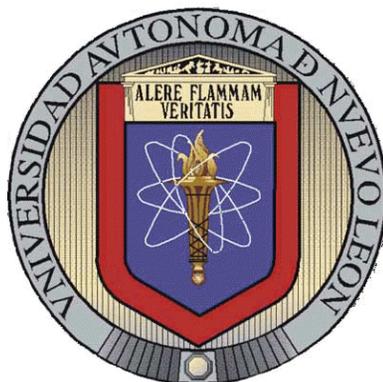


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y su toxicidad
contra tres poblaciones de *Aedes aegypti***

P O R

M.C. CLAUDIA IVONNE FERNANDEZ AVILA

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

Cd. Universitaria

Diciembre de 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y su toxicidad
contra tres poblaciones de *Aedes aegypti***

**Tesis como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

Presenta

M.C. CLAUDIA IVONNE FERNÁNDEZ ÁVILA

COMISIÓN DE TESIS

Presidente

Dr. Benito Pereyra Alférez

Secretario

Dra. Isela Quintero Zapata

1 Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera

2 Vocal

Dra. María Guadalupe Maldonado Blanco

3 Vocal

Dra. Myriam Elías Santos

Cd. Universitaria

Diciembre de 2010

DEDICATORIA

1. A Dios porque me ha dado fortaleza y sabiduría para cumplir cada unos de mis propósitos.
2. A mi madre por haberme brindado todo su apoyo incondicional, y que gracias a su esfuerzos hoy puedo decir que soy una profesional.
3. A mi padre por el amor y cariño que me brindó, y que siempre estará presente en esta nueva etapa que tomara mi vida.
4. A mis hermanos, Gaby, Carlos, Manuel y Sergio quienes confiaron en mi y estuvieron conmigo en todo el transcurso de la carrera.
5. A mis tías Soco y Manuela que siempre me dieron fortaleza para seguir adelante y no me abandonaron en los momentos difíciles de mi vida.
6. A mis sobrinos Iam, Leonel, Damián y sobrinas Camila y Dayra que con cada una de sus sonrisas hicieron que en los momentos difíciles me levantara.
7. A mis amigos especiales Lupita, Hayde, Ángeles, Samuel que me brindaron su confianza y estuvieron conmigo en los momentos difíciles.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la sabiduría y permitirnos culminar una meta más en nuestras vidas.

A nuestras familias, por su apoyo incondicional y estar presente en cada momento que se les necesitó para brindarnos su confianza y estimulación.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez y a la Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto

Al laboratorio L4 del Instituto de Biotecnología por su apoyo durante el desarrollo del proyecto

A la Dra. Lilia, Dra. Katiushka, Dra. Guadalupe Maldonado al Dr. Humberto Quiroz por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su colaboración durante nuestra formación profesional.

AL CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) por la beca recibida para los estudios de Doctorado.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 4 DEL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA Y EN EL LABORATORIO DE
ENTOMOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS/UANL,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ

ÍNDICE GENERAL

Sección	Página
1 RESUMEN.....	1
ABSTRAC	2
2 INTRODUCCIÓN.....	3
3 OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4 ANTECEDENTES.....	5
4.1 Control biológico.....	5
4.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
4.2.1 Clasificación de las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
4.2.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry.....	9
4.3 Control biológico de mosquitos.....	13
4.3.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>israelensis</i>	13
4.3.2 Ecología de <i>Bti</i>	14
4.3.3 Generalidades de <i>Bti</i>	15
4.3.4 Resistencia.....	15
4.3.5 Toxinas y mecanismos de acción de <i>Bti</i>	16

4.4	Dengue.....	17
4.5	Biología de <i>Aedes aegypti</i>	18
4.5.1	Características biológicas de <i>Aedes aegypti</i>	18
4.5.1.1	Huevo.....	18
4.5.1.2	Larva.....	19
4.5.1.3	Pupa.....	21
4.5.1.4	Adulto.....	21
5	MÉTODOS.....	23
5.1	Establecimiento de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i>	23
5.1.1	Sitios de recolección de pupas y larvas de <i>Aedes aegypti</i>	23
5.1.2	Colectas de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	23
5.1.3	Estudio taxonómico.....	24
5.1.4	Crianza de larvas.....	25
5.1.5	Crianza de adultos.....	25
5.2	Caracterización fisicoquímica de las cepas nativas de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> RV4-8 y RV8-1.....	27
5.2.1	Microorganismos.....	27
5.2.1.1	Obtención de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	27
5.2.1.2	Mantenimiento de las cepas.....	27
5.2.2	Determinación de la morfología del cristal de las cepas	27
5.2.3	Análisis proteico del complejo espora cristal.....	28
5.2.4	Determinación del perfil plásmidos.....	28
5.2.5	Determinación de la producción de la β -exotoxina.....	29
5.2.6	Determinación de la actividad hemolítica.....	30
5.3	Evaluación de la actividad insecticida de las cepas de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> RV4-8 y RV8-1	31

5.3.1	Obtención del complejo espora cristal.....	31
5.3.1.1	Liofilización del complejo espora cristal.....	32
5.3.1.2	Solubilización del complejo espora cristal.....	32
5.3.1.3	Cuantificación de proteína.....	32
5.3.2	Determinación de las dosis letales media (DL50) de las cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> RV4-8 y RV8-1	33
6	RESULTADOS.....	35
6.1	Establecimiento de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i>	35
6.1.1	Recolección de larvas y mosquitos.....	35
6.1.2	Estudio taxonómico.....	35
6.1.2.1	<i>Identificación de larvas de Aedes aegypti</i>	35
6.2	Caracterización fisicoquímica de las cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> RV4-8 y RV8-1.....	38
6.2.1	Morfología del cristal de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> RV4-8 y RV8-1.....	38
6.2.2	Análisis proteico	39
6.2.3	Perfil plásmidico.....	39
6.2.4	β -exotoxina.....	40
6.2.5	Evaluación de la actividad hemolítica.....	41
6.3	Evaluación de la toxicidad de las cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas del tercer estadio de <i>Aedes aegypti</i>	42
6.3.1	Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) aplicando el Método Estadístico Probit.....	42
7	DISCUSIÓN.....	50
8	CONCLUSIONES.....	55
9	LITERATURA CITADA.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I	Concentraciones del complejo espora-cristal de las cepas RV4-8 y RV8-1 utilizadas para determinar la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos..... 31
II	Concentraciones del complejo espora –cristal utilizadas para determinar la dosis letal media (DL ₅₀) de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> RV4-8, RV8-1y HD225 en <i>Aedes aegypti</i> provenientes de los estados de Nuevo León, Veracruz y Morelos..... 33
III	Especies de Mosquitos identificados en los Estados de Nuevo León, Veracruz y Morelos..... 35
IV	Espectro de absorción de los precipitados etanolicos de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> RV4-8, RV8-1 HD-59 Y HD-1..... 41
V	DL ₅₀ Y DL ₉₀ <i>Bacillus thuringiensis</i> RV4-8, RV8-1 y HD-225 Contra larvas del tercer estadios de <i>Aedes aegypti</i> provenientes del estado de Nuevo león, del estado de Veracruz y del estado de Morelos..... 43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cristales y esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2	Modo de acción de las proteínas Cry.....	9
3	Modo de acción de las proteínas Cyt.....	11
4	Modo de acción de la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	17
5	Ciclo biológico del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	18
6	Larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	19
7	Clave ilustrada para larvas Del cuarto estadio de <i>Aedes aegypti</i>	20
8	Morfología de la pupa de <i>Aedes aegypti</i>	21
9	Morfología del adulto hembra de <i>Aedes aegypti</i>	21
10	Fotografía de la jaula de mantenimiento de la cría de <i>Aedes aegypti</i>	26
11	Foto 3.2. Puntos de ovoposición.....	26
12	Bioensayos de laboratorio. Determinación de las concentraciones letales media (DL50) de <i>Bacillus thuringiensis</i>	34
13	Sifón con un par de cerdas simples o múltiples.....	36
14	Extremo del abdomen de <i>Aedes</i> . Silla de montar del segmento X incompleta.....	36
15	Brocha ventral con cinco o más pares de cerdas que nacen de una grilla.....	36
16	Dientes del peine del segmento VIII dispuestos en una fila, con espina central larga.....	37

17	Torax con espinas laterales muy evidentes.....	37
18	Dientes del peine del segmento VIII con espinas laterales visibles.....	37
19	Cerda 7 de la cabeza simple.....	37
20	Microfotografías al microscopio electrónico de la morfología de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> : A. RV8-1; B.RV4-8.....	38
21	Análisis comparativo de la composición del complejo espora cristal solubilizado de <i>B. thuringiensis</i> RV4-8 Y Rv8-1 por SDP- PAGE.....	39
22	Geles de agarosa: (A: 1.5%; B: 1%; C: 0.7 %). Análisis comparativo de los fragmentos amplificados de los genes <i>cry</i> de <i>B. thuringiensis</i> RV4-8 y RV8-1.....	40
23	Actividad hemolítica de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> RV4-8 Y RV8-1 sobre eritrocitos humanos.	41
24	Graficas del Análisis Probit <i>Bacillus thuringiensis</i> RV4-8 contra <i>Aedes aegypti</i>	44
25	Graficas del Análisis Probit <i>Bacillus thuringiensis</i> RV8-1 contra <i>Aedes aegypti</i>	47

1. RESUMEN

Mucha atención ha recibido el control de agentes vectores de enfermedades en el humano, especialmente el control biológico de mosquitos como *Aedes aegypti*, vector del dengue el cual presenta dificultad debido, principalmente, porque las poblaciones presentan marcada variación en la susceptibilidad a los agentes de biocontrol. En este trabajo, nos propusimos evaluar cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra tres poblaciones del mosquito *A. aegypti*. La primera etapa consistió en el establecimiento y mantenimiento de la cría del mosquito. La caracterización de las cepas nativas de *B. thuringiensis* RV4-8 y RV8-1, mostró la presencia de cristales bipiramidales, esféricos y cuadrados, compuesto de proteínas de 130, 70 y 27 kDa, respectivamente. Ambas cepas hemolizaron eritrocitos humanos lo cual demuestra la presencia de Cyt y resultaron negativas para la β -exotoxina. El resultado de la toxicidad, tercera etapa, demostró que las cepas RV4-8 y RV8-1 son muy distintas ya que la dosis letal media (DL_{50}) para las poblaciones de estado de Nuevo León, Veracruz y Morelos expuestas a RV4-8 fueron de 0.027, 0.03991 y 0.6756 $\mu\text{l/ml}$ respectivamente, mientras que para la RV8-1 fueron 0.0796 $\mu\text{l/ml}$, para Nuevo León; 0.725 $\mu\text{l/ml}$ para Veracruz y 0.8160 $\mu\text{l/ml}$ para la proveniente de Morelos.

Los resultados sugieren que existe alta variabilidad en las población de *A. aegypti*, la proveniente de Nuevo León es la mas susceptible seguida en orden decreciente por la población proveniente de Veracruz y Morelos.

ABSTRAC

A great attention has been addressed to the control of vectors implicated in human illness, in special the biological control of mosquitoes like *Aedes aegypti*, vector of dengue, because, it mosquito present a high variability in the susceptibility of populations of mosquitoes. In this work, we proposed to evaluate native strains of *Bacillus thuringiensis* against three different *A. aegypti* populations. The first step was the establishment and maintenance of the mosquito population. In the second stage, we characterized the *B. thuringiensis* RV4-8 and RV8-1 strains, who produced spherical, bypyramidals and square crystal-shape with molecular mass of ca. 130, 65 and 27-25 kDa, respectively. It was observed that both *B. thuringiensis* RV4-8 and RV8-1 strains are very both similar in total plasmid profile. Results showed that no correlation between plasmid profile and toxicity *B. thuringiensis* RV8-1 strain show to be less toxic than *B. thuringiensis* RV4-8. The spore-crystal complex of both strains showed hemolytic activity on human erythrocytes and these ones were negative for β -exotoxin. In the third stage realized the bioassays to determine the toxicity, DL_{50} , of the spore-crystal mixtures against three different *A. aegypti* populations obtained from Nuevo León, Veracruz and Morelos States. The toxicity of RV4-8 strain for Nuevo León, Veracruz and Morelos was of 0.027, 0.03991 and 0.6756 μ l /ml, respectively. While that the RV8-1 strain had a DL_{50} of 0.0796 μ l/ml for colony from Nuevo León; 0.725 μ l/ml for Veracruz and 0.8160 μ l/ml for colony from Morelos. Results showed a great variability among *A. aegypti* population, and that colony from Nuevo Leon State is the most susceptible followed by Veracruz and Morelos populations.

INTRODUCCIÓN

En años recientes el uso excesivo de insecticidas químicos como, organofosforados, carbamatos y piretroides responsables de la resistencia generada por los vectores del dengue, ha traído como resultado alta toxicidad para los humanos y su persistencia en el ambiente con acumulación en grasas de animales y humanos. Frente a estos problemas se plantea la OMS ha continuado buscando nuevos métodos de control, destacando el control biológico que utiliza directamente enemigos naturales. De los métodos de control biológico, el microbiológico ha merecido el mayor apoyo y atención en todo el mundo, bacterias esporágenas han demostrado ser más específicas en su toxicidad contra organismos blancos que otros insecticidas; son biodegradables, inocuas, para el hombre, animales y plantas, además de que su auto dispersión asegura su eficacia en sitios inaccesibles y tienen un alto efecto residual que las convierte en biolarvicidas muy económicos al no ser necesarios su aplicación frecuente.

Actualmente las estrategias usadas para el control biológico de mosquitos depende principalmente de productos basados en bacterias con actividad tóxica contra mosquitos como *Bacillus thuringiensis subsp israelensis* y *Bacillus sphaericus*. Estas bacterias tienen altos grados de especificidad contra insectos y seguridad para el medio ambiente, características que las hacen apropiadas para ser usadas contra larvas de mosquitos, ambas bacterias sintetizan inclusiones cristalinas durante el proceso de esporulación y son tóxicas contra larvas cuando son ingeridas por estas. Sin embargo en los últimos años los insectos han desarrollado resistencia a las toxinas de *Bacillus sphaericus*, aunque no se ha descrito resistencia a *Bacillus thuringiensis subsp israelensis*, por tal motivo, nace la necesidad de buscar nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar las proteínas del cristal de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* RV4-8 y RV8-1 y evaluar la actividad biológica contra tres poblaciones distintas de *Aedes aegypti*

3.2 Objetivos específicos

1. Establecer colonias de *Aedes aegypti* provenientes de los estados de Nuevo León, Veracruz y Morelos, en condiciones controladas de laboratorio.
2. Determinar el peso molecular de las proteínas del cristal, la presencia de β -exotoxina y plásmidos de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* RV4-8 y RV8-1.
3. Determinar la actividad biológica del complejo espora cristal de las cepas nativas *Bacillus thuringiensis* RV4-8 y RV8-1 en las tres poblaciones de *Aedes aegypti*

4. ANTECEDENTES

4.1 CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico puede definirse como el control de plagas por el uso directo o indirecto de enemigos naturales, depredadores y patógenos; es el uso de poblaciones de un organismo para controlar otro. Se ha demostrado que el uso de bacterias esporógenas es muy importante en el control de mosquitos vectores debido al alto grado de actividad letal que presentan; una de ellas es el *Bacillus thuringiensis*. Esta bacteria Gram positiva produce toxinas altamente específicas contra insectos (Bravo *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 2006). Al esporular produce cristales paraesporales formados por la glicoproteína δ -endotoxina y que causa parálisis del epitelio intestinal, ruptura de las microvellosidades, cambios en los organelos citoplasmáticos y finalmente la muerte de la larva. Los productos que contienen *B. thuringiensis* (Bt) son notablemente seguros, hasta ahora no se han registrado efectos dañinos en ensayos de seguridad con abejas, vertebrados y humanos.

4.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, morfológicamente relacionada con *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* (Dharmisthinil *et al.*, 1985). Estas tres especies bacterianas, durante su ciclo de vida, presentan dos fases principales, la fase de crecimiento vegetativo en donde las bacterias se duplican por bipartición cada 30-90 min. dependiendo del medio de cultivo y la fase de esporulación, la cual es un programa de diferenciación de bacteria a espora. El programa de

diferenciación consta de siete estadios, se dispara cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes (Arantes and Lereclus 1991).

La espora es una forma de vida latente que puede permanecer en el ambiente por periodos de tiempo muy largos (años) en ausencia de humedad y nutrientes. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio rico que contenga los nutrientes necesarios puede germinar para comenzar de nuevo el crecimiento vegetativo. Bt es considerada una bacteria ubicua ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A Bt se le diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis* por contener un cuerpo paraesporal conocido como cristal, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas (Fig. 1). Esta constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Carreras *et al.*, 2003). La primera bacteria fue aislada del gusano de seda en 1902 (Ben-Dov *et al.*, 1999)

Durante muchos años se pensó que Bt era un patógeno de lepidópteros porque solo se aislaron cepas activas contra este tipo de insectos. En 1978, se encontró una bacteria *Bt subsp israelensis* capaz de matar mosquitos y en 1983 una *Bt subsp tenebrionis* activa contra insectos coleópteros. Fue a partir de entonces que un gran numero de

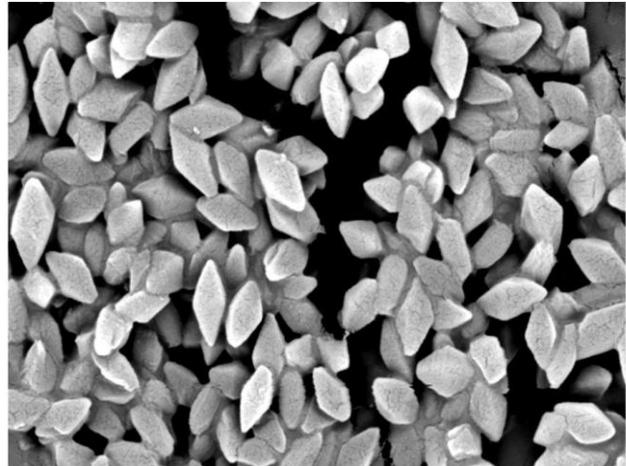


Figura 1 Cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis*

investigadores en todo el mundo se dedico a buscar mas de estas bacterias y se ha encontrado una gran diversidad de estas, las cuales se han caracterizado por su

serotipo H-flagelar, o sea, por las proteínas presentes en el flagelo en mas de 45 serotipos y 58 serovariedades diferentes.

