto que surge la necesidad de crear de toxinas Cry11 por evolución dirigida como una alternativa que puede ser efectiva no solo para aumentar la toxicidad sino el espectro de acción contra otros insectos.

La importancia de este trabajo radica en generar información científica acerca de la relación estructura-función y en el futuro, crear toxinas mejoradas para el control de vectores.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad tóxica de variantes de proteínas Cry11 obtenidas por técnicas de evolución dirigida en larvas de primer estadio de *A. aegypti*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener cepas recombinantes de *Bt* que expresen proteínas de las variantes obtenidas por barajado de ADN.
- Construir dos variantes con mutaciones puntuales en el gen *cry11Bb*.
- Analizar las secuencias de ADN y proteínas de las variantes obtenidas por barajado de ADN.
- Relacionar los cambios encontrados a nivel de la secuencia de las variantes y la actividad tóxica frente a *A. aegypti*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* (*Bt*)

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria Gram positiva, aerobia formadora de endosporas, resistente a temperaturas extremas, a la desecación y algunos desinfectantes. Es sensible a la radiación ultravioleta perdiendo su viabilidad cuando se expone a la luz solar por más de 24 horas (Sanahuja, Banakar et al. 2011). *Bt* ha sido aislada de diversas partes del mundo principalmente de muestras de suelo, alimentos para animales, hojas de plantas e insectos muertos. Fue descubierta por Ishiwata en Japón en 1901 y descrita en Alemania por Berliner en 1911 (Sanahuja, Banakar et al. 2011). *Bt* hace parte del grupo de *B. cereus* que incluyen 5 especies: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* y *B. weihenstephanensi* (Didelot, Barker et al. 2009), así mismo esta subdividido en 71 subespecies con base en las propiedades del antígeno flagelar (H) (Lecadet, Frachon et al. 1999) y de este grupo se conocen cuatro como las principales que son *Bt*subsp. *kurstaki* (H3a3b3c), *Bt*subsp. *paizawai* (H7) que tienen actividad contra lepidópteros, *Bt*subsp. *israelensis* (H14) que tiene actividad contra mosquitos y *Bt*subsp. *morrisoni* cepa *tenebrionis* (H8a8b) que tiene actividad contra coleópteros. La primera clasificación se realizó teniendo en cuenta la especificidad para lepidópteros, dípteros, lepidópteros-dípteros y coleópteros (Hofte and Whiteley 1989) y posteriormente, se modificó con base a la homología y bloques conservados en su secuencia aminoacídica y su especificidad según el orden de insectos (Crickmore, Zeigler et al. 1998).

El ciclo de vida de *Bt*, puede dividirse en 4 fases: la fase I denominada crecimiento vegetativo, la fase II que consiste en una transición a la esporulación, la fase III que consiste en la fase de esporulación y la fase IV que consiste en la maduración de la espora y muerte celular (Piggot and Hilbert 2004, Berbert-Molina, Prata et al. 2008).

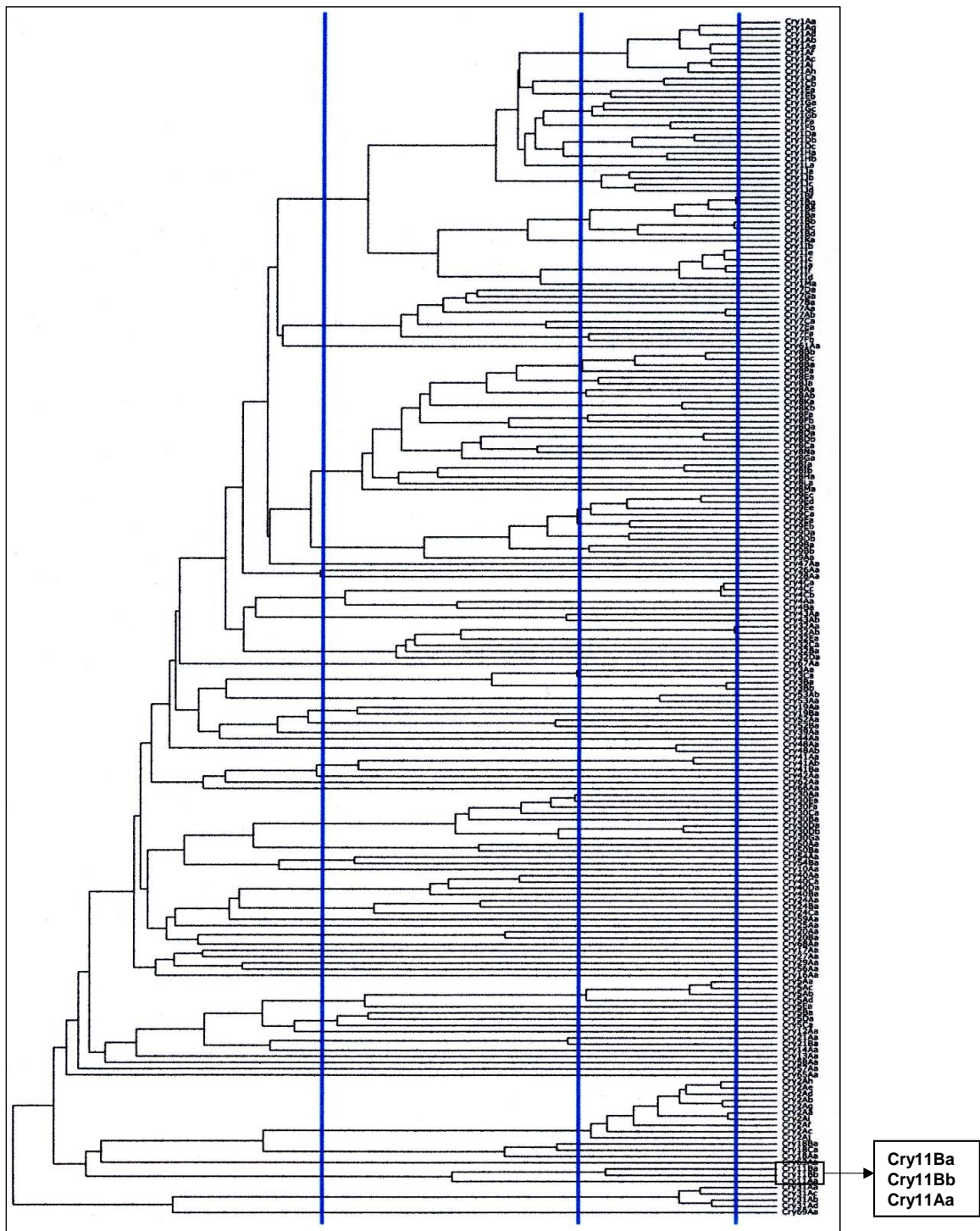
Al mismo tiempo *Bt* produce factores de virulencia que incluyen fosfolipasas C, proteasas y hemolisinas (Hajaij, Carron et al. 2005, Hajaij-Ellouze, Fedhila et al. 2006, Brar, Verma et al. 2009, Martin, Gundersen-Rindal et al. 2010) y antibióticos como la zwittermicina, proteínas insecticidas vegetativas y quitinasas (Zhao, Song et al. 2008). Durante la fase III, *Bt* produce inclusiones parasporales de las que se conocen 2 tipos de toxinas: Cry y Cyt, ambas se pueden empacar en forma de cristal y haber uno o más de estas en una misma cepa de *Bt* (de Maagd, Bravo et al. 2001). Las toxinas Cyt pueden hacer sinergismo o sobrepasan problemas de resistencia de proteínas Cry mosquitocidas, funcionando como un receptor de unión membranal de Cry (Bravo, Gill et al. 2007). Las toxinas Cry o δ -endotoxinas han demostrado ser tóxicas contra insectos pero amigables y seguras con el medio ambiente y el hombre (Roh, Choi et al. 2007, Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011, Pardo-Lopez, Soberon et al. 2013). Debido a su especificidad, *Bt* y sus productos vienen siendo empleados para el control biológico en más de 400 formulaciones comerciales conteniendo en la mayoría de ellas, proteínas insecticidas (Zenas and Crickmore 2012).

4.2 PROTEÍNAS CRY

Las proteínas Cry tienen por lo general un espectro definido de actividad insecticida y en algunos casos, restringido a unas pocas especies de los distintos órdenes de insectos, Díptera, Lepidóptera, Coleóptera y nemátodos (de Maagd, Bravo et al. 2001, Xu, Wang et al. 2014). Su denominación parte del prefijo Cry y cuatro filas jerárquicas que constan de números que permite localizarlas en el árbol filogenético descrito por Crickmore y colaboradores (Crickmore, Zeigler et al. 1998). Hasta la fecha, con base en la nueva nomenclatura existen 775 genes *cry* categorizados en 74 grupos (Crickmore, Zeigler et al. 1998, Crickmore, Baum et al. 2016). Incluyendo nuevos grupos de toxinas que presentan actividad contra insectos del orden Hymenoptera, Orthoptera, Hemiptera, Isoptera, Mallophaga, Thysanoptera, etc., y algunos otros como nematodos y ácaros (Schnepf, Crickmore et al. 1998) (Figura 1).

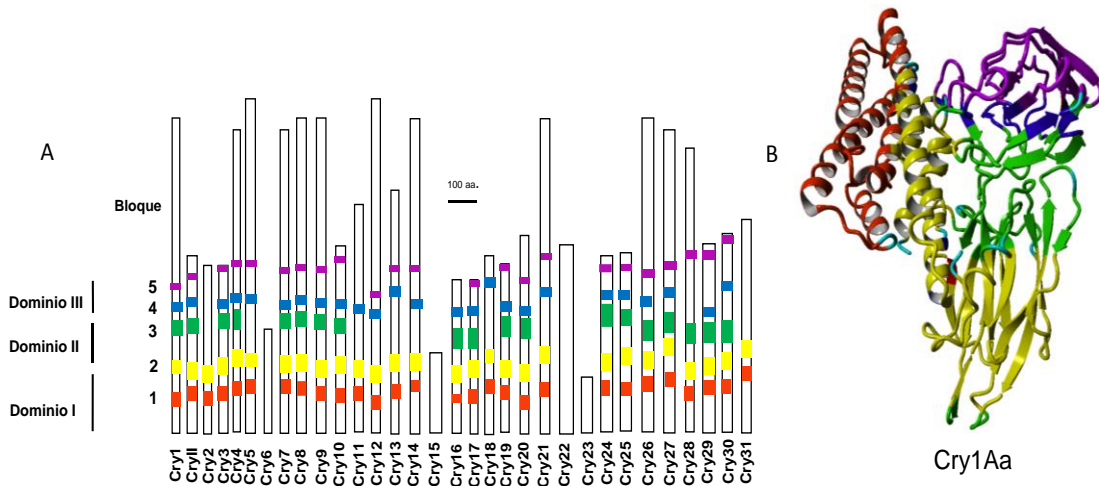
Las toxinas Cry comparten una arquitectura compuesta de tres dominios similares entre ellas (Xu, Wang et al. 2014) determinadas por medio de estudios de cristalografía dirigidos a la estructura terciaria de las toxinas: Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1 (Li, Carroll et al. 1991, Grochulski, Masson et al. 1995, Derbyshire, Ellar et al. 2001, Galitsky, Cody et al. 2001, Morse, Yamamoto et al. 2001, Boonserm, Davis et al. 2005, Guo, Ye et al. 2009, Hui, Scheib et al. 2012). Las proteínas Cry están compuestas por aproximadamente 600 aminoácidos (de Maagd, Bravo et al. 2003), son globulares y contienen tres dominios (3D) estructurales conservados conectados por uniones individuales (Xu, Wang et al. 2014) (Figura 2). Análisis de los alineamientos de los tres dominios de las toxinas Cry revelan que la mayoría tienen el mismo patrón de plegamiento (Schnepf, Crickmore et al. 1998, de Maagd, Bravo et al. 2003) y presentan cinco bloques conservados. El primer bloque es la hélice central del dominio I, el segundo se localiza en la interface entre los dominios I y II, a su vez, el tercer bloque se ha identificado en el límite entre los dominios II y III, el cuarto está en la hoja β central del dominio III y el quinto bloque se ha determinado al final del dominio III (de Maagd, Bravo et al. 2001, Xu, Wang et al. 2014) (Figura 2).

Figura 1. Dendograma de las proteínas Cry. En el cuadro pequeño se resalta el lugar en donde se encuentran las toxinas Cry11



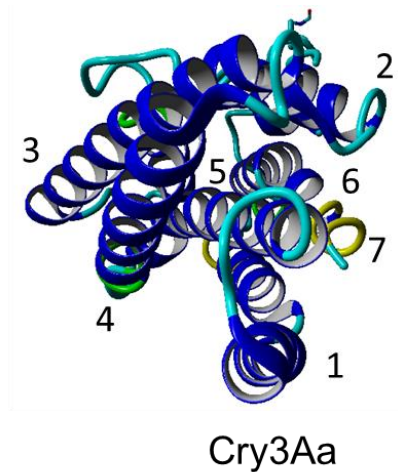
Tomado de: (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/); modificado por autor.

Figura 2. Bloques conservados de las proteínas Cry y estructura tridimensional de Cry1Aa. A) Bloques conservados en las secuencias aminoacídica de las δ -endotoxinas. B) Estructura tridimensional de Cry1Aa; dominio I en naranja, dominio II en verde, amarillo, dominio III verde, azul, morado.



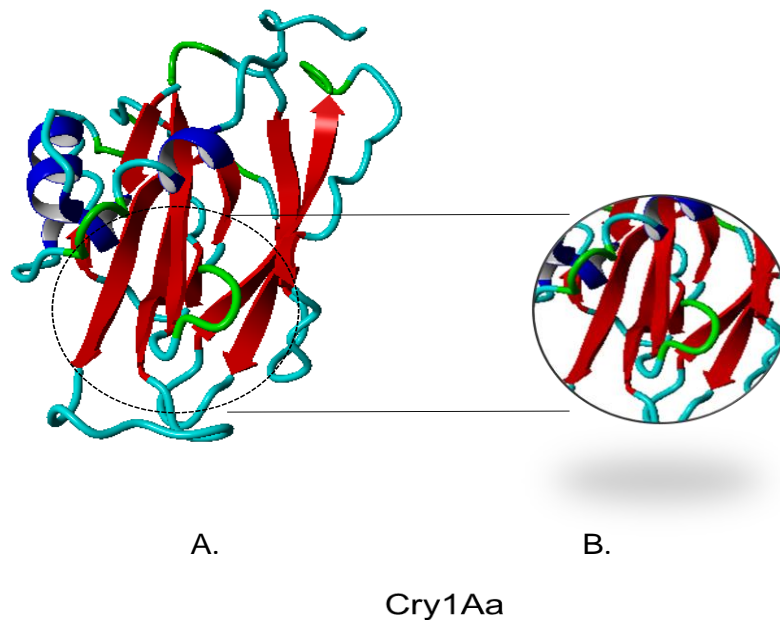
El **Dominio I** se describió por primera vez para la toxina Cry3Aa por Li y colaboradores (Li, Chougule et al. 2011). Este consiste de un paquete de siete α -hélices en el cual, seis hélices rodean una hélice central. Cada una de las hélices externas es de naturaleza anfipática con residuos polares o cargados y residuos hidrofóbicos; típicamente de naturaleza aromática proyectados hacia la hélice central (Figura 3). Los grupos polares están presentes en el espacio inter helical y forman puentes salinos o enlaces de hidrógeno. La mayoría de las α -hélices son más largas de 30Å y son capaces de atravesar una membrana hidrofóbica (Alzate, Osorio et al. 2010). Estas características sumadas a la alta similitud estructural con el dominio responsable de la formación del poro en Colicina A (toxina formadora de poros α), sugiere que este dominio es el mayor determinante en la penetración de la toxina en la membrana y la posterior formación del poro, una vez que esta se ha unido al receptor específico (Grochulski, Masson et al. 1995, Xu, Wang et al. 2014).

Figura 3. Dominio I de la toxina Cry3A, en esta se pueden observar sus 7 α -hélices.



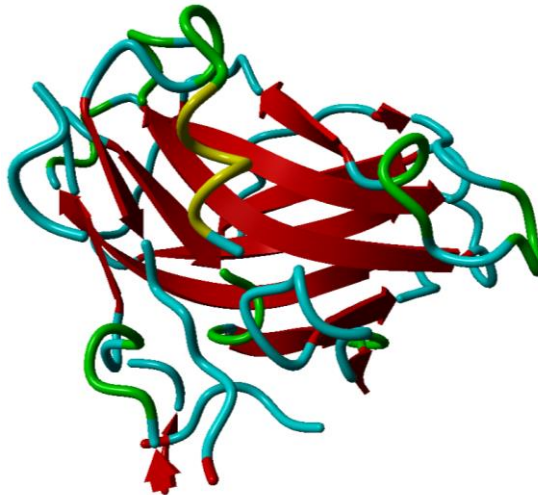
El **Dominio II** está formado por un paquete de tres hojas β antiparalelas para formar un prisma β con pseudosimetría triple (Grochulski, Masson et al. 1995, Li, Choi et al. 2007) (Figura 4A). Dos de las hojas están compuestas de cuatro cadenas en un motivo de llave griega y están expuestas al solvente. El tercer paquete de hojas involucra tres cadenas y una α -hélice corta dirigida hacia el dominio I (Figura 4B). Estructuralmente el dominio II es el más variable (Boonserm, Davis et al. 2005) evidenciado por la diferencia en la longitud de las cadenas β al comparar diversas toxinas (Pigott and Ellar 2007). Esto le confiere al dominio II relevancia en la especificidad de la toxina (Pigott and Ellar 2007). Además, se ha demostrado que está involucrado en el reconocimiento del receptor (Fernandez, Perez et al. 2005, Moonsom, Chaisri et al. 2007, Likitvivatanavong, Aimanova et al. 2009).

Figura 4. Dominio II de la toxina Cry1 Aa. (A) Estructura del dominio II de la toxina Cry1Aa; (B) llave griega del Dominio II.



El **Dominio III** es un β -sándwich (Grochulski, Masson et al. 1995, Li, Choi et al. 2007, Nair and Dean 2015). En este arreglo, dos paquetes de hojas β antiparalelas están juntas con una topología en “rodillo de jalea” (Figura 5). Ambas hojas están compuestas de cinco cadenas con el revestimiento de la cara externa hacia el solvente y el revestimiento interno contra el dominio II (Li, Choi et al. 2007). Dos bucles largos extendidos desde el extremo del dominio interactúan con el dominio I. El dominio III muestra menos variabilidad estructural que el dominio II y las principales diferencias son encontradas en las longitudes, orientaciones y secuencias de los bucles (Boonserm, Davis et al. 2005).

