



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



**DISEÑO DE UNA PRUEBA QUE PERMITA DETECTAR LA PRESENCIA DE δ -
ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*
EN UN MEDIO DE CULTIVO**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. **Adriana G. Camino Di Prinzio** como requisito para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutoras:

Dra. Roxana Gajardo

Dra. Mariana Eleizalde

Caracas, mayo de 2019

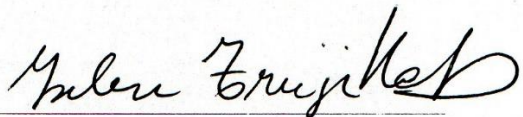
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DE LA Br. Adriana Gabriela Camino Di Prinzio**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. **Adriana Gabriela Camino Di Prinzio**, C.I: **23.944.037**, titulado “**DISEÑO DE UNA PRUEBA QUE PERMITA DETECTAR LA PRESENCIA DE δ -ENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* EN UN MEDIO DE CULTIVO**”, para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

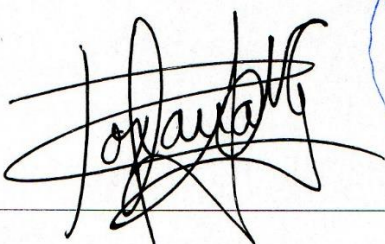
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 10 días del mes de mayo del año 2019.



Dra. Carolina Pérez-Gordones

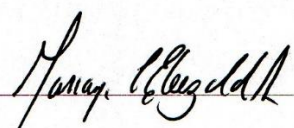


Dra. Iselen Trujillo



Dra. Roxana Gajardo
(Tutora 1)





Dra. Mariana Eleizalde
(Tutora 2)

El jurado evaluador sugiere que los resultados obtenidos de este trabajo deben ser publicados debido a su impacto en el proceso de escalamiento de formulaciones de bioinsecticidas con base en *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, lo cual incidirá de forma definitiva en la epidemiología de muchas enfermedades transmitidas por dípteros en Venezuela.

*Dedicado a mi nonno y a mi nonna
que sé que desde el cielo me miran y se
enorgullencen. Así como, a mis padres
por su amor y apoyo incondiciona*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser un gran ejemplo a seguir y por brindarme día a día su amor incondicional. A mi hermana Ana Valentina, por siempre escucharme y ayudarme.

A mis tutoras, Roxana Gajardo, por creer en mí y darme la oportunidad de trabajar a su lado, y Mariana Eleizalde que en tan poco tiempo pasó de ser más que una tutora... una amiga. Gracias.

Al profesor Blas Dorta, ejemplo de profesionalismo y ser humano, por apoyarme y aconsejarme no sólo en cada paso de este proyecto sino también de mi vida personal.

Al mejor amigo, Gabriel Guía, por soportar mis 7 personalidades y quererlas a cada una de ellas como solo tú sabes hacerlo. Gracias por siempre estar ahí para escucharme y ayudarme.

A Daniela Plasencia que más de una vez me saco de apuros y por sentarte conmigo en las tardes a discutir mis resultados tomando un buen café.

A los miembros del Laboratorio de Inmunobiología IDECYT-UNESR, la Dra. Marta Mendoza, la Dra. Lucinda Tavares y el Dr. José Ruben Ramírez, por brindarme sus conocimientos y hacerme mis días más amenos. Así como, Jesús Morales y Orquídea Pérez.

A mi jurado, la profa. Maria Carolina Pérez-Gordones e Iselen Trujillo.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y a todos sus profesores.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE.....	III
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMEN	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
Biología de <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
Características generales de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
Los cristales parasporales y la δ -endotoxina.....	5
Modo de acción de las δ -endotoxinas.....	8
Los mosquitos.....	10
Ciclo de vida de los mosquitos	10
Impacto de los mosquitos en la salud del humano	12
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	13

ANTECEDENTES	15
JUSTIFICACIÓN	18
OBJETIVOS.....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos específicos	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
- Materiales	22
Material Biológico	22
Medios de Cultivo	23
Medio A-80	23
-Métodos.....	24
Preparación de los preinóculos	24
Cultivo por lote de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	24
Observación de la esporulación y producción de cristales en un microscopio de contraste de fases.....	25
Obtención del complejo espora-cristal.....	25
Electroforesis SDS-PAGE del complejo espora-cristal	26
Solubilización de los cristales parasporales	28
Obtención de una fracción enriquecida en cristales parasporales	29
Estudio in sílico de la proteína Cry11Aa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	30
Cinética de formación de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> . var. <i>israelensis</i> en medio A-80 a través de electroforesis SDS-PAGE	31
Electroelución de la banda de 72 kDa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	31

Diálisis y concentración de la proteína Cry11Aa electroeluída	32
Cuantificación de la proteína Cry11Aa	33
Preparación del inmunógeno e inmunización.....	34
Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante un Dot Blot	35
Evaluación de la cinética de formación de anticuerpos a través de un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI)	36
Evaluación de la cinética de formación de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> en medio A-80 a través de un Dot Blot	39
Detección de la proteína Cry11Aa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> mediante un ensayo Western Blot	40
RESULTADOS.....	42
Curva de Crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	42
Solubilización de los cristales parasporales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	44
Obtención de una fracción enriquecida en cristales parasporales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	46
Estudio <i>in silico</i> de la proteína Cry11Aa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	48
Evaluación de la cinética de formación de los cristales mediante una electroforesis SDS-PAGE	53
Purificación de la proteína Cry11Aa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> por el método de electroelución	55
Evaluación de la producción de anticuerpos IgG anti-Cry11Aa mediante un Dot Blot.....	57
Estandarización del Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (ELISAI)	58
Evaluación de la cinética de anticuerpos mediante un Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (ELISAI).....	61

Evaluación de la cinética de formación del cristal parasporal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis en medio A-80 mediante un ensayo Dot Blot.....	62
Detección de la proteína Cry11Aa de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis mediante un ensayo Western Blot	64
DISCUSIÓN	66
Cultivo por lote de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis.....	66
Solubilización del cristal parasporal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis.....	69
Obtención de una fracción enriquecida en cristales parasporales de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis	72
Estudio <i>in silico</i> de la proteína Cry11Aa producida por <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis ..	74
Evaluación de la cinética de formación del cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. israelensis	78
Purificación de la proteína Cry11Aa	79
Detección de la proteína Cry11Aa mediante pruebas inmunoquímicas	79
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFÍA.....	90
CONSULTAS EN LINEA.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio A-80 (Arcas <i>et al.</i> , 1984).	23
Tabla 2. Composición del gel de apilamiento al 5% y del gel de resolución al 10%.	26
Tabla 3. Composición del tampón muestra 4x.	27
Tabla 4. Composición del amortiguador de corrida 1x.	27
Tabla 5. Composición de la solución colorante Azul Brillante de Coomassie.	28
Tabla 6. Composición del amortiguador Carbono Bicarbonato (BCB) 0,05 M; pH 9,6.	29
Tabla 7. Composición del amortiguador Tris Tampón Salino (TBS), pH 7,5.	35
Tabla 8. Composición del sustrato Diaminobencidina.	36
Tabla 9. Composición del tampón Fosfato Salino 0,02 M; pH 7,2 (PBS)	38
Tabla 10. Soluciones para la preparación del sustrato 3,3 5-bis-tetrametilbenzidina (TMB).	39
Tabla 11. Composición del amortiguador de electrotransferencia pH 8,9	40
Tabla 12. Composición de la solución Rojo Ponceau.....	41
Tabla 13. Análisis de similitud de la secuencia completa del gen <i>cry11Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> empleando el programa BLASTP 2.8.0.	49
Tabla 14. Análisis de similitud de la secuencia completa del gen <i>cry11Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> empleando el programa BLASTP 2.8.0.	52
Tabla 15. Estudio <i>in silico</i> de los epítopes de Cry11Aa predichos a partir del programa Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.	53
Tabla 16. Productos proteolíticos de las proteínas que conforman al cristal parasporal de <i>Bt.</i> var. <i>israelensis</i>	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de una célula de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i> C18 (x 44.000) esporulada.	4
Figura 2. Estructura primaria y terciaria de la toxina Cry.....	7
Figura 3. Modo de acción de las toxinas Cry.....	10
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> . /	12
Figura 5. Esquema de trabajo empleado para el Dot Blot.	36
Figura 6. Esquema de la placa de ELISAI empleada para la estandarización.....	37
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>Bt.</i> var. <i>israelensis</i> en medio A-80 y cinética de formación de esporas.....	42
Figura 8. Cultivo de <i>Bt.</i> var. <i>israelensis</i> a diferentes tiempos de cultivo visto bajo un microscopio de contraste de fase a 1000x.....	43
Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida del complejo espора- cristal (CEC) de <i>Bt</i> var. <i>israelensis</i> en fermentación sólida empleando diferentes protocolos de solubilización....	44
Figura 10. Fases obtenidas después del tratamiento del complejo espора- cristal de <i>Bt.</i> var. <i>israelensis</i> con hexano..	46
Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida de las fracciones obtenida mediante la purificación con hexano y diclorometano, empleando DTT como agente reductor.	47
Figura 12. Alineamiento entre las diferentes secuencias aminoacídicas de las proteínas Cry11Aa obtenidas mediante el programa BLASTP..	51
Figura 13. Evaluación de la cinética de formación del cristal de <i>Bt.</i> var. <i>israelensis</i> mediante una electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida..	54
Figura 14. Gel preparativo al 10 % de poliacrilamida del complejo espора- cristal (CEC) de <i>Bt.</i> var. <i>israelensis</i> , solubilizado en tampón carbono bicarbonato (BCB-βME).	55

Figura 15. Electroelución de la proteína Cry11Aa visualizada en una electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida.....	56
Figura 16. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-Cry11Aa mediante un Dot Blot..	57
Figura 17. Estandarización de las condiciones del ELISAi.	59
Figura 18. Proporción de unión entre las densidades ópticas de los sueros positivos y negativos de referencia obtenidas en la estandarización del ELISAi.	60
Figura 19. Cinética de formación de anticuerpos IgG contra la proteína Cry11Aa	61
Figura 20. Evaluación de la cinética de formación del cristal parasporal de <i>Bt. var. israelensis</i> en el medio A-80 mediante un ensayo Dot Blot.	63
Figura 21. Detección de la proteína Cry11Aa en el medio de cultivo A-80 mediante Western Blot..	64

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu_{\text{máx.}}$: Velocidad máxima de crecimiento

A-80: Medio de cultivo A-80

ALP: Fosfatasa alcalina

APN: N-aminopeptidasa

Bc: *Bacillus cereus*

BCB: Tampón Carbono Bicarbonato

BLASTP: Basic Local Alignment Search Tool

Br: proporción de unión (del inglés *binding ratios*)

BSA: Albúmina Sérica Bovina

Bt.: *Bacillus thuringiensis*

CADR: Cadherina

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CEC: Complejo espora-cristal

D.O.: Densidad óptica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditiotreitól

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

ELISAI: Ensayo indirecto de inmunoabsorción ligado a enzimas

ExPASy: Expert Protein Analysis System

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

MIP: Manejo Integrado de Plagas

MPPS: Ministerio del Poder Popular para la Salud

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PBS: Tampón Fosfato Salino

PM: Peso Molecular

rpm: Revoluciones por minuto

SD: Solución dilución

SDS-PAGE: Electroforesis en condiciones desnaturizantes

β -ME: β -Mercaptoetanol

TBS: Tris-Tampón- Salino

Tg: Tiempo generacional

TMB: 3,3'-bis-tetrametilbenzidina

vvm: volumen de aire/volumen de medio/minuto

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria que forma una inclusión parasporal conformada por δ -endotoxinas tóxicas para una gran variedad de insectos. Las formulaciones de *Bt* son ampliamente utilizadas en todo el mundo como una alternativa en el uso de pesticidas químicos ya que los cristales son altamente específicos, son inocuos para vertebrados y plantas, y son completamente biodegradables, lo que los hace una alternativa viable para el control de plagas de insectos. *Bt. var. israelensis* es específica para especies del género *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, dípteros que causa enfermedades tropicales como la malaria, el dengue, el chikungunya y el zika. Debido a la importancia económica de esta variedad, es necesario generar metodologías que nos permitan evaluar el proceso fermentativo y a su vez la formación del cristal. Por esta razón, el siguiente trabajo se planteó diseñar una prueba que permitiera detectar en medios de cultivo la proteína Cry11Aa, que conforma al cristal parasporal de *Bt. var. israelensis* mediante métodos inmunológicos. Para ello, la proteína Cry11Aa fue purificada a través del método de electroelución. Posteriormente, fue inyectada en conejos para obtener sueros hiperinmunes que fueron evaluados mediante un ELISAi, a fin de monitorear la respuesta de anticuerpos anti-Cry11Aa en función del tiempo. El seguimiento de la formación del cristal en un medio de cultivo, se realizó mediante un ensayo Dot Blot, resultando en un incremento progresivo en el reconocimiento de la proteína Cry11Aa hasta la fase estacionaria, lográndose así la estandarización de un método sencillo y reproducible para la detección de las δ -endotoxinas. Finalmente, se confirmó con un Western Blot que los anticuerpos generados reconocían sólo a la proteína Cry11Aa entre las diferentes proteínas que conforman al complejo espora-cristal de *Bt. var. israelensis*.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, proteína Cry11Aa, ensayos inmunoquímicos, Dot Blot, control biológico.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años, el control de plagas de insectos en la agricultura, y de insectos vectores de importantes enfermedades en el hombre, se ha logrado principalmente mediante el empleo de insecticidas químicos (Bravo *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de éstos han dado paso a varios problemas, incluida la contaminación ambiental, la resistencia que generan los insectos y el aumento en los efectos deletéreos sobre la salud humana, como cáncer y varios trastornos del sistema inmunitario (Devine y Furlong, 2007; Bravo *et al.*, 2011). Según la organización mundial de la salud (WHO, 1990), el problema más grave ha sido la resistencia generada por los insectos como resultado del uso excesivo y sostenido de pesticidas ya que, una vez que la plaga comienza a desarrollar resistencia, el efecto inmediato es el empleo de mayor cantidad de pesticida para erradicarla. Esta práctica irracional conlleva a los efectos negativos mencionados anteriormente, incluyendo la eliminación de los enemigos naturales de las plagas y eventualmente el resurgimiento de una plaga de mayor importancia.

Los pesticidas químicos no son ni el único método de control, ni necesariamente el mejor, para el manejo de las plagas. Una alternativa ha sido el uso de microorganismos entomopatógenos, entre ellas, se han usado bacterias, hongos, virus y protozoarios. A pesar del número relativamente grande de patógenos de insectos que se han propuesto como insecticidas, los productos formulados con base en *Bacillus thuringiensis* (Bt) son los más extendidos y ampliamente utilizados hoy en día (Lin *et al.*, 2003), representando más del 50 % de las ventas como agente de control microbiano (Lacey, 2016).

B. thuringiensis tiene como blanco diferentes órdenes de insectos, entre ellos, lepidópteros, dípteros, coleópteros, himenópteros, homópteros, dictiópteros, ortópteros, ácaros y

malófagos, así como organismos de otros *Phyla* como nemátodos, tremátodos y protozoarios (Vilas-Bôas *et al.*, 2007). La actividad insecticida se debe principalmente a las toxinas proteicas que conforman a las inclusiones parasporales. Además, estas bacterias producen una variedad de factores de virulencia que pueden actuar sinérgicamente contribuyendo a la muerte de los insectos (Rowe y Margaritis, 1987; Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2005). Debido a que las toxinas son altamente específicas, completamente biodegradables, inocuas en humanos, vertebrados y plantas, constituyen una alternativa viable para el control de plagas de insectos (Bravo *et al.*, 2005).

Biología de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria perteneciente a la familia *Bacillaceae*, ubicada dentro del grupo 1 del género *Bacillus*. Forma parte del grupo *Bacillus cereus*, el cual incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoide*, *B. pseudomycoide* y *B. weihenstephanensis* (Sauka y Benintende, 2008). Se encuentra estrechamente relacionada con *B. cereus* y *B. anthracis*, con mayor homología al primero del cual no es posible diferenciarlo ni morfológica ni bioquímicamente en fase vegetativa del ciclo de vida (Aronson *et al.*, 1982; Helganson *et al.*, 2000).

B. anthracis es un bacilo no móvil con capacidad de formar cápsula y producir toxinas que llevan a la formación de forúnculos en animales y humanos, causando la enfermedad denominada ántrax. Por su parte, *B. thuringiensis* forma inclusiones parasporales con propiedades bioinsecticidas, mientras que *B. cereus* carece de estas características, pero puede causar contaminación en alimentos (Vilas-Bôas *et al.*, 2007).

Características generales de *Bacillus thuringiensis*

Entre las características de *Bt*, es un bacilo Gram-positivo, que no forma cápsula (Ibrahim *et al.*, 2010), de flagelación peritrica, mide de 3 a 5 μm de largo y 1 a 1,2 μm de ancho (Bulla *et al.*, 1980). Es una bacteria que ha sido aislada en todo el mundo y en diferentes hábitats, incluidos el suelo, insectos, el polvo del producto almacenado y las hojas deciduas y coníferas (Roh *et al.*, 2007). Como otros bacilos, en su ciclo de vida, en condiciones de inanición, forma esporas de resistencia elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar. Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganoheterótrofo y con actividad catalasa (Sneath, 1986).

La característica principal de este organismo, es que durante el proceso de esporulación, produce una o varias inclusiones citoplasmáticas que pueden ser observadas bajo un microscopio de contraste de fases como estructuras altamente refráctiles (figura 1). Las inclusiones están conformadas por varias proteínas con actividad insecticida conocidas como “ δ -endotoxinas” que pueden provenir de dos familias, basadas en la similitud de sus secuencias aminoacídicas: la protoxina Cry (del inglés *Crystal*) y la protoxina Cyt (del inglés *Cytosolic*) (Angsuthanasombat, 2004). La familia Cry tiene un espectro mayor de acción (lepidópteros, coleópteros, himenópteros, dípteros) a diferencia de la familia Cyt que solo se ha reportado tóxica para larvas de mosquitos y algunos coleópteros (Bravo *et al.*, 2005; Angsuthanasombat, 2004). En conjunto a estos cristales proteicos, *B. thuringiensis* produce otras toxinas como la α -exotoxina, la β -exotoxina la cual es termoestable, además de quitinasas y fosfolipasas (Rowe y Margaritis, 1987) y un tercer grupo de proteínas denominadas proteínas insecticidas vegetativas (proteínas Vip), que son sintetizadas durante la fase vegetativa del crecimiento de la bacteria y secretadas en el medio sin que se haya formado la inclusión cristalina (Bravo *et al.*, 2005).

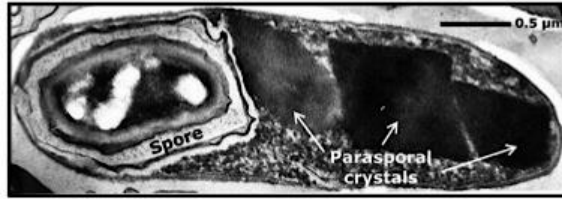


Figura 1. Micrografía electrónica de una célula de *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* C18 (x 44.000) esporulada. En la imagen se puede observar que dentro del bacilo se encuentran tres cristales parasporales (parasporal crystal) de forma bipiramidal y una espora (spore). Tomado de Ibrahim *et al.*, 2010.

Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis*

El ciclo de vida de *B. thuringiensis* se caracteriza por tener dos fases, la fase vegetativa y la fase esporulativa. La división de las células vegetativas está caracterizada por la formación de un tabique que se inicia a lo largo de la membrana plasmática, dando como resultado la formación de dos células hijas. El principal estímulo para la entrada a la fase esporulativa es la inanición (Errington, 2003). A diferencia de la fase vegetativa, esta fase involucra una división celular asimétrica y se caracteriza por presentar siete etapas con una duración total de 12 horas.

La primera etapa, dura aproximadamente siete horas, ocurre la transición de la forma vegetativa a la esporulativa, la célula deja de crecer y el nucleoide se condensa en un filamento axial compacto y alargado. La segunda etapa, transcurre entre las 7 y 8 horas, se genera el tabique que dará origen a una célula más pequeña o preespora, y una de mayor tamaño denominada célula madre o esporangio. Posteriormente, la tercera etapa, transcurre entre las 8 y 9 horas, en ella ocurre el envolvimiento de la preespora y se da la primera aparición del cristal parasporal. Las etapas cuatro y cinco son difíciles de diferenciar, en ellas ocurre la síntesis de la pared primordial, el córtex, la formación del exosporium, el desarrollo de las capas de la espora y la transformación del nucleoide de la espora. Finalmente, en la etapa siete la espora madura, el esporangio se lisa (Bulla *et al.*, 1980; Ibrahim *et al.*, 2010) y la espora y el cristal se liberan. En algunos casos la inclusión queda incluida dentro del exosporium (Aronson, 2002)

Los cristales parasporales y la δ -endotoxina

El nombre “cristal parasporal” fue propuesto por Hannay (1953). Otras denominaciones son: cristal, cuerpo parasporal, inclusión cristalina, endotoxina cristalina o cristaloide (Gajardo, 2017). La formación del cristal en *B. thuringiensis* es fisiológicamente importante ya que constituye del 20 al 30 % del peso seco del esporangio (Nickerson y Bulla, 1974; Schnepf *et al.*, 1998). Su forma puede variar desde bipiramidal, cuboidal, esférica, rombo plano o amorfa (Osman *et al.*, 2015) y, dentro de una bacteria, se pueden formar uno o más cristales del mismo o diferente tipo. El cristal es insoluble en agua o en solvente orgánicos pero es soluble en soluciones alcalinas (de Maagda *et al.*, 2001). Para su formación es importante que el crecimiento de la bacteria ocurra en un rango de pH 5,6 a 8,5 y que cuente con fuente de carbono, nitrógeno y sales (Arcas *et al.*, 1984; Pearson y Ward, 1988; Rowe y Margaritis, 1987). La temperatura óptima de formación del cristal está entre 28 y 32 °C y debe contar con una alta tasa de aireación (Pearson y Ward, 1988; Avignon-Rosse *et al.*, 1992).

El genoma de *Bt* tiene un tamaño de 2,4 a 5,7 Mb (Schnepf *et al.*, 1998; Challacombe *et al.*, 2007). La diversidad remarcable de cepas de *Bt* y sus toxinas se dan en parte por el alto grado de variabilidad genética (Schnepf *et al.*, 1998). Las toxinas se encuentran codificadas en elementos extracromosomales, que pueden ser lineales o circulares, a menudo como partes de estructuras compuestas que incluyen a elementos móviles (Carlson *et al.*, 1994).

Originalmente, las toxinas fueron clasificadas en cuatro clases, de acuerdo a la homología de la secuencia aminoacídica y la actividad insecticida específica. Las toxinas CryI, son específicas para lepidópteros; CryII, específicas para lepidópteros y dípteros; CryIII específicas para coleópteros y CryIV, específicas para dípteros (Morris *et al.*, 1996; Roh *et al.*, 2007; Osman *et al.*, 2015). Sin embargo, este sistema empezó a demostrar inconsistencias debido a los intentos

de acomodar genes que eran altamente homólogos a los genes conocidos pero que no codificaban a una toxina con espectro insecticida similar (Crickmore *et al.*, 1998). Por esta razón, Crickmore y colaboradores (1998) propusieron una nueva nomenclatura donde las toxinas se clasifican solo con base en la homología de la secuencia de aminoácidos. De esta manera, cada protoxina adquirió un nombre que consiste en el nemotécnico “Cry” (o Cyt) y cuatro rangos jerárquicos que consisten en números, letras mayúsculas, letras minúsculas y, nuevamente, un número (por ejemplo, Cry25Aa1), dependiendo de su lugar en el árbol filogenético. Por lo tanto, las proteínas con menos del 45 % de similitud de secuencia, difieren en el rango primario (Cry1, Cry2, etc.), el rango secundario (letras en mayúscula) es dado a las proteínas que tienen entre el 45 y 78 % de similitud y el rango terciario (letras en minúscula), para aquellas proteínas que presentan entre el 78 % y 95 % de identidad, por ejemplo, Cry1Aa y Cry1Ab. Por último, se puede encontrar otro número que muestra que la proteína tiene más del 95 % de identidad, por lo que deberían ser consideradas variantes de la misma proteína.

Se han publicado numerosos trabajos que muestran la estructura tridimensional de las proteínas Cry: CryIAa (Grochulski *et al.*, 1995), Cry2Aa (Morse *et al.*, 2001), Cry3Aa (Li *et al.*, 1991), Cry4A y Cry4B (Angsuthanasombat *et al.*, 2004), Cry4Ba (Boonserm *et al.*, 2005) entre otras. Todas las proteínas Cry son moléculas globulares, entre 65 y 130 kDa (Pardo-López *et al.*, 2012), formadas por tres dominios estructurales, a los que se le atribuyen el modo de acción de la toxina (Gill *et al.*, 1992), y muestran un alto grado de similitud topológica (figura 2) (Ibrahim *et al.*, 2010).

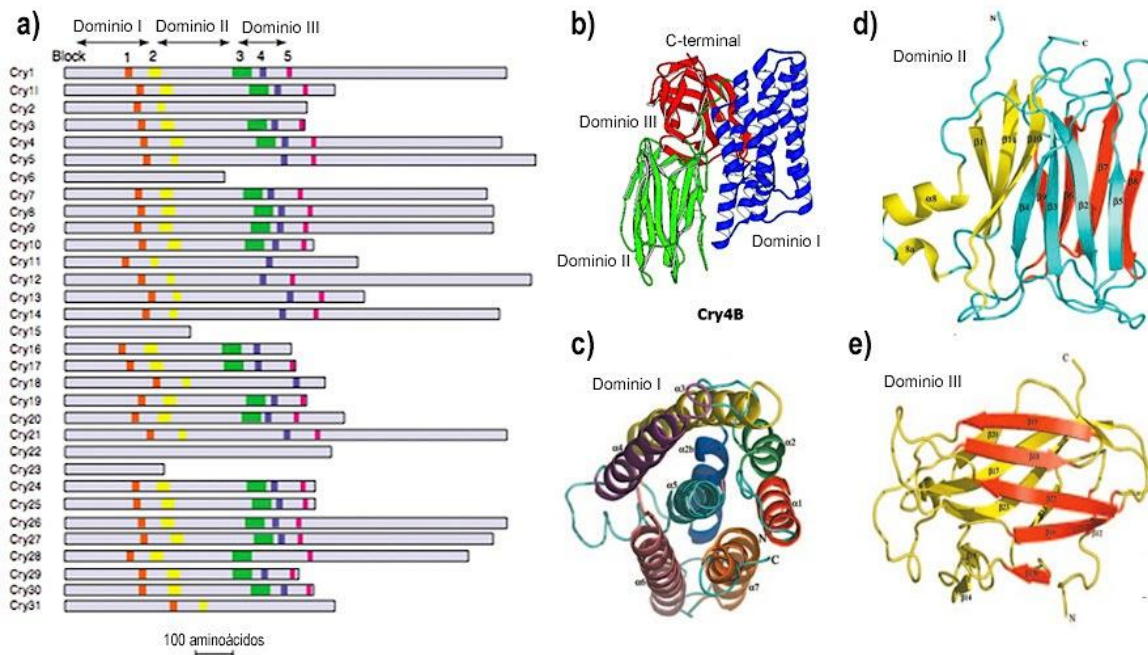


Figura 2. Estructura primaria y terciaria de la toxina Cry. a) Longitudes relativas de las protoxinas Cry y posición de los cinco bloques conservados. La posición de los tres dominios de la toxina activada están indicados para Cry1A (Tomado de: de Maagda *et al.*, 2001). b) Estructura tridimensional de la proteína Cry4B ya activada. El dominio I se representa en azul, el dominio II en verde y el dominio III en rojo (Tomado de Angsuthanasombat *et al.*, 2004). c) Vista superficial del dominio I, se observa que la α -hélice 5 se encuentra rodeada por las otras 6 α -hélice. d) Representación del dominio II. e) Representación del dominio III (c, d y e tomado de Boonserm *et al.*, 2006).

