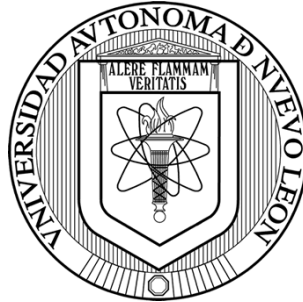


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Modulación de la Inmunidad innata del Lepidóptero plaga *Trichoplusia ni*
(Hübner) expuesto a *Bacillus thuringiensis***

Que PRESENTA

M. C. JOSÉ ALBERTO VALADÉZ LIRA

**Como opción para obtener el grado de Doctor en Ciencias con
especialidad en Microbiología**

Cd. Universitaria

Enero 2011

**Modulación de la Inmunidad innata del Lepidóptero Plaga *Trichoplusia ni*
(Hübner) Expuesto a *Bacillus thuringiensis***

COMITÉ DE TESIS

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Director de Tesis

Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales
Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDOS

SECCIÓN	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
NOMENCLATURA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	5
3.1 Objetivo general	6
3.2 Objetivos específicos	7
	8
4. ANTECEDENTES	
4.1 Inmunidad innata en insectos	8
4.1.2 Respuesta humoral de insectos	10
4.1.3 Reacciones celulares de insectos	12
4.2 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)	13
4.2.1 Péptidos antimicrobianos en insectos	18
4.2.2 Péptidos antimicrobianos en lepidópteros	21
4.3 Vías de señalización en inmunidad innata en insectos y mamíferos	25
4.3.1 Regulación genética de la inmunidad de insectos	28
4.4 Inmunosupresores	29
4.5 RNA de Interferencia en Insectos	30
4.6 Ficha técnica de <i>Trichoplusia ni</i>	32

4.7 Bacillus thuringiensis	33
4.7.1 Morfología de <i>Bt</i>	
4.7.2 Espectro de huéspedes de las proteínas Cry	36
4.7.3 Modo de acción de las proteínas insecticidas de <i>Bt</i>	37
4.7.4 Ingestión, solubilización y activación	38
4.7.5 Paso a través de la membrana peritrófica	39
4.7.6 Unión al receptor e inserción en la membrana	39
4.7.7 Formación del poro y lisis celular	39
4.7.8 Bases de la resistencia a <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
4.7.9 Resistencia de lepidópteros a <i>Bacillus thuringiensis</i>	41
	45
5. METODOLOGÍA	
5.1 Material Biológico	45
5.2 Método de infección con entomopatógenos	46
5.3 Obtención de especímenes a evaluar	47
5.4 Ensayo de fenoloxidasa	47
5.5 Inmunosupresores	48
5.6 Oligonucleótidos para la detección de transcritos	48
5.7 Extracción de RNA <i>T. ni.</i>	49
5.8 Síntesis de DNAC	50
5.9 Análisis de la expresión de genes involucradas en la inmunidad innata por PCR punto final.	50
5.10 RT-PCR en Tiempo Real	51
5.11 Método de análisis de muestras por PCR tiempo real	53
5.12 Producción y Purificación de RNA de interferencia	53
5.13 Administración del RNA de Interferencia y análisis de inhibición.	54
5.14 Análisis estadístico	54

6. RESULTADOS

6.1 Detección de Transcritos por RT-PCR	55
6.2 Análisis de la actividad de fenoloxidasa	56
6.3 Efecto de <i>Bt</i> sobre la actividad de Fenoloxidasa	57
6.4 Efecto de Inmunosupresores sobre Fenoloxidasa	58
6.5 Efecto del Inductor de fenoloxidasa <i>Micrococcus luteus</i> sobre <i>Trichoplusia ni</i>	60
6.6 Análisis transcripcional de <i>Trichoplusia ni</i> expuesto a <i>Bt</i> (Xentari)	61
6.7 Análisis transcripcional de <i>Trichoplusia ni</i> expuesto a <i>Bt</i> (Dipel)	63
6.8 Producción y efecto de dsRNA sobre <i>Trichoplusia ni</i>	64
6.9 Inhibición por dsRNA	65
6.10 Bloqueo de PGRP por dsRNA y su efecto en susceptibilidad a <i>Bt</i> .	66