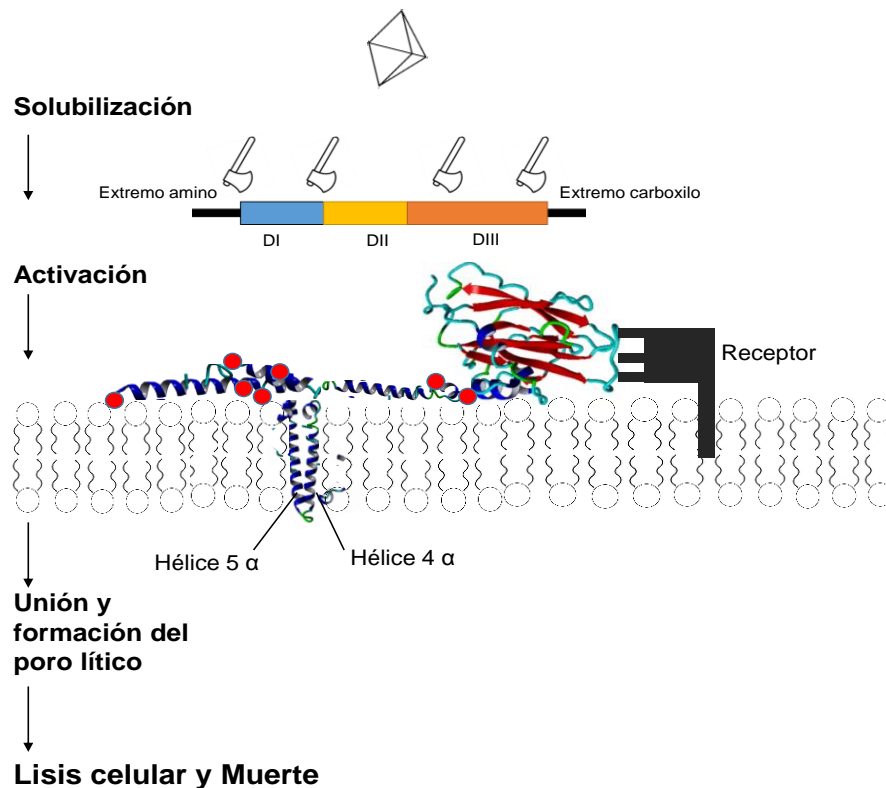
Figura 5. Dominio III de la toxina Cry. En este esquema se puede observar sus hojas β plegadas (β -sándwich).



4.2.1 Mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bt*. Los mecanismos que inducen la citotoxicidad aún no han sido completamente elucidados debido a que los estudios orientados a determinar los eventos que resultan en la muerte celular no son comunes (Melo, Soccol et al. 2016). Se ha descrito que las toxinas Cry tienen alta especificidad (Jurat-Fuentes and Adang 2006, Bravo, Likitvivatanavong et al. 2011). Sin embargo, los autores proponen diversos mecanismos de toxicidad lo que indica la complejidad de los eventos que llevan a la muerte del insecto y la dificultad de tener un modelo estándar. Además de que aún no existe un conocimiento preciso respecto a los receptores de las δ -endotoxinas, las implicaciones de cada uno de sus dominios en la actividad tóxica, aún no son definitivos. De los múltiples mecanismos de acción propuestos se hace referencia especialmente al modo de formación del poro lítico o secuencial y a la vía de señalamiento mediante la formación de canales iónicos (Melo, Soccol et al. 2016).

El modo de formación del poro ocurre en la membrana plasmática y que en consecuencia genera un desbalance osmótico que conduce a la muerte del insecto (Figura 6). Las δ -endotoxinas son ingeridas, posteriormente las proteasas digestivas activan las toxinas Cry que luego entran en contacto con los receptores N-aminopeptidasa, cadherina y fosfatasa alcalina ubicados en la superficie de la membrana del intestino del insecto (Griko, Rose-Young et al. 2007, Jimenez-Juarez, Munoz-Garay et al. 2008, Hua, Park et al. 2014).

Figura 6. Aspectos principales del mecanismo de acción de las δ -endotoxinas.



Por afinidad molecular específica entre las toxinas y ciertos receptores se produce un clivaje proteolítico en la molécula Cry que causa cambios estructurales en la cadena y forma oligómeros que funcionan como “pre-poros”. Hay además una tercera conexión con la superficie de la membrana con el receptor N-aminopeptidasa que tiene una afinidad molecular y actúa para anclar el pre-poro en la bicapa lipídica (Melo, Soccol et al. 2016). Las horquillas helicoidales hidrofóbicas

de hélice α -4 y hélice α -5 se insertan a la membrana para iniciar la formación del poro, mientras que el resto del dominio I se mantiene flotando sobre la membrana en un estado globular asimilando la forma de una sombrilla (Dean, Rajamohan et al. 1996) (Figura 6). Las mutantes Cry que han sido alteradas en residuos del dominio I de las hélices α modifican su papel en la inserción y formación del poro (Dean, Rajamohan et al. 1996, Alzate, Hemann et al. 2009, Alzate, Osorio et al. 2010). Las demás interacciones proteína-receptor son mediadas por bucles expuestos en los ápices de las tres hojas β hidrofóbicas del dominio II (Li, Carroll et al. 1991). Debido a las similitudes con los sitios de unión de antígenos de las inmunoglobulinas, se ha propuesto que los bucles del dominio II están relacionados con uniones a receptores del intestino medio de insectos (Dean, Rajamohan et al. 1996). Estudios de mutagénesis sitio dirigida y análisis de intercambio de segmentos soportan esta hipótesis (Deist, Rausch et al. 2014). Se ha propuesto un modelo denominado “Ping-Pong”, el cual se ha podido extraer de la unión de la proteína Cry1Ab y receptores en *M. sexta* (Pacheco, Gomez et al. 2009). En este, los bucles β 10- β 11 pueden estar al principio involucrados con baja afinidad al receptor N- aminopeptidasa, el cual es abundante. Seguidamente, los bucles β 6- β 7 y β 10- β 11 y bucle α -8 interactúan con el receptor cadherina y por esta interacción, ocurre la eliminación de hélice α -1 y promueve la oligomerización. Luego, la toxina oligomérica se une a los receptores N-aminopeptidasa y fosfatasa alcalina a través de otras regiones de la toxina Cry, como las cadenas β 16- β 22 del dominio III, pero el oligómero sigue estando unido a cadherina (Pacheco, Gomez et al. 2009). Por último, residuos de los bucles β 10- β 11 participan en la inserción de la membrana (Pacheco, Gomez et al. 2009).

El β -sándwich del dominio III está involucrado en funciones de unión al receptor y se ha sugerido que está implicado en el mantenimiento de la integridad estructural de la molécula protegiéndola de la proteólisis dentro del intestino del insecto (de Maagd, Bravo et al. 2003). Estudios de proteínas híbridas han demostrado la importancia del dominio III con interacciones específicas en receptores de membrana. Por ejemplo, los intercambios entre dominio III de Cry1Ab y Cry1Ac o

Cry1Aa y Cry1Ac, resultaron en proteínas con afinidad alterada en *S. exigua* (de Maagd, Kwa et al. 1996). Al mismo tiempo, se ha reportado que el residuo Trp544 localizado entre los bucles β 18- β 19 en Cry1Ac, tiene una importancia en el mantenimiento de la estabilidad de proteínas frente el control de *Helicoverpa armigera* (Liu, Wang et al. 2010).

Otro modo es la vía de señalización que retoma varias ideas del modelo anterior, pero que conduce a la muerte celular. Este modelo es dependiente de Mg^{+2} que le permite a la toxina unirse al receptor cadherina provocando la muerte celular activando una vía de señalización y estimulando la proteína G y la adenilciclase, incrementando los niveles de AMPc y la activación de la proteína quinasa A (Zhang, Candas et al. 2006, Melo, Soccol et al. 2016).

4.2.2 Proteínas Cry11. La familia Cry11 está conformada por proteínas con actividad contra insectos del orden díptera a las cuales pertenecen las toxinas: Cry11Aa, *Bti*, Cry11Bb, *Btmed*, Cry11Ba, *Btjeg*. *Bti* produce una protoxina de 70kDa y mediante una proteólisis, remueve 28 residuos del extremo amino (3.0 kDa) y una partición intermolecular convierte la proteína en dos fragmentos de 32 y 34 kDa, que se mantienen asociados y son tóxicos. La proteína activa se une a receptores específicos de la membrana apical del intestino medio de insectos, produciendo una inserción y formación un poro lítico (Fernandez, Perez et al. 2005). En un estudio de mutagénesis se identificaron regiones del dominio II (bucle α 8, β 4, y bucle 3) involucradas en la interacción con membranas microvellosas del intestino medio de *A. aegypti* (Fernandez, Perez et al. 2005) y también regiones expuestas del dominio II y III involucradas en la interacción con glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclado al receptor fosfatasa alcalina (Fernandez, Martinez-Anaya et al. 2009). Se ha propuesto que GPI anclado a receptores tiene un papel importante en el modo de acción de proteínas Cry11 (Fernandez, Martinez-Anaya et al. 2009).

La toxina Cry11Bb de *Btsubsp. medellin* (*Btmed*) requiere de un procesamiento proteolítico partiendo de una protoxina de 94kDa, produciendo una toxina activa de

68kDa que luego se cliva por acción de proteasas intestinales produciendo dos fragmentos activos de 30 y 35 kDa. Los bioensayos de este intermediario marcado con I¹²⁵ en presencia de vesículas de membrana de borde de cepillo, mostró una interacción específica y saturada. Por otro lado, inmunoblots demostraron que los fragmentos de 30 y 35 kDa no se unen a las membranas intestinales de *A. aegypti*, *An. Albimanus* y *Culex quinquefasciatus* (Ruiz, Segura et al. 2004). Una característica especial de las toxinas Cry11Bb es que contiene 5 bloques repetitivos entre los aminoácidos 702 y 781 y cada bloque consta de 16 aminoácidos (GYEQGYNDNQNTSS) (Orduz, Realpe et al. 1998).

*Bt*subsp. *Jegathesan* (*Btjeg*) produce una protoxina de 80kDa, esta a su vez al ser degradada en el intestino de los insectos, genera dos fragmentos activos de 33 y 36 kDa; el rompimiento de la proteína ocurre en sitios localizados ente los bucles 1 y 2. Se ha demostrado que el fragmento de 36 kDa tiene mayor porcentaje de unión a membrana (32%) debido a que este posee un fragmento del extremo amino del dominio I y bucles esenciales del dominio II (Likitvivanavong, Aimanova et al. 2009, Likitvivanavong, Chen et al. 2011). La toxicidad de Cry11Ba es dependiente de los receptores que se encuentran en el intestino medio de los insectos y se ha evidenciado que receptores como cadherina, amino peptidasa y fosfatasa alcalina, están involucrados en la especificidad de esta toxina en el control de mosquitos (Wirth, Walton et al. 2015).

La actividad de las toxinas Cry11 en larvas de mosquitos es variable, siendo la toxina Cry11Ba activa contra larvas de *Anopheles stephensi*, *Culex pipiens* y *A. aegypti* (Delecluse, Rosso et al. 1995). La toxina Cry11Bb tiene mayor toxicidad contra *A. aegypti* y *Culex quinquefasciatus* mientras que Cry11Aa tiene mayor actividad con respecto a las otras dos proteínas Cry11 contra a *Anopheles albimanus* y *A. aegypti* y menor actividad contra *C. quinquefasciatus*. La actividad tóxica de las cepas *Bti*, *Btjeg* y *Btmed* es por lo general más letal que cepas recombinantes debido a que además de los cristales, estas bacterias de manera sincrónica producen en otras fases del crecimiento celular, otras toxinas como Cyt

y proteínas vegetales (BA., H-W. et al. 2010) y que tienen un efecto sinérgico con Cry. El potencial de la familia Cry11 tanto en cepas nativas como en las recombinantes frente a mosquitos transmisores de enfermedades se describen en la tabla 1 (Orduz, Realpe et al. 1998).

Tabla 1. Actividad toxica de proteínas Cry11 nativas y recombinantes.

CEPA	Tipo de cristal	CL ₅₀ (ng ml ⁻¹)(95%CL)		
		<i>Anopheles albimanus</i>	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
<i>Bti</i>	Nativo	24.0 (18.9-30.6)	4.3 (3.6-5.0)	21.5 (14.9-30.9)
<i>Btjeg</i>	Nativo	202.8 (153.8-267.4)	22.6 (17.6-29.1)	53.1 (39.3-71.9)
<i>Btmed</i>	Nativo	111.5 (76.9-161.5)	22.4 (18.6-26.9)	9.4 (7.5-11.8)
4Q2-81 (pHT640)	Cry11Aa Recombinante	675.9 (507.3-900.6)	39.2 (33.4-45.9)	57.9 (11.6-288.5)
SPL407 8pJEG80.1	Cry11Ba Recombinante	150.6 (106.6-212.4)	23.6 (19.4-28.6)	6.53 (4.7-9.1)
4Q2-81 (pBTM5)	Cry11BbRecombinante	166.3 (124.9-221.4)	17.9 (14.2-22.3)	34.1 (26.6-43.7)
4Q2-81	Negativo	NT	NT	NT

Fuente, Orduz, Realpe et al. 1998, adaptada por autor. NT (no toxica).

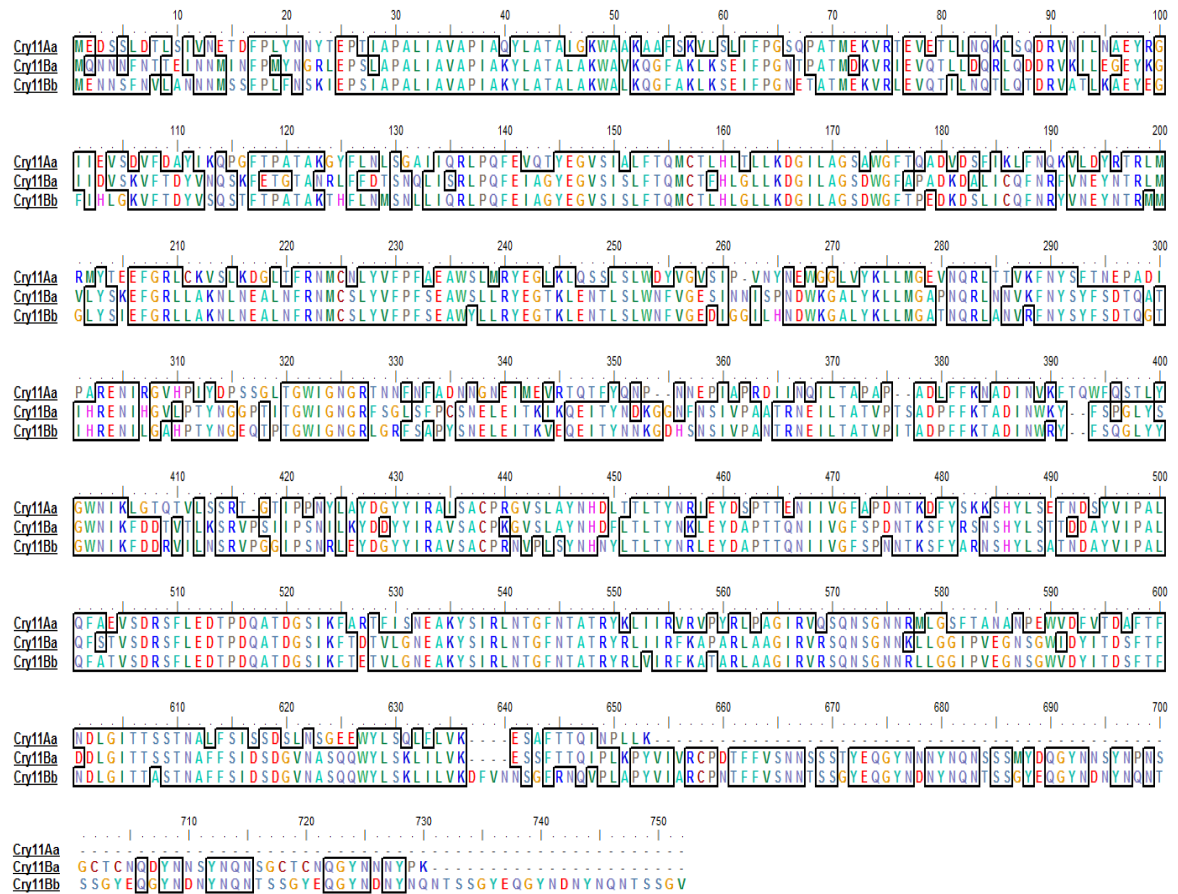
Otras características importantes de las proteínas Cry11 se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Características generales de los genes y proteínas Cry11 de *B. thuringiensis*.

Gen/No. Acceso Gene Bank	Proteína	Variedad <i>Bt</i>	Tamaño molecular	Referencia
<i>cry11Aa</i> (M313737)	Cry11Aa	<i>Bt.subsp. israeliensis</i>	72 kDa	Donovan <i>et al.</i> , (1988).
<i>cry11Ba</i> (X86902)	Cry11Ba	<i>Bt.subsp. Jegathesan</i>	81 kDa	Delécluse <i>et al.</i> , (1995).
<i>cry11Bb</i> (AF017416)	Cry11Bb	<i>Bt.subsp. Medellín</i>	94 kDa	Orduz <i>et al.</i> , (1998).

Los tres holotipos de proteínas Cry11 muestran porcentajes de identidad similares. A nivel de proteína, la toxina Cry11Bb tiene una identidad del 69% con Cry11Aa y un 83% con Cry11Ba (Figura 7). La secuencia nucleotídica del gen *cry11Bb* es 60.9% y 83% idéntica a los genes *cry11Aa* y *cry11Ba*, respectivamente (Orduz, Realpe et al. 1998).

Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas Cry11Aa, Cry11Ba y Cry11Bb. Las zonas delineadas exponen las regiones de mayor identidad.



La expresión de toxinas Cry11 en cepas no cristalíferas como *Bt* SPL407 ha demostrado que, para el caso de Cry11Ba, la actividad tóxica aumenta 2.5 veces con respecto al control contra larvas de mosquitos de *A. aegypti* (Delecluse, Rosso et al. 1995). Lo mismo se observa para la proteína Cry11Aa con alta actividad tóxica contra larvas de *A. aegypti* y la toxina Cry11Bb con alta actividad contra larvas de primer instar de *A. aegypti*, *An. albimanus* y *C. quinquefasciatus* (Orduz, Realpe et al. 1998)(Tabla 3).

Tabla 3. Cepas recombinantes de *Bt* que contienen genes *cry11*.

Constructo	Plásmido	Gen <i>cry11</i>	Cepa	Referencia
pJEG80.1	pHT315	Ba	Bt SPL407	Delecluseet <i>al.</i> ,1995
pHT640	pHT315	Aa	Bt 4Q2-81	Donovanet <i>al.</i> , 1988
pBMT5	pBU4	Bb	Bt 4Q2-81	Orduzet <i>al.</i> , 1998

A continuación se mencionan los tipos de modificaciones de toxinas Cry más empleadas y su relación con la actividad tóxica.

4.2.3 Modificaciones de toxinas Cry. Se han realizado diferentes estrategias para el mejoramiento de proteínas Cry, incrementando su toxicidad frente a especies de insectos específicos, incluyendo a aquellos que han generado resistencia a Bt (Deist, Rausch et al. 2014, Lucena, Pelegrini et al. 2014); estas modificaciones además, pueden generar otro tipo de cambios como ampliar su espectro de acción, o insecto blanco. La información obtenida a partir de las variantes de Cry es esencial para tener una aproximación a un modelo más preciso del modo de acción de las proteínas Cry. Dentro de estas estrategias de mejoramiento se encuentra, el truncamiento de proteínas, modificaciones de sitios de clivaje y modificaciones de unión (Deist, Rausch et al. 2014).

