



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Departamento de Biología Celular

**DISEÑO DE UNA PRUEBA QUE PERMITA DETECTAR LA PRESENCIA
DE δ -ENDOTOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VARIEDAD
KURSTAKI EN UN MEDIO DE CULTIVO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Marubetsy Alcina Jaimes como requisito
parcial para optar al título de Licenciado en
Biología


Tutoras: Lic. Roxana Gajardo
Dra. Mariana Eleizalde

CARACAS VENEZUELA
MAYO 2016

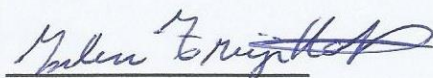
DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA Br. MARUBETSY CAROLINA ALCINA JAIMES.

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Marubetsy Carolina Alcina Jaimes, C.I. 21013349, titulado “**Diseño de una prueba que permita detectar la presencia de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurtaki* en un medio de cultivo**”, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.


Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Carcas, a los 24 días del mes de Mayo de 2016, dejando constar que la Prof. Roxana Gajardo actuó como coordinadora del jurado evaluador.



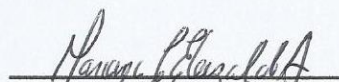
Prof. Carolina Pérez



Prof. Iselen Trujillo



Prof. Roxana Gajardo
(Tutora)



Prof. Mariana Eleizalde
(Tutora)

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional en todo momento, siempre impulsándome a ser mejor persona y respetando cada una de las decisiones que he tomado respecto a mi vida y mi carrera; por ser grandes ejemplos a seguir para mí y para mis hermanos; por enseñarme cuáles son las cosas realmente importantes en la vida, y a luchar por cada meta o sueño que deseo realizar. Son una bendición y soy muy afortunada de tenerlos. Este logro es para ustedes, los quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar les quiero agradecer a mis padres, quienes con su esfuerzo, amor y apoyo, me han hecho la persona que soy hoy en día y sin ustedes, no hubiese podido alcanzar este logro. Para mí son una constante fuente de inspiración y dedicación, muchas gracias por todo, los amo.

A las mejores tutoras:

La profesora Roxana Gajardo, por darme la oportunidad de trabajar a su lado, regalarme sus conocimientos y guiarme durante el desarrollo de este trabajo. Además, de ser un ejemplo de mujer, madre y profesional.

La Dra. Mariana Eleizalde, en quien encontré una amiga y desde el primer día me otorgó su confianza, apoyo y dedicación, permitiéndome desarrollarme en el mundo de la investigación durante la realización de este trabajo.

Ambas son profesoras y biólogas admirables, con las que estaré siempre agradecida. Ellas demuestran que a pesar de las adversidades del país, aún existen Venezolanos trabajando muy duro por sacar nuestro país adelante. Las quiero mucho.

A todo el personal de Laboratorio de Procesos Fermentativos (IBE-UCV), a Prof. Blas Dorta, la Srta. Dayanara Navas y particularmente a mis amigas Isamar Guevara e Irene Alvarado.

Al instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos de la UNESR. A todos en el Grupo de Inmunobiología del Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios del al Dr. Armando Reyna, la Dra. Marta Mendoza, el Dr. Alpidio Boada, el Lic. Jose Ruben Ramírez, la Lic. Laura Hernández y especialmente a la Dra. Lucinda Tavares por su apoyo en el área de Bioquímica.

A la Facultad de Ciencias de Universidad Central de Venezuela y todos sus profesores fundamentalmente la Dra. Cristina Sanoja, quien desde el comienzo de mi carrera me apoyo y ayudo a cumplir mis metas académicas.

A mis amigos que desde el primer semestre nos enamoramos de la ciencia, Sarah Dresden, Génesis Falcón y en especial a David Hernández, quien me ofreció su apoyo y amor, que siempre encontró la manera de hacerme feliz en cualquier momento.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
1.2. Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
1.3. Cristales parasporales: δ - endotoxinas	7
1.4. Mecanismo de acción de los cristales entomopatógenos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
1.5. Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	17
1.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	19
2. ANTECEDENTES	21
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Materiales:	30
5.1.1 Material Biológico	30

5.1.2 Medios de Cultivo.....	30
5.2 Métodos.....	32
5.2.1 Preparación de los inóculos.....	32
5.2.2 Preparación del cultivo por lote de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> para la obtención del complejo espora cristal	32
5.2.3 Obtención del complejo espora cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	33
5.2.4 Purificación de los cristales parasporales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	33
5.2.5 Preparación de las muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	34
5.2.6 Determinación cualitativa de la pureza de los cristales a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	35
5.2.7 Separación de las proteínas presentes en el complejo espora cristal a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)..	37
5.2.8 Electroelución de Proteína Cry1Aa.....	37
5.2.9 Determinación de la concentración de proteínas mediante el método del Ácido Bicinconínico.....	38
5.2.10 Cálculo del rendimiento de la proteína de interés para cada método de purificación.....	39
5.2.11 Preparación del Inmunógeno.....	39
5.2.12 Inmunización.....	40
5.2.13 Evaluación del reconocimiento de la de la proteína Cry1Aa de <i>Btk</i> purificadas a través de una electroelución mediante la técnica de Dot Blot.	41
5.2.14 Evaluación de la cinética de anticuerpos a través de ensayo por inmunoadsorción indirecto ligado a enzimas (ELISAI).....	42
5.2.15 Estandarización de la técnica de Western blot para la detección de Cry1Aa	46

5.2.16	Detección de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	49
5.2.17	Cinética de cristales de <i>Btk</i> en medio A80 a través de Dot blot .	49
5.2.18	Cinética de cristales de <i>Btk</i> en medio A80 a través de Western blot	49
6.	RESULTADOS.....	51
6.1	Titulación del cultivo de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> utilizado para la obtención de la proteína Cry1A.....	51
6.2	Purificación de proteínas Cry1A de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> . 53	
6.3	Evaluación del reconocimiento de la proteína Cry1Aa electroeluída mediante la técnica de Dot Blot.	56
6.4	Estandarización de las condiciones de ELISAi.....	57
6.5	Evaluación de la cinética de anticuerpos a través de ensayo por inmunoadsorción indirecto ligado a enzimas (ELISAi).....	59
6.6	Estandarización de la técnica de Western blot para la detección de Cry1Aa. 60	
6.7	Detección de la proteína Cry1Aa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> en un medio de cultivo mediante la técnica de Western blot.	61
6.8	Evaluación de la cinética de síntesis de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> en medio A80 a través de la técnica de Dot blot.....	63
6.9	Evaluación de la cinética de síntesis de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> en medio A80 a través de la técnica de Western blot 64	
7.	DISCUSIÓN	66
8.	CONCLUSIONES.....	81
9.	RECOMENDACIONES.....	83
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio Luria-Bertani.	31
Tabla 2. Composición del medio A80.	31
Tabla 3. Composición del amortiguador de muestra 2X	34
Tabla 4. Composición del gel de separación 10% y del gel de concentración 5%.	36
Tabla 5. Composición del amortiguador de corrida Tris-Glicina	36
Tabla 6. Composición de la solución para tinción de proteínas del gel	36
Tabla 7. Amortiguador para electroelución de proteínas de un gel SDS-PAGE	38
Tabla 8. Componentes del amortiguador fosfato alcalino TBS	41
Tabla 9. Componentes del amortiguador carbono-bicarbonato	42
Tabla 10. Componentes del amortiguador fosfato alcalino PBS	43
Tabla 11. Componentes del sustrato 3'3 5-bis tetrametilbenzidina TMB	43
Tabla 12. Componentes del amortiguador de transferencia pH 8,9	47
Tabla 13. Componentes de la solución reveladora	48
Tabla 14. Títulos del cultivo en lote de <i>Bt</i> hasta las 72 h	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía en contraste de fases de un cultivo en fase esporulativa de <i>Bt</i> .	4
Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
Figura 3. Esquema de la esporulación en <i>Bt</i>	6
Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión de <i>Btk</i>	8
Figura 5. Árbol filogenético que representa los tres dominios de la familia de proteínas Cry	10
Figura 6. Estructura tridimensional de la toxina Cry1Aa	12
Figura 7. Dominios conservados de algunas proteínas Cry	14
Figura 8. Modo de acción de <i>Bt</i> en una larva de Lepidoptero.	15
Figura 9. Esquema de la formación del poro por las δ -endotoxinas del cristal	16
Figura 10. Cristales parasporales de <i>Btk</i>	20
Figura 11. Esquema de la placa utilizada para estandarizar condiciones de ELISAi	44
Figura 12. Esquema de la placa utilizada para realizar la cinética de anticuerpos. ...	46
Figura 13. Esquema de los parámetros utilizados para realizar el Western Blot.....	48
Figura 14. Cinética de un cultivo de <i>Btk</i> en medio A80.	52
Figura 15. Cristales purificados de <i>Btk</i>	53

Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras purificadas por el método de Mounsef	54
Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE de la proteína Cry1Aa electroeluida.....	55
Figura 18. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-Cry1Aa mediante Dot Blot	56
Figura 19. Estandarización de las condiciones del ELISAi.	57
Figura 20. Diferencias de D.O. obtenidas en la estandarización de las condiciones del ELISAi.	58
Figura 21. Cinética de anticuerpos contra Cry1Aa.....	59
Figura 22. Estandarización de la técnica de Western blot para la detección de Cry1Aa.	60
Figura 23. Detección de la proteína Cry1Aa mediante Western blot a partir de un medio de cultivo.....	62
Figura 24. Evaluación de la cinética de síntesis de cristales en medio A80 a través de un Dot blot.	63
Figura 25. Evaluación de la cinética de síntesis de cristales en medio A80 a través de la técnica de Western blot.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Bt *Bacillus thuringiensis*.

Btk *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

CVCM Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.

IBE Instituto de Biología Experimental.

LB Medio Luria-Bertani.

ATP Adenosín Trifosfato

PCR Reacción en cadena de la polimerasa.

UFC Unidades Formadoras de colonias.

SDS-PAGE Electroforesis en gel de acrilamida con dodecilsulfato sódico.

BCA Acido bicinconínico

ELISA Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas.

ELISAI Ensayo por Inmunoadsorción Indirecto Ligado a Enzimas.

D.O. Densidad Óptica

TMB 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

C conjugado

S+ Suero positivo

S- Suero negativo

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (*Btk*) es el principal agente de control biológico usado a nivel mundial. Su producción como bioinsecticida, requiere de formulaciones de medios de cultivo que permitan el crecimiento de la bacteria y la obtención del producto insecticida, es decir, de la δ -endotoxina contenida en el complejo esporacristal. En Venezuela, el desarrollo de metodologías que permitan evaluar el proceso fermentativo y a su vez detectar la capacidad efectiva de *Btk* para producir cristales tóxicos ha sido limitado. Por este motivo, en este trabajo se planteó como objetivo diseñar una prueba que permita detectar la presencia de δ -endotoxinas, durante el desarrollo de un cultivo de *Btk* a través de inmunoensayos. Para ello, se procedió a purificar la proteína Cry1Aa, la cual fue empleada para la producción de un suero hiperinmune utilizando conejos como modelo experimental. La respuesta de anticuerpos en función del tiempo fue monitoreada a través de un ELISAi, y el reconocimiento de la proteína por parte del suero hiperinmune fue verificado empleando las técnicas de Western blot y Dot Blot. Finalmente, se evaluó la cinética de síntesis de la proteína Cry1Aa de *Btk* en medio A80, mediante las técnicas inmunoquímicas mencionadas, evidenciando el incremento progresivo en el reconocimiento de esta proteína hasta la fase estacionaria, lograndose de esta manera la estandarización de un método sencillo y reproducible para la detección de δ -endotoxinas.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas a los que se ven expuestos los cultivos de plantas, lo constituye la presencia y ataque de plagas de origen entomológico, las cuales representan el 15% o más del costo de montaje y mantenimiento de un determinado cultivo, causando perjuicio tanto a productores como a consumidores (Bravo y Quintero, 1993). Además, varias familias de insectos son vectores de enfermedades infecciosas, como paludismo, dengue, fiebre chikungunya, fiebre amarilla, encefalitis japonesa, leishmaniosis, enfermedad de Chagas, enfermedad de Lyme (Schmunis y Dias, 2000). Las enfermedades no contagiosas representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, y provocan cada año más de 1 millón de defunciones, la mayoría de éstas por malaria y paludismo (OMS, 2015).

Desde su descubrimiento, los insecticidas de origen químico representaron la principal alternativa para el control de numerosos insectos plagas. Sin embargo, su uso indiscriminado ha conducido a alteraciones importantes en los agroecosistemas (PAN, 2010). Ello ha despertado gran interés en los últimos años en el uso de métodos alternativos de control, destacándose entre ellos, por su efectividad e inocuidad, la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Brar, 2006).

Desde hace muchos años, *Bt* ha sido estudiado por su capacidad de producir proteínas con actividad contra insectos de diferentes órdenes. Estas proteínas se denominan Cry, existiendo varios grupos de acuerdo a su toxicidad para un

determinado hospedador (Schnepf *et al.*, 1998) Así *Bt* es el organismo más empleado en preparaciones de bioinsecticidas por su alta efectividad en controlar insectos plagas, principalmente de lepidópteros y dípteros (Rosas-García, 2008).

A menudo, los insecticidas líquidos basados en *Bt* que se aplican como spray en plantas de cultivo, deben ser ingeridos para tener efecto (Beegle y Yamamoto, 1992). Actualmente, se utilizan formulaciones de *Bt* como insecticidas específicos bajos nombres comerciales como Bioster, Dipel y Thuricide. Estos productos se han empleado en forma de spray desde 1938 en Francia y desde 1958 en los EEUU, sin que hubiera ningún efecto perjudicial aparente para el medio ambiente (UCSD, 2010). Entre las características que justifican su tan extendido uso están la ausencia de toxicidad en los seres humanos, en muchos de los enemigos naturales de diversas plagas, en otros vertebrados y en plantas cultivadas (Rosas-García, 2008). Sin embargo, no todos los informes científicos sobre la seguridad de él han sido positivos. Un estudio realizado en el 2007, financiado por la rama europea de Greenpeace, sugería que podía existir un riesgo mínimo de daño hepático en ratas (Séralini *et al.*, 2007). No obstante, este ha sido tema de debate, ya que las preparaciones de *Bt* tienen como ventaja su espectro de acción reducido, lo que indica que pueden ser altamente específicas para una plaga determinada (Bravo y Cerón, 2004).

Adicionalmente, la exposición constante a una toxina da lugar a la presión selectiva, que contribuye a que las plagas se hagan resistentes a la toxina.

Actualmente, se sabe que la población de un tipo de polillas (*Pectinophora gossypiella*) se ha vuelto resistente a toxinas de *Bt*, cuando se utiliza en la agricultura ecológica (Dhurua, 2011). Los primeros reportes de insectos lepidópteros resistentes a toxinas de *Bt* se realizaron a principios de los 90 por Laboratorios Abbott. Posterior a esto, se han descrito insectos con una alta resistencia a algunos subtipos de proteínas Cry (Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac) (Zenner y Borrero, 1993) y baja resistencia a Cry1C (Hernández - Rodríguez *et al.*, 2012). Se han propuesto varios mecanismos para explicar esta resistencia como la modificación de los receptores tipo cadherinas (Morin, 2003) y la alteración en la expresión de la aminopeptidasa (Tiewisiri, 2011).

Por otro lado, se han utilizado genes de *Bt* que codifican las toxinas insecticidas, para realizar plantas genéticamente modificadas, capaces de expresar estas proteínas entomopatógenas. En 1995, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos aprobó la plantación de patatas intervenidas genéticamente con genes de *Bt*, convirtiéndolas en el primer cultivo productor de un plaguicida en ser aprobado en los Estados Unidos. En 1996, los agricultores estadounidenses cultivaban maíz, patata y algodón transgénicos (Jian *et al.*, 2006).

1.1. Características generales de *Bacillus thuringiensis*

Bt pertenece a la familia *Bacillaceae*. Esta bacteria es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia elipsoidales

que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (figura 1). Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimiorganotrofo y con actividad de catalasa (Sneath, 1986).

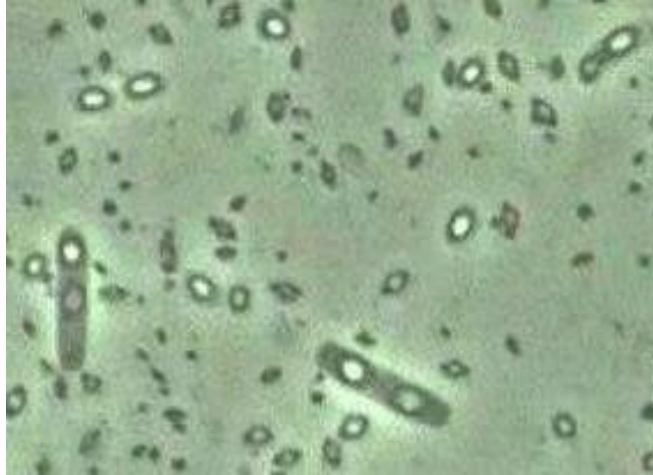


Figura 1. Micrografía de contraste de fases de un cultivo de *Bt* en fase esporulativa. Las células vegetativas contienen la endospora (brillante) y los cristales de proteína insecticida (bipirámides) (Knowles, 1994).

Bt ha sido encontrado en diversos ambientes. Se han aislado cepas de todo el mundo en varios hábitats, incluyendo suelos (Burges y Hurst, 1977), insectos, polvo almacenado en algunos productos y en hojas de plantas coníferas y caducifolias (Smith y Couche, 1991). La característica principal de *Bt* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal, formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (Schnepf *et al.* 1998). Los genes que codifican para las proteínas Cry son altamente conservados en las diferentes cepas de *Bt* (Huerta, 2013). Estos cristales son tóxicos contra las larvas de insectos del orden lepidóptera, díptera y coleóptera (Beegle y Yamamoto, 1992) y contra himenópteros, homópteros y ácaros, así como otros invertebrados (Feitelson *et al.*, 1992).

1.2. Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*

El ciclo de vida de *Bt* está caracterizado por dos etapas. La división de la célula vegetativa y el desarrollo de la espora (figura 2):

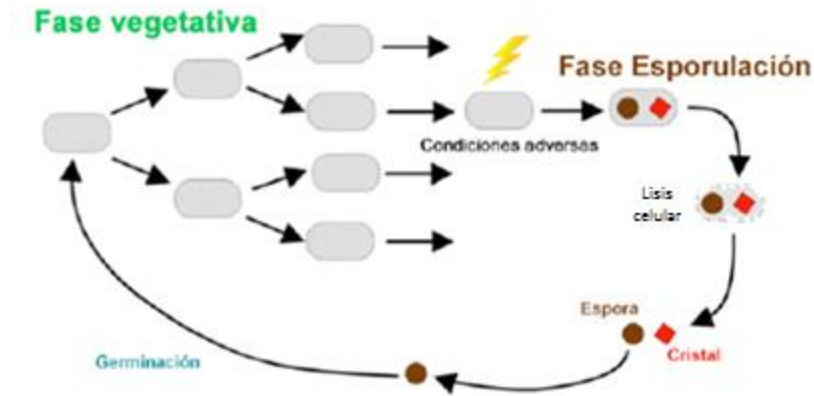


Figura 2. Diagrama del ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*. En el esquema se diferencian la fase vegetativa y fase de esporulación. ● Esporas de *Bt*. ◆ Cristales entomopatógenos. (Sánchez, 2014).

La división celular está caracterizada por la formación de un tabique, el cual divide la membrana plasmática, y por el cual comienza la separación de las células hijas (Bulla *et al.*, 1980) (figura 2).

La esporulación es inducida por el empobrecimiento de los recursos nutritivos presentes en el medio. Este proceso dura aproximadamente 12 horas e introduce una serie de cambios que culminan en la producción de dos compartimentos: el esporangio y la espora (Errington, 1993). El proceso de esporulación se puede dividir en siete etapas (figura 3).

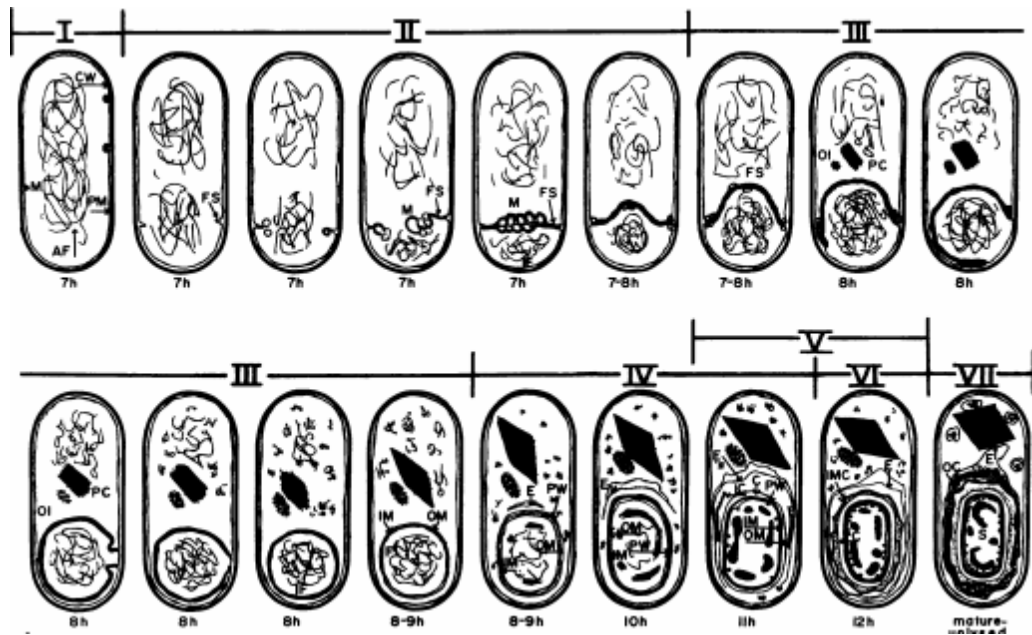


Figura 3. Esquema de la esporulación en *Bt* (I) Formación del filamento axial. (II) Formación de la preespora y el esporangio. (III) Aparición del cristal parasporal y la preespora libre. (IV) Surgimiento de la pared primordial de la célula. (V) Formación del exosporio. (VI) Maduración de la espora y el cristal. (VII) Lisis del esporangio. (Bechtel y Bulla, 1982).