Poco se sabe sobre el hábitat natural de Bt, sin embargo, dado su requerimiento vitamínico y de algunos aminoácidos como glutámico, así como a su actividad bioinsecticida, se piensa que la forma de vida vegetativa solo se presenta en el interior de insectos que infecta hasta que esporula y es liberada al medio ambiente donde permanece en forma de esporas, lo que explica su amplia distribución.

En especies de Bacillus, la endospora se desarrolla en un esporangio que consiste de dos compartimentos celulares conocidos como la célula madre y la espora. Las proteínas insecticidas se acumulan en la célula madre durante el proceso de esporulación. En el estadio I se inducen los genes que iniciaran la esporulación. Este punto puede ser reversible si se adicionan nutrientes. Sin embargo, a partir del estadio II de esporulación, el proceso es irreversible y continua hasta finalizar con la formación de la espora. En el estadio II, la bacteria forma un septo de división asimétrico. En el estadio III, se inicia la síntesis del cristal insecticida, la cual continuara hasta el final de la esporulación. La síntesis del cristal insecticida se da a partir de dos promotores que funcionan secuencialmente (Bt1 y Bt2). El primero es activado por sigma E durante los estadios III y IV y el segundo por sigma K durante los estadios V y VI. Durante estos pasos se lleva conjuntamente la formación de la espora. Finalmente en el estadio VII se sintetizan enzimas líticas que liberan a las esporas y los cristales insecticidas (Arantes and Lereclus 1991)

Esta bacteria Gram positiva produce toxinas altamente específicas contra insectos (Knowles 1994; Schnep *et al.*, 1998) Al esporular produce cristales paraesporales formados por la glicoproteína delta-endotoxina y que causa parálisis del epitelio

intestinal, ruptura de las microvellosidades, cambios en los organelos citoplasmáticos y, finalmente, la muerte de la larva (Bravo *et al.*, 2006; Carreras *et al.*, 2003).

4.2.1. Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

Existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. A la fecha se han clonado y secuenciado 166 diferentes genes *cry* y 16 diferentes genes *cyt*. La primera clasificación de las δ -endotoxinas se basó en la especificidad de la actividad insecticida. En esta clasificación las toxinas Cry I eran las que presentaban actividad contra insectos lepidópteros, las toxinas Cry II eran proteínas más pequeñas de 70 kDa, actividad contra lepidópteros y dípteros, las toxinas Cry III eran proteínas activas contra insectos coleópteros; las toxinas Cry IV activas contra insectos dípteros y las Cry V y Cry VI activas hacia nematodos, en donde el Cry VI era un grupo que no tenía homología con el grupo Cry V. Sin embargo, muy rápidamente se dieron cuenta que esta clasificación no era adecuada ya que empezaron a encontrar proteínas Cry que eran muy semejantes, pero con especificidad diferente o toxinas Cry con actividad dual hacia lepidópteros y coleópteros, las cuales también las llamaron Cry V, creando una gran confusión en la nomenclatura. Esto propició que se creara una nueva nomenclatura de las δ -endotoxinas basadas exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria (Benintende *et al.*, 2000). En esta nueva nomenclatura los números romanos se cambiaron por números arábigos. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. Actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies de bacterias como *Clostridium bif fermentans* (clasificadas como Cry17A, Cry18A, y Cry19A con actividad hacia mosquitos) (Alyahyae and Ellar 1995).

Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de Bti que muestren actividad hemolítica o tengan similitud con la secuencia de las toxinas Cyt. A la fecha las proteínas Cry están agrupadas en 28 grupos y varios subgrupos y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos.

4.2.2 Mecanismo de acción de las proteínas Cry

El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de varios pasos: solubilización del cristal, procesamiento de las protoxinas, unión al receptor, inserción a la membrana, agregación, formación de poro y citólisis. En la figura 2 se muestra un esquema donde se presentan los diferentes eventos en el modo de acción de las proteínas Cry.

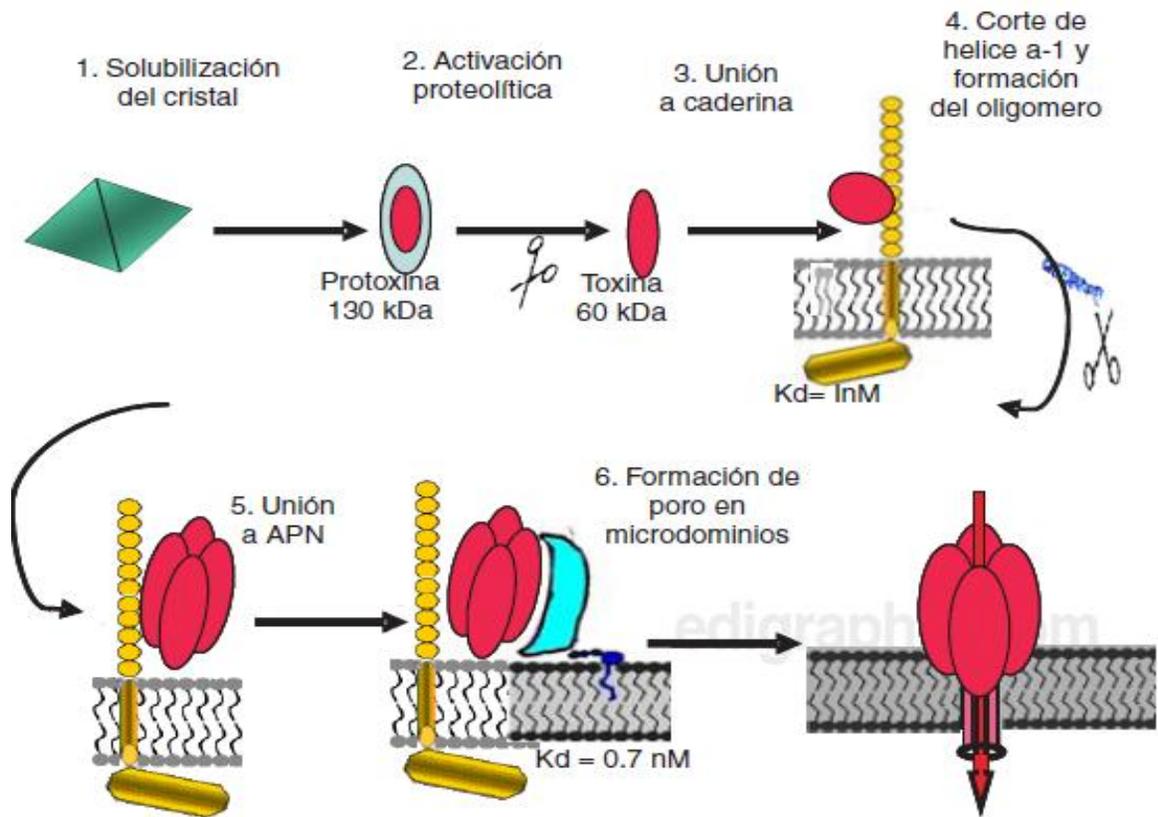


Figura 2 Modo de acción de las proteínas Cry

1. Solubilización del cristal

Los cristales producidos por Bti se solubilizan a pH alcalino liberando a la "protoxinas", también se requiere un medio ambiente reductor para romper los enlaces disulfuro que son abundantes en la mitad C-terminal de las proteínas Cry de 130 kDa. El intestino medio de la mayor parte de las larvas de insectos susceptibles (lepidópteros, dípteros y algunos grupos de coleópteros) se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras. La mayor parte de las proteínas Cry se producen como protoxinas, que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio de los insectos liberando el fragmento tóxico (Gill 1995; Aronson and Shai 2001; Ruiz *et al.*, 2004). Puede generalizarse que el procesamiento típico de las toxinas Cry1 se da por el corte de los primeros veintiocho residuos del extremo N-terminal en un sitio conservado y de los últimos 500 residuos del extremo C-terminal, quedando de esta forma un fragmento resistente a proteasas de entre 55 y 65 kDa que se le denomina "toxina". La posición del sitio de procesamiento en el extremo C-terminal no es constante sino que se localiza en la región 609 a 630 residuos (Benintenden *et al.*, 2000). La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de las proteínas Cry3A y Cry1Aa, ha revelado que estas moléculas están organizadas en tres dominios. El dominio I está constituido por un ramillete de siete α -hélices anfipáticas donde seis de ellas rodean a la α -hélice 5. El dominio II está formado por tres láminas β -antiparalelas que terminan en asas en el vértice de la molécula formando un prisma. El dominio III está compuesto de dos hojas β -plegadas arregladas en forma de emparedado una sobre otra. Todas las toxinas Cry presentan cinco bloques conservados en su secuencia de aminoácidos que se localizan en las regiones centrales y de contacto entre los dominios.

La localización estratégica de estas regiones permite inferir que los miembros de la familia Cry que las contengan podrían tener un plegamiento similar y por lo tanto un mecanismo de acción semejante.

2. Unión al receptor

Se ha demostrado que después de ser activadas, las proteínas Cry se unen a sitios específicos localizados en la microvellosidad de las células columnares del intestino medio de las larvas de insectos susceptibles: lepidópteros, coleópteros y dípteros (Ayra *et al.*, 2006).

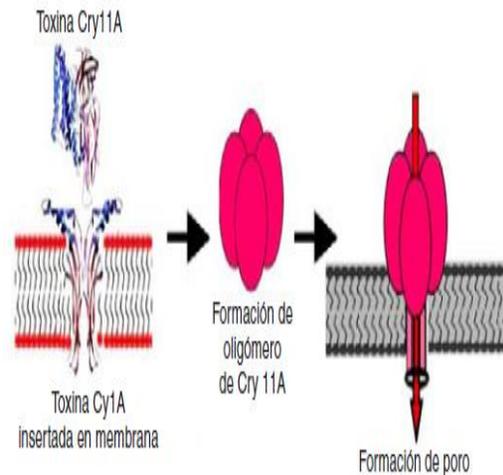


Figura 3. Modelo de sinergismo entre las toxinas Cry 11 Aa y Cyt 1Aa de *Bacillus thuringiensis*

La unión a estos sitios es muy específica, como la de una llave con su cerradura, es una etapa determinante en la toxicidad por lo que diversos grupos de investigación han dedicado un gran esfuerzo a entender como ocurre este proceso. La mayor parte de los análisis se han hecho con larvas de lepidópteros y toxinas de tipo Cry1, y algunos estudios con la toxina Cry3A y el coleóptero *Tenebrio molitor* (Ayra *et al.*, 2006). De los resultados obtenidos en los estudios de competencia se puede generalizar que la constante de disociación (Kd) entre las toxinas y sus sitios de unión para el caso de los lepidópteros es del orden de 0.2 a 50 nM, y que la concentración de sitios de unión (Bmax) va de 0.4 a 62 pmoles/mg de proteína de vesículas. Para el caso de la toxina Cry3A y las VMMA de *T. molitor* se determinó que la Kd y Bmax es de 17.5 nM y 304 pmoles/mg de proteína de vesículas, respectivamente. Los estudios de competencia

homologa han mostrado que la cinética de unión de las toxinas Cry a las VMMA de los insectos susceptibles es bifásica, compuesto de un paso reversible y otro irreversible.

1. Inserción en la membrana y formación de poro

La fase irreversible de la unión de las proteínas Cry a la membrana se considera como una evidencia de que las proteínas Cry se insertan en la membrana, para luego causar la destrucción del tejido intestinal de las larvas de insectos susceptibles. Se han aislado algunas mutantes en el dominio I afectadas en la unión irreversible y se propone que estas mutantes son incapaces de insertarse en la membrana, ya que estas mutantes involucran la introducción de una carga negativa (A92D) o bien la eliminación de una carga positiva (R93). Ambas mutantes se localizan en la cara inferior del dominio I que esta expuesto hacia la membrana y se propone que estos cambios evitarían la interacción con la membrana, quien tiene carga negativa (Al-Momani *et al.*, 2004). Se ha demostrado que a dosis μM (1000 veces mas que la dosis letal media) las proteínas Cry son capaces de interactuar con membranas lipídicas artificiales e insertarse en las mismas, formando canales permeables principalmente a cationes pero también a aniones y solutos neutros. Se comprobó que la capacidad de la toxina Cry1C para interactuar con una membrana modelo, aumenta de forma sustantiva al disminuir el pH ($\text{pH} < 5$), y que esto esta correlacionado con el aumento en la hidrofobicidad de la superficie de la molécula. Estos datos sugieren que en estas condiciones *in vitro*, la proteína sufre un cambio conformacional que la lleva a un estado competente para la inserción. Es posible que *in vivo* se logre una transición a un estado conformacional similar, por ejemplo, por la unión al receptor. Es importante señalar que a concentraciones fisiológicamente relevantes (pM-nM), las proteínas Cry no se insertan de manera espontanea en las membranas biológicas que carecen de los receptores específicos. Con base en el

conocimiento que se tiene acerca de la inserción de otras toxinas bacterianas formadoras de poro se han propuesto dos modelos posibles de la inserción de toxinas Cry en la membrana. Un primer modelo (modelo del abrecartas), propone que las α -hélices 5 y 6 se insertan en la membrana como consecuencia de un cambio conformacional disparado por el receptor, sin mayor participación de las hélices y dominios restantes. El otro modelo (modelo de paraguas) plantea también que después de la unión con el receptor, se inserta la región $\alpha 4$ - $\alpha 5$, mientras que el resto de las hélices se aplanan sobre la superficie de la bicapa lipídica exponiendo hacia ella su cara hidrofóbica quedando de esta manera la molécula en forma parecida a un paraguas.

4.-Citólisis

Se ha propuesto que las proteínas Cry causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH y por citólisis osmótica. Las toxinas Cry aumentan la permeabilidad de la microvellosidad apical a cationes, aniones, agua y moléculas de mayor tamaño. Esto causa a su vez que se colapse la diferencia de potencial y por tanto se pierda la fuerza motriz que dirige la entrada de aminoácidos al interior celular, así como la redistribución de los cationes entre el lumen y el citoplasma. Se considera que el efecto más devastador de este proceso es la alcalinización del citoplasma, ya que esto interfiere con el metabolismo celular normal, que tiene como consecuencia final la destrucción del epitelio intestinal. Una vez que las células columnares y caliciformes se destruyen, las esporas de Bti tienen acceso al hemolinfa, medio en el que proliferan. La consecuencia final de la destrucción del intestino medio y la proliferación de bacterias en la hemolinfa es la muerte de las larvas por inanición y septicemia.

4.3 CONTROL BIOLÓGICO DE MOSQUITOS

4.3.1 *Bacillus thuringiensis var israelensis*

Un caso excepcional es el control de mosquitos por una cepa de Bt conocida como *Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis* (Bti). Esta bacteria produce tres toxinas Cry (Cry4A, Cry4B y Cry11A) y dos toxinas Cyt (Cyt1A y Cyt2A) con alta actividad insecticida contra larvas de diferentes especies de mosquitos y otros dípteros. Bti se ha ocupado por más de 30 años en el control de mosquitos y moscas transmisores de enfermedades como el dengue, la malaria y la oncocercosis sin que a la fecha se haya reportado la aparición de resistencia.

4.3.2 Ecología de *Bti*.

La bacteria es parte de diversos ecosistemas como: bosques, selvas y sabanas y desiertos (Fernández 1988; Fleming 1986). La spora de *Bti* supervive por varios años, germina se multiplica como células vegetativas en ambientes naturales, su existencia está relacionada con lugares de elevadas densidades de insectos, el número de esporas de la bacteria en graneros es alta en relación a otros hábitat de acuerdo con ciertas condiciones ambientales: como la temperatura y la humedad constante, mientras que la ausencia de radiación solar permite que permanezcan viables. En relación a los hábitats naturales y los artificiales como los graneros, existe controversia en su distribución, investigación en el agro-sistema del Bajío Guanajuatense (Guanajuato, México para determinar la existencia y supervivencia de esporas de *Bt* en algunas malezas, en hojas de cultivos agrícolas como el fríjol y maíz, en insectos saprobios y en el suelo, revelaron la existencia de esporas en el filoplano de esas malezas y en el suelo cultivado con maíz, pero no en las hojas de las plantas cultivadas, ni en los insectos y/anélidos del suelo con

los que se asocian, las esporas viables de *Bti*, se detectaron hasta 4 días después de su aplicación (Feitelson and Kim 1992) lo que explica porque solo en los graneros se reportan epizootias con miles de insectos muertos por los cristales de *Bti* (Bourgoin and Rapaport 1986)

4.3.3 Generalidades de Bti

Los productos que contienen *B. thuringiensis* (Bti) son notablemente seguros, hasta ahora no se han registrado efectos dañinos en ensayos de seguridad con abejas, vertebrados y humanos; Bti es un larvicida eficaz y muy seguro para los trabajadores de salud, así como para los moradores y animales domésticos (Bobrowski *et al.*, 2001; Chang C *et al.*, 1999). A fin de disminuir los costos en la producción masiva del Bti H-14 se han realizado trabajos con buenos resultados en el desarrollo de esporas y actividad tóxica usando como medios de cultivo agua de coco y extracto de endospermo, coco entero y yuca con resultados semejantes a los medios de cultivo comerciales (Chang C. *et al.*, 1999; Couch and Ross 1980)

4.3.4 Resistencia

Distintos estudios en diferentes laboratorios demostraron que la no aparición de insectos resistentes a Bti se debe a la presencia de la toxina Cyt1Aa. Se han podido aislar poblaciones de moscos resistentes a las toxinas Cry4A, Cry4B y Cry11A, o a las tres toxinas, sin embargo no se han podido aislar poblaciones resistentes a la toxina Cyt1Aa. Es más, las poblaciones de mosquitos resistentes a las toxinas Cry recuperan la sensibilidad a estas toxinas en presencia de cantidades subletales de Cyt1Aa. Por otra parte, se ha demostrado que la toxina Cyt1A sinergiza la actividad insecticida de las otras toxinas Cry, es decir, la actividad tóxica de la mezcla de toxinas Cry con Cyt es mucho mayor que la suma de sus actividades individuales.