El dominio I en la región N-terminal (figura 2c) es un paquete de seis α -hélice en el que una hélice central $\alpha5$ se encuentra rodeada por las otras seis hélices anfipáticas. Lo que sugiere que éste dominio está implicado en la inserción en la membrana y la formación de canales iónicos. Se ha demostrado que el bucle entre la hélice $\alpha4$ y $\alpha5$ es un determinante importante para la actividad tóxica de la proteína Cry. El dominio II consta de tres hojas β antiparalelas agrupadas alrededor de un núcleo hidrofóbico central formando una estructura llamada "prisma β " (figura 2d) (Li *et al.*, 1991; Grochulski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 2001; Angsuthanasombat *et al.*, 2004). Este dominio representa la parte más divergente en la estructura de las proteínas (Bravo *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2010) ya que los bucles que conectan a las hojas β se exponen en el vértice del dominio y representan las regiones menos conservadas entre las toxinas Cry. La

figura 2a muestra la alineación de las toxinas Cry, donde se revela la presencia de cinco bloques de secuencias conservadas y también se puede observar la diversidad en la longitud entre las diferentes protoxinas, no se conoce qué impacto tiene la longitud del bucle en la estructura y función del dominio. Ciertamente, el lapso de los bucles contribuye a la configuración del dominio II y, lo más probable, influye en las interacciones de los tres dominios, así como la unión de toxinas individuales a sus receptores afines (Ibrahim *et al.*, 2010). El tercer dominio (III) se encuentra en el extremo carboxil, es un sándwich β , formado por dos hojas β antiparalelas (Figura 2e). Se cree que está implicado en la integridad estructural de moléculas de toxinas (Li *et al.*, 1991), permeabilización de la membrana y la unión al receptor que puede influir en la especificidad de los insectos (Angsuthanasombat *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2010).

Modo de acción de las δ -endotoxinas

El modo de acción de las toxinas Cry ha sido caracterizado principalmente en lepidópteros. Luego de que las larvas ingieren el cristal, son solubilizados en el intestino medio de los insectos debido a las condiciones alcalinas que presenta y subsecuentemente son activados por las proteasas intestinales que remueven la mitad de la región C-terminal y aproximadamente 30- 49 residuos aminoacídicos de la región N-terminal, generando fragmentos tóxicos de 60- 70 kDa aproximadamente (Gill *et al.*, 1992; Boonserm *et al.*, 2006). Las toxinas activadas se unen a receptores específicos de naturaleza glicoproteíca o glicolipídica, que se encuentran en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio (Griffiths *et al.*, 2005). Cuatro tipos de receptores para las toxinas Cry1A, específica para lepidópteros, han sido caracterizados, la N-aminopeptidasa (APN) (Burton *et al.*, 1999), proteínas tipo cadherina (CADR), una fosfatasa alcalina (ALP) y un glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.*, 2007; Pardo-López *et al.*,

2012). Tanto APN como ALP se encuentran ancladas a la membrana por un glicosil fosfatidilinositol (GPI) (Pardo-López *et al.*, 2012). Tras la unión de la toxina con el receptor, se generan cambios conformacionales que permiten su inserción en la membrana celular, formando poros que conducen a la fuga de iones con la subsecuente lisis celular y muerte del insecto (Boonserm *et al.*, 2006). La afinidad de las uniones puede variar dependiendo del tipo de receptor. Por ejemplo, Cry1A interactúa con menor afinidad con los receptores ALP Y APN pero es capaz de interactuar con alta afinidad a CADR (Pardo-López *et al.*, 2012). Las uniones son reversibles, pero una vez que la toxina se inserta en el epitelio de la membrana se vuelven irreversibles (Burton *et al.*, 1999).

A nivel molecular, se han propuesto dos modelos para el modo de acción, ambos han sido descritos para la toxina Cry1A. El primero, involucra un mecanismo de unión secuencial de la toxina con las moléculas receptoras CADR y APN (Gómez *et al.*, 2006), ya que se ha encontrado evidencia que muestra que la unión de Cry1A al receptor CADR promueve una escisión proteolítica adicional en el extremo N-terminal, lo que facilita la formación de una estructura oligomérica pre-poro con mayor afinidad por el receptor APN, lo que conlleva a su inserción en balsas lipídicas de membrana (figura 3). El segundo mecanismo, propone que la unión a CADR desencadena una vía intracelular que da como resultado la activación de una proteína G con activación posterior de la adenil ciclasa, elevando los niveles de cAMP y activando una proteína quinasa A, que a su vez conduce a la muerte celular sin participación de formación de oligómeros, formación de poros de toxinas o participación de otros receptores tales como proteínas ancladas a GPI (Zhang *et al.*, 2008).

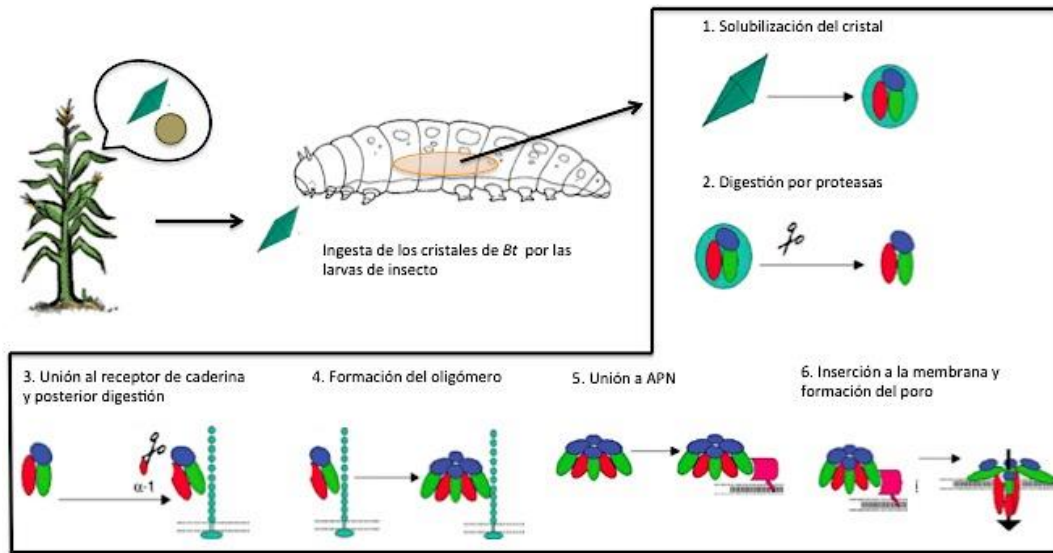


Figura 3. Modo de acción de las toxinas Cry. Tomada y adaptada de Bravo *et al.*, 2005.

Los mosquitos

Los mosquitos son insectos dípteros pertenecientes a la familia *Culicidae*, la cual está subdividida en dos subfamilias: *Anophelinae* y *Culicinae* (Wilkerson *et al.*, 2015). Su distribución es mundial, se les puede encontrar en las regiones templadas y tropicales del mundo, y mucho más allá del círculo polar ártico (Harbach, 2007).

Ciclo de vida de los mosquitos

Los mosquitos son insectos holometábolos, es decir, sufren una metamorfosis completa. Las formas inmaduras (huevos, larvas y pupas) se desarrollan en colecciones de agua y son filtradores, mientras que los adultos son de hábitat aéreo y son chupadores. La duración de cada fase varía según la especie y depende del acceso al alimento y de las condiciones ambientales, particularmente de la temperatura (Agrela, 2018). En este sentido, se ha observado que el ciclo vital completo (de huevo a adulto) puede ser de 20 días a 20 °C, pero solo de siete días a 30 °C. De manera que, dentro de cierto rango, es más corto al aumentar la temperatura (Delatte *et al.*, 2009).

El ciclo vital comienza cuando la hembra coloca sus huevos directamente sobre el agua o sobre sustratos húmedos o inundables (figura 4). Los huevos eclosionan 2 a 3 días después de la oviposición, dando lugar a larvas que se alimentan de microorganismos, detritus, hojas e invertebrados vivos o muertos incluyendo larvas de otras especies de mosquitos (Lounibos y Campos, 2002). Aunque las larvas viven en ambientes acuáticos toman el oxígeno del aire, casi todas las larvas pertenecientes a las diferentes especies de mosquitos se mueven activamente en la columna de agua y frecuentemente llegan a la superficie para respirar y tomar aire a través del sifón respiratorio. Como las larvas de los anofelinos carecen de sifón, descansan paralelas a la superficie del agua para poder respirar. Por otra parte, cabe destacar, que los cuerpos de agua donde se desarrollan las larvas, suelen ser aguas estancadas, por lo cual, los esfuerzos de erradicación y control de las poblaciones de mosquitos generalmente, involucran la eliminación o el tratamiento de estos espacios delimitados (OMS, 2017a).

Después de tres mudas, las larvas pasan a pupa. La duración de la fase de pupa varía entre 2 y 3 días. Corresponde a una etapa de intensos cambios morfológicos que darán lugar al mosquito adulto. Aunque las pupas no se alimentan, son muy activas y es muy frecuente observarlas moviéndose en zig-zag o dando saltos a lo largo de la columna de agua (Agrela, 2018).

Una vez concluido el proceso de metamorfosis, la pupa incrementa la presión interna al llenarse de aire, provocando así la ruptura de la cutícula y permitiendo que el adulto salga lentamente. Los adultos recién emergidos reposan por un breve período de tiempo para endurecer su cutícula y luego iniciar el vuelo (Foster y Walker, 2009).



Figura 4. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. El ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti* consta de cuatro estadios, huevo, larva, pupa y mosquito adulto. Tomado de <http://www.mdm.org.ar/>

Impacto de los mosquitos en la salud del humano

Los mosquitos afectan al hombre de dos formas, directa e indirectamente. En forma directa los mosquitos ocasionan molestias debido a su picadura, en algunos casos provocan reacciones alérgicas locales y sistémicas en individuos sensibles, debido a la presencia de alérgenos en su saliva (Peng *et al.*, 2004). De forma indirecta, los mosquitos actúan como vectores de importantes enfermedades, como el dengue, la fiebre amarilla, el chikungunya, la malaria y el zika (Delgado, 2005), ya que son portadores de virus, protozoarios y helmintos.

Entre los virus de mayor impacto en la salud de los venezolanos figuran el dengue, chikungunya y el zika. En su transmisión participan mosquitos del género *Aedes*, particularmente *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Mientras que, entre el grupo de los protozoarios se encuentra el género *Plasmodium*, causantes de la malaria o el paludismo, una enfermedad febril y potencialmente mortal transmitida principalmente por el género *Anopheles*.

Bacillus thuringiensis* var. *israelensis

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (*Bt.* var. *israelensis*) fue aislado por primera vez por Goldberg y Margalit (1977) de sedimento de lagunas. Sus cristales son altamente específicos para larvas de culícidos y simúlidos (Delgado, 2005). *Bt.* var. *israelensis* puede albergar hasta ocho plásmidos circulares de tamaño entre 5 y 210 Kpb (González y Carlton, 1984).

La actividad larvicida de *Bt.* var. *israelensis* reside en al menos cuatro protoxinas principales: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa y Cyt1Aa (Gill *et al.*, 1992; Delgado, 2005), todas mapeadas en un plásmido de 128 Kb conocido como pBtoxis. Además, pBtoxis contiene los siguientes genes: *cry10Aa*, *cyt2Ba* y *cyt1Ca*, los dos primeros se acumulan en pequeñas cantidades en el cristal parasporal (Ben-Dov *et al.*, 2014). Este microorganismo, puede producir por célula hasta 3 cristales de diferentes formas, entre ellas, cuboidal, ovoidal, esférica o amorfa (Tanada y Kaya, 1993). A pesar de que las proteínas Cry4Aa y Cry4Ba son moléculas estrechamente relacionadas, presentan 35 % de similitud en secuencia de aminoácidos, difieren en los niveles de toxicidad contra diferentes especies de mosquitos (Boonserm *et al.*, 2006). La toxina Cry4Aa de 134 kDa, está codificada por una secuencia de 3543 pb (1180 aminoácidos), es altamente tóxica para las larvas de *Culex* (vector del virus del oeste del Nilo y la encefalitis japonesa), pero tiene menor actividad para las larvas de *Anopheles* y *Aedes* (Boonserm *et al.*, 2006). Por su parte, Cry4Ba es una protoxina de 128 kDa, codificada por una secuencia de 3408 pb (1136 aminoácidos), es altamente tóxica para las larvas de *Anopheles* y *Aedes* (vectores del dengue, fiebre amarilla y malaria). Una vez que la proteína ha sido procesada se generan dos polipéptidos principales de 60 y 68 kDa los cuales se degradan aún más en dos fragmentos de 46- 48 kDa y 16- 18 kDa (Boonserm *et al.*, 2005). Cry11Aa, tiene un peso molecular de 72 kDa, está codificada por una secuencia de 1929 pb (643 aminoácidos) y es tóxico a larvas de *Aedes* y

de *Culex*, pero menor para *Anopheles*. El procesamiento de estas proteínas por proteasas generan dos fragmento de 34 y 32 kDa, aproximadamente (Chen *et al.*, 2009; Ben-Dov *et al.*, 2014). Por último, Cyt1Aa, tiene un peso molecular de 27 kDa, se encuentra codificada por una secuencia de 744pb (248 aminoácidos). A pesar que es específico para dípteros, en comparación con las proteínas mencionadas arriba, tiene baja actividad (Ben-Dov *et al.*, 2014).

Sorprendentemente, cuando las toxinas de *Bt.* var. *israelensis* son aisladas, muestran un orden de magnitud menor en sus efectos tóxicos. Esto se debe a que las toxinas que componen al cristal parasporal actúan de forma sinérgica, dicho efecto se debe principalmente a la toxina Cyt1Aa que mejora la actividad de Cry4Aa, Cry4Ba y Cry11Aa (Cantón *et al.*, 2011)

Con respecto al modo de acción, la evidencia reciente sugiere que las toxinas Cry activas contra las larvas de dípteros se unen a las mismas clases de proteínas que funcionan como receptores para las toxinas Cry1 en las larvas de lepidópteros. Por ejemplo, se ha identificado que la proteína Cry4Ba se une a una APN en *Anopheles quadrimaculatus* y *Anopheles gambiae*, mientras que para la unión de Cry11Aa se requiere una CADR en *An. gambiae* y en *Aedes aegypti* fue identificada una ALP como un receptor para Cry11Aa (Hua *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009).

ANTECEDENTES

La implementación de microorganismos como control de plagas es una práctica que lleva mucho tiempo. Las propiedades insecticidas de *Bt* fueron reconocidas años antes que la bacteria fuera identificada, algunos relatos sugieren que las esporas pudieron haber sido utilizadas en el antiguo Egipto (Sanahuja *et al.*, 2011). Además, se han encontrado textos egipcios y chinos que relatan historias donde se mantenían colecciones bacterianas para ser empleadas contra insectos (Ibrahim *et al.*, 2010).

B. thuringiensis fue descubierta por primera vez en 1901 por Shigetane Ishiwata (Ishiwata, 1901), un científico japonés que aisló la bacteria de las larvas del gusano de la seda (*Bombix mori*) mientras investigaba la causa de la enfermedad llamada “enfermedad de sotto”; a esta bacteria la llamó *Bacillus sotto* (Rowe y Margaritis, 1987; Ibrahim *et al.*, 2010). En investigaciones posteriores Ishiwata (1905), notó que los cultivos bacterianos jóvenes no eran patogénicos, mientras que los cultivos viejos que habían experimentado la esporulación eran altamente tóxicos (Ishiwata, 1905; Osman *et al.*, 2015; Albright *et al.*, 2016). Luego, en 1911, el científico alemán Berliner aisló una nueva cepa de las larvas muertas de la palomilla de la harina (*Ephestia kuehniella*), a la cual llamó *Bacillus thuringiensis* debido al estado alemán Turingia, donde fueron encontradas las larvas (Rowe y Margaritis, 1987; Ibrahim *et al.*, 2010). A diferencia de Ishiwata, Berliner se dio cuenta que estas bacterias producían una inclusión parasporal. Sin embargo, no la relacionó con la toxicidad de estos organismos (Rowe y Margaritis, 1987). Fue en 1954, cuando Angus (1954) demostró que los cristales bipiramidales presentes en las células esporuladas de *B. thuringiensis* eran realmente los responsables de la toxicidad en las larvas de *B. morix*, mientras que las esporas solas no tenían efecto (Bulla *et al.*, 1980). Para el año 1938, en Francia, se produjo el primer insecticida comercial con base en *B.*

thuringiensis, denominado Sporine, (Rowe y Margaritis; Ibrahim *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2015).

Debido al interés comercial e industrial en el uso de *B. thuringiensis* como alternativa a los insecticidas químicos y, dado a que el principio insecticida reside en el cristal proteico parasporal, la eficiente separación de los cristales parasporales de las esporas es un requisito previo para el estudio de la química del cristal. Por esta razón, se han descrito una gran cantidad de metodologías como algunas que se detallan a continuación.

En sus inicios, los métodos para la obtención de concentrados secos y estables del complejo esporas-cristal generaban pérdidas significativas de esporas y células (Angus, 1959; Murray, 1966; Dulmage *et al.*, 1970). Sin embargo, posteriormente, se reportaron diversas técnicas de centrifugación como lo son, la centrifugación isopínica en gradiente de cloruro de cesio (CsCl) (Fast, 1972), en gradiente de bromuro de sodio (BrNa) (Ang y Nickerson, 1978), en gradiente de Renografina (Sharpe *et al.*, 1975), en gradientes de Ludox (Zhu *et al.*, 1989) y en gradiente discontinuo de sacarosa (Thomas y Ellar, 1983). También se han descrito técnicas que utilizan espumas de flotación (Sharpe *et al.*, 1978) y cromatografías en columnas de carboximetilcelulosa (Murty *et al.*, 1994). Probablemente los métodos más efectivos son la centrifugación en gradiente de CsCl y la centrifugación en gradientes de Renografina (Rao y Shethna, 1980). No obstante, todos los métodos mencionados anteriormente son parcialmente exitosos, exigen tiempo y/o requieren equipos y reactivos costosos (Mounsef *et al.*, 2014). Además, ninguno de estos métodos es apto para la purificación de grandes cantidades de cristales (Bulla *et al.*, 1980; Rao y Shethna, 1980).

La dificultad en la obtención de una buena separación, recae en que las esporas y los cristales presentan similitud en tamaño, tendencia de las esporas a agruparse y atrapar cristales y similitud de algunas propiedades físicas (Lin, 2003; Mounsef *et al.*, 2014).

En Venezuela, en el Laboratorio de Procesos Fermentativos de la UCV, se han realizado previos aislamientos de los cristales entomopatógenos a través de técnicas como la centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa con yodamina metilglucamínica y en gradiente lineal de amidotrizoato de meglumina (Urografina), la cual se basa en el aumento lineal de la densidad conforme aumenta la distancia del centro de rotación, permitiendo separar partículas con coeficientes de sedimentación similares (Brazón, 1998). Además, se han realizado enriquecimientos de la proteína Cry1Aa usando el solvente hexano que interactúa con las esporas separándolas de los cristales (Mounsef *et al.*, 2014; Alcina, 2016).

Entre las metodologías para la detección de los cristales parasporales, se han propuesto métodos a través de ensayos inmunológicos. El primer reporte de detección de proteínas entomopatógenas a través de anticuerpos fue publicado por Krywienczyk y Angus (1960). En su estudio inmunizaron cobayos con cristales de tres cepas diferentes de *Bt* tóxicas para *Bombix mori*, encontrando que el componente tóxico de las tres variedades se encuentra relacionado serológicamente. Por su parte, Wie y colaboradores (1982) realizaron ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que permitieron detectar y cuantificar los cristales entomopatógenos de *Bt*. En sus estudios, comprobaron que este método es altamente preciso y extremadamente sensible. Así mismo, Smith y Ulrich (1983) demuestran la confiabilidad de los ensayos ELISA para analizar las fermentaciones de *Bt*. var. *kurstaki*. De este modo, muchas de las nuevas investigaciones se han dedicado a mejorar el proceso de extracción del cristal parasporal así como su detección a partir de anticuerpos (Albright *et al.*, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Los mosquitos constituyen un serio problema de salud pública ya que son vectores de algunas de las enfermedades más mortales para la humanidad. Existen más de 3.000 especies, pero los miembros de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, son los principales responsables de la propagación de las enfermedades en humanos (Agrela, 2018).

Entre las enfermedades transmitidas por estos insectos se encuentran el dengue, el paludismo, la fiebre chikungunya, la fiebre amarilla, el zika, las cuales han azotado a diferentes poblaciones, cobrándose vidas y abrumando los sistemas de salud (OMS, 2017a).

La Organización Mundial de la Salud (2017b), estimó que solo en el año 2016, a nivel mundial, hubo 216 millones de casos de paludismo y se generaron 445.000 muertes, siendo esta enfermedad una de las principales causas de desesos en personas menores de cinco años. Oficialmente, en el año 2016, Venezuela reportó 240.613 personas infectadas, contrastando con la OMS la cual estimó que el número de contagios ascendió al menos a 300.000 y el de decesos a 280 (Agrela, 2018). Esta cifra aumentó en el año 2017, cuando se dieron al menos 406.000 casos; una cifra muy difícil de verificar dado que no hay datos oficiales (El Nacional, 2018). De esta manera, Venezuela se ubica, según el Informe Mundial de Malaria 2017 de la OMS (2017b), en condiciones de alerta junto a otros tres países (Nigeria, Sudán del Sur y Yemen).

En cuanto al dengue, en el 2016, se presentaron unas 3.900 millones de infecciones (96 millones de ellas sintomáticas) y 20.000 muertes, predominantemente a nivel urbano (OMS, 2017c). En Venezuela, según el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) en 2016, se registró un total de 29.263 casos de esta enfermedad (Agrela, 2018). Con respecto al zika, el brote más importante ocurrió en el año 2015. Según cifras del Instituto de Medicina Tropical, de

la Universidad Central de Venezuela, entre 563 y 1.400 niños nacieron en el 2016 con microcefalia ocasionada por este virus (Torres, 2018).

Todas estas cifras y la alta proliferación de mosquitos, que se ha generado en los últimos años a nivel nacional, ha creado una alarma epidemiológica que involucraría tomar medidas de control urgentes. Entre las estrategias para el control de estos insectos se encuentra el Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual recomienda combinar todas las formas posibles de control de la plaga, empleando al máximo los enemigos naturales, el control biológico y otras prácticas accesibles (Restrepo *et al.*, 2000). Todos estos procedimientos se contraponen al empleo de agentes químicos, los cuales han causado daños severos en el ambiente, resistencia de los insectos, y desequilibrios biológicos, que ocurren por la muerte de insectos, animales y microorganismos no blancos que se ven afectados por los compuestos químicos (Serafini *et al.*, 2001). De esta manera, la necesidad de un enfoque integral del control de vectores para hacer frente al impacto de las enfermedades que transmiten nunca ha sido tan apremiante como lo es ahora.

El uso de bioinsecticidas formulado con base en *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* se muestra como una solución ecológicamente viable para el control de los mosquitos, ya que muchas consideraciones ambientales y de seguridad favorecen su empleo y desarrollo. Adicionalmente, este microorganismo es altamente específico sobre las larvas de los dípteros en los cuales tiene actividad, siendo inocuo sobre otros animales y humanos. Además, el modo de acción difiere completamente de los químicos sintéticos, lo que permite preservar a los enemigos naturales y a su vez evitar el desarrollo de resistencia por parte del insecto blanco.

En Venezuela, son escasas las investigaciones realizadas en torno a *Bt* y la mayoría de estas se enfocan en la búsqueda y aislamiento de nuevas cepas (Gillis, 2013). Dado que a nivel

nacional existe una premura en el desarrollo y empleo de formulaciones para el control de estos dípteros, se genera la necesidad de impulsar las investigaciones que se centren en el mejoramiento y producción de bioinsecticidas con base en *Bt* var. *israelensis*,. De esta manera, en el Laboratorio de Procesos Fermentativos, se han formulado medios de cultivos empleando subproductos agroindustriales como materia prima de alta disponibilidad y de bajo costo, que permitan la masificación de los cultivos.

En este sentido, ya que en el cristal reside el efecto tóxico, su evaluación en cuanto a la formación y toxicidad es un punto clave en el proceso fermentativo. En general, dicha evaluación se ha realizado durante muchos años mediante métodos indirectos, por el conteo de esporas viables y la realización de bioensayos. Sin embargo, estos procesos no son rápidos, por lo cual surge el interés de diseñar una prueba que permita la detección de los cristales de *Bt* var. *israelensis* mediante métodos inmunológicos, cuyos resultados son precisos, confiables y expeditos. Esto podría constituir una herramienta sencilla para evaluar la eficiencia de medios de cultivos, formulados a partir de subproductos agroindustriales empleados en preparaciones bioinsecticidas con base en este microorganismo. Dichas investigaciones impulsarán la fabricación de un bioinsecticida a gran escala, de producción nacional, que podrá reducir las poblaciones de mosquitos que generan cada día problemas importantes de salud pública, disminuyendo además el uso de insecticidas químicos y sus efectos nocivos.

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Diseñar una prueba inmunológica para la detección de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

- **Objetivos específicos**

- Aislar y purificar los cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.
- Obtener antisuero de conejo contra la proteína Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.
- Estandarizar una prueba inmunológica para la detección de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en un medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Materiales

Material Biológico

Bacillus thuringiensis var. *israelensis* (CVCM-1817): donada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. La cepa se mantuvo en punciones.