En la primera etapa de la esporulación, que dura 7 horas aproximadamente, la célula deja de crecer y se forma un filamento axial de la cromatina. Luego, en la segunda etapa, que ocurre entre las horas 7 y 8, se forma un tabique que termina en la mitosis asimétrica que permitirá la formación de dos tipos de células: la preespora y el esporangio. En la tercera etapa, que transcurre entre las horas 8 y 9, aparece por primera vez un cristal parasporal, además se evidencia la preespora libre (Bulla *et al.*, 1980). La cuarta etapa está caracterizada por el surgimiento de la pared primordial de la célula y la formación del córtex entre la membrana interna y externa. En la quinta etapa se forman las capas de cubierta de la espora la cual es rodeada completamente

por el exosporio. Todas las características de resistencia físicas y químicas de la espora son debidas a estas dos capas protectoras. En la sexta etapa, la espora termina de madurar y el cristal llega a su máximo tamaño (Errington, 1993). En la etapa final, se libera la espora gracias a lisis del esporangio (Bechtel y Bulla, 1976).

Desde el instante en el que ocurre el englobamiento de la preespora hasta su maduración, tiene lugar simultáneamente la síntesis de uno o varios cristales parasporales, que pueden representar hasta un 30% del peso seco del esporangio. Estos cristales pueden presentar distintas morfologías, como bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Khetan, 2001).

1.3. Cristales parasporales: δ - endotoxinas

Las δ -endotoxinas que componen a los cristales parasporales de *Bt*, son proteínas denominadas Cry (figura 4). Estas se caracterizan por poseer actividad tóxica contra larvas de diferentes insectos. Existen reportes de que los cristales parasporales pueden ser degradados por la acción de los microorganismos del suelo y también pueden ser inactivados por la acción de la luz ultravioleta (Pusztai, 1991). Existen reportes de degradación de las proteínas por acción de la temperatura (Arrivillaga y Ochoa, 2009).

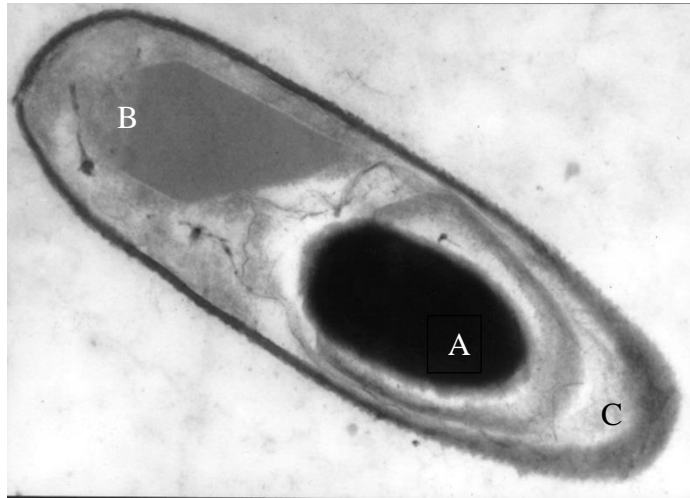


Figura 4. Micrografía electrónica de transmisión de *Btk*. A: espora. B: cristal ovoide. C: borde del esporangio (Sauka y Benintende, 2008).

El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y por lo general, fuera del exosporio de la espora, y ambos son finalmente liberados tras la lisis celular. Existen algunos casos donde se describieron cristales dentro del exosporio, por lo que éstos continúan junto a las esporas tras la lisis (López-Meza e Ibarra, 1996).

La primera clasificación de las proteínas Cry se realizó con base en la especificidad de la actividad insecticida (Hofte y Whiteley, 1989). Posteriormente, se propusieron nuevos grupos dentro de esta misma clasificación (Feitelson *et al.*, 1992). Sin embargo, esta no era la más adecuada ya que se encontraron proteínas Cry muy semejantes a otras descritas, pero con una actividad insecticida diferente. Esto proporcionó una nueva nomenclatura para las δ -endotoxinas, basada exclusivamente en la secuencia primaria (Crickmore *et al.*, 1998).

Las proteínas Cry representan una gran familia que actualmente consta de aproximadamente 300 isoformas, divididos en 75 grupos (figura 5). De estos grupos se ha reportado que las familias de proteínas Cry1 y Cry2 poseen δ -endotoxinas principalmente contra lepidópteros y en menor medida dípteros y coleópteros, siendo Cry1 el grupo más dominante con 41 holotipos representativos (Cry1Aa- Cry1Ld) (Crickmore, 2016).

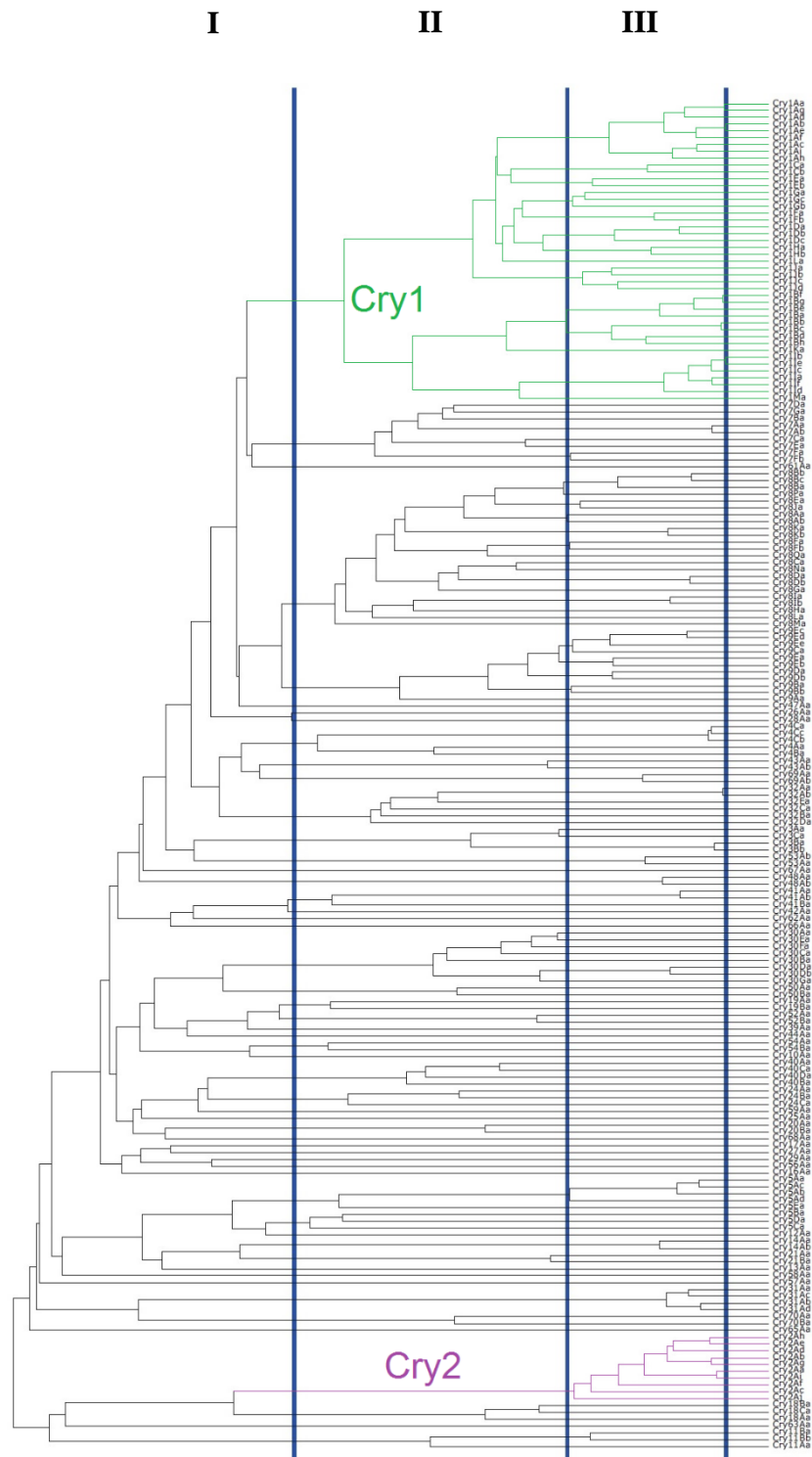


Figura 5. Árbol filogenético que representa los tres dominios de la familia de proteínas Cry <http://www.btnomenclature.com> [Consulta: 07 de marzo de 2016]

Los genes de δ -endotoxinas de *Bt* se encuentran localizados en plásmidos crípticos y conjugativos de alto peso molecular (más de 40 Kpb). La identificación de las diferentes variedades de *Bt* se realiza a través de PCR para amplificar segmentos de los diferentes genes *cry* (Carozzi *et al.*, 1991). Se ha demostrado que los distintos genes de las δ -endotoxinas, se encuentran localizados en plásmidos distintos dentro de una misma cepa (Kronstad *et al.*, 1983). Sin embargo, existen reportes en los cuales se indica que los genes de estas toxinas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano. Estos análisis se realizaron a través de dos técnicas: Southern blot y por mapeo del cromosoma, donde no existe ninguna evidencia experimental de la funcionalidad de este supuesto gen *cry* (Kolsto y Carlson, 1993).

Las toxinas Cry presentan una organización similar, compuesta de tres dominios estructuralmente conservados: Dominios I, II y III (figura 6).

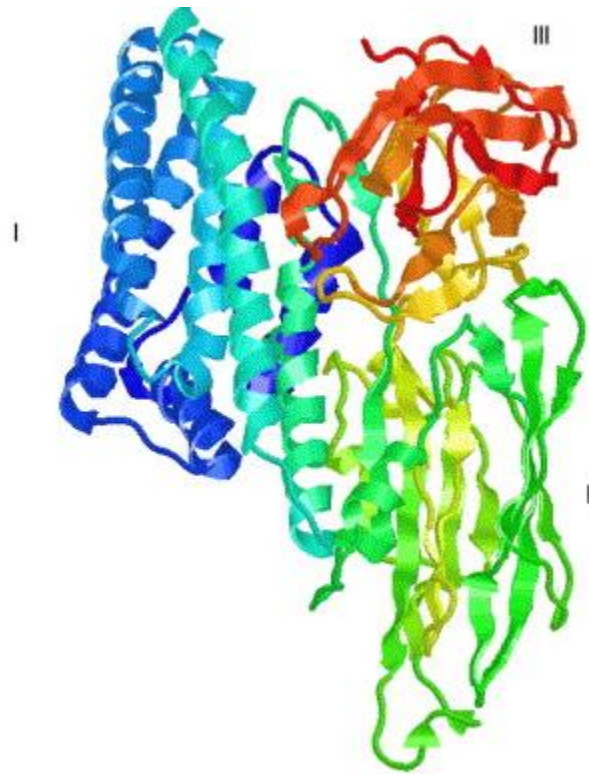


Figura 6. Estructura tridimensional de la toxina Cry1A. Dominio I en azul. Dominio II verde. Dominio III naranja. (De Maagd *et al.*, 2001)

El dominio I está conformado por siete estructuras α -hélice, donde una hélice hidrofóbica central (hélice 5) está rodeada por 6 hélices anfipáticas (Li *et al.*, 1991). Las hélices hidrofóbicas y anfipáticas del dominio I, sugieren que este dominio puede ser responsable de la formación de poros en el epitelio intestinal del organismo susceptible (Ahmad y Ellar, 1990). La formación del poro involucra movimientos intramoleculares y la inserción de una asa hidrofóbica formada por las α -hélice 4 y 5 (Schwartz *et al.*, 1997).

Al dominio II lo conforman tres láminas de estructura β -plegada en antiparalelo, con un arreglo triangular β -prima que terminan en asas (1, 2 y 3),

además de dos α -hélices cortas (7 y 8) (Schnep *et al.*, 1998). Este dominio participa en la interacción con el receptor de la membrana apical del epitelio intestinal de larvas de los insectos diana (Lee *et al.*, 1996). Ensayos con Cry1A, toxina que tiene acción sobre lepidópteros, muestran que la α -hélice 8 junto con las asas 2 y 3 están involucradas en la interacción con este receptor (Lee *et al.*, 2001).

Las toxinas con secuencias altamente similares en este dominio comparten al menos un sitio de unión en el epitelio intestinal (Hernández y Ferré, 2005). Sin embargo, recientemente se ha propuesto un modelo donde no son necesarios residuos específicos en las asas para la unión al receptor, sino que la conformación de éstas es lo que permite la unión al receptor (cadherina) (Fujii *et al.*, 2013).

El dominio III está formado por dos láminas de estructura β -plegadas formando un β -sándwich (Flores *et al.*, 1997). Este dominio es vital para la estabilidad de la proteína y su resistencia a la acción de proteasas (Li *et al.*, 1991), ya que está involucrado en el mantenimiento de la integridad estructural de la toxina ante la proteólisis en el intestino del organismo susceptible, en la unión al receptor, en la penetración de la membrana celular y en la formación de canales iónicos que generan desbalance osmótico en las células intestinales de las larvas susceptibles (Schnepf *et al.*, 1998).

Ahora bien, dentro de los tres dominios anteriormente mencionados se encuentran cinco bloques conservados en su secuencia de aminoácidos (figura 7), localizándose en las regiones centrales y de comunicación entre dominios. Su

ubicación sugiere que los miembros de la familia de proteínas Cry pudieran tener estructuras secundarias y terciarias similares, lo que conlleva a un mecanismo de acción similar. Por otro lado, de 294 proteínas Cry, únicamente 32 (11%) no poseen estos cinco bloques conservados y tienden a plegarse de manera diferente a estos tres dominios (Pardo *et al.*, 2013).

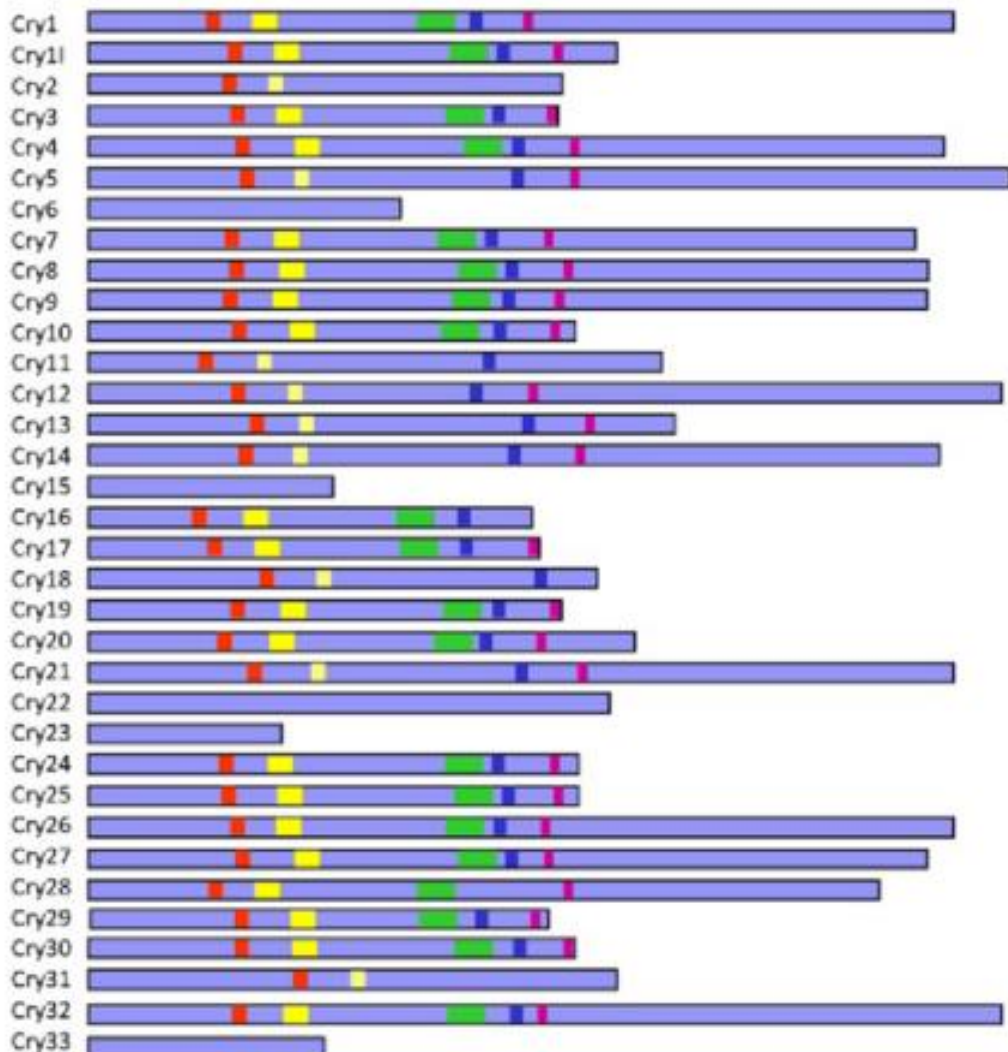


Figura 7. Representación gráfica de algunos miembros de la familia de proteínas Cry. Se simboliza la longitud de cada proteína y la presencia de los cinco bloques conservados. Bloque 1: Rojo. Bloque 2: Amarillo. Bloque 3: Verde. Bloque 4: Azul. Bloque 5: Fucsia. (Schnepf *et al.*, 1998)

1.4. Mecanismo de acción de los cristales entomopatógenos de *Bacillus thuringiensis*

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de varios pasos (figura 8).

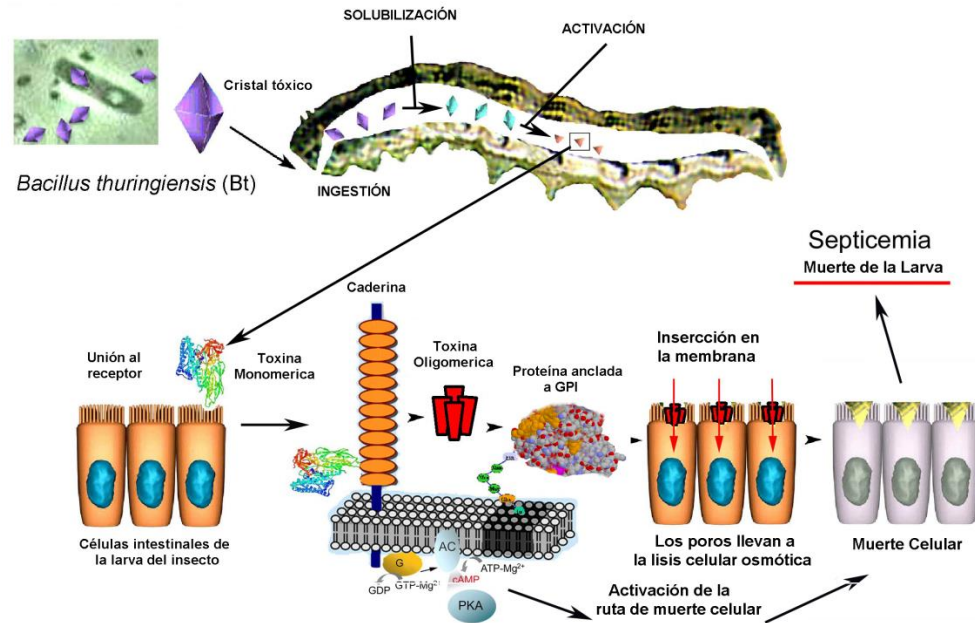


Figura 8. Modo de acción de *Bt* en una larva de Lepidóptero. Una vez ingerido el complejo espora-cristal. Las δ -endotoxinas se unen a receptores, induciendo la formación del poro que provocara la lisis celular. Esto permite el paso de material del lumen intestinal al hemocele causando la septicemia de la larva. <http://naukas.com/2014/01/10/entrega-de-toxinas-domicilio/> [Consulta: 10 de enero de 2014]

Cuando el cristal es ingerido, éste se solubiliza y procesa en el intestino de la larva. Los cristales son solubles en pH alcalino (Gringorten *et al.*, 1992), y se requiere, de un ambiente reductor, ya que los puentes disulfuro son abundantes en el extremo C-terminal de las proteínas de 140 KDa (Knowles, 1994). Estas δ -endotoxinas deben ser procesadas para ser activas. Este cambio, es generado por las

proteasas del intestino del insecto, liberando el fragmento tóxico. En las proteínas Cry1, de tamaño entre 130-140 KDa, se genera un corte en los primeros 28 residuos del extremo N-terminal y en los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, generando un fragmento resistente a proteasas entre 55 y 65 KDa (Bietlot *et al.*, 1989). Una vez que la toxina se encuentra activa, se une a receptores específicos en la cara apical de la membrana epitelial del intestino medio de la larva. Entre estos receptores se encuentran la Aminopeptidasa N (APN) (Yaoi y Dean, 1997), los receptores tipo-cadherina (Vadlamudi *et al.*, 1995) y la Fosfatasa Alcalina (ALP) (Sangdala *et al.*, 1994) (figura 9).