4.2.3.1 Toxinas truncadas. Las toxinas Cry han sido sujeto de modificaciones con el fin de obtener información respecto de su estructura-función y poder elucidar el mecanismo de acción de estas. Además, estas modificaciones han generado variantes Cry con toxicidad diferenciada respecto de las proteínas nativas, optimizando y diversificando sus aplicaciones biotecnológicas (Deist, Rausch et al. 2014). La técnica de truncado de toxinas *Bt* se ha utilizado para determinar las implicaciones de los extremos amino y carboxilos en la toxicidad de la proteína por medio de análisis de delección. También se ha realizado delecciones de genes *cry* en sus dos extremos para identificar los fragmentos que codifican el péptido tóxico. Tal

es el caso de las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac de *Btkurstaki* donde logró determinar que la mitad de extremo amino de las protoxinas es suficiente para provocar la muerte a insectos (Adang, Staver et al. 1985, Schnepf and Whiteley 1985, Hofte, de Greve et al. 1986, Deist, Rausch et al. 2014). Por otro lado, un estudio realizado por Pang y colaboradores en 1992 demostraron que al expresar la proteína Cry11A truncada al inicio de su amino terminal (9.6 kDa), resultó no ser tóxica en el control de larvas del primer estadio de *A. aegypti* (Pang, Frutos et al. 1992).

También se han realizado estudios en otras regiones de las proteínas. Se ha logrado la expresión mejorada de las toxinas truncadas como lo descrito por Hayawaka y colaboradores en 2008, quienes diseñaron un gen que codifica para la proteína Cry4Aa con alto contenido de GC y preferencia de codones por *Escherichia coli*, logrando un aumento significativo en los niveles de expresión pero con actividad tóxica similar a la nativa contra *Culex pipiens* (Hayakawa, Howlader et al. 2008). Craveiro y colaboradores en el 2010, obtuvieron variantes a partir de Cry1Ia (carente de carboxilo terminal), por medio de barajado de ADN y librería de fagos. Estas nuevas proteínas reportaron capacidad de unión a las membranas en forma de cepillo de *T. licuslicusy* al mismo tiempo reportaron una toxicidad aumentada hasta 3 veces respecto de la parental truncada y nativa (Craveiro, Gomes Junior et al. 2010).

4.2.3.2 Modificación de sitios de Clivaje. El procesamiento de las protoxinas Cry es un evento importante en el paso a toxina. Este mecanismo es revisado por (Deist, Rausch et al. 2014) y se enfoca en la remoción de regiones de aminos y carboxilo terminal, produciendo proteínas grandes (Cry3) o intermedias (Cry1, Cry4, Cry11). Un clivaje proteolítico deficiente altera o anula la toxicidad. Por tanto, se ha propuesto que conociendo estos sitios de escisión puede ser importante en el diseño y construcción de toxinas modificadas (Deist, Rausch et al. 2014).

La activación proteolítica de las toxinas también puede aumentar la solubilidad. En este caso, las proteínas con solubilidad limitada se precipitan y restringen la

interacción entre esta y los receptores del intestino del insecto (Carroll, Convents et al. 1997). La solubilidad de las toxinas Cry es dependiente del pH lo que también restringe los insectos diana, pues el pH del intestino varía de acuerdo al orden. En Lepidóptera y Díptera el pH es alcalino mientras que en Coleóptera y Hemíptera tienen un pH entre neutro y ácido (de Maagd, Bravo et al. 2003). Por otro lado, la solubilidad de las Cry también cambiar luego del clivaje proteolítico, como ocurre con la toxina Cry3A cuando se trata con quimotripsina, haciéndola soluble a pH neutro (Carroll, Convents et al. 1997). La especificidad de las toxinas Cry es multifactorial, el tipo de proteasas de los insectos diana es fundamental en la selección del blanco, siendo esto es un punto sensible en el desarrollo de resistencia a toxinas Cry, pues pequeñas modificaciones en las proteasas requeridas para la activación de la toxina previenen el clivaje y hacen inofensiva la proteína (Cao, Zhang et al. 2013, Deist, Rausch et al. 2014). La toxina Cry3A ha sido la única toxina a la que alterando los sitios de clivaje, se genera una proteína eCry3.1Ab, tóxica para *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte; plaga resistente a Cry3A y Cry1Ab (Walters, deFontes et al. 2010). Esta aproximación ha generado toxinas activas contra insectos no susceptibles, lo que sugiere aplicaciones más amplias (Deist, Rausch et al. 2014).

4.2.3.3 Modificación de uniones. Dentro de los factores determinantes de la citotoxicidad de Cry se destacan: la activación proteolítica y la unión al epitelio del intestino de los insectos. La modificación de alguno de estos puntos permite comparar nuevas toxicidades y ampliar su rango de insectos blancos. Las modificaciones de unión de Cry a la membrana plasmática se puede llevar a cabo utilizando metodologías como intercambios de dominios o bucles, mutagénesis sitio dirigida, incorporación de péptidos de unión y obtener librería de variantes de Cry en fagos (Deist, Rausch et al. 2014).

En un estudio llevado a cabo con Cry3Aa, se obtuvo una variante al formar un puente disulfuro entre las hélices α -5 y 7 (dominio I) con la cual se aumentó la estabilidad térmica y las fuerzas de empaquetamiento, pero no así con la actividad

tóxica contra *Tenebrio molitor*. En este caso la estabilidad de la proteína no siempre está involucrada en el aumento de su actividad tóxica (Wu, Koller et al. 2000).

En el dominio II también ha sido evaluado en las interacciones hidrofóbicas entre bucles de las toxinas y moléculas receptoras del intestino medio del insecto realizando sustituciones de residuos hidrofóbicos con residuos de alanina o reemplazando residuos cargados positivamente con residuos cargados negativamente. Las mutaciones reportadas en el bucle 2 del dominio II de la toxina Cry1Ab y las sustituciones por alanina en residuos ³⁶⁸RRP³⁷⁰ inhibieron la toxicidad contra *M. sexta* y *Heliothis virescens* debido a la reducción de afinidad de unión a vesículas de membrana en borde de cepillo (BBMV) (Abdullah, Moussa et al. 2009). Rajamohan y colaboradores en 1996, introdujeron mutaciones puntuales en el bucle 2 de Cry1Ab y crearon una toxina 36 veces más activa contra larvas de *Lymantria dispar* con un incremento en afinidad de unión de 18 veces a las vesículas membranales del intestino de insectos (Rajamohan, Alzate et al. 1996).

Para el control de díptera, Abdullah y colaboradores en el año 2003, introdujeron sustituciones de aminoácidos en el bucle 3 putativo del dominio II de la toxina Cry4Ba e intercambiaron residuos en el bucle putativo de Cry4Aa, demostrando que el intercambio en el bucle putativo 3 causa un incremento de la toxicidad 700 veces contra *C. quinquefasciatus* y más de 285 veces contra *C. pipiens* con respecto a las proteínas nativas (Abdullah, Alzate et al. 2003). Adicionalmente en el 2004, en un estudio sobre aumento de toxicidad en la proteína Cry19Aa mediante transferencia de las regiones del bucle del dominio II para imitar la toxina Cry4Ba, encontraron un aumento superior a 42.000 veces la toxicidad contra *A. aegypti*, mientras mantuvo su actividad contra *Anopheles* (2.2 ng/ml) y *Culex* (19 ng/ml). Este incremento en la toxicidad es el más alto reportado hasta el momento por ingeniería de proteínas para toxinas Cry (Abdullah and Dean 2004).

Hasta el momento se ha llevado a cabo un estudio de intercambios de dominio entre las proteínas Cry11, empleando Cry11Aa y Cry11Bb y con ello, determinar que el

orden de los dominios interfiere en la formación de los cuerpos de inclusión (formación de cristales), así como con la actividad tóxica. Una de las variantes, la AAB obtenida a partir de los dominios I y II del Cry11Aa y del Dominio III de Bb, demostró una actividad similar a Cry11Aa contra *C. quinquefasciatus* (4.8 µg/ml) y *A. aegypti* (2.2 µg/ml) (Sun, Zhao et al. 2014).

Por último, se ha demostrado que sustituciones de un solo aminoácido en el amino terminal pueden alterar el mecanismo de toxicidad. Lo cual fue demostrado cuando la alanina situada en la posición 92 de Cry1Aa (Wu and Aronson 1992) se intercambió por ácido aspártico, generando cambios estructurales que desencadenan la pérdida de formación del poro lítico en el intestino medio de *M. sexta* y *H. virescens* (Wu and Aronson 1992). También se han realizado estudios en la posición L157 de Cry1Ab donde cambiando una lisina por arginina, se alteró la hélice α -5 ocasionando una pérdida de toxicidad de hasta dos veces en *M. sexta*, comparado con la parental (Alzate, Osorio et al. 2010). Pero al mismo tiempo, este cambio produjo un incremento en la toxicidad de hasta 4 veces contra *L. dispar* (Alzate, Osorio et al. 2010).

Se ha podido determinar que al menos 53 toxinas han sido evaluadas contra 23 especies de dípteros en 233 bioensayos (van Frankenhuyzen 2009). Dentro de esto solo 4 especies de mosquitos corresponden al 77% de los estudios. *A. aegypti* es la especie más frecuente ensayada (37.2%), seguida de *C. pipiens* (15.8%), *An. Stephensi* (14.9%) y *C. quinquefasciatus* (9.8%). En los estudios de control de mosquitos por parte de *Bt*, se han podido reportar 5 proteínas que se destacan, las cuales comprenden el 64% de los ensayos, dentro de este grupo están, Cry4 (20.1%), Cyt1 y Cyt 2 (20.9%), Cry11 (15.4%) y Cry 1 (7.6%) (van Frankenhuyzen 2009).

4.2.3.4 Estudios no racionales basados en evolución dirigida en genes cry. A diferencia de las aproximaciones racionales, las no racionales como evolución dirigida emplean técnicas moleculares que provocan mutaciones al azar en el ADN.

El barajado de ADN, es una técnica no racional donde variantes de un gen o de un grupo de genes homólogos son fragmentados y recombinados con la meta de obtener genes con diferente composición de bases (Stemmer 1994). Varias investigaciones se han realizado, con proteínas Cry empleando como estrategia de mejoramiento genético ya sea mediante el barajado de ADN con algunas modificaciones o Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) propensa a error (*EP-PCR*) (Craveiro, Gomes Junior et al. 2010).

Estudios como el de Shu y colaboradores en el 2007 identificaron dos variantes de la toxina Cry8Ca2 usando tecnología de *EP-PCR* con actividad aumentada en promedio de 3.9 veces contra larvas de *Anomala corpulenta* (Shu, Liu et al. 2007). Otro estudio reportó la construcción de una librería combinatoria de genes *cry11a* truncados y fusionados a fagos, de los cuales cuatro variantes de toxinas fueron activas contra *T. licus* (Carvalho, Vacari et al. 2012). En el 2011, mediante evolución dirigida, se identificó la variante T524Nde la toxina Cry1Ac que mostró un aumento de actividad insecticida contra larvas de *S. exigua* (LC₅₀ 9.6µg/ml), mientras que su actividad insecticida contra larvas de *H. armigera* se mantuvo. Este estudio demostró que una única mutación puede ser determinante en la actividad insecticida y provee evidencia biológica de la función estructural del dominio III en la actividad insecticida de la toxina Cry1Ac (Shan, Zhang et al. 2011).

Del mismo modo y con el fin de contrarrestar el lepidóptero *T. licus* en cultivos de caña de azúcar, se empleó la variante Cry11a12sybth (Cry11a, carente de extremo C-terminal) obteniéndose la variante D233N con una tasa de mortalidad de 75.43% mientras que la proteína parental no mostró ninguna actividad tóxica (Craveiro, Gomes Junior et al. 2010).

5. METODOLOGÍA

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio de investigación de tipo experimental

5.2 HIPÓTESIS

➤ **Hipótesis de Investigación**

Las variantes de Cry11 tienen una actividad tóxica aumentada contra larvas de *A aegypti*.

➤ **Hipótesis Alternativa**

Las variantes de Cry11 tienen actividad tóxica similar a las toxinas nativas contra larvas de *Aaegypti*.

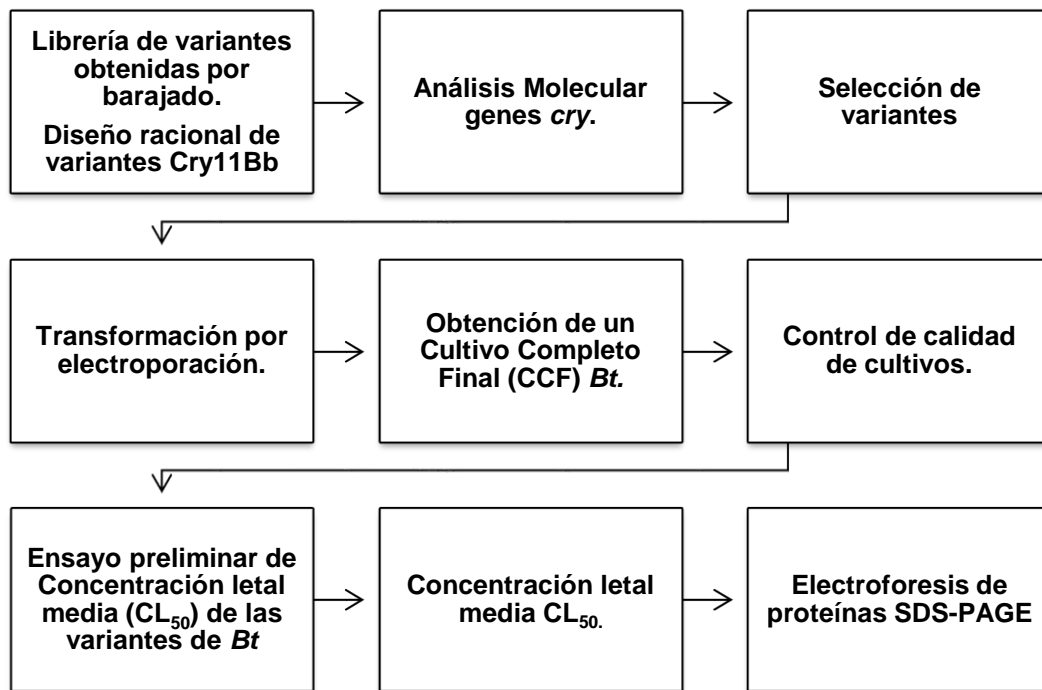
➤ **Hipótesis Nula**

Los genes mutantes de Cry11 no tienen actividad tóxica contra larvas de los géneros *A aegypti*.

5.3 METODOLOGÍA

Los pasos a seguir se muestran en figura 8

Figura 8. Esquema general para el desarrollo experimental del proyecto.



5.4 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

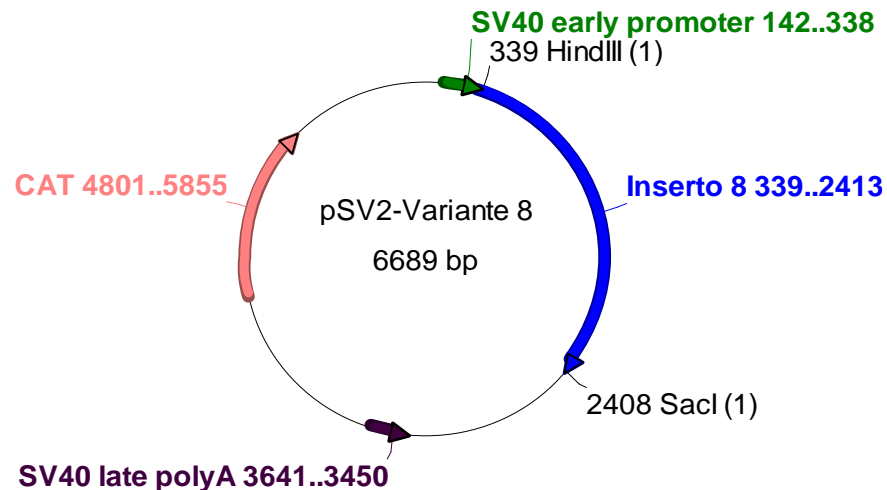
Los medios empleados para los cultivos de las cepas bacterianas fueron caldo LB suplementado con ampicilina 50 ($\mu\text{g/ml}$) para las transformante *E. coli* DE3BL21 y cloranfenicol 30 ($\mu\text{g/ml}$) para los transformantes de *Bt* acristalífera BMB171 la cual fue donada por el profesor Ziniu Yu (*Statekey Laboratory of Agriculture Microbiology, Huazhong Agriculture University, Wuhan Hubei. People's Republic of China*). Para los cultivos completos finales de *Bt*, se preparó buffer fosfato salino (BFS) que contenía 137mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10mM de NaHPO y 2mM de KH₂PO (pH 7,4). La extracción de ADN plasmídico se realizó empleando el *Kit Wizard Minipreps* (Promega) siguiendo indicaciones de fabricante. La preservación de las cepas se realizó en un medio de caldo LB con glicerol al 20%. La resuspensión de las células después del choque eléctrico en la electroporación se realizó en caldo SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM

MgSO₄, 20mM glucosa). La electroforesis en gel de agarosa fueron realizadas a una concentración de 0.8% p/v y teñidas SYBR safe 10X y la electroforesis de proteínas se realizaron en SDS-PAGE 10% (Joseph Sambrook 2006).

5.5 DISEÑO DE VARIANTES *cry11*

5.5.1 Obtención no racional de variantes *cry11*. A partir de una librería obtenida mediante el barajado de ADN de los genes *cry11Aa*, *Ba* y *Bb* (Morales 2010). Se seleccionaron de acuerdo a los análisis de restricción y de secuencia, variantes cuyas longitudes fueran superiores a 2 kb y tuvieran marcos abiertos de lectura con homología con alguno de los genes parentales. Las genes ensamblados correspondientes a cada una de las variantes se encontraban en *E. coli* (DH5 α) en el constructo pCR4-TOPO (LifeTechnologies) (Figura 9). Los genes de las variantes seleccionadas 1, 8, 23, 79 y 81 fueron sintetizados por Genewiz (New Jersey-Estados Unidos) con adaptadores en sus extremos 5' y 3' de *Hind*III y *Sac*I respectivamente para el posterior clonaje y subclonaje en el vector de expresión pSV2 (donado por Neil Crickmore, Universidad de Sussex, Inglaterra) utilizando las enzimas de restricción arriba mencionadas y ligasa T4 (Promega) utilizando las condiciones del fabricante. Los productos de ligación se introdujeron en células *E. coli Artic Express* DE3BL21 por electroporación.

Figura 9. Imagen mapa del subclonaje de las variantes y genes parentales en el vector de expresión pSV2, en esta imagen se puede apreciar el esquema obtenido con la variante 8.



5.5.2 Diseño racional de mutantes cry11Bb. Las variantes obtenidas por aproximaciones racionales para *Cry11Bb* se diseñaron con base en los estudios de interacción toxina-receptor según (Alzate, Hemann et al. 2009) (Wu, Aronson. 1992) y reportadas por Flórez y colaboradores (Florez, Osorio et al. 2012), así como los trabajos sobre mutaciones efectuadas en el dominio I de otras toxinas Cry (Alzate, Osorio et al. 2010; Sheng-JiunWu 2012). A partir de la secuencia de *Cry11Bb*, se sintetizaron dos secuencias de ADN por Genewiz (New Jersey-Estados Unidos) con las siguientes modificaciones, A92D (274-276 gcg/gat), cambiando en la posición 92 de la proteína una alanina por ácido aspártico y una segunda C157R (469-471 tgt/aga) cambiando una cisteína por arginina en la posición 157 (Figura 10). Las secuencias se sintetizaron conteniendo los sitios de clonaje *HindIII* y *SacI* y posteriormente, se subclonaron en el vector pSV2 empleando ligasa T4 siguiendo recomendaciones de casa fabricante (Promega). Las células fueron transformadas

por electroporación y se verificó la presencia del inserto como se describe en el numeral 5.7.1.