Las toxinas Cry y Cyt son toxinas formadoras de poro. Esto significa que para matar a su insecto blanco, las toxinas Cry y Cyt se insertan en la membrana de las células apicales del intestino formando un poro que permite el paso de iones y agua, provocando un desbalance osmótico y finalmente la lisis celular. Sin embargo, las toxinas Cry y Cyt tienen mecanismos diferentes para interactuar con la membrana. Es importante mencionar que el mecanismo más común de la resistencia a las toxinas Cry son mutaciones que afectan a los receptores proteínicos, lo que evita así la unión de la toxina a su membrana blanco. En cambio, las toxinas Cyt, formadas por un solo dominio estructural, no interactúan con proteínas de membrana, si no que interactúan directamente con lípidos específicos de la membrana de mosquitos formando el poro.

4.3.5 Toxinas y mecanismos de acción de Bti

Investigación sobre la bioquímica de *Bti*, se reporta que el cristal no es tóxico en su totalidad, está dividido en regiones o subunidades de proteína, las cuales tienen actividad enzimática proteolítica similar a la tripsina del insecto. La ingestión de cristales y esporas por el insecto, revela una interacción entre el cristal y el intestino del hospedero (Galan *et al.*, 1996; Georghiou and Wirth 1997; Gitahy *et al.*, 2007) cuando un insecto susceptible los ingiere sus enzimas digestivas los hidrolizan en el ambiente alcalino de su intestino, lo que se causa daño en las células epiteliales de la pared intestinal (Glare 2000; Goldbertg *et al.*, 1980; Goldbertg and Margalit 1977); éstas expuestas no responden uniformemente, las de tipo cuboide o columnas se deterioran en estructura en las microvellosidades y en la membrana celular, dilatación de la cisterna del retículo endoplásmico rugoso y dispersión de los ribosomas, los núcleos no se afectan, sin embargo las mitocondrias se hinchan, los cambios fisiológicos son insuficientes para el transporte de iones y permeabilidad, se agota el ATP disponible, con cambios patológicos como: vacuolización celular, hinchamiento y lisis (Ayra *et al.*, 2006; Bobrowski *et al.*, 2001) así el insecto muere en menos de una hora o en varios

días, depende de la dosis ingerida, cuando una larva consume cristales sin espora ocurre una secuencia idéntica de estos eventos, en consecuencia la parálisis y muerte del insecto, en donde las esporas son pasivas hasta que el pH disminuye a 7, lo que estimula su germinación, ya que las esporas sobreviven en casos específico, como en graneros lo cual provoca epizootia por la invasión masiva de *Bt* en el insecto (Fig. 4).

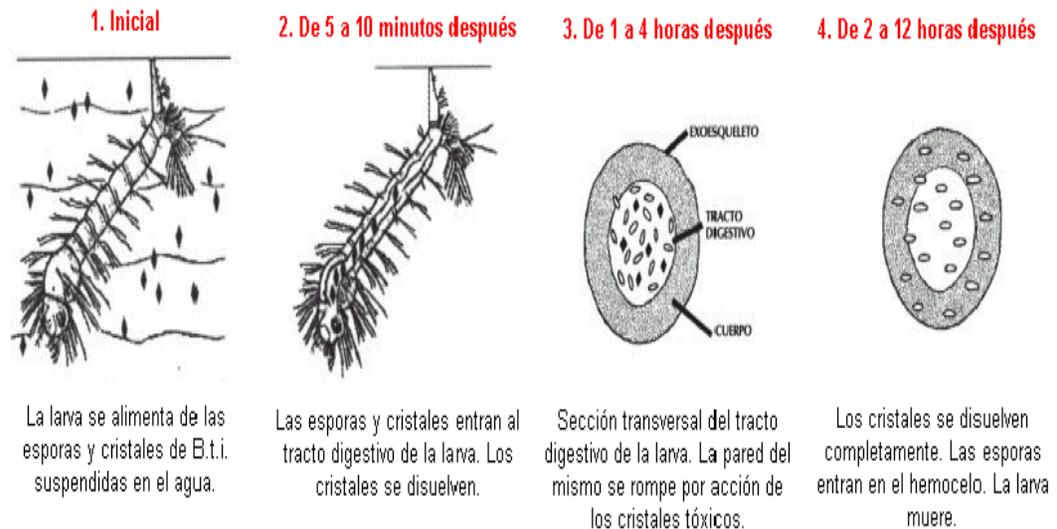


Figura 4. Modo de acción de la toxina de *Bacillus thuringiensis var. israelensis*

4.4 DENGUE

Es una grave enfermedad viral transmitida por la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, se presenta de dos formas clínicas: fiebre de dengue, enfermedad de tipo gripal que afecta a los niños mayores y a los adultos, pero rara vez causa la muerte y la fiebre hemorrágica de dengue (FHD) es otra forma mas grave, en la que puede sobrevenir hemorragia y a veces un estado de choque, que lleva a la muerte. En los niños es sumamente peligrosa. La fiebre hemorrágica de dengue es una enfermedad mortífera para las personas y el diagnostico temprano seguido del oportuno tratamiento puede

prevenir la muerte. Los síntomas varían según la edad y el estado general de salud del paciente. Los lactantes y los niños pequeños pueden presentar una tabla de fiebre y erupción “sarampionoides” difícil de distinguir de la gripe, el sarampión, el paludismo, la hepatitis infecciosa y otras enfermedades febriles.

4.5 BIOLOGIA DE *Aedes aegypti*

4.5.1 Características biológicas de *Aedes aegypti*

Aedes aegypti es un mosquito originario de África e introducido en América a través del tráfico de esclavos. Es esencialmente doméstico, aunque también existen formas silvestres. Como todos los mosquitos, durante su ciclo biológico pasa por los estados de huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 5).

4.5.1.1 Huevo.

Debido a su relación con el hombre, los sitios de cría consisten en recipientes artificiales ubicados cerca de las viviendas o dentro de las mismas, siendo muy amplia la gama de posibles criaderos tales como aljibes, tanques, barriles, depósitos, envases de lata, botellas, canaletas de techos, floreros, fondo de botes, bodegas de barcos, cubiertas de autos en desuso, depósitos de agua en heladeras, bandejas de acondicionadores de aire,

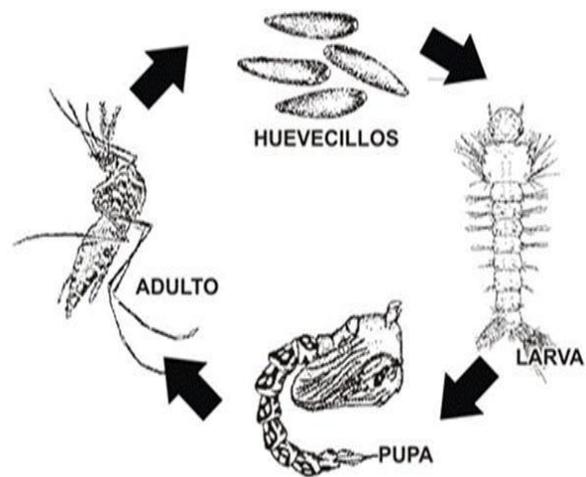


Figura 5. Control biológico del mosquito *Aedes aegypti*

etc. Las hembras seleccionarían los sitios para oviponer detectando diferencias químicas en el agua de los criaderos; ello sería posible mediante receptores ubicados en las antenas o espinas quimiorreceptores en las patas. Las hembras evitan poner los huevos en piletas o colecciones de agua en el suelo, donde los bordes son de barro o tierra, prefieren oviponer en lugares resguardados, especialmente donde los huevos pueden adherirse a alguna pared. Las cubiertas de vehículos son importantes sitios de cría para esta especie, seguidos por recipientes de formas cilíndricas y abiertas, prefiriendo las formas grandes a medianas, descartándose aquellos de boca angosta.

También pueden encontrarse en depósitos naturales como cavidades de arboles, en bambúes, bromeliáceas y en huecos en rocas. *Aedes aegypti* nunca coloca los huevos sobre una superficie seca y prefiere hacerlo sobre una superficie húmeda a ponerlos directamente en el agua, los huevos son generalmente colocados en las paredes de los recipientes, justo por sobre el nivel del agua.

4.5.1.2 Larva.

Las larvas se mueven activamente (movimiento serpentiforme muy marcado) en el ambiente acuático para buscar alimento (microorganismos y desechos orgánicos animales y vegetales) que atraen hacia la boca con los cepillos bucales. Son fotofobias, es decir, prefieren lugares sombreados. Se desarrollan preferentemente en ambientes con agua limpia (Figs. 6 y 7)

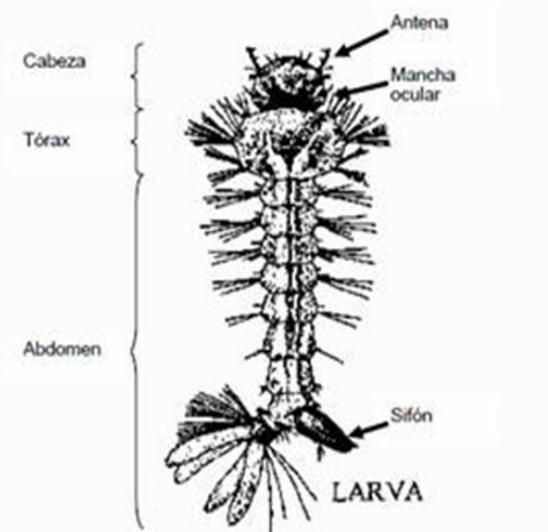


Figura 6. Larvas del mosquito *Aedes aegypti*

4.5.1.3 Clave ilustrada para larvas de cuarto estadio de *Aedes Aegypti*. (Rabinobict 1989).

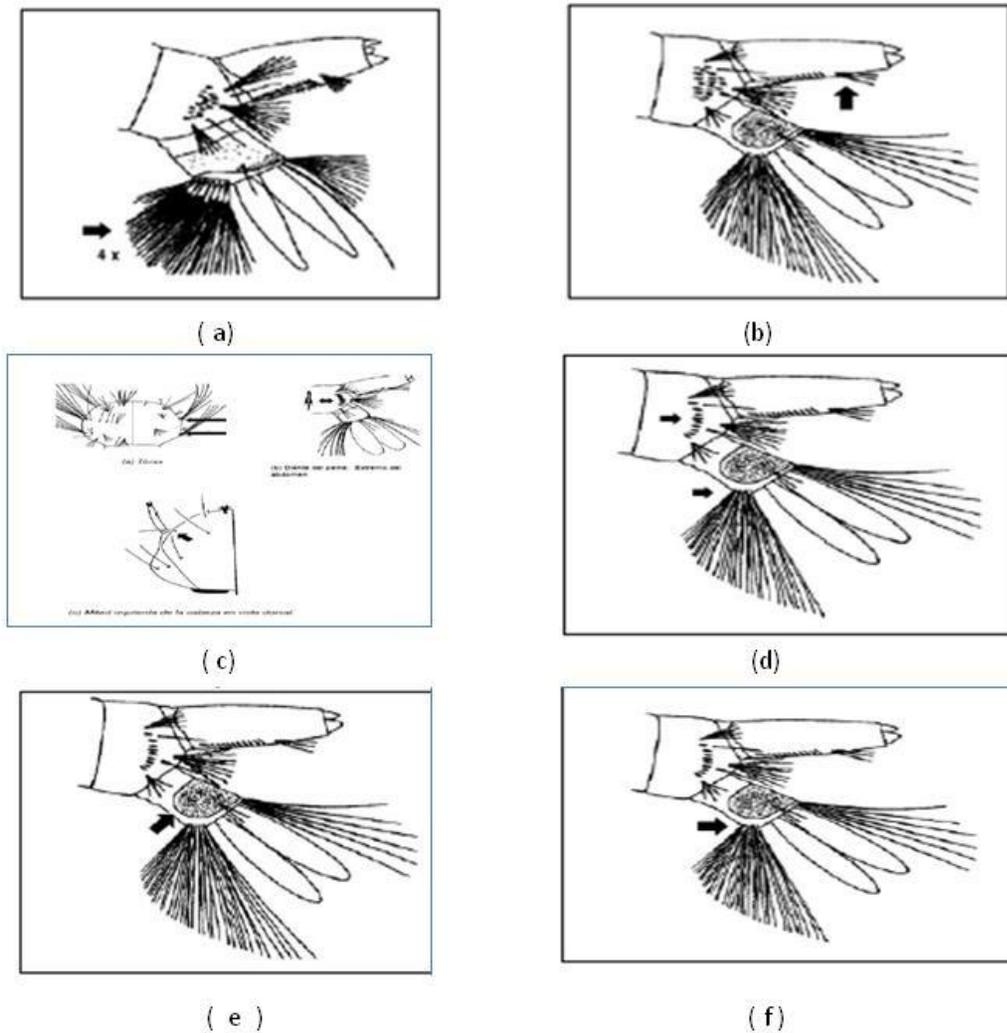


Figura 7. a).-Brocha ventral de *Aedes* formada por un mínimo de cuatro pares de cerdas; b).- Extremo del abdomen de *Aedes*. Sifón con un par de cerdas simples o múltiples)-. Extremo del abdomen de *Aedes*. Silla de montar del segmento X incompleta; d) Brocha ventral con cinco o mas pares de cerdas que nacen de una grilla e) Tórax con espinas laterales muy evidentes; dientes del peine y segmento VIII con espinas laterales visibles; cerda 7 de la cabeza simple (figs. a, b, c) (b) Diente del peine. Extremo del abdomen; f) Dientes del peine del segmento VIII dispuestos en una fila, con espina central larga; brocha ventral formada

4.5.1.3 Pupa.

En la pupa se operan profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto. Si bien la pupa se mueve, la tendencia es permanecer inmóvil en contacto con la superficie del agua. Al igual que las larvas, también son fotofóbicas. En condiciones favorables, la duración de este estado es de alrededor de dos días.

4.5.1.4 Adulto

Luego de la emergencia, al igual que otros mosquitos, procuran lugares húmedos y sin corrientes de aire donde puedan reposar. Transcurridas 24-48 h, y una vez maduros, los machos también vuelan cerca del hombre mientras buscan a las hembras para aparearse. Como se trata de mosquitos esencialmente domésticos y antropofílicos, las hembras obtienen la sangre que necesitan fundamentalmente del hombre. Se trata de insectos diurnos (el periodo de actividad es durante el día) a diferencia del mosquito común de las habitaciones *Culex pipiens quinquefasciatus* que es nocturno.

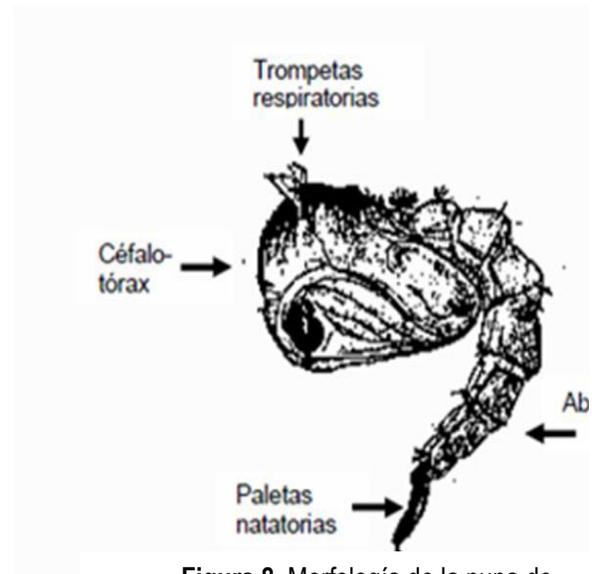


Figura 8. Morfología de la pupa de *Aedes aegypti*

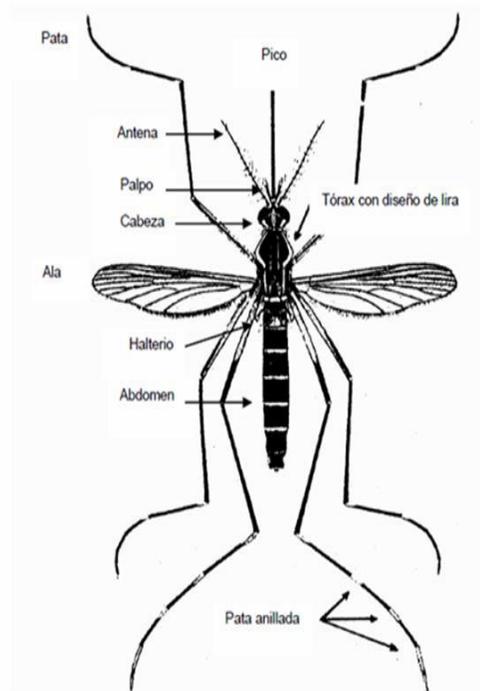


Figura 9. Morfología del adulto hembra de *Aedes aegypti*

La dispersión espontánea o activa de las hembras alcanza los 100 m, por lo que durante su vida visitan pocas residencias, tendiendo a permanecer próximas al lugar donde se desarrollaron hasta adultos.

Sin embargo, la disponibilidad de recipientes de cría condiciona la dispersión, de modo que cuando estos resultan escasos el rango de dispersión puede extenderse hasta los 800 m. Por otro lado, la dispersión a través de distintos medios de transporte, como automóviles, trenes, camiones, ómnibus, barcos e incluso los aviones, es uno de los factores más importantes de diseminación de estos mosquitos y de los virus dengue de una región a otra.

El ciclo completo de *Aedes aegypti*, de huevo a adulto, en óptimas condiciones de temperatura y alimentación ocurre en aproximadamente diez días. Sin embargo, es sabido que estos insectos presentan diferencias en cuanto a su comportamiento y hábitos según el ámbito geográfico en el que se desarrollan. La distribución estacional de *Aedes aegypti* en las regiones tropicales tiende a seguir los patrones que establecen las lluvias. Cuando aumentan las precipitaciones aumenta el número de criaderos y por lo tanto el tamaño de la población de adultos.

En las regiones templadas, la temperatura, como así la duración y severidad del invierno, y las precipitaciones son los factores que regulan el tamaño poblacional.

En la figura 9 se ilustran las características morfológicas de una hembra de *Aedes aegypti*. Es un insecto pequeño de color oscuro (castaño oscuro o negro) con rayas blanco-plateadas en el dorso y patas. Este patrón de coloración es igual tanto para el macho como para la hembra. El tórax presenta un diseño en forma de lira y las patas son anilladas. Mide aproximadamente 5 mm.

5. MÉTODOS

5.1. Establecimiento de las poblaciones de *Aedes aegypti*

Las crías de *Aedes aegypti* (Díptero: *Culicidae*) se establecieron en el laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Biológicas la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.1.1 Sitios de recolección de pupas y larvas de *Aedes aegypti*

Debido a que el clima y la temperatura son factores que determinan diferencias genéticas entre la misma especie de un organismos se eligieron a los estados de Nuevo León y Veracruz para la recolección de las poblaciones de *Aedes aegypti*. Las crías de *Aedes aegypti* fueron proporcionadas por el laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias biológicas.