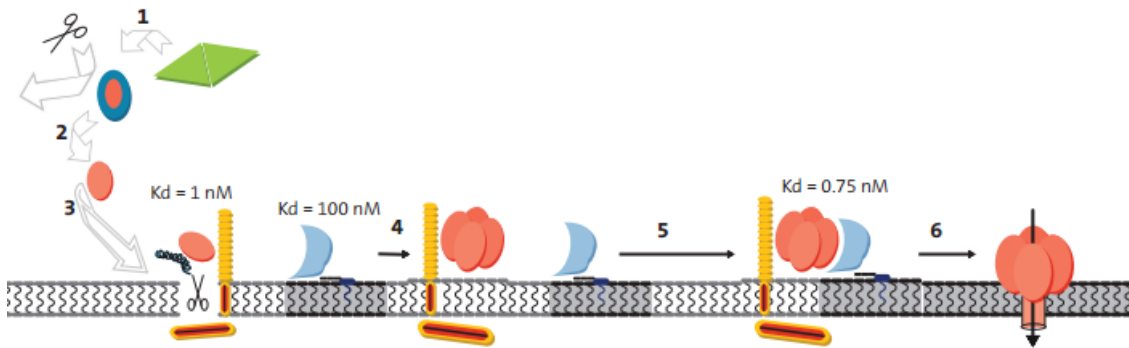


Figura 9. Esquema de la formación del poro por las δ -endotoxinas del cristal. 1: Solubilización. 2: Procesamiento. 3: Unión a receptor cadherina. 4: Formación del pre-poro 5: Unión a receptor aminopeptidasa. 6: Inserción a membrana (Soberon y Bravo, 2008).

Posteriormente se inicia una cascada de señalización dependiente de magnesio (Mg^{2+}) que sería responsable de la lisis celular. Adicionalmente, se estimula la exocitosis de receptores tipo cadherina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula, lo que aumenta el número de éstos, y como consecuencia se presenta un mayor reclutamiento de toxinas libres que amplificarían la señal inicial (Zhang *et al.*, 2008).

Una vez que ocurre la unión al receptor tipo caderina, se induce la formación de una estructura pre-poro a través de la unión de monómeros. Esta estructura tiene alta afinidad por otros receptores de la membrana, como APN o la fosfatasa alcalina (ALP) (Bravo *et al.*, 2007). Con respecto a la APN, la proteína Cry1A (var. *kurstaki*) se une a ésta a través del dominio III de la proteína. Este receptor, al igual que ALP, se encuentra anclados a la membrana por glicosilfosfatidil inositol (GPI). La unión de la toxina oligomérica a ese segundo receptor, facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio de la larva del insecto (Pardo *et al.*, 2013).

Los poros formados alteran el equilibrio de electrolitos y agua, interfiriendo en el metabolismo celular normal. Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical, tanto para cationes monovalentes como para divalentes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez, que colapse la diferencia de potencial, generando la alcalinización del citoplasma y la destrucción de las células columnares y caliciformes (De Maagd *et al.*, 2001). Al destruirse las células, las esporas de *Bt* van a tener acceso a la hemolinfa y proliferan dentro de ésta, provocando en la larva del insecto la parálisis de su tracto digestivo, el cese de la ingesta de alimentos y por último, su muerte (Schnepf *et al.*, 1998).

1.5. Medios de cultivo para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var.

kurstaki

El medio de cultivo debe proveer al microorganismo de todas las sustancias que requiere para la síntesis de material celular y para la generación de energía. Ya

que las proteínas Cry de *Bt* se expresan durante la esporulación, los cultivos que se utilizan para la producción de estas toxinas se realizan en lote, lo que permite un agotamiento de los nutrientes y como consecuencia la esporulación de la bacteria. El cultivo por lote de *Bt*, se puede dividir en dos partes. En la primera los nutrientes son consumidos y tiene lugar el crecimiento de las células vegetativas, es decir, la fase exponencial, lo que ocurre en las primeras horas en medio A80 (Brazón, 1998). Posteriormente, en la segunda etapa comienza la esporulación, alcanzando su máximo a las 72 horas (Brazon, 1998; Ramírez, 1999; Peñalver, 2005).

A la fecha, se han realizado numerosas investigaciones que permiten conocer los parámetros del cultivo para el óptimo crecimiento, esporulación y producción de cristales. En el caso de la fuente de carbono, la más eficiente para producir toxina es la glucosa, pero con el glicerol se obtienen toxinas con mayor efectividad (Smith, 1982). Se ha reportado que la fuente de nitrógeno no sólo debe encontrarse en la forma de sales de amonio (nitrógeno reducido), sino que también debe estar presente en compuestos orgánicos comprobándose que el más eficiente es el extracto de levadura (Arcas, 1984).

Para la esporulación de *Bt*, es vital la presencia de fuentes minerales como el fósforo y el magnesio, ya que éstos intervienen en las reacciones de transferencia de energía con Adenosin Difosfato. El calcio, potasio, azufre y sodio se encuentran de manera significativa en la estructura de la célula. La presencia de manganeso (Mn^{2+})

está relacionada con la formación de esporas, al igual que el potasio y el zinc (Arcas, 1984).

Entre los factores más importantes en la síntesis del cristal proteico, se incluye la concentración de oxígeno disuelto en el cultivo. A medida que la concentración de biomasa aumenta en un cultivo por lote, la demanda de oxígeno aumenta y como consecuencia la concentración de oxígeno disuelto disminuye hasta llegar a la condición crítica (Nickelson y Bulla, 1992). Por otro lado, el pH también influencia la formación de la espora y la producción de las δ -endotoxinas. El pH debe oscilar entre 6,5 y 8 para no generar cambios significativos en la producción de los cristales (Holmberg *et al.*, 1980).

1.6. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Se han encontrado numerosas cepas de *Bt* efectivas contra diferentes insectos diana, las cuales se han caracterizado por su serotipo H-flagelar en más de 45 serotipos y 58 serovariedades diferentes, siendo la variedad *kurstaki* (*Btk*) la más común. La diversidad de *Bt* se manifiesta por la variabilidad de los genes *cry* y sus respectivas proteínas Cry entomopatógenas, además de variaciones a lo largo de su genoma, como en las regiones extragénicas repetitivas (Sauka y Benintende, 2008).

Btk fue aislada por primera vez en Francia por Kurstak, en larvas de *Ephestia kuhniella* (Kurstak, 1962), un lepidóptero que afecta productos almacenados como harinas, galletas, cacao, granos de cereales y frutos secos. Sin embargo, la cepa

utilizada comercialmente en Estados Unidos fue aislada 10 años después. Esta variedad es por excelencia la cepa utilizada para el control biológico de insectos lepidópteros, que son plagas agrícolas, forestales y de salud pública (Gajardo *et al.*, 2010). *Btk* presenta un cristal con morfología bipiramidal (figura 10) (Sauka y Benintende, 2008) y se caracteriza por poseer los siguientes genes *cry* que codifican proteínas con actividad tóxica contra lepidópteros: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia* (Hofte y Whiteley, 1989).

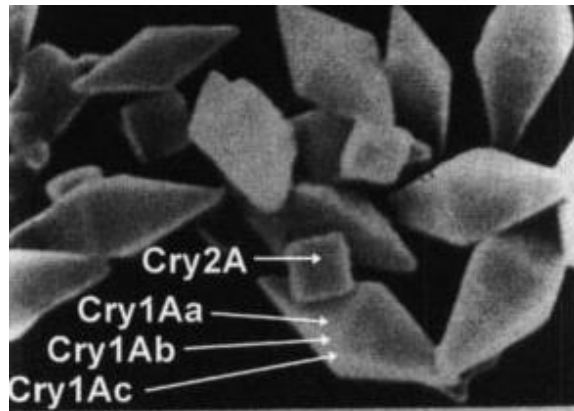


Figura 10. Cristales parasporales de *Btk* Se diferencian las dos morfologías presentes en los cristales de la variedad *kurstaki*. Los cristales bipiramidales están formados por proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, tóxicas para lepidópteros. Los cristales cúbicos están formados por la proteína Cry2A, tóxica para dípteros. (Federici, 1998).

2. ANTECEDENTES

Bt fue aislada por primera vez por Shigetane Ishiwata en Japón, a partir de una larva muerta del gusano de la seda, *Bombix mori* (Ishiwata, 1901). Se identificó como agente entomopatógeno en 1911 cuando Berliner, en Alemania, la aisló nuevamente a partir de larvas muertas de la palomilla de la harina (*Ephestia kuehniella*). Hacia 1936, se introdujo en el mercado, el primer producto comercial bajo el nombre de Sporine, cuyo principio activo eran las esporas de *Bt* (Nester *et al.*, 2002).

Debido a que existe un interés comercial e industrial en el uso *Bt* como bioinsecticida, un gran número de investigaciones se han enfocado en la búsqueda de medios de cultivo que sean de bajo costo y eficientes (Pearson y Ward, 1988). Es por ello, que se han utilizado diferentes metodologías para evaluar cultivos con subproductos agroindustriales, como las matrices multifactoriales y la metodología de respuesta de superficie (RMS) (Liu y Tzeng, 1998). Debido a que la capacidad insecticida la poseen los cristales parasporales, en las investigaciones orientadas al diseño de medios, es necesaria la purificación de los cristales con la finalidad de estimar la eficiencia de estos cultivos para el desarrollo de las δ -endotoxinas.

En este sentido, se debe destacar que actualmente existen dificultades para la purificación adecuada de los cristales parasporales de *Bt*, derivadas de la similitud en las densidades de flotación de la espora y del cristal (1,25 y 1,30 g·cm⁻³), así como, de la tendencia de las esporas a agruparse alrededor del cristal (Mounsef *et al.*,

2014). Se han reportado variadas técnicas de purificación como: centrifugación isopícnica en gradiente de cloruro de cesio (Fast, 1972), centrifugación en gradiente de bromuro de sodio (Ang *et al.*, 1976), centrifugación en gradiente de densidad de Renografina (Sharpe *et al.*, 1975), centrifugación a través de gradientes de Ludox (Zhu *et al.*, 1989). También se han descrito técnicas que utilizan espumas de flotación (Sharpe *et al.*, 1978) y cromatografías en columnas de carboximetilcelulosa (Murty *et al.*, 1994). Pero el más utilizado, es la centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (Thomas y Ellar, 1983). Este gradiente se crea superponiendo cuidadosamente bajas concentraciones de sacarosa sobre altas concentraciones en un tubo de centrifugación. La muestra que contiene las partículas de interés es ubicada encima del gradiente y centrifugada a fuerzas que superan los 150.000 Xg. Las partículas viajan a través del gradiente hasta el punto en el que su densidad es igual a la de la sacarosa circundante, pudiendo remover luego la fracción de interés (De Duve *et al.*, 1959).

En Venezuela, en el Laboratorio de Procesos Fermentativos de la UCV, se han realizado previos aislamientos de los cristales entomopatógenos a través de dos técnicas: centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa con yodamina metilglucamínica, con un fundamento similar al expuesto anteriormente, y la centrifugación en gradiente lineal de amidotrizoato de meglumina (Urografina), la cual se basa en el aumento lineal de la densidad conforme aumenta la distancia del centro de rotación, permitiendo separar partículas con coeficientes de sedimentación similares (Brazón, 1998).

Por otra parte, la detección de proteínas de *Bt* se ha realizado mediante el uso de anticuerpos con afinidad hacia proteínas específicas de la bacteria, ya sean propias de las células vegetativas como los antígenos flagelares (Cragie, 1931) o asociadas a la espora y al cristal entomopatógeno. Posterior a ello, han derivado muchos otros estudios empleando técnicas inmunocitoquímicas, que han permitido dilucidar en gran parte el mecanismo de acción de la bacteria, gracias al análisis de la especificidad de unión de las toxinas a los receptores del organismo blanco, especialmente las toxinas de tipo Cry1 y los receptores de larvas de lepidópteros (Pietramonio y Gill, 1996).

El primer reporte de detección de proteínas entomopatógenas a través de anticuerpos, utilizando la técnica de inmunodifusión, permitió relacionar el tipo de δ -endotoxina con la serovariedad de *Bt* (Krywienczyk *et al*, 1979). Esto abrió una ventana a posteriores investigaciones cuyo objetivo era desarrollar técnicas que permitieran la obtención de anticuerpos contra las proteínas Cry y así lograr la caracterización de cepas nativas. De acuerdo a ello, Reguero *et al*. (1994) inmunizaron conejos empleando cristales desnaturalizados de *Bt*, como inmunógeno, para así obtener un suero hiperinmune que permitiera la detección de las proteínas de interés mediante un Dot blot, logrando resultados satisfactorios en cuanto a la determinación de presencia o ausencia de algún tipo de δ -endotoxina, en las diferentes cepas empleadas. Reportes similares fueron descritos por Tapp y Stotzky (1995) quienes empleando el Dot blot, siguieron el curso de las toxinas insecticidas

de *Btk* en el suelo, empleando un suero hiperinmune de conejo obtenido a partir de proteínas purificadas con un gradiente de Ludox.

La técnica inmunoquímica Dot blot, también se ha empleado con éxito para la detección de proteínas Cry de *Bti* en medio de cultivo, permitiendo estimar cualitativamente la concentración de cristales en el medio, a través del uso de cantidades conocidas de la δ -endotoxina purificada y un anticuerpo comercial (Carareto y Lemos, 2000).

Finalmente, el uso de las técnicas basadas en la interacción antígeno-anticuerpo se han extendido al campo de la biología molecular de *Bt*, En este sentido, se ha reportado el uso de anticuerpos como indicadores de la expresión de proteínas recombinantes, resultando ideales en los procesos de transgénesis, particularmente en la evaluación de la presencia de Cry1C en plantas transgénicas de brócoli (Cao *et al.*, 1999) y Cry2Aa2 en cloroplastos de tabaco (Khota *et al.*, 1998).

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el desenvolvimiento de la agricultura y la ampliación de las fronteras agrícolas han forzado la intensificación del empleo de los insecticidas químicos, derivando en el incremento de los ataques de insectos resistentes, responsables de más del 25% de pérdidas de las cosechas y productos almacenados (Agaisse y Lereclus, 1995). El uso de estos plaguicidas crea una serie de problemas para el medio ambiente. Más del 98% de los insecticidas fumigados llegan a un destino diferente del buscado, incluyendo especies vegetales y animales, aire, agua, sedimentos de ríos, mares y alimentos (PMEP, 2007). El uso de plaguicida reduce la biodiversidad, la fijación de nitrógeno, contribuye al declive de polinizadores, destruye hábitats y amenaza a especies en peligro de extinción (EPA, 2016).

Nuevas alternativas de control de insectos surgieron entonces, entre las cuales se encuentran el uso de feromonas y entomopatógenos. Estos últimos incluyen virus, bacterias y hongos. Estos biopesticidas son un componente clave en los programas de control integrado de plagas y están recibiendo mucha importancia como medio de reducir la cantidad de pesticidas sintéticos utilizados en el control de plagas y enfermedades en los cultivos. La principal ventaja que ofrecen estos biocontroladores es que reducen significativamente el impacto sobre las especies que no son objeto de los tratamientos, incluyendo los seres humanos.

Dentro de las bacterias entomopatógenas, *B. thuringiensis* (*Bt*) es el microorganismo más ampliamente usado como biopesticida entre los muchos métodos disponibles para el control de insectos. Sin embargo, a pesar de estar disponible comercialmente desde la década de 1950, no ha tenido mucho impacto en el mercado de biopesticidas. Actualmente, el mercado mundial de biopesticidas no llega a representar el 2% del mercado de pesticidas y los productos formulados con *B. thuringiensis* representan el 80% de los biopesticidas vendidos. La importancia de su implementación se ve potenciada debido a que, además de atacar plagas agrícolas, posee capacidad insecticida contra algunos vectores de enfermedades tropicales (Kroeger, 1995). Para que este microorganismo entomopatógeno sea considerado como un agente potencial de control biológico, debe existir disponibilidad y factibilidad de tecnologías que permitan su producción continua en grandes cantidades (Bravo y Cerón, 2004).

En Venezuela, son escasas las investigaciones sobre *Bt* como bioinsecticida y la mayor parte de éstas están centradas en la búsqueda y aislamiento de nuevas cepas (Gillis, 2013), por lo que ha quedado en segundo plano la investigación para mejorar la producción de *Bt*. Como consecuencia de esto, se ha creado la necesidad de impulsar investigaciones centradas en el mejoramiento de la producción de este microorganismo entomopatógeno, evaluando la cinética de producción del cristal. En este sentido, las primeras aproximaciones en el desarrollo de un medio de cultivo para el crecimiento, esporulación y síntesis del cristal se llevan a cabo con medios sintéticos que permitan evaluar los requerimientos nutricionales de *Bt*.

Una vez analizados estos parámetros, comienza el desarrollo de medios de cultivo eficientes, con materia prima de alta disponibilidad y de bajos costos, para la fabricación de preparaciones bioinsecticidas a partir de *Bt*. Por ello, se ha recurrido a la utilización de subproductos agroindustriales como constituyentes de los medios de cultivos, que garanticen el aporte de los nutrientes necesarios para el crecimiento, esporulación y desarrollo del cristal. Esto permitiría la adecuada síntesis de las δ -endotoxinas.

En Venezuela, en el Laboratorio de Procesos Fermentativos (IBE-UCV), se han realizado trabajos para desarrollar este tipo de medios de cultivo para la producción a gran escala de *Bt* (Brazón, 1998; Peñalver, 2005). No obstante, no se ha logrado estimar la formación de cristales durante este proceso de producción de manera directa, solamente se han realizado aproximaciones indirectas utilizando recuentos de esporas viables (Elorta, 1985). Sin embargo, ésta no es una medida confiable de la cantidad de cristales que la bacteria pueda generar en un medio de cultivo específico, debido a que la esporulación puede suceder sin la formación de éstos (Arcas, 1996).

Tradicionalmente, la metodología utilizada en la purificación de los cristales ha sido el gradiente discontinuo de sacarosa (Thomas y Ellar, 1983). Dicha técnica requiere de equipos costosos, personal entrenado en su uso y largo tiempo para implementarla. Alternativamente existen otros métodos para la purificación de los

cristales, entre ellas el propuesto por Monseuf *et al.* (2014) a través de interacciones apolares de la espora con el solvente hexano.

Por este motivo, en el presente trabajo se diseñó una metodología que permite evaluar la cinética de síntesis de cristales, durante la producción de *Bt* en cultivos sumergidos. Esto podría constituir una herramienta sencilla para evaluar la eficiencia de medios de cultivos, formulados a partir de subproductos agroindustriales empleados en preparaciones bioinsecticidas con base en este microorganismo. Impulsando así, la fabricación de un bioinsecticida a gran escala que podrá reducir el uso de insecticidas químicos y por lo tanto sus efectos nocivos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Diseñar una prueba que permita detectar la presencia de δ -endotoxinas

en un cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar los cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.
- Obtener un antisuero de conejo contra δ -endotoxinas de *Bacillus*

thuringiensis var. *kurstaki*.

- Establecer condiciones experimentales óptimas para el uso de antisuero de conejo en la detección de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en un medio de cultivo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales:

5.1.1 Material Biológico

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* cepa HD1: obtenida del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV). La cepa fue mantenida en una punción.

Bacillus cereus cepa CVCM 1832: obtenida del CVCM-IBE-UCV. Se utilizó como control negativo para ensayos serológicos. La cepa fue mantenida en una punción.

Modelo lepórico: Para la obtención del antisuero se utilizaron 4 conejos machos Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) de 2 Kg de peso.

5.1.2 Medios de Cultivo

- Medio Luria-Bertani (Caldo LB): Este medio se utilizó para el crecimiento de *Bt* provenientes de los aislados en choque térmico. Los compuestos se añadieron en el mismo orden que aparecen en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio Luria-Bertani.

Compuesto	Concentración (g/L)
Bactotripton	10.0
Extracto de levadura	5.0
NaCl	5.0

Se esteriliza a 121 °C, 15 lb durante 15 min.

Para la preparación de Agar, por cada litro de caldo LB se agregaron 15 g de agar en polvo.

- Medio A-80: es un medio definido diseñado por Arcas (1984) para el crecimiento, esporulación y producción de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Los constituyentes del medio A80 se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio A80.

	Compuesto	Concentración (g/L)
Solución A	(NH ₄)SO ₄	1.00
	KH ₂ PO ₄	1.00
	Extracto de levadura	4.00
	K ₂ HPO ₄	1.00
Solución B	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.00
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.03
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04
Solución C	Glucosa	8.00

Las soluciones A y B fueron preparadas por separado, para evitar que los fosfatos precipitaran. Los constituyentes de la solución A fueron disueltos en el 80% del volumen de agua total a utilizar. Por su parte, los constituyentes de la solución B

fueron disueltos en 10% del volumen total de agua a usar. Ambas soluciones fueron esterilizadas por separado a 15 libras, 121 °C durante 15 min. Mientras que la solución C fue preparada en el 10% de agua total restante y se esterilizó a 10 libras, 121 °C durante 15 min. Una vez esterilizadas las tres soluciones se constituyó el medio A80, en un biorreactor de 1,5 L marca Newbrunswick, liberando el paso de la solución B hacia la solución A. Posteriormente, se agregó, a través de una apertura en la tapa del biorreactor, la solución de glucosa a la que previamente se le ha añadió el inóculo. El biorreactor fue encendido a 150 rpm de agitación y con un suministro de aire de 2,77 vvm.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de los inóculos

Los inóculos fueron preparados en caldo LB (tabla 1) correspondiente al 10% volumen del cultivo final. Para inocular este medio estéril, se introdujo un asa en la punción que contenía la cepa de *Btk* y luego ésta se colocó en contacto con el medio. El proceso se realizó en condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar Lab Conco, modelo purifier class II.