Figura 10. Esquema del sitio de los cambios efectuados en las variantes racionales. Las flechas señalan los sitios en donde se efectuaron las mutaciones.



5.6 ANÁLISIS MOLECULAR PARA LAS VARIANTES *CRY11* OBTENIDAS POR BARAJADO DE ADN

De acuerdo a sus tamaños moleculares, secuencia, marco de lectura abierta e identidad con genes *cry11*, se determinó la ubicación de las mutaciones, se dedujo la secuencia proteica y sus dominios empleando MatGat (Campanella, Bitincka et al. 2003) y Gene Runner versión 5(www.generunner.net, version 5.0.39 Beta). Las secuencias fueron analizadas en la base de datos de NCBI empleando la herramienta Nblast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Madden, Tatusov et al. 1996). Las posiciones de los cambios producidos tanto en los genes como en las proteínas de las variantes fueron deducidas en el programa Bioedit 9 (Hall 1999). Por último, se realizó una comparación filogenética entre las proteínas variantes del barajado con respecto de las parentales empleando el método de máxima verosimilitud basado en la matriz JTT (Jones, Taylor et al. 1992). Los análisis fueron hechos en MEGA6 (Tamura, Stecher et al. 2013).

5.7 TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

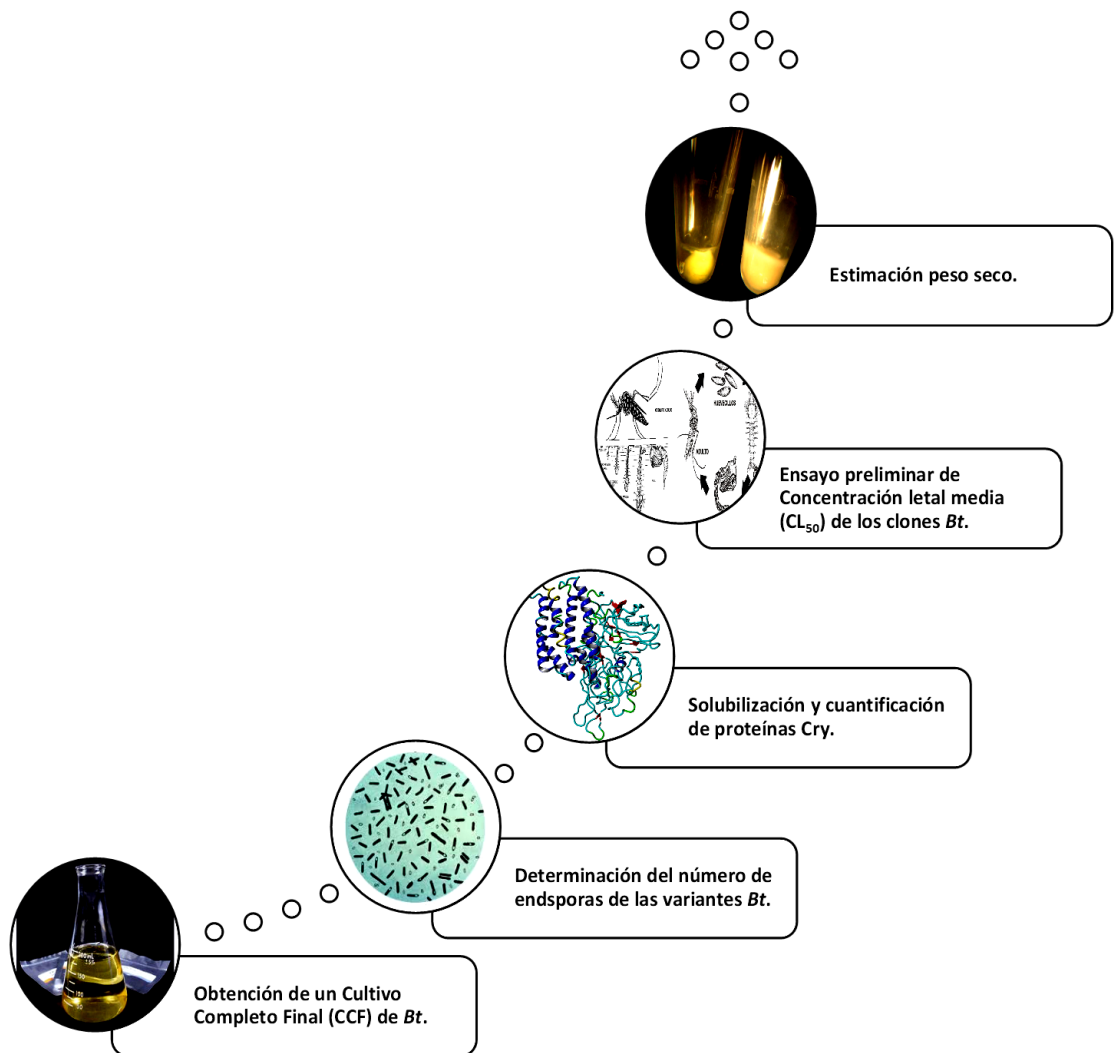
5.7.1 Electroporación en *E. coli* DE3BL21. El ADN de constructos clonados en pSV2 se cuantificó empleando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 a una longitud de onda A260/A280. Las células fueron transformadas con 10pg/μl de ADN en condiciones de electroporación de 1.8 Kilovoltios*4,8 milisegundos. Se emplearon celdas de 0,2 mm de diámetro y una vez terminado el choque eléctrico, las células fueron resuspendidas en medio SOC y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación a 150 r.p.m. Posteriormente, se tomaron 100 μl de caldo con crecimiento y se cultivó en superficie en LB ampicilina (50 μg/ml). Los clones crecidos se seleccionaron en caldo LB ampicilina (50μg/ml) y se incubaron a 37°C por 16 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó extracción de ADN plasmídico empleando el *Kit Minipreps Wizard*. Por último se realizó digestión con las enzimas *HindIII* y *SacI*. Las digestiones fueron incubadas a 37°C por un periodo de tiempo de 2 horas. Los productos de ADN plasmídico fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y visualizadas en el fotodocumentador Gel Doc XR (BioRad).

5.7.2 Electroporación en cepa de *Bt* acristalífera BMB171. Para la transformación se empleó la cepa de *Bt* cristal negativa BMB171. La transformación se llevó a cabo utilizando 500 ng de ADN bajo condiciones de choque eléctrico de 2 Kilovoltios*4 milisegundos empleando el electroporador Bio-Rad Micropulser™. Una vez terminados los ensayos de transformación, las cepas fueron recuperadas en medio SOC y se llevaron a una incubación por 1 hora a 30°C a 50 r.p.m. Una vez terminado este periodo de tiempo se tomaron 200 μl del caldo crecido de cada uno de los ensayos y sembraron en agar LB con cloranfenicol (6 μg/ml). Se dejaron incubando a 30°C por 48 horas y se realizó recuento de número de transformantes por μg de ADN calculando la eficiencia de transformación. Se realizó extracción de ADN plasmídico y electroforesis en geles de agarosa al 0.8% para verificar la presencia del plásmido.

5.8 PREPARACIÓN DE LAS VARIANTES EN LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

A continuación, se describen los pasos de la preparación previa de las variantes del barajado y diseñadas para determinar su toxicidad (Figura 11).

Figura 11. Esquema general para la preparación de las variantes obtenidas en los ensayos de toxicidad.



5.8.1 Producción de un Cultivo Completo Final (CCF) de *Bt*. Las variantes 1, 8, 23, 79, 81, A92D, C157R y así mismo, las recombinantes que expresan toxinas Cry11Aa y Bb, junto a la cepa *Bt* acristalifera BMB171, se cultivaron en 10 ml de caldo LB con cloranfenicol (6 µg/ml) y se incubaron a 30°C con agitación a 300 r.p.m. por un periodo de 7 días. Después de 48 horas de incubación, se realizó chequeo de formación de esporas y cristales por medio de tinción de verde malaquita. Se tomaron 5 ml de todos los cultivos, se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de NaCl 1M. El preparado se dejó en incubación durante 1 hora a 30°C en agitación a 50 r.p.m. Después de este periodo de tiempo, se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de BFS 1X. Luego se homogenizó el pellet y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Este procedimiento se repitió dos veces más. Las células se congelaron en 1 ml de BFS.

5.8.2 Determinación del número de esporas de las variantes de *Bt*. Los cultivos de cada una de las mutantes disueltas en BFS 1X, se sometieron a estrés térmico el cual se realizó de la siguiente manera: se tomaron 100 µl de cada uno de los cultivos y se incubaron a 72°C por 20 minutos. Luego, se llevaron a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Se realizaron diluciones del orden de 10^{-1} a 10^{-5} en volumen final de 100 µl, se sembró toda la dilución en agar LB con cloranfenicol (6 µg/ml) y se incubaron a 30°C durante 24 horas, el recuento se realizó por superficie en placa, esta medición arrojó información acerca en qué fase de crecimiento se encontraban los cultivos. Los resultados obtenidos se reportaron en esporas/ml de cultivo.

5.8.3 Solubilización y cuantificación de proteínas Cry. Las proteínas se solubilizaron tomando 200 µl del cultivo final de cada uno de las variantes (numeral 6.8.1), se adicionó 800 µl de buffer de solubilización de cristales (NaOH 50 mM, EDTA 10 mM; pH: 11,7). Esta solución se dejó incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 15000 r.p.m. a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se

ajustó el volumen a 1 ml con Tris-base 0.1 M pH 7,4. Para cuantificar las proteínas se utilizó el método de microtécnica de Bradford a 540nm en el Nanodrop 2000. Se realizaron tres mediciones para cada variante con el objeto de calcular la media y desviación estándar.

5.8.4 Ensayo preliminar de concentración letal media (CL₅₀) de las variantes de *Bt*. A partir de las células obtenidas en numeral 6.8.1 se realizó un ensayo preliminar. Este ensayo consistió en poner 5 larvas de *A. aegypti* primer instar en pozos de placa de ELISA (de 300 µl) con 30 µl de cultivo final de cada mutante y se completó a un volumen final de 300 µl de una infusión de heno al 10% (10 gr de heno en un 1 litro de agua estéril, se calienta hasta ebullición por 5 minutos). Se mantuvo una proporción 1:10 de cultivo final, se realizaron dos replicas en paralelo. Se evaluó la toxicidad de las variantes a las 24 horas.

5.8.5 Estimación de peso seco. Considerando que para el ensayo de concentración letal₅₀ se parte del cultivo final tratado con NaCl y que en cada unidad experimental la larva está expuesta a cristales, esporas y detritos celulares, fue necesario establecer de toda la masa celular, la cantidad que corresponde a proteína. Para esto, se realizó la estimación del peso seco tomando 500 µl de cultivo completo final de cada variante según se describe en el numeral 6.8.1 y se centrifugaron a 15000 r.p.m a 4°C por 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejaron secar por 48 horas a 20°C. Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron mediciones de peso seco por triplicado calculando la media y la desviación estándar. La masa obtenida se dividió entre 0.5 debido a que se partió de 500 µl del cultivo completo final.

5.9 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

A partir de que preparado obtenido en el numeral 6.8.3. La separación de proteínas se realizó en gel de acrilamida al 10% y la preparación del gel y el corrido electroforético se llevó a cabo siguiendo indicaciones según (Laemmli 1970), y el libro de protocolos “The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Joseph Sambrook 2006). Se empleó 5 µg de proteína por línea, para el revelado del gel se usó azul de Coomassie R-250, 30 minutos de solución fijadora, 60 minutos de solución de tinción y 30 minutos en solución decolorante. Las condiciones de corrido fueron 80 voltios por 90 minutos.

5.10 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀)

Los ensayos de letalidad se llevaron a cabo con los cultivos completos finales CCF obtenidos en el numeral 6.8.1. Se realizaron 2 réplicas, cada replica constaba de 30 larvas de *A. aegypti*, para cada una de las proteínas, se tomaron en cuenta 7 dosificaciones, utilizando un total de 420 larvas por variante. Para estimar la letalidad se realizó recuento de las larvas vivas que se tradujo a porcentaje de larvas muertas. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo empleando la función ProBit el cual usa el logaritmo lineal para manejar conjunto de datos con variables dependientes categóricas. Las consolas de trabajo para calcular la concentración letal media (CL₅₀), se realizaron empleando el Software R-Project (Team 2013).

5.11 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo de investigación no involucró trabajo con seres humanos, tampoco la manipulación de muestras humanas de ningún tipo ni pruebas diagnósticas, tratamientos e intervenciones que involucren o pongan en riesgo la

salud y la vida de los seres humanos. Por lo tanto, no aplican para este trabajo las consideraciones éticas establecidas en la **Declaración de Helsinki**, ni del **tratado Belmont**.

De acuerdo a la resolución 8430 de 1993 este trabajo se realizó en Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Santander, UDES. Este laboratorio cumple los requerimientos enunciados en el **Capítulo I, Artículo 63** respecto a las instalaciones y sistemas de contención.

Aunque este trabajo implicó la construcción y manejo de ácidos nucleicos recombinantes, estos se manejaron de acuerdo a las disposiciones del artículo 74. Su uso es exclusivamente para actividades de investigación relacionadas con este trabajo o con los proyectos subsecuentes. Todo material biológico desechado se desnaturalizó, previo a su descarte y esterilización con el fin de no liberar ningún material biológico al ambiente.

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS MOLECULAR DE VARIANTES OBTENIDAS POR BARAJADO DE ADN

El análisis molecular se orientó a establecer los valores de identidad y similitud para cada una de las variantes (1, 8, 23, 79 y 81) con respecto a los genes parentales *cry11Aa*, *cry11Ba* y *cry11Bb*. La tabla 4 representa los valores hallados y calculados en la matriz MatGat.

Tabla 4. Tabla porcentaje de identidad y similitud de las variantes obtenidas mediante barajado de ADN respecto a los genes parentales. Los valores subrayados y en negrilla muestran la identidad y similitud de las variantes respecto *Cry11Aa*.

% IDENTIDAD								
	Cry11Ba	Cry11Aa	Cry11B b	1	8	23	79	81
Cry11Ba		53.7	76.5	48.6	47.0	53.9	27.8	50.3
Cry11Aa	67.7		52.0	<u>84.6</u>	<u>86.5</u>	<u>98.8</u>	<u>47.0</u>	<u>90.7</u>
Cry11Bb	84.8	64.9		47.1	45.7	51.9	27.6	48.2
Variante 1	60.9	<u>88.2</u>	58.1		93.6	84.5	52.9	91.7
Variante 8	59.3	<u>87.4</u>	56.5	94.3		86.2	53.4	93.6
Variante 23	67.4	<u>98.9</u>	64.3	87.9	87.1		47.6	90.7
Variante 79	41.9	<u>55.7</u>	39.9	62.4	63.7	56.6		51.9
Variante 81	62.4	<u>91.2</u>	59.2	95.6	94.6	91.0	63.1	
% SIMILITUD								

Los resultados muestran que las variantes presentaron identidades y similitudes más altas con Cry11Aa. La variante 8 presentó una identidad del 86.5% y una similitud del 87.4%, al mismo tiempo la variante 1 con valores de 84.6% y 88.2%, respectivamente. Por el contrario, la variante 79 presentó un 47% de identidad y 55.7% de similitud con la Cry11Aa. La variante 23 presentó la mayor identidad (98%) y similitud (98.9%) con Cry11Aa, seguida de la variante 81. Para todas las variantes los porcentajes de identidad y similitud más bajos fueron encontrados con Cry11Bb y Ba.

La tasa de mutación para cada una de las variantes fue así, para la variante 1 del 15%, variante 8 del 13%, variante 23 del 1%, variante 79 del 20% y variante 81 del 8%. La variante 79 fue la más variable y la variante 23 la menos variable. Las variantes 1 y 8, presentaron una delección de 219 nucleótidos (73 aminoácidos) en la región que codifica para el dominio I. Todas las variantes presentaron menos variaciones en el dominio II respecto de la secuencia del Cry11Aa. En todas las secuencias de las variantes analizadas, la región que codifica para el dominio III presentó el mayor número de sustituciones (Tabla 5).

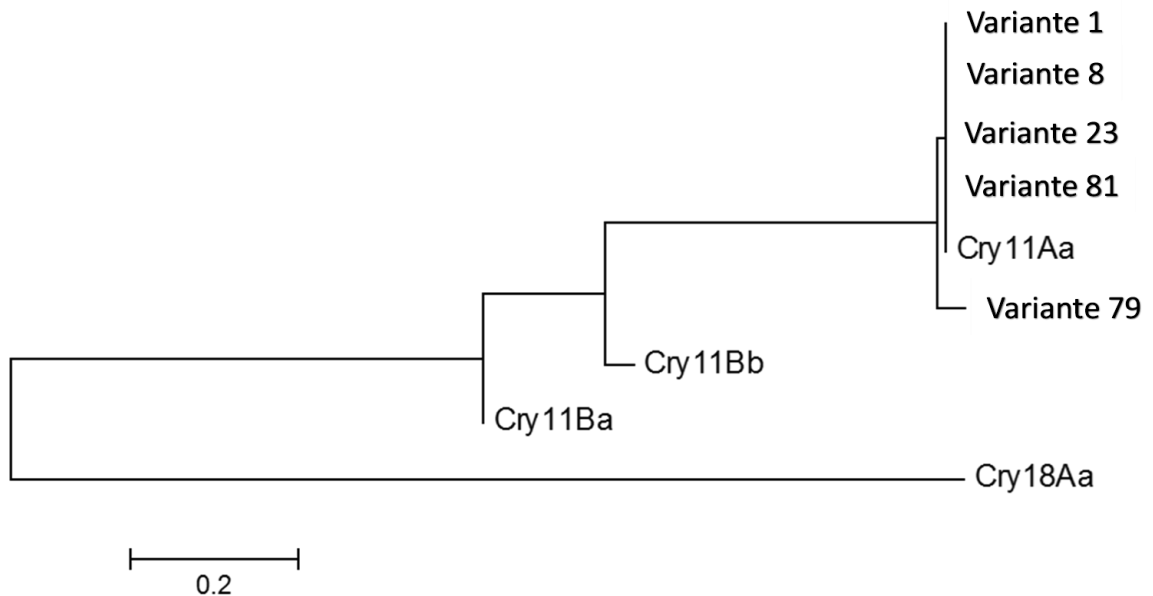
Tabla 5. Cambios en los dominios de las variantes barajado; DEL (delección); INS (Inserción); SUS (Sustitución). Los análisis se llevaron a cabo comparando la secuencia nucleotídica parental *cry11Aa*. Las secuencias subrayadas en negrillas, son mutaciones compartidas. **Total*: Es el número de mutaciones encontradas en cada dominio para cada variante**

Variante	DOMINIO I	Total*	DOMINIO II	Total*	DOMINIO III	Total*
1	1- 219DEL(ATG....A CT)	219	0 DEL	0	0 DEL	79
	0 INS		0 INS		1926 INS ((C); 1927 INS (A); 1940....2011 INS (TGGG...ATAA).	
	0 SUS		0 CA		<u>C1917G; G1918T; A1921T; A1935G; C1936T; T1937G</u>	
8	1-219DEL (ATG....ACT)	219	0 DEL	6	1939 DEL (A)	14
	0 INS		0 INS		0 INS	
	0 SUS		A1192G; A1223C; A1352G; A1361G; C1380G; T1399G.		A1779C; A1887G; T1892G; T1912C; <u>C1917G;</u> <u>G1918T;</u> A1920G; <u>AA1921-1922TT;</u> A1925C; <u>A1935G; C1936T;</u> T1938G.	
1-9 DEL(ATG...TAT)		0 DEL		0 DEL		

23	0 INS	9	0 INS	6	1940-44 INS (AGTAG)	6
	0 SUS		C1185T; ACTC1210-1213 CTCG; C1243G.		C1593G; C1608G	
79	1-325 DEL (ATG...GTG)	326	1180 DEL (T)	7	0 DEL	63
	357 INS (C)		0 INS		1940-82 INS (AGG...TAG)	
	0 SUS		T1199G; T1230G; T1266G; T1350A; T1365G; T1401A.		AT1455GC; T1479A; T1524G; T1611G, T1647G; T1659A; T1728A; T1800A; T1854A; T1893G; T1896G; G1918T <u>AA1921-22TT</u> ; T1934G; <u>A1935G</u> ; <u>C1936T</u> ; A1939G	
81	1-152 DEL (ATG...GGA) ; 180 (A)	153	0 DEL	0	0 DEL	10
	0 INS		0 INS		1940-47 INS (AG...AA)	
	0 SUS		0 SUS		<u>C1936T</u> ; <u>T1937G</u>	

La historia evolutiva de las proteínas parentales y variantes, se infirió basándose en el método de la máxima verosimilitud basado en la matriz JTT (Jones, Taylor et al. 1992), según los parámetros estándares del Software MEGA 6 (Tamura, Stecher et al. 2013) (Figura 12).