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*. Se empleó como control positivo en los ensayos realizados y fue mantenida en punciones.

Bacillus cereus (CVCM 1832): donada por el CVCM-IBE-UCV. Se empleó como control negativo para los ensayos y fue mantenida en punciones.

Para la obtención de los sueros se emplearon dos (02) conejos machos Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). La escogencia del modelo animal se basó en la cantidad de suero que es posible extraer. De esta manera, los conejos representan una buena opción para la producción de sueros policlonales dado que son fáciles de cuidar y manipular, la toma de sangre puede hacerse de forma segura y repetida, y los anticuerpos que producen están bien caracterizados y son fáciles de purificar (Harlow y Lane, 1988). Cabe destacar que el presente estudio siguió las normativas para la investigación animal, según el Código de Bioética y Bioseguridad, Parte II, Capítulo III (MPPCTII y FONACIT, 2008).

Medios de Cultivo

Medio A-80: medio semidefinido diseñado por Arcas y colaboradores (1984). Se empleó para el crecimiento, esporulación y producción de la δ -endotoxina de *Bt. var. israelensis*. Los constituyentes del medio A-80 se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del medio A-80 (Arcas *et al.*, 1984).

Solución	Composición	Cantidad (g/L)
Solución A	(NH ₄) ₂ SO ₄	1
	KH ₂ PO ₄	1
	K ₂ HPO ₄	1
	Extracto de levadura	5
Solución B	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1
	MnSO ₄ x H ₂ O	0,03
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,04
Solución C	Glucosa	5

Como es posible observar en la tabla 1, el medio está conformado por tres soluciones. La solución A aporta la fuente de nitrógeno y los fosfatos, la solución B aporta las sales que contribuyen a la formación del complejo espora-cristal y la solución C, representa la fuente de energía y carbono.

Las soluciones A y B fueron preparadas por separado para evitar la precipitación de los fosfatos. Los constituyentes de la solución A se disolvieron en el 80 % del volumen total de agua a emplear, mientras que los constituyentes de la solución B fueron disueltos en el 10 % del volumen de agua total a usar. Ambas soluciones fueron esterilizadas a 15 libras, 121 °C durante 15 min. Por otra parte, la solución C se preparó utilizando el 10 % del volumen de agua total que resta y se esterilizó, separada de las soluciones anteriores, a 10 libras, 121 °C durante 15 min.

Una vez estériles las soluciones, se constituyó el medio agregando lentamente la solución B sobre la A, seguida de la solución C.

El Agar A-80, se preparó agregando 15 gr de agar en polvo por cada libro de medio.

- **Métodos**

• ***Preparación de los preinóculos***

A partir de la punciones de *Bt. var. israelensis*, se prepararon los preinóculos. Para esto, se tomó una asada de la punción y se dejó crecer toda la noche en medio A-80 y se incubó a 30 °C.

Para asegurar la esterilidad se trabajó dentro de una campana de flujo laminar LabConco, modelo purifier class II.

• ***Cultivo por lote de Bacillus thuringiensis var. israelensis***

Los cultivos por lote fueron desarrollados en una unidad de fermentación Newbrunswick, modelo BioFlo C-30, operada a un volumen de trabajo de 380 mL a 550 rpm de agitación, con un suministro de aire 2 vvm y a una temperatura de 28 °C, en medio A-80.

El medio fue inoculado a partir de los preinóculos, cuyo volumen representó el 10 % del volumen del cultivo final. El crecimiento fue seguido durante 10 horas y luego a las 24 y 48 horas después de la inoculación, sembrando las muestras en placas de agar A-80 antes y después de someterlas a choque térmico. El choque térmico se llevó acabo calentando la muestra durante 10 min., a 80 °C en baño de María, seguido por 5 min. en hielo, eliminando así las células vegetativas. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 30 °C, con la finalidad de determinar los parámetros cinéticos, velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$), el tiempo generacional (tg) y títulos de esporas al final de la evaluación.

Para el cálculo de la velocidad máxima de crecimiento y el tiempo generacional se emplearon las ecuaciones de Monod (Madigan *et al.*, 2004)

$$\mu_{m\acute{a}x} = x_0 e^{\mu t} \qquad tg = \frac{\ln(2)}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

- ***Observación de la esporulación y producción de cristales en un microscopio de contraste de fases***

Las colonias obtenidas fueron observadas bajo un microscopio de contraste de fases marca Nikon, modelo E400, con aumento de 1000X, después de incubarlas durante 48 horas a 30 °C. Para ello, se tomó una asada de la colonia y se colocó sobre un portaobjeto con una gota de glicerol 100 % para evitar la movilidad de las células.

- ***Obtención del complejo espора-cristal***

La obtención del complejo espора-cristal de *Bt.* var. *israelensis* se realizó a partir de fermentaciones sólidas. Para esto, se tomaron placas de agar A-80 y se inocularon con 0,1 mL de preinóculo de *Bt.* var. *israelensis*, seguidamente se incubaron a 30 °C durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se le agregó a cada placa agua desionizada previamente esterilizada y fría y, empleando un rastrillo, se limpió toda la superficie del agar. El cultivo se transvasó a tubos Falcon de 50 mL previamente pesados y se centrifugó a 7823 Xg por 10 min. en una centrífuga Sorvall, que opera con un rotor SS-34, o 3780 rpm por 25 min. en una centrífuga Jouan modelo CR312. Se descartó el sobrenadante que contenía el medio. A continuación, se resuspendió nuevamente en agua desionizada y se centrifugó bajo las mismas condiciones. El procedimiento fue repetido tres veces para asegurar la eliminación del medio.

- ***Electroforesis SDS-PAGE del complejo espora-cristal***

La separación de las proteínas que componen al complejo espora-cristal de *Bt.* var. *israelensis* se realizó mediante una electroforesis, en condiciones desnaturalizantes, empleando un sistema de geles discontinuos (Laemmli, 1972). Para esto, se ensambló una minicámara BIO-RAD modelo Mini-Protean® II Cell, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El gel de resolución se realizó al 10 % de poliacrilamida, para lo cual se mezclaron los componentes en el orden mostrado en la tabla 2. La mezcla se vertió entre los vidrios, previamente limpiados y ensamblados, del sistema electroforético. Seguidamente, se agregó agua destilada para alinear el margen del gel y se dejó polimerizando toda la noche.

Al día siguiente, se lavó la parte superior del gel varias veces con agua destilada para remover los restos de acrilamida no polimerizada, y con la ayuda de un papel de filtro, se removió la mayor cantidad de agua posible. Seguidamente, se preparó el gel de apilamiento mezclando los componentes de acuerdo a la tabla 2. La mezcla se vació sobre el gel de resolución y se colocó rápidamente el peine para marcar los bolsillos donde se colocaron las muestras, evitando la formación de burbujas de aire. Finalmente, una vez polimerizado el gel de apilamiento, se retiró cuidadosamente el peine y se lavó el gel con agua destilada para remover la acrilamida no polimerizada.

Tabla 2. Composición del gel de apilamiento al 5 % y del gel de resolución al 10 %.

Compuesto	Gel de resolución (mL)	Gel de apilamiento (mL)
Agua destilada estéril	2,0	1,4
Solución de poliacrilamida 30%	3,3	0,33
Amortiguador del gel (Tris 1,5 M pH 8,8)	1,7	--
Amortiguador del gel (Tris 1,5 M pH 6,8)	--	0,25
Persulfato de amonio 10%	0,05	0,02
N,N,N',N Tetrametil etilen diamina (TEMED)	0,002	0,002

Para la preparación de las muestras, el complejo espora-cristal se llevó al 40 % p/v con agua desionizada previamente esterilizada y fría. Se tomaron alícuotas de 200 μ L y se agregaron en Eppendorf de 500 μ L de capacidad, seguidamente las muestras fueron centrifugadas a 13.500 rpm durante 2 min. en una microcentrífuga marca Gyrozen, modelo mini, descartando el sobrenadante obtenido. Al *pellet*, se le agregaron 150 μ L de agua desionizada y 50 μ L de tampón muestra 4x con ditioneitol (DTT) al 10 % v/v (tabla 3), se agitó vigorosamente y se calentó a 100 °C en baño de María, durante 10 min. para desnaturalizar completamente a las proteínas.

Tabla 3. Composición del tampón muestra 4x.

Compuesto	Cantidad
Glicerol 100 %	4 mL
Tris/HCl pH 6,8	2,4 mL
SDS	0,8 gr
Azul de bromofenol	4 mg
Agua destilada	3,1 mL

Para cargar el gel, se colocaron 20 μ L de muestra por cada bolsillo. La corrida se llevó a cabo a un amperaje constante de 20 mA y voltaje libre en amortiguador de corrida 1x (tabla 4).

Tabla 4. Composición del amortiguador de corrida 1x.

Compuesto	Cantidad (g/L)
Tris 0,05 M	3,03
SDS 1 %	1
Glicina 0,38 M	4

Como cepas de referencia se emplearon *Bt.* var. *kurstaki* y *B. cereus*, cuyas fermentaciones se llevaron a cabo en medio sólido durante 72 horas. La preparación de estas muestras se realizó de la misma manera que la cepa *israelensis*, con la excepción de que el complejo espora-cristal de *Bt.* var. *kurstaki* fue trabajado al 10 % p/v y el volumen de siembra en el gel fue de 10 μ L.

Al finalizar la corrida electroforética, se cubrió el gel con solución colorante de Azul Brillante de Coomassie (tabla 5) durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente, para apreciar las bandas proteicas. Posteriormente, se descartó la solución colorante y se le añadió la solución decolorante durante 1 hora en agitación. La composición de la solución decolorante es la misma que la solución anterior con la excepción que no se le agrega Azul Brillante de Coomassie.

Tabla 5. Composición de la solución colorante Azul Brillante de Coomassie.

Composición	Cantidad
Azul de Coomassie R-250	6 mg
Metanol	90 mL
Ácido acético	20 mL
Agua destilada	90 mL

Finalmente, las imágenes fueron digitalizadas en una cámara transiluminadora marca Uvitec, conectada a un software que permitió la visualización del gel.

- ***Solubilización de los cristales parasporales***

Como paso siguiente, se procedió a solubilizar el complejo espora-cristal en 50 mM amortiguador carbono-bicarbonato (pH 9,6) con β -mercaptoetanol al 5 % v/v (BCB- β ME) (Tabla 6). Para esto, primeramente el complejo fue llevado al 40 % p/v. Luego, se tomaron alícuotas de 200 μ L que fueron centrifugadas a 13.500 rpm durante 2 min. en una microcentrífuga marca Gyrozen, modelo mini, se retiró el sobrenadante y al *pellet* se le añadieron 150 μ L de BCB- β ME, seguidamente se incubó durante dos horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 13.500 rpm por 2 min. en una microcentrífuga. El sobrenadante se transvasó a otro Eppendorf y se agregó tampón muestra 4x con DTT al 10 % v/v, en una relación 4:1. En el caso del sedimento, se resuspendió en agua desionizada y se le agregó tampón muestra 4x con DTT al 10

% v/v, igualmente en relación 4:1. Ambas muestras se calentaron a 100 °C durante 10 min. para asegurar la completa desnaturalización de las proteínas que conforman al cristal parasporal. Posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante una electroforesis SDS-PAGE.

Tabla 6. Composición del Amortiguador Carbono Bicarbonato (BCB) 0,05 M; pH 9,6.

Composición	Cantidad
Na ₂ CO ₃ 0,2 M	16 mL
NaHCO ₃ 0,2 M	34 mL

Solución de trabajo: La solución madre se diluye ¼ en agua destilada.

- ***Obtención de una fracción enriquecida en cristales parasporales***

La obtención de una fracción enriquecida en cristales parasporales se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Mounsef y colaboradores (2014). La técnica se basa en la interacción de un solvente orgánico, el hexano, con las esporas que son hidrofóbicas permitiendo separarlas de los cristales. Para ello, se realizaron cultivos en placas de agar A-80 y se incubaron durante 72 horas hasta la autólisis, cerciorándose de ello por medio del microscopio de contraste de fase. Seguidamente, se obtuvo el complejo espora-cristal mediante lavados con agua desionizada previamente esterilizada y fría, como se explicó anteriormente. Luego, el complejo espora-cristal se resuspendió en agua desionizada y se agregó hexano a razón del 10 % del volumen de agua. Los tubos con las muestras se fijaron a soportes universales y se introdujeron en un sonicador marca BRANSONIC®, modelo 8210, que contenía agua con hielo. El proceso fue llevado a cabo aplicando 100 W durante 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron a 7823 Xg por 10 min. en una centrífuga Sorvall, que opera con un rotor SS-34. Seguidamente, se retiró el sobrenadante y el sedimento fue nuevamente resuspendido en agua desionizada y hexano, sonificado y centrifugado bajo las mismas condiciones descritas. La

metodología se repitió tres veces. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento, pero empleando el diclorometano como solvente.

Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante una electroforesis SDS-PAGE como se explicó en la sección anterior.

- ***Estudio in silico de la proteína Cry11Aa de Bacillus thuringiensis var. israelensis***

El análisis *in silico* se llevó a cabo para la proteína Cry11Aa con el fin de conocer si presentaba similitud con otras proteínas reportadas en las diferentes bases de datos, así como estudiar sus características fisicoquímicas, e inferir su potencial inmunogénico, es decir, si tiene la capacidad de generar una respuesta de anticuerpos específica de tipo IgG. Para ello, se obtuvo la secuencia aminoacídica de la proteína utilizando el servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se seleccionó la secuencia completa reportada por Denovan y colaboradores (1988) (P21256) como secuencia de referencia, la cual fue obtenida a partir de la clonación del DNA plasmídico. Posteriormente, se realizó un análisis de similaridad de la proteína Cry11Aa con otras proteínas reportadas en el GenBank, mediante el programa BLASTP 2.8.0 (Basic Local Alignment Search Tool) del servidor NCBI. Los primeros diez resultados mostrados por el programa, fueron alineados a través de la herramienta bioinformática CLUSTAL O (1.2.4).

La predicción de las características fisicoquímicas de la secuencia de referencia se realizó mediante el programa Protparam (Gasteiger *et al.*, 2005) del servidor ExPASy. Finalmente, mediante el programa Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 (Jespersen *et al.*, 2017), se predijeron los epítopes lineales para la proteína Cry11Aa.

- ***Cinética de formación de cristales de Bacillus thuringiensis. var. israelensis en medio A-80 a través de electroforesis SDS-PAGE***

A partir de un preinóculo de *Bt. var. israelensis*, se inocularon placas de agar A-80 con 0,1 mL de cultivo, seguidamente se incubaron a 30 °C, durante 6, 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a centrifugar el medio para la obtención de las células o del complejo espora-cristal, siguiendo la metodología previamente descrita. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso. Seguidamente, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes, para observar el perfil proteico a los diferentes tiempos de cultivo y así la formación de los cristales parasporales. Para esto, las muestras fueron preparadas siguiendo los pasos descritos anteriormente.

- ***Electroelución de la banda de 72 kDa de Bacillus thuringiensis var. israelensis***

Con la finalidad de purificar la proteína Cry11Aa de interés se realizó la metodología de electroelución descrita por Jacobs y Clad (1986). Para esto, se realizaron 4 geles preparativos en una cámara SE Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit de Amersham Biosciences, que permitió la elaboración de geles de mayor tamaño (14 x 16 cm), a partir de la fracción del sobrenadante de las muestras incubadas con BCB-βME. Los geles se realizaron al 10 % de poliacrilamida y se corrieron a 50 mA.

Para escindir la banda de 72 kDa correspondiente a la proteína Cry11Aa, se cortó una tira de 1 cm a ambos extremos del gel y se tiñeron durante 2 horas con solución colorante Azul de Coomassie (tabla 5). Por otra parte, se preparó una solución de Sulfato de Cobre al 1 % p/v y se tiñó el resto del gel.

Comparando el patrón de bandas obtenidos con la tinción de Coomassie y la tinción negativa, se cortó la banda de 72 kDa, la cual fue almacenada en un Eppendorf de rosca a -80 °C hasta su uso.

Para la electroelución, se empleó la cámara de electroelución Bio-Rad, modelo 422, con una membrana de 12 kDa de corte, que impide el escape de la proteína. El ensamblaje se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

En cuanto a las condiciones de corrida, se colocó la tira del gel (que contiene la banda de 72 kDa) previamente cortada en trozos de aproximadamente 1 mm por cada tubo de electroelución. La corrida se llevó a cabo con amortiguador de corrida 1x (tabla 4), a 10 mA/tubo, durante 5 horas en frío. Finalmente, la proteína electroeluída fue recolectada en Eppendorf de rosca y almacenada a -80 °C hasta su uso.

- ***Diálisis y concentración de la proteína Cry11Aa electroeluída***

Con el fin de eliminar el exceso de sales, las muestra electroeluídas fueron dializadas. La diálisis es un proceso que se basa en la difusión de moléculas, desde una solución de alta concentración a una solución de menor concentración, a través de una membrana semipermeable que separa tomando en cuenta el tamaño de la molécula (Haney *et al.*, 2013). Para esto, todas las muestras electroeluídas, se introdujeron en una membrana de diálisis con un punto de corte de 10 kDa, marca Thermo Scientific Snakeskin®. Posteriormente, la membrana fue sumergida en dos litros de agua destilada, que fue sustituida inicialmente tres veces cada dos horas, y luego se dejó toda la noche. El procedimiento se llevó a cabo en frío.

Seguidamente, las muestras dializadas fueron liofilizadas para poder concentrarlas, en un liofilizador LabConco, modelo 7670520. Este proceso se basa en la desecación de la muestra,

donde el disolvente es congelado y posteriormente eliminado por sublimación en un ambiente de vacío (GIDOLQUIM, 2014). El liofilizado se rehidrató con 2 mL de agua destilada y se conservó a -80 °C.

Finalmente, se realizó un gel de poliacrilamida al 10 % para corroborar que la proteína electroeluída fuera la de interés.

- ***Cuantificación de la proteína Cry11Aa***

Con la finalidad de conocer la cantidad de proteína Cry11Aa purificada, se realizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método involucra la unión del colorante Azul de Coomassie G-250, inicialmente de color rojo, a las proteínas. El complejo colorante-proteína formado genera una coloración azul que absorbe a 595 nm. Por lo tanto, la intensidad de color de la reacción es proporcional a la concentración de proteínas, tal como lo establece la ley de Lambert-Beer. Para llevar a cabo este procedimiento se empleó el estuche comercial Bio-Rad Protein Assay, que contiene el reactivo colorante, y placas de ELISA de la marca Costar®.

La concentración de proteína se estimó mediante la elaboración de una curva patrón empleando albúmina de huevo como proteína de referencia. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de la muestra a cuantificar y se constituyó el reactivo de ensayo, diluyendo 1/5 el reactivo de trabajo en agua destilada. Seguidamente, empleando una micropipeta multicanal, se colocaron 150 µL del reactivo de ensayo por pozo y se le agregaron 5 µL del estándar o de la muestra, por duplicado. Se dejó incubar durante 10 min. en agitación y finalmente se leyó en un lector de placas ELISA 3550 (Bio-Rad) a 595 nm.

- ***Preparación del inmunógeno e inmunización***

Para la obtención de los anticuerpos policlonales se inmunizaron dos conejos con la proteína Cry11Aa purificada por el método de electroelución. La metodología a seguir fue la propuesta por Harlow y Lane (1988).

En primer lugar, se realizó la preparación del inmunógeno mezclando 100 µg de proteína Cry11Aa con 1 mL de adyuvante completo de Freund o incompleto, para los refuerzos. La mezcla fue sonicada, mediante pulsos de 30 segundos e interpulsos de un minuto en frío, para lograr una emulsión, y luego fue recolectada en una jeringa calibre 18. Este procedimiento se llevó a cabo para cada conejo.

Como segundo paso, antes de inmunizar a los conejos, se realizó la toma de muestra de sangre para obtener el suero preinmune. Para esto, se afeitó una de las orejas del animal a nivel de la vena marginal, se limpió con alcohol y se agregó una gota de xilol para generar vasodilatación. Posteriormente, se agregó una delgada capa de vaselina y con una hojilla se realizó un pequeño corte transversal en la vena. La sangre fue recolectada en tubos Falcon de 15 mL. Finalmente, se limpió la oreja con alcohol y se hizo presión para detener el sangrado.

Se realizaron tres inmunizaciones cada 21 días, es decir, la primera inmunización correspondió al día 0, la segunda inmunización al día 21 y la tercera al día 42. Para ello, se afeitó el lomo del animal y se limpió con alcohol. Seguidamente, se inyectó el inmunógeno en cuatro sitios diferentes, para prevenir la formación de granulomas, a nivel supraescapular vía subcutánea.

Finalmente, luego de la primera inmunización, se realizó semanalmente la toma de muestra de sangre. Posterior a la segunda inmunización, la toma de muestra se llevó a cabo cada 15 días.

Para la obtención de los sueros, la sangre fue centrifugada a 3780 rpm, en una centrífuga marca Jouan, modelo CR312, durante 25 min. para separar las células sanguíneas del suero. Luego, los sueros, correspondiente a la fracción del sobrenadante, se transvasaron a un Eppendorf de 2 mL y se congelaron a -20 °C.

- ***Evaluación de la respuesta inmune humoral mediante un Dot Blot***

Con el fin de saber si se estaba obteniendo una respuesta de anticuerpos contra la proteína Cry11Aa de *Bt. var. israelensis*, se realizó un Dot Blot.

Se cortaron siete (07) cuadrados de 1 cm² de membrana de nitrocelulosa. Cinco de ellos se impregnaron con 1 µL de proteína Cry11Aa (1 µg/µL), uno con 1 µL de suero diluido 1/50 y al otro no se le colocó nada. Una vez secas, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche descremada 5 % en TBS, tabla 7), durante 1 hora a 37 °C, en agitación para saturar los sitios de unión a proteínas adicionales. Seguidamente, se realizaron tres lavados durante 5 min. con solución de lavado (Tween 20 1 % en TBS).

Tabla 7. Composición del Amortiguador Tris Tampón Salino (TBS), pH 7,5.

Composición		Cantidad (g/L)
Tris	20 mM	2, 42
NaCl	300 mM	19, 22

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el suero correspondiente (figura 4), diluido 1/50 en solución dilución (leche descremada 1 % en TBS) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C en agitación. Nuevamente, se realizaron tres lavados durante 5 min. con solución de lavado. Las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 1/5.000 en solución dilución durante 1 hora a 37 °C

en agitación. Las membranas fueron lavadas dos veces durante 5 min. con solución de lavado y una vez por 5 min. con TBS.

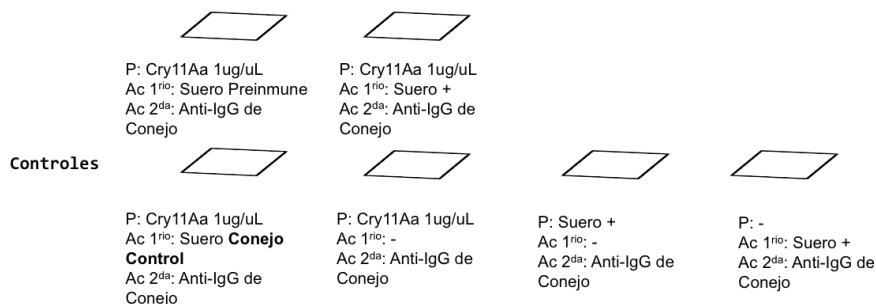


Figura 5. Esquema de trabajo empleado para el Dot Blot. P: proteína; Ac. 1º: Anticuerpo primario; Ac 2º: Anticuerpo secundario; Suero +: suero obtenido a los 42 días después de la 1ª inmunización con la proteína Cry11Aa.

Finalmente, se reveló la reacción con el sustrato diaminobencidina (tabla 8) que genera un precipitado visible de color marrón oscuro. Para detener la reacción se empleó agua destilada.

Tabla 8. Composición del sustrato Diaminobencidina.

Composición	Cantidad (g/L)
Diaminobencidina	6 mg
H ₂ O ₂	50µL
TBS	10 mL

- Evaluación de la cinética de formación de anticuerpos a través de un ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI)***

La cinética de formación de anticuerpos se evaluó mediante un ensayo ELISAI (Engvall y Perlman, 1971).

Previamente a la evaluación de sueros se procedió a la estandarización del ensayo con la finalidad de obtener las condiciones óptimas que permitan obtener la mayor diferencia entre sueros positivos y negativos. Para ello, se utilizaron placas de polivinilo de 96 pozos y se

evaluaron diferentes diluciones de suero (1/100, 1/200, 1/400), de conjugado anti-IgG de conejo unido a peroxidasa marca Jackson ImmunoResearch® (1/10.000, 1/25.000, 1/50.000) y de antígeno (1 µg/mL y 2 µg/mL), como se muestra en la figura 5. La estandarización de la técnica se llevó a cabo utilizando un suero de conejo positivo y uno negativo de referencia. Finalmente, se utilizó como sustrato el 3,3 5-bis-tetrametilbenzidina (TMB), por ser un sustrato sensible ideal para ensayos con proteínas purificadas (Reyna *et al.*, 2007).

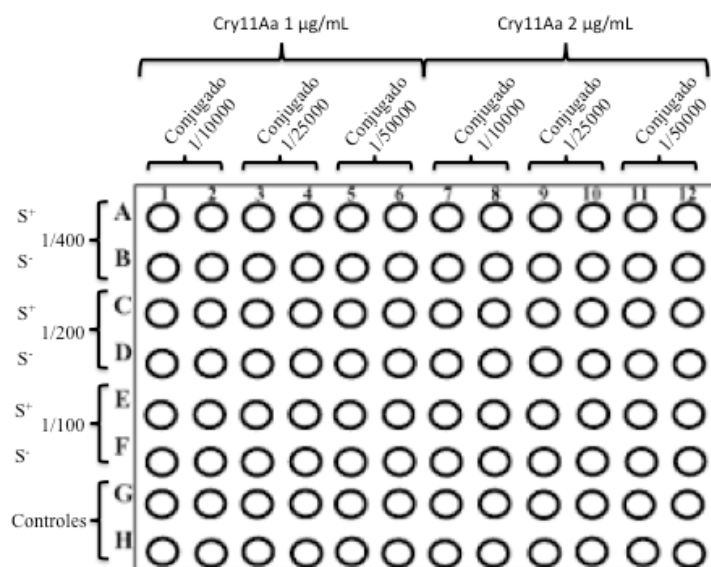


Figura 6. Esquema de la placa de ELISAI empleada para la estandarización. Los controles positivos empleados fueron: Suero positivo 1/100 + Conjugado 1/10.000; Suero positivo 1/100 + Conjugado 1/25.000; Suero positivo 1/100 + Conjugado 1/50.000; Complejo espora-cristal (2 µg/mL) + Suero Positivo 1/400 + Conjugado 1/10.000; Complejo espora-cristal (2 µg/mL) + Suero Positivo 1/400 + Conjugado 1/25000; Complejo espora-cristal (2 µg/mL) + Suero Positivo 1/400 + Conjugado 1/50.000. Los controles negativos fueron: Sustrato; Conjugado 1/50.000; Proteína Cry11Aa (2 µg/mL) + Conjugado 1/10.000; Complejo espora-cristal (2 µg/mL) + Suero Negativo 1/400 + Conjugado 1/10.000; Complejo espora-cristal (2 µg/mL) + Suero Negativo 1/400 + Conjugado 1/25.000; Complejo espora-cristal (2 µg/mL) + Suero Negativo 1/400 + Conjugado 1/50.000.