5.2.2 Preparación del cultivo por lote de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* para la obtención del complejo espora cristal

El preinóculo preparado en la sección anterior se empleó para inocular el bioreactor con medio A80 (tabla 2). Con la finalidad de conocer la cinética del crecimiento microbiano, se realizaron recuentos de células viables cada 24 horas

durante 4 días hasta que el cultivo se encontró en fase estacionaria. Para ello, se tomaron muestras del cultivo en condiciones de esterilidad, las cuales fueron diluidas hasta 1×10^{-6} . Posteriormente, estas se sembraron en placas de agar LB y se incubaron durante 24 horas para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) correspondiente a las células vegetativas. Luego de la siembra, la muestra diluida fue sometida a un tratamiento térmico (10 min a 80 °C, seguidos de 5 min en hielo). Se realizó la siembra en placas de agar LB y se incubaron durante 24 horas para conocer el título de esporas en el cultivo.

5.2.3 Obtención del complejo spora cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Una vez obtenido el cultivo de *Bt* en fase estacionaria, se centrifugó a 3500 Xg y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió el sedimento en agua destilada y se centrifugó nuevamente a 3500 Xg. Este procedimiento se repitió tres veces. El sedimento fue almacenado a -10° C.

5.2.4 Purificación de los cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Los cristales parasporales se purificaron siguiendo la metodología reportada por Mounsef *et al.* (2014), donde un solvente orgánico interactúa con las esporas permitiendo su separación de los cristales. El medio de cultivo con una alta concentración de esporas fue centrifugado a 7660 Xg a 4 °C durante 10 min,

utilizando una centrifuga Sorvall operada con el rotor SS-34. Los sedimentos se lavaron con solución salina al 1,5 M preparada con Tween 20 al 0,02%. Este lavado se realizó tres veces. Un vez obtenido el complejo espora-cristal (sedimento), éste se resuspendió en solución salina 1,5 M con Tween 20 al 0,02% y se repartieron 2 mL en tubos Corex de 15 mL de capacidad. A cada tubo se le añadió 0,2 mL de hexano y se centrifugaron a 3500 Xg durante 10 min, a 4°C, utilizando la misma centrifuga. Posteriormente, los sedimentos fueron lavados tres veces con el mismo procedimiento, resuspendiéndolos en 2 mL de solución salina y 0,2 mL de hexano y centrifugados bajo las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y el sedimento correspondiente a los cristales purificados fue almacenado en un Eppendorf de 1,5 mL de capacidad a -10 °C.

5.2.5 Preparación de las muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Las muestras antes de ser cargadas en el gel se diluyeron 1/2 en amortiguador de carga 1X (tabla 3) y se hirvieron durante 10 min. Finalmente, se centrifugaron 2 min a 7000 Xg y se tomó el sobrenadante, esta fracción fue la cargada en el gel.

Tabla 3. Composición del amortiguador de muestra 2X

Compuesto	Concentración (mM)
Tris HCl pH 6.8	25
β -mercaptoetanol	1280
Azul de bromofenol	2.89
SDS	138
Glicerol	2170

5.2.6 Determinación cualitativa de la pureza de los cristales a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para determinar el grado de pureza de la proteína se efectuaron electroforesis analíticas de la purificación. Esta se realizó en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes. El sistema empleado en la electroforesis fue un sistema de geles en discontinuo. (Laemmli, 1972).

Para llevar a cabo la electroforesis se ensambló una minicámara BIO-RAD modelo Mini-Protean® II Cell, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, procediendo de la siguiente manera para el vaciado del gel de SDS-PAGE. El gel de resolución se realizó al 10%, para ello se mezclaron los componentes de acuerdo a la tabla 4. Esta mezcla se vertió entre los vidrios ya montados y limpios del sistema electroforético. Posteriormente sobre la mezcla se añadió agua destilada para alinear el margen del gel, dejando polimerizar durante 2 horas. El gel de apilamiento se realizó mezclando los componentes de acuerdo tabla 4. Luego se ubicó esta mezcla sobre el gel de resolución y se colocó rápidamente el peine que marca los bolsillos de las muestras. Finalmente, luego de que el gel de apilamiento polimerizó, se retiró el peine cuidadosamente y se lavó el gel con agua destilada.

Tabla 4. Composición del gel de separación 10% y del gel de concentración 5%.

Compuesto	Gel de separación 10%	Gel de concentración 5%
Agua destilada estéril	2.21 mL	3.20 mL
Amortiguador del gel (Tris 3 M; SDS 0.3%; pH 8.45)	3.3 mL	1.24 mL
Glicerol 100%	1 mL	---
Solución de poliacrilamida 30%	3.3 mL	800 µL
N,N,N',N Tetrametil etilen diamina (TEMED)	10 µL	5 µL
Persulfato de amonio 10%	100 µL	50 µL

Una vez realizado el gel se colocaron 5 µg de muestra en el fondo de cada celda. La electroforesis se desarrolló en tampón de corrida 1X (tabla 5).

Tabla 5. Composición del amortiguador de corrida Tris-Glicina

Compuesto	Concentración (g/L)
Tris base (0.05 M)	6.05
Glicina (0.38 M)	28.0
SDS (0.1%)	1.0

Las condiciones de corrida fueron, amperaje constante de 15mA y voltaje libre. Finalmente, los geles fueron teñidos durante 30 min con una solución que contiene Azul Brillante de Coomassie (tabla 6) y para retirar el exceso de colorante el gel se colocó en una solución decolorante (Solución de tinción sin Azul de Coomassie) durante 1 h en agitación.

Tabla 6. Composición de la solución para tinción de proteínas del gel

Compuesto	Concentración % v/v
Azul de Coomasie	250 mg
Etanol	45 mL
Ácido acético	9 mL
Agua destilada	46 mL

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron de la Marca Gibco BRL BenchMark, n° de catálogo 10748-010. Para fotografiar los geles se utilizó una cámara transiluminadora marca Evitec conectada a un software que permitió la visualización del gel.

5.2.7 Separación de las proteínas presentes en el complejo espora cristal a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El procedimiento fue similar al descrito anteriormente, a diferencia de que se utilizó una cámara SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit de Amersham Biosciences, que permite la elaboración de geles de mayor tamaño, para una mayor resolución de las proteínas. Se utilizó un peine demostrativo donde se cargaron 0,75 mL de complejo espora cristal a 0,5 mg/mL. La electroforesis se desarrolló a amperaje constante de 75mA y voltaje libre.

5.2.8 Electroelución de Proteína Cry1Aa

Con la finalidad de purificar la proteína de interés se realizó la metodología de electroelución descrita por Jacobs y Clad (1986). Para ello se realizó una electroforesis SDS-PAGE del complejo espora cristal siguiendo la metodología descrita anteriormente (Laemmli, 1972). Para escindir esta banda de 140 KDa del gel se cortaron membranas de 1 cm de ancho en los extremos verticales del gel y luego fueron teñidas con Azul de Coomassie para conocer la posición de la banda de

interés. Posteriormente, se colocó el gel sobre una placa de acrílico junto con las membranas teñidas en su posición original y se cortó la banda correspondiente a la proteína Cry de 140 KDa.

Estas bandas fueron colocadas en los tubos para electroelución con una membrana de 12 KDa para impedir el escape de la proteína. Los tubos se ensamblaron en una cámara de electroelución BIO-RAD modelo Mini-Protean® II Cell, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con tampón de electroelución (tabla 8) y sometidas a una corriente de 55 mA a voltaje libre durante 5 horas. Luego la proteína electroeluida fue colectada y almacenada a -10 °C.

Tabla 7. Amortiguador para electroelución de proteínas de un gel SDS-PAGE

Compuesto	Concentración (g/L)
Tris-base	3
Glicina	14,4
SDS	1

5.2.9 Determinación de la concentración de proteínas mediante el método del Ácido Bicinconínico.

Una vez obtenida la proteína se procedió a determinar su concentración mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985), utilizando el estuche comercial Micro BSA™ Protein Assay Kit (Pierce), que se basa en la formación de un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer (Cox, 2000). Para ello, se utilizaron placas de ELISA fondo plano marca Nunc® y se

realizó una curva patrón por duplicado, la cual se basa en diluciones seriadas de albúmina sérica bovina (BSA) partiendo de una concentración conocida de 50 µg/mL. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de las muestras a cuantificar, también por duplicado partiendo de una dilución 1/20 con agua destilada y se agregarán 100 µL de reactivo de trabajo (2,5 mL de reactivo A, 2,4 mL de reactivo B y 100 µL de reactivo C). La placa se incubó a 60 °C por 1 h, en cámara húmeda, en una estufa marca Memert®. Una vez culminado este tiempo de incubación se leyó en un lector de placas de ELISA 3550 (BioRad) a 595 nm.

5.2.10 Cálculo del rendimiento de la proteína de interés para cada método de purificación.

El cálculo del rendimiento se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$Ra = \frac{mg \text{ de } \partial - \text{endotoxina} \times 100}{mg \text{ de complejo espora cristal utilizados}}$$

5.2.11 Preparación del Inmunógeno

Para inmunizar a los conejos se utilizó la proteína obtenida a través del método de electroelución. En un jeringa se colocaron 1 mL de adyuvante completo de Freund (o incompleto, para los refuerzos). Luego, se añadieron 100 µg de la proteína Cry1Aa y esta mezcla se sónico a 60W hasta lograr una emulsión. Finalmente, se tomó toda la mezcla con una jeringa de calibre 18.

5.2.12 Inmunización

La metodología fue la reportada por Harlow y Lane (1988). Antes de la inmunización se tomó una muestra de sangre del conejo, como suero preinmune. Se afeitó una de las orejas a nivel de la vena marginal, se limpió con alcohol y cubrió con una delgada capa de vaselina. Posteriormente, se colocó xilol con la finalidad de generar vasodilatación. Se realizó un corte transversal de la vena con una hojilla y se comenzó a recoger la sangre en tubos de vidrio. Finalmente, se limpió la oreja y se presionó hasta detener el sangrado. Para obtener el suero preinmune, se centrifugó la sangre obtenida antes de la inmunización a 435 Xg para separar el suero de los glóbulos rojos. El suero obtenido se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Se realizaron tres inmunizaciones, para ello se afeitó el lomo del animal y se limpió con alcohol, con la aguja calibre 18 que contiene la mezcla del adyuvante y el antígeno, se inoculó el conejo a nivel supra escapular vía subcutánea en cuatro sitios diferentes. La primera inoculación correspondió al día 0, la segunda, al día 21, y la tercera, al día 42. Luego de 15 días de cada inoculación se tomaron muestras sanguíneas para la obtención del suero, siguiendo la misma metodología explicada arriba.

5.2.13 Evaluación del reconocimiento de la de la proteína Cry1Aa de *Btk* purificadas a través de una electroelución mediante la técnica de Dot Blot.

Se cortaron cuadrados de membrana de nitrocelulosa de 1cm x 1cm y se colocaron 0,2 µg de proteína Cry1Aa y 1µL de complejo espora cristal, se dejaron secar e incubaron con una solución de leche descremada al 5% en TBS (tabla 9) por 1 h a 37 °C. Este bloqueo se realizó para saturar los sitios de unión a proteínas adicionales. Luego, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos, cada una con solución de lavado. Las membranas fueron incubadas con el antisuero anticristales correspondiente al obtenido al día 0, 17, 28 y 57 diluido 1/50 en solución de dilución (leche descremada al 1,25% en TBS) e incubado 1 h a 37°C. Cada membrana fue lavada 3 veces durante 5 minutos cada una con solución de TBS tween 20 al 0,125%. Luego se incubó con anticuerpos tipo IgG contra las inmunoglobulinas de conejo, conjugados con Peroxidasa de Rábano diluidos 1/5000 durante 1h a 37°C. Nuevamente, la membrana fue lavada 3 veces durante 5 minutos cada una.

Tabla 8. Componentes del amortiguador fosfato alcalino TBS

Compuesto	Concentración (g/L)
Tris-HCl	2,42
NaCl	19,22

Finalmente, se revelaron las membranas con Luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) utilizando el estuche comercial SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate, donde se colocaron unas gotas del sustrato sobre las membranas y se incubaron 5 min en oscuridad. Luego se colocó film sobre los

recuadros. Posteriormente en oscuridad se colocó sobre las membranas una película de revelado Kodak durante 5'' y luego esta película se reveló con un kit de la misma marca. Los controles negativos fueron: Una membrana solo incubada con conjugado y una membrana sin antígenos.

5.2.14 Evaluación de la cinética de anticuerpos a través de ensayo por inmunoadsorción indirecto ligado a enzimas (ELISAI)

La cinética de anticuerpos se realizó a través de un ELISA indirecto (Engvall y Perlman, 1971). Antes de realizar la cinética es necesario establecer los parámetros de antígeno, suero y anticuerpo secundario que se utilizarán, por lo que se realizó una placa con diferentes condiciones para encontrar la que mejor permita catalogar resultados positivos y negativos de suero hiperinmune contra Cry1Aa (Figura 11). Para ello se sensibilizaron las placas de ELISA fondo plano marca Nunc® con el antígeno (Proteína Cry1Aa o complejo espora cristal) diluyéndolo en tampón carbonato-bicarbonato (tabla 9) hasta 1 y 2 µg/mL colocando 100 µL en cada pozo. Luego se incubó la placa en cámara húmeda a 4 °C durante toda la noche. Una vez fijado el antígeno se realizaron tres lavados con solución de lavado 200 µM de NaCl con tween 20 (0,05%) con la finalidad de eliminar el exceso de este.

Tabla 9. Componentes del amortiguador carbonato-bicarbonato

Compuesto	Concentración % v/v
Na ₂ CO ₃ 0,2 M	40
NaHCO ₃ 0,2 M	60

La solución de trabajo se diluye ¼

Para bloquear los pozos se colocaron 200 μL de solución de leche descremada al 5% en PBS (tabla 10) cada uno y se incubó la placa a 37 °C durante 1h al terminar se realizaron tres lavados. Posteriormente se colocó el suero anti-Cry1Aa obtenido del conejo 3, luego de las tres inmunizaciones, diluido 1/100, 1/200 y 1/400 y se incubó la placa a 37 °C durante 1h. Nuevamente, se realizaron tres lavados. Para la detección de los anticuerpos anti-Cry1Aa unidos a esta proteína se colocaron 100 μL de anticuerpo contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1/10000, 1/25000 y 1/50000 y se incubó la placa a 37 °C durante 1h y de nuevo se realizaron tres lavados.

Tabla 10. Componentes del amortiguador fosfato alcalino PBS

Compuesto	Concentración (g/L)
Na₂HPO₄	11,5
NaH₂PO₄	2,96
NaCl	5,84

Finalmente, se revelaron las placas con TMB (tablas 11) colocando 50 μL por pozo del sustrato para luego dejar la placa en agitación durante 10 min, se detuvo la reacción con 50 μL por pozo de H₂SO₄ a 1N. Luego se introdujo la placa en un lector de ELISA a 450nm.

Tabla 11. Componentes del sustrato 3'3 5-bis tetrametilbenzidina TMB

Compuesto	Cantidad
Amortiguador BFC 0,05 M (Na₂HPO₄ 10 mM, Ácido cítrico 50 mM)	9 mL
H₂O₂ 30%	1000 μL
TMB	1 μg

La placa de ELISAI utilizada para realizar la estandarización posee el esquema mostrado en la figura 11. Además parte de los controles fue utilizar como antígeno el complejo espora-cristal. Todas las condiciones, incluyendo los controles, fueron realizadas por duplicado. Este ensayo de estandarización fue realizado una vez con cada condición por duplicado.

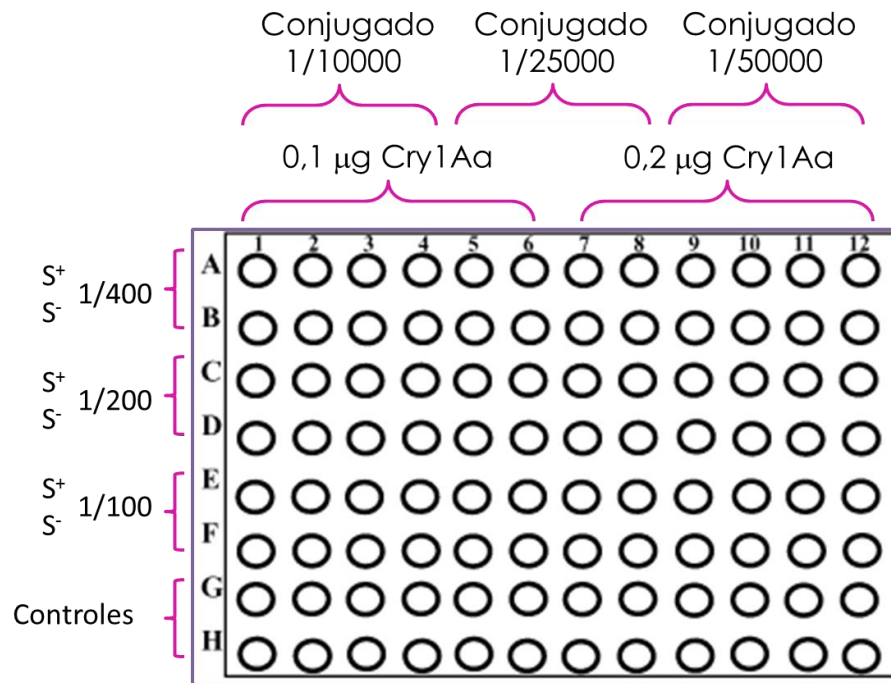


Figura 11. Esquema de la placa utilizada para estandarizar condiciones de ELISAI.

Los controles utilizados en la estandarización son los siguientes:

- Positivo: Suero 1/100, Conjugado 1/10000
- Positivo: Suero 1/100, Conjugado 1/25000
- Positivo: Suero 1/100, Conjugado 1/50000
- Negativo: Conjugado 1/10000
- Negativo: 2 µg Cry1Aa, Conjugado 1/10000
- Negativo: Solo sustrato

- 2 µg Complejo espora-cristal, Suero Positivo 1/400, Conjugado 1/10000
- 2 µg Complejo espora-cristal, Suero Negativo 1/400, Conjugado 1/10000
- 2 µg Complejo espora-cristal, Suero Positivo 1/400, Conjugado 1/25000
- 2 µg Complejo espora-cristal, Suero Negativo 1/400, Conjugado 1/25000
- 2 µg Complejo espora-cristal, Suero Positivo 1/400, Conjugado 1/50000
- 2 µg Complejo espora-cristal, Suero Negativo 1/400, Conjugado 1/50000

En el ensayo de la cinética de anticuerpos contra Cry1Aa, se utilizó el mismo protocolo utilizado en la estandarización. Los parámetros seleccionados fueron la concentración de antígeno 0,2 µg/mL, suero anti-Cry1Aa diluido 1/400 y anticuerpo secundario diluido 1/25000 (figura 12). Se realizó la cinética de anticuerpos se realizó una sola vez empleando los sueros obtenidos de los cuatro conejos. Todas las muestras y controles se realizaron por duplicado.

Los controles que se utilizaron en este ensayo fueron:

- Positivo: Suero 1/400, Conjugado 1/25000
- Negativo: 2 µg Cry1Aa, Conjugado 1/25000
- Positivo: 2 µg Complejo espora cristal, Suero positivo 1/400, Conjugado 1/25000
- Negativo: 2 µg Complejo espora cristal, Suero negativo 1/400, Conjugado 1/25000
- Positivo: Suero 1/100, Conjugado 1/25000
- Negativo: Conjugado 1/25000
- Negativo: Solo Sustrato

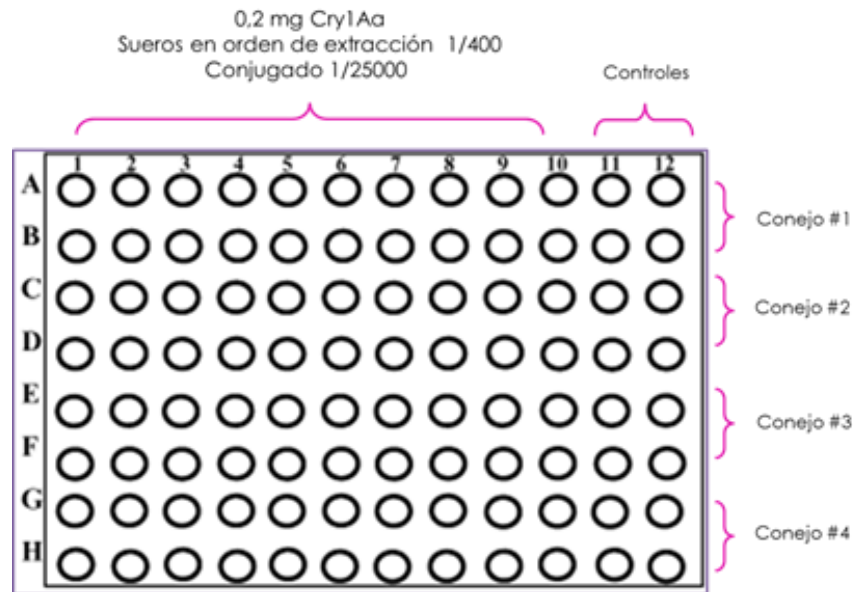


Figura 12. Esquema de la placa utilizada para realizar la curva de aparición de anticuerpos.