Figura 12. Comparación filogenética de las proteínas variantes y parentales Cry11. El análisis se realizó por dominios. La historia evolutiva fue inferida usando el método de máxima verosimilitud basado en la matriz JTT. Los análisis fueron hechos en MEGA6 (Tamura, Stecher et al. 2013).



En la Figura 12 se puede evidenciar una estrecha relación evolutiva entre las variantes 1, 8, 23, 81 con la parental Cry11Aa. Así mismo, se puede apreciar la distancia de la variante 79 con respecto a las demás. Todas las variantes presentaron mayor distancia evolutiva con los demás proteínas Cry11 y Cry18.

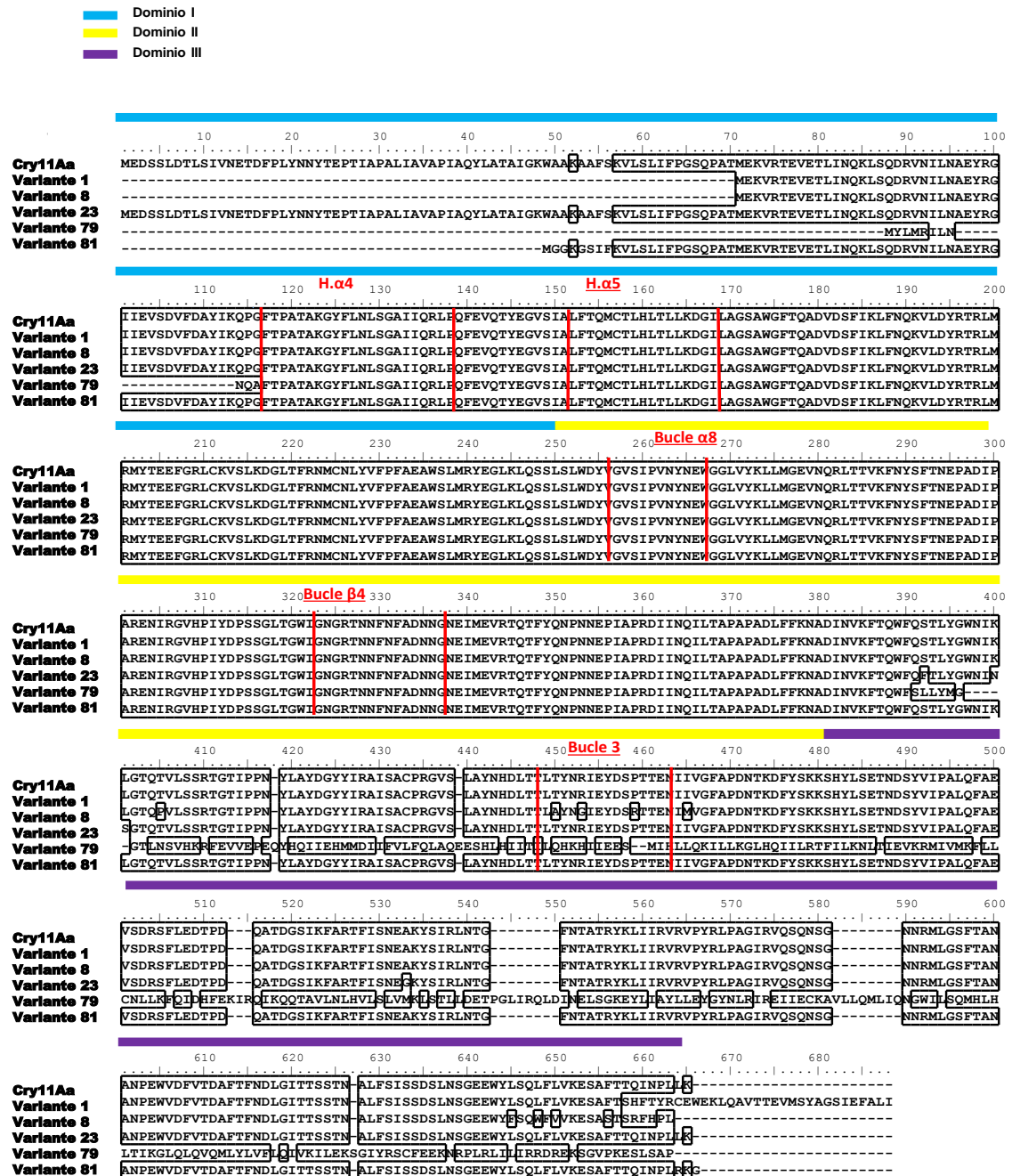
6.1.1 Análisis de las secuencia aminoacídica de las variantes. La secuencia más conservada respecto a Cry11Aa fue la variante 23. La tabla 6 muestra el análisis realizado a las proteínas deducidas para cada una de las variantes. La variante 79 presenta un cambio hacia su carboxilo terminal. Con respecto a la variante 8, se puede observar una deleción de 73 aminoácidos en su extremo amino y varios cambios en su extremo carboxilo (Figura 13).

Los análisis de secuencia de las variantes y la parental Cry11Aa fueron realizados identificando posiciones conservadas en las hélices α -4 y α -5 del dominio I, así como de regiones importantes involucradas en la interacción con la membrana plasmática (bucle α 8, bucle β 4 y bucle 3). Se obtuvo que las todas las mutantes no presentaron cambios estos sitios con excepción de las variantes 8 y 79 que presentaron sustituciones en el bucle 3 (Figura 13).

Tabla 6. Cambios en la secuencia aminoacídica de las variantes obtenidas por barajado de ADN. DEL (delección); INS (Inserción); SUS (sustitución). Los análisis se llevaron a cabo comparando la secuencia proteica parental de Cry11Aa.

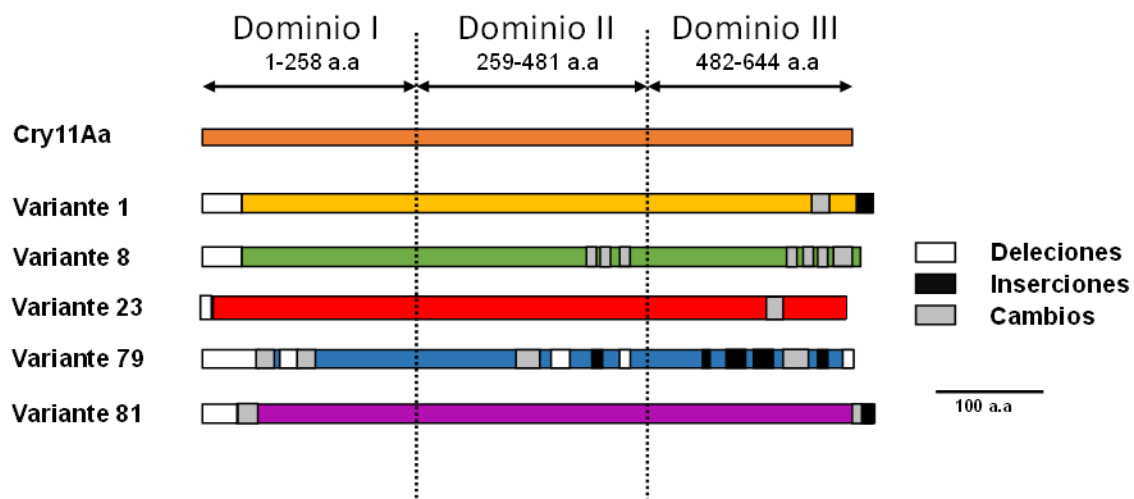
Variante 1	1-73 DEL (MNY.....AT)
	668-691 INS(EKLQAVTTEVMSYAGSIEFALI)
	Q640H; I641F; N642T; P643Y; L644R; L645C
Variante 8	1-73 DEL (MNY.....AT); 667 DEL (L)
	0 INS
	T453A; R456G; P462R; L648F; L651W; F659S; Q662R; I663F; N664H
Variante 23	1-3 DEL (MNY)
	0 INS
	S392F; L401S; A536G
Variante 79	1-90 DEL (MNY...KLS); 99-116 DEL (AE...IK); 400-404 DEL (WNIKL); 462-463 DEL (PT); 667 DEL (L)
	421 INS (Q); 442 INS (E); 516-518 INS (KIR); 546-553 INS (PG...LD); 585-592 INS (VL...IQ); 630 INS (S)
	Q91M; D92Y; R93L; V94M; N95R; Q117N; P118Q; G119A; Q407L; T408N; V409S; C410V; S411H; S412K; T414F; G415E; T416V; I417V; P418E; 453-456 TYNR/QHKH; 458-460EYD/IEE;Q662S; I663L; N664S; P665A; L666P
Variante 81	1-51 DEL (MNY...IGK)
	669 INS (G)
	W52M; A53G; A54G; A56G; A57S; F58I; S59F; L667R

Figura 13. Alineamiento de secuencias de proteínas. Dominios y regiones involucradas en la formación del poro lítico (hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$), e interacción con los receptores de la membrana plasmática de insectos (bucle $\alpha 8$, bucle $\beta 4$ y bucle 3) de Cry11Aa y variantes del barajado del ADN. Dominio I (azul); Dominio II (amarillo) y Dominio III (morado).



El análisis deducido de proteínas de las variantes obtenidas permitió determinar que la mayoría de las mutaciones ocurrieron en el dominio III, mientras que en el dominio I se observó predominancia de deleciones (Figura 14) y en el dominio II fue el menos variable en todas las variantes con respecto a la parental Cry11Aa con excepción de las variantes 8 y 79.

Figura 14. Esquematización de las variaciones obtenidas librería de barajado de ADN, respecto a Cry11Aa. Se señalan los dominios, así como las deleciones, inserciones y cambios puntuales en la secuencia.



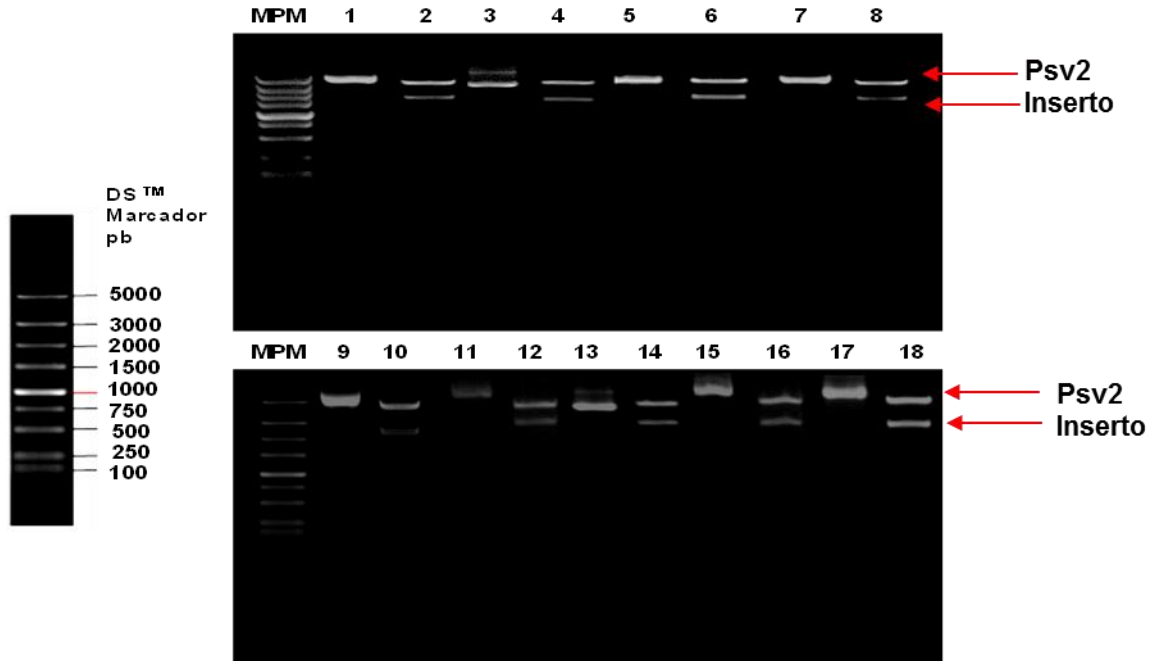
6.1.2 Subclonaje de variantes y parentales. Los resultados indican una alta eficiencia de transformación en células de *E. coli* DE3BL21. La eficiencia más alta se obtuvo para el constructo pSV2-11Aa y la menor para pSV2-Variante 79. El resultado de la eficiencia de transformación se describe en la tabla 7.

Tabla 7. Eficiencia de transformación en DE3BL21.

CONSTRUCTO	Células/μg ADN
pSV2-Variante 1	$8 \cdot 10^8$
pSV2-Variante 8	$45 \cdot 10^8$
pSV2-Variante 23	$32 \cdot 10^8$
pSV2-Variante 79	$12 \cdot 10^7$
pSV2-Variante 81	$20 \cdot 10^7$
pSV2-A92D	$15 \cdot 10^8$
pSV2-C157R	$25 \cdot 10^7$
pSV2-11Aa	$55 \cdot 10^8$
pSV2-11Bb	$35 \cdot 10^8$

Se seleccionó clon por variantes y parentales, se extrajo ADN plasmídico y se digirió con las enzimas *Hind*III y *Sac*I, así mismo se confirmó la presencia del inserto, la correspondencia con los pesos moleculares y la calidad del ADN. La figura 15 muestra la electroforesis en agarosa para cada uno de los clones tamizados.

Figura 15. Corrido de electroforesis 0.8% de Agarosa, de variantes barajado, racionales y parentales sublonados en pSV2. MPM: marcador de peso molecular; carril 1 (variante 1 ADN plasmídico); carril 2 (variante 1 ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 3 (variante 8 ADN plasmídico); carril 4 (variante 8 ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 5 (variante 23 ADN plasmídico); carril 6 (variante 23 ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 7 (variante 79 ADN plasmídico); carril 8 (variante 79 ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 9 (variante 81 ADN plasmídico); carril 10 (variante 81 ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 11 (variante A92D ADN plasmídico); carril 12 (variante A92D ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 13 (variante C157R ADN plasmídico); carril 14 (variante C157R ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 15 (Cry11Bb ADN plasmídico); carril 16 (Cry11Bb ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)); carril 17 (Cry11Aa ADN plasmídico); carril 18 (Cry11Aa ADN plasmídico digerido (*Hind*III/*Sac*I)).



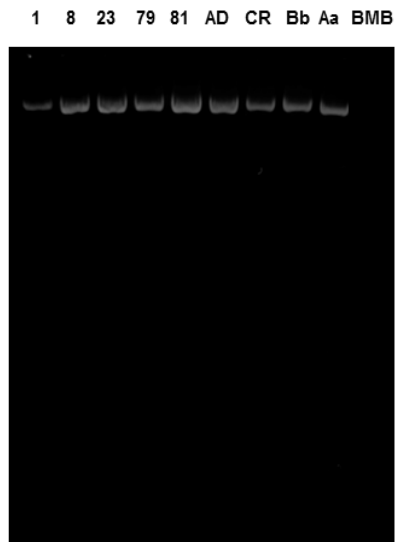
De la electroforesis se distingue el peso molecular de vector linearizado pSV2 cortado con *HindIII* y *SacI* (5 kb) y el de los insertos entre 2 y 3 kb. Los pesos moleculares correspondieron al patrón de bandas esperado. Para las variantes obtenidas por barajado fue de aproximadamente de 1900 pb, las dos variantes obtenidas por mutaciones racionales fue de aproximadamente 2300 pb, 1900 pb para *cry11Aa* y 2300 pb para *cry11Bb* (Figura 12).

Cada constructo se empleó para transformar la cepa acristalífera BMB171. Se calculó la eficiencia del método (Tabla 8). La presencia del plásmido se verificó para cada uno de los mutantes obtenidos y se constató la ausencia de plásmido en el control BMB171 (Figura 16).

Tabla 8. Eficiencia de transformación en BMB171.

CONSTRUCTO	Células/μg ADN
pSV2-Variante 1	$7 \cdot 10^8$
pSV2-Variante 8	$5 \cdot 10^8$
pSV2-Variante 23	$3 \cdot 10^8$
pSV2-Variante 79	$2 \cdot 10^8$
pSV2-Variante 81	$10 \cdot 10^8$
pSV2-A92D	$6 \cdot 10^9$
pSV2-C157R	$25 \cdot 10^8$
pSV2-11Aa	$55 \cdot 10^8$
pSV2-11Bb	$35 \cdot 10^8$

Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de ADN plasmídico obtenido de la transformación de cada una de las variantes de Cry11 en *Bt*BMB171 con sus respectivos controles (Cry11Aa, y Cry11Bb y control negativo *Bt*BMB171).



Para determinar cuáles de las variantes seleccionadas presentaron toxicidad contra larvas de *A. aegypti*, se realizó un ensayo preliminar el cual mostró los siguientes resultados (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados obtenidos en el ensayo grueso para las variantes obtenidas por barajado de ADN a 24 horas.

CEPA	NUMERO DE LARVAS VIVAS	
	REPLICA 1	REPLICA 2
1	3	1
8	3	2
23	2	3
79	3	4
81	4	4
A92D	3	4
C157R	5	5
Aa	5	4
Bb	3	3
C-	5	5

Las variantes 1, 8, 23 y la cepa *Bt* que expresa Cry11Bb fueron las que mayor actividad tóxica presentaron. Las cepas con menor toxicidad fueron 81, A92D, Cry11Aa. La C157R no presentó actividad tóxica y por tanto se excluyó para las siguientes fases (Tabla 8).