5.1.2. Colecta de larvas de *Aedes aegypti*

En el periodo de muestreo de este estudio se colecto un total de 500 individuos del orden Díptera, todas ellos en la fase del ciclo de vida conocido como larva y pupa; taxonómicamente incluidos en la familia *Culicidae*. La colecta de mosquitos se realizo en época de lluvias. En cada colecta se realizo una inspección directa, para encontrar larvas y pupas de mosquitos.

El contenedor fue considerado positivo cuando al menos una larva de cualquier larva estadio o pupa estaba presente. Se colectaron larvas y pupas de mosquito utilizando tubos desechables de trasferencia; las larvas y las pupas fueron colocadas en frascos de plástico de 15 cm de alto x 5 cm de diámetro con roscas; los frascos fueron previamente

etiquetados. Las larvas y las pupas se preservaron en agua bidestilada y subsecuentemente se transportaron al Laboratorio de Etimología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.1.3 Estudio taxonómico

El trabajo de laboratorio para las muestras biológicas consistió en la separación, registro y cuantificación de dípteros; para la identificación del material biológico se escogieron al azar de cada una de las crías 10 larvas mediante el uso del estereoscopio binocular de 3X y goteros de 5 ml. para la respectiva identificación de las larvas de *Aedes aegypti* para lo cual se emplearon las claves de identificación morfológica propuesta por Rabinovitch 1989.

Los especímenes de cada muestra fueron identificados en el tercer y cuarto estadio. Las pupas de *Aedes aegypti* fueron contabilizadas en los totales debido a que es posible identificarlas a nivel genero. Cuando una sola especie estaba en el criadero, todas las pupas se consideraron de la misma especie que los individuos identificados en el tercer o cuarto estadio en el mismo criadero.

Los caracteres cualitativos que se analizaron fueron los siguientes:

1. Sifón ventilador presente o ausente
2. Pelo 1 deñil dorso del abdomen o palmeado o no palmeado
3. Sifón con peine o sin peine
4. Segmento VIII abdominal con dientes o sin dientes
5. Esclerito anal completo o incompleto
6. Esclerito anal con espinas prominentes o pequeñas
7. Peine del sifón ocupando igual o mas de 0.75 o menor del 0.75 de la base del sifon; Antena constreñida o no constreñida desde el nivel de la inserción del pelo I-A; Pelo I -A situado cerca de la mitad o en el tercio apical de la antena
8. sifón con los pelos I-S dispuestos regular o irregularmente

9. Sifón con espinas cerca del ápice o sin ellas; papilas anales tan o más largas o cortas que el esclerito anal

5.1.4 Crianza de larvas

Las larvas obtenidas fueron transferidas a recipientes de plástico (30cm de largo x 10cm de ancho x 10cm de alto) conteniendo un litro de agua bidestilada estéril, suplementada con croquetas pulverizadas para gato ®marca Whiskas. Los recipientes se mantuvieron en el laboratorio, a una temperatura de 30 °C hasta obtener las pupas las cuales fueron transferidas a recipientes de plástico (5cm alto x 3cm de diámetro) conteniendo agua bidestilada estéril.

5.1.5 Crianza de adultos

Los recipientes conteniendo las pupas fueron colocados en las jaulas de madera cubiertas con malla metálica (30cm de alto x 30cm de ancho y 50cm de largo) y se mantuvieron 2 días para que las pupas se transformaran directamente en adultos dentro de las jaulas. Durante los dos primeros días de su vida como adultos, los mosquitos no fueron alimentados, pero a partir del tercer día los adultos, fueron alimentados utilizando torundas de algodón impregnadas con una solución de sacarosa al 10% para los machos y hembras, además las hembras fueron alimentadas con sangre de humano dos veces por semanas, para lo cual el brazo eran introducidos a las jaulas de cría y expuestos a la picadura de los adultos durante 2 horas. Para obtener la primera generación se introdujeron recipientes de plástico (10cm de alto x 5cm de diámetro) cubiertos en su interior por una tira de cartulina de color blanco (25cm largo x 8cm ancho) y 50 ml de agua bidestilada estéril para la ovoposición, una vez obtenidos los huevecillos, las tiras de papel fueron sumergidas en recipientes de plástico (30cm de largo x 10cm de ancho x 10cm de alto) conteniendo un litro de agua estéril suplementada con croquetas para

gato, pulverizadas para así obtener la primera generación; de igual manera se obtuvo la segunda generación para realizar los bioensayos.



Figura 10. Jaula de mantenimiento de la cría de *Aedes aegypti*



Figura 11. Puntos de ovoposición

5.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS CEPAS RV4-8 Y RV8-1

5.2.1 Microorganismo

5.2.1.1 Obtención de las cepas de *Bacillus thuringiensis*

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1 HD-59, RV4-8 y RV8-1 fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Industrial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y las cepas HD-73 y HD-225 fueron proporcionadas por el laboratorio de Genética de la facultad de Ciencias biológicas de la de la Universidad Autónoma de Nuevo León

5.2.1.2 Mantenimiento de las cepas de *Bacillus thuringiensis*

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1, HD-59. HD-73, HD-225, RV4-8 y RV8-1 fueron sembradas en tubos de ensaye conteniendo 10 ml de caldo nutritivo sólido e incubadas a 30°C por 18 horas se almacenaron a 4 °C.

5.2.2. Determinación de la morfología del cristal la cepas de *B. thuringiensis* RV4-8 and RV8-1

La identificación morfológica de los cristales de *B. thuringiensis* RV4-8 y RV8-1 se realizó por microscopía de fase de contraste. Para este proceso, se sembró cada una de las cepas en cajas de petri conteniendo caldo nutritivo sólido utilizando la técnica de extensión en placa, cada caja fue incubada a 30 °C por 18 horas; se tomó una asada de cada cultivo y se fijó en un porta objetos, después se le añadió cristal violeta por un

minuto y se lavo con agua destilada, se dejo secar a temperatura ambiente y se observo a través del microscopio.

5.2.3 Análisis proteico del complejo espora cristal

Las cepas *B. thuringiensis* RV4-8, RV8-1, HD-73, HD-225 y subsp *israelensis* se sembraron en caldo nutritivo solido hasta la lisis celular. La mezcla espora- cristal fue cosechada y lavada con NaCl al 1N por centrifugación a 14 rpm por 1 minuto. La mezcla espora-cristal fue suspendida en solución buffer (25 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 10 % glicerol, 5% of mercaptoetanol and 0.1% azul de bromofenol) y fue calentada hasta ebullición por 10 minutos. El material insoluble fue removido por centrifugación a 1000 rpm por 14 segundo, el sobrenadante se retiro en otro tubo Eppendorf. El SDS-PAGE se llevo a cabo por medio del método descrito por el método de Lammeli usando 8, 12 y 15 %; los geles fueron teñidos con azul de Coomassie .La masa molecular de las proteínas fueron determinadas utilizando las cepas *B. thuringiensis* HD-73, HD-225 y subsp. *israelensis* , suero de albumina de bovino (BSA) y albumina de huevo como referencia. La concentración de proteína se determino utilizando el método descrito por Bradford con BSA como el estandar (Benintenden *et al.*, 2000; Crickmore *et al.*, 1998)

5.2.4 Perfil de plásmidos

Las cepas *B. thuringiensis* se sembraron en 2 ml de medio LB por 12 horas; transcurrido este tiempo, las células fueron cosechadas por centrifugación a 10,000 rpm por 10 minuto; las células recuperadas se suspendieron en 2 ml de TE 0.05M (Tris-Base) y EDTA 0.01M a un pH 8.0 y centrifugadas. Los pellets fueron suspendidos en 40 µl de TE; 40 µl de la suspensión celular fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 0.06 ml de buffer para lisis (4% SDS en TE at pH 12.4), y se incubaron a 37 °C por 20 min hasta alcanzar la lisis total de las células; la solución fue

neutralizada con 30 μ l de 2.0 M Tris a un pH 7.0, los tubos fueron ligeramente invertidos hasta que se observe un cambio en la viscosidad de la solución; el AND cromosomal fue precipitado con 0.24 ml de NaCl 5 M. y fueron incubados en hielo por 4 horas. El material insoluble fue removido por centrifugación a 12.000 rpm por un minuto; el sobrenadante fue removido en otro tubo Eppendorf (1.5 ml) se les adiciono 0.55 ml de isopropanol y se incubaron -20°C por 30 minutos. El AND fue recuperado por centrifugación a 12.000rpm por 3 minutos; el sobrenadante fue eliminado y los tubos se invirtieron sobre toallas de papel, los precipitados se disolvieron en 30 μ l of TES (Tris 0.05 M, EDTA 0.005M, NaCl 0.005M, pH 8.0). Para visualizar el DNA se cargaron 10 μ l de muestra con 2 μ l de amortiguador de carga (azul de bromofenol) en geles de agarosa al 1,7 y 1.5 % en 1 x Tris-acetato y se dejo correr a 100 V por 3 horas, los geles se tiñeron con bromuro de etidio por 5 minutos y se revelaron con luz ultravioleta. Para la identificación de los genes *cry* se utilizaron como referencia la cepa HD73 y HD225 (Ragni and Delecluse 1996)

5.2.5 Producción de la β -exotoxina

La producción de la β -exotoxina fue detectada utilizando el método de Arevalo-Niño (1990). La cepas RV4-8, RV-8-1, HD-59 (control positivo) y HD-1 (control negativo) fueron sembradas en medio solido (caldo nutritivo) por 24 horas a 37°C . Una asada de células de cada cultivo fueron transferidas a 50 ml de caldo nutritivo e incubadas con agitación a 30°C (150 rpm) por 18 horas; dos ml de cada cultivo fueron transferidos a 200 ml de Medio de Conner y Hansen (10.0 g of casaaminoacidos, 5.0 g de KH_2PO_4 , 5.0 g de K_2HPO_4 , 0.05 g of $\text{Mg S}_0_4 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g de $\text{Ca Cl}_2 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g of $\text{Na} (\text{NH}_4) \text{HPO}_4 4 \text{H}_2\text{O}$ y 3.0 g de citrato de sodio , pH 7.0) y fueron incubados a 37°C por 48 horas, con agitación (150 rpm). Los cultivos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C , el sobrenadante fue esterilizado a 120°C por 15 minutos y filtrados usando membrana millipore (0.22 μm); 20 ml de cada sobrenadante fue concentrado 10

veces su volumen a 90 °C y fueron precipitados con etanol. El precipitado fue disuelto en agua bidestilada. La producción de la β -exotoxina se analizó por espectrofotometría de absorción. 250, 260 and 270 nm.

5.2.6 Determinación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica se determinó utilizando eritrocitos humanos. Los eritrocitos humanos fueron colectados y lavados cuatro veces con solución salina de fosfatos (PBS) y centrifugados a 2500 rpm por 2 minutos. (Thiery *et al.*, 1997). Porciones de 100 μ l de eritrocitos humanos y 900 μ l de PBS fueron colocados en tubos Eppendorf. Una suspensión de 500 μ l del complejo espora cristal fue solubilizado utilizando 750 μ l NaOH 0.05M e incubados por 2 horas a una temperatura 37°C (Yu Y and Gill 1991). El material insoluble fue removido por centrifugación a 1000 rpm por cinco minutos; el sobrenadante se colocó en otro tubo Eppendorf. La concentración de proteína se determinó utilizando el método descrito por Bradford utilizando BSA como estándar. En tubos Eppendorf de 1.5 ml se colocaron porciones de 200 μ l de eritrocitos y diferentes concentraciones del complejo espora cristal solubilizado (Tabla I) y se les adicionó solución buffer (PBS) hasta obtener un volumen total de 1 ml; después fueron incubados por 1hr. a una temperatura de 37 °C; los tubos fueron centrifugados a 5000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante fue removido y analizado para determinar la hemoglobina por absorción a 540 nm (Wu and Federici 1994).

El porcentaje de la lisis se obtuvo comparando el 100 % de lisis obtenida al incubar eritrocitos humanos en agua bidestilada y el 0% de lisis incubando eritrocitos de humanos en solución buffer (PBS). Cada prueba se realizó cuatro veces por duplicado en días diferentes.

Tabla I

Concentraciones del complejo espora-cristal de las cepas RV4-8 y RV8-1 utilizadas para determinar la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos

No	Concentraciones μ l	
	RV8-1	RV4-1
1	350	35
2	300	30
3	250	25
4	200	20
5	150	15
6	100	10
7	50	5
8	0	0

5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LAS CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* contra larvas de *Aedes aegypti*

5.3.1 Obtención del complejo espora- cristal de *Bacillus thuringiensis*

Se utilizaron cuatro cepas de *Bacillus thuringiensis* las cuales fueron: HD73, H225, RV-48 y RV8-1. Las cepas se activaron durante 18 horas utilizando tubos de ensaye conteniendo caldo nutritivo solido, de cada uno de los tubos de ensaye conteniendo las cepas de *Bacillus thuringiensis* se tomaron varias asadas para ser sembradas por estrías en 10 cajas petri conteniendo 10 ml de caldo nutritivo sólido, las cajas fueron incubadas a 30 °C hasta la esporulación.

Los cultivos fueron monitoreados hasta observar la presencia del complejo espora cristal el cual se detecto a través de una tinción simple. Para la recuperación del complejo espora- cristal, el material biológico desarrollado en las cajas petri fue cosechado en tubos eppendorf de 1.5 ml y suspendido en NaCl 1 N para la inactivación de proteasas presentes en el medio; los tubos fueron incubados por 2 horas a 37°C, en un termociclador (Perkin Elmer); los tubos se lavaron 3 veces por centrifugación (centrífuga para tubos Eppendorf modelo 5415C) con agua bidestilada a 1000 rpm por 5 minuto y almacenado a -20°C por 14 horas.

5.3.1.1 Liofilización del complejo espora cristal

El complejo espora-cristal fue incubado a -20 °C por 14 horas y fue liofilizado por 8 horas.

5.3.1.2. Solubilización del complejo espora- cristal

Se suspendió 0.01gramo del complejo espora cristal liofilizado en 1ml de agua bidestilada; 500 µl de esta suspensión fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y fue solubilizado por incubación en 750 µl NaOH 0.05 M por 2 horas a 37 °C en un termoblock (Thomas and Ellar 1983). El material insoluble fue removido por centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos.

5.3.1.3. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determino utilizando el método de Bradford, se tomo 5 utilizando BSA como estándar y se llevo a un pH de 7-7.5 con HCl concentrado.

5.3.2 Determinación de las dosis letales media (DL₅₀) de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* RV4-8, RV8-1

Los bioensayos se realizaron de acuerdo a la WHO. Se utilizaron larvas de *Aedes aegypti* del tercer instar de la segunda generación, provenientes del estado de Nuevo León, Veracruz y Morelos; se utilizaron vaso de plástico de 10cm de alto x 50cm de diámetro conteniendo 40 ml de agua bidestilada estéril; en cada vaso se colocaron 10 larvas. Las concentraciones del complejo espora -cristal solubilizado utilizado para determinar la dosis letal media (DL₅₀) de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* RV4-8, RV8-1 y HD225 se presenta en la tabla II. Se realizaron tres replicas por cada concentración a evaluar y un control.

Tabla II

Concentraciones del complejo espora –cristal utilizadas para determinar la dosis letal media (DL₅₀) de las cepas de *Bacillus thuringiensis* RV4-8, RV8-1 y HD225 en *Aedes aegypti* provenientes de los estados de Nuevo León, Veracruz y Morelos

No	<i>Aedes aegypti</i>								
	Nuevo León			Veracruz			Morelos		
	Dosis concentración µg/ml			Dosis concentración µg/ml			Dosis concentración µg/ml		
	RV4-8	RV8-1	HD225	RV4-8	RV8-1	HD225	RV4-8	RV8-1	HD225
1	0.4	10	0.025	2.0	25	0.16	3.8	45	0.45
2	0.2	6.0	0.020	1.8	20	0.14	3.4	40	0.40
3	0.1	2.0	0.015	1.6	15	0.12	3.0	35	0.30
4	0.08	1.0	0.010	1.4	10	0.10	2.6	30	0.20
5	0.06	0.8	0.005	1.2	5.0	0.08	2.2	25	0.10
6	0.04	0.6	0.0015	1.0	2.0	0.06	1.8	20	0.05
7	0.02	0.4	0.0010	0.8	1.0	0.04	1.4	15	0.01
8	0.01	0.2	0.0005	0.6	0.5	0.02	1.0	10	0.05
9	0.008	0.08	0.0001	0.4	0.2	0.01	0.6	5.0	0.001
10	0.006	0.06	0.00005	0.3	0.1	0.008	0.2	1.0	0.0005
Cont.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0



Figura12. Bioensayos de laboratorio. Determinación de las concentraciones letales media (DL_{50}) de *Bacillus thuringiensis* RV4-8 y RV8-1

6. RESULTADOS

6.1 ESTABLECIMIENTO DE POBLACIONES DE *Aedes aegypti*

6.1.1 Recolección de pupas y larvas de mosquitos

Los siguientes datos muestran las diferentes especies de mosquitos recolectados durante el muestreo entre ellos se encuentran *Aedes aegypti*, *Culex*.

Tabla III

Especies de Mosquitos identificados en los Estados de Nuevo León, Veracruz y Morelos

Estado	Especie de Mosquito
Nuevo León	1. <i>Aedes aegypti</i>
	2. <i>Aedes</i>
	3. <i>Culex</i>
Veracruz	4. <i>Aedes</i>
	5. <i>Culex</i>

6.1.2 Estudio taxonómico

6.1.2.1 Identificación de larvas de *Aedes aegypti*

La identificación se llevo a cabo, mediante el uso de claves taxonómicas propuestas por Rabinovitch. La columna derecha representan las claves taxonómicas propuestas por Rabinovitch 1989, por su parte la columna izquierda corresponden a las

fotos de las características morfológicas identificadas en el laboratorio que comprueban que en el presente estudio realmente se trabajó con la especie *Aedes aegypti* en el establecimiento de la colonia y los bioensayos de laboratorio.