Para la realización de la técnica, inicialmente se sensibilizó la placa de 96 pozos de polivinilo, marca NUNC®, con 100 µL/pozo de las diferentes concentraciones de los antígenos, Cry11Aa y complejo espora-cristal (1 y 2 µg/mL), diluidos en tampón carbono bicarbonato 50 mM, pH 9,6 (tabla 6) y se mantuvo toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Posteriormente, con

una piseta se realizaron 5 lavados con NaCl 0,15 M/0,05 % de Tween 20, y se colocaron 200 μ L/pozo de solución de bloqueo (leche descremada al 5 % diluida en solución PBS) (tabla 9). Se incubó durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda, luego de lo cual se procedió al lavado bajo las mismas condiciones.

Tabla 9. Composición del tampón Fosfato Salino 0,02 M; pH 7,2 (PBS)

Composición	Cantidad
NaH ₂ PO ₄ 0,2 M	28 mL
Na ₂ HPO ₄ 0,2 M	72 mL
NaCl 1,5 M	8,72 g
H ₂ O	1L

Seguidamente, los sueros de referencia (positivo y negativo) se diluyeron en tampón PBS con 0,1 % de Tween 20 (PBS-T) para alcanzar las diferentes concentraciones (1/100, 1/200, 1/400). Se agregaron 100 μ L de los mismos en el pozo correspondiente (figura 5) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Consecutivamente, se lavó la placa y se añadieron 100 μ L/pozo de conjugado anti-IgG de conejo unido a la enzima peroxidasa diluido en tampón PBS-T (diluciones 1/10.000, 1/25.000, 1/50.000), y se incubó nuevamente durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Luego de lo cual se lavó con la solución de lavado y se añadió el cromógeno TMB (50 μ L/pozo) (tabla 10). La placa se mantuvo en agitación por 15 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió H₂SO₄ 1 N (50 μ L/pozo) para detener la reacción y la placa fue leída a 450 nm en un lector de placas de ELISA, marca Bio-Rad, modelo 3550.

Tabla 10. Soluciones para la preparación del sustrato 3,3 5-bis-tetrametilbenzidina (TMB).

Solución	Composición	Cantidad
Tampón Fosfato Citrato 0,05 M	Na ₂ HPO ₄ 10 mM	1,46 g
	C ₆ H ₈ O ₇ 50 mM	1,02 g
	H ₂ O	200 mL
H₂O₂ al 3 %	H ₂ O ₂ al 30 %	10 µL
	H ₂ O	300 µL
Solución 3,3 5-bistetrametilbenzidina (TMB)	TMB	1 mg
	(CH ₃) ₂ SO (DMSO)	1 mL
	Tampón Fosfato Citrato	9 mL
	H ₂ O ₂ al 3 %	100 µL

Las condiciones óptimas escogidas fueron aquellas que permitieron registrar cuantitativamente mayor diferencia entre el suero positivo y negativo de referencia.

Una vez estandarizadas las condiciones del ELISAi, se procedió a evaluar la cinética de anticuerpos IgG contra la proteína Cry11Aa producidos por los conejos durante la inmunización. Los parámetros seleccionados fueron, 2 µg/mL de antígeno (Cry11Aa y complejo spora-cristal), suero primario 1/400 y anticuerpo secundario 1/50.000. Los controles empleados fueron la proteína Cry11Aa incubada con conjugado, el suero de referencia positivo enfrentado con el conjugado, el conjugado incubado con el sustrato, y sustrato. Cabe destacar que todas las condiciones y los controles se realizaron por duplicado siguiendo los pasos descritos detalladamente en la estandarización de la técnica.

- ***Evaluación de la cinética de formación de cristales de Bacillus thuringiensis var. israelensis en medio A-80 a través de un Dot Blot***

Se realizó un cultivo sólido de *Bt. var. israelensis*. Se extrajeron muestras a las 6, 15, 17, 18, 20, 24, 48 y 72 horas de cultivo, las cuales fueron centrifugadas y diluidas a un 40 % p/v con agua destilada estéril. Luego, en una membrana de nitrocelulosa se fijó 1 µL de cultivo para cada tiempo. Las condiciones empleadas para realizar el ensayo fueron suero 1/200 y conjugado 1/20.000. El Dot Blot se llevó a cabo siguiendo la metodología anteriormente descrita.

Como controles se emplearon, el suero fijado a la membrana e incubado con el anticuerpo secundario, el antígeno (complejo espora-cristal y proteína purificada) fijado a la membrana e incubado con el suero negativo y el anticuerpo secundario, y por último, el antígeno (complejo espora-cristal y proteína purificada) fijado a la membrana e incubado con el conjugado.

- ***Detección de la proteína Cry11Aa de Bacillus thuringiensis var. israelensis mediante un ensayo Western Blot***

Con el fin de determinar si los anticuerpos producidos eran específicos para la proteína Cry11Aa, se realizó un ensayo Western Blot. Para esto, se hizo una electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1972) a una muestra de cultivo de *Bt. var israelensis* de 72 horas de incubación. La corrida electroforética se llevó acabo empleando geles preparativos (8 x 7 cm) de 0,75 mm de espesor, que fueron sembrados con aproximadamente 200 µg del complejo espora-cristal y corridos a 20 mA.

Seguidamente, las proteínas presentes en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a través de una electrotransferencia (tabla 11), siguiendo la metodología reportada por Towbin (1979).

Tabla 11. Composición del amortiguador de electrotransferencia pH 8,9

Composición	Cantidad
Tris-base 0,2 M	5,81 g
Glicina 0,2 M	2,93 g
SDS 1,5 M	0,375 g
Metanol	15,84 mL
H ₂ O	hasta 1L

Para verificar la transferencia, la membrana fue teñida con Rojo Ponceau (tabla 12) durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se lavó con agua destilada para retirar el colorante y se secó durante 10 min. a 37 °C en estufa.

Tabla 12. Composición de la solución Rojo Ponceau

Composición	Cantidad
Ponceau S 0,5 %	0,5 g
Ácido acético	1 mL
H ₂ O	100 mL

Para el Western, la membrana fue cortada en tiras de 4 mm de ancho y bloqueadas con una solución de leche descremada al 5 % en TBS (tabla 7), durante 1 hora a 37 °C en agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados durante 5 minutos con Tween 20 al 0,1 % en TBS (TBS-T) en agitación. Se agregó el anticuerpo primario, diluido 1/200 en solución de leche descremada al 1,25 % en TBS (SD), y se incubó durante 2 horas a 37 °C en agitación. Nuevamente, las membranas fueron lavadas, bajo las mismas condiciones. Para detectar el anticuerpo primario, se empleó un conjugado anti-IgG de conejo unido a la enzima peroxidasa diluido 1/20.000 en SD, con el cual se incubó durante 1 hora a 37 °C en agitación. Transcurrido el tiempo, se realizaron dos lavados durante 5 min. con TBS-T y uno solo con TBS. Finalmente, se reveló con el cromógeno diaminobencidina (tabla 8) y la reacción se detuvo con agua destilada.

Los controles empleados en el sistema fueron la proteína Cry11Aa purificada, un cultivo a las 72 horas de *B. cereus* y el suero de conejo fijado a la membrana. Para esto, se sembraron 40 µg de proteína Cry11Aa y esporas de *B. cereus*.

RESULTADOS

Curva de crecimiento de Bacillus thuringiensis var. israelensis

Al evaluar la cinética de crecimiento de *Bt. var. israelensis* empleando el medio de referencia A-80, se obtuvo una tendencia como se muestra en la figura 7.

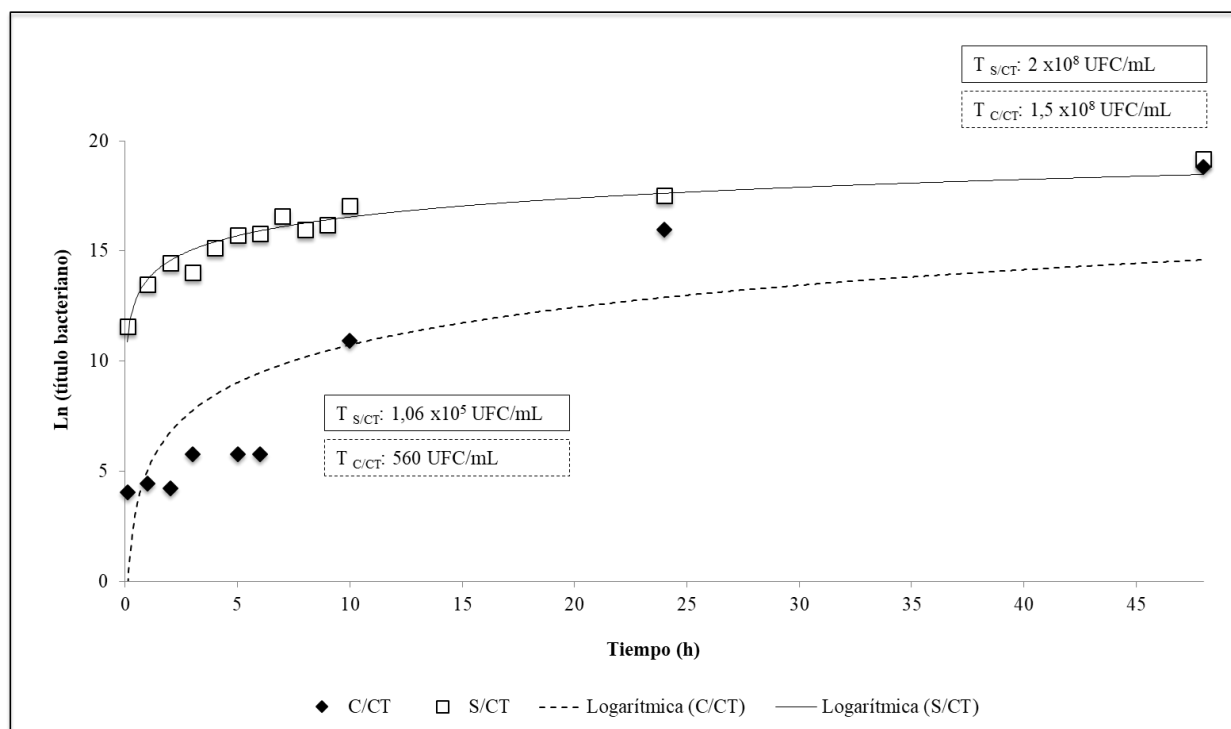


Figura 7. Cinética de crecimiento de *Bt. var. israelensis* en medio A-80 y cinética de formación de esporas. Título del cultivo sin choque térmico ($T_{S/CT}$; $\square$). Título de las esporas al aplicar choque térmico ($T_{C/CT}$, $\blacklozenge$). En los recuadros se indican los títulos obtenidos al inicio del cultivo y al final del cultivo.

Como se observa en la figura 7, la curva de crecimiento sin someter el cultivo a choque térmico, mostró un aumento exponencial de los títulos bacterianos en las primeras horas de cultivo, con un valor de $1,06 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$ al comienzo de la evaluación, y de $7,62 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$ a las siete horas de evaluación. En esta fase exponencial de crecimiento, fue posible

determinar los parámetros cinéticos, resultando en una velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) $0,694 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo generacional (tg) de 1 hora.

Posteriormente, a las 10 horas de cultivo, se comenzó a distinguir la fase estacionaria, pues dejan de observarse cambios significativos en los títulos bacterianos, evidenciándose la formación de un *plateau*.

Por otra parte, en la curva obtenida luego de someter al cultivo a choque térmico, se visualizó que el primer incremento significativo se dio a las 10 horas de cultivo (de 560 UFC/mL en la primera evaluación y $5,6 \times 10^4$ UFC/mL a las 10 horas). A las 24 horas, los títulos, antes y después del choque térmico, empezaron a igualarse, siendo estos de $4,1 \times 10^7$ UFC/mL y $8,6 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Finalmente, para la última evaluación, los títulos antes y después del tratamiento térmico, se igualaron a 2×10^8 UFC/mL.

El cultivo fue observado a los diferentes tiempos de evaluación bajo un microscopio de contraste de fase. Los registros se encuentran en la figura 8.

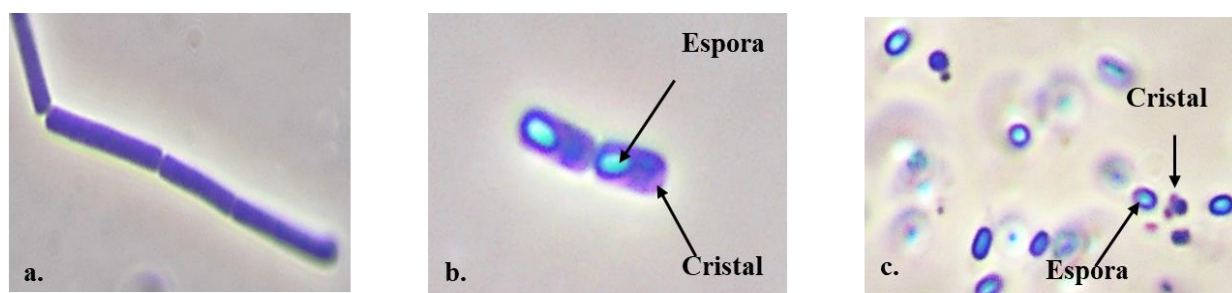


Figura 8. Cultivo de *Bt. var. israelensis* a diferentes tiempos de evaluación visto bajo un microscopio de contraste de fase a 1000x. a. Cultivo a las 7 h, se observan las células en fase vegetativa. b. Cultivo a las 24 h, las células se encuentran en fase esporulativa, se observa la espóra y la inclusión cristalina dentro del esporangio c. Cultivo a las 48 h, se observan las esporas y los cristales libres en el medio.

En las primeras horas del cultivo, sólo se observaron células en estado vegetativo de forma bacilar (figura 8a). A las 24 horas, se visualizaron los esporangios conteniendo a las esporas refringentes y los cuerpos parasporales opacos de formas ovoidales con bordes

irregulares o amorfos (figura 8b). Finalmente, a las 48 horas se evidenciaron restos celulares, esporas y cristales liberados en el medio (figura 8c).

Solubilización de los cristales parasporales de Bacillus thuringiensis var. israelensis

Con el objetivo de mejorar la solubilización de las diferentes proteínas que componen al cristal parasporal, se realizaron distintos tratamientos que fueron evaluados mediante una electroforesis SDS-PAGE. Los resultados se muestran en la figura 9.

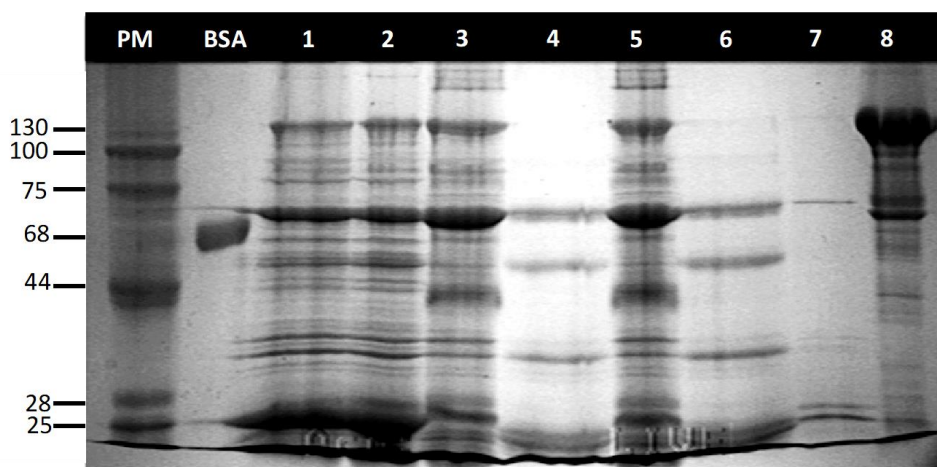


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida del complejo espora-cristal (CEC) de *Bt* var. *israelensis* en fermentación sólida empleando diferentes protocolos de solubilización. Carriles: PM. Peso molecular; BSA. Albúmina sérica bovina (2 µg/µL); 1. CEC de *Bt*. var. *israelensis* en agua y con β-mercaptoetanol (β-ME); 2. CEC de *Bt*. var. *israelensis* en agua y con ditioneitol (DTT); 3. Sedimento del CEC de *Bt*. var. *israelensis* solubilizado en tampón carbonato-bicarbonato (BCB) con β-ME; 4. Sobrenadante del CEC de *Bt*. var. *israelensis* solubilizado BCB con β-ME; 5. Sedimento del CEC de *Bt*. var. *israelensis* solubilizado BCB con DTT; 6. Sobrenadante del CEC de *Bt*. var. *israelensis* solubilizado BCB con DTT; 7. Sobrenadante del medio luego de la primera centrifugación; 8. CEC de *Bt*. var. *kurstaki*. Todas las muestras del CEC se encontraban al 40 % p/v y cada carril fue cargado con 20 µL de muestra. El gel fue teñido con Azul de Coomassie.

En la figura 9 se puede observar que bajo condiciones estándares de desnaturalización (SDS, calor y agentes reductores de puentes disulfuro) (figura 9, carril 1 y 2), el complejo espora-cristal está constituido por una gran cantidad de proteínas de diferentes pesos moleculares. Entre las bandas observadas se encuentran aquellas que representan a diversas

proteínas de pesos moleculares entre 200 kDa hasta bandas de aproximadamente 25 kDa. Una proteína de alto peso molecular de alrededor de 130 kDa y otras bandas de pesos aproximados de 72 y 28 kDa, son las bandas dominantes en el perfil electroforético, que coinciden con los pesos reportados para las proteínas Cry4 (Cry4Ba y Cry4Aa), Cry11Aa y Cyt1A, respectivamente. Así mismo, en los patrones proteicos no se visualizaron diferencias significativas en cuanto al empleo de β -mercaptoetanol (figura 9, carril 1) y DTT (figura 9, carril 2) como agentes reductores de puentes disulfuros.

Al someter el complejo espora-cristal a condiciones alcalinas, con tampón carbonato bicarbonato con β -mercaptoetanol (BCB- β ME) y, posteriormente, centrifugar la muestra, se observó en el *pellet* un enriquecimiento de las bandas de 130 kDa y 72 kDa, así como en las bandas de aproximadamente 44 kDa. Además, hubo un incremento en el número de bandas de cercanas a 200 kDa (figura 9, carril 3 y 5). Por otra parte, en la fracción del sobrenadante (figura 9, carriles 4 y 6), se evidenció una primera banda tenue de 130 kDa y varias bandas menores de 100 kDa, entre las que destacaron una de 72 kDa, una de aproximadamente 65 kDa, bandas entre 40 y 30 kDa, 28 kDa y 25 kDa, respectivamente. Nuevamente, no hubo diferencias significativas al emplear diferentes compuesto reductores de puentes disulfuros (figura 9, carriles del 3 al 6).

Además, se evaluaron las proteínas presentes en el sobrenadante luego de la primera centrifugación para la obtención del complejo espora-cristal (figura 9, carril 7), evidenciando las tres bandas de mayor dominancia presentes al aplicar los tratamientos anteriores (130, 72 y 28 kDa, respectivamente) y, adicionalmente, bandas cercanas a 33 kDa y una mayor a 28 kDa. Como referencia de proteínas de alto peso molecular, se empleó la δ -endotoxina producida por la cepa de *Bt. var. kurstaki*, donde se observó claramente la banda correspondiente a la proteína Cry1Aa de 135 kDa (figura 9, carril 8).

Obtención de una fracción enriquecida en cristales parasporales de Bacillus thuringiensis var. israelensis

Con la finalidad de obtener una fracción enriquecida en cristales parasporales, se probó la capacidad de interacción del solvente hexano con las esporas hidrofóbicas de *Bt. var. israelensis* (figura 10).

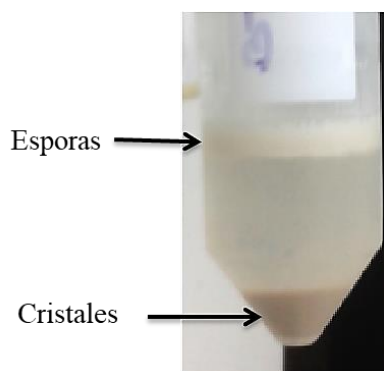


Figura 10. Fases obtenidas después del tratamiento del complejo espora-cristal de *Bt. var. israelensis* con hexano. Se observan dos fases: una primera fase acuosa que debía contener las esporas atrapadas por el hexano y restos celulares, y el *pellet* que debía contener los cristales.

En la figura 10, se observa una muestra del complejo espora-cristal después de haber hecho las centrifugaciones con el solvente orgánico, en la cual se obtuvieron dos fases. Una primera fase acuosa, donde se encuentra el hexano que debería contener las esporas y un *pellet* que debería estar enriquecido en cristales de *Bt. var. israelensis*.

Posteriormente, el sedimento obtenido fue evaluado mediante una electroforesis SDS-PAGE, para corroborar el enriquecimiento de cristales en el *pellet* y su ausencia en la fase acuosa. Sin embargo, los resultados no mostraron un enriquecimiento en las proteínas que constituyen al cristal parasporal (resultados no mostrados). En virtud de esto, se procedió a evaluar todas las fracciones obtenidas después del tratamiento. Adicionalmente, el mismo ensayo fue realizado con el solvente medianamente polar, diclorometano, empleando como referencia el

complejo espора-cristal solubilizado en condiciones alcalinas. Los resultados de dichos tratamientos se muestran en la figura 11.

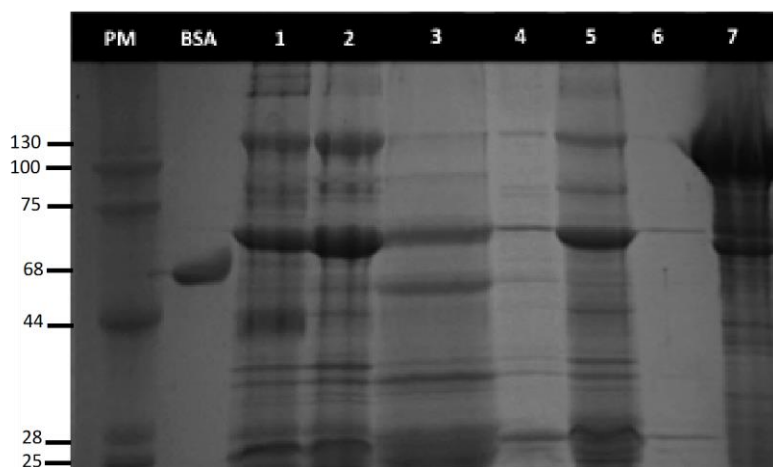


Figura 11. Electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida de las fracciones obtenida mediante la purificación con hexano y diclorometano, empleando DTT como agente reductor. Carriles: PM. Peso molecular; BSA Albúmina sérica bovina; 1. Complejo espора-cristal (CEC) de *Bt. var. israelensis* (40 % p/v) solubilizado en tampón carbonato-bicarbonato (BCB-βME) y con DTT (20 μL); 2. Sedimento del CEC de *Bt. var. israelensis* (40 % p/v) luego del tratamiento con hexano e incubado con BCB-βME (fracción del *pellet* luego de la solubilización) (20 μL); 3. Sedimento del CEC de *Bt. var. israelensis* (40 % p/v) luego del tratamiento con hexano e incubado con BCB-βME (fracción del sobrenadante luego de la solubilización) (20 μL); 4. Sobrenadante del CEC de *Bt. var. israelensis* (40 % p/v) luego del tratamiento con hexano (20 μL); 5. Sedimento del CEC de *Bt. var. israelensis* (40 % p/v) luego del tratamiento con diclorometano e incubado con BCB-βME (fracción del sedimento luego de la solubilización) (20 μL); 6. Sobrenadante del CEC de *Bt. var. israelensis* (40 % p/v) luego del tratamiento con diclorometano (20 μL); 7. CEC de *Bt. var. kurstaki* (10 % p/v; 10 μL). Teñido con Azul de Coomassie.

En la electroforesis mostrada en la figura 11, se evidencia que no hubo diferencias entre la muestra de referencia (figura 11, carril 1) y los perfiles proteicos obtenidos a partir de las fases generadas después de la solubilización con BCB-βME, tanto en el ensayo con hexano (figura 11, carriles 2 al 4), como con diclorometano (figura 11, carriles 5 al 6). De esta manera, las bandas correspondientes a las proteínas Cry4 (Cry4Ba y Cry4Aa), Cry11Aa y Cyt1Aa, se pueden visualizar en el *pellet* y en el sobrenadante de las muestras tratadas con ambos solventes (figura 11, carriles 2 al 6).

Estudio in silico de la proteína Cry11Aa de Bacillus thuringiensis var. israelensis

Una vez corroborado el fenotipo de la cepa y la posible presencia de las cuatro principales protoxinas características de la subespecie *israelensis*, se realizó un análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de la proteína Cry11Aa.

Primeramente, se llevó a cabo el análisis de similitud, con el programa BLASTP, el cual mostró como resultado que la secuencia de la proteína usada como referencia (Donovan *et al.*, 1988) es similar en un rango del 96- 100 % con otras proteínas Cry11A pertenecientes a diferentes aislados (tabla 13), con un porcentaje de cobertura del 100 % y un valor E de 0.0.

Tabla 13. Análisis de similitud de la secuencia completa del gen *cry11Aa* de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* empleando el programa BLASTP 2.8.0.