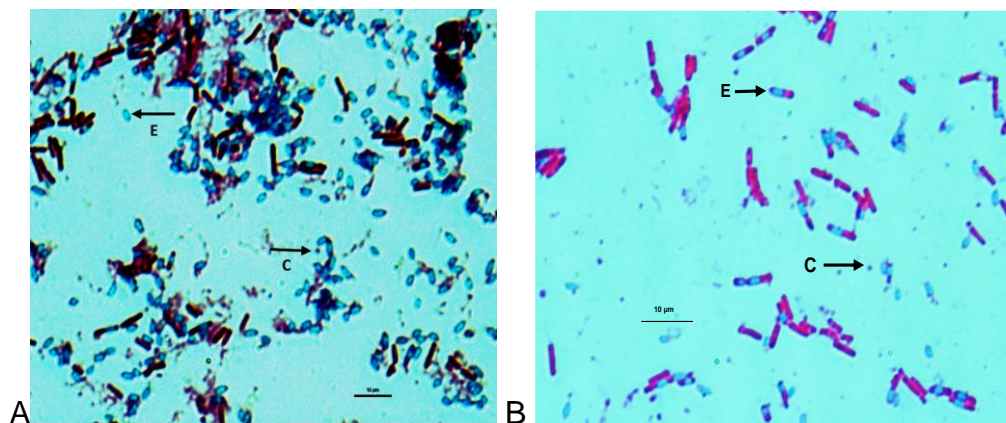
El resultado de conteo de número de esporas se muestra en la tabla 9. La presencia de cristales estuvo presente en todas las variantes. Los cristales presentaron una morfología circular y de posición subterminal (Figura 17).

Tabla 10. Conteo de número de esporas por ml de las variantes.

Variante	Número de esporas/ml
1	42*10 ⁶
8	12*10 ⁶
23	10*10 ⁶
79	50*10 ⁶
81	30*10 ⁶
A92D	10*10 ⁶
Aa	86*10 ⁶
Bb	16*10 ⁶

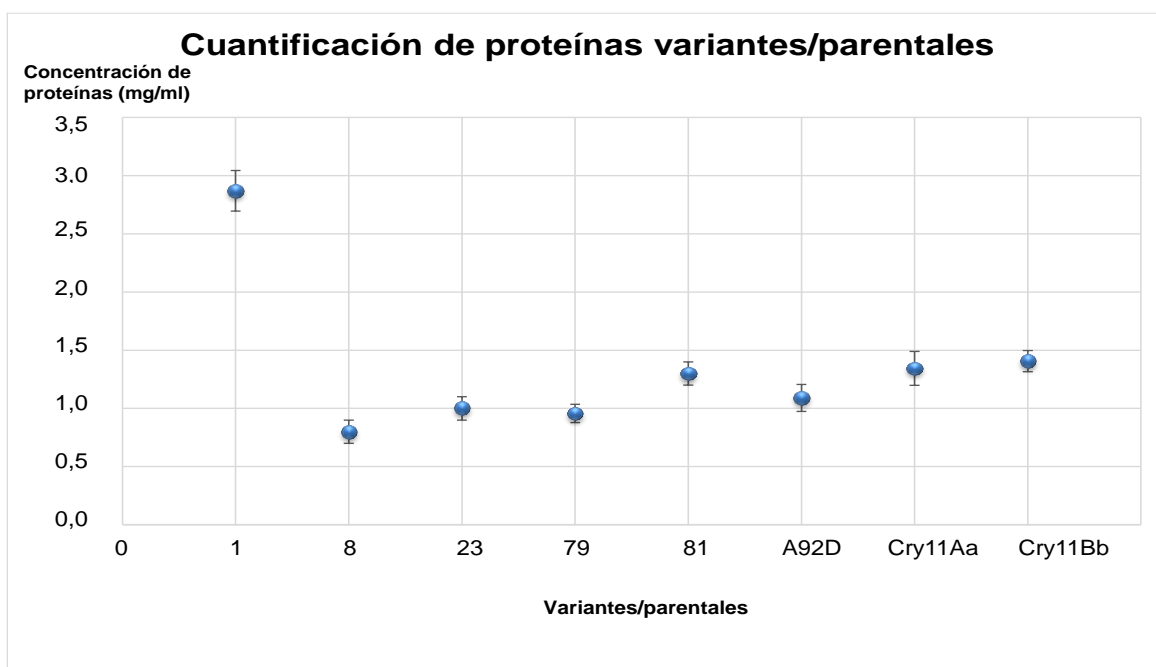
Para todos los candidatos a evaluar su toxicidad, se observó un orden de 10⁶ esporas/ml.

Figura 17. Coloración de verde de malaquita más safranina, se puede apreciar las esporas de color azul (E), los cristales se aprecian como pequeñas incrustaciones rojas circulares (C). A (variante 8), B (variante 79).



Una vez obtenidos los productos solubilizados, se llevó a cabo la cuantificación de proteína total usando 2 μ l de muestra (Figura 18).

Figura 18. Cuantificación de proteínas de las variantes y parentales empleando el método de Bradford (Laemmli 1970). Variante 1; Variante 8; Variante 23; Variante 79; Variante 81; Variante A92D; Cry11Aa; Cry11Bb.



La cuantificación de las proteínas en mg/ml en promedio y desviación estándar mostraron, para las variantes y parentales los siguientes resultados: variante 1: 2,85 (+/- 0,04); variante 8: 0,79 (+/- 0,08) ; variante 23: 0,97 (+/- 0,03); variante 79: 0,98 (+/- 0,02); variante 81: 1,20 (+/- 0,01); variante A92D: 1,06 (0,02); controles Cry11Aa: 1,33 (+/-0,01) y Cry11Bb: 1,39 (+/-0,05) (Figura 18). Una vez obtenido los resultados de concentración de proteínas, se estimó el peso seco (Tabla 11).

Tabla 11. Promedio de la estimación del peso seco de las cepas variantes y recombinantes de Cry11, por cada ml de cultivo de las variantes y recombinantes. El peso seco se expresa en mg/ml.

Muestra	Peso tubo + pellet g	Peso seco g/0.5ml	Peso seco mg/ml
Tubo	0,1843(+/-0.018)		
1	0,2830 (+/-0.057)	0,0987	197,4
8	0,2151(+/-0.013)	0,0308	61,6
23	0,2027(+/-0.031)	0,0184	36,8
79	0,2171(+/-0.019)	0,0328	65,6
81	0,2131(+/-0.021)	0,0288	57,6
A92D	0,2179(+/-0.018)	0,0336	67,2
Aa	0,2193(+/-0.030)	0,035	70
Bb	0,2556(+/-0.016)	0,0713	142,6

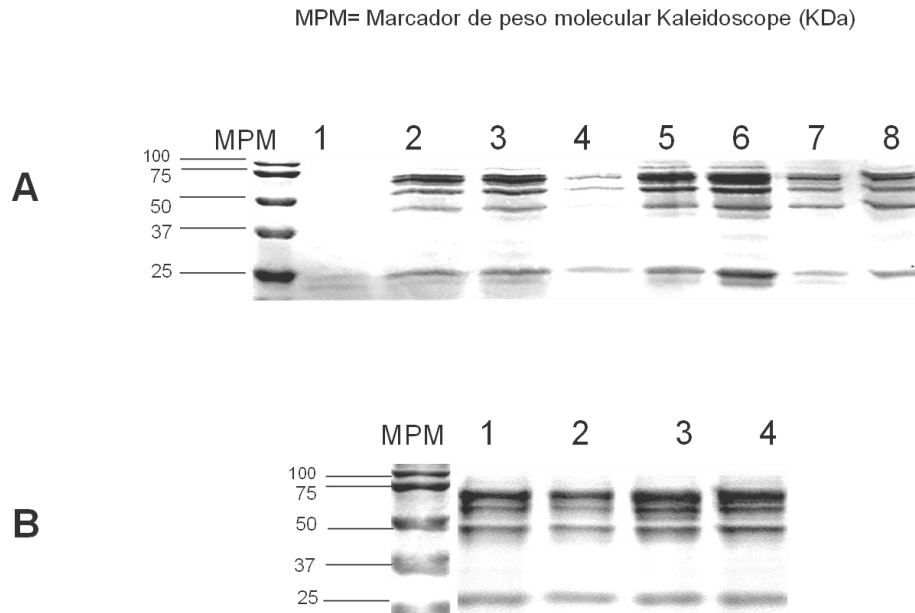
Con base en los resultados de peso seco, se determinó la proporción de proteína tóxica usada para cada uno de los bioensayos (Tabla 12).

Tabla 12. Determinación de la proporción peso seco y proteína solubilizada a partir de cristales, para cada una de las variantes utilizadas en los ensayos de CL₅₀.

Cepa	PESO SECO mg/ml	CONCENTRACIÓN DE PROTEINA SOLUBILIZADA mg/ml	PROPORCION PESO SECO:PROTEINA
1	197,40	2,85	69 : 1
8	61,60	0,79	78 : 1
23	36,80	0,97	38 : 1
79	65,60	0,98	67 : 1
81	57,60	1,20	48 : 1
A92D	67,20	1,06	63 : 1
Aa	70,00	1,33	53 : 1
Bb	142,6	1,39	103 : 1

Se verificó el patrón electroforético de las proteínas por medio de SDS - PAGE 10%. La figura 18 muestra el gel de proteínas teñido con azul de Coomassie R-250 (Figura 19).

Figura 19. SDS-Page 10 %, de las variantes y controles Cry11. Se emplearon 5 μ g de proteína por línea. **A.** Línea 1: *Bt* cepa BMB171; línea 2: variante 1; línea 3: variante 8; línea 4 (Variante 23); línea 5 (variante 79); línea 6 (variante 81); línea 7 (Cry11Aa); línea 8 (Cry11Bb). **B.** 1 (variante A92D); 2 (variante C157R); 3 (Cry11Aa); 4 (Cry11Bb).



Para las variantes obtenidas por barajado de ADN y para la variante A92D y C159R obtenidas por mutación sitio dirigida, se observó un patrón similar de bandas entre 50 y 75 kDa (tabla 13).

Tabla 13. Pesos moleculares obtenidos para cada una de variantes y controles Cry11Aa y Cry11Bb.

Variante	Peso molecular deducido de proteína kDa
1	67,63
8	64,75
23	72,36
79	63,97
81	67,26
A92D	84,46
C157R	84,47
Aa	72,64
Bb	84,42

6.2 CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀)

6.2.1 Análisis ProBit. El Software R Project (Team 2013) permitió comparar los modelos estadísticos de ProBit, Logit y Log-Log determinando que el modelo que más se ajusta para la interpretación de los datos fue ProBit. A partir de este análisis se encontró que la variante 8 fue 3.8 veces más tóxica que Cry11Bb y 6 veces más tóxica que Cry11Aa frente *A. aegypti*. La variante A92D de Cry11Bb disminuyó su letalidad 13.7 veces respecto del control (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de CL₅₀ obtenidos por la prueba ProBit. Los valores se expresan en nanogramos por ml de la mezcla de cristal-espora. Los límites de confianza se indican en paréntesis.

CEPA	CL ₅₀ (ng ml ⁻¹)(95%CL)
	<i>Aedes aegypti</i>
1	26.56 (7.24-28.98)
8	6.05 (1.6-6.41)
23	254.21 (52.63-263.15)
79	39.72 (7.46-44.77)
81	428.12 (208.33-416.66)
C157R	>500
A92D	313.71 (158.73-317.46)
Aa	36.90 (18.86-37.73)
Bb	22.90 (12.13-24.27)

7. DISCUSIÓN

Se han descrito distintas estrategias para mejorar la actividad tóxica de las toxinas Cry que incluyen el truncamiento de toxinas, modificación de sitios de clivaje, intercambio de dominios, adición de péptidos, uso de fagos, mutaciones sitio dirigidas y barajado de ADN (Deist, Rausch et al. 2014). Mediante estas estrategias ha sido posible entender la estructura, su función y modo de acción contra diversos insectos, así como ha permitido la obtención de variantes Cry mejoradas para el control biológico de los mismos (Deist, Rausch et al. 2014, Lucena, Pelegrini et al. 2014). En este estudio se presenta un análisis molecular y la determinación tóxica contra *A. aegypti* de cinco variantes obtenidas de una librería de barajado de ADN, al igual que la construcción y la determinación tóxica de dos variantes de Cry11Bb obtenidas mediante mutación sitio dirigida.

En el análisis molecular y específicamente en el análisis de secuencias, las variantes 1, 8, 23, 79 y 81, mostraron la identidad más alta con Cry11Aa que con respecto a las demás parentales. Las variantes 23 y 81 exhibieron las tasas de mutación más bajas, entre el 1 y 8% respectivamente (Tabla 4), mientras que las variantes 1 y 79 tuvieron una identidad de 84.6 y 47% respectivamente, siendo la variante 79 la que presentó la más alta tasa de mutación (Tabla 4). Las variantes 1 y 8 mostraron características similares en cuanto a identidad y tasas de mutación. Teniendo en cuenta la baja identidad de las variantes con los genes parentales *cry11Ba* y *Bb*, los resultados indican que estas fueron producto del reensamblaje del gen parental *cry11Aa*. El análisis filogenético confirma este hallazgo y da cuenta de la distancia cercana de las variantes con el gen parental *cry11Aa* (Figura 12).

Un hallazgo importante fueron las deleciones encontradas en todas las variantes en el extremo 5' del gen, en la región que codifica para el extremo amino terminal y dominio I. La longitud de las deleciones fue variable entre las toxinas que oscilaron

entre 9 y 325pb (0.33 kDa a 11.9 kDa). Al contrastar estos resultados con la actividad tóxica contra *A. aegypti*, se evidencia que las variantes 23 y 81 que tuvieron las más bajas tasas de mutación (1 y 8% respectivamente), fueron las dos con mayor pérdida de actividad tóxica (6.8 y 11.6 veces) con respecto a Cry11Aa (Tabla 14). Así mismo, estas variantes se distinguieron por ausencia del extremo amino terminal de 0.33 y 5.5 kDa. En cambio, las variantes 1 y 79 que tuvieron las mayores tasas de mutación del 15 y 20% y presentaron toxicidad similar a la parental (Tabla 14), no contenían un fragmento de 8.0 y 11.9 kDa en su extremo amino respectivamente. Así mismo, la variante 8 que en ausencia de un fragmento al extremo amino de 8.0 kDa y con una tasa de mutación de 13%, la actividad tóxica fue 6.09 veces mayor con respecto a la parental (Tabla 14). De acuerdo con estudios realizados en toxinas relacionadas con Cry11 como Cry2a, la ausencia de 42 aminoácidos de su extremo amino terminal de la proteína aumenta de 4,1 a 6,6 veces su actividad tóxica contra lepidópteros (Mandal, Gayen et al. 2007). Así mismo el truncamiento del extremo amino y la pérdida de la hélice α 1 (13 aminoácidos), en variantes de Cry1AC, produce un incremento de hasta 107 veces en el potencial insecticida contra *Pectinophora gossypiella* (Soberon, Pardo-Lopez et al. 2007) y aumenta 350 veces la toxicidad contra *Plutella xylostella* y *Ostrinia nubilalis* (Tabashnik, Huang et al. 2011). Sin embargo, en Cry11 se ha descrito lo contrario. De los dos reportes existentes en Cry11, las deleciones superiores a 38 aminoácidos (4.1 kDa) en el extremo amino terminal de Cry11Aa produce pérdida total de actividad tóxica contra *A. aegypti* (Pao-intara, Angsuthanasombat et al. 1988) y en otro estudio, en una variante truncada de la proteína Cry11Aa con una deleción de 9.6 kDa en el extremo amino terminal, produjo la pérdida de toxicidad (>4000ng/ml) (Pang, Frutos et al. 1992). Sumado a estos antecedentes, en todas las variantes obtenidas por barajado, las deleciones encontradas no involucraron las hélices α -4 (F117-P138) y α -5 (S151-I168), la cuales están directamente involucradas en la formación del poro (Deist, Rausch et al. 2014). Por lo tanto, es posible que la pérdida de la actividad tóxica por parte de las variantes 23 y 81, así como la actividad tóxica similar a la parental de las variantes 1 y 79 y el aumento de la actividad tóxica de la variante 8 depende de otras regiones distintas al dominio I

en las cuales ocurrieron mutaciones. La variante 1 posee varios cambios en el dominio III e inserciones hacia su terminal carboxilo del dominio III posiciones 668-691. A diferencia de la 81, la variante 1 tuvo una actividad tóxica (26.56 ng/ml) muy similar tóxica con respecto a la parental. La delección de los primeros 73 aminoácidos en la región amino y la inserción de 24 aminoácidos al final de la proteína no afectaron la actividad tóxica. Así mismo, de acuerdo a las mutaciones encontradas en los genes ensamblados, se pudieron identificar mutaciones no relevantes como aquellas que se repitieron tanto en variantes con incremento en la toxicidad como en las que hubo presentaron disminución de la misma, con lo cual descarta su papel en su actividad tóxica, este es el caso de las mutaciones AA1921-1922TT; A1935G; C1936T y T1937G. Contrario a los anteriores, se identificaron dos mutaciones relevantes como C1917G y G1918T que posiblemente indican un papel asociado a la actividad tóxica. Según estos indicios, no se descarta que modificaciones en el dominio III tengan alguna incidencia en la actividad tóxica de Cry11Aa contra *A. aegypti* (Tabla 6).

Se ha descrito que la interacción entre el receptor y la proteína Cry11Aa incluye al menos tres regiones dominio II (bucles $\alpha 8$, β -4 y bucle 3) (Fernandez, Perez et al. 2005). Además se ha reportado con anterioridad que una región del dominio II (C256-R360), está involucrada en procesos de toxicidad, sugiriendo que esta región es esencial en procesos toxina-receptor (Yamagiwa, Sakagawa et al. 2004). Para todas las variantes obtenidas por barajado de ADN de este estudio, las regiones que involucran los bucles $\alpha 8$ (257GVSIPVNYNEW267) y $\beta 4$ (323GNGRTNNFNADNN336), no presentaron ninguna modificación (Figura13). Las variantes 1, 23 y 81 mantuvieron los residuos del bucle 3 intactos (450TLTYNRIEYDSPTTEN465), caso contrario con lo observado en la variante 8, la cual presento tres sustituciones (T453A, R456G y P462R), la primera y la segunda pueden estar jugando un rol importante en el cambio de hidrofobicidad (no polares) exponiendo menos estos residuos al solvente intestinal lo que puede generar una estabilidad mayor en esta región de la proteína. Y la variante 79 donde hubo siete cambios (453-456 TYNR/QHKH) (458-460EYD/IEE) y dos delecciones

(462 DEL (P) y 463 DEL (T)) (Figura 13). Teniendo en cuentas estos hallazgos, las sustituciones observadas en la variante 8 podrían tener una relación con la actividad tóxica mas no así con la variante 79 dada su alta variabilidad en el extremo C terminal. Sumado a esto, y teniendo en cuenta las mutaciones de la variante 23, la pérdida de toxicidad por parte de esta podría estar relacionada con el dominio III.

La variante 81 conserva tres regiones idénticas a Cry11Aa en el dominio III, lo cual indica que la pérdida de actividad tóxica al igual que la 23, podría está asociada con mutaciones alojadas en este dominio. El dominio II en la variante 1 es idéntico a Cry11Aa por tanto, las regiones asociadas con la interacción toxina-receptor permiten inferir que son funcionales siendo esto evidenciado en los resultados de actividad tóxica (Tabla 14).