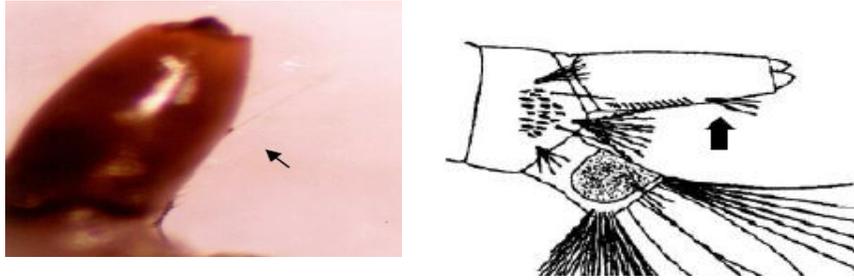


Figura 13. Sifón con un par de cerdas simples o

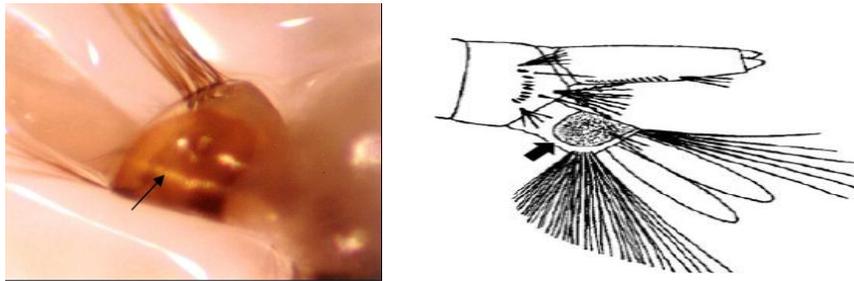


Figura 14. Extremo del abdomen de *Aedes*. Silla de montar del segmento X

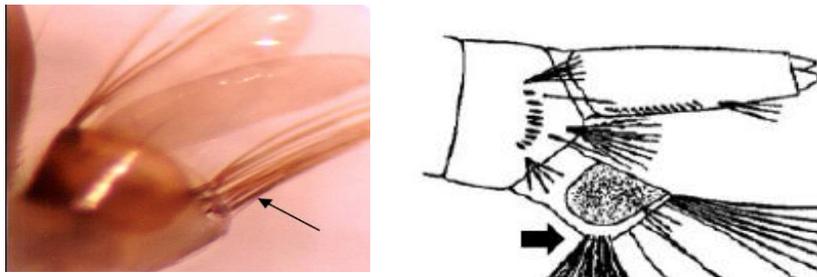


Figura 15. Brocha ventral con cinco o más pares de cerdas que nacen de una grilla.

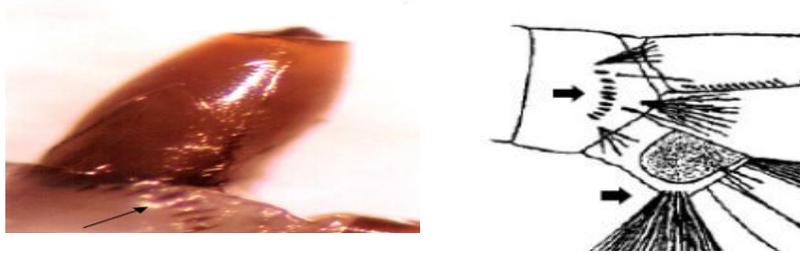


Figura 16. Dientes del peine del segmento VIII dispuestos en una fila, con espina central larga

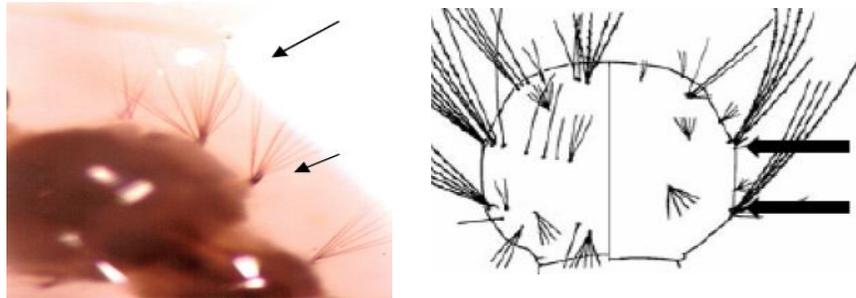


Figura 17. Torax con espinas laterales muy evidentes

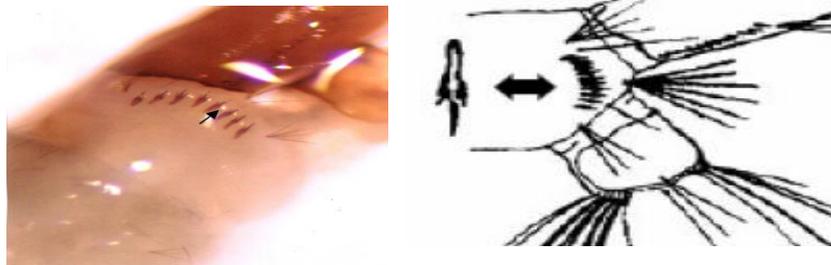


Figura 18. Dientes del peine del segmento VIII con espinas laterales visibles

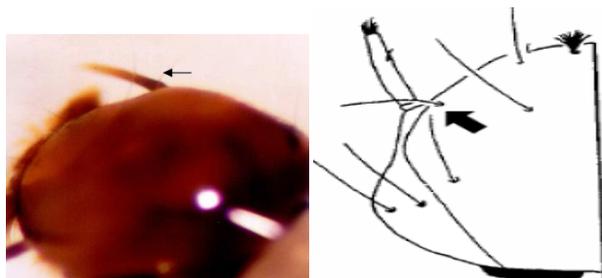


Figura 19. Cerda 7 de la cabeza simple

6.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*

6.2.1 Morfología del cristales de las cepas de *Bacillus thuringiensis* RV4-8 y RV8-1

El análisis al microscopio permitieron precisar la presencia de cristales de forma bipiramidal (medianos a grandes) cubica y esférica en la cepa RV4-8, por otra parte, en la cepa RV8-1 se observaron solo dos tipos de cristales de forma bipiramidal y ovoide. Esto coincide con los criterios de algunos autores, al señalar que las subespecies de *B. thuringiensis* pueden sintetizar más de una inclusión parasporal (Del Rincon-Castro *et al.*, 2006). De igual modo, la cepa HD1 (patrón internacional) también presenta cristales bipiramidales, los cuales se encuentran acompañados de pequeños cristales cuboidales o inclusiones cúbicas que son tóxicos a lepidópteros y dípteros (Fig. 20)

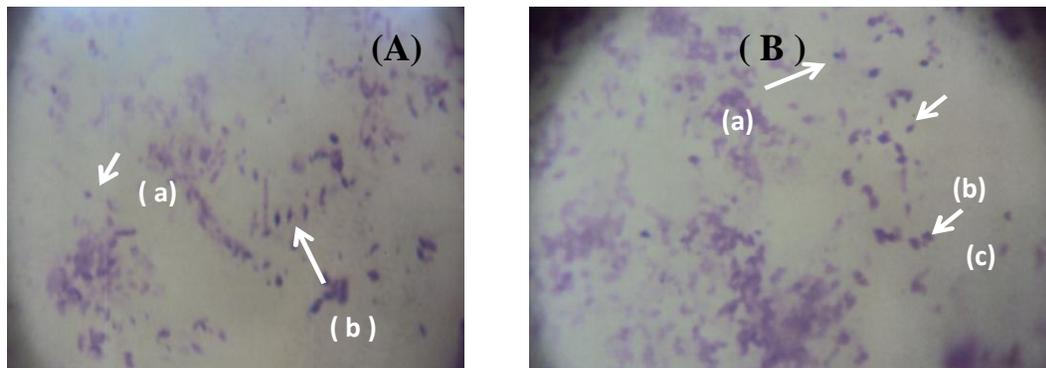


Figura 20. Microfotografías al microscopio electrónico de la morfología de las cepas de *B. thuringiensis*: A. RV8-1; B. RV4-8. Se observa la morfología bipiramidal típica (b) cúbicas cristalinas (c), y los cristales de amorfos (a) a esféricos.

6.2.2 Análisis proteico

La SDS-PAGE de las suspensiones de esporas y cristales muestra que las cepas RV4-8 y RV8-1 tuvieron un patrón proteico similar al informado para *B. thuringiensis subs. israelensis*, con proteínas de 130, 70 y 27 kDa. Las cepas RV4-8 y RV8-1 también presentaron un perfil Cry caracterizado por una sola proteína de muy bajo peso molecular, que pudiera considerarse como proteínas Cyt

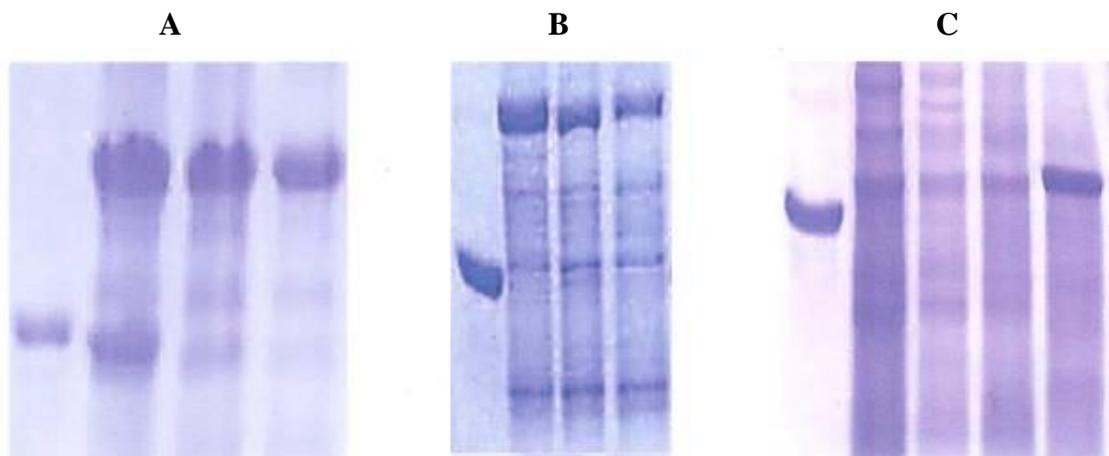


Figura 21. Análisis comparativo de la composición del complejo espora cristal solubilizado de *B. thuringiensis* RV4-8 Y Rv8-1 por SDS- PAGE al 8% Panel A, 12% Panel B y 15% de poliacrilamida Panel C. Panel A. Carriles: 1, BSA; 2: RV4-8; 3 RV8-1; 4, HD-73. Panel B: Carriles: Línea 1: BSA; Línea 2: RV4-8; 3, RV8-1; 4, HD-73.C: SDS-PAGE 15%: Carriles: 1, Albumina de huevo; 2: RV4-8; 3,RV8-1; 4, HD-225.

6.2.3 Perfil plasmidico

El análisis de la PCR de las cepas RV4-8 y RV8-1 revela la presencia de fragmentos amplificados característicos de los genes *cry* comparados con un patrón de plásmidos similar a *B. thuringiensis subs. israelensis* y HD-73 cepas utilizadas como referencia (Fig. 22).

6.2.3 β - exotoxina

Los resultados de los análisis espectrofotométricos de los sobrenadantes etanolicos analizados de las cepas RV4-8 y RV8-1, presentaron resultados similares a control negativo (HD-1), con una absorción de onda 0.1208 y 0.1431 nm respectivamente (Tabla IV) y el medio estéril, mientras que *B. thuringiensis* HD-59 presento altos valores de absorbancia (control positivo).

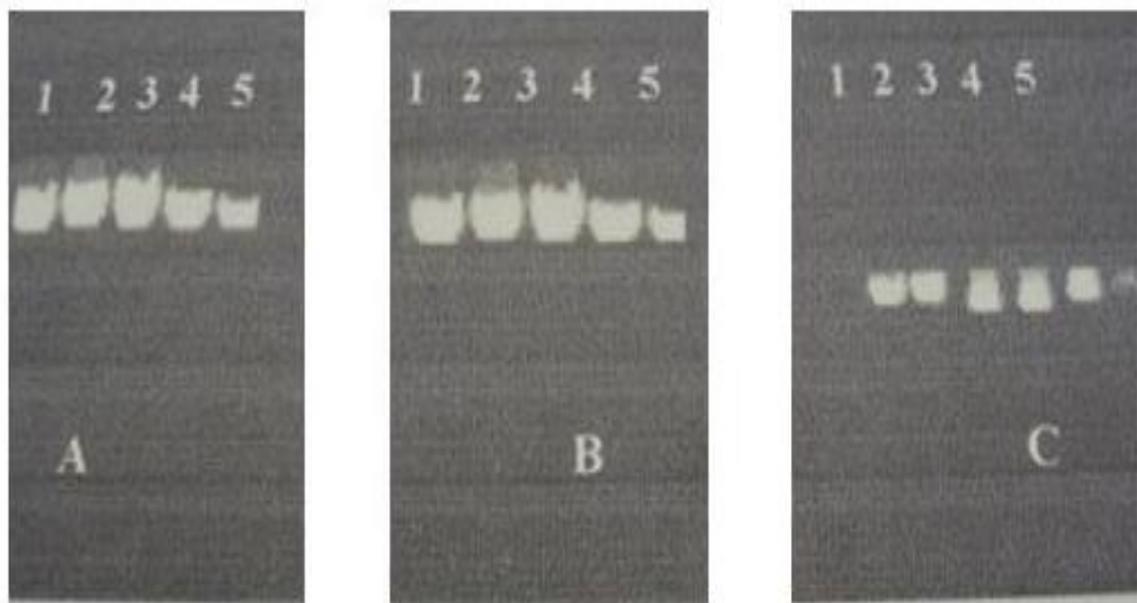


Figura 22. Geles de agarosa: (A: 1.5%; B: 1%; C: 0.7 %). Análisis comparativo de Los fragmentos amplificados de los genes *cry* de *B. thuringiensis* RV4-8 y Rv8-1. Carriles: 1, RV4-8; 2, RV8-1; 3, HD225; 4, HD-73

Tabla IV

Espectro de absorción de los precipitados etanolicos de las cepas RV4-8, RV8-1 HD-59 Y HD-1

Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Absorbancia		
	nm		
	250	260	270
HD-59 (+)	0.2147	0.2471	0.1986
HD-1 (-)	0.1621	0.1532	0.1322
RV4-8	0.1289	0.1208	0.1006
RV8-1	0.1506	0.1431	0.1252
Control	0.1391	0.1331	0.1113

6.2.4 Evaluación de la actividad hemolítica

Los resultados de los análisis espectrofotométricos del complejos espora cristal solubilizados de las cepas RV4-8 y RV8-1, sobre los eritrocitos humanos presentaron actividad hemolítica similares al control positivo (HD225), presentando una HDL₅₀ de 16.6 y 189.9 µg/ µl respectivamente (Fig. 23).

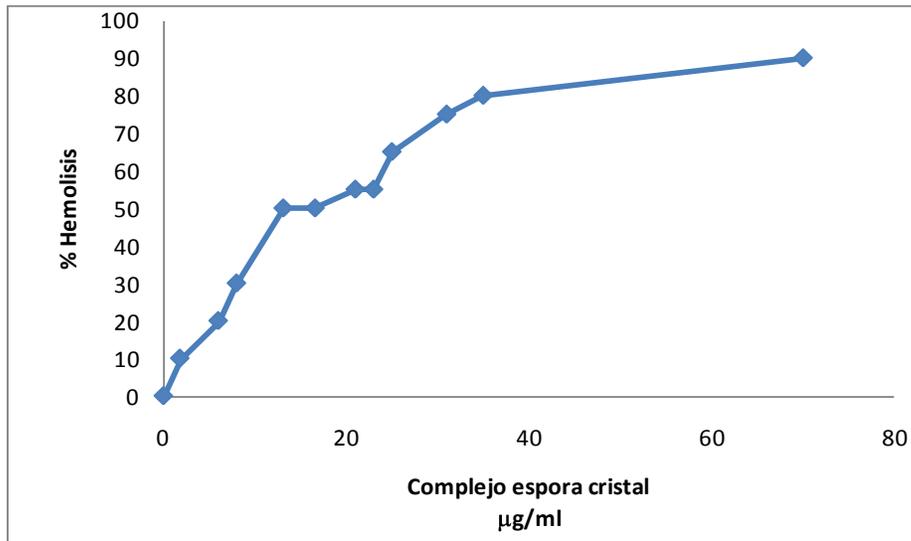


Figura 23 a. Gráfica del análisis de la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos: RV4-8

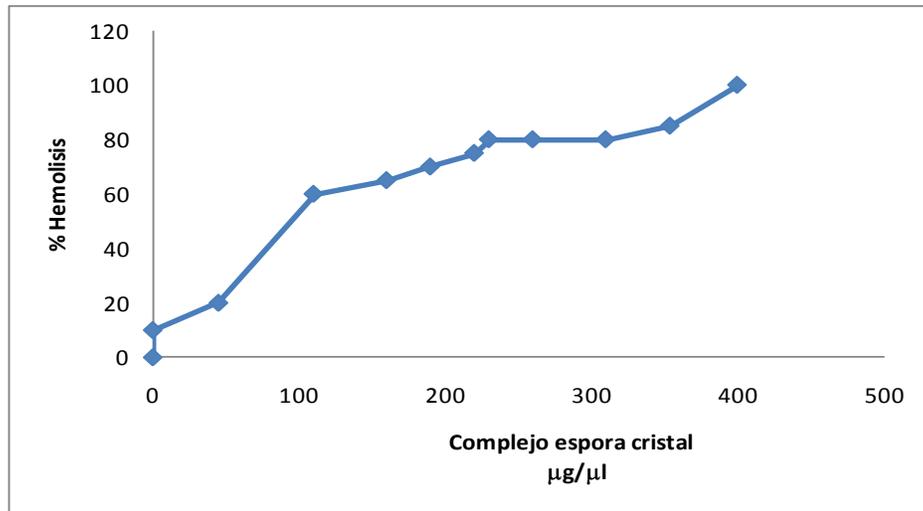


Figura 23 b. Gráfica del análisis de la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos: RV8-1

6.3 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LAS CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA LARVAS DEL TERCER ESTADIO DE *Aedes aegypti*