Nº acceso	Procedencia	Descripción	Cobertura	Valor-E	Identidad
WP_000390241.1	-	Multispecies: pesticidal crystal protein Cry11Aa [<i>Bacillus</i>]: Secuencia de referencia en NCBI	100%	0.0	100%
EEM99034.1	USA	Pesticidal cristal protein Cry11Bb [<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL422]: Aislada de un gato, serovar. como <i>israelensis</i>	100%	0.0	100%
ABW89737.1	Pakistán	Cry4d [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: Aislado DAB-Bt1 de suelos Pakistaníes	100%	0.0	99%
AXJ97553.1	Colombia	Mutant biopesticidal Cry11-like protein variant 23 [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: 5 variantes de Cry11 obtenidas mediante “DNA shuffling”, siendo la variante 23 la que mostró el mayor porcentaje de identidad	100%	0.0	99%
ABW89739.1	Pakistán	Cry4d [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: Aislado DAB-Bt3 de suelos Pakistaníes	100%	0.0	99%
ABW89738.1	Pakistán	Cry4d [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: Aislado DAB-Bt2 de suelos Pakistaníes	100%	0.0	99%
ABW89740.1	Pakistán	Cry4d [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: Aislado DAB-Bt4 de suelos Pakistaníes	100%	0.0	98%
ABW89742.1	Pakistán	Cry4d [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: Aislado DAB-Bt6 de suelos Pakistaníes	100%	0.0	96%
ABW89741.1	Pakistán	Cry4d [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: Aislado DAB-Bt5 de suelos Pakistaníes	100%	0.0	96%

Adicionalmente, los resultados mostrados en la tabla 13 fueron alineados empleando el programa CLUSTALO (1.2.4) con el fin de observar las variaciones entre las secuencias aminoacídicas reportadas para diferentes proteínas Cry11Aa (figura 12).

```

sp|P21256.1|C11AA_BACTI    ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
WP_000390241.1            ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
EEM99034.1                MNYMEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    60
ABW89737.1                ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
ABW89741.1                ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
ABW89742.1                ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
ABW89740.1                ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
ABW89738.1                ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
ABW89739.1                ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
AXJ97553.1                ---MEDSSLDTLSIVNETDFPLYNNYTEPTIAPALIAVAPIAQYLATAIGKWAAKAAFSK    57
                             *****

sp|P21256.1|C11AA_BACTI    VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
WP_000390241.1            VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
EEM99034.1                VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    120
ABW89737.1                VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
ABW89741.1                VLSLIFPGSQPGTMEKVCTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
ABW89742.1                VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
ABW89740.1                VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETFINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
ABW89738.1                VLSLIFPGSQPATMEKVCTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
ABW89739.1                VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
AXJ97553.1                VLSLIFPGSQPATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNAEYRGIIEVSDVDFDAYIKQPGF    117
                             *****
                             .*****
                             .*****

sp|P21256.1|C11AA_BACTI    TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
WP_000390241.1            TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
EEM99034.1                TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    180
ABW89737.1                TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
ABW89741.1                SPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCSLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
ABW89742.1                TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
ABW89740.1                TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
ABW89738.1                TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
ABW89739.1                TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
AXJ97553.1                TPATAKGYFLNLSGAI IQRLPQFEVQTYEGVSIALFTQMCTLHLTLTKDGLILAGSAWGFT    177
                             .*****
                             .*****
                             .*****

sp|P21256.1|C11AA_BACTI    QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    237
WP_000390241.1            QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    237
EEM99034.1                QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    240
ABW89737.1                QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    237
ABW89741.1                QADVDSFIKLFNQKVL VYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVRVKDGLTFRNMCNLYVFPFAGAWS    237
ABW89742.1                QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    237
ABW89740.1                QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEELGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    237
ABW89738.1                QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVRLKDGLTFRNMCNLYVFPFAGAWS    237
ABW89739.1                QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    237
AXJ97553.1                QADVDSFIKLFNQKVL DYRTRLRMRMYTEEFGRCLKVSLKDGLTFRNMCNLYVFPFAEAWS    237
                             *****
                             .*****
                             .*****
                             .*****

sp|P21256.1|C11AA_BACTI    LMRYEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    297
WP_000390241.1            LMRYEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    297
EEM99034.1                LMRYEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    300
ABW89737.1                LMRYEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    297
ABW89741.1                LMRGEGLKLQSSSLALWVYVGVSIPVNYNEWGGVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTSEPA    297
ABW89742.1                LMRYEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    297
ABW89740.1                LMRYEGLKLQSSSLWVYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGGVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    297
ABW89738.1                LMRDEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTSEPA    297
ABW89739.1                LMRYEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    297
AXJ97553.1                LMRYEGLKLQSSSLWDYVGVSIPVNYNEWGGLVYKLLMGEVNQRLTTVKFNYSFTNEPA    297
                             *****
                             .*****
                             .*****
                             .*****

sp|P21256.1|C11AA_BACTI    DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
WP_000390241.1            DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
EEM99034.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    360
ABW89737.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
ABW89741.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGVTGGIGNGRTNNNFADNKGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
ABW89742.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNIFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
ABW89740.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
ABW89738.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGVTGGIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
ABW89739.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
AXJ97553.1                DIPARENIRGVHPIYDPSSGLTGWIGNGRTNNNFNADNNGNEIMEVRTQTFYQPNNEPI    357
                             *****
                             .*****
                             .*****
                             .*****

```

Figura 12. Alineamiento entre las diferentes secuencias aminoacídicas de las proteínas Cry11Aa obtenidas mediante el programa BLASTP. Alineamiento realizado con el programa CLUSTAL O (1.2.4). Los residuos en común entre las diferentes secuencias se selañan con un asterisco (*). Las mutaciones conservadas debido a cambios entre residuos aminoacídicos de un mismo grupo con propiedades similares se denotan con dos pintos (:). Los cambios entre aminoácidos del mismo grupo con similitudes débiles en cuanto a sus propiedades se denotan con un punto (.). Los cambios no conservados se representaron con un espacio ().

En la figura 12 se muestra que las variaciones en las secuencias aminoacídicas de las proteínas Cry11Aa, se encuentran distribuidas principalmente en la región central. Como es posible observar en la tabla 13, las secuencias que presentaron la menor similitud con respecto a la secuencia patrón fueron ABW89741 y ABW89742, con un 4 % de sustituciones. Para ABW89741, el 57 % de los cambios fueron conservados, mientras que para ABW89742 solo el 52 % de las sustituciones fueron cambios entre aminoácidos del mismo grupo.

Entre otros resultados obtenidos con el programa, se encontró que la proteína Cry11B, producida por las variedades *medellin* y *jegathesan*, presentan un 66 % de identidad, para una cobertura de 99 % y un valor E de 0.0, con la proteína Cry11Aa de referencia. Así mismo, variantes de la proteína Cry11, obtenidas por técnicas de ADN recombinante, presentaron porcentajes de identidad entre 93- 99 % para coberturas entre 46- 91 % y valores E iguales o menores a 0.0, como se muestra en tabla 14.

Tabla 14. Análisis de similitud de la secuencia completa del gen *cry11Aa* de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* empleando el programa BLASTP 2.8.0.

Nº acceso	Descripción	Cobertura	Valor-E	Identidad
Q9ZIU5.1	Pesticidal crystal protein Cry11Bb: Proteína Cry11Bb de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>medellin</i> .	99%	0.0	60%
WP_103595482.1	Cry11b [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar. <i>jegathesan</i>]: Proteína Cry11Ba de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>jegathesan</i> .	99%	0.0	60%
AXJ97555.1	Mutant biopesticidal Cry11-like protein variant 81 [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: 5 variantes de Cry11 obtenidas mediante “DNA shuffling”.	91%	1e-40	27%
AXJ97552.1	Mutant biopesticidal Cry11-like protein variant 8 [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: 5 variantes de Cry11 obtenidas mediante “DNA shuffling”.	88%	0.0	99%
AXJ97551.1	Mutant biopesticidal Cry11-like protein variant 1 [<i>Bacillus thuringiensis</i>]: 5 variantes de Cry11 obtenidas mediante “DNA shuffling”.	88%	0.0	99%

Los parámetros fisicoquímicos fueron también evaluados en este estudio *in silico*, mediante el programa Protparam del servidor ExPASy. Los resultados indicaron que teóricamente la proteína tiene un peso molecular de 72 kDa, un punto isoeléctrico de 5,37 y un índice de hidrofobicidad de -0,187.

Seguidamente, se procedió a realizar la evaluación de los posibles epítopes lineales, empleando el programa Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0, encontrando 12 posibles epítopes los cuales se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Estudio *in silico* de los epítopes de Cry11Aa predichos a partir del programa Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0.

N°	Péptido	Posición	
		Inicio	Fin
1	ATMEKVRTEVETLINQKLSQDRVNILNA	69	96
2	VQTYEGVSIALFTQMCTLHLL	142	164
3	SLKDGLTFRNM	214	224
4	LKLQSSLSLWD	244	254
5	VNQRLTTVKFNYSFTNEP	279	296
6	YDPSSGLTGWIGNGRNNTNFADNNGNEIMEVRTQTFYQNPNN	312	355
7	TQWFQSTLYGWNILGTQTVLSSRT	387	411
8	YNRIE	449	453
9	TKDFYSKKSHYLSETNDS	471	488
10	DTPDQATDGSIK	507	518
11	ISNEAKYSIRLNTGFNT	524	540
12	RVQSQNSGNNRMLGSFTANANPEWV	561	585

Evaluación de la cinética de formación de los cristales mediante una electroforesis SDS-PAGE

El estudio de la síntesis de los cristales parasporales se realizó a través del análisis de los perfiles proteicos de muestras del cultivo de *Bt.* var. *israelensis* a diferentes tiempo de

fermentación, obtenidos mediante una electroforesis SDS-PAGE como se puede observar en la figura 13.

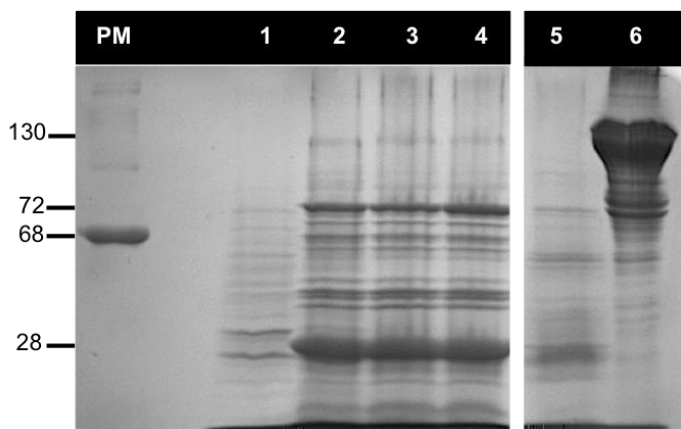


Figura 13. Evaluación de la cinética de formación del cristal de *Bt. var. israelensis* mediante una electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida. Carriles: PM. Peso molecular; 1-4. Cultivo de *Bt. var. israelensis* a las 6, 24, 48, 72 horas, respectivamente. Cada tiempo fue trabajado al 40 % p/v y se sembraron 20 μ L de muestra por cada carril; 5. Cultivo de *Bacillus cereus* a las 72 horas (40 % p/v, 20 μ L); 6. Cultivo de *Bt. var. kurstaki* a las 72 horas (10 % p/v, 10 μ L). Teñido con Azul de Coomassie.

En el perfil proteico se evidenció que en las primeras seis horas de cultivo de *Bt. var. israelensis* (figura 13, carril 1), se sintetizan una gran cantidad de proteínas de pesos moleculares menores a 100 kDa. A partir de las 24 horas de cultivo (figura 13, carril 2), se observa un cambio en el patrón de proteínas menores e iguales a 130 kDa. Se destaca que un grupo de ellas se torna dominante, entre estas, las que conforman al cristal parasporal (130 kDa, 72 kDa y 28 kDa). Por otra parte, no se observan diferencias entre los perfiles proteicos obtenidos a las 24, 48 y 72 horas (figura 13, carriles 2, 3 y 4, respectivamente).

Como muestra de referencia se empleó la especie *B. cereus* (figura, 13, carril 5), que no forma inclusiones cristalinas pero si esporas. Se puede observar un perfil con una gran cantidad de bandas tenues menores a 100 kDa. Además, se empleó como referencia, la variedad *kurstaki* (figura, 13, carril 6), que genera proteínas desde 200 kDa a menores pesos moleculares. Entre

ellas destaca una proteína de 135 kDa, que conforma el cristal parasporal de esa especie. De esta manera, se evidencia que las bandas proteicas en común entre las tres especies son menores a 100 kDa.

Purificación de la proteína Cry11Aa de Bacillus thuringiensis var. israelensis por el método de electroelución

Debido a que los ensayos empleando compuestos orgánicos para obtener fracciones libres de esporas no fueron exitosos, se procedió a purificar la proteína Cry11Aa, de 72 kDa, mediante el método de electroelución. Para ello, se realizó el protocolo de solubilización con BCB-βME y, a partir de la fracción del sobrenadante, se escindió la banda de interés. De esta manera, se realizaron múltiples geles preparativos, que fueron cortados y preservados hasta su uso a -80 °C para evitar la degradación de la proteína. Los resultados se muestran en la figura 14.

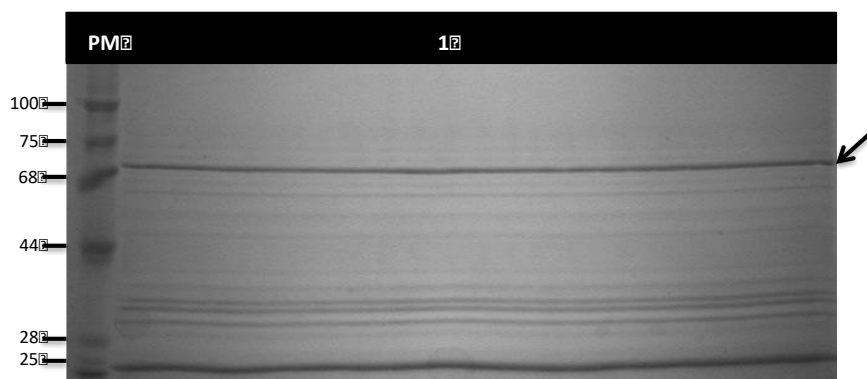


Figura 14. Gel preparativo al 10% de poliacrilamida del complejo espora-cristal (CEC) de *Bt. var. israelensis*, solubilizado en tampón carbono bicarbonato (BCB-βME). Carriles: PM. Peso molecular; 1. Cultivo de *Bt. var. israelensis* tomando la fracción del sobrenadante luego de la solubilización (200 μL). La flecha indica la banda de 72 kDa correspondiente a la proteína Cry11Aa la cual fue cortada para ser electroeluida. Teñido con Azul de Coomassie.

El patrón de proteínas obtenido en la fracción del sobrenadante, luego de la solubilización con BCB-βME, coincide con lo obtenido en los ensayos anteriores, como se pudo observar en la figura 9.

Posteriormente, la proteína de interés de 72 kDa fue electroeluída y la muestra obtenida fue analizada por electroforesis SDS-PAGE y visualizada con azul de Coomassie (figura 15).

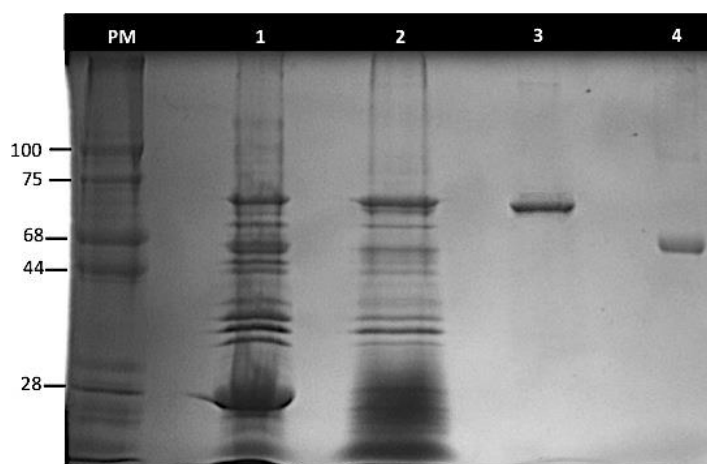


Figura 15. Electroelución de la proteína Cry11Aa visualizada en una electroforesis SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida. Carriles: PM. Peso molecular; 1. Cultivo *Bt. var. israelensis* en fermentación sólida al 40 % p/v (20 μ L); 2. Cultivo *Bt. var. israelensis* en fermentación sólida al 40 % p/v, solubilizado en BCB, fracción del sobrenadante (20 μ L). 3. Proteína Cry11Aa electroeluída. 4. BSA (3 μ g/ μ L). Teñido con Azul de Coomassie.

En la figura 15 se muestran la diferencia entre los perfiles del complejo espora-cristal hasta la proteína Cry11Aa purificada por el método de electroelución. En el carril 1 se visualiza el complejo espora-cristal bajo condiciones estándares de solubilización, evidenciando el mismo patrón de proteínas obtenido previamente (ver figura 9). En el carril 2, se observa una muestra del complejo espora-cristal sometida a condiciones alcalinas de solubilización, destacando el enriquecimiento de la proteína de interés. Finalmente, en el carril 3, se muestra una banda única de 72 kDa correspondiente a la proteína Cry11Aa electroeluída.

Una vez purificada la proteína de interés, se procedió a dializarla para eliminar las sales presentes y liofilizarla para concentrarla. Por último, se realizó un ensayo Bradford, con el cual se determinó que la concentración de proteína en la muestra era de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Evaluación de la producción de anticuerpos IgG anti-Cry11Aa mediante un Dot Blot

Con la finalidad de verificar si se estaba produciendo una respuesta inmune contra la proteína, se analizaron los sueros obtenidos a partir de las muestras de sangre de los conejos, a través de un ensayo Dot Blot (figura 16).

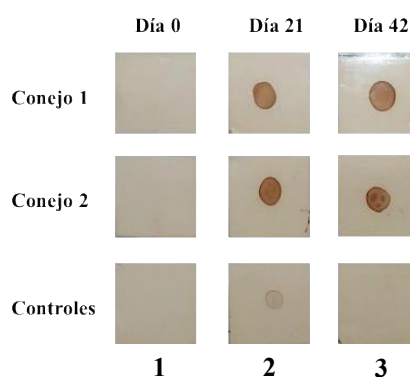


Figura 16. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-Cry11Aa mediante un Dot Blot. Se fijó 1 μg de proteína Cry11Aa electroeluída en cada membrana que fue incubada con el suero preinmune o hiperinmune (1/50) y conjugado (1/5.000). Para revelar se empleó el sustrato diaminobenzidina. Controles: 1. Proteína Cry11Aa (1 μg) + Conjugado; 2. Suero 1/50 del día 42 + Conjugado; 3. Conjugado. Para esta prueba se empleó una concentración de 1 μg de Cry11Aa, los sueros diluidos 1/50 y el conjugado diluido 1/5.000.

En la figura 16 se puede observar que los sueros preinmunes (correspondientes al día 0), para ambos conejos, no presentaron reconocimiento por el antígeno (proteína Cry11Aa purificada), a diferencia de los sueros hiperinmunes (día 21 y 42) donde sí se visualiza el reconocimiento del anticuerpo primario por la proteína de interés.

En cuanto a los controles, no hubo reconocimiento entre el antígeno y el conjugado. Igualmente, no se adhirió el anticuerpo primario a la membrana de nitrocelulosa luego de

incubarla con solución de bloqueo (controles negativos). Por su parte, el control positivo empleado en el sistema, evidenció el buen funcionamiento del conjugado al reconocer los anticuerpos contenidos en el suero e inmovilizados en la membrana.

Estandarización del Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (ELISAI)

Primeramente se realizó la estandarización del ensayo inmunoenzimático, evaluando diferentes concentraciones de antígeno (1 $\mu\text{g/mL}$ y 2 $\mu\text{g/mL}$), anticuerpo primario (1/100, 1/200 y 1/400) y anticuerpo secundario (1/10.000, 1/25.000 y 1/50.000), con el fin de seleccionar las condiciones que permitan obtener la mayor diferencia entre muestras positivas y negativas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17.

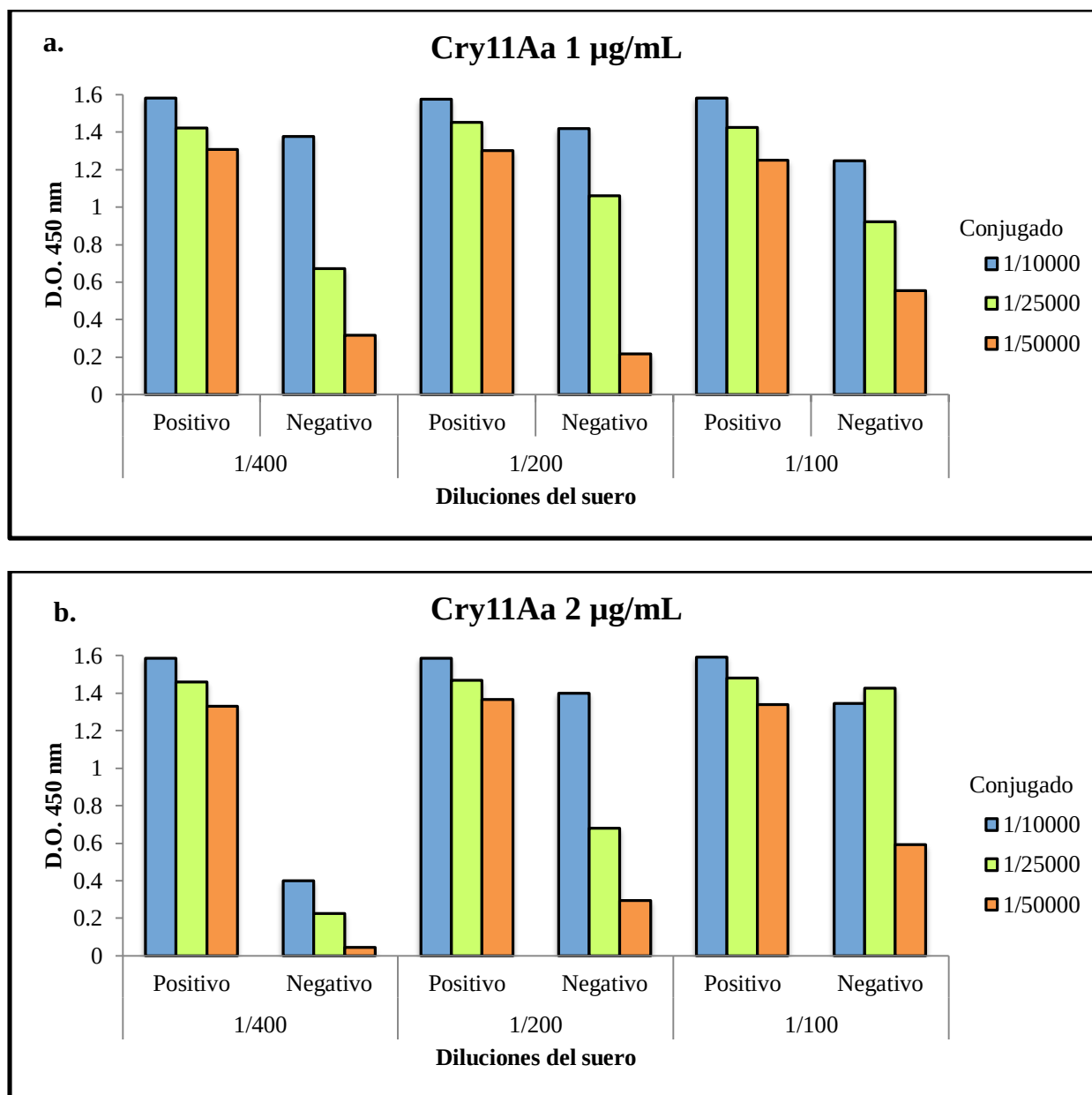


Figura 17. Estandarización de las condiciones del ELISAi. a. Empleando 1 µg/mL de antígeno Cry11Aa; b. 2 µg/mL de antígeno Cry11Aa.

En la gráfica 17 (a y b), se puede observar que se alcanzaron altas lecturas de densidad óptica (D.O.) para el suero positivo, bajo todas las condiciones empleadas (D.O._{450nm} máxima 1,59 y mínima 1,25). Mientras que los valores de D.O._{450nm} obtenidos para el suero negativo, varían dependiendo de la condición.

Al emplear diluciones de conjugado 1/10.000 y 1/25.000, se registran altos valores de D.O._{450nm}, utilizando ambas concentraciones de antígeno. La menor D.O._{450nm} registrada para el suero negativo se observó utilizando el conjugado diluido 1/50.000, particularmente, usando el suero diluido 1/400 y la concentración de antígeno 2 µg/mL (figura 17, b).

Con la finalidad de facilitar la visualización de los resultados anteriores y cuantificar las diferencias entre las D.O. obtenidas para ambos sueros, se procesaron los valores registrados, para los sueros positivos entre los negativos, resultando la proporción de unión (Brs, del inglés *binding ratios*). Los resultados se muestran en la figura 18.

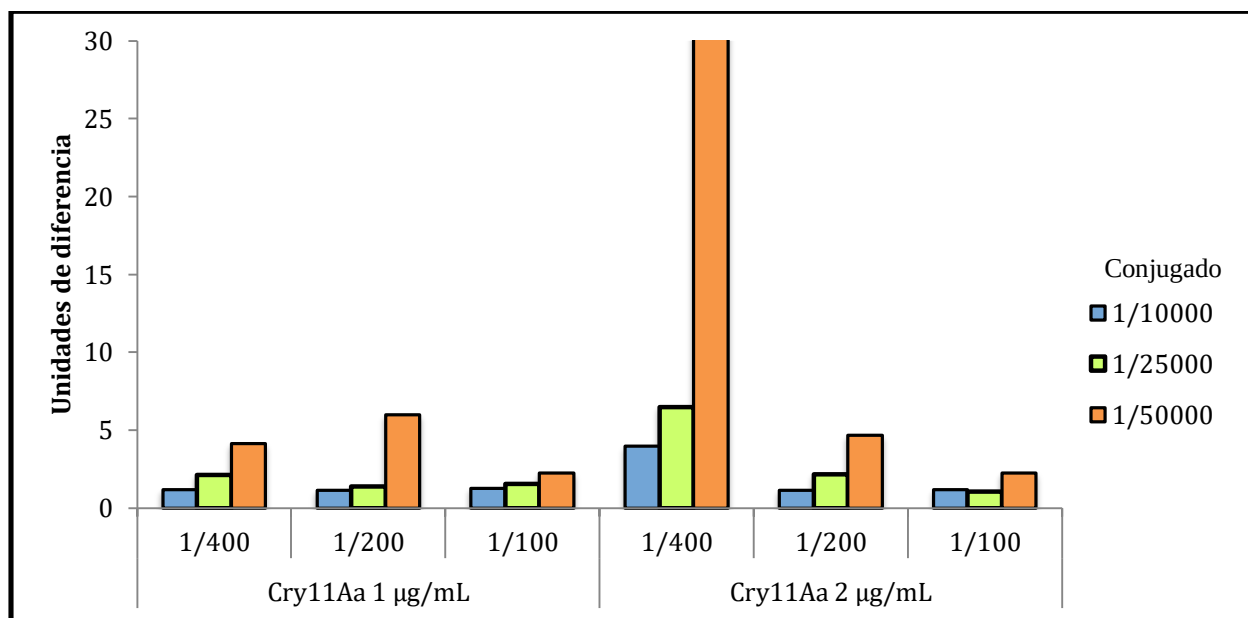


Figura 18. Proporción de unión entre las densidades ópticas de los sueros positivos y negativos de referencia obtenidas en la estandarización del ELISAI.