5.2.15 Estandarización de la técnica de Western blot para la detección de Cry1Aa

Con la finalidad de verificar la presencia de anticuerpos anti-cristales parasporales, se realizó un Western Blot. La proteína Cry1Aa electroeluida y el complejo espora cristal fueron sometidos a una electroforesis SDS-PAGE según la metodología propuesta por Lammeli (1972). Se cargaron 600 µg del complejo espora cristal en un gel con un peine preparativo. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a través de un electrotransferencia (tabla 12), de acuerdo a la metodología propuesta por Towbin (1979). Con la finalidad de verificar la transferencia, la membrana fue teñida con una solución de

Rojo Ponceau al 1% en ácido acético glacial y lavada con agua destilada para retirar el colorante.

Tabla 12. Componentes del amortiguador de transferencia pH 8,9

Compuesto	Concentración (g/L)
Tris-base	5,81
Glicina	2,93
SDS	0,375
Metanol	15,84

La membrana fue cortada en membranas de 4 mm (figura 13) y bloqueadas con una solución de leche descremada al 5% por 1 h a temperatura ambiente, este bloqueo se realizó para saturar los sitios de unión a proteínas adicionales y las membranas fueron lavadas 5 veces durante 5 minutos, cada una con solución de lavado la cual fue TBS tween al 0,125%. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el suero anti-Cry1Aa obtenido del conejo 3 luego de tres inmunizaciones, diluido 1/100 y 1/50 (figura 13) en solución de leche descremada al 1,25% e incubadas 2 h a 37°C, luego cada membrana fue lavada 5 veces durante 5 minutos. Para detectar el reconocimiento del suero a Cry1Aa se incubaron las membranas con anticuerpos contra las inmunoglobulinas tipo IgG de conejo, conjugados con Peroxidasa de Rábano diluidos 1/5000 y 1/10000 durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente la membrana fue lavada 5 veces durante 5 minutos y una última vez solamente con TBS. Para revelar las membranas el cromógeno utilizado fue diaminobencidina y usando como sustrato peróxido de hidrógeno (tabla 13). Se incubaron las membranas con el sustrato durante 10 min y se detuvo la reacción con agua destilada una vez observada las bandas de interés. La reacción de

detección es evidente por la presencia de una coloración oscura visible. Esta estandarización se realizó tres veces.

Tabla 13. Componentes de la solución reveladora

Compuesto	Cantidad
Diaminobencidina	100 mg
H ₂ O ₂	10 mL
TBS pH 7,5	990 mL

Los controles utilizados en este ensayo fueron:

- Control Positivo: Solamente conjugado 1/1000 (cuadro de nitrocelulosa)
- Control Negativo: Suero 1/50 (cuadro nitrocelulosa)
- Control Positivo: Suero 1/50, Conjugado 1/1000 (cuadro nitrocelulosa)

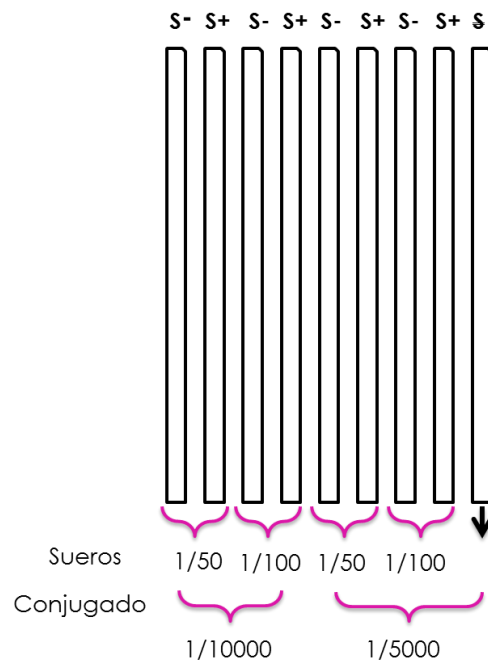


Figura 13. Esquema de los parámetros utilizados para realizar el Western Blot

5.2.16 Detección de cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Una vez que el cultivo de *Btk* se encontró en fase estacionaria (a las 72 h), se realizó la obtención del complejo espora cristal. De esta manera, el complejo espora cristal, esporas de *Bacillus cereus* (control negativo) y la proteína Cry1Aa purificada por electroelución fueron sometido a la metodología anteriormente descrita para el Western Blot. Se cargaron en el gel 30 µg de *Bt* y *B. cereus*, mientras que de la proteína purificada se cargaron 50 µg. Se utilizó el suero obtenido del conejo 3 diluido 1/100 y el anticuerpo secundario 1/10000. Para este ensayo se utilizaron como controles positivos la proteína Cry1a purificada y dos cuadros de nitrocelulosa, uno con el suero fijado e incubado con conjugado y otro con el conjugado fijado.

5.2.17 Cinética de cristales de *Btk* en medio A80 a través de Dot blot

Se realizó el Dot blot siguiendo la metodología anteriormente descrita (5.2.11) (Suero del conejo 3). Para ello se utilizaron 0,1 µL de complejo espora cristal (aproximadamente 4 µg) de cada una de las muestras de cultivo, obtenidas a las 0, 24, 48, 60, 72 y 80 horas. Como control positivo se utilizaron 0,2 µg de proteína Cry1Aa electroeluída y esporas *B. cereus* como control negativo.

5.2.18 Cinética de cristales de *Btk* en medio A80 a través de Western blot

Se tomaron 20 mL de cultivo a las 0, 24, 48, 60, 72 y 80 horas desde su inoculación. Se realizó la obtención del complejo espora cristal como se describió anteriormente (5.2.14). Cada una de estas muestras fue sometida a una SDS-PAGE,

sembrando 24 μg por pozo y luego transferidas a un papel de nitrocelulosa. Se realizó el Western blot, con suero diluido 1/200 y conjugado 1/10000. Como control positivo se utilizó la proteína Cry1Aa electroeluída y como control negativo esporas de *B. cereus*.

6. RESULTADOS

6.1 Titulación del cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* utilizado para la obtención de la proteína Cry1A.

La evaluación de la producción de esporas se realizó a través de una cinética de crecimiento de *Btk* en medio A80 según Brazón (1998).

Tabla 14. Títulos del cultivo en lote de *Bt* hasta las 72 h

Tiempo de cultivo (horas)	Título (UFC/mL) Esporas	Título (UFC/mL) Células Vegetativas
0	0	$8,0 \cdot 10^4$
24	0	$3,5 \cdot 10^5$
48	$7,5 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^2$
60	$1,8 \cdot 10^7$	21
72	$3,0 \cdot 10^7$	0
80	$2,8 \cdot 10^7$	0

En la tabla 1, se muestran los títulos obtenidos en el cultivo por lote de *Btk* a distintos tiempos. El cultivo se tituló antes y después de ser sometido a un choque térmico, el cual es un tratamiento de calor que elimina las células vegetativas y permite la germinación de las esporas. Cabe destacar que la cantidad de esporas aumenta progresivamente a través del tiempo hasta las 72 horas. En la última medición se mantiene el título de éstas. Esta cinética se realizó una vez, simplemente se confirmó lo reportado para el crecimiento de *Bt* en medio A80.

Para una mejor visualización de la cinética se graficaron los títulos obtenidos con los dos tratamientos en función del tiempo.

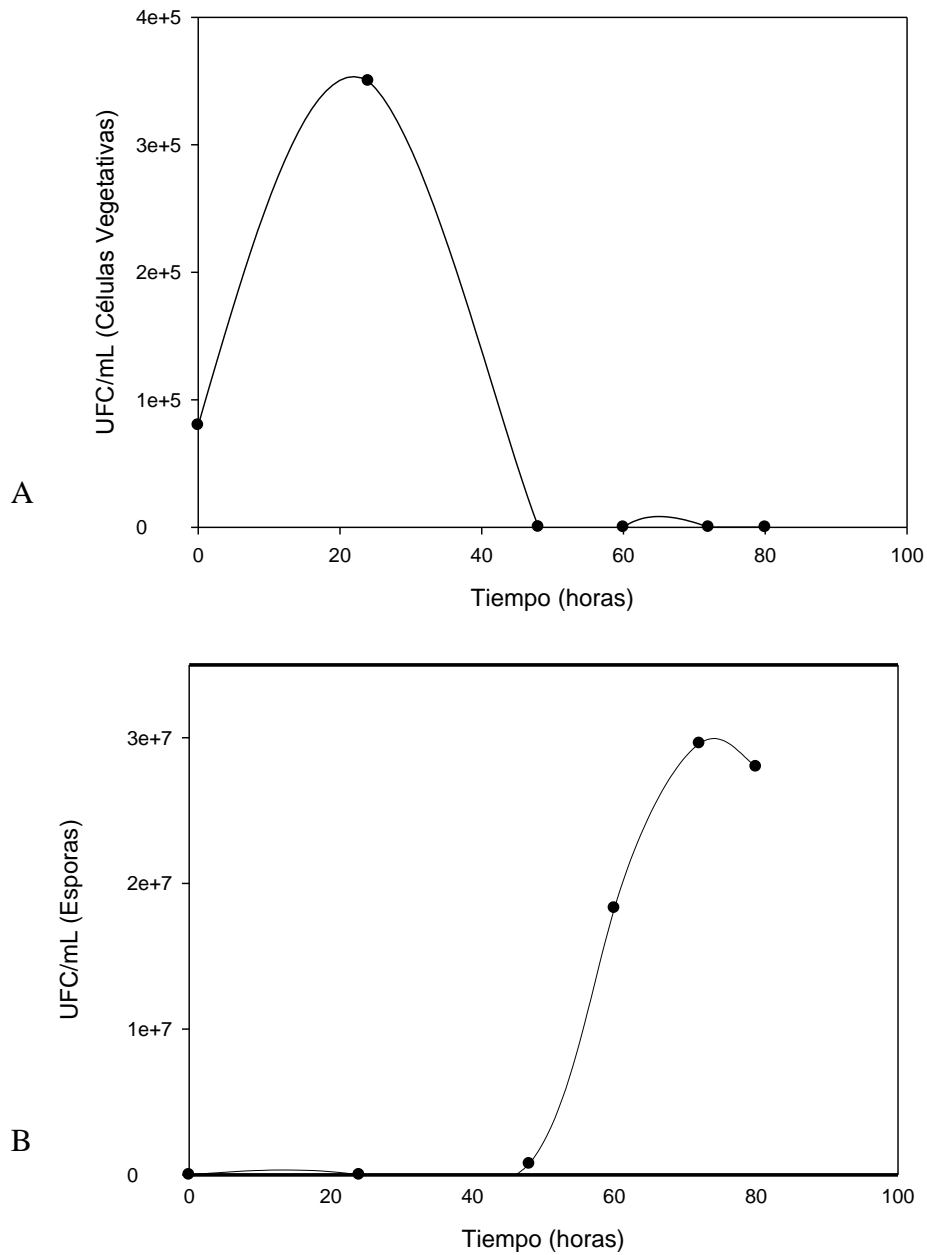


Figura 14. Cinética de un cultivo de *Btk* en medio A80. A: Título de células vegetativas desde las 0 hasta las 80 horas, B: Título de esporas desde las 0 hasta las 80 horas. Ambos títulos se encuentran en Unidades Formadoras de Colonias por mL.

En la figura 14 se observa que en las muestras que fueron sometidas a choque térmico, la cantidad de esporas aumenta a partir de las 48 horas y se mantiene constante desde las 72 horas hasta las 80 horas. En contraste, el título de células vegetativas disminuyó progresivamente hasta desaparecer a las 72 horas.

6.2 Purificación de proteínas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

Una vez purificados los cristales, por el método propuesto por Mounsef *et al.* (2014), éstos fueron observados al microscopio óptico con un aumento de 1000X.

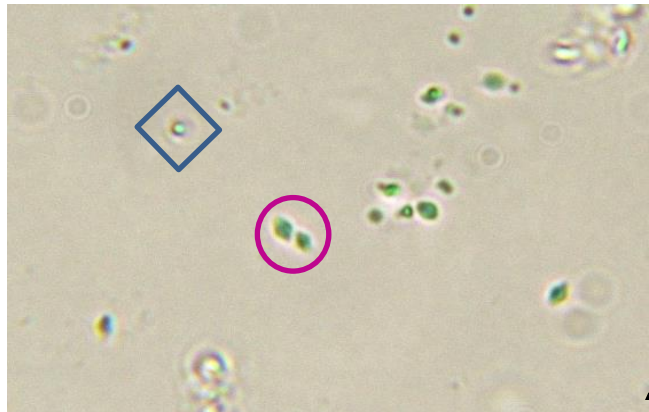


Figura 15. Cristales purificados de *Btk*. Micrografía óptica a 1000X de la fracción obtenida en la purificación. ○: Cristales. ◊: Esporas.

En la micrografía (figura 15) se evidencia la presencia de los cristales bipiramidales característicos de *Btk* separados de las esporas, encontrándose estas últimas en muy baja proporción. Adicionalmente, los cristales purificados, se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE.

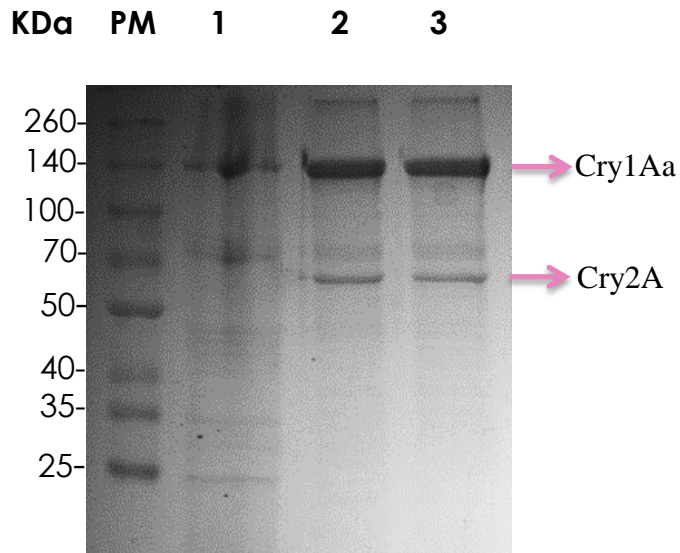


Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras purificadas. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con Azul de Coomassie. Carril 1: 4 µg complejo espora-cristal. Carriles 2 y 3: 6 µg de cristales purificados.

En la figura 16, se muestran el complejo espora-cristal y el resultado del proceso de purificación, en el cual destacan dos proteínas predominantes, una de 140 KDa que corresponde a la proteína Cry1Aa que compone al cristal bipiramidal, y otra de 65 KDa asociada al cristal cúbico incrustado en el cristal bipiramidal. Además, se observan bandas tenues correspondientes a otras proteínas de *Bt*. El rendimiento obtenido con esta técnica de purificación fue de 1,28% y se evaluó de la siguiente manera:

$$Ra = \frac{0,256 \text{ mg de cristales obtenidos} \times 100}{20 \text{ mg de complejo espora cristal utilizados}} = 1,28\%$$

Adicionalmente se purificó la proteína Cry1Aa, contenida en una muestra de complejo espora-cristal, empleando la técnica de electroelución. La muestra obtenida fue visualizada en un gel SDS-PAGE.

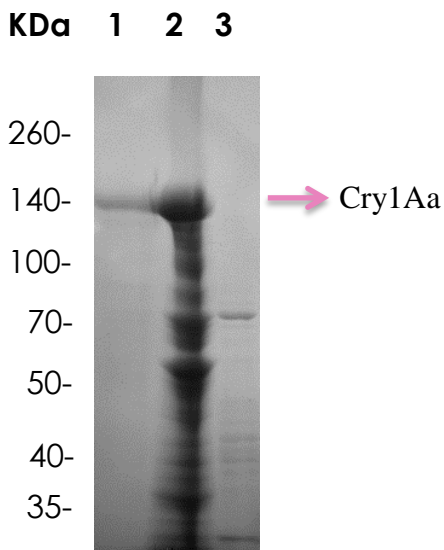


Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE de la proteína Cry1Aa electroeluida. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con Azul de Coomassie. Carril 1: 2 µg de proteína Cry1Aa electroeluida. Carril 2: 16 µg del complejo espora-cristal. Carril 3: 15 µg de esporas de *Bacillus cereus*.

En la figura 17, es posible observar la proteína purificada, evidenciando una banda de 140KDa, correspondiente a Cry1Aa (carril 1), mientras que en el complejo espora-cristal se visualizan múltiples bandas incluyendo a la proteína de interés (carril 2). Por otro lado, se utilizaron esporas de *B. cereus* como control negativo, ya que Cry1Aa no está presente en esta especie (carril 3).

Adicionalmente, se calculó el rendimiento de la proteína electroeluida, el cual fue de 20,37%, siendo calculado de la siguiente manera:

$$Ra = \frac{1,1 \text{ mg de Cry1Aa} \times 100}{5,4 \text{ mg de complejo espora cristal utilizados}} = 20,37\%$$

6.3 Evaluación del reconocimiento de la proteína Cry1Aa electroeluída mediante la técnica de Dot Blot.

A partir de los sueros obtenidos durante todo el periodo de inmunización, se realizó un Dot Blot para verificar la presencia de anticuerpos tipo IgG contra Cry1Aa.

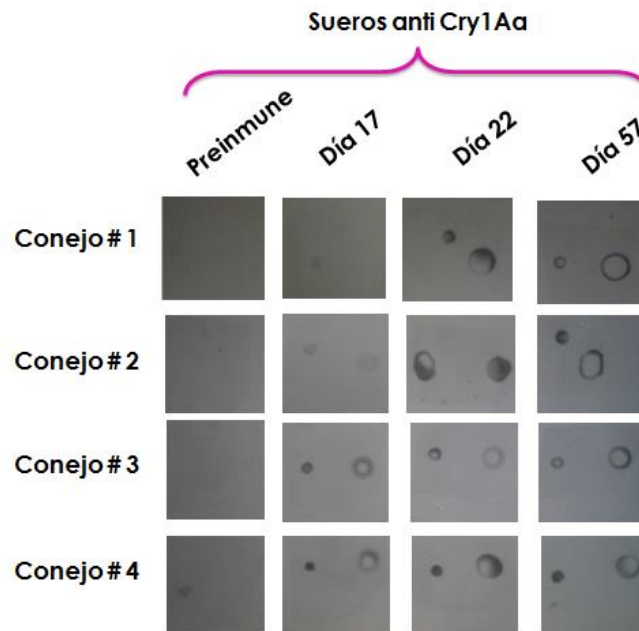


Figura 18. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-Cry1Aa mediante Dot Blot. En el lado izquierdo de cada cuadro se encuentran 0,2 μg del complejo espora-cristal y a la derecha 0,05 μg de la proteína electroeluída. El conjugado fue diluido 1/5000.

La intensidad de la detección de anticuerpos anti-CryAa aumenta en el tiempo, lo que se traduce en un aumento de IgG contra la proteína de interés en todos los sueros postinmunización (PI). Sin embargo, se aprecia una reacción tenue del suero preimmune con el complejo espora-cristal.

6.4 Estandarización de las condiciones de ELISAi.

Antes de realizar el ensayo de inmunoadsorción indirecta para obtener la cinética de anticuerpos, fue necesario encontrar los parámetros que mejor permitieran catalogar resultados negativos y positivos a partir de los sueros preinmune e hiperinmune anti-Cry1Aa. Para ello, se evaluaron varias concentraciones de antígeno, suero y anticuerpo secundario. Las diferencias a nivel de densidad óptica (D.O.) se muestran en la figura 19a y 19b.

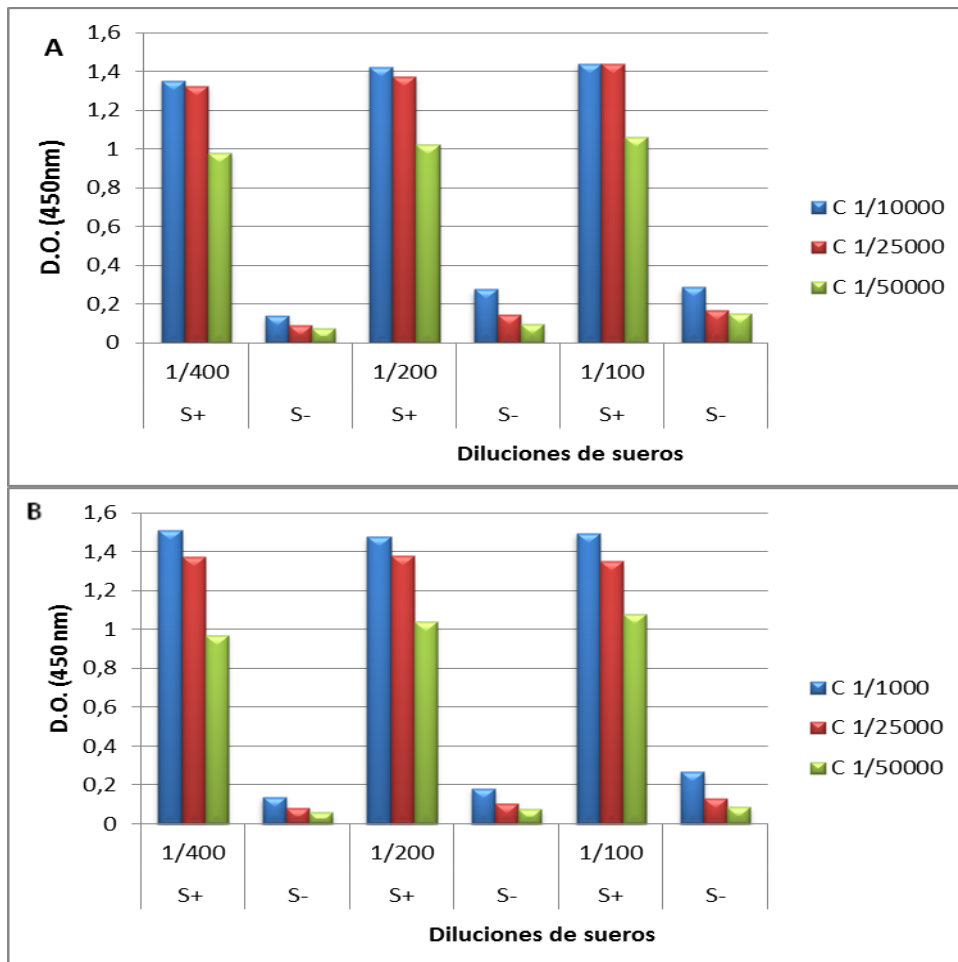


Figura 19. Estandarización de las condiciones del ELISAi. A: 1 µg/mL de Cry1Aa B: 2 µg/mL de Cry1Aa, S+: suero positivo. S-: suero preinmune (negativo). C: conjugado. Cada valor de D.O. representa el promedio obtenido entre dos replicas.