6.3.1 Determinación de la Dosis Letal (DL₅₀) aplicando el Método Estadístico Probit

En la tabla II se pueden observar las concentraciones que provocaron entre 0 y 100% de mortalidades con cada cepa, pudiéndose corroborar la actividad insecticida que poseen las mismas, la cepa RV4-8 arrojó las menores concentraciones en los bioensayos, seguida por RV8-1. Los datos analizados con el programa Probit, para obtener las concentraciones letales y las rectas de regresión para cada cepa, se muestran en la tabla V. Se aplicó la prueba χ^2 , a todos los resultados de los bioensayos, por lo que podemos plantear que todas las mortalidades ocurridas en cada uno están asociadas con las dosis utilizadas. Los altos valores de las pendientes correspondientes a las ecuaciones de regresión indican la homogeneidad de las poblaciones

TABLA V

DL₅₀ Y DL₉₀ *Bacillus thuringiensis* RV4-8, RV8-1 y HD225 Contra larvas del tercer estadios de *Aedes aegypti* provenientes del estado de Nuevo león, del estado de Veracruz y del estado de Morelos

Estado	<i>Bacillus thuringiensis</i>						Pendiente	Línea de regresión
	RV4-8	RV8-1	HD225	RV4-8	RV8-1	HD225		
	DL ₅₀			DL ₉₀				
Nuevo León	0.027	0.0796	0.000064	0.228	7.8690	0.00512	RV4-8 = 4.33 RV8-1 2.005	Y= 11.792+4.33X Y=7.2036+2.005 X
Morelos	0.6756	0.8166	0.00334	3.8810	3.1375	0.2257	RV4-8 5.26 RV8-1 6.84	Y=5.897 + 5.268 X Y= 5.6020 +6.842
Veracruz	0.3991	0.7525	0.0025	15.892	1.6751	0.0101	RV4-8 2.5 RV8-1 11.512	Y= 5.99+2.5X Y=6.42+11.512

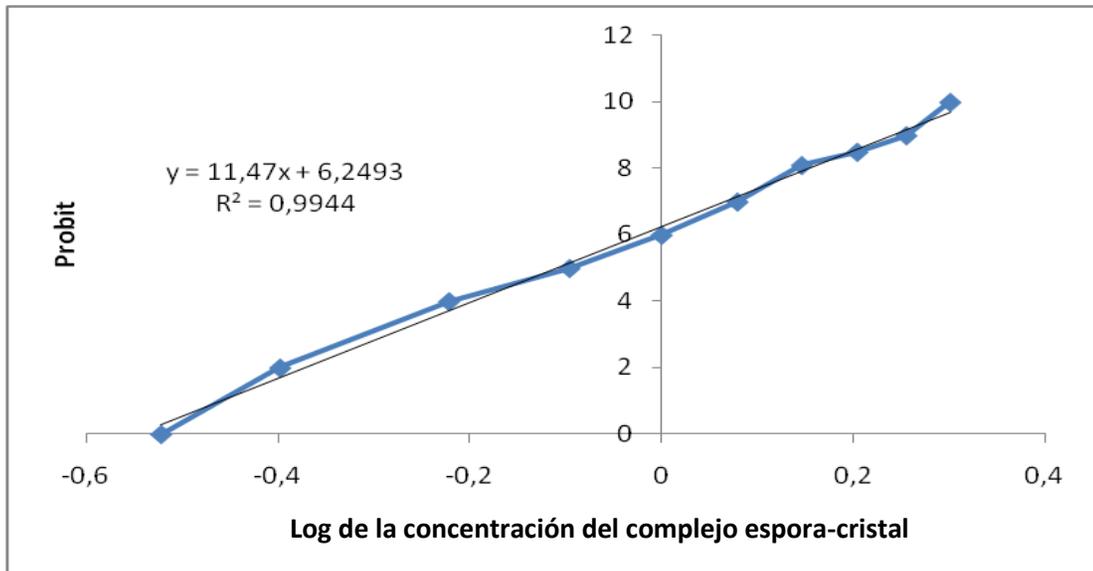
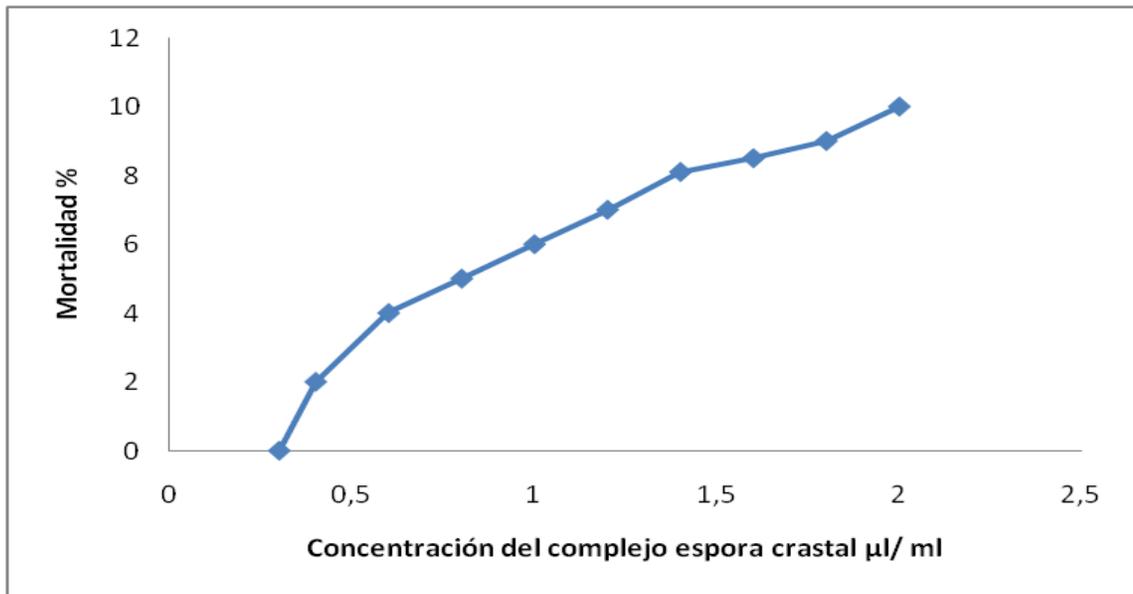


Figura 24 a. Gráficas del Análisis Probit *Bacillus thuringiensis* RV4-8 contra *A. aegypti*: Veracruz

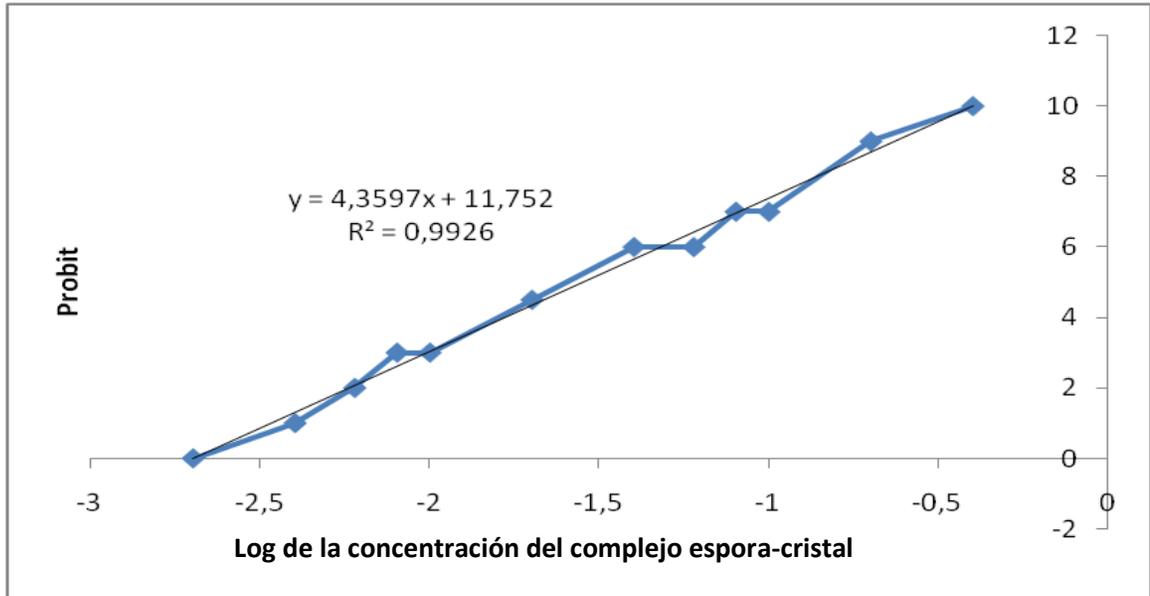
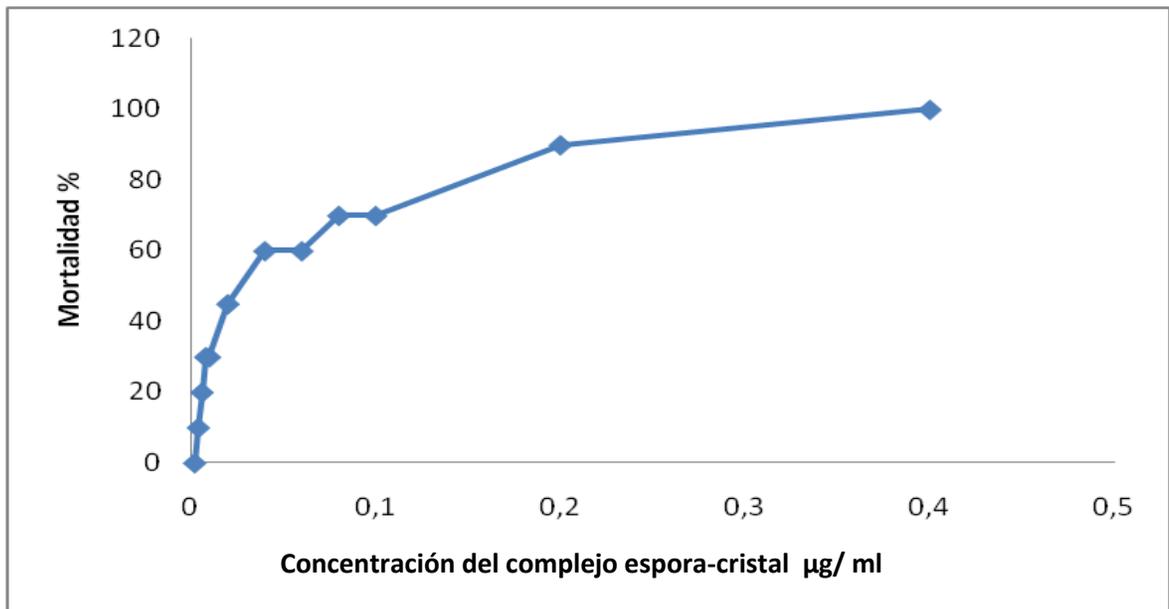


Figura 24 b. Graficas del Análisis Probit *Bacillus thuringiensis* RV4-8 contra *Aedes aegypti*: Nuevo León

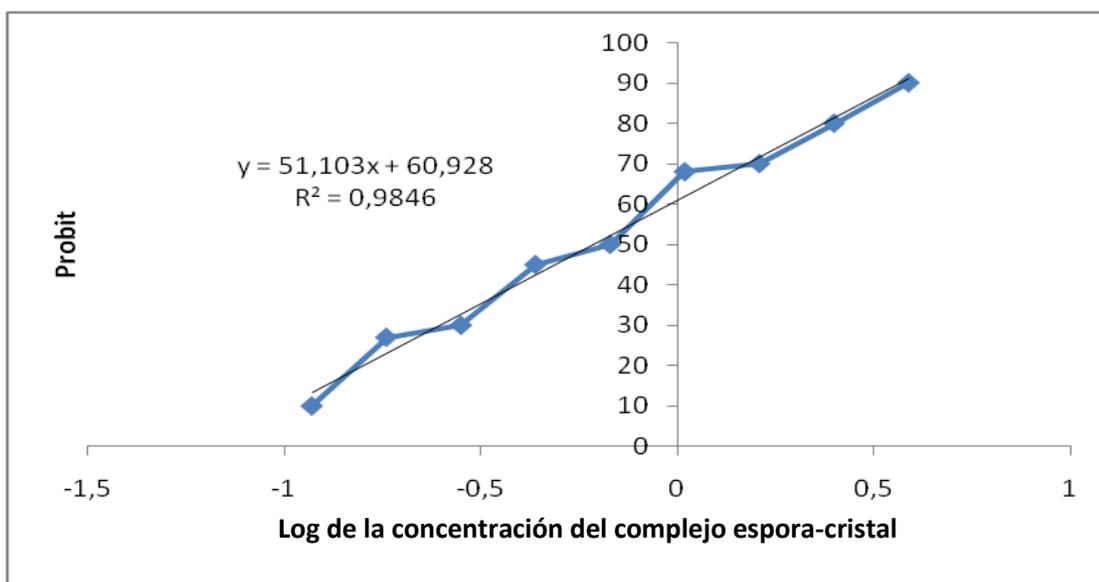
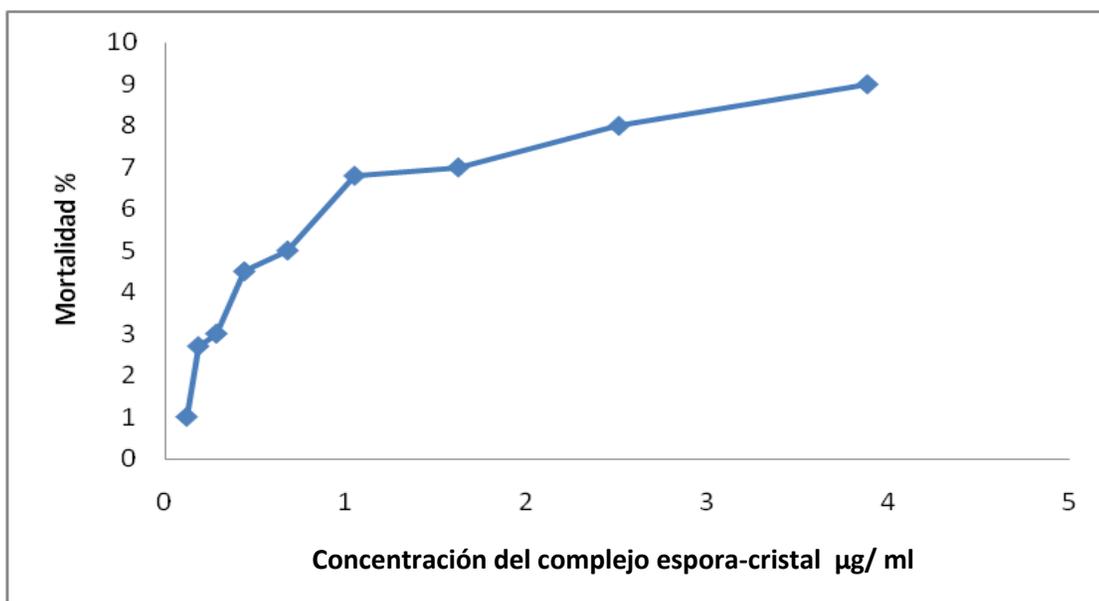


Figura 24 c. Gráficas del Análisis Probit *Bacillus thuringiensis* RV4-8 contra *Aedes aegypti*: Morelos

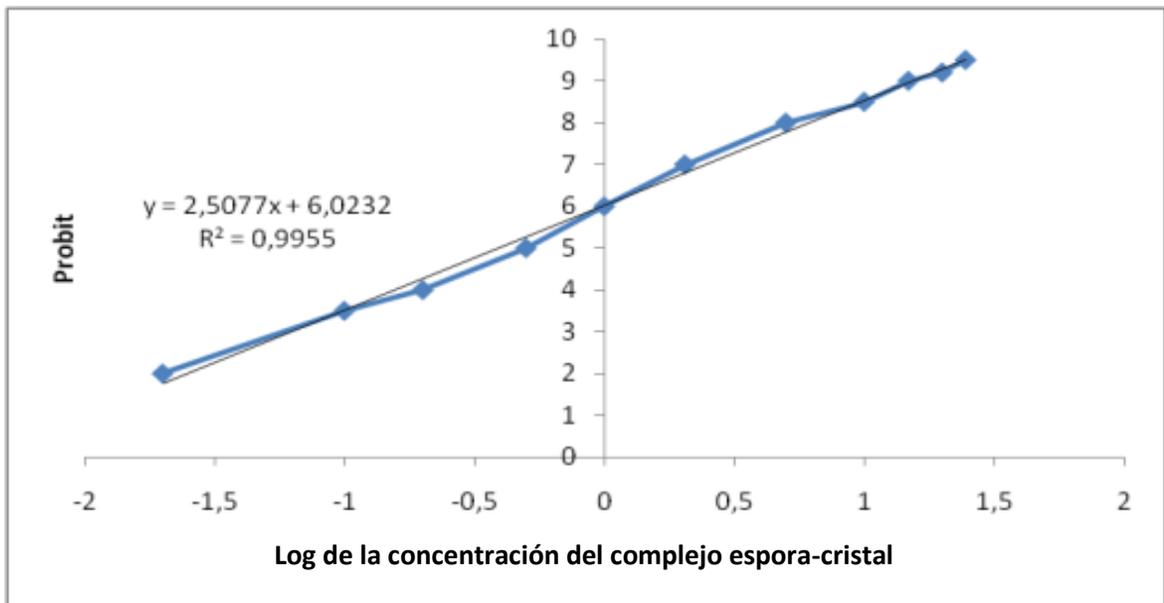
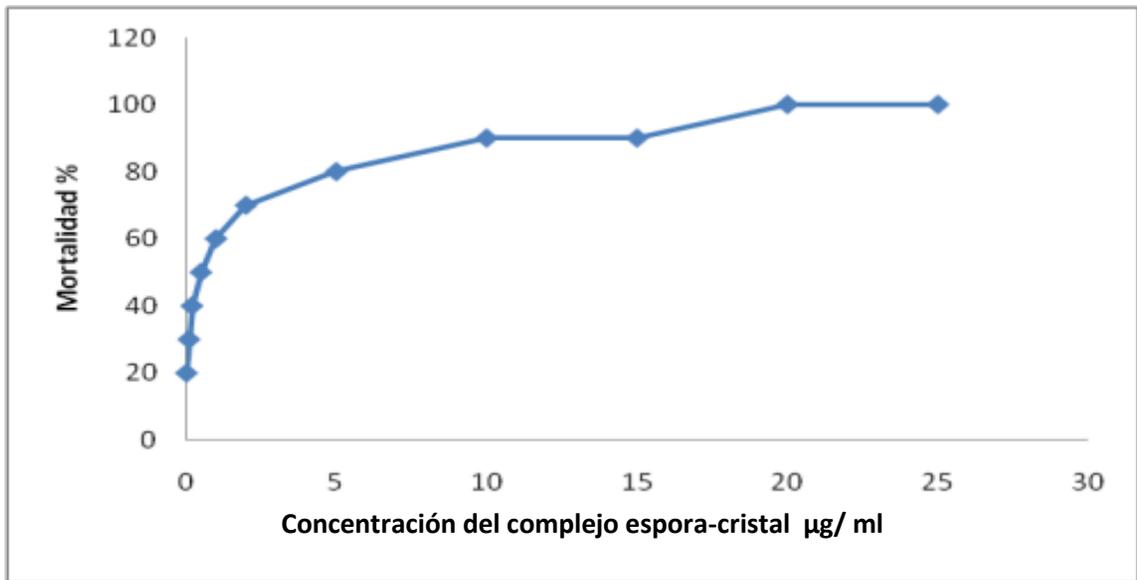