Como se puede observar, al emplear 1 µg/mL de antígeno, la mayor diferencia obtenida fue de 6 unidades bajo las condiciones de suero diluido 1/200 y conjugado 1/50.000. Mientras que al emplear 2 µg/mL de antígeno, la mayor diferencia alcanzada fue de 30 unidades, al

emplear la dilución de suero 1/400 y conjugado 1/50.000 (figura 18). Por esta razón, las condiciones seleccionadas fueron estas últimas reportadas.

Evaluación de la cinética de anticuerpos mediante un Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (ELISAI)

Una vez obtenidas las condiciones óptimas del ensayo ELISAI, se realizó el estudio del título de anticuerpos del tipo IgG generados contra la proteína Cry11Aa a través del tiempo. La evaluación se efectuó empleando como antígenos tanto la proteína Cry11Aa purificada como el complejo espora-cristal, como se muestra en la figura 19.

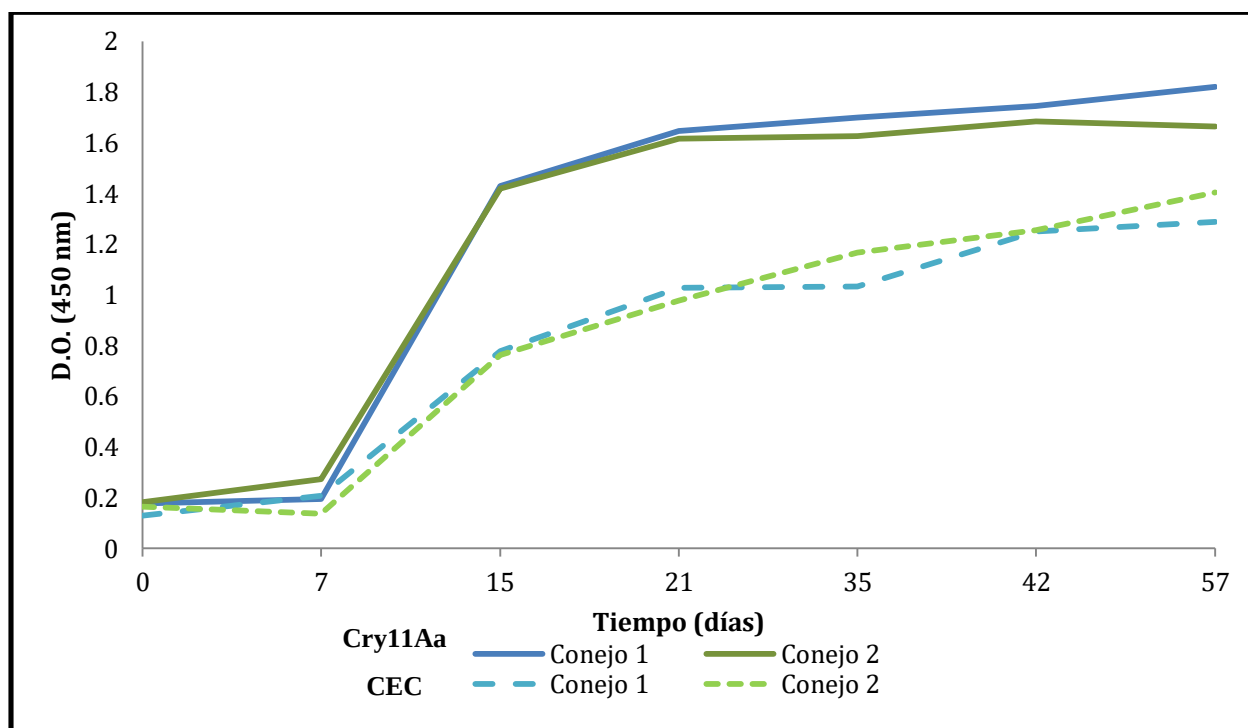


Figura 19. Cinética de formación de anticuerpos IgG contra la proteína Cry11Aa. Las líneas continuas representan los resultados obtenidos al emplear como antígeno la proteína Cry11Aa purificada (2 µg/mL), mientras que para las líneas punteadas representan al complejo espora cristal. CEC (2 µg/mL). El suero se empleó a una dilución 1/400, el conjugado 1/50.000 y como sustrato la diaminobencidina.

Los resultados obtenidos evidencian que inicialmente el título de anticuerpos contra la proteína Cry11Aa era bajo, mostrando una D.O._{450nm} de 0,2 (figura 19). A partir de los 7 días post-inmunización, se produjo un incremento exponencial en las lecturas de D.O._{450nm}, visualizado en un aumento desde 0,8 a 1,6 para el día 21. Luego de esta lectura, los valores presentaron leves incrementos hasta el día 57. Por otra parte, al emplear como antígeno el complejo espora-cristal, se observó también que a partir de los 7 días post-inmunización, hay un incremento gradual de la D.O._{450nm}, variando de 0,2 a 1,4. Sin embargo, a diferencia del patrón obtenido para la proteína Cry11Aa, no se observa para los sueros obtenidos del conejo 2, la entrada al *plateau* que representaría la máxima producción de anticuerpos. Además, se evidencia que los valores de D.O._{450nm} registrados para el complejo espora-cristal representan siempre aproximadamente la mitad de lo registrado para la proteína purificada.

Evaluación de la cinética de formación del cristal parasporal de Bacillus thuringiensis var. israelensis en medio A-80 mediante un ensayo Dot Blot

La cinética de síntesis de los cristales de *Bt. var. israelensis* en el medio A-80 a través de la detección de la proteína Cry11Aa, fue evaluada mediante un ensayo Dot Blot. Los resultados se muestran en la figura 20.

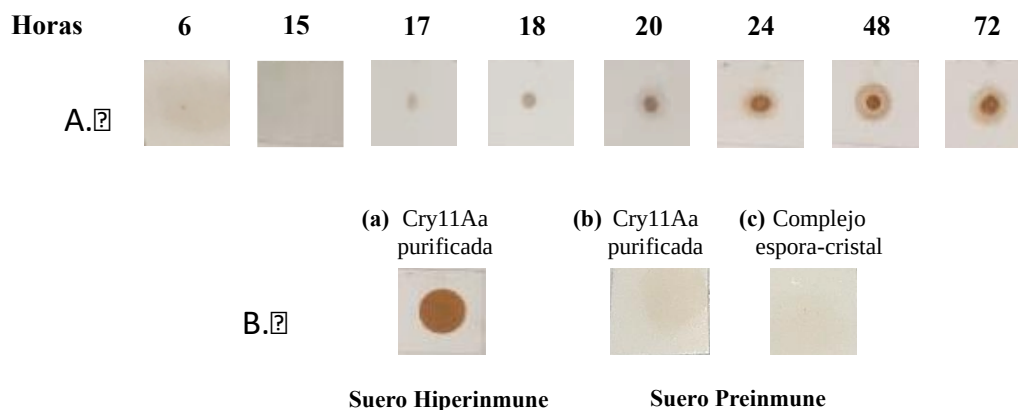


Figura 20. Evaluación de la cinética de formación del cristal parasporal de *Bt. var. israelensis* en el medio A-80 mediante un ensayo Dot Blot. A. Cinética de la formación de cristales de *Bt. var. israelensis*. Cada tiempo de cultivo fue trabajado al 40 % p/v. Se tomó 1 μ L de muestra que fue fijada a la membrana e incubada con suero hiperimmune (1/200) B. Controles: a. reconocimiento de la proteína Cry11Aa purificada (2 μ g/ μ L) por el suero hiperimmune (1/200); b y c. controles negativos, (b) empleando la proteína Cry11Aa purificada (2 μ g/ μ L) (c) y el complejo espora-cristal a las 72 horas (1 μ L), incubados con el suero preimmune (1/200). En todos los casos, el conjugado empleado fue un anti IgG de conejo unido a la enzima peroxidasa (1/20.000) y el sustrato fue la diaminobenzidina.

La figura 20 muestra el aumento en el reconocimiento de la proteína Cry11Aa por parte de los anticuerpos presentes en el suero hiperimmune a través del tiempo. Dicho aumento fue visualizado por el incremento en la intensidad de la coloración. De esta manera, se observa que a las 6 y 15 horas de cultivo no hay reconocimiento del suero hiperimmune por la proteína Cry11Aa. A partir de las 17 horas de cultivo se visualiza un leve reconocimiento que incrementa progresivamente hasta las 48 horas y se mantiene con la misma intensidad hasta las 72 horas. Por otra parte, como control positivo del sistema se enfrentó la proteína Cry11Aa purificada con el suero hiperimmune visualizando el reconocimiento de la misma (figura 20, B-a). Como controles negativos del sistema, se emplearon la proteína Cry11Aa purificada y el complejo espora-cristal, incubados con el suero preimmune (figura 20, B-b y B-c), los cuales no presentaron reconocimiento.

Detección de la proteína Cry11Aa de Bacillus thuringiensis var. israelensis mediante un ensayo Western Blot

Finalmente, se realizó un Western Blot para corroborar el reconocimiento específico de la proteína Cry11Aa, de 72 kDa, contenida en el complejo espora-cristal por parte del suero hiperinmune. Los resultados se muestran en la figura 21.

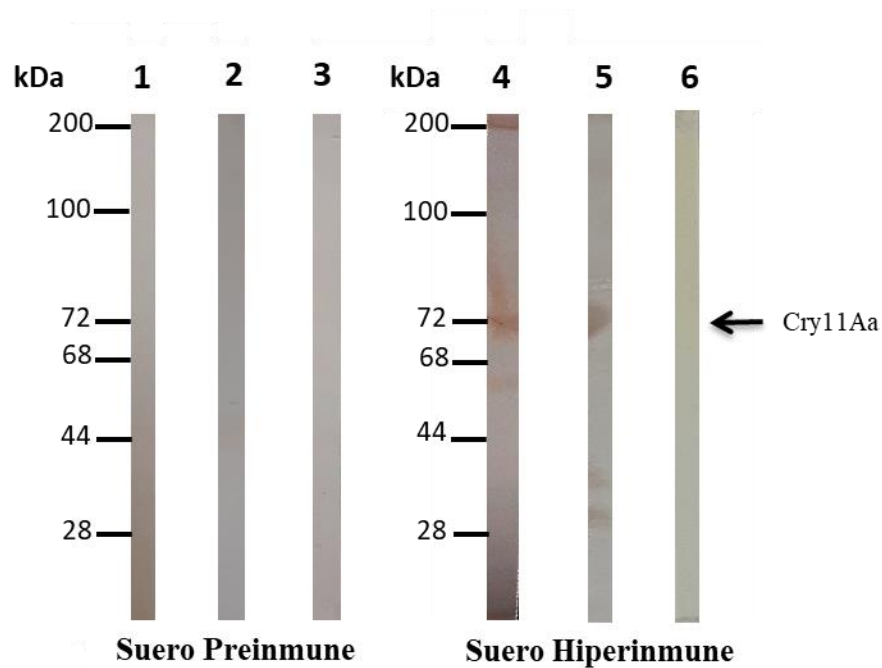


Figura 21. Detección de la proteína Cry11Aa en el medio de cultivo A-80 mediante Western Blot. Carriles: 1 y 4. Complejo espora-cristal de *Bt. var. israelensis* (20 µg); 2 y 5. Proteína Cry11Aa purificada (40 µg); 3 y 6. Complejo espora-cristal de *B. cereus* (40 µg).

Como se puede observar en la figura 21, al incubar el complejo espora-cristal de *Bt. var. israelensis* con el suero hiperinmune (figura 21, carril 4), se reconocieron tres bandas de aproximadamente 200 kDa, 72 kDa y 65 kDa, respectivamente, siendo la más dominante la de 72 kDa. Mientras que con el suero preinmune no se observó reconocimiento de las proteínas que conforman al complejo espora-cristal (figura 21, carril 1). El control positivo empleado en el sistema fue la proteína Cry11Aa electroeluída e incubada con el suero hiperinmune (figura 21,

carril 5), resultando en un fuerte reconocimiento de una banda de 72 kDa y dos bandas entre 40 y 30 kDa. Adicionalmente, se observó un débil reconocimiento de una proteína cercana a los 200 kDa. Por otra parte, se emplearon como controles negativos, la proteína Cry11Aa electroeluída y un cultivo en fase esporulativa de *B. cereus*. El suero negativo no presentó reconocimiento por la proteína purificada (figura 21, carril 2), y no se observó interacción con las proteínas de *B. cereus* al incubar con los sueros hiperinmune y preinmune (figura 21, carril 3 y 6).

DISCUSIÓN

Un punto crítico en la producción comercial de *B. thuringiensis*, es que cada proceso fermentativo debe estar sujeto a un control de calidad para asegurar un alto grado de actividad tóxica. En este sentido, el establecimiento de metodologías estandarizadas para el seguimiento de la formación del cristal parasporal y su toxicidad son escasas (Carareto y Lemos, 2003).

Cultivo por lote de Bacillus thuringiensis var. israelensis

Un primer paso en el desarrollo de un bioinsecticida, es conocer el requerimiento nutricional del organismo. En el caso de *B. thuringiensis*, los requerimientos nutricionales varían entre diferentes cepas (Nickerson y Bulla, 1974; Dulmage, 1970b). Además, un buen crecimiento y esporulación no siempre implican una alta toxicidad (Dulmage, 1970a; Avignone-Rossa y Mignone, 1995). Tomando en cuenta las premisas anteriores, se empleó como medio de referencia el medio formulado por Arcas y colaboradores (1984), ya que en el Laboratorio de Procesos Fermentativos, donde fue realizado este trabajo de investigación, se ha comprobado que este medio presenta las proporciones y cantidades de nutrientes necesarias para el crecimiento abundante de *B. thuringiensis* y, sobretodo, permite la formación del complejo espora-cristal (Brazón, 1998; Peñalver, 2005; Alcina, 2016; Alvarado, 2016; Guevara, 2016; Gajardo, 2017).

Al evaluar la cinética de crecimiento de *Bt. var. israelensis*, se llevó a cabo la titulación tanto para células viables como para las esporas. De esta manera, se obtuvieron dos curvas, la primera representó la curva de crecimiento del microorganismo y la segunda, la cinética de formación de esporas (figura 7).

La curva de crecimiento presentada en la figura 7, mostró que una vez inoculado el medio A-80, comenzó el desarrollo de la fase exponencial de crecimiento. Cabe destacar que no se observó una fase de latencia, ya que el cultivo partió de un preinóculo realizado con el mismo medio. La fase exponencial se evidenció por el aumento en los títulos bacterianos debido a la duplicación de las células vegetativas. Durante esta primera fase, fue posible calcular los parámetros cinéticos de la bacteria, resultando en una velocidad de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de $0,694 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo generacional (tg) de 1 hora. Se ha reportado que en general *B. thuringiensis*, posee un tiempo generacional entre 30- 90 minutos (0,5- 1,5 horas) dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentre (Soberón y Bravo, 2000). Así mismo, en este trabajo, se obtuvieron resultados de los parámetros cinéticos similares a los encontrados por Avignone-Rossa y colaboradores (1995) y Alvarado (2016) en sus estudios, empleando el mismo medio.

Luego de transcurridas las primeras 10 horas, el cultivo alcanzó la fase estacionaria. Durante esta fase, ocurre el agotamiento de los nutrientes en el medio y la velocidad de crecimiento se hace cero, en consecuencia, no se generan incrementos del título bacteriano. Proporcionalmente, en este tiempo, se observó un aumento en el título de esporas, que empezó a igualarse a las 24 horas con el título de células que no recibieron tratamiento térmico. Esto significa que inicialmente en la curva de crecimiento sin choque térmico, la mayoría de las colonias contadas provenían de células vegetativas y a medida que transcurre el tiempo este tipo celular va siendo sustituido por las esporas termoresistentes. De esta manera, a las 48 horas todo el cultivo estuvo conformado exclusivamente por esporas y cristales.

Por otra parte, en la curva de crecimiento, no se observó fase de muerte ya que la bacteria, al haber entrado en la fase esporulativa de su ciclo de vida y producir las esporas, estas

se mantienen latentes hasta que las condiciones nutricionales sean nuevamente favorables para activarse y germinar (Errington, 2003).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado, dado a que se alcanzaron altos títulos de células vegetativas y altos títulos finales de esporas. Dichos resultados se ajustan a lo observado por Avignone-Rossa y colaboradores (1995) y Alvarado (2016) para *Bt. var. israelensis* en presencia del mismo medio de cultivo. De forma similar, los resultados de este estudio se asemejan a lo obtenido por Arcas y colaboradores (1984), Brazón (1998), Alcina (2016), Guevara (2016) y Gajardo (2017), cuando realizaron curvas de crecimiento empleando el mismo medio y la cepa *Bt. var. kurstaki*.

Paralelamente, las muestras tomadas a los diferentes tiempos, fueron evaluadas mediante el empleo del microscopio de contraste de fase para la observación de la formación del complejo espora-cristal (figura 8). De esta manera, en las primeras horas de cultivo se observaron las células bacilares sin presencia de esporas (figura 8a). Una vez que el cultivo entró en fase esporulativa se visualizaron las esporas refringentes, que no provocaron el hinchamiento del perfil bacilar, y las inclusiones parasporales opacas, con formas ovoidales de bordes irregulares o amorfas (figura 8, b y c), lo cual concuerda con lo observado por diversos autores (Höfte y Whiteley, 1989; Zghal *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2012). No obstante, llama la atención que en la literatura se han reportado más de una forma del cristal parasporal para esta variedad, además de las observadas en este estudio (Tanada y Kaya, 1993), a diferencia de otras subespecies de *B. thuringiensis* que presentan una estructura del cristal definida. Por otra parte, se ha descrito que hasta los momentos, la variedad *israelensis* es la única que presenta una estructura lamelar que rodea a la inclusión cristalina (Federici *et al.*, 1990; Federici *et al.*, 2003).

Solubilización del cristal parasporal de Bacillus thuringiensis var. israelensis

Una vez transcurridas las 48 horas del cultivo, el complejo espora-cristal obtenido fue analizado mediante una SDS-PAGE. El perfil proteico resultante mostró una gran degradación de las proteínas que conforman a la δ -endotoxina (datos no mostrados), que puede deberse a la actividad de las exoproteasas presentes en el medio de cultivo (Pearson y Ward, 1987; Lacey, 2016). Sin embargo, al emplear fermentaciones sólidas, la degradación proteica fue menor, por lo que en el perfil electroforético, bajo condiciones estándares de desnaturalización, se pudieron apreciar las bandas esperadas de aproximadamente 130 kDa, 72 kDa y 28 kDa, que coinciden con los pesos reportados para las principales proteínas Cry4 (Cry4Ba y Cry4Aa), Cry11Aa y Cyt1Aa, respectivamente (figura 9, carril 1 y 2). Cabe destacar que las proteínas Cry4Ba y Cry4Aa tienen pesos moleculares similares (128 kDa y 134 kDa, respectivamente), por lo cual se requerirían otros métodos analíticos que permitan diferenciarlas.

Por otra parte, se conoce que el cristal parasporal de *Bt. var. israelensis*, requiere de condiciones alcalinas para ser solubilizado (Gill *et al.*, 1992). Así mismo, se ha reportado que la adición de agentes reductores, como el β -mercaptoetanol (β -ME) y el ditioneitol (DTT), a la solución alcalina mejoran la solubilización de las protoxinas, particularmente las de alto peso molecular (Thomas y Ellar, 1983; Insell y Fitz-James, 1985). Esto indica que las interacciones hidrófobas, iónicas y los enlaces disulfuros están implicados en la integridad de las subunidades proteicas de la inclusión (Insell y Fitz-James, 1985; Bukhari *et al.*, 2013). Además, diversos autores han reportado que el tratamiento de las inclusiones cristalinas bajo las condiciones descritas (pH básico y desnaturalización), genera un incremento en una serie de proteínas de bajos pesos moleculares, que pueden ser visualizadas mediante electroforesis SDS-PAGE, la

mayoría producto de la proteólisis de las principales proteínas que conforman a la inclusión cristalina (Federici *et al.*, 1990; de Barros y Neves, 2007; Oestergaard *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, el complejo espora-cristal fue incubado en condiciones alcalinas y desnaturalizantes, con tampón carbono bicarbonato (pH 9,6) y β -mercaptoetanol 5% v/v, con el fin de evitar los agregados que se formaban luego de centrifugar el cultivo. Al transcurrir el periodo de incubación, las fracciones resultantes fueron evaluadas mediante una electroforesis SDS-PAGE (figura 9, carril 3 a 6), obteniendo perfiles proteicos distintos (figura 9, carriles 3 a 6). La fracción del sedimento, mostró una gran cantidad de bandas correspondientes a proteínas de diversos pesos moleculares, en un rango de 200 a 25 kDa, entre las cuales dominaron las cuatro proteínas principales, anteriormente descritas, que conforman al cristal parasporal, así como posiblemente sus productos de degradación proteolítica y proteínas de las esporas (figura 9, carriles, 3 y 5).

Por su parte, la fracción del sobrenadante presentó aproximadamente 20 bandas comprendidas en un rango entre 130 y 25 kDa, siendo las de mayor intensidad las bandas de 72 y 28 kDa (figura 9, carriles 4 y 6), lo cual se asemeja a lo observado por Thomas y Ellar (1983) al incubar las inclusiones cristalinas de *Bt. var. israelensis* con 50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-HCl}$ (pH 10,5) durante 30 min. a 37 °C y extraer sólo un 40 % del cristal en forma soluble. Así como Armstrong y colaboradores (1985), cuando solubilizaron cultivos secos de *Bt. var. israelensis* con 1 N de NaOH (pH 12), durante 3 horas a 37 °C.

Posiblemente, las bandas con un peso molecular comprendido entre 68 a 25 kDa observadas en la fracción del sobrenadante, correspondan en su mayoría a productos de la proteólisis de las cuatro protoxinas. En este contexto, las bandas visualizadas en un rango de 68 a 44 kDa, probablemente sean productos de la proteólisis de las proteínas de alto peso molecular,

ya que se ha reportado que Cry4Aa y Cry4Ba, cuando son cortadas generan dos fragmentos de 68 a 60 kDa. No obstante, a diferencia de otras proteínas Cry, estas pueden seguir siendo escindidas generando dos fragmentos de 48 a 45 kDa y de 20 a 18 kDa (Yamagiwa *et al.*, 1999; Revina *et al.*, 2004; Boonserm *et al.*, 2005; de Barros y Neves, 2007). Así mismo, los fragmentos mayores a 44 kDa hasta 28 kDa podrían ser el resultado de la protoxina Cry11Aa, que serían capaces de formar heterodímeros con capacidad tóxica (Yamagiwa *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2009; Ben-Dov, 2014), y en el caso de la banda de 25 kDa, podría corresponder al producto de Cyt1Aa (Chow *et al.*, 1989) que a su vez, sería capaz de formar un dímero de 50 kDa (Couche *et al.*, 1987). En este sentido, la tabla 16 resume los fragmentos resultantes de la proteólisis de cada protoxina.

Tabla 16. Productos proteolíticos de las proteínas que conforman al cristal parasporal de *Bt. var. israelensis*.

Proteína	Peso Molecular	Primer Corte	Segundo Corte	Observación	Bibliografía
Cry4Ba y Cry4Aa	130 y 128 kDa, respectivamente	Fragmentos entre 60 y 68 kDa	Fragmentos de 45 a 48 kDa y 18 a 20 kDa	Se ha reportado que los fragmentos de 45 y 20 kDa pueden formar complejos tóxicos de 60 kDa	Yamagiwa <i>et al.</i> , 1992; Oestergaard <i>et al.</i> , 2007
Cry11Aa	72 kDa	Fragmentos entre 30 y 40 kDa			Yamagiwa <i>et al.</i> , 2002; Chen <i>et al.</i> , 2009; Ben-Dov, 2014
Cyt1Aa	28 kDa	Fragmentos de 25 kDa		Los fragmentos forman dímeros de 50 kDa	Couche <i>et al.</i> , 1987; Chow <i>et al.</i> , 1989; Oestergaard <i>et al.</i> , 2007

Generalmente, la ruptura de los enlaces disulfuros se logra por un proceso de desplazamiento de equilibrio utilizando un gran exceso de grupos tioles libres (Rabilloud, 1996). Entre los agentes reductores de puentes disulfuros más utilizados se encuentran el DTT y el β -ME, que se suelen emplear indistintamente. Sin embargo, exhiben diferentes propiedades químicas (Konigsber, 1972; Rabilloud, 1996), que pueden generar artefactos en una corrida

electroforética, lo cual justifica la escogencia de la sustancia a usar (Rabilloud, 1996; Herbert *et al.*, 1998; Herbert, 1999). De esta manera, al probar ambos reactivos (DTT y β -ME), no se encontraron diferencias entre los perfiles proteicos obtenidos (figura 9, carriles 3 al 6).

Todas las observaciones realizadas, desde la morfología de la colonia, la cinética de crecimiento y formación del complejo espora-cristal, la forma del cristal parasporal visualizada en un microscopio de contraste de fase y la conformación proteica de las inclusiones cristalinas analizadas mediante una SDS-PAGE, permitió inferir que la cepa empleada podría tratarse de la variedad *israelensis*.

Obtención de una fracción enriquecida en cristales parasporales de Bacillus thuringiensis var. israelensis

Una vez corroborado la presencia de las proteínas, se prosiguió a resuspender el complejo espora-cristal con hexano, y adicionalmente diclorometano, para separar los cristales de las esporas (Doyle *et al.*, 1984; Mounsef *et al.*, 2014). A pesar que se observaron las dos fases obtenidas por Mounsef y colaboradores (2014) (figura 10), las metodologías no resultaron ser efectivas para el enriquecimiento del cristal parasporal, ya que al realizar evaluaciones mediante SDS-PAGE, no hubo diferencias significativas en los perfiles proteicos de las fracciones del sedimento antes y después del tratamiento, como se pudo observar en la figura 11. Cabe acotar que el procedimiento fue también realizado con ambos agentes reductores de puentes disulfuro (DTT y β -ME) obteniendo el mismo patrón de bandas (datos no mostrados), lo que implica una reproducibilidad de los resultados alcanzados tanto para el tratamiento de solubilización con los diferentes agentes reductores, como con los tratamientos con compuestos orgánicos.

Este método de enriquecimiento de los cristales, se basa en la capacidad de las esporas hidrofóbicas de interactuar con el solvente. En el caso de *B. thuringiensis*, sus esporas presentan un 61 % de capacidad de adherencia a compuestos orgánicos (Doyle *et al.*, 1984), por lo cual una parte de las esporas del cultivo no está constantemente interactuando con el compuesto y, al centrifugar, estas pueden sedimentar junto a los cristales (Alcina, 2016). En consecuencia, el enriquecimiento en cristales podría verse afectado.