Al evaluar las diferentes condiciones de antígeno, suero y conjugado, se pudo evidenciar altas lecturas de D.O. del suero positivo con respecto al suero negativo. No obstante, los mayores valores de D.O. para el suero hiperinmune se obtuvieron utilizando 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Cry1Aa como antígeno. Por otro lado, al emplear las condiciones de suero y conjugado más concentradas, se registran D.O. mayores en los sueros negativos en comparación con las condiciones más diluidas.

Con la finalidad de facilitar la determinación de las diferencias entre las lecturas obtenidas con el suero positivo y negativo, se procesaron los datos dividiendo la D.O. obtenida para el suero hiperinmune entre el suero preinmune. Estas diferencias se muestran en la figura 20.

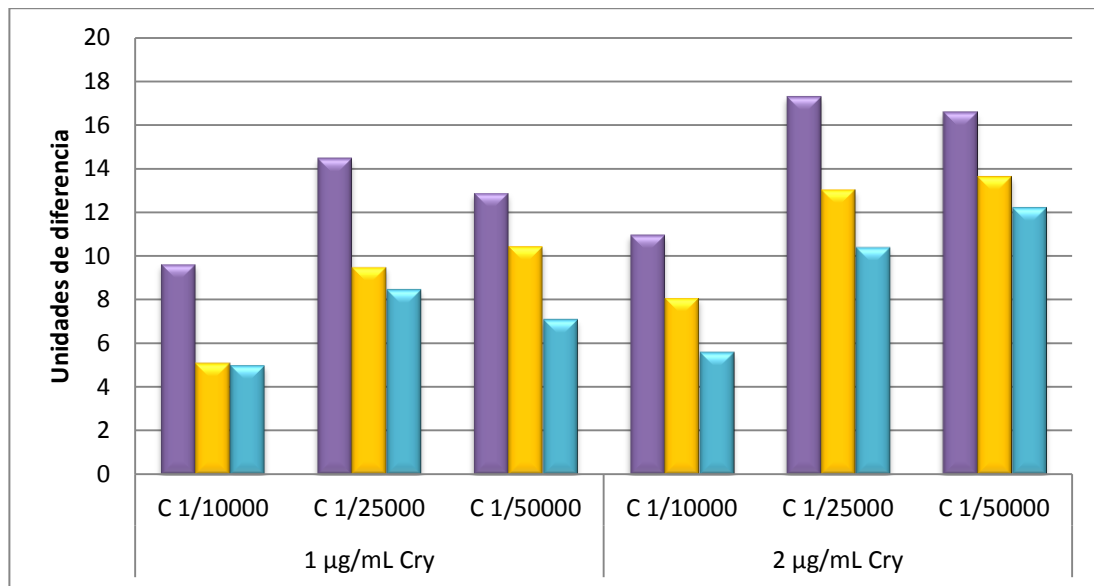


Figura 20. Diferencias de D.O. obtenidas en la estandarización de las condiciones del ELISAi. C: diluciones de conjugado. S: suero \color{purple} 1/400, \color{yellow} 1/200 y \color{cyan} 1/100.

Al emplear 1 mg/mL de Cry1Aa, se obtuvieron diferencias de D.O. hasta de 14,6 veces, mientras que con 2 μ g/mL de antígeno la mayor diferencia alcanzada fue de 17,3 veces. Al utilizar las condiciones más concentradas de suero y conjugado, las diferencias de D.O. entre sueros hiperinmune y preinmune resultaron menores, hasta de 5 veces. En contraste, al emplear diluciones mayores se logró aumentar la diferencia entre los valores de D.O. registradas para estos sueros (17,3 veces). De acuerdo a esto, los parámetros para la realización del ELISAi son: 2 mg/mL de Cry1Aa como antígeno, 1/400 de suero y 1/25000 de conjugado.

6.5 Evaluación de la cinética de anticuerpos a través de ensayo por inmunoadsorción indirecto ligado a enzimas (ELISAi).

Con la finalidad de estimar el título de anticuerpos IgG contra Cry1Aa a través del tiempo se realizó un ELISA indirecto.

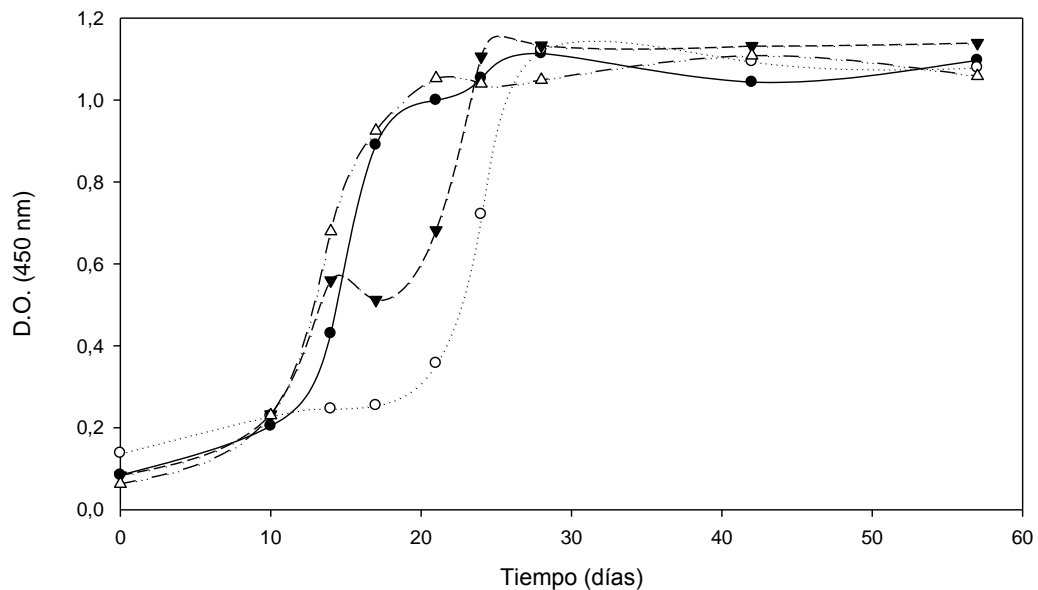


Figura 21. Cinética de anticuerpos contra Cry1Aa. ● Conejo 1. △ Conejo 2. ▼ Conejo 3. ▼ Conejo 4.

La figura 21, muestra el aumento de los niveles de anticuerpos anti-Cry1Aa en el tiempo, en todos los conejos evaluados. Específicamente, después del día 14 PI los conejos 1, 2 y 4 mostraron un incremento progresivo de anticuerpos hasta el día 21 aproximadamente. A diferencia del conejo 3 en el que se evidenció una seroconversión tardía a partir del día 21 hasta el día 28 PI. En todos los animales se mantuvo constante la cantidad de anticuerpos hasta el final de la experimentación.

6.6 Estandarización de la técnica de Western blot para la detección de Cry1Aa.

Con la finalidad de detectar la proteína Cry1Aa en el complejo espora-cristal a través el Western blot, se realizó una estandarización previa de la técnica para seleccionar las condiciones óptimas de suero y conjugado.

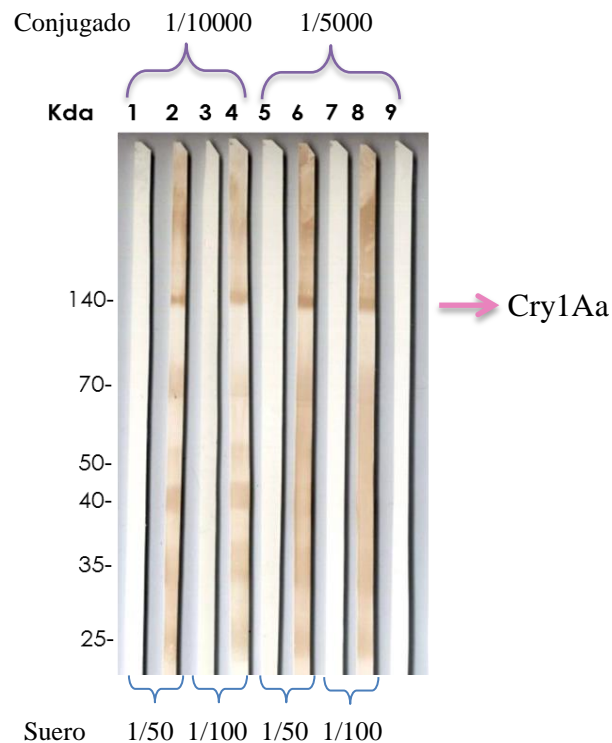


Figura 22. Estandarización de la técnica de Western blot para la detección de Cry1Aa. Carriles 1,3 ,5 y 7: suero preinmune. Carriles 2, 4, 6 y 8: suero positivo.

En la figura 22 no se observan bandas en las membranas incubadas con el suero preinmune (carriles 1, 3, 5 y 7), lo que demuestra que este suero no reconoce la proteína Cry1Aa. Mientras que al incubar las membranas con el suero hiperinmune, es evidente el reconocimiento de la proteína de 140 KDa, correspondiente a Cry1Aa. Sin embargo, al utilizar la condición de conjugado más concentrada (1/5000), la presencia de reconocimientos inespecíficos es mayor que al emplear la dilución 1/10000 de conjugado. Al emplear diluciones de suero 1/50 y 1/100 no se observaron diferencias significativas.

6.7 Detección de la proteína Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en un medio de cultivo mediante la técnica de Western blot.

Se realizó un Western blot para comprobar el reconocimiento de la proteína de 140 KDa contenida en el complejo espora-cristal de un cultivo a las 72 h. Como controles se utilizaron la proteína Cry1Aa electroeluida y *B. cereus*.

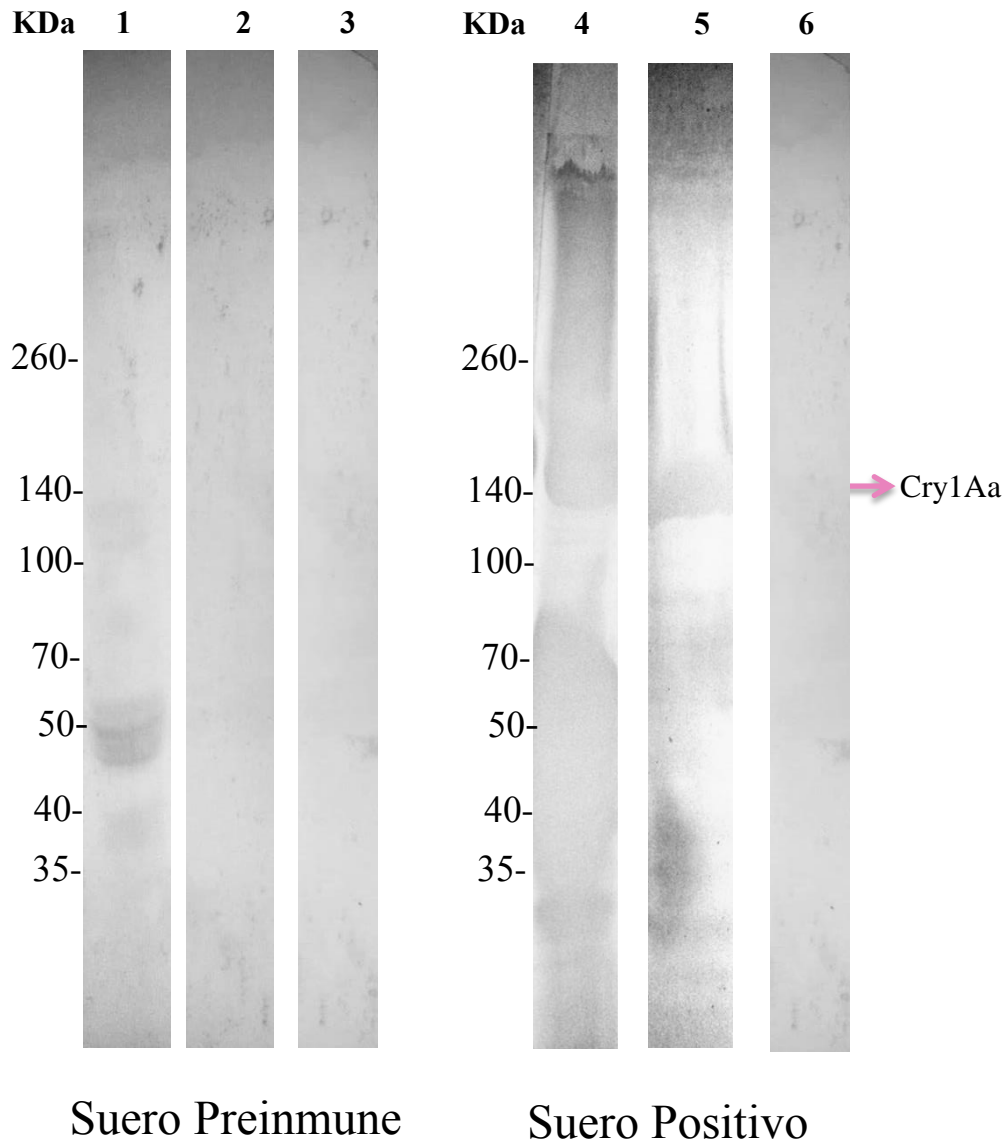


Figura 23. Detección de la proteína Cry1Aa mediante Western blot a partir de un medio de cultivo. Transferencia de un gel de poliacrilamida al 10%. Carriles 1 y 4: 30 μ g de complejo espora-cristal. Carriles 2 y 5: 50 μ g de Cry1Aa. Carriles 3 y 6: 30 μ g de esporas de *B. cereus*.

En la figura 23, se observa que tanto *B. cereus*, como la proteína Cry1Aa electroeluída no fueron reconocidas por el suero preimmune. Mientras que con este suero, fueron reconocidas proteínas de alrededor de 50 KDa contenidas en el complejo espora-cristal.

Por otro lado, con el suero hiperinmune no solo hubo detección de la proteína Cry1Aa electroeluída, sino también la contenida en el complejo espora-cristal. No obstante, en este último es notable un reconocimiento de proteínas ajenas al cristal bipiramidal, con pesos moleculares comprendidos entre 35-70 KDa. Al igual que con el suero preinmune no hubo reconocimiento de proteínas de las esporas de *B. cereus*.

6.8 Evaluación de la cinética de síntesis de cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en medio A80 a través de la técnica de Dot blot.

Una vez confirmado que el suero hiperinmune es capaz de reconocer la δ -endotoxina, se evaluó la cinética de síntesis de cristales en medio A80 a través de un Dot blot.

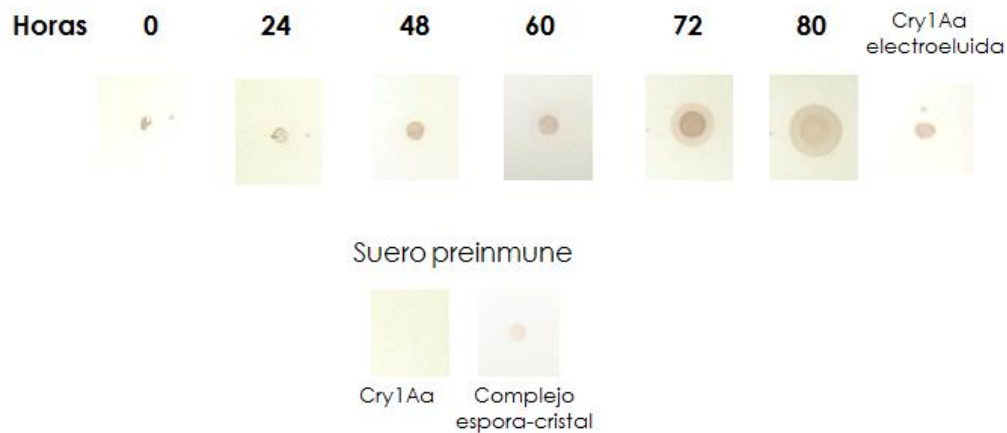


Figura 24. Evaluación de la cinética de síntesis de cristales en medio A80 a través de un Dot blot.

La figura 24 muestra el aumento del reconocimiento de la proteína Cry1Aa a través del tiempo en un cultivo de *Btk*. Además, se observó un débil reconocimiento del complejo espora-cristal obtenido de un cultivo de 72 h por parte del suero preinmune, mientras que la proteína electroeluída no fue reconocida por este suero.

Adicionalmente, como control positivo se incubó la proteína electroeluída con el suero positivo, evidenciando el reconocimiento esperado.

6.9 Evaluación de la cinética de síntesis de cristales de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en medio A80 a través de la técnica de Western blot

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos en el Dot blot, se evaluó la cinética de síntesis de cristales en medio A80 a través de un Western blot.

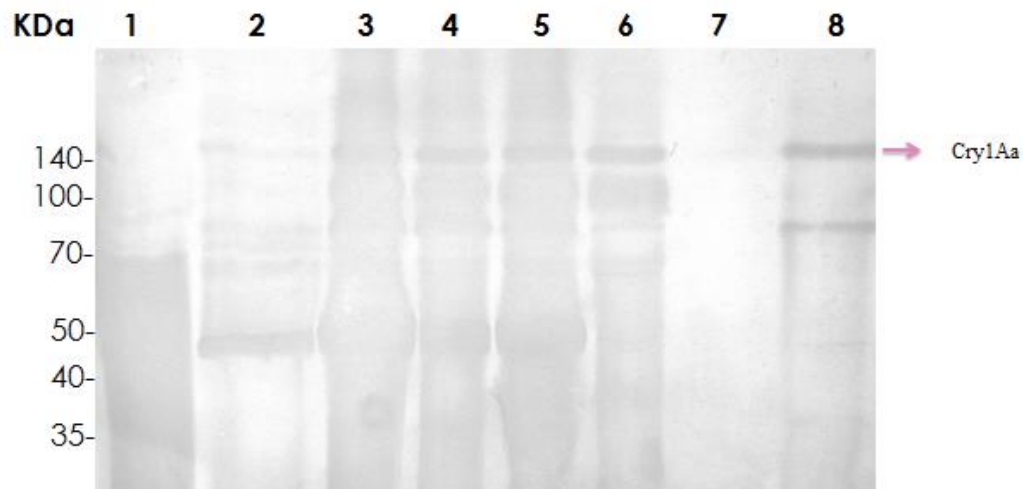


Figura 25. Evaluación de la cinética de síntesis de cristales en medio A80 a través de la técnica de Western blot. Carriles 1-6: muestras del cultivo a las 0, 24, 48, 60, 72 y 80 horas respectivamente. Carril 7: esporas de *B. cereus*. Carril 8: proteína Cry1Aa electroeluída.

Es posible observar en la figura 25, la presencia de la banda de 140 KDa correspondiente a la proteína Cry1Aa a partir de las 24 horas de cultivo. Este reconocimiento aumenta y se mantiene hasta las 80 horas. Adicionalmente, se observan bandas de diferente peso molecular al de proteína de interés, siendo la de 50 KDa la más dominante. Como control negativo se utilizaron esporas de *B. cereus*, las

cuales no fueron reconocidas por parte del suero hiperinmune, mientras que la proteína electroeluída si fue detectada por este suero (control positivo).

7. DISCUSIÓN

B. thuringiensis es una bacteria que se caracteriza por la producción de una inclusión proteica durante la fase de esporulación, la cual le confiere su capacidad entomopatógena (Hofte y Whiteley, 1989). Una gran variedad de productos derivados de *Bt* han sido utilizados exitosamente como control a un amplio rango de plagas de invertebrados (Valero, 1999). El principal obstáculo para la producción de estos pesticidas es el alto costo de producción de la bacteria, por lo que se han generado numerosas investigaciones para diseñar medios de cultivo que permitan el desarrollo de la capacidad entomopatógena de la misma (Brar *et al.*, 2006).

Recientemente se han desarrollado investigaciones usando medios de cultivo alternativos para la formulación de estos bioinsecticidas con desechos agroindustriales como almidón de maíz, cáscara de arroz, melaza, salvado de trigo, entre otros (Tirado-Montiel, 2001). Para evaluar la eficiencia de estos medios de cultivo, es necesario detectar la cinética de la síntesis de las proteínas Cry entomopatógenas, durante el desarrollo de la fermentación.

Hasta ahora se ha utilizado una metodología para estimar la cantidad de cristales, en el medio de cultivo utilizando el recuento de esporas viables, luego de someterlo a un tratamiento de calor, que elimina las células vegetativas. Este tratamiento supone una medida indirecta para evaluar los niveles de toxinas, pues se presume que la cantidad de cristales parasporales formados es equivalente al título de esporas (Elorta, 1985). No obstante, esta predicción puede estar errónea puesto que

una deficiencia en la concentración de alguna de las sales minerales, permitiría la escasa formación de esporas sin ninguna presencia del cristal (Arcas, 1996).