Figura 25 a. Gráficas del Análisis Probit *Bacillus thuringiensis* RV8-1 contra *Aedes aegypti*: a) Veracruz

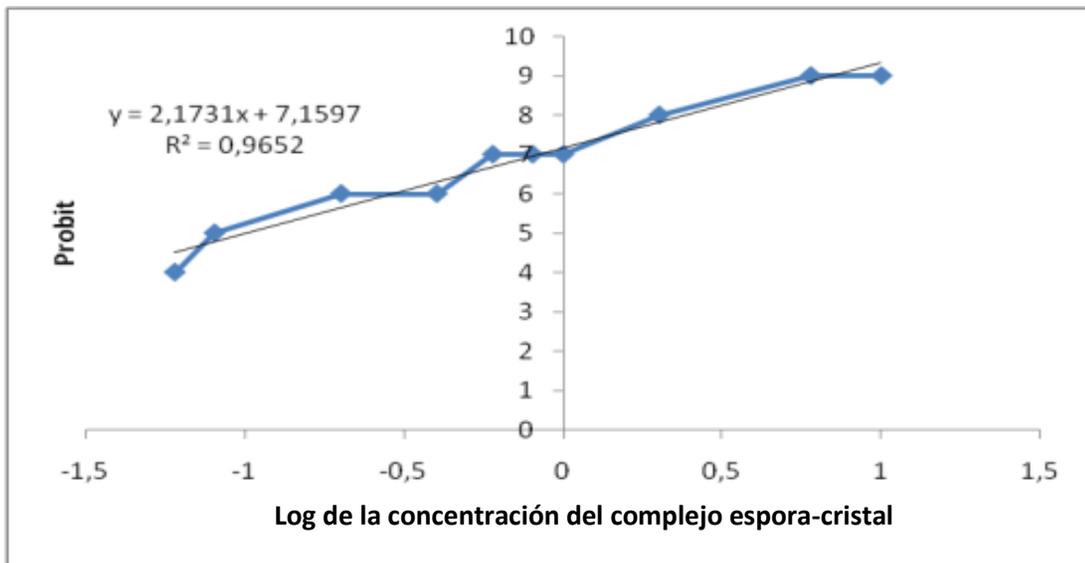
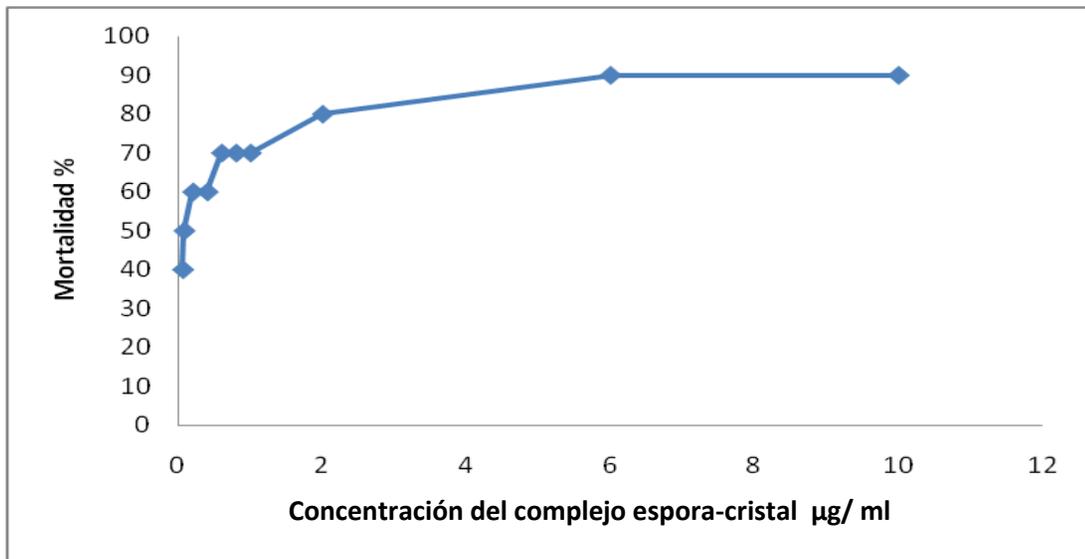


Figura 25 b. Gráficas del Análisis Probit *Bacillus thuringiensis* RV8-1 contra *Aedes aegypti*: Nuevo León

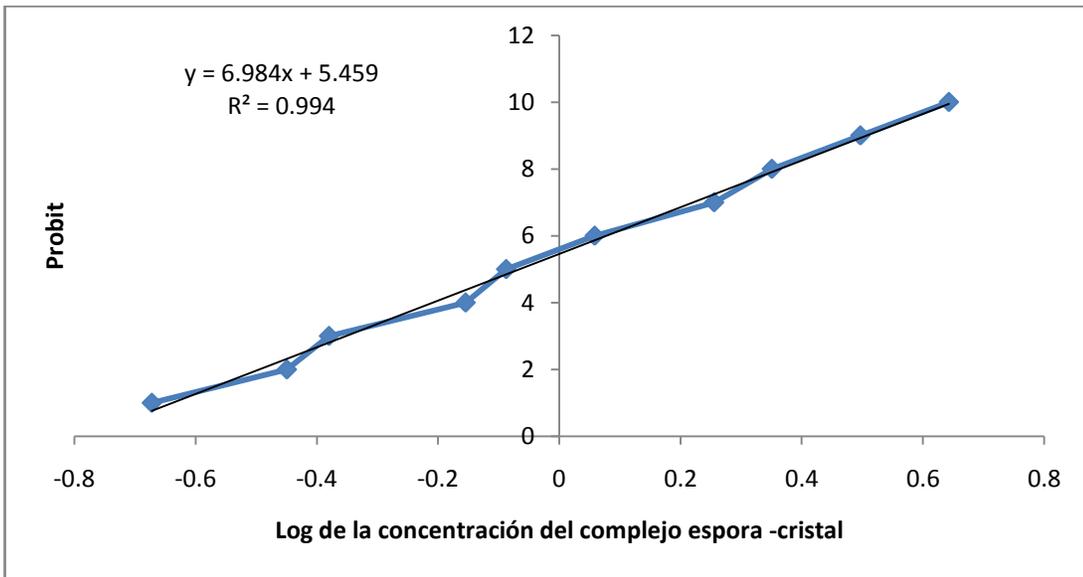
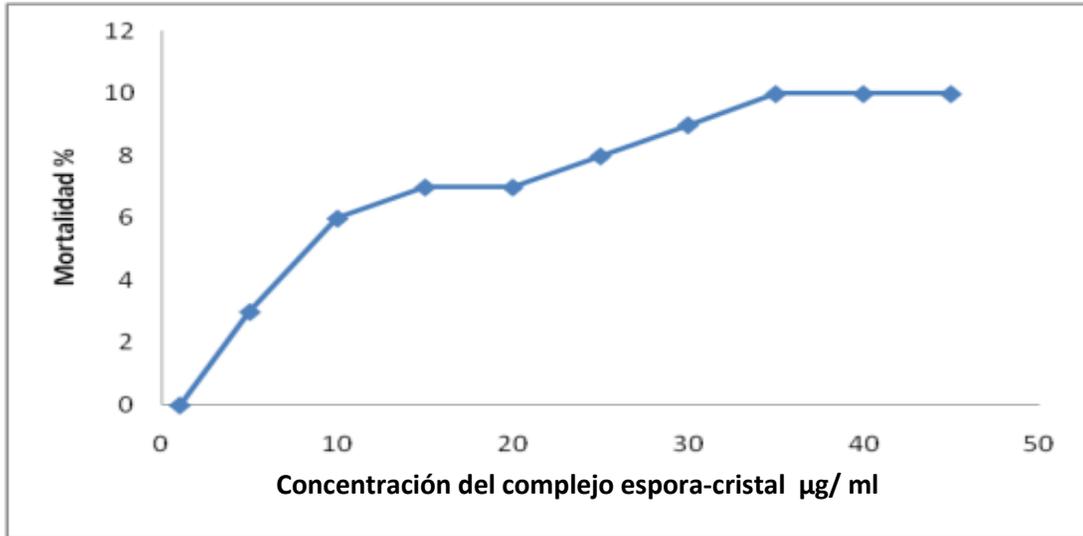


Figura 25 c. Graficas del Análisis Probit *Bacillus thuringiensis* RV8-1 contra *Aedes aegypti*: Morelos

7. DISCUSIÓN

La característica más distintiva de la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis* es la presencia de las inclusiones cristalinas o cuerpos parasporales (cristales) de naturaleza proteica. La morfología, tamaño y número de las inclusiones parasporales varían entre las diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Aunque generalmente predomina la forma bipiramidal, es posible distinguir diferentes morfologías como bipiramidal, esta forma es la predominante en la mayoría de los aislados de *B. thuringiensis* (Borgouin and Rapaport 1986) esférico-amorfo, rectangular, cuadrado y en forma de barra (Barloy *et al.*, 1969)

La formación de estas estructuras es un proceso asociado al evento de esporulación, en el cual los cristales se liberan al medio por lisis del esporangio. Su formación responde además a la presencia de genes que codifican para su producción, localizados en plásmidos de alto peso molecular (Federici 1999)

Lee (1995) analizó 113 aislados de *B. thuringiensis* y encontró gran variedad en la morfología de los cristales. Observó cuerpos parasporales bipiramidales, amorfos, esféricos, cúbicos y rectangulares. Igualmente Carreras (2003) advirtió cristales bipiramidales de diferentes tamaños, así como cúbicos y amorfos en un grupo de cepas nativas de *B. thuringiensis* estudiadas. Del Rincón-Castro *et al.* (2006), al analizar tres cepas nativas del estado de Guanajuato, México, también observaron cristales bipiramidales típicos de las cepas de *B. thuringiensis*. Adicionalmente apreciaron una inclusión cuadrada aplanada más pequeña. Se plantea que el cristal bipiramidal generalmente se asocia con la toxicidad de la cepa contra insectos lepidópteros y la presencia en ellas de la proteína Cry 1. Los cristales cúbicos y ovoides son activos tanto para lepidópteros como dípteros, y se relaciona a la inclusión cúbica con la proteína Cry 2 (Federici 1999). Las fotografías resultantes del análisis permitieron precisar la presencia de cristales de forma bipiramidal (medianos a grandes) cubica y esférica en la cepa RV4-8, por otra parte, en la cepa RV8-1 se observaron solo dos tipos de cristales

de forma bipiramidal y esféricos. Esto coincide con los criterios de algunos autores, al señalar que las subespecies de *B. thuringiensis* pueden sintetizar más de una inclusión parasporal (Arantes and Delecluse 1991). De igual modo, la cepa HD1 (patrón internacional) también presenta cristales bipiramidales, los cuales se encuentran acompañados de pequeños cristales cuboidales o inclusiones cúbicas que son tóxicos a lepidópteros y dípteros.

Las δ -endotoxinas contenidas en los cristales parasporales forman una familia de proteínas, clasificadas de acuerdo con la similitud de sus secuencias aminoacídicas y el espectro de toxicidad exhibido frente a diversos organismos plagas. Gitahy *et al.* (2007) informaron que la mayoría de los cristales de *B. thuringiensis* tóxicos a insectos del orden dípteros están compuestos de proteínas de aproximadamente 130 kDa, los que corresponden al tamaño de las δ -endotoxinas Cry11, usualmente asociadas con cristales de morfología ovoide. Los polipéptidos de 70 kDa corresponden con las δ -endotoxinas Cry tipo 2 asociados con la morfología cúbica

El patrón de proteínas Cry presente en las inclusiones parasporales se determinó para cada una de las cepas en estudio. Como se observa en cada una de las cepas, se obtuvieron dos bandas correspondientes a la proteína Cry 11 (130-140 kDa) y a la Cry 2 (70 kDa). La SDS-PAGE de las suspensiones de esporas y cristales muestra que las cepas RV4-8 y RV8-1 tuvieron un patrón proteico similar al informado para *B. thuringiensis subs. israelensis*, con proteínas de 130, 70 y 27 kDa.

Una de las características de las cepas que muestran actividad contra dípteros es la presencia de toxinas Cyt, pero estas no son tóxicas por sí solas, sino que manifiestan su acción al potenciar a las Cry y establecer una clara acción sinérgica (Botero 1992; Orland *et al.*, 1963)

Las cepas RV4-8 y RV8-1 también presentaron un perfil Cry caracterizado por una sola proteína de muy bajo peso molecular, que pudiera considerarse como proteínas Cyt según Guerchicoff *et al.* (2001), o como una proteína Cry de pequeño tamaño de acuerdo con lo informado por Rampersad y Ammons (2005). Al presentar estas cepas

actividad contra *Aedes aegypti*, se pudiera pensar que se trata de una proteína Cyt, que al estar acompañadas de las Cry de 130 y 70 kDa que conforman el patrón para díptero, mostraron el efecto esperado.

La β -exotoxina es una toxina no proteínacea, estable al calor (120°C, 15 minutos), que se secreta dentro del medio de cultivo y es activamente transportada. Esta toxina no es específica y puede ejercer efectos dañinos en diferentes organismos inclusive especies benéficas; es particularmente activa contra especies de dípteros, pero también es activa contra especies de coleópteros, lepidópteros y algunas especies de nematodos

Los resultados de los análisis espectrofotométricos de los sobrenadantes etanolicos analizados de las cepas RV4-8 y RV8-1, presentaron resultados Similares a control negativo (HD-1), con una absorción de onda 0.1208 y 0.1431 nm respectivamente.

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad contra dípteros tienen como característica la presencia de proteínas Cyt; esta proteína pose actividad citolítica y hemolítica. La proteína Cyt1Aa, es la principal componente de la toxicidad del cristal de *B. thuringiensis subsp israelensis* y fue la primera toxina aislada y caracterizada. Desde entonces, otras han sido detectadas en diferentes cepas con actividad toxica hacia dípteros: algunas relacionadas con Cyt1, como las reportadas para la *B. subspecie medellin*, y algunas que han sido clasificadas dentro de otros grupos basados en criterios inmunológicos; también se ha detectado la presencia de un segundo gen *cyt* en Bti llamado *cyt 2Ba1*, el cual expresa un polipeptido de 27 a 28 kDa.

Los resultados de los análisis espectrofotométricos del complejos espora cristal solubilizados de las cepas RV4-8 y RV8-1, sobre los eritrocitos humanos presentaron actividad hemolítica similares al control positivo (HD-225), presentando una HDL₅₀ de 16.6 y 189.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ respectivamente

La toxicidad de *B. thuringiensis* hacia dípteros se atribuye a cepas del serotipo *israelensis* (Fernández 1998). Además de esta subespecie existen otros serotipos que presentan actividad tóxica hacia larvas de dípteros como lo son *morrisoni*, *fukuokaensis*, *darmstadiensis*, *kyushuensis* y *jegathesan*; sin embargo, *israelensis* es considerada la

más tóxica e importante. De acuerdo con numerosos estudios e informes ha resultado muy activa contra larvas de mosquitos (72 especies).

En 1990 y 1993 se determinó la susceptibilidad de 31 colecciones de *Culex pipiens* provenientes de California y de 7 colecciones del Mediterráneo de Cyprus. No se presentó gran variación geográfica en la susceptibilidad entre las colecciones de California, sin embargo, las colecciones de Cyprus presentaron LC_{50} mayores a las de California. La colección de Cyprus presentó una LC_{50} 20 veces mayor y una LC_{95} 12.5 veces mayor.

Los resultados de los bioensayos muestran que las dosis letal media (DL_{50}) fueron significativamente diferentes. La dosis letal media (DL_{50}) para las poblaciones de estado de Nuevo León, Veracruz y Morelos expuestas a RV4-8 fueron de 0.027, 0.03991 y 0.6756 $\mu\text{l/ml}$ respectivamente y la dosis letal media (DL_{50}) para cada una de las poblaciones expuestas a RV8-1 fueron 0.0796, 0.725 y 0.8160 $\mu\text{l/ml}$ respectivamente. Estos resultados sugieren que las diferencias en la toxicidad se deben a una variación natural de la bacteria entre los insectos más que a una variación causada por la resistencia que pudieran desarrollar los insectos a la δ -endotoxina, son consistentes con previas investigaciones realizadas por Garcia y colaboradores (2001) donde sugieren que la variabilidad y la mortalidad causada por la δ -endotoxina es debido a diferencias genéticas entre las poblaciones de insectos. Gonzales y colaboradores (2001) a través de un estudio en respuesta a tres poblaciones de insectos comprobaron que los modelos de las potencias relativas entre las cepas no fueron similares entre las poblaciones probadas, lo que sugiere que los resultados obtenidos con una cepa no necesariamente predicen los resultados de otra cepa.

Los valores altos de las pendientes son el resultado de una población homogénea mientras que los valores bajos reflejan una gran heterogeneidad de la población, comportamiento que refleja la resistencia de los insectos a un bioinsecticida (Hemmingway 1993).

La toxicidad de la δ -endotoxina puede variar entre poblaciones de la misma especie de insectos. Esta variación afecta el criterio de la resistencia, debido a que la población tratada podría ser considerada resistente o no dependiendo de la cepa usada, además tal variación podría afectar la estandarización de la potencia de los productos basados en *Bacillus thuringiensis*.