Una manera de mejorar los resultados de este procedimiento es mediante repeticiones reiteradas del tratamiento, con la desventaja que siempre se perderá una parte de la fracción cristalina y que el proceso no siempre conducirá al mismo resultado. En torno a esto, Pearson y Ward (1987), realizaron un protocolo similar empleando un sistema bifásico de polietilenglicol (PEG)/Sulfato dextrano de sodio con el cual lograron remover entre 37- 61 % de esporas por cada pasada, luego de repetir siete veces el procedimiento removieron el 99 % de esporas y recuperaron 38 % de la cantidad inicial del cristal. Por su parte, Mounsef y colaboradores (2014) reportaron un alto rendimiento de purificación de cristales bipiramidales con hexano (99 % de cristales puros), mientras que al someter cristales esféricos, obtuvieron un rendimiento menor (44 %). Las diferencias entre los rendimientos las acreditaron a la morfología y el tamaño del cristal. Contrariamente, Alcina (2016) reportó un bajo rendimiento de purificación de cristales bipiramidales (1,28 %) y describió el procedimiento como “no adecuado” para los fines de su investigación. De las evidencias anteriores se puede inferir que el enriquecimiento de la fracción en cristales parasporales puede verse afectado por diversos factores, tales como la morfología, hidrofobicidad y tamaño del cristal, la naturaleza de la espora, el número de veces que se repite el procedimiento y el solvente a emplear.

Tomando en consideración que los protocolos realizados con los solventes orgánicos no dieron los resultados esperados, se prosiguió el estudio purificando la proteína de 72 kDa por el método de electroelución, luego de someter al complejo espora-cristal a soluciones alcalinas. La elección de la proteína se basó en su elevada capacidad tóxica (Chilcott y Ellar, 1988; Fernandez *et al.*, 2005) y su dominancia en los perfiles electroforéticos obtenidos, lo que garantiza un mayor rendimiento en el método seleccionado para su purificación. Cabe destacar que aunque también se obtuvo una alta dominancia de la proteína de 28 kDa, correspondiente a Cyt1Aa, la misma no fue seleccionada para electroelución ya que muestra efectos tóxicos en vertebrados al solubilizarla (Thomas y Ellar, 1983), lo que podría ocasionar daños a los animales experimentales.

Estudio in silico de la proteína Cry11Aa producida por Bacillus thuringiensis var. israelensis

Con el fin de inferir si la proteína Cry11Aa, de 72 kDa, tenía potencial inmunogénico, se realizó el estudio *in silico* de la misma. Para esto, primeramente se efectuó un análisis de similaridad utilizando el programa BLASTP, del servidor NCBI, el cual es capaz de comparar una secuencia problema con una gran cantidad de secuencias aminoacídicas reportadas a la fecha en diferentes bases de datos (Altschul *et al.*, 1990). De esta manera, se encontró que la proteína Cry11Aa de referencia es similar en un rango de 96- 100 % a otras Cry11A reportadas de diferentes aislados, con un porcentaje de cobertura del 100 % y un valor E de 0,0, es decir, que la totalidad de la secuencia fue comparada y el valor E corrobora que estos resultados no se obtuvieron al azar y que los alineamientos tienen alto nivel de confiabilidad (tabla 13).

Al realizar un alineamiento entre las diferentes secuencias obtenidas en el BLASTP, se observó que las variaciones entre los aislados se localizan principalmente en la región central de la secuencia aminoacídica, la cual correspondería al dominio II de la proteína (figura 12). Este dominio es el más divergente entre las proteínas Cry y se cree que está implicado en la unión a los receptores de membrana (Bukhari *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2010). Por lo cual, estas variaciones pudieran ser o no significativas, ya que se ha demostrado que sustituciones puntuales, aun cuando se consideren irrelevantes para la carga global de una proteína, son capaces de alterar la estructura y función de la misma (Conn y Jannovick, 2006; Schaefer y Rost, 2012). Por otra parte, cabe destacar que las cepas que presentaron las mayores diferencias con respecto a la secuencia de referencia, curiosamente, resultaron ser las más tóxicas al evaluar la proteína Cry4B, de los seis aislados probados por Bukhari y colaboradores (2003).

Aunado a esto, se encontró que la proteína Cry11B, tóxica para larvas de anófeles y culícidos, producida por las subespecies *medellin* y *jegathesan* presenta un 60 % de similitud con la proteína de referencia (tabla 14). De acuerdo a esto, y desde un punto de vista inmunológico, aquellas proteínas que tienen alta similitud en cuanto a su secuencia aminoacídica, podrían presentar epítopes en común, lo cual conduciría a un reconocimiento inespecífico al emplear anticuerpos policlonales (Wie *et al.*, 1982; Delécluse *et al.*, 1995; Orduz *et al.*, 1996). A fines de este trabajo, este hecho podría resultar beneficioso ya que ampliaría el número de cepas a las que se les podría hacer el seguimiento en la formación del cristal parasporal en un medio de cultivo.

Desde un punto de vista biotecnológico, la identificación de nuevas proteínas que sean tóxicas para mosquitos, y difieran en estructura y modo de acción es altamente valioso, ya que se podrían desarrollar nuevos pesticidas, combinando en el mismo organismo varios genes que codifiquen toxinas con diferentes especificidades y/o niveles de actividad, con lo cual se lograría

prevenir o retrasar el inicio de la resistencia en insectos (Delécluse *et al.*, 1995). De hecho, hay un informe que sugiere que la aparición de la resistencia de los mosquitos a *Bt. var. israelensis* se correlaciona inversamente con el número de toxinas utilizadas para la selección, al menos en condiciones de laboratorio (Georghiou *et al.*, 1993).

En cuanto al estudio *in silico* de los parámetros fisicoquímicos, se evaluó el peso molecular (PM), el punto isoelectrico (pI) y el índice de hidrofobicidad. De esta manera, experimentalmente, basados en la migración en geles de poliacrilamida, la banda proteica se debía observar a un peso aproximado o igual a 72 kDa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

El punto isoelectrico calculado para la proteína Cry11Aa fue de 5,37. Este parámetro hace referencia al pH en el cual las cargas positivas de la proteína se igualan a las negativas, anulando la existencia de movimiento en un campo eléctrico. Por lo cual, al pH obtenido, la proteína podría mostrar un mínimo de solubilidad (Nelson y Cox, 2009) y, por tanto, precipitar en una solución.

Por su parte, el índice de hidrofobicidad es una medida de la energía [kJ/ mol] que se debe usar para transferir un segmento de secuencia de longitud definida de un medio hidrofóbico a un medio hidrofílico (Müller-Esterl, 2008). El resultado obtenido *in silico* fue de -0,187, por lo que la proteína Cry11Aa estaría clasificada teóricamente como hidrofílica, ya que el valor fue inferior a 0. En el presente trabajo se observó que la proteína, en condiciones desnaturalizantes, es soluble en agua. No obstante, múltiples investigaciones han reportado que las proteínas Cry que componen al cristal parasporal de *Bt. var. israelensis* son insolubles en este solvente debido a su alto contenido de residuos de cisteína hacia el extremo C-terminal (Fast y Milne, 1979; Bukhari *et al.*, 2013). Posiblemente, la diferencia entre el resultado obtenido *in silico* y lo

reportado se deba a que el programa Protparam, hace un promedio de los valores de hidropatía de cada residuo aminoacídico sin tomar en cuenta la estructura tridimensional de la proteína (Kyte y Doolittle, 1982; Gasteiger *et al.*, 2005).

Con el fin de evaluar el potencial inmunogénico de la proteína de interés, se realizó el estudio de los posibles epítopes lineales empleando el programa Bepipred 2.0 (tabla 15). Los epítopes lineales consisten en secuencias seguidas de aminoácidos, a diferencia de los epítopes discontinuos o conformacionales que están constituidos por secuencias aminoacídicas distantes que se aproximan entre sí debido al plegamiento o estructura tridimensional de la proteína (Forsström *et al.*, 2015; Jespersen *et al.*, 2017). En el presente trabajo, se realizó el estudio de los epítopes lineales por dos razones. Primero, la proteína a emplear se encuentra desnaturalizada, por lo cual se ha perdido la estructura terciaria. Segundo, para el estudio de los epítopes conformacionales se requiere de la estructura tridimensional de la proteína, la cual no se encuentra disponible en las diferentes bases de datos.

El programa Bepipred 2.0 arrojó como resultado 12 posibles regiones de la proteína Cry11Aa que podrían ser reconocidas por los linfocitos B. Tomando en cuenta que las células B reconocen principalmente epítopes que contienen entre 5 y 25 aminoácidos (Kringelum *et al.*, 2013) y, que los anticuerpos generados contra los epítopes lineales, por lo general siguen reconociendo epítopes conformacionales específicos en proteínas nativas (Forsström *et al.*, 2015), se puede inferir que el suero hiperinmune producido en el modelo lepórico, a partir de la proteína desnaturalizada, podría reconocer epítopes indistintamente de su conformación. De acuerdo a estos resultados, se considera que la δ -endotoxina Cry11Aa tiene potencial inmunogénico.

Evaluación de la cinética de formación del cristal de Bacillus thuringiensis var. israelensis

La cinética de formación del cristal de *Bt.* var. *israelensis* se evaluó mediante una electroforesis SDS-PAGE, a partir de muestras del cultivo a diferentes tiempos. Se encontró que en las primeras seis horas de cultivo (figura 13, carril 1) se sintetizaron una gran cantidad de proteínas necesarias para cumplir las funciones celulares. Posteriormente, a las 24 horas del proceso fermentativo se observó un cambio en el patrón de bandas y un enriquecimiento en aquellas que conforman al cristal parasporal, donde la banda correspondiente a la proteína de 28 kDa fue la más intensa, seguida por la de 72 kDa. Los resultados obtenidos concuerda con lo observado en la curva de crecimiento (figura 7) y con lo reportado por Chilcott y colaboradores (1983), Federici y colaboradores (1990), y Sarrafzadeh y colaboradores (2005), cuyos trabajos indican que la formación del cristal parasporal se completa a las 24 horas de cultivo, mientras que la lisis requiere entre 24 y 48 horas.

Las cepas de referencias empleadas, fueron la especie *B. cereus* y *Bt.* var. *kurstaki*, en ambos casos se visualizaron los perfiles esperados. Aunque, *Bacillus cereus* es fisiológicamente similar a *Bt.*, no posee los plásmidos que codifican a las toxinas, motivo por el cual solamente se evidenciaron bandas de bajo peso molecular correspondientes a las proteínas de la esporas (Kolstø y Carlson, 1993; Vilas-Bôas *et al.*, 2007). Por su parte, la subespecie *kurstaki*, sintetiza principalmente una δ -endotoxina de 135 kDa, visualizada como la banda de mayor intensidad. De esta manera, las bandas en común entre las tres especies son principalmente proteínas asociadas a las esporas.

Purificación de la proteína Cry11Aa

Debido a que el interés de este trabajo es obtener anticuerpos que permitan detectar la δ -endotoxina que produce *Bt* var. *israelensis* en un medio de cultivo, las proteínas deben encontrarse completamente aisladas para poder ser empleadas, de lo contrario, proteínas provenientes de las esporas o de las células vegetativas podrían ser más inmunogénicas, desviando la producción de anticuerpos y generando un reconocimiento inespecífico (Kindt *et al.*, 2007). De acuerdo a estos requerimientos, la purificación de la proteína Cry11Aa se llevó a cabo mediante la técnica de electroelución. Esta técnica ha sido empleada anteriormente con éxito para purificar proteínas de *Bt*. (Vablamudi *et al.*, 1995; Malik y Riazuddin, 2006; Alcina, 2016). Así mismo, debido a que las proteínas Cry contenidas en la matriz de poliacrilamida no generan una presentación adecuada al sistema inmune (Reguero *et al.*, 1994), la electroelución constituye una alternativa para la obtención de esta proteína evadiendo esta dificultad.

Por otra parte, con el fin de evitar interferencias en la determinación de la concentración de proteínas, se optó por realizar una tinción negativa (o inversa) con sulfato cúprico al 1 %, ya que debido a la naturaleza de la tinción, la proteína podía ser eluída sin presencia de algún otro agente que pudiera interferir en la cuantificación. Además, la técnica presenta como ventajas su simplicidad y cortos tiempos de incubación (Hardy y Castellanos, 2002; Lee *et al.*, 1987). De esta manera, luego de eluir, dializar y concentrar la proteína, se realizó el ensayo Bradford donde se obtuvo una concentración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Cry11Aa.

Detección de la proteína Cry11Aa mediante pruebas inmunoquímicas

El conocimiento en cuanto a la capacidad inmunogénica de los cristales parasporales producidos por diversas cepas de *B. thuringiensis* ha abierto una ventana al empleo de técnicas

inmunológicas para ser utilizadas como metodologías en el control de calidad de los cristales proteicos producidos por el microorganismo (Tyrell *et al.*, 1981; Wie *et al.*, 1982; Reguero *et al.*, 1994; Martínez y Moreno, 2017).

Con el fin de evidenciar si se estaba obteniendo una respuesta humoral hacia la proteína Cry11Aa purificada, se realizó un Dot Blot. En la figura 16 se pudo observar una coloración intensa como respuesta a la reacción del antígeno con los anticuerpos presentes en el suero tomados a los 21 y 42 días, por lo cual se concluyó que no se necesitaban más inmunizaciones en los organismos experimentales. Por otra parte, el suero negativo no reaccionó con la proteína purificada, lo que indica la ausencia de anticuerpos previos anti-Cry11Aa en los animales. Esto confirma que la generación de una respuesta inmune ocurrió postinmunización.

En este ensayo se corroboró que el conjugado no reconocía de forma inespecífica a la proteína y que el bloqueo de la membrana resultó eficiente al no permitir la adherencia del suero a la misma. Por otra parte, se evidenció el reconocimiento del conjugado a los anticuerpos presentes en el suero que fue fijado a la membrana. Todos estos controles permitieron asegurar el buen funcionamiento del sistema, y evidenciar que las reacciones observadas no se generaron por interacciones inespecíficas.

Una vez confirmada la presencia de inmunoglobulinas IgG contra la proteína Cry11Aa, se realizó un ELISA indirecto (ELISAI) para evaluar la cinética de formación de dichos anticuerpos. Como primer paso, se procedió a la estandarización del ensayo en busca de las condiciones óptimas que permitieran catalogar resultados positivos y negativos. En este tipo de ensayo, los aspectos más importantes a considerar son: primero, que haya suficiente antígeno disponible que se una al anticuerpo primario, buscando siempre que la cantidad no sobrepase los lugares de unión disponibles en los pozos de la placa de ELISA. Segundo, obtener las

concentraciones óptimas de conjugado para evitar interacciones inespecíficas y que permita detectar todas las moléculas de anticuerpo primario unidas para lograr la sensibilidad analítica requerida (Crowther, 2001).

En este contexto, se probaron diferentes soluciones de conjugado (1/10.000, 1/25.000 y 1/50.000), frente a sucesivas diluciones de sueros (1/100, 1/200 y 1/400) en placas tapizadas con antígeno a dos concentraciones (1 µg/mL y 2 µg/mL). En la figura 17 se pudo observar que con las diluciones de conjugado 1/10.000 y 1/25.000, hubo saturación del sistema, lo cual fue evidenciado por los altos valores de D.O. (450nm) del suero negativo (Crowther, 2001). Este mismo resultado se evidenció al emplear la dilución del conjugado 1/50.000 y los sueros 1/100, debido, posiblemente, a un exceso en la cantidad de anticuerpos primarios que originó interacciones inespecíficas con el conjugado. Tomando en cuenta que las condiciones óptimas son aquellas que producen la menor reacción inespecífica, es decir, el menor color de fondo o *background*, con muestras negativas e implican una clara distinción de las muestras positivas, visualizado por las altas lecturas de D.O., se pudo concluir que la mejor condición a emplear en el sistema fue de 2 µg/mL de proteína purificada, suero diluido 1/400 y conjugado 1/50.000 (figura 17, b). Otra forma de evidenciar estos resultados fue calculando la “proporción de unión” (Brs, por el inglés *binding ratios*), donde se obtuvo que el suero positivo tuvo una lectura 30 veces mayor que el suero negativo (figura 18).

Por otra parte, el sustrato utilizado en el ELISA también es un parámetro a tomar en cuenta durante el proceso de estandarización. En este caso, se empleó el sustrato 3,3 5-bis-tetrametilbenzidina (TMB) que es el recomendado cuando se utilizan proteínas purificadas como antígeno, por su elevada sensibilidad (Reyna *et al.*, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos con los controles, se evidenció que no hubo interacciones inespecíficas entre el conjugado y la proteína. Además, se corroboró que el bloqueo del pozo fue eficaz al impedir la adhesión inespecífica del conjugado a la placa. De esta manera, estos resultados demuestran que la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos en el ensayo es baja. Por otra parte, el buen funcionamiento del sistema fue corroborado al evidenciar la reacción del conjugado con los anticuerpos adheridos a la placa.

Una vez conocidas las concentraciones óptimas para el ELISAI, se procedió a realizar la cinética de formación de anticuerpos del tipo IgG contra la proteína Cry11Aa (figura 19). Para esto, se evaluaron todos los sueros obtenidos durante el curso de las inmunizaciones.

En los resultados mostrados en la figura 19 se observó un periodo de latencia entre la primera inmunización y la generación de anticuerpos del tipo IgG. Esto se debe a que una vez que el antígeno entra en contacto por vez primera con el receptor de células B, los primeros anticuerpos producidos son del tipo IgM, que pueden expresarse sin cambios de clase (o isotipos) debido a que su formación no involucra la recombinación irreversible del DNA (Murphy *et al.*, 2009).

La exposición repetida a un mismo inmunógeno genera la producción de otros tipos de anticuerpos (Murphy *et al.*, 2009). Para tal fin los adyuvantes juegan un papel importante ya que previenen la rápida dispersión del antígeno y, a la vez, contienen sustancias que estimulan el reclutamiento de macrófagos en el sitio del depósito de antígeno y aumenta la tasa local de fagocitosis (Morris *et al.*, 1999). De esta manera, a partir de los 7 días después de la primera inmunización se pudo observar el aumento en el título de anticuerpos IgG anti-Cry11Aa en los sueros (figura 19), que llegó a su máximo a los 21 días y luego se mantuvo constante, producto de la generación de la memoria inmunológica (Roitt, 1989).

Por otra parte, al realizar el ensayo con el complejo espora-cristal como antígeno, se observó que las D.O._(450nm) medidas eran aproximadamente la mitad de lo obtenido con la proteína Cry11Aa purificada. Esto se debe a que al trabajar con un homogenato, la concentración de Cry11Aa es menor, en consecuencia, las interacciones antígeno-anticuerpo se reducen. En este contexto, ya que el ELISAI es una técnica cuantitativa que registra los resultados mediante lecturas de D.O. (Voller *et al.*, 1975), resultaría interesante evaluar la cantidad de proteína presente en un medio de cultivo (Wie *et al.*, 1982; Wie *et al.*, 1984; Takahashi *et al.*, 1998; Albright *et al.*, 2016).

Seguidamente, con el fin de estudiar la cinética de síntesis de los cristales parasporales de *Bt. var. israelensis* en un medio de cultivo, mediante la detección de la proteína Cry11Aa, se realizó un ensayo Dot Blot (figura 20).

Como primer paso, al igual que en el ensayo ELISAI, se evaluaron diversas diluciones de antígeno, suero y conjugado y se seleccionaron aquellas condiciones que permitieron una clara distinción entre resultados positivos y negativos. De esta manera, los parámetros empleados fueron 1 µL de antígeno, los sueros diluidos 1/200 y el conjugado 1/20.000.

Una vez estandarizadas las condiciones se prosiguió a realizar el seguimiento de la formación del cristal tomando muestras del cultivo a las 6, 15, 17, 18, 20, 24, 48 y 72 horas. Los resultados alcanzados no sólo mostraron el incremento del reconocimiento del suero por el cristal en el transcurso del tiempo en el que se llevó a cabo el cultivo, sino que corroboraron los resultados obtenidos en la curva de crecimiento y la evaluación de la cinética de formación de los cristales mediante una electroforesis SDS-PAGE. De esta manera, se observó que a las primeras 15 horas, no hubo reconocimiento del suero hiperinmune por el antígeno. Esto concuerda con lo esperado, ya que según las evidencias encontradas en este trabajo y lo reportado en la

bibliografía, en las primeras horas de cultivo el tipo celular predominante son las células vegetativas (figuras 7 y 13) (Brazón, 1998; Alcina, 2016; Alvarado, 2016). A partir de las 17 horas se comienza a evidenciar un débil reconocimiento del suero por la proteína Cry11Aa presente en cultivo de *Bt. var. israelensis*, que aumenta progresivamente hasta las 48 horas. Este resultado puede deberse a que en las primeras 17 horas hay una pocas esporas liberadas (Sarrafzadeh *et al.*, 2005). Con el transcurso del tiempo, el reconocimiento va aumentando, ya que las células no están sincronizadas (Madigan *et al.*, 2004), por lo cual, la formación de la espora y el cristal y su concomitante liberación en el medio depende netamente del estado fisiológico de la célula en cuestión. De esta manera, se observa que a las 24 horas ya hay un fuerte reconocimiento, que llega a su máximo a las 48 horas, tiempo en el cual el cultivo bacteriano se encuentra totalmente lisado, como es posible observar en los resultados mostrados en las figuras 7 y 13 (Chilcott *et al.*, 1983; Federici *et al.*, 1990; y Sarrafzadeh *et al.*, 2005). Por esta razón, se podría inferir que el incremento del reconocimiento del suero por el antígeno está relacionado con la cantidad de proteína Cry11Aa presente en el medio.

Por otra parte, al probar el suero preinmune no se observó reconocimiento por ninguno de los dos antígenos empleados (Cry11Aa purificada y el CEC), lo cual concuerda con lo obtenido anteriormente en el Dot Blot realizado para la verificación de la respuesta inmune (figura 16), así como en el ELISAI (figura 19).

Adicionalmente, los resultados alcanzados se asemejan a lo obtenido por Andrews y colaboradores (1980) quienes realizaron ensayos de inmunodifusión para determinar la presencia de los cristales parasporales de *Bt. var. kurstaki* en medios de cultivo. Similares resultados encontraron Carareto y Lemos (2000) y Alcina (2016), quienes evaluaron la detección de δ -

endotoxinas de *Bt. var. israeliensis* y *Bt. var. kurstaki*, respectivamente, en medios de cultivo mediante ensayos Dot Blot, logrando resultados satisfactorios.

Por otra parte, dadas las evidencias encontradas en este trabajo, se confirmó que la proteína Cry11Aa es un buen inmunógeno, ya que generó una respuesta inmune satisfactoria evidenciada por un fuerte reconocimiento de los anticuerpos por la proteína presente en el cultivo, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el estudio *in sílico*. Así mismo, estos hallazgos se asemejan a lo reportado por Alcina (2016) quien al emplear baja cantidad de la proteína Cry1Aa de *Bt. var. kurstaki* como inmunógeno (100 µg por inmunización) obtuvo altos títulos de anticuerpos. A diferencia, otras investigaciones han requerido altas concentraciones de toxinas de *Bt.* (hasta 2,4 mg por inmunización), en la generación de la respuesta inmune (Krywienczyk y Angus, 1965; Andrews *et al.*, 1980; Takahashy *et al.*, 1998; Carareto y Alves, 2000). Estas discrepancias en los resultados obtenidos por los diferentes autores puede deberse a que la producción de anticuerpos contra un antígeno particular va a depender de una serie de factores como son la naturaleza de la proteína, el adyuvante empleado, el modelo experimental, la vía de inoculación, el número y frecuencia de inmunizaciones (Harlow y Lane, 1998).

Finalmente, se realizó un Western Blot con el objetivo de corroborar la especificidad de los anticuerpos producidos contra la proteína Cry11Aa presente en el complejo espora-cristal, ya que mediante esta técnica cualitativa se puede conocer, en una mezcla de proteínas, el peso molecular de aquellas que sólo sean reconocidas por el anticuerpo primario (Mahmood y Yang, 2012). Es así como en el carril 4 de la figura 21, se evidenció que el suero hiperinmune reconoció la banda de 72 kDa correspondiente a la proteína Cry11Aa, al igual que una banda de aproximadamente 200 kDa, que posiblemente sea producto de la oligomerización de la proteína Cry11Aa (Muñoz *et al.*, 2009). De esta manera, los resultados demuestran que el principal

reconocimiento de los anticuerpos es hacia la proteína de 72 kDa (Cry11Aa) presente en el complejo espora-cristal de *Bt. var. israelensis*.

Ahora bien, al incubar el complejo espora-cristal con el suero preinmune no se observó reconocimiento hacia ninguna de las proteínas presentes en la muestra, lo cual corrobora la especificidad a la proteína en coincidencia con los resultados obtenidos en ensayos anteriores.

Por otra parte, la proteína Cry11Aa purificada fue enfrentada tanto al suero preinmune como al suero hiperinmune, observando únicamente reconocimiento de este último por la banda de 72 kDa (Cry11Aa) y dos bandas entre 40 y 30 kDa, correspondientes a los productos proteolíticos de la proteína, los cuales han sido también visualizados por Pfannenstiel y colaboradores (1986) y Oestergaard y colaboradores (2007). Es importante señalar que posiblemente, estas bandas no se evidenciaron al someter el complejo espora-cristal al suero hiperinmune, ya que al realizar la electrotransferencia, se emplearon muestras frescas del cultivo de *Bt. var. israelensis* que no fueron solubilizadas con tratamientos alcalinos.

Adicionalmente, se empleó un cultivo en fase estacionaria de *B. cereus*, que fue incubado con los sueros positivo y negativo. En ambos casos, no hubo reconocimiento, es decir, que los conejos no presentaron anticuerpos contra las proteínas vegetativas ni de la espora de *B. cereus*.

Los resultados alcanzados en este trabajo demuestran que es posible purificar proteínas de forma rápida y confiable a través del método de electroelución para ser empleadas como antígeno en inmunizaciones. Adicionalmente, se corroboró que el esquema de inmunización propuesto por Alcina (2016), permite el desarrollo de altos títulos de anticuerpos Anti-Cry11Aa, en modelo lepórico, sin requerir altas cantidades de antígeno.