Con la finalidad de confirmar la formación de esporas es, decir, que el cultivo se encuentra en fase estacionaria, se realizó una titulación de células vegetativas y esporas a las 0, 48, 60, 72 y 80 horas. Se obtuvo que el número de esporas aumentó notablemente de las 48 a las 72 horas, de acuerdo a lo reportado para *Btk* en medio A80 (Brazon, 1998; Peñalver, 2005). En la última evaluación, a las 80 horas, el número de esporas se mantuvo igual (figura 14). Entonces, se podría suponer que la mayor cantidad de cristales se encuentran alrededor de las 72 horas.

En este sentido, en el presente trabajo se purificaron los cristales parasporales a partir del complejo spora-cristal por el método propuesto por Mounsef *et al.* (2014). Debido a que la producción de las δ -endotoxinas ocurre durante la fase de esporulación, que en *Btk* se alcanza a las 72 h (Brazon, 1998) en el medio A80 (Arcas, 1984), se tomaron 1,5 L de cultivo en fase estacionaria y se determinó la presencia de los cristales a través de microscopía óptica (figura 15). Posteriormente, se evaluó el aislamiento de los cristales mediante una SDS-PAGE, logrando observar las dos bandas esperadas, una de ellas de 140 KDa correspondiente a la proteína Cry1Aa, que forma el cristal bipiramidal con actividad insecticida contra Lepidópteros, y otra de 65 KDa perteneciente a la proteína Cry1Ab que forma un cristal cuboidal, el cual se encuentra incrustado en el cristal bipiramidal (Figura 16). Ambas proteínas son características de la var. *kurstaki* (Schnepf *et al.*, 1998). Sin

embargo, en la SDS-PAGE de los cristales purificados se puede observar una serie de bandas muy tenues (figura 16, carril 2 y 3), que son propias de las esporas y células vegetativas (Aronson *et al.*, 1986). Este método de purificación de cristales parasporales, se basa en la hidrofobicidad de las esporas, es decir, su capacidad de interaccionar a través de fuerzas de Van der Waals con un solvente polar (Chang, 2010). Las esporas de *Bt* son altamente hidrofóbicas con una adherencia al solvente orgánico del 61% (Doyle, 1984). Esto quiere decir que una parte de las esporas del cultivo no está constantemente interaccionando con el hexano, y al centrifugar éstas pueden sedimentar junto con los cristales.

Este protocolo (Mounsef *et al.*, 2014) es de utilidad ya que permite eliminar una gran cantidad de proteínas ajenas a las δ -endotoxinas (figura 16), manteniendo la actividad biológica de las mismas. Sin embargo, en este trabajo el objetivo de la purificación es la preparación de un antígeno para la obtención de un suero hiperinmune anti-Cry1Aa únicamente, por lo que este método de purificación no resulta adecuado. Esto se debe a que la proteína de interés no se encuentra completamente aislada (figura 16) y las proteínas provenientes de la spora o de alguna célula vegetativa podrían ser más antigénicas, desviando la producción de anticuerpos, lo que generaría un reconocimiento inespecífico (Kindt *et al.*, 2007). Adicionalmente el rendimiento obtenido a través de esta técnica fue bajo, apenas de 1,28%. Debido a estos resultados se procedió a realizar la purificación de Cry1Aa a través de la electroelución.

La purificación e integridad de la proteína electroeluida fue verificada a través de una nueva electroforesis SDS-PAGE. En la figura 17, se puede observar la proteína Cry1Aa de 140 KDa totalmente purificada. Esta metodología ha sido utilizada con éxito anteriormente para purificar proteínas Cry de otras variedades de *Bt* (Malik y Riazuddin, 2006). Con esta metodología se alcanzó un rendimiento de 20,37%, lo que permitió obtener la cantidad de δ -enodotoxinas necesaria para cumplir con el esquema de inmunización.

Una vez obtenida la proteína Cry1Aa purificada se realizaron los ensayos de inmunización para obtener el suero hiperinmune. Posteriormente, este suero fue evaluado para verificar la presencia de anticuerpos contra la proteína de interés mediante un Dot Blot. En la figura 18, es posible observar el aumento en el reconocimiento luego de cada inmunización, notando un comportamiento similar tanto con el complejo espora-cristal como con la proteína purificada. Sin embargo, utilizando el suero preinmune se evidenció un reconocimiento débil del complejo espora-cristal, más no de la proteína purificada. Esto podría ser consecuencia de una previa exposición de los conejos a *Bt*, debido a que los animales utilizados provenían de una granja de cría, donde se encuentran en contacto con la microbiota del suelo en la cual probablemente estuvo presente esta bacteria.

Para evaluar la aparición de anticuerpos contra Cry1Aa se realizó previamente la estandarización de un ELISAI, con la finalidad de hallar las condiciones de suero, conjugado y antígeno óptimas, que permitan una mayor diferenciación entre sueros

positivos y negativos a la presencia de Cry1Aa. Esto se debe a que el ELISAI al ser una técnica cuantitativa, que registra los resultados mediante lecturas de D.O., se puede establecer una diferenciación matemática. (Voller *et al.*, 1975).

La concentración de antígeno es un parámetro que permite conocer las cantidades óptimas de proteína que pueden ser reconocidas por el suero obtenido. En este ensayo se encontró que la cantidad de antígeno más idónea para realizar el ELISAI fue 0,2 µg por pozo, debido a que los valores D.O. registrados con los sueros negativos fueron los más bajos y los positivos más altos (figura 19b). Aunque son pocos los reportes en los que se utiliza ELISAI para la detección de proteínas Cry, existen investigaciones en las que se utiliza esta técnica para evidenciar la presencia de toxinas Cry en plantas transgénicas a partir de las hojas de las mismas (Zwahlen *et al.*, 2003) y en el suelo (Obrist *et al.*, 2006).

Para conocer la condición óptima de suero hiperinmune anti-Cry1Aa, se evaluaron tres diluciones del mismo (1/100, 1/200 y 1/400). Al utilizar la dilución 1/400, se evidencia altas lecturas de D.O. con el suero positivo superiores a 1,4, mientras que usando el suero negativo las lecturas de D.O. fueron inferiores a 0,2 (figura 19a y b), traduciéndose esto en una diferencia de hasta 17,3 veces entre ambos sueros (figura 20). Esto es debido a que se reducen las interacciones inespecíficas de los anticuerpos con la proteína de interés (Crowther, 2000). Por otro lado, al emplear la dilución de suero 1/100 el sistema se satura observando valores para el suero negativo cercanos a 0,3, generando una menor diferencia entre suero positivo y

negativo (hasta 12 veces, figura 20). Esta condición, está íntimamente relacionada con la afinidad del anticuerpo por la proteína (Murphy *et al.*, 2009).

El conjugado posee un rol de gran importancia debido a que detecta anticuerpos anti-Cry1Aa. Esto ocurre ya que el anticuerpo secundario se encuentra unido a la enzima peroxidasa, que es capaz de oxidar la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina dimina, generando una coloración azul visible (Liem, 1979). Este sustrato es el recomendado cuando se utilizan proteínas purificadas como antígeno, por su elevada sensibilidad (Reyna *et al.*, 2007), siendo necesario optimizar la dilución del conjugado. Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron tres diluciones del mismo (1/10000, 1/25000 y 1/50000), evidenciando que con la condición más concentrada, se obtienen las lecturas más altas de D.O. para el suero negativo (figura 19a y b). Esto podría explicarse porque al haber una alta cantidad de conjugado, una fracción es capaz de interaccionar de manera inespecífica con la proteína fijada, sobreestimando la detección de la misma (Crowther, 2000). Mientras que con las otras dos diluciones (1/25000 y 1/50000), se observaron notables diferencias entre sueros negativos y positivos contra Cry1Aa, de hasta 17,3 veces (figura 20). Aunque estas diferencias fueron similares, la condición 1/50000 no resultó adecuada por el hecho que las D.O. registradas para el suero positivo fueron muy bajas, lo que podría traer como consecuencia la aparición de falsos negativos. En este sentido, la condición de conjugado seleccionada fue 1/25000 como la más idónea.

La principal razón para estandarizar este ensayo, es la búsqueda de condiciones que permitan detectar la presencia de cristales de manera fidedigna. Si se alejan a los extremos las condiciones elegidas, se genera una desviación de los resultados. A bajas concentraciones de antígeno, suero y conjugado podemos obtener falsos negativos, porque aunque puede estar presente la δ -endotoxina, la cantidad de anticuerpos primarios y secundarios generarían una señal muy débil que podría pasar desapercibida. Por el contrario, al saturar el sistema se generan falsos positivos, ya que uniones inespecíficas entre anticuerpos con proteínas presentes arrojarían una alta lectura de D.O. (Valmaseda *et al.*, 2004). En consecuencia, las condiciones elegidas para realizar la cinética de anticuerpos contra Cry1Aa a través del ELISAi fueron: 0,2 μ g de antígeno por pozo, suero hiperinmune contra Cry1Aa diluido 1/400 y conjugado anti-IgG de conejo diluido 1/25000.

Con la intención de comprobar la ausencia de artefactos en la técnica que pudieran afectar los resultados, se aplicaron una serie de controles positivos y negativos. Entre ellos se encontraba el tratamiento del pozo con conjugado diluido 1/10000 después del bloqueo, verificando que la señal no se produce por unión del anticuerpo secundario al pozo. También se empleó el suero fijado directamente al pozo, comprobando la unión del conjugado a los anticuerpos primarios. Finalmente, se utilizó el complejo espora-cristal como antígeno con el fin de conocer la contribución por parte de otras proteínas ajenas a Cry1Aa en el reconocimiento. Con este control se demostró la detección de ciertas proteínas del complejo diferentes a la

δ -endotoxina por el suero preinmune, lo que se traduce en una menor diferencia entre las lecturas de D.O. del suero negativo y positivo.

Una vez fijadas las condiciones óptimas del ELISAI, se realizó un ensayo para evaluar la cinética de los anticuerpos anti-Cry1Aa. Para ello, se utilizaron todos los sueros extraídos durante el período de inmunización. La clonación de células B que entran en contacto con el antígeno por primera vez llega al máximo aproximadamente 7 días luego de la inmunización. Los primeros anticuerpos que se producen en esta respuesta inmunitaria siempre son IgM, debido a que pueden expresarse sin cambio de clase. Estos anticuerpos IgM tienden a ser de baja afinidad, ya que se producen antes de que las células B hayan experimentado permutación somática (Murphy *et al.*, 2009). Una inmunización repetida por un mismo antígeno activa los linfocitos de memoria creados como consecuencia de la respuesta humoral primaria. De esta manera, luego de 15-21 días desde la primera inmunización, se induce la producción de otros isotipos de anticuerpos principalmente IgG, que poseen un mayor afinidad y tiempo de vida media que las IgM (Abbas, 2004). En la figura 21, es posible apreciar que a partir del día 14 se comenzaron a registrar anticuerpos tipo IgG contra Cry1Aa, lo que coincide con los períodos de aparición de IgG reportados empleando otros antígenos en el mismo modelo experimental (Eleizalde *et al.*, 2007). Este aumento se hizo más evidente a partir del día 21, correspondiente a la segunda inmunización, hasta el día 24 cuando se registró el máximo título de anticuerpos, el cual se mantuvo constante hasta el último día de experimentación (día 57). Por lo tanto, se puede

afirmar que la proteína Cry1Aa es antigénica, ya que es capaz de producir una alta respuesta inmune humoral (Kindt *et al.*, 2007).

Con la intención de corroborar la presencia de anticuerpos anti-Cry1Aa en el suero, se realizó un Western blot, ya que al tratarse de un técnica cualitativa se puede conocer el peso molecular de las proteínas reconocidas. Por ello, al igual que en el ELISAi se estandarizaron las condiciones óptimas de suero y conjugado, con el objetivo de observar el reconocimiento de proteínas con pesos moleculares específicos, y así identificar la proteína 140 KDa correspondiente a Cry1Aa.

La elección de las condiciones de suero depende de múltiples factores como la metodología para la obtención de éste y la afinidad de los anticuerpos por la proteína de interés (Crowther, 2000). En el caso del anticuerpo secundario, se utilizó uno conjugado a peroxidasa, una enzima que es capaz de hidrolizar el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), liberando un ion hidronio que reacciona con el sustrato Diaminobencidina, generando un precipitado cuando hay presencia del conjugado. La elección de este sustrato se debe a su alta sensibilidad y rapidez de revelado (Herzog, 1973). En la figura 22, se observó que el suero preinmune no presenta anticuerpos anti-Cry1Aa. Mientras que en todas las condiciones en las que se utilizó el suero hiperinmune, hay reconocimiento de la proteína de interés además de otras presentes en el complejo espora-cristal.

Las diluciones de suero empleadas para la estandarización fueron 1/50 y 1/100, y de conjugado 1/5000 y 1/10000. En la figura 22, se evidencia que en los

carriles 2 y 4, es posible observar bandas definidas, donde se emplearon las diluciones de suero 1/50 y 1/100, con conjugado 1/10000. Aunque la diferencia entre estas condiciones de suero fue sutil, se seleccionó la dilución de suero 1/100 ya que se minimiza el reconocimiento de bandas ajenas a la δ -endotoxina y se mantiene el reconocimiento de la misma.

Ahora bien, al emplear la condición de conjugado 1/5000, se observó una mayor cantidad de reconocimientos inespecíficos, lo que impide distinguir las bandas correspondientes a proteínas impropias al cristal. Por lo tanto, las condiciones óptimas para este ensayo fueron las más diluidas, suero 1/100 y conjugado 1/10000.

Para comprobar que no existen interacciones entre el conjugado y el complejo espora-cristal se transfirieron 30 μ g del mismo en una membrana, que luego de bloqueada se incubó directamente con el conjugado. Al ser revelada no se observó formación del precipitado, lo que implica que no hubo unión inespecífica del conjugado al complejo (figura 22, carril 9).

Posteriormente, se realizó un Western blot con las condiciones previamente seleccionadas. Se evaluaron el complejo espora cristal, la proteína Cry1Aa electroeluida y esporas de *B. cereus*, como control negativo. Al utilizar la proteína electroeluida como antígeno (figura 23), no se observó ningún reconocimiento en la membrana tratada con el suero negativo (preimmune) (figura 23, carril 2), a diferencia del resultado observado al emplear suero positivo (día 57) (figura 23, carril 5), donde se distinguió un fuerte reconocimiento de la proteína de 140 KDa, correspondiente a

Cry1Aa. Por otro lado, se observó una serie de reconocimientos tenues en el rango de 70 - 35 KDa. Tomando en cuenta que la proteína es sensible al calor, la luz y otros microorganismos (Pusztai M, 1991; Arrivillaga y Ochoa, 2009), estos péptidos podrían ser producto de su degradación (Lieu *et al.*, 2005). Al comparar estos resultados con los obtenidos en el ELISAi se confirma la presencia de anticuerpos anti-Cry1Aa en el suero hiperinmune, corroborando que la inmunización con proteínas purificadas a través de la electroelución fue exitosa (Andersen, 1994)

El fuerte reconocimiento de la proteína Cry1Aa verifica la capacidad antigénica de la misma. No obstante otros investigadores han expuesto que las δ -endotoxinas podrían ser proteínas de baja antigenicidad, al requerir una mayor concentración de ésta como inmunógeno (2 mg), para poder desarrollar una respuesta inmune humoral en el conejo (Reguero *et al.*, 1994). Adicionalmente, otras investigaciones que han requerido el uso de anticuerpos para diversos objetivos, utilizaron altas cantidades de proteínas Cry como inmunógeno, específicamente 2 mg, 8 mg y 9 mg (Tapp y Stotzky, 1995; Carareto y Lemos, 2000; Krywienczyk *et al.*, 1979). Lo anteriormente expuesto, contrasta con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se emplearon 300 μ g de Cry1Aa y se obtuvo un alto título de anticuerpos en el animal experimental. Esto puede deberse a las diferencias entre los esquemas de inmunización empleados por los diferentes autores y este trabajo.

Por otra parte, al utilizar el complejo espora-cristal en el Western Blot (figura 23), se puede observar que al emplear el suero preinmune (figura 23, carril 1), se

evidencia el reconocimiento de algunas proteínas de *Bt* cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 35 y 50 KDa, lo que explica los resultados obtenidos en el Dot blot (figura 18) y en el ELISAi, donde se evidencia un débil reconocimiento del complejo espora-cristal al emplear el suero preinmune. Esto podría deberse a que los conejos utilizados, estuvieron expuestos a la microbiota del suelo donde probablemente estaba presente la bacteria. Esta exposición previa explicaría la presencia de anticuerpos contra ciertas proteínas de *Btk* en el suero preinmunización (Da Costa Lima *et al.*, 2000). Ahora bien, al incubar el complejo espora-cristal con el suero positivo, se distingue una banda predominante de 140 KDa correspondiente a la proteína Cry1Aa. Adicionalmente, es posible notar reconocimientos de proteínas con peso molecular inferior a 50 KDa, lo que podría ser una consecuencia, no solo de la presencia de anticuerpos contra proteínas ajenas a la δ -endotoxina antes de la inmunización, sino también a la posible degradación de la proteína Cry1Aa, generando un patrón similar al encontrado con la proteína purificada (figura 23, carril 5).

El hecho de utilizar *B. cereus* como control negativo del sistema, radica en que este microorganismo es muy similar a *Bt*, pero incapaz de producir cristales entomopatógenos (Kolstø y Carlson, 1993). Al incubar esporas de *B. cereus* tanto con suero negativo como positivo no se observó reconocimiento alguno, lo que confirmó que las condiciones seleccionadas para realizar este Western blot (suero 1/100 y conjugado 1/10000) no promueven la unión inespecífica de los anticuerpos a proteínas distintas a las de *Btk*.

Posteriormente, se procedió a evaluar la cinética de la síntesis de Cry1Aa en medio A80, a través de un Dot blot. Para ello se inmovilizó en la membrana, el sedimento celular tomado a los distintos tiempos evaluados. En la figura 24, se puede observar un reconocimiento basal de proteínas por parte del suero positivo en las primeras horas (0 y 24 horas), período en el cual el tipo celular predominante es células vegetativas (Brazon, 1998). Este resultado podría corresponder a los péptidos detectados a través del Western blot, los cuales se encontraban entre 35 y 50 KDa (figura 23, carril 4). Adicionalmente, como control se trató el complejo espора- cristal con el suero preinmune observando un débil reconocimiento, mientras que la proteína Cry1Aa electroeluida no fue detectada con este suero (figura 24). Esto confirma que el reconocimiento observado en las primeras horas, puede deberse a la presencia de anticuerpos contra otras proteínas de *Bt*.

Ahora bien, a partir de las 48 horas incrementó el reconocimiento del sedimento celular, por parte del suero positivo hasta las 80 horas. Tomando en cuenta que durante este periodo ocurre la esporulación en medio A80 y por tanto la producción de la δ -endotoxina (Arcas, 1984; Brazon, 1998; Peñalver, 2005), se podría inferir que este incremento está relacionado con la cantidad de proteína Cry1Aa presente en el medio. En este ensayo se obtuvieron resultados similares a los reportados por Carareto y Lemos (2000), quienes evaluaron la detección de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *israeliensis* en un medio de cultivo, logrando resultados satisfactorios.

Con la finalidad de confirmar los resultados visualizados en el Dot blot anterior, se realizó un Western blot. En la figura 25 se evidenció el reconocimiento de una banda de 140 KDa, correspondiente a Cry1Aa a partir de las 24 horas, aumentando su intensidad a través del tiempo hasta las 80 horas, lo que coincidió con los resultados obtenidos en el Dot blot. En este sentido, se debe destacar que en medio A80, la fase exponencial de crecimiento ocurre durante las primeras horas (Brazón, 1998; Peñalver, 2005). En este período no se esperaría la presencia de proteínas Cry. Estas δ -endotoxinas están asociadas a la fase estacionaria, en la cual se producen las esporas (Bravo y Cerón 2004), lo que explicaría la detección de la banda de 140 KDa a partir de las 24 horas. Este reconocimiento aumentó progresivamente hasta las 80 horas, etapa en la que el cultivo se mantiene en fase estacionaria.

Adicionalmente, se observó una serie de bandas de distintos pesos moleculares, destacando una dominante inferior a 50 KDa ya descrita en el Western blot anterior (figura 23). Curiosamente, el reconocimiento de esta proteína desaparece a las 80 horas, por lo que se infiere que esta proteína podría estar asociada a células vegetativas, las cuales están ausentes al final de la fase estacionaria (Brazon, 1998). Por otro lado, al observar el reconocimiento de Cry1Aa electroeluida (figura 25 carril 8), son evidentes los signos de degradación de la misma, lo que fortalece la hipótesis expuesta en la que parte de los reconocimientos adicionales son productos de la degradación de Cry1Aa. Como control negativo se utilizaron esporas de *B. cereus* (figura 25, carril 7), evidenciando que no hubo ningún reconocimiento a proteínas de

esta bacteria, lo que confirma que la especificidad de los anticuerpos presentes en el suero hiperinmune contra proteínas de Btk.