La variante 79 presentó la mayor tasa de mutaciones y retuvo su actividad tóxica similar a Cry11Aa (39.72 ng/ml). Esta proteína fue la más variable, con una deleción de 90 aminoácidos en su extremo amino, así como varias inserciones en el dominio II y III. Una de estas, la mutación localizada en la posición T1230G del gen, produce un cambio en el marco de lectura generando un bloque de 236 aminoácidos que al análisis de homología utilizando Blastp como PSI-Blast y con diferentes matrices, no se encontraron regiones homólogas con otros microorganismos (datos no mostrados). En la tinción por microscopia de luz de la variante 79 (Figura 13B) se observa la producción esporas y cristales y que posteriormente como parte de otra investigación, fueron confirmados por microscopia electrónica (datos mostrados). El número de sustituciones de la variante 79 en la región C-terminal no se equipara con ninguna otra variante Cry descrita hasta ahora por aproximaciones racionales y no racionales y menos aún que tenga la capacidad de retener la actividad tóxica contra *A. aegypti*. Esta variante es una de las más interesantes para estudiar la relación estructura función de la familia de las toxinas Cry11.

La variante 8 presentó sustituciones en su dominio II, específicamente en el bucle 3 (T453A, R456G y P462R) que no han sido descritas antes en las toxinas Cry11.

Sin embargo, se sabe que sustituciones en el bucle 3 del dominio II de Cry4Ba producen un aumento de la toxicidad de 1.38 y 700 veces en el control de *A. aegypti* y *C. quinquefaciatus*, respectivamente (Abdullah, Alzate et al. 2003). Otras sustituciones en el dominio II (delección del bucle 2 y cambios en el 1) en una variante de Cry19 produce un incremento hasta 42.000 veces de su actividad tóxica contra *A. aegypti* (Abdullah and Dean 2004). A pesar de lo anterior, no existe información sobre sustituciones en el dominio III en las toxinas Cry11 con efectos en la toxicidad con *A. aegypti*. Sin embargo, de acuerdo a los análisis de secuencia de la variante 8, las nueve sustituciones encontradas en este dominio (Tabla 6) indican la tendencia a sufrir más variaciones con respecto a otros dominios, y que a su vez, en conjunción con el dominio II, pudiesen estar involucrados en la actividad tóxica contra *A. aegypti*.

La variante 23 redujo la actividad tóxica hasta 6.9 veces con respecto a la parental Cry11Aa. Esta variante no presentó modificaciones en el dominio II, pero si tres cambios (S392F; L401S; A536G) en el dominio III, el cambio de Serina por Fenilalanina, puede generar cambios estructurales que puedan comprometer la estructura de la proteína así como modificaciones del sitios de clivaje (Deist, Rausch et al. 2014). La delección de tres aminoácidos en el extremo amino terminal no alcanza a comprometer las α hélices α involucradas en la formación del poro (Mandal, Gayen et al. 2007), por tanto y de acuerdo a lo observado en la demás de variantes, estas no estarían involucradas en la disminución de la actividad tóxica. Sin embargo, es posible que la causa de la disminución de la actividad tóxica dependa de las tres mutaciones presentes en el dominio III. En un estudio de Cry1Aa se obtuvo una variante denominada F536A, que presentó un aumento del 20% y 6 % contra *S. exigua* y *H armigera*, respectivamente (Zhang, Xia et al. 2011). Si bien la proteína Cry1Aa ha sido usada como referencia en la construcción de modelos estructurales de Cry11Aa (Fernandez, Perez et al. 2005), es necesario adelantar estudios dirigidos en revertir las mutaciones y completar su caracterización con el fin de conocer las implicaciones que tendrían en la toxicidad y estabilidad.

La variante 81 además de la delección en el extremo amino terminal, presentó 7 sustituciones en el dominio I, una sustitución y una inserciones en el dominio III (Tabla 6), además redujo su actividad tóxica en 11.06 veces respecto de Cry11Aa. La variante 23 como la 81 presentó cambios en el dominio III y disminución en la actividad tóxica. Se sabe que el dominio III está involucrado en el reconocimiento y estabilidad de la interacción toxina-receptor en el intestino medio de insectos, además está involucrado en mantener la integridad estructural de la toxina protegiéndola de la proteólisis dentro del intestino medio del insecto blanco (de Maagd, Bravo et al. 2003). Sin embargo, de acuerdo a las evidencias encontradas en este estudio, el dominio III en Cry11 adquiere una relevancia importante en la toxicidad. En toxinas relacionadas filogenéticamente como es el caso de las toxinas Cry2Ab y Cry2Aa se ha reportado cambios en el dominio III produciendo una variante con actividad tóxica incrementada donde se intercambiaron residuos de Cry2Ab con bloques de residuos de Cry2Aa obteniéndose una mutante que mostró ser 6,75 veces más tóxica que la parental Cry2Ab contra *Anopheles gambiae* (McNeil and Dean 2011). Estos resultados sugieren la necesidad llevar a cabo estudios que permitan elucidar el papel del dominio III de estas variantes en función de su actividad tóxica contra *A. aegypti*.

Otro hallazgo interesante fueron las mutaciones en Cry11Bb. La alanina en la posición 92 de la variante A92D está localizada en una región hidrofóbica en el dominio I. Esta misma sustitución de carga negativa (A92D) ha sido reportada en otras toxinas como Cry1Aa, Ab y Ac (Wu and Aronson 1992), donde se demuestra que este cambio altera la inserción de la toxina a la membrana celular resultando en la pérdida de toxicidad contra *M. sexta* y *H. virescens* (Wu and Aronson 1992). En este estudio se encontró que la misma variación pero en Cry11Bb, disminuyó 13.7 veces la actividad tóxica contra *A. aegypti* respecto a la parental. Este resultado indica que la sustitución de alanina 92 con respecto a su actividad tóxica es conservada entre toxinas Cry1 y Cry11 y posiblemente implicada en la formación del poro iónico. Contrario a la variante A92D, la actividad tóxica de la toxina C157R

contra *A. aegypti* fue no detectable (>500 ng/ml). En un estudio previo en *M. sexta* se demostró que esta alteración de la hélice α -5 en la posición L157 puede ocasionar una pérdida de toxicidad de hasta dos veces comparado con la toxina Cry1Ab (Alzate, Osorio et al. 2010). Sin embargo, esta misma modificación produjo un incremento en la toxicidad de hasta 4 veces contra *L. dispar* (Alzate, Osorio et al. 2010). Estos resultados indican que la actividad tóxica de esta variante, así como de las obtenidas por barajado de ADN podrían tener resultados distintos frente a otro tipo de dípteros por lo que estudios en este sentido están siendo llevados a cabo.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la importancia de métodos no racionales y de mutagénesis sitio dirigida no solo para elucidar la relación estructura-función y modo de acción sino para obtener proteínas con mayor actividad tóxica como la variante 8 o toxinas que aún con un C-terminal altamente variable pueden conservar su actividad tóxica como ocurre con la variante 79. Este estudio aporta información relevante de cada uno de los dominios de la toxina Cry11Aa, así como de la Cry11Bb y su papel en la actividad tóxica con *A. aegypti*.

8. CONCLUSIONES

1. Este trabajo logró demostrar que las estrategias no racionales como el barajado de genes *cry11* permiten obtener proteínas con mayor actividad tóxica contra *A. aegypti*. La variante 8 es un resultado más importante de este trabajo y que de acuerdo a las características de las demás variantes, estas fueron ensambladas solamente de un gen parental, *cry11Aa*. Sin embargo, todas las variantes presentaron diferentes porcentajes de identidad con respecto a la parental y así mismo, deleciones en el extremo amino terminal de hasta 11.9 kDa sin que tenga ésté implicaciones en la actividad tóxica contra *A. aegypti*. Por otro lado, los cambios en los dominios II y III, como en el caso de la variante 8 sugieren que podrían están implicados en la actividad tóxica contra *A. aegypti*.
2. La variante 79 fue la más distinta entre todas las variantes dadas las características halladas en su secuencia al extremo C-terminal. Sin embargo, la actividad tóxica fue similar a la parental lo que hace que sea un modelo interesante de estudio sobre su estructura y función. Del mismo modo la variante 23, que presentando el menor número de variaciones presentó una disminución de la actividad tóxica la convierte en un modelo interesante para revertir estas mutaciones y así elucidar otros residuos involucrados en la actividad tóxica contra *A. aegypti*.
3. La variante 1 presentó una incrementado leve de la actividad tóxica con respecto a *Cry11Aa* que junto con la variante 8, fueron las únicas del estudio que presentaron una mayor letalidad. Comparando las mutaciones alojadas en estas dos variantes, se sugiere un posible papel del dominio III en la actividad tóxica contra *A. aegypti*.

4. Respecto a las variantes racionales A92D y C157R, se concluye que estos residuos son cruciales en la actividad tóxica de Cry11Bb y que por lo descrito en otras toxinas Cry1, estos residuos son conservados produciendo los mismos efectos aún en distintos insectos blanco.

5. Este estudio presenta información relevante que aporta nuevo conocimiento frente al estudio de las proteínas Cry11 y la función asociada entre los dominios y la toxicidad para *A. aegypti*. El contar con la librería supone un potencial científico-tecnológico que a futuro permitirá el desarrollo de proteínas variantes, con toxicidad elevada, efectivas en el control de vectores.

9. RECOMENDACIONES

1. En este estudio las variantes 8 y 79 revisten de gran de importancia por sus características tóxicas y las distintas mutaciones que presentan. Ambas son candidatas para pruebas más específicas como dicroísmo molecular, *docking* molecular, estudio de cristalografía de rayos X, dicroísmo molecular y micrografía electrónica. Estos ensayos podrían arrojar indicios más claros sobre la conformación espacial y actividad tóxica de las variantes.
2. La realización de bioensayos con cristales solubilizados activados con tripsina, deberán llevarse a cabo para correlacionar los resultados obtenidos con CCF y solo proteínas. Esto permitirá tener una estimación del potencial de estos cristales sin demás factores de virulencia
3. El mismo grupo de variantes ensayadas en este proyecto de investigación podrían ser evaluadas frente a larvas de mosquitos como *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles albimanus* que por referencia de otros estudios, se sabe que son insectos blancos del grupo de Cry11. Esto podría dar más indicios sobre la especificidad de estas variantes en distintos insectos blanco.

10. DIVULGACIONES

1. Poster: "Rational and non-rational designing of cry muteins from *Bacillus thuringiensis* to control dengue". II congreso internacional de Biotecnología y Biodiversidad- Centro de investigaciones biotecnológicas del Ecuador, Junio 2014.-meciion, premio mejor poster en la sección de Agrobiotecnología. Autores: Suarez, Miguel Orlando¹. Morales, Gloria Marcela¹. Estupiñan, Juan David¹. Orduz, Sergio². Flórez, Álvaro Mauricio^{1*}. Afiliación: 1. Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, Instituto MASIRA, Facultad de Salud, Universidad de Santander, UDES, Bucaramanga, Santander, Colombia. 2. Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Medellín, Colombia.
2. Poster: "Formation of secondary structures of *cry11* genes from *Bacillus thuringiensis* in DNA shuffling conditions: an experimental and computational approach". VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015, Barcelona (Spain), 28-30 October 2015. Autores: Efraín Hernando Pinzón Reyes^{1, 2}; Miguel Orlando Suarez Barrera^{1, 3}; Karen Lizeth Rivera Rivera²; Daniel Alfonso Sierra Bueno¹; Sergio Orduz Peralta ⁴; Álvaro Mauricio Flórez Escobar ^{1*} (corresponding author) Afiliación: ¹ Department of physical-mechanical science, Electrical electronics and telecommunications engineering, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia,² Department of Health, Medicine, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Universidad de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia³ Department of Health, Bacteriology Faculty, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia⁴ Department of Ecology and Systematic of Insects; Universidad Nacional de Colombia Sede Medellin.* amflores@udes.edu.co

BIBLIOGRAFIA

Abdullah, M. A., O. Alzate, M. Mohammad, R. J. McNall, M. J. Adang and D. H. Dean (2003). "Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering." Appl Environ Microbiol**69**(9): 5343-5353.

Abdullah, M. A. and D. H. Dean (2004). "Enhancement of Cry19Aa mosquitocidal activity against *Aedes aegypti* by mutations in the putative loop regions of domain II." Appl Environ Microbiol**70**(6): 3769-3771.

Abdullah, M. A., S. Moussa, M. D. Taylor and M. J. Adang (2009). "*Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) cadherin fragments function as synergists for Cry1A and Cry1C *Bacillus thuringiensis* toxins against noctuid moths *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*." Pest Manag Sci**65**(10): 1097-1103.

Adang, M. J., M. J. Staver, T. A. Rocheleau, J. Leighton, R. F. Barker and D. V. Thompson (1985). "Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*." Gene**36**(3): 289-300.

Alfaro-Toloza, P., D. E. Clouet-Huerta and A. J. Rodriguez-Morales (2015). "Chikungunya, the emerging migratory rheumatism." Lancet Infect Dis**15**(5): 510-512.

Alzate, O., C. F. Hemann, C. Osorio, R. Hille and D. H. Dean (2009). "Ser170 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin becomes anchored in a hydrophobic moiety upon insertion of this protein into *Manduca sexta* brush border membranes." BMC Biochem**10**: 25.

Alzate, O., C. Osorio, A. M. Florez and D. H. Dean (2010). "Participation of valine 171 in alpha-Helix 5 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in translocation of toxin into *Lymantria dispar* midgut membranes." Appl Environ Microbiol**76**(23): 7878-7880.

BA., F., P. H-W. and B. DK (2010). "Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control." Open Toxinol**3**: 83–100.

Berbert-Molina, M. A., A. M. Prata, L. G. Pessanha and M. M. Silveira (2008). "Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* growth on high glucose concentrations." J Ind Microbiol Biotechnol**35**(11): 1397-1404.

Boonserm, P., P. Davis, D. J. Ellar and J. Li (2005). "Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications." J Mol Biol**348**(2): 363-382.

Brar, S. K., M. Verma, R. D. Tyagi, J. R. Valero and R. Y. Surampalli (2009). "Concurrent degradation of dimethyl phthalate (DMP) during production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides." J Hazard Mater**171**(1-3): 1016-1023.

Bravo, A., S. S. Gill and M. Soberon (2007). "Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control." Toxicon**49**(4): 423-435.

Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S. S. Gill and M. Soberon (2011). "*Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide." Insect Biochem Mol Biol**41**(7): 423-431.

Campanella, J., L. Bitincka and J. Smalley (2003). "MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences." BMC Bioinformatics**4**(1): 1-4.

Cao, G., L. Zhang, G. Liang, X. Li and K. Wu (2013). "Involvement of nonbinding site proteinases in the development of resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac." J Econ Entomol**106**(6): 2514-2521.

Carroll, J., D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie and D. J. Ellar (1997). "Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity." J Invertebr Pathol**70**(1): 41-49.

Carvalho, D. O., A. L. Costa-da-Silva, R. S. Lees and M. L. Capurro (2014). "Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases." Acta Trop**132 Suppl**: S170-177.

Carvalho, V. F., A. M. Vacari, A. F. Pomari, C. P. De Bortoli, D. G. Ramalho and S. A. De Bortoli (2012). "Interaction between the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) and the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*." Environ Entomol**41**(6): 1454-1461.

Craveiro, K. I., J. E. Gomes Junior, M. C. Silva, L. L. Macedo, W. A. Lucena, M. S. Silva, J. D. de Souza Junior, G. R. Oliveira, M. T. de Magalhaes, A. D. Santiago and M. F. Grossi-de-Sa (2010). "Variant Cry1Ia toxins generated by *DNA shuffling* are active against sugarcane giant borer." J Biotechnol**145**(3): 215-221.

Crickmore, N., J. Baum, A. Bravo, D. Lereclus, K. Narva, K. Sampson and E. Schnepf. (2016). "*Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Available online." 2016, from <http://www.btnomenclature.info/>

Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean (1998). "Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins." Microbiol Mol Biol Rev**62**(3): 807-813.

de Maagd, R. A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore and H. E. Schnepf (2003). "Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria." Annu Rev Genet**37**: 409-433.

de Maagd, R. A., A. Bravo and N. Crickmore (2001). "How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world." Trends Genet**17**(4): 193-199.

de Maagd, R. A., M. S. Kwa, H. van der Klei, T. Yamamoto, B. Schipper, J. M. Vlak, W. J. Stiekema and D. Bosch (1996). "Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition." Appl Environ Microbiol**62**(5): 1537-1543.

Dean, D. H., F. Rajamohan, M. K. Lee, S. J. Wu, X. J. Chen, E. Alcantara and S. R. Hussain (1996). "Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis--a minireview." Gene**179**(1): 111-117.

Deist, B. R., M. A. Rausch, M. T. Fernandez-Luna, M. J. Adang and B. C. Bonning (2014). "Bt toxin modification for enhanced efficacy." Toxins (Basel)**6**(10): 3005-3027.

Delecluse, A., M. L. Rosso and A. Ragni (1995). "Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein." Appl Environ Microbiol**61**(12): 4230-4235.

Derbyshire, D. J., D. J. Ellar and J. Li (2001). "Crystallization of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and its complex with the receptor ligand N-acetyl-D-galactosamine." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**57**(Pt 12): 1938-1944.

Didelot, X., M. Barker, D. Falush and F. G. Priest (2009). "Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group." Syst Appl Microbiol**32**(2): 81-90.

El-Kawokgy, T. M., H. A. Hussein, N. A. Aly and S. A. Mohamed (2015). "Highly toxic and broad-spectrum insecticidal local *Bacillus* strains engineered using protoplast fusion." Can J Microbiol**61**(1): 38-47.

Endersby, N. M. and A. A. Hoffmann (2013). "Effect of *Wolbachia* on insecticide susceptibility in lines of *Aedes aegypti*." Bull Entomol Res**103**(3): 269-277.

Fernandez, L. E., C. Martinez-Anaya, E. Lira, J. Chen, A. Evans, S. Hernandez-Martinez, H. Lanz-Mendoza, A. Bravo, S. S. Gill and M. Soberon (2009). "Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*." Biochemistry**48**(37): 8899-8907.

Fernandez, L. E., C. Perez, L. Segovia, M. H. Rodriguez, S. S. Gill, A. Bravo and M. Soberon (2005). "Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop alpha-8 of domain II." FEBS Lett**579**(17): 3508-3514.

Fillinger, U. and S. W. Lindsay (2006). "Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya." Trop Med Int Health**11**(11): 1629-1642.

Florez, A. M., C. Osorio and O. Alzate (2012). "Protein engineering in Cry toxins IN: *Bacillus thuringiensis* Biotechnology." Sansinenea, Estibaliz (Ed.) Springer Verlag ISBN. 978-94-007-3020-5. : 350p.

Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J. R. Luft, W. Pangborn and L. English (2001). "Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**57**(Pt 8): 1101-1109.

Griko, N. B., L. Rose-Young, X. Zhang, L. Carpenter, M. Candas, M. A. Ibrahim, M. Junker and L. A. Bulla, Jr. (2007). "Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus*

thuringiensis to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1." Biochemistry**46**(35): 10001-10007.

Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J. L. Schwartz, R. Brousseau and M. Cygler (1995). "*Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation." J Mol Biol**254**(3): 447-464.

Guan, P., X. Dai, J. Zhu, Q. Li, S. Li, S. Wang, P. Li and A. Zheng (2014). "*Bacillus thuringiensis* subsp. sichuansis strain MC28 produces a novel crystal protein with activity against *Culex quinquefasciatus* larvae." World J Microbiol Biotechnol**30**(4): 1417-1421.