8. CONCLUSIONES

1. Las cepas RV4-8 y RV8-1 producen tres tipos de cristales los cuales se asocian con polipetidos de 130 KDa (Bipiramidales y esfericos), 65 kDa (cuboidales) y 27-25 kDa (esféricos).
2. La producción de cristales en ambas cepas no es el mismo. Sin embargo el perfil de plásmidos y proteínas confirman una similaridad en ambas cepas
3. El patrón de proteínas es similar al que presentan aquellas cepas que tienen actividad toxica contra mosquitos
4. Ambas cepas presentan actividad hemolítica la cual se asocia con la presencia de la proteína Cyt; la diferencia de la actividad hemolítica de ambas cepas puede ser atribuida a diferencias en la producción de la proteína Cyt.
5. El análisis del espectro de absorción de los precipitados etanolicos sugieren que ambas cepas son β -exotoxina negativo.
6. Los estudios de toxicidad revelaron que la toxicidad no es el mismo hacia las larvas de *A. aegypti*, estas diferencias de toxicidad se le atribuye a la producción de las diferentes clases de cristales por parte de las cepas y a la variación genética de las larvas de *A. aegypti*
7. La Dosis Letal (DL_{50}) de RV4-8 y RV8-1 obtenida para las larvas del mosquito de *A. aegypti* de menor a mayor fueron: Nuevo León, Veracruz y Morelos.

8. LITERATURA CITADA

1. Al-Momani, F.; M. Obeidat; I. Saadoun; M. Meqdam 2004. Serotyping of *Bacillus thuringiensis* Isolates, Their Distribution in Different Jordanian Habitats and Pathogenicity in *Drosophila melanogaster*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(7):749-753.
2. Al-yahyaee, S. A. S., and D. J. Ellar. 1995. Maximal toxicity of cloned CytA-endotoxin from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* requires proteolytic processing from both the N- and C-termini. *Microbiology* 141:3141–3148.
3. *and Mol Biol Rev* 62: 775-806.
4. Arantes, O., and D. Lereclus. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108:115–119.
5. Araújo-Coutinho CJPC 1995. Biological control program against simuliids in the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 131-134.
6. Aronson A.I.; Angelo N. y S.C. Holt. 1971. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T : Characterization of mutants produced altere amounts of protease. *J. Bacteriol* . 106 : 1016-1025.
7. Aronson AI, Shai Y 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol Lett* 195: 1-8.
8. Ayra, P. C.; C. L. Rodríguez; P. Y. Fernández; R. P. Téllez 2006. Increased Activity of a Hybrid *Bacillus thuringiensis* Toxin Against *Spodoptera frugiperda* Larvae from a Maize Field in Cuba», *Biotecnología Aplicada* 23:236-239
9. Barloy, F., A. Del Ruse, L. Nicolas, y M.M. Lecadet. 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans subs. malasya*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *J. Bacteriol.* 178:3099-3105.

10. Bechtel D. B. y L. A. Bulla Jr. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 127:1472-1481
11. Becker N 1990. Microbial control of mosquitoes and black flies. Proc Intl Coll Invert Pathol Microb Control, Adelaide, p. 84-89.
12. Ben-Dov, E., G. Nissan, N. Pelleg, R. Manasherob, S. Boussiba, and A. Zaritsky. 1999. Refined, circular restriction map of the *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* plasmid carrying the mosquito larvicidal genes. Plasmid 42:186–191.
13. Benintende, G.; J. López-Meza; J. Cozzi; C. Piccinetti; J. Ibarra; 2000. Characterization of INTA 51-3, a New Atypical Strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina», Curr. Microbiol. 41:396-401, EE.UU.
14. Bobrowski, V. L.; G. Pasquali; M. Bodanese Zanettini; L. Fiuza; 2001. Detection of cry1 Genes in *Bacillus thuringiensis* Isolates from South of Brazil and Activity Against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)», Brazilian J. Microbiol. 32:105-109, Brasil
15. Botero D. Parasitosis humana. Bogota 1992. Corporación para investigaciones biológicas
16. Bourgoïn, C., A. Delecluse, and G. Rapoport. 1986. Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Mol. Gen. Genet. 205:390–397. +4
17. Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens, and M. Peferoen. 1992. Immunocytochemical Analysis of Specific Binding of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to Lepidopteran and Coleopteran Midgut Membranes. J. Invertebr. Pathol. 60:247-254
18. Bravo, A.; M. Soberón; I. Gómez; C. Muñoz; L. Pardo; L. Galán; H. Luna; A. Alcázar; B. Pereyra; J. A. Carrillo; R. García; L. Serrano; M. Patino; E. Galindo; M. C. del Rincón; J. E. Ibarra; 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev. Latinoam. Microbiol. 48(2):113-120

19. Bravo, A.2004. “Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains”, en *Biochimica et Biophysica Acta*, 162
20. Carreras, B. 2003. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario. Tesis en opción al título de Maestro en Microbiología General, Universidad de La Habana
21. Cavados CFG, Fonseca RN, Chaves Q, Rabinovitch L, Araújo- Coutinho CJPC 2001. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1017-1021.
22. Chang, C., Y.-M. Yu, S.-M. Dai, S. K. Law, and S. S. Gill. 1993. High-level cry IVD and *cyt A* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:815–821.
23. Charles J-F, De Barjac H 1983. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis var.israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti*, en microscopie électronique. *Ann Microbiol(Inst Pasteur)* 134 A: 197-218.
24. Chilcott C, Pillal BS.; 1985. The use of coconut wastes for the production of *Bacillus thuringiensis var. israelensis*. Departament of Microbiology, University of Otago.
25. Couch T.L. y R. Ross. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech. and Bioeng.* 22 :1297.
26. Crickmore, N. 2000. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclatura», http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html,
27. Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:808–813. +8
28. Crickmore, N., E. J. Bone, J. A. Williams, and D. J. Ellar. 1995. Contribution of the individual components of the endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:249–254.

29. Crickmore, N.; D. R. Zeigler; E. Schnepf; J. Van Rie; D. Lereclus; J. Baum; A. Bravo; D. Dean. 2000. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature»,
30. De Barjac H 1978. Um nouveau candidat a la lutte biologique contre les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Entomophaga* 23: 309-319.
31. Del Rincón-Castro, M. C.; J. Méndez-Lozano; J. E. Ibarra; 2006;: «Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)), *Folia Entomol. Mexic.* 45 (2):157-164
32. Delécluse, A., S. Poncet, A. Klier, and G. Rapoport. 1993. Expression of *cry* IVA and *cry* IVB genes, independently or in combination, in a crystal- negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3922–3927.
33. Delécluse, A., V. Juárez-Pérez, and C. Berry. 2000. Vector-active toxins: structure and diversity, p. 101–125. In J.-F. Charles, A. Delécluse, and C. Nielsen-leRoux (ed.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
34. Dharmisthini I S.C.; Patuwatana y Bhumiratana; 1985; Production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1583 on glutamate factory. *J. Invertebr. Phatol.* 46:231-238.
35. Dulmage H.T. ; Correa J.A. y Gallegos-Morales G. Potential for improved formulation of *Bacillus thuringiensis israelensis* through standarization and fermentation development. In: *Bacterial control of mosquitoes & black flies*. Rutgers University Pries, 1990. P.110-131.
36. Earp, D. J., E. S. Ward, and D. J. Ellar. 1987. Investigation of possible homologies between crystal proteins of three mosquitocidal strains of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 42:195–199. +16
37. Federici A. 1998. Site of action of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in mosquito and blackfly larvae. In: *Basic biology of microbial larvicides of vector of*

- human diseases. Special program for research and training in tropical diseases. Geneva, Switzerland: UNDP/WORLD BANK 1982. p. 37-47.
38. Federici, B.A.1999. *Bacillus thuringiensis* in Biological control. En: Handbook of Biological Control. T. S. Belows y T. W. Fisher (eds) Academic Press, San Diego. pp. 575-712.
 39. Feitelson J. S., J. Payne y L. Kim 1992. *Bacillus thuringiensis* : insects and beyond. Bio/technology 10:271-275.
 40. Fernández, L. E.. 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae”, en *Biochemical Journal*, 394.
 41. Fernández-Larrea, O.1999. Desarrollo de productos de *Bacillus thuringiensis* para el control de ácaros, nematodos y coleópteros. Etapa 01. Estudio del espectro de acción de las cepas», Inisav, Cuba, 1998: «Review of *Bacillus thuringiensis* Production in Cuba», Biocontrol News and Information 20(1):47-48
 42. Fischhoff, D. A. , Bowdish, K. S. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/ Technology 5: 807-813.
 43. Flemming G.1986; Biología y ecología de los vectores de malaria de las Americas. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
 44. Fritsch; T. Maniatis 1989; Molecular Cloning. A laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
 45. Galan L.J. ; J.A. Garcia; Ellis S.M.; Quintero Z.I. y H.A. Luna O. 1996. Production of *Bacillus thuringiensis*. En: Avances en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey, Mexico. 139-152.
 46. Georghiou, G. P., and M. Wirth. 1997. Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Appl. Environ. Microbiol. 63:1095–1101.
 47. Gill SS 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann Rev Entomol* 37: 615-636.

48. Gitahy, P.; M. Teixeira de Souza; R. Monnerat; E. Arrigoni; J. Baldani 2007. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain Highly Active to *Sugarcane Borer Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: *Crambidae*)», *Brazilian J. Microbiol.* 38:531-537.
49. Glare, T.; M. O'Callaghan; 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety, John Wiley and Sons, Chichester.
50. Goldberg L. J.; J. Margalit 1978. A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity Against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*», *Mosq. News* 37:355-358.
51. Gómez I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo & M. Soberón. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513:242-246.
52. Guerchicoff, A., A. Delécluse, and C. P. Rubinstein. 2001. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1090–1096.
53. Guerchicoff, A., R. A. Ugalde, and C. P. Rubinstein. 1997. Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2716–2721.
54. Guerchicoff, A.; A. Delecluse; C. P. Rubinstein; 2001. The *Bacillus thuringiensis* cyt Genes for Hemolytic Endotoxins Constitute a Gene Family, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1090-1096.
55. Hernández, M.; F. Cuevas; M. González; L. Guzmán; 2004. Comportamiento de dos variedades de soya CS 23 e IS 27 (*Glycine max* (L.) Merrill) en diferentes épocas, *Avances* 6(3)
56. Ibarra, J. E.; M. C. del Rincón; O. Orduz; D. Noriega; G. Benintende; R. Monnerat; L. Regis; C. M. F. de Oliveira; H. Lanz; M. H. Rodríguez; J. 1993. including an ultraestructural study of larvae for *Bacillus sphaericus*., *Dev Ind Microbiol* 1981; 22: 69-81.

57. Informacion tecnica sobre el agente de control biologico *Bacillus thuringiensis* SH-14 de Barjac. Mexico, 1984
58. Iñigo, R.; A. Estela; M. Porcar; C. Martínez; J. Oguiza; J. Ferré; P. Caballero: 2006. Molecular and Insecticidal Characterization of a Cry 1 Protein Toxic to Insects of the Family Noctuidae, Tortricidae, Putellidae and Chrysomelidae», *Appl. Environm. Microbiol.* 72 (6):4796-480
59. Knowles BH 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxin. *Adv Insect Physiol* 24:275-308.
60. Koldenkova L, Garcia L, Garces J, Gonzales R 1988. Capacidad depredadora. del pez larvivo *Poecilia reticulata* (Peters, 1985). *Cyprinodontiformis: Poecilidae* en un criadero natural de *Culex quinquefasciatus* say, 1923. *Rev Cub Med Trop* ; 40(1): 21-6.
61. Koni, P. A., and D. J. Ellar. 1994. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins. *Microbiology* 140:1869–1880.
62. Kwang-Bo, J.; J.Côte; 2002; «A Review of the Environmental Impacts of the Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis*», *Agriculture and Agri-Food*.
63. Lacey LA, Escaffre H, Philippon B, Seketeli A, Guillet P 1982. Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the control of *Simulium dammosum* S.I in the onchocerciasis control programme. *Z Tropenmed Parasitol* 33: 97-
64. Lee, H. 1984. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Korea, *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Environmental Benefits vol. I, HuaShiang Yuan Publishing, Taiwán, 1995, pp. 201-215.
65. Lereclus, D., O. Arantès, J. Chaufaux, and M.-M. Lecadet. 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60:211–218.
66. Lereclus, J. Baum y D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Rev.* 62:807-813

67. Morland H.B., Hayes R.O. and School, H. 1963. Methods for mass rearing of *Aedes aegypti* (L). U.S., public Rptes. 78: 711-719.
68. Mardini LB, Souza MAT, Rabinovitch L, Alves RSA, Silva CMB 1999. Field studies with the bacterial larvicida INPALBAC for *Simulium* spp. control in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 679-681.
69. Márquez, M. E.1999. Selección y evaluación tóxico-patogénica de cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis* con actividad nematocida, tesis en opción al grado científico de Doctora en Ciencias Agrícolas.
70. Merello J, Ventoslla P. Chauca J, Guerra h, Infante B, Perez E 2000. Coconut and yuca agars to produce *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*. 65 Annual Meeting of the AMCA and the 87 Annual Meeting of the New Jersey Mosquito Control Association, Inc. March 12-16. Atlantic City NJ.
71. MINISTERIO DE SALUD 1999. Bases para el análisis de la situación del salud, Peru-1999. Boletín de la Oficina General de Epidemiología. Lima
72. Mulla M, Federice A, Darwanzen A. 1982. Larvicidal efficacy of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against stagnant water mosquitoes and its effects on nontarget organisms. *Environ Entomol* ; 11: 788-95.
73. Murga G.M.A. 1983. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* GM-2 en diferentes medios de cultivo. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo Leon, México.
74. Ortiz Seleena A, Braso A, Quintero R.1982. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis*
75. Pérez, C. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israeliensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor”, en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102.
76. Pérez, C., L. E. Fernandez, J. Sun, J. L. Folch, S. S. Gill, M. Soberón and A. Bravo. 2005. *Bti* Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that

- Cyt1Aa functions as membrane-bound receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102:18303-18308.
77. Rabinovitch L, Cavados CFG, Chaves JQ, Coutinho CJPCA, Silva, KRA, Seldin L 1999. A new strain of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* very active against black fly larvae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 683-685.
78. Ragni, A., I. Thiéry, and A. Delecluse. 1996. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype. *Curr. Microbiol.* 32:48–54. +34
79. Ragni, A., I. Thiéry, and A. Delécluse. 1996. Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 sero- type. *Curr. Microbiol.* 32:48–54.
80. Rampersad, J.; A. Ammons 2005. *Bacillus thuringiensis* Isolation Method Utilizing a Novel Stain, Low Selection and High Throughput Produced Atypical Results», *BMC Microbiol.* 5:52.
81. Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles J-F 2001. Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitol* 17: 377-379.
82. Regis, L.; S. B. da Silva; M. A. V. Melo-Santos 2001. The Use of Bacterial Larvicides in Mosquito and Black Fly Control Programs in Brazil», *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:207-210.
83. Rosso, M.-L., and A. Delécluse. 1997. Distribution of the insertion element IS240 among *Bacillus thuringiensis* strains. *Curr. Microbiol.* 34:348–353.
84. Ruiz LM, Segura C, Trujillo J, Orduz S 2004. In vivo binding of the Cry 11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* to the midgut of mosquito larvae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 73-79.
85. Saadoun, I.; F. Al-Momani; M. Obeidat; M. Meqdam; A. Elbetieha 2001. Assessment of Toxic Potential of Local Jordanian *Bacillus thuringiensis* Strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex sp.* (Diptera)», *Journal of Applied Microbiology* 90(6):866-872

86. Saadoun, I.; F. Al-Momani; M. Obeidat; M. Meqdam; A. Elbetieha 2001. Assessment of Toxic Potential of Local Jordanian *Bacillus thuringiensis* Strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex* sp. (Diptera), *Journal of Applied Microbiology* 90(6):866-872.
87. Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
88. Sambrook, J.; Sánchez; G. Peña; A. Bravo 2003; «Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity Against Different Mosquito Species», *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5269-5274.
89. Schagger, H.; G. von Jagow 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa», *Analytical Biochemistry* 166:368- 379.
90. Schagger, H.; G. von Jagow 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa, *Analytical Biochemistry* 166:368- 379
91. Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol*
92. Soberón, M.; L. E. Fernández; C. Pérez; S. S. Gill; A. Bravo 2007. Mode of Action of Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* Toxins», *Toxicon.* 49(5):597 600
93. Symposia in Agricultural Research. Allenhed , Oamun and Co., Totowa. N.J. 5 :129. 1981
94. Támez, P.; M. M. Iracheta; B. Pereira; L. J. Galán; R. Gómez; R. Támez; C. Rodríguez: 2007. Caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros», *Ciencia UANL* 8(4):477-482.
95. Thiéry, I., A. Delécluse, M. C. Tamayo, and S. Orduz. 1997. Identification of a cyt1A-like hemolysin gene from *Bacillus thuringiensis subsp. medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. *Appl. Environ. Micro-biol.* 63:468–473.

96. Thomas, W. E., and D. J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal - endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 60:181–197.
97. Thomas, W.E. y Ellar, D.J. 2002. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta endotoxin: effects and mamalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 60: 181-197.
98. Ward, E. S., D. J. Ellar, and C. N. Nicholls. 1988. Single amino acid changes in the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin affect the toxicity and expression of the protein. *J. Mol. Biol.* 202:527–535.
99. Wirth, M. C., G. P. Georghiou, J. I. Malik, and G. H. Abro. 2000. Laboratory selection for resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: *Culicidae*) from California, USA. *J. Med. Entomol.* 37:534–540.
100. Wu, D., J. J. Johnson, and B. A. Federici. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and Cry IVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 13:965–972.
101. Yu, Y., M. Ohba, and S. S. Gill. 1991. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1075–1081.

RESUMEN CURRICULAR

Claudia Ivonne Fernández Ávila

Candidato para el grado de
Doctor en ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis*
Y SU TOXICIDAD CONTRA TRES POBLACIONES DE *Aedes aegypti*

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacida en Durango, Dgo., el 24 de Abril de 1976

Educación: Egresada del Instituto Tecnológico de Durango, grado obtenido: Maestro
en Ciencias con especialidad en Bioquímica.

Experiencia Profesional: Maestra de Tiempo completo del Instituto Tecnológico
Superior de Santiago Papasquiario desde el 2006; Jefe del Laboratorio
de la Carrera de Ingeniería en Industrias Alimentarias; Integrante del
cuerpo de Investigación del Instituto Tecnológico Superior de Santiago
Papasquiario