Los resultados expuestos en este trabajo, indican que es posible la purificación de los cristales a través de un método poco costoso y que mantiene intacta la actividad biológica de las δ -endotoxinas, basado en la interacción de las esporas con el hexano (Mounsef *et al.*, 2014). Sin embargo, por el nivel de purificación y rendimiento que ofrece, se recomienda la electroelución de la proteína para ensayos de inmunización. Aunado a esto, se propone un esquema de inmunización, el cual permite el desarrollo de un alto título de anticuerpos anti-Cry1Aa, en modelos lepidóridos. Estos sueros obtenidos son útiles para la detección de la δ -endotoxina aplicando diversas técnicas inmunoquímicas, demostrando que es posible reconocer los cristales en un medio de cultivo de una manera sencilla y rápida, a través de un Dot blot. Estos resultados, generan un importante aporte para llevar a cabo la evaluación de la producción de los cristales entomopatógenos, en el desarrollo de procesos fermentativos relacionados con la producción de bioinsecticidas, basados en *Bacillus thuringiensis*.

8. CONCLUSIONES

- ✿ La purificación de cristales a través de la interacción de las esporas con el hexano, permite un aislamiento parcial de los mismos. Esta técnica permite mantener la actividad biológica de las δ -endotoxinas.
- ✿ La electroelución constituye un método eficiente para la purificación total de la proteína Cry1Aa, obteniendo un mayor rendimiento en comparación la técnica de interacción de las esporas con el hexano. No obstante, se debe tener en cuenta que este método, genera la pérdida de actividad biológica en las muestras purificadas.
- ✿ En un modelo lepórido, es posible obtener un suero hiperinmune anti-Cry1Aa, mediante la aplicación de 300 μg de la δ -endotoxina en tres inmunizaciones realizadas cada 21 días, con adyuvante completo e incompleto de Freund, vía subcutánea.
- ✿ Las condiciones óptimas para el reconocimiento de anticuerpos anti-Cry1Aa, a través de un ELISAi son: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antígeno, suero diluido 1/400, conjugado 1/25000 y sustrato TMB.
- ✿ Las condiciones adecuadas para la detección de la proteína Cry1Aa a través de un Western blot son: suero diluido 1/100, conjugado 1/10000 y sustrato Diaminobenzidina.
- ✿ El Dot blot representa una técnica sencilla y eficiente para evaluar la cinética de síntesis de proteína Cry1Aa de *Btk* en medio A80, lo que constituye una

herramienta para el análisis de medios de cultivos eficientes y de bajo costo para la producción a gran escala de un bioinsecticida con base en *Btk*.

✿ El empleo del Dot blot para el desarrollo de medios de cultivo, promueve la fabricación a gran escala de un biocontrolador que tendrá como principio activo cristales de *Btk*., lo que implica una sustitución a largo plazo de los insecticidas químicos disminuyendo sus efectos negativos en los agroecosistemas y la salud humana.

9. RECOMENDACIONES

- ✿ Debido a la evidencia de degradación de la proteína Cry1Aa durante el período de experimentación se recomienda el empleo de inhibidores de proteasas una vez culminado el proceso de purificación.
- ✿ Se debe estandarizar la cantidad de proteína a utilizar en el Wester blot a fin de reducir las posibles interacciones inespecíficas con el anticuerpo secundario, permitiendo una mayor resolución de las bandas producto del reconocimiento.
- ✿ En el Western blot del complejo espora cristal, se evidenció que el suero preinmune poseía anticuerpos contra proteínas ajenas a la δ -endotoxina, producto de una exposición previa a *Bt*, por lo que para futuras investigaciones se recomienda una evaluación antes de la inmunización, para evitar reacciones cruzadas. Adicionalmente de vigilar las condiciones especiales de cautiverio en los animales de experimentación.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, K. y. (2004). Inmunología celular y molecular (5 ed.). Madrid, España: Elsevier Science and Elsevier Imprim.
- Agaisse, H. y Lereclus, D.. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *Journal of Bacteriology*, 177(21): 6027- 6032.
- Ahmad, W., y Ellar, J. D. (1990). Direct mutagenesis of selected regions of a *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein. *FEMS Microbiol. Lett.*, 68, 97:104.
- Andersen, P. (1994). Effective Vaccination of Mice against Mycobacterium tuberculosis Infection with a Soluble Mixture of Secreted Mycobacterial Proteins. *Infection and Immunity*, 2536-2544.
- Ang, B., Nickerson, J., y Kenneth, W. (1976). Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 4, 625:626.
- Arcas, J. (1984). A new medium for growth and d-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnology Letters*, 6, 495:500.
- Arcas, J. (1996). Produccion de bacterias entomopatogenas. En R. Lecuona, *Microorganismos Patógenos empleados en el control microbianode insectos plaga* (págs. 207-223). Buenos Aires, Argentina: Talleres Graficos Mariano Mas.
- Aronson, A. I., Beckman, W., y Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbioll. Rev.*, 50, 1-24.
- Arrivillaga, J., & Ochoa, G. (2009). *Bacillus thuringiensis*: Avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. *Boletin de Marialologia y Salud Ambiental*, XLIX(2), 181-191.
- Bechtel, D., y Bulla, L. (1976). Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1472-1481.

- Bechtel, D, y Bulla, L. (1982). Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* sporulation. *Journal of ultrastructure research*, 79(2), 121-132.
- Beegle, C. C., y Yamamoto, T. (1992). History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *The Canadian Entomologist*, 124(4), 587:616.
- Bietlot, H., Carey, P. P., Kaplan, H., Lessard, T., y Pozsgay, M. (1989). Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem J*, 260, 87:91.
- Brar, S. K. (2006). Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water Research*, 40, 1310-1320.
- Bravo, A., y Cerón, J. (2004). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogota: Buena Semilla.
- Bravo, A., y Quintero, R. (1993). Importancia y potencial de *Bacillus thuringiensis* en el control de insectos plaga. Oficina regional para América Latina y Chile.
- Bravo, A., Sarjeet, G., y Soberon, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423:435.
- Brazon, J. (1998). Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* con base en subproductos agroindustriales de bajo costo. Trabajo Especial de Grado. Caracas, Venezuela: Facultad de Ciencias.
- Bulla, L. A., Bechtel, D. B., Kramer, K. J., Shethna, Y. I., Aronson, A. I., y Fitz-James, P. C. (1980). Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 8, 147:204.
- Burges, H. D., y Hurst, J. A. (1977). Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *J. Invertebr. Pathol.*, 30(2), 131:139.

- Cao, J., Tang, J., Strizhov, N., Shelton, A., y Earle, E. (1999). Transgenic broccoli with high levels of *Bacillus thuringiensis* Cry1C protein control diamondback moth larvae resistant to Cry1A or Cry1C. *Molecular Breeding*, 5, 131-141.
- Carareto, M. L., y Lemos, M. (2000). Methodology for fast evaluation of *Bacillus thuringiensis* crystal protein content. *Braz. J. Microbiol.*, 31(3), 216:219.
- Carozzi, N. B., Kramer, V. C., Warren, G. C., Evola, S., y Koziel, M. G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol*, 57(11), 3057-3061.
- Chang, R. (2010). *Química* (10 ed.). Mexico DF: McGraw-Hill.
- Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry* (pp. 306-308). New York: Worth Publishers.
- Cragie, J. (1931). Studies on serological reactions of flagella of *B. typhosa*. *J. Immunol.*, 21, 417:511.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., VanRie, J., Lereclus, D., y otros. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. and Mol. Biol*, 62, 807:813.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., y otros. (2016). *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Recuperado el 12 de Marzo de 2016, de <http://www.btnomenclature.info/>
- Crowther, J. R. (2000). *The Elisa Guidebook*. Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press.
- Da Costa Lima, P. S., Lemos, M., Lemos, E., & Carareto, L. (2000). Transference of a crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* and its expression in *Bradyrhizobium* sp. cells. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 361-365.
- De Duve, C., Berthet, J., & Beaufay, H. (1959). Gradient centrifugation of cell particles. Theory and applications. *Progr. Biophys. Biophys. Chem*, 9, 325.

- De Maagd, R., Bravo , A., y Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends. Genet.*, 17, 193:199.
- Doyle, F. N.-H. (1984). Hydrophobic Characteristics of *Bacillus* Spores. *Current Microbiology*, 10, 329-332.
- Dhurua, S. &. (2011). Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders)(Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest management science*, 67(8), 898-903.
- Elorta, R. (1985). Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides.
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- Errington, J. (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: Regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbio. Rev.*, 57, 1:33.
- Eleizalde, M., Caballero, H., & Reyna, A. (2007). Evaluacion y mejoramiento del ensayo inmunoenzimatico (ELISA) para el diagnostico de la anaplasmosis bovina, utilizando la MSP5 recombinante como antígeno. *Revista cientifica FCV-LUZ, XvII*, 349-356.
- Environmental Protection Agency. Pest Control and Pesticide Safety for Consumers. <https://www.epa.gov/safepestcontrol> [Consulta: 29 de Mayo de 2016].
- Fast, P. G. (1972). The 6-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III. A rapid method for separating parasporal bodies from spores. *J. Invertbr. Pathol.*, 20, 139:140.
- Federici, B. (1998). Transgenic Bt crops and resistance: Broadscale use of pest-killing plants to be true test. *California Agriculture*, 52(6), 14-20.
- Feitelson, J. S., Payne, J., y Kim, L. (1992). The *Bacillus thuringiensis* family tree: insects and beyond. *Bio/technology*, 10, 63:71.

- Flores, H., Soberon, X., Sanchez, J., y Bravo, A. (1997). Isolated domain II and III from the *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin binds to lepidopteran midgut membranes. FEBS Letter, 313:318.
- Fujii, U., Tanaka, S., Stsuki, M., Hoshino, Y., Morimoto, C., Kotani, T., y otros. (2013). CryAa binding to the cadherine receptor does not require conserve amoniacid secuencias in the domain II loops. Biosci. Rep., 1(33), e00010.
- Gajardo, R., Vitelli, J., Rodirguez-Lemonie, V., y Dorta, B. (2010). Aislamiento y Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 en el nororiente de Venezuela. Estudios multidisciplinarios de las palometa peluda Hylesia metabus. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas (IVIC). Caracas, Venezuela: Hernandez JV, Osborn F y JE Conde.
- Gillis, A. (2013). El arsenal de *Bacillus thuringiensis*: su uso en manejos agrícolas y en la industria alimentaria. Entomotropica(28), 106-107.
- Gringorten, J. L., Milne, R. E., Fast, P. G., Sohi, S. S., y Van Frankenhuyzen, K. (1992). Supression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. J. Invertebr. Pathol., 60, 47-52.
- Harlow, E., y Lane, D. (1998). Antibodies: A Laboratory Manual. Nueva York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hernández, C. S., y Ferré, J. (2005). Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ja, Cry1Fa and Cry1Ac in Helicoverpa armiguera, Helicoverpa zea and Spodoptera exigua. Appl. Environ. Microbiol.(71), 5627-5629.
- Hernández-Rodríguez CS, H.-M. P. (2012). Specific binding of radiolabeled Cry1Fa insecticidal protein. Appl. Environ. Microbiol., 78, 4048-4050.
- Herzog, V. (1973). A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3, 3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. Analytical biochemistry, 55(2), 554-562.
- Hofte, H., y Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of Bacillus thuringiensis. Miicrobiol. Mol. Biol. Rev., 53(2), 242:255.

- Holmberg, A., Sievanen, R., y Carlberg, G. (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: Process analysis study. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1707:1724.
- Huerta, D. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades entomocidas, para vectores transmisores de enfermedades metaxénicas . Tesis doctoral. Lima, Peru: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ishiwata, S. (1901). Examination of sotto disease bacillus. *Kyoto Sangyo Koshuio Sanji Hokoku.* , 346-347.
- Jacobs, E., y Clad, A. (1986). Electroelution of fixed and stained membrane proteins from preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels into a membrane trap. *Analytical Biochemistry*, 154, 583-589.
- Jian, X., Qin, L., Xiang-dong, Y., y Shu-de, Z. (2006). A review of recent development of *Bacillus thuringiensis* ICP genetically engineered microbes. *Entomological Journal of East China*(15), 53-58.
- Khetan, S. (2001). Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. *Microbial Pest Control*, 14:19.
- Khota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynsk, S. F., Gould, F., y Moar, W. J. (1998). Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Current Issue*, 96(5), 1840–1845.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*. Macmillan.
- Knowles, B. H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Advan. Insect Physiol*, 24, 275:308.
- Kolstø, A., y Carlson, C. (1993). A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *Journal of Bacteriology*, 175, 1053–1060.

- Kroeger, A. H. (1995). The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropica*, 60(1), 47-57.
- Kronstad, J. W., Schnepf, H., y Whiteley, A. (1983). Diversity of locations of *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *J. Bacteriol.*, 154, 419:428.
- Krywienczyck, J., Dulmage, H. T., Hall, I. M., Beegle, C., Arakawa, K., y Fast, P. G. (1979). Occurrence of *kurstaki* k-1 Crystal Activity in *Bacillus thuringiensis* su bsp. *thuringiensis* Serovar (H1). *J. Invertebr. Pathol.*, 37, 62:65.
- Kurstak, E. (1962). Données sur l'epizootie bacterienne naturelle provoguée par un *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis* sur *Ephestia kuhniella*. *Entomophaga Memoire Hors*, 2, 245-247.
- Laemmli, K. (1972). Cleavage of structural proteín during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, M. K., You, T. H., Curtiss, A., y Dean, D. H. (1996). Involvement of two amino acid residues in the loop region of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in toxicity and binding to *Lymantria dispar*. *Biochem. Biophys. Res. Coummun.*, 229, 2845:2849.
- Lee, M. K., Jenkins, L. Y., You, T. H., Curtis, A., Son, J. J., Adang, M. J., y otros. (2001). Mutations at the arginine residues in alpha8 loop of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N. *FEBS Lett*(408), 108-112.
- Li, J., Carrol, J., y Ellar, D. J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353, 815:821.
- Liem, H. H.-F.-E. (1979). Quantitative determination of hemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, a safe substitute for benzidine. *Analytical biochemistry*, 98(2), 388-393.

- Lieu , M. H., Humphreys , T., & Antanavi, E. (2005). *Cell signally technology*. Obtenido de Western Blotting Troubleshooting Guide: <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=western-trouble>
- Liu, B. L., y Tzeng, Y. M. (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. *Bioprocess Engineering*, 18(6), 413-418.
- López-Meza , J., y Ibarra, J. (1996). Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 62, 1306:1310.
- Malik, K., y Riazuddin, S. (2006). Immunoassay-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* -endotoxins, entomocidal to cotton aphids (*aphis gossypii*) and whiteflies (*bemisia tabaci*). *Pakistan Journal of Botanical*, 38(3), 757-765.
- Morin S, B. R. (2003). Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc Natl Acad Sci*(100), 5004-5009.
- Mounsef, J. R., Salameh, D., Awad, M. K., Chamy, L., Brandam, L., y Lteif, R. (2014). A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 147:149.
- Murphy, K., Travers, P., y Walport, M. (2009). *Inmunobiologia de Janeway*. Mexico D.F.: McGraw Hill.
- Murty, M. G., Srinivas, G., Bora, R. S., y Sekar, V. (1994). A simple method for separation of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* using carboxymethyl cellulose column chromatography. *J. Microbiol. Methods*, 19(2), 103:110.
- Nester, E., Thomashow, L., Metz, M., y Gordon, M. (2002). 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. Obtenido de <http://www.asmusa.org>
- Nickelson, K. W., y Bulla, L. (1992). Physiology of spore forming bacteria associated with insect. *Applied Microbiology*, 1, 124:128.

- Obrist, L. B., Dutton, A., Romeis, J., y Bigler, F. (2006). Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. *BioControl*, 51, 21-48.
- OMS. (2015). <http://www.who.int/>. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/> [Consultado: 6 de Mayo de 2015]
- Pardo, L. L., Soberon, M., y Bravo, A. (2013). *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action insect resistance and consequences for crop protection. *Microbiol*, 37, 3-22.
 - Peñalver, C. Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Pearson, D., y Ward, O. P. (1988). Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnology Letters*, 10(7), 451-456.
- Pesticide Action Network, PAN. (2010). Environmental effects of pesticides. An impression of recent scientific literature. Bruselas: PAN Europe.
- Pesticide Management Education Program. PMEP. 2007. <http://web.archive.org/web/20090427170313/http://pmep.cce.cornell.edu/index.html>.
- Pietramonio, P. V., y Gill, S. S. (1996). *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action on the insect midgut. En M. J. Lehane, y P. F. Bilingsley, *Biology of the Insect Midgut* (págs. 354-342). Londres: Chapman y Hall.
- Pusztai M, F. P. (1991). The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem J*, 273, 43:47.
- Ramirez, D. (1999). *Growth kinetics of Bacillus thuringiensis batch, fed-batch and continuous bioreactor cultures*. Ontario-Canada: University of Western Ontario.
- Reguero, M. T., Cerón, J., Uribe, D., Mora, C., y Amaya, L. D. (1994). Obtención y caracterización de anticuerpos contra endotoxinas con actividad

bioinsecticida CryI, CryIII y Cry IV, asociadas al cristal de tres cepas patrón de *Bacillus thuringiensis*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas(22), 31:35.

- Reyna, A., Eleizalde, M., y Silva, A. (2007). Assessment of Chromogen suitability in ELISA for the detection of Anaplosmosis and Trypanosomosis. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 1-11.
- Rosas-García, N. M. (2008). Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. Rev. Colomb. Biotecnol., 10(1), 49:63.
- Sanchez, J. (2014). *Identificación y producción de proteínas de Bacillus thuringiensis: Evaluación de su actividad insecticida*. Universidad Pública de Navarra.
- Sangdala, M., Walters, F. S., English, L. H., y Adang, M. J. (1994). A mixture of Manduca sexta aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1a insecticidal toxin binding and Rb86+ y K+ efflux in vitro. J. Biol. Chem., 10088-10092.
- Sauka, D., y Benintende, B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. argent. Microbiol, 40, 124:140.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., y otros. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62(3), 775:806.
 - Schmunis, G. A., y Dias, J. C. P. (2000). La reforma del sector salud, descentralización, prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores Health system, decentralization, and the control of vector-borne diseases. Cad. Saúde Pública, 16(Sup 2), 117-123.
- Schwartz, J. L., Juetau, M., Grochulsky, P., Cygler, M., Praefontain, G., Brosseau, R., y otros. (1997). Restriction of intramolecular movements within the Cry1Aa toxin molecule of *Bacillus thuringiensis* strains collection. Appl. Environ. Microbiol.(71), 1765-1774.

- Séralini GE, Cellier D , y de Vendomois JS . (2007). New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity . Arch. Environ. Contam. Toxicol., 4(52), 596–602.
- Sharpe, E. S., Nickerson , K. W., Bulla, L. A., y Aronson , J. N. (1975). Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. Appl. Microbiol., 30, 1052:1053.
- Sharpe, E. S., Herman, A. I., y Toolan, S. C. (1978). Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* by flotation. J. Invertebr. Pathol., 34, 315:216.
- Smith, R. A. (1982). Effect of strain nd medium vriation on mosquito toxin production by *Bacillus thuriengiensis* var. israeliensis. Candian Journal of Microbiology, 28, 1089:1092.
- Smith, P., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. y Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry, 150(1), 76-85.
- Smith, R. A., y Couche, G. A. (1991). The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. Applied and Environmental Microbiology, 57(1), 311:315.
- Sneath, P. (1986). Spore forming gram-positive rods and cocci. En P. H. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, y J. Butler (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (págs. 1104-207). Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- Soberon, M., y Bravo, A. (2008). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. En A. Lopez-Mungia, Una ventana al quehacer científico (págs. 303-314). Instituto de Biotecnología de la UNAM.
- Tapp, H., y Stotzky, G. (1995). Dot Blot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Monitoring the Fate of Insecticidal Toxins from *Bacillus thuringiensis* in Soil. Applied and Environmental Microbiology, 61(2), 602-209.
- Thomas, W. E., y Ellar, D. J. (1983). *Bacillus thuringiensis* var israelensis crystal deltaendotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J. Cell Sci., 60(1), 181:197.

- Tiewsiri K, W. P. (2011). Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. P Natl Acad Sci-Biol, 108, 14037–14042.
- Tirado-Montiel, M. L. (2001). Wastewater treatment sludge as a raw material for the production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Water Research, 35, 3807–3816.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci, 76, 4350:4354.
- University of California San Diego (UCSD). (2010). History of Bt. Obtenido de http://www.bt.ucsd.edu/bt_history.html
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Bulla, T. H., y Bulla, L. A. (1995). Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem., 270, 5490:5494.
- Valero, J. R. (1999). Microbial control of defoliating forest insects. Recent Research Developments in Microbiology, 3, 455-464.
- Valmaseda, T., Alba, L., Ochoa, R., Moya, A., Pino, Y., y Esnard, C. S. (2004). Determinación de las condiciones de ensayo óptimas en un ELISA para la detección de anticuerpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* O11. VaccinMonitor, 13(3), 18-25.
- Voller, A., Draper, C., Bidwell, D., y Barlett, A. (1975). Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. The Lancet, 426-428.
- Yaoi, K., y Dean, D. H. (1997). Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* CryA1a toxin. Eur. J. Biochem., 246, 652:657.
- Zenner, P., y Borrero, F. (1993). Resistencia del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a algunos insecticidas y su manejo. Boletín de Sanidad Vegetal , 13, 39:59.

- Zhang, X., Griko, N., Corona, S., y Bulla, L. J. (2008). Enhanced hexocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. *Comp. Biochem. Physi. Biochem. Mol. Biol.*, 149: 58.
- Zhu, Z. S., Ken, Carlson, Brooke, Allan, y Phil. (1989). Separation of protein crystals from spores of *Bacillus thuringiensis* by Ludox gradient centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(5), 1279:1281.
- Zwahlen, C., Hilberk, P., Gugerli, P., y Nentwig, W. (2003). Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology*, 765-775.