Por otra parte, el suero hiperinmune obtenido fue útil para la detección y el seguimiento de las δ -endotoxinas de *Bt. var. israelensis* en el medio de cultivo empleado, mediante técnicas

inmunoquímicas. Estos resultados constituyen un importante aporte para llevar a cabo la evaluación de la producción de los cristales entomopatógenos en el desarrollo de procesos fermentativos relacionados con la producción de bioinsecticidas con base en *Bacillus thuringiensis*. De esta manera, al emplear la técnica Dot Blot, se reducen los tiempos de trabajo a aproximadamente 5 horas, a diferencia de los bioensayos que requieren de 4 a 11 días. Aunado a esto, no se precisan de esquemas de purificación porque el método es específico para la proteína Cry11Aa, aún en presencia de células vegetativas y otras proteínas que conforman al cultivo.

CONCLUSIONES

- Este trabajo de investigación aporta un método práctico y eficiente para el enriquecimiento de la δ -endotoxina Cry11Aa a partir de la fracción soluble del complejo espora-cristal, obtenida en condiciones alcalinas y reducidas de *Bt. var. israelensis*, mediante su separación por electroforesis (SDS-PAGE) y posterior electroelución.
- La inmunización con la δ -endotoxina Cry11Aa (subcutáneo, 100 μ g/inmunización, 3 dosis/21 días) en modelo lepórico permitió generar un suero policlonal específico contra la proteína.
- Los anticuerpos generados contra la proteína Cry11Aa constituye una herramienta rápida y sencilla para evaluar la cinética de formación de los cristales parasporales de *Bt. var. israelensis*, a través del reconocimiento específico de la δ -endotoxina presente en el complejo espora-cristal mediante Dot Blot.

RECOMENDACIONES

- Debido a la rápida degradación de las proteínas que conforman al cristal parasporal, se recomienda el almacenamiento del mismo a -80 °C.
- Se debe mantener un banco de punciones o cuñas para el trabajo con las bacterias ya que los repiques consecutivos generan la pérdida parcial o total de las δ -endotoxinas principalmente de las proteínas Cry4B.
- Antes de emplear un animal de experimentación, se recomienda realizar las pruebas pertinentes para descartar previa exposición a la bacteria *Bt. var. israelensis*.
- Se recomienda para las investigaciones referidas al estudio de las proteínas que componen el cristal parasporal, el empleo de cultivos sólidos, pues disminuye la degradación de las proteínas. Así mismo, se recomienda usar inhibidores de proteasas al trabajar tanto con cultivos líquidos como sólidos para poder preservar por un mayor tiempo la muestra sin que se degrade.
- Próximos estudios podrían incluir la purificación y cuantificación de las δ -endotoxinas, con el fin de aproximar mediante un ensayo ELISA la cantidad de toxinas presente en el cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrela, I.F. 2018. Los mosquitos (Diptera: Culicidae) y su importancia en Venezuela. *Saber* **30**: 14-36
- Albright, V.C., Hellmich, R., Coats, J.R. 2016. A review of Cry protein detection with enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem.* **64**:11 2175-2189.
- Alcina, M. 2016. Diseño de una prueba que permita detectar la presencia de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* variedad *kurstaki* en un medio de cultivo. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Alvarado, I. 2016. Producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* usando subproductos agroindustriales de bajo costo y alta disponibilidad en Venezuela. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Andrews, R.E., Iandolo, J.J., Campbell, B.S., Davidson, L.I., Bulla, L.A. 1980. Rocket immunoelectrophoresis of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:5 897-900.
- Ang, B.J., Nickerson, K.W. 1978. Purification of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* by zonal gradient centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**:4 625-626.
- Angsuthanasombat, C., Uawithya, P., Leetachewa, S., Pornwiroon, W., Ounjai, P., Kerdcharoen, T., Katzenmeier, G., Panyim, S. 2004. *Bacillus thuringiensis* Cry4A and Cry4B mosquito-larvicidal proteins: Homology-based 3D model and implications for toxin activity. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**:3 304-313.

- Angus, T. 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature* **173**: 545-546.
- Angus, T.A. 1959. Separation of bacterial spores and parasporal bodies with fluorocarbon. *J. Insect. Pathol.* **1**: 97-98.
- Arcas, J., Yantorno, O., Arrarás, E., Ertola, R. 1984. A new medium for growth and delta-endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* **6:8** 495-500.
- Armstrong, J.L., Rohrmann, G.F., Beaudreau, G.S. 1985. Delta Endotoxin of *Bacillusthuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **161:1** 39-46.
- Aronson, A. 2002. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol. Life Sci.* **59**: 417-425.
- Aronson, A.I., Tyrell, D.J., Fitz-James, P.C., Bulla, L. 1982. Relationship of the syntheses of spore coat protein and parasporal crystal protein in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* **151:1** 399-410.
- Avignone-Rossa, C., Arcas, J., Mignone, C. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and δ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 301-304.
- Avignone-Rossa, C., Mignone, C. 1995. *Bacillus thuringiensis* growth and toxicity: Basic and applied considerations. *Mol. Biotechnol.* **4**: 55-71.
- Ben-Dov, E. 2014. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins* **6**: 1222-1243.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* **348:2** 363-382.

- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, C., Lescar, J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *J. Bacteriol.* **188:9** 3391-3401.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7:72** 248-254.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cys toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49:** 423-435.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2005. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. Pág. 6, 175-206 pp. En: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier BV.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41:** 423-431.
- Brazón, J. 1998. Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* con base en subproductos agroindustriales de bajo costo. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Bukhari, D.A., Zahid, N., Shakoori, A.R. 2013. Molecular characterization of *cry4b* gene from a local isolate of *Bacillus thuringiensis* encoding 70 kDa crystal protein. *Pakistan j. Zool.* **45:3** 779-791.
- Bulla, L.A., Bechtel, D.B., Kramer, K.J., Shethna, Y.I. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **8:**2147-204.

- Burton, S.L., Ellar, D.J., Li, J., Derbyshire. 1999. N-acetylgalactosamine on the putative insect receptor aminopeptidase N is recognised by a site on the domain II lectin-like fold of a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin. *J. Mol. Biol.* **287**: 1011-1022.
- Cantón, P.E., Reyes, E.Z., Ruiz, I., Bravo, A., Soberón, M. 2011. Binding of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role synergism. *Peptides* **32**: 595-600.
- Carareto, L.M., Lemos, M.V. 2000. Methodology for fast evaluation of *Bacillus thuringiensis* crystal protein content. *Braz. J. Microbiol.* **31**: 216-219.
- Carlson, C.R., Caugan, D.A., KolstØ, A.-B. 1994. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:6 1719-1725.
- Conn, M., Janovick, J.A. 2006. Rescate de proteínas aberrantes. *Investigación y Ciencia.* **1**: 46-55.
- Couche, G.A., Pfannenstiel, M.A., Nickerson, K.W. 1987. Structural disulfide bonds in the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Protein Crystal. *J. Bacteriol.* **169**: 3281-3288.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Var Rie, J., Lereclus, D., Bauem, J. y colaboradores. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:3 807-813.
- Crowther, J.R. 2000. The Elisa Guidebook. Nueva Jersey, Estados Unidos: Humana Press.
- Challacombe, J.F., Altherr, M.R., Xie, G., Bhotika, S., Brown, N., Bruce, D., Campbell, C. y colaboradores. 2007. Genome Announcement. *J. Bacteriol.* **189**:9 3680-3681.
- Chen, J., Aimanova, K.G., Fernandez, L.E., Bravo, A., Soberón, M., Gill, S.S. 2009. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. J.* **424**: 191-200.

- Chilcott, C.N., Ellar, D.J. 1988. Comparative toxicity of *Bacillusthuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins in vivo and in vitro. *J Gen Microbiol.* **134:9** 2551-2558.
- Chow, E., Singh, G.J.P., Gill, S.S. 1989. Binding and aggregation of the 25 kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino modifiers. *Appl. Enviro. Microbiol.* **55:** 2779-2788.
- de Barros, H; Neves, M.H. 2016. Interaction of *Bacillusthuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedesaegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. *FEMS Microbiol lett* **266:** 163-169.
- de Maagda, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends. Genet.***17:4** 193-199.
- Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A., Fontenille, D. 2009. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *J. Med. Entomol.* **46:1** 33-41.
- Delécluse, A., Rosso, M-L., Ragni, A. 1995. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Jegathesan* encoding a highly mosquitoidal protein. *Appl. Enviro. Microbiol.* **61:12** 4230-4235.
- Delgado, N. 2005. Factores que afectan la eficiencia y persistencia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sobre *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae), vector de malaria en Venezuela. *Entomotropica* **20:3** 213-233.
- Denovan, W.P., Dankocsik, C., Gilbert, M.P. 1988. Molecular characterization of a gene encoding a 72-kilodalton mosquito-toxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* **10:** 4732-4738.

- Devine, G.J., Furlong, M. 2007. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agric. Human Values*. **24**: 281-306
- Doyle, R.J., Nedjat-Haiem, F., Singh, J.S. 1984. Hydrophobic characteristics of *Bacillus* spores. *Curr. Microbiol.* **10**: 329-332.
- Dulmage, H.T. 1970a. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**: 232-239.
- Dulmage, H.T. 1970b. Production of the spore d-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. *J. Invertebr. Pathol.* **16**: 385-389.
- Dulmage, H.T., Correa, J.A., Martinez, A.J. 1970a. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**: 15-20.
- Engvall, E. y Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:9 871-874.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**: 117-126.
- Fast, P.G. y Miller. 1979. *Bacillus thuringiensis* parasporal toxin: dissolution of crystals with retention of toxicity *J. Invert.Pathol.***34**: 319
- Fast, P.G.1972. The δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* III. A rapid method for separating parasporal bodies from spores. *J. Invertbr. Pathol.* **20**: 139:140.
- Federici, B.A., Lüthy, P., Ibarra, J.E. 1990. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: structure, protein composition and toxicity. Pág. 3. En: H. de Barjac *et al.* (eds.), Bacterian control of mosquitoes and black flies. Rutgers University Press.

- Federici, B.A., Park, H.-W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C., Johnson, J.J. 2003. Recombinant Bacteria for Mosquito Control. *J. Exp. Biol.* **206**: 3877–3885
- Fernández, L., Pérez, C., Segovia, L., Rodríguez, M., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M. 2005. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop 8 of domain II. *Febs letters.* **579**: 3508-3514.
- Foster, W.A., Walker, E.D. 2009. Mosquitoes (Culicidae). En: MULLEN GR, Durden LA (Eds). Medical and veterinary entomology. Second edition. Academic Press Elsevier, San Diego, USA, pp. 207-260.
- Gajardo, R. 2017. Aislamiento y caracterización de microorganismos entomopatógenos y su empleo como agentes de biocontrol de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae). Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En: Walker, J.M., Ed., The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 571-607.
- Georghiou, G.P., Wirth, M.C., Delécluse, A., Klier, A. 1993. Potentiality for development of resistance to single vs. Multiple toxins of *Bacillus* by mosquitoes, abstr. L68. En Proceedings of the VIIth International Conference on *Bacillus*, Paris, Francia.
- Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* **37**: 615-636.
- Gillis, A. 2013. El arsenal de *Bacillus thuringiensis*: su uso en manejos agrícolas y en la industria alimentaria. *Entomotropica* **28**: 106-107.

- Goldberg, J., Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles gambiae*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* **37**: 355-358.
- Gómez, I., Arenas, I., Benitez, I., Miranda, J., Becerril, B., Grande, R., Almagro, J.C., Bravo, A., Soberón, M. 2006. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem* **281**:45 34032-34039.
- González, J.M., Carlton, B. 1984. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. *Plasmid* **11**: 28-38.
- Griffiths, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S. y colaboradores. 2005. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**: 922-925.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.-L., Brousseau, R., Cygler, M. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* **254**: 447-464.
- Guevara, I. 2016. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* obtenidas de muestras de suelo de alta montaña. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela.
- Hannay, C.L. 1953. Crystalline inclusion in aerobic sporeforming bacteria. *Nature* **172**:4387 1004
- Harbach, R.E. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*. **1668**: 591-638.

- Hardy, E., Castellano, L. 2002. Precipitación selectiva de imidazolato de zinc: aplicación a la detección de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y glicolípidos bacterianos separados en geles de poliacrilamida. *Biotechn. Apl.* **19**: 41-47.
- Harlow, E., y Lane, D. 1998. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Nueva York, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Helganson, E., Økstad, O., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I., Kolstø, A. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:6 2627-2630.
- Herbert, B. 1999. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**: 660-663.
- Herbert, B.R., Molloy, M.P., Gooley, A.A., Walsh, B.J., Bryson, W.G., Williams, K.L. 1998. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*. **19**:5 845-851.
- Höfte, H., Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**:2 242-255.
- Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M.A., Adang, M.J. 2008. *Anopheles gambiae* cadherin binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* **47**:18 5101-5110.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., Bulla, L.A. 2010. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioeng. Bugs.* **1**:1 31-50.
- Insell, J.P., Fitz-James, P.C. 1985. Composition and toxicity of the inclusión of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Ap. Env. Microbiol.* **50**:1 56-62.

- Ishiwata, S. 1905. About “sottokin”, a bacillus of disease of the silkworm. *Dainihon Sanshi Kaiho* (Reporte de la Asociación Sericultural de Japón). **161**:1-5.
- Jacobs, E., y Clad, A. 1986. Electroelution of fixed and stained membrane proteins from preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels into a membrane trap. *Anal. Biochem.* **154**: 583-589.
- Jespern, M.C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P. 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res.* **3:45 (W1)**: W24-W29.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). Kuby immunology. Macmillan.
- Kolstø, A., y Carlson, C. 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. *J. Bacteriol.* **175**: 1053–1060.
- Konigsberg, W. 1972. Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. *Methods Enzymol.* **25**: 185-188.
- Kringelum, J.V., Nielsen, M., Padkjær, S.B., Lund O. 2013. Structural analysis of B-cell epitopes in antibody: protein complexes. *Mol. Immunol.* **53:1-2** 24-34.
- Krywienczyk, J., Angus, T.A. 1960. A serological comparison of the parasporal bodies of three insect pathogens. *J. Insect Pathol.* **2**: 411- 417.
- Krywienczyk, J., Angus, T.A. 1965. Serological studies of the protein parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* var. *sotto* Ishiwata. *J. Invert. Pathol.* **7**: 175-179.
- Kyte, J., Doolittle, R. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.

- Lacey, L. A. 2016. Entomopathogens used as microbial control agents. En: Lacey, L. A. (eds.). Microbial control of insect and mite pests: From theory to practice. Academic Press, Inc.
- Laemmli, K. 1972. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, C., Levin, A., Branton, D. 1987. Cooper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* **166**: 308-312.
- Li, J., Carroll, J., Ellar, D. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*. **353**: 815-821.
- Lin, D., Yao, S., Mei, L., Zhu, Z. 2003. Collection and purification of parasporal crystal from *Bacillus thuringiensis* by aqueous two-phase extraction. *Sep. Sci. Technol.* **38**:7 1665-1680.
- Lounibos, P., Campos, R.E. 2002. Investigaciones recientes sobre *Toxorhynchites rutilus* (Diptera: Culicidae) con referencia al control biológico de mosquitos habitantes en recipientes. *Entomotropica*. **17**:2 145-156.
- Madigan, M., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. 10 Ed. Madrid. España: Pearson Education.
- Mahmood, T., Yang, P.C. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* **4**:9 429-434.
- Malik, K., y Riazuddin, S. 2006. Immunoassay-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins, entomocidal to cotton aphids (*aphis gossypii*) and whiteflies (*bemisia tabaci*). *Pakistan J. Bot.* **38**:3 757-765.
- Martínez, M.T., Fierros, L.M. 2017. Efectos inmunológicos y adyuvantes de las proteínas Cry1A. *REB.* **36**:4 118-128.

- Morris, O.N., Converse, V., Kanagaratnam, P., Davies, J.S. 1996. Effect of cultural conditions on spore-crystal yield and toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (HD133). *J. Invertebr. Pathol.* **67**: 129-136.
- Morse, R.J., Yamamoto, T., Stroud, R.M. 2001. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure.* **9**: 409-417.
- Mounsef, J. R., Salameh, D., Awad, M. K., Chamy, L., Brandam, L., y Lteif, R. 2014. A simple method for the separation of *Bacillus thuringiensis* spores and crystals. *J. Microbiol. Methods* **107**: 147:149.
- Müller-Esterl, W. 2008. Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Barcelona. España: Reverté.
- Muñoz, C., Rodríguez, C., Aguilar, J.N., Portugal, L., Gómez, I., Saab, G., Soberón, M., Bravo, A. 2009. Oligomerization of Cry11Aa from *Bacillus thuringiensis* has an important role in toxicity against *Aedes aegypti*. *Appl. Enviro. Microbiol.* **75**:23 7548-7550.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2009. Inmunobiología de Janeway. Mexico D.F.: McGraw Hill.
- Murray, E.D. 1996. A simplified purification technique for parasporal inclusions from certain varieties of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **8**:3 418-420.
- Murty, M.G., Srinivas, G., Bora, R. S., Sekar, V. 1994. A simple method for separation of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* using carboxymethyl cellulose column chromatography. *J. Microbiol. Methods*, **19**:2 103:110.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2009. Lehninger: Principios de bioquímica. 5ta Ed. Barcelona. España: Omega.

- Nickerson, K.W., Bulla, L.A. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insect: minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **28:1** 124-128.
- Oestergaard, J., Voss, S., Lange, H., Lemke, H., Strauch, O., Ehlers, R-U. 2007. Quality control of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* products base don toxin quantification with monoclonal antibodies. *Biocontrol Sci. Techn.* **17:3** 295-302.
- Orduz, S., Diaz, T., Restrepo, N., Patiño, M.M., Tamayo, M. 1996. Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91:2** 231-237.
- Orduz, S., Rojas, W., Correa, M.M., Montoya, A.E., de Barjac, H. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **59:** 99-103.
- Osman, G.E.H., Already, R., Assaeedi, A.S.A., Organji, S.R., El-Ghareeb, D., Abulreesh, H.H., Althubiani, A.S. 2015. Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* comprehensive reviuw. *Egypt J. Biol. Pest Control.* **25:1** 271-288.
- Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A. 2012. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* **37:13-22**.
- Pearson, D., Ward, O.P. 1988. Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.* **10:7** 451-456.

- Peng, Z., Beckett, A.N., Engler, R.J., Hoffman, D.R., Ott, N.L., Simons, F.E. 2004. Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114:5** 1189-1194.
- Peñalver, C. 2005. Producción de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* variedad kurstaki. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Pfannenstiel, M.A., Couche, G., Ross, E.J. 1986. Immunological relationships among proteins making up of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* crystalline toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **52:4** 644-649.
- Rabilloud, T. (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis.* **17:** 813-829.
- Ragni, A., Thiéry, I., Delécluse, A. 1996 Characterization of six highly mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strains that do not belong to H-14 serotype. *Curr. Microbiol.* **32:1** 48-54.
- Rao, C.D., Shethna, Y.I. 1980. A simple technique for purification of the parasporal crystal (δ -endotoxin) of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Indian Inst. Sci.* **62:** 1-11.
- Reguero, M.T., Cerón, J., Uribe, D., Mora, C., Amaya, L.D. 1994. Obtención y caracterización de anticuerpos policlonales contra endotoxinas con actividad bioinsecticida Cry I, Cry III y Cry IV, asociadas al cristal de tres cepas patrón de *Bacillus thuringiensis*. *Rev. colomb. cienc. quim. farm.* **22:** 31-36.
- Restrepo M., José, Angel S., D., Prager M., M. 2000. Agroecología. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (CEDAF). Santo Domingo, República Dominicana.
- Revina, L.P., Kostina, L.I., Ganishkina, L.A., Mikhailova, A.L., Zalumin, I.A., Chestukhina. 2004. Reconstruction of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry11Aa endotoxin from

fragments corresponding to its N- and C- moieties restores its original biological activity. *Biochemistry*. **69:2** 181-187.

- Reyna, A., Eleizalde, M., y Silva, A. 2007. Assessment of Chromogen suitability in ELISA for the detection of Anaplasmosis and Trypanosomosis. *J Immunoassay Immunochem*. **28:11-11**.
- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H. 2007 *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol*. **17:4** 547-559.
- Roitt, I. 1989. Inmunología Esencial. Barcelona. España: JIMS SA
- Rowe, G.E., Margaritis, A. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Biotechnol*. **6:1** 87-121.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotech. J*. **9:3** 283-300.
- Sarrafzadeh, M.h., Guiraud, J.P., Lagneau, C., Gaven, B., Carron, A., Navarro, J-M. 2005. Growth, sporulation, α -endotoxin synthesis and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14. *Curr. Microbiol*. **51**: 75-81.
- Sauka, D.H., Benintende, G.B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. Microbiol*. **40**: 124-140.
- Schaefer, C., Rost, B. 2012. Predict impact of single amino acid change upon protein structure. *BMC Genomics*. **13:4** S4.

- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62:3** 775-806.
- Serafini, A.L., de Barros, M.N., de Azevedo, L.J. 2001. Biotecnologia na agricultura e na agroindustria. Livraria e Editora Agropecuária. Guaíba, Brasil.
- Sharpe, E.S., Herman, A.I., Toolan, S.C. 1978. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* by flotation. *J. Invertebr. Pathol.* **34**: 315:216.
- Sharpe, E.S., Nickerson, K.W., Bulla, L.A. 1975. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents. **30:6** 1052-1053.
- Smith, R.A., Ulrich, J.T. 1983. Enzyme-linked immunoabsorbent assay for quantitative detection of *Bacillus thuringiensis* crystal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **45:2** 586-590.
- Sneath, P. 1986. Spore forming gram-positive rods and cocci. En: Butler J, editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, p. 1104-207.
- Takahashi, Y., Hori, H., Furuno, H., Kawano, T., Takahashi, M., Wada, Y. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assays for rapid and quantitative detection of insecticidal crystal proteins of *Bt* pesticides. *J. Pestic. Sci.* **23**: 386-391.
- Tanada, Y. y Kaya, H.. 1993. Insect Pathology. Academic Press, Inc., Primera Edición, San Diego, California, E.U.A.
- Thomas, W.E., Ellar, D.J. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell Sci.* **60**: 181-197.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4354.

- Tyrell, D., Bulla, L.A., Andrews, R.E., Kramer, K.J., Davidson, L.I., Nordin, P. 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Bacteriol.* **145:2** 1052-1062.
- Vadlamudi, R. K., Weber, E., Ji, I., Bulla, T. H., Bulla, L. A. 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**: 5490-5494.
- Vilas-Bôas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, O.M.N. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **53**: 673-687.
- Voller, A., Draper, C., Bidwell, D., Barlett, A. 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas disease. *The Lancet* 426-428.
- Wie, S.I., Andrews, R.E., Hammock, B.D., Faust, R.M., Bulla, L.A. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection and quantification of the entomocidal parasporal crystalline protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43:4** 891-894.
- Wie, S.I., Hammock, B.D., Gill, S.S., Grate, E., Andrews, R.E., Faust, R.M., Bulla, L.A. 1984. An improved enzyme-linked immunoassay for the detection and quantification of the entomocidal parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Appl. Bacteriol.* **57**: 447-454.
- Wilkerson, R.C, Linton, Y.M., Fonseca, D.M., Schultz, T.R., Price, D.C., Strickman, D.A. 2015. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS ONE*. **10:7** e0133602.
- World Health Organisation (WHO). 1990. Public health impact of pesticides used in agricultura. Geneva, Suiza.

- Yamagiwa, M., Esaki, M., Otake, K., Inagaki, M., Komano, T., Amachi, T., Sakai, H. 1999. Active process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Enviro. Microbiol.* **65:8** 3464-3469.
- Yamagiwa, M., Ogawa, R., Yasuda, K., Natsuyawa, H., Sen, K., Sakai, H. 2002. Active form of dipteran-specific insecticidal protein Cry11A produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **66:3** 516-522.
- Zghal, R.Z., Tounsi, S., Jaoua. 2006. Characterization of a *cry4Ba*-type gene of *Bacillus thuringiensis israelensis* and evidence of the synergistic larvicidal activity of its encoded protein with Cry2A δ -endotoxin of *B. thuringiensis kurstaki* on *Culex pipiens* (common house mosquito). *Biotechnol. Appl. Biochem.* **44:** 19-25.
- Zhang, R., Hua, G., Andacht, T.M., Adang, M.J. 2008. A106-kDa aminopeptidase is a putative receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* **47:** 11263–11272.
- Zhang, W., Crickmore, N., George, Z., Xiu, L., He, Y., Li, Y., Tang, J., Tian, L., Wang, X., Fang, X. 2012. Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillus thuringiensis* – an alternative to *Bti*? *J. Inverte. Pathol.* **109:** 217-222.
- Zhu, Z.S., Ken, C., Brooke, A., Filner, P. 1989. Separation of protein crystals from spores of *Bacillus thuringiensis* by Ludox gradient centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:5** 1279:1281.

CONSULTAS EN LINEA

- El Nacional (2018). OMS: Venezuela registra el mayor incremento de casos de malaria en el mundo. (Consultado: enero 2018) http://www.el-nacional.com/noticias/crisis-humanitaria/oms-venezuela-registra-mayor-incremento-casos-malaria-mundo_232213
- Forsström, B., Bislawska, B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A., Uhlen, M. 2015. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*. **10:3** (Consultado: abril de 2019) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4376703/>!po=78.1250”
- GIDOLQUIM (2014). Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (TELQ). Tema 4: el proceso de liofilización. Universidad de Barcelona, España. (Consultado: enero 2019) <http://www.ub.edu/talq/es/node/261>
- Haney, P., Herting, K., Smith, S. 2013. Separation Characteristics of Dialysis Membranes. Thermo Fisher: Protein Biology Application Notes. (Consultado: noviembre de 2018) <https://www.thermofisher.com/ve/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/separation-characteristics-dialysis-membranes.html>
- Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias [MPPCTII] y Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación [FONACIT] (2008). Código de bioética y de bioseguridad. Tercera ed. (Consulta: octubre 2018). http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/biolanimlab/archivos/codigo_fonacit_2008.pdf

- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2017a). Respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030. (Consulta: enero 2018).
http://www.who.int/malaria/areas/vector_control/Draft-WHO-GVCR-2017-2030-esp.pdf
- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2017b). Informe mundial sobre el paludismo. (Consultado: enero 2018). <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/report/es/>
- Organización Mundial de la Salud [OMS] (2017c). Dengue y dengue grave. Nota descriptiva: Abril de 2017. (Consultado: enero 2018)
<http://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>
- Soberón, M.; Bravo, A. 2000. Cap. 12: *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. En: Microbios. Martínez, E y Martínez, J. (Eds.). (Consulta: octubre de 2006).
<http://biblioweb.mx/microbios/Cap12>
- Torres A. (2018). Invasión de mosquitos, Venezuela sufre sus siete plagas. Revista Climax. (Consultado: enero 2018) <http://elestimulo.com/climax/invasion-de-mosquitos-venezuela-sufre-sus-siete-plagas/>