Guo, S., S. Ye, Y. Liu, L. Wei, J. Xue, H. Wu, F. Song, J. Zhang, X. Wu, D. Huang and Z. Rao (2009). "Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*." J Struct Biol**168**(2): 259-266.

Hajaij-Ellouze, M., S. Fedhila, D. Lereclus and C. Nielsen-LeRoux (2006). "The enhancin-like metalloprotease from the *Bacillus cereus* group is regulated by the pleiotropic transcriptional activator PlcR but is not essential for larvicidal activity." FEMS Microbiol Lett**260**(1): 9-16.

Hajaij, M., A. Carron, J. Deleuze, B. Gaven, M. L. Setier-Rio, G. Vigo, I. Thiery, C. Nielsen-LeRoux and C. Lagneau (2005). "Low persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis spores in four mosquito biotopes of a salt marsh in southern France." Microb Ecol**50**(4): 475-487.

Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser.**41**: 95-98.

Hayakawa, T., M. T. Howlader, M. Yamagiwa and H. Sakai (2008). "Design and construction of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry4Aa gene: hyperexpression in *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol**80**(6): 1033-1037.

Hofte, H., H. de Greve, J. Seurinck, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. Vanderbruggen, M. van Montagu, M. Zabeau and et al. (1986). "Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715." Eur J Biochem**161**(2): 273-280.

Hofte, H. and H. R. Whiteley (1989). "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*." Microbiol Rev**53**(2): 242-255.

Hua, G., Y. Park and M. J. Adang (2014). "Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*." Insect Biochem Mol Biol**45**: 11-17.

Hui, F., U. Scheib, Y. Hu, R. J. Sommer, R. V. Aroian and P. Ghosh (2012). "Structure and glycolipid binding properties of the nematocidal protein Cry5B." Biochemistry**51**(49): 9911-9921.

Jimenez-Juarez, N., C. Munoz-Garay, I. Gomez, S. S. Gill, M. Soberon and A. Bravo (2008). "The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*." Peptides**29**(2): 318-323.

Jones, D. T., W. R. Taylor and J. M. Thornton (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." Comput Appl Biosci**8**(3): 275-282.

Joseph Sambrook, D. R. (2006). "The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual." CSHL PRESS**1**: 756-760.

Jurat-Fuentes, J. L. and M. J. Adang (2006). "The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins." Biochemistry**45**(32): 9688-9695.

Khyami-Horani, H., M. Hajaj and J. F. Charles (2003). "Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *jordanica* (serotype H71), a novel serovariety isolated in Jordan." Curr Microbiol**47**(1): 26-31.

Knight, J. S., A. H. Broadwell, W. N. Grant and C. B. Shoemaker (2004). "A strategy for shuffling numerous *Bacillus thuringiensis* crystal protein domains." J Econ Entomol**97**(6): 1805-1813.

Lacey, L. A., D. Grzywacz, D. I. Shapiro-Ilan, R. Frutos, M. Brownbridge and M. S. Goettel (2015). "Insect pathogens as biological control agents: Back to the future." J Invertebr Pathol**132**: 1-41.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature**227**(5259): 680-685.

Lassner, M. and J. Bedbrook (2001). "Directed molecular evolution in plant improvement." Curr Opin Plant Biol**4**(2): 152-156.

Lecadet, M. M., E. Frachon, V. C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent and I. Thiery (1999). "Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*." J Appl Microbiol**86**(4): 660-672.

Lemeshko, V. V. and S. Orduz (2013). "Electrical hypothesis of toxicity of the Cry toxins for mosquito larvae." Biosci Rep **33**(1): 125-136.

Li, H., N. P. Chougule and B. C. Bonning (2011). "Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris)." J Invertebr Pathol**107**(1): 69-78.

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

Li, M. S., J. Y. Choi, J. Y. Roh, H. J. Shim, J. N. Kang, Y. S. Kim, Y. Wang, Z. N. Yu, B. R. Jin and Y. H. Je (2007). "Identification and molecular characterization of novel cry1-type toxin genes from *Bacillus thuringiensis* K1 isolated in Korea." J Microbiol Biotechnol**17**(1): 15-20.

Likitvivatanavong, S., K. G. Aimanova and S. S. Gill (2009). "Loop residues of the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin are important for mosquitocidal activity." FEBS Lett**583**(12): 2021-2030.

Likitvivatanavong, S., J. Chen, A. Bravo, M. Soberon and S. S. Gill (2011). "Cadherin, alkaline phosphatase, and aminopeptidase N as receptors of Cry11Ba toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Aedes aegypti*." Appl Environ Microbiol**77**(1): 24-31.

Liu, Y. L., Q. Y. Wang, F. X. Wang, X. Z. Ding and L. Q. Xia (2010). "Residue 544 in domain III of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin is involved in protein structure stability." Protein J**29**(6): 440-444.

Lucena, W. A., P. B. Pelegrini, D. Martins-de-Sa, F. C. Fonseca, J. E. Gomes, Jr., L. L. de Macedo, M. C. da Silva, R. S. Oliveira and M. F. Grossi-de-Sa (2014). "Molecular approaches to improve the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins." Toxins (Basel)**6**(8): 2393-2423.

Madden, T. L., R. L. Tatusov and J. Zhang (1996). "Applications of network BLAST server." Methods Enzymol**266**: 131-141.

Mandal, C. C., S. Gayen, A. Basu, K. S. Ghosh, S. Dasgupta, M. K. Maiti and S. K. Sen (2007). "Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects." Protein Eng Des Sel**20**(12): 599-606.

Martin, P. A., D. E. Gundersen-Rindal and M. B. Blackburn (2010). "Distribution of phenotypes among *Bacillus thuringiensis* strains." Syst Appl Microbiol**33**(4): 204-208.

McNeil, B. C. and D. H. Dean (2011). "*Bacillus thuringiensis* Cry2Ab is active on *Anopheles* mosquitoes: single D block exchanges reveal critical residues involved in activity." FEMS Microbiol Lett**325**(1): 16-21.

Melo, A. L., V. T. Soccol and C. R. Soccol (2016). "*Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review." Crit Rev Biotechnol**36**(2): 317-326.

Moonsom, S., U. Chaisri, W. Kasinrerak and C. Angsuthanasombat (2007). "Binding characteristics to mosquito-larval midgut proteins of the cloned domain II-III fragment from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin." J Biochem Mol Biol**40**(5): 783-790.

Morales, G. M. (2010). ANALISIS in silico Y EXPERIMENTAL DE GENES cry11 DE *Bacillus thuringiensis* OBTENIDOS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA, Universidad de Antioquia.

Morse, R. J., T. Yamamoto and R. M. Stroud (2001). "Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope." Structure**9**(5): 409-417.

Nair, M. S. and D. H. Dean (2015). "Composition of the Putative Prepore Complex of Cry1Ab Toxin." Adv Biol Chem**5**: 179-188.

Nair, M. S., X. S. Liu and D. H. Dean (2008). "Membrane insertion of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin: single mutation in domain II block partitioning of the toxin into the brush border membrane." Biochemistry**47**(21): 5814-5822.

Orduz, S., M. Realpe, R. Arango, L. A. Murillo and A. Delecluse (1998). "Sequence of the cry11Bb11 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin and toxicity analysis of its encoded protein." Biochim Biophys Acta**1388**(1): 267-272.

Pacheco, S., I. Gomez, I. Arenas, G. Saab-Rincon, C. Rodriguez-Almazan, S. S. Gill, A. Bravo and M. Soberon (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." J Biol Chem**284**(47): 32750-32757.

Pang, Y., R. Frutos and B. A. Federici (1992). "Synthesis and toxicity of full-length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells using a baculovirus vector." J Gen Virol**73 (Pt 1)**: 89-101.

Pao-intara, M., C. Angsuthanasombat and S. Panyim (1988). "The mosquito larvicidal activity of 130 kDa delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* resides in the 72 kDa amino-terminal fragment." Biochem Biophys Res Commun**153**(1): 294-300.

Pardo-Lopez, L., C. Munoz-Garay, H. Porta, C. Rodriguez-Almazan, M. Soberon and A. Bravo (2009). "Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*." Peptides**30**(3): 589-595.

Pardo-Lopez, L., M. Soberon and A. Bravo (2013). "*Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection." FEMS Microbiol Rev**37**(1): 3-22.

Park, H. W., B. C. Pino, S. Kozervanich-Chong, E. A. Hafkenscheid, R. M. Oliverio, B. A. Federici and D. K. Bideshi (2013). "Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis enhances mosquitocidal activity of *B. thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 against *Aedes aegypti* but not *Culex quinquefasciatus*." J Microbiol Biotechnol**23**(1): 88-91.

Piggot, P. J. and D. W. Hilbert (2004). "Sporulation of *Bacillus subtilis*." Curr Opin Microbiol**7**(6): 579-586.

Pigott, C. R. and D. J. Ellar (2007). "Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity." Microbiol Mol Biol Rev**71**(2): 255-281.

Rajamohan, F., O. Alzate, J. A. Cotrill, A. Curtiss and D. H. Dean (1996). "Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae." Proc Natl Acad Sci U S A**93**(25): 14338-14343.

Roh, J. Y., J. Y. Choi, M. S. Li, B. R. Jin and Y. H. Je (2007). "*Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control." J Microbiol Biotechnol**17**(4): 547-559.

Rosso, M. L. and A. Delecluse (1997). "Contribution of the 65-kilodalton protein encoded by the cloned gene cry19A to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*." Appl Environ Microbiol**63**(11): 4449-4455.

Rubio-Infante, N. and L. Moreno-Fierros (2015). "An overview of the safety and biological effects of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in mammals." J Appl Toxicol.

Ruiz, L. M., C. Segura, J. Trujillo and S. Orduz (2004). "In vivo binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae)." Mem Inst Oswaldo Cruz**99**(1): 73-79.

Sanahuja, G., R. Banakar, R. M. Twyman, T. Capell and P. Christou (2011). "*Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications." Plant Biotechnol J**9**(3): 283-300.

Schilling, S., P. Emmerich, S. Gunther and J. Schmidt-Chanasit (2009). "Dengue and Chikungunya virus co-infection in a German traveller." J Clin Virol**45**(2): 163-164.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." Microbiol Mol Biol Rev**62**(3): 775-806.

Schnepf, H. E. and H. R. Whiteley (1985). "Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene." J Biol Chem**260**(10): 6273-6280.

Shan, S., Y. Zhang, X. Ding, S. Hu, Y. Sun, Z. Yu, S. Liu, Z. Zhu and L. Xia (2011). "A Cry1Ac toxin variant generated by directed evolution has enhanced toxicity against Lepidopteran insects." Curr Microbiol**62**(2): 358-365.

Shu, C., R. Liu, R. Wang, J. Zhang, S. Feng, D. Huang and F. Song (2007). "Improving toxicity of *Bacillus thuringiensis* strain contains the cry8Ca gene specific to *Anomala corpulenta* larvae." Curr Microbiol**55**(6): 492-496.

Soberon, M., L. Pardo-Lopez, I. Lopez, I. Gomez, B. E. Tabashnik and A. Bravo (2007). "Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance." Science**318**(5856): 1640-1642.

Soberon, M., L. Pardo, C. Munoz-Garay, J. Sanchez, I. Gomez, H. Porta and A. Bravo (2010). "Pore formation by Cry toxins." Adv Exp Med Biol**677**: 127-142.

Stemmer, W. P. (1994). "Rapid evolution of a protein in vitro by *DNA shuffling*." Nature**370**(6488): 389-391.

Sun, Y., Q. Zhao, D. Zheng, X. Ding, J. Wang, Q. Hu, Z. Yuan, H. W. Park and L. Xia (2014). "Construction and characterization of the interdomain chimeras using Cry11Aa and Cry11Ba from *Bacillus thuringiensis* and identification of a possible novel toxic chimera." Biotechnol Lett**36**(1): 105-111.

Tabashnik, B. E., F. Huang, M. N. Ghimire, B. R. Leonard, B. D. Siegfried, M. Rangasamy, Y. Yang, Y. Wu, L. J. Gahan, D. G. Heckel, A. Bravo and M. Soberon (2011). "Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance." Nat Biotechnol**29**(12): 1128-1131.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0." Mol Biol Evol**30**(12): 2725-2729.

Team, R. C. (2013). "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing." from <http://www.R-project.org/>.

van Frankenhuyzen, K. (2009). "Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins." J Invertebr Pathol 101(1): 1-16.

Ventura, C. V., M. Maia, V. Bravo-Filho, A. L. Gois and R. Belfort, Jr. (2016). "Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly." Lancet.

Villamil-Gomez, W. E., O. Gonzalez-Camargo, J. Rodriguez-Ayubi, D. Zapata-Serpa and A. J. Rodriguez-Morales (2016). "Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia." J Infect Public Health.

Walters, F. S., C. M. deFontes, H. Hart, G. W. Warren and J. S. Chen (2010). "Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein." Appl Environ Microbiol**76**(10): 3082-3088.

Wilder-Smith, A. and D. J. Gubler (2015). "PUBLIC HEALTH. Dengue vaccines at a crossroad." Science**350**(6261): 626-627.

Wirth, M. C., W. E. Walton and B. A. Federici (2015). "Evolution of Resistance in *Culex quinquefasciatus* (Say) Selected With a Recombinant *Bacillus thuringiensis* Strain-Producing Cyt1Aa and Cry11Ba, and the Binary Toxin, Bin, From *Lysinibacillus sphaericus*." J Med Entomol**52**(5): 1028-1035.

Wu, D. and A. I. Aronson (1992). "Localized mutagenesis defines regions of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin involved in toxicity and specificity." J Biol Chem**267**(4): 2311-2317.

Wu, S. J., C. N. Koller, D. L. Miller, L. S. Bauer and D. H. Dean (2000). "Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop." FEBS Lett**473**(2): 227-232.

Xu, C., B. C. Wang, Z. Yu and M. Sun (2014). "Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins." Toxins (Basel)**6**(9): 2732-2770.

Yamagiwa, M., K. Sakagawa and H. Sakai (2004). "Functional analysis of two processed fragments of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin." Biosci Biotechnol Biochem**68**(3): 523-528.

Zenas, G. and N. Crickmore (2012). "*Bacillus thuringiensis* Applications in Agriculture." Springer Netherlands: pp 19-39.

Zhang, C., L. Xia, X. Ding, F. Huang, H. Li, Y. Sun and J. Yin (2011). "Influence of mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin on larvicidal activity." Curr Microbiol**62**(3): 968-973.

Zhang, R., C. M. Zhao, Z. N. Yu and M. Sun (2005). "[Co-expression of crystal protein gene cry26Aa and cry28Aa has an ability to form parasporal crystal inside exosporium in *Bacillus thuringiensis* subsp. *finitimus*]." Wei Sheng Wu Xue Bao**45**(6): 955-958.

Zhang, X., M. Candas, N. B. Griko, R. Taussig and L. A. Bulla, Jr. (2006). "A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*." Proc Natl Acad Sci U S A**103**(26): 9897-9902.

Zhao, C., C. Song, Y. Luo, Z. Yu and M. Sun (2008). "L-2,3-diaminopropionate: one of the building blocks for the biosynthesis of Zwittermicin A in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain YBT-1520." FEBS Lett**582**(20): 3125-3131.

Zhuang, M., D. I. Oltean, I. Gomez, A. K. Pullikuth, M. Soberon, A. Bravo and S. S. Gill (2002). "*Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation." J Biol Chem**277**(16): 13863-13872.

ANEXOS

Anexo A: Datos del conteo de larvas vivas, dos replicas, para el cálculo de la Concentración letal media de las variantes evaluadas.

Tabla 15. Conteo de larvas vivas, de las dos replicas llevadas a cabo para calcular la concentración letal media (CL₅₀). A. primera replica B. segunda replica

A. Replica 1

		NUMERO DE LARVAS VIVAS																					
		CONCENTRACIÓN PROTEÍNA Ug/ml																					
		0,125	0,25	0,3	0,35	0,5	0,75	0,85	1	1,25	1,5	1,75	2	2,5	3	5	7	10	13	15	17	20	
VARIANTE	1	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,4-2,4-4,4)	(5,3-4,3-3,4)	(3,3-2,3-2,2)	(2,2-3,1-3,3)	(2,1-2,2-2,1)	(0,2-0,1-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	
	8	(5,5-5,5-5,5)	(5,4-4,4-3,4)	(4,4-3,3-4,3)	(3,3-2,1-2,3)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)
	23	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,3-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-4,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,4-4,3-5,5)	(4,4-4,4-4,2)	(3,5-3,3-4,1)	(2,2-4,3-2,2)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)
	56																						
	79	(4,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,4)	(5,4-4,1-5,5)	(3,3-2,2-3,1)	(3,3-4,3-1,3)	(2,3-2,1-2,4)	(2,3-2,2-3,0)	(1,2-3,1-3,3)	(3,1-0,0-1,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)
	81	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-4,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,3)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,4-4,5-4,4)	(2,3-3,3-4,3)	(2,3-3,5-3,2)	(0,0-0,0-0,0)
	A92D	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-4,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,3-4,4-3,4)	(5,3-3,3-2,4)	(2,3-3,1-3,1)	(0,0-0,0-0,0)
	C157R																						
	Aa	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,3-5,5-5,4)	(5,3-5,4-3,4)	(1,2-1,3-2,2)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)
	Bb	(5,5-4,4-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-4,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,4-4,5-3,5)	(3,4-3,3-1,3)	(1,2-2,2-2,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)
	C. NEGATIVO	(4,5-5,5-5,4)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)

B. Replica 2

		NUMERO DE LARVAS VIVAS																							
CONCENTRACIÓN PROTEÍNA Ug/m		0,125	0,25	0,3	0,35	0,5	0,75	0,85	1	1,25	1,5	1,75	2	2,5	3	5	7	10	13	15	17	20			
VARIANTES	1	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,4-5,5-5,4)	(5,3-4,3-3,4)	(3,3-2,3-2,2)	(2,2-3,2-3,3)	(2,1-2,2-2,1)	(0,2-0,1-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)		
	8	(5,5-5,5-5,5)	(5,4-4,4-3,4)	(3,4-3,3-3,3)	(3,3-3,2-2,3)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	
	23	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,4-4,3-5,5)	(4,4-4,4-4,2)	(3,4-3,3-3,1)	(2,2-4,3-1,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	
	56																								
	79	(4,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,5-3,4-5,5)	(3,3-2,2-3,1)	(3,3-4,3-1,3)	(2,3-2,1-2,3)	(2,2-2,2-2,1)	(1,0-3,2-2,3)	(2,1-1,0-1,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	
	81	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,3)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,4-4,4-4,4)	(3,2-3,3-3,5)	(3,2-3,3-3,4)	(0,0-0,0-0,0)	
	A92D	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-4,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,3-4,4-4,4)	(3,5-3,3-2,4)	(2,3-3,1-3,1)	(0,0-0,0-0,0)	
	C157R																								
	Aa	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(3,5-5,4-5,5)	(5,3-5,4-3,4)	(2,1-2,2-2,2)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	
	Bb	(5,5-4,4-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-4,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(4,4-5,5-3,5)	(3,4-3,3-1,3)	(1,2-2,2-2,1)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	(0,0-0,0-0,0)	
	C. NEGATIVO	(5,5-4,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-4,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,4-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,5)	(5,5-5,5-5,3)