67

7. DISCUSIÓN

73

8. CONCLUSIÓN

75

9. REFERENCIAS

81

RESUMEN CURRICULAR

LISTA DE TABLAS

I.	Agrupación de PAMs de acuerdo a su composición bioquímica y acción.	16
II.	Clasificación de las proteínas insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	37
III.	Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR en punto final.	49
IV.	Secuencias de Oligonucleotidos marcados con FAM (Sondas Taqman) utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR en tiempo real.	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Tipos de Hemocitos involucrados en la inmunidad de insectos	9
Figura 2.- Mecanismos de defensa en insectos.	9
Figura 3. - Regulación de la inmunidad innata en insectos y Activación de señales de transcripción mediado por distintos patógenos	10
Figura 4 - Señalización y activación de la melanización mediado por la actividad fenoloxidasa en <i>Manduca sexta</i>	11
Figura 5. Interacción y reconocimiento de moléculas de membrana, pared de eucariotas y procariotas mediante los péptidos antimicrobianos	15
Figura 6. Formación del poro por los péptidos antimicrobianos	16
Figura 7. Expresión de péptidos antimicrobianos en diferentes tipos de tejido en el estadio larvario de insectos	18
Figura 8. Familia de genes de artrópodos involucrados en la inmunidad innata	21
Figura 9. Foto de microscopio electrónico. Efecto de la cecropina en <i>Escherichia coli</i> .	22
Figura 10. Receptores involucrados en el reconocimiento de patógenos	26
Figura 11. Mecanismos transduccionales en la activación transcripcional de genes que codifican para reacciones involucradas en la defensa en insectos	27
Figura 12. Mecanismos de activación de genes de respuesta inmune en mamíferos e insectos y su homología en la transducción de señales	29
Figura.13. Mecanismo de RNA de interferencia	31
Figura 14.- Plaga principal de la col. A) Ciclo de vida del gusano falso medidor <i>Trichoplusia ni</i>	35
Figura 15. Morfología de espora y cristal de <i>Bt</i> .	36
Figura 16- Modo de acción de toxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	40
Figura 17. Plásmidos utilizados para clonación y producción de dsRNA	45
Figura 18. Detección por RT-PCR punto final de los transcritos que codifican para péptidos antimicrobianos	55
Figura 19. Niveles de fenoloxidasa en los distintos <i>estadios</i> de desarrollo de <i>Trichoplusia ni</i> .	56
Figura 20.- Niveles de Fenoloxidasa en dos colonias de <i>Trichoplusia ni</i> expuesta a <i>Bt</i> .	57
Figura 21.- Efecto de los niveles de fenoloxidasa cuando se expuso a inmunosupresores.	58
Figura 22. Efecto de los tratamientos con inmunosupresores y la exposición con <i>Bt</i>	59
Figura 23.- Efecto de de la exposición con <i>Bt</i> cuando se utilizo el inmunosupresor Ciclosporina A	59

Figura 24. Efecto del inductor <i>Micrococcus luteus</i> sobre <i>Trichoplusia ni</i> y su efecto a la exposición a <i>Bt</i> .	60
Figura 25. Frecuencia de detección de transcritos involucrados en la inmunidad innata en <i>Trichoplusia ni</i> expuesto a <i>Bt</i> (Xentari).	61
Figura 26. Análisis de transcritos involucrados en la inmunidad innata en <i>Trichoplusia ni</i> expuesto a <i>Bt</i> (Xentari).	62
Figura 27.- Análisis transcripcional por RT-PCR en Tiempo Real (Taqman), en tratamiento con <i>Bt</i> .	63
Figura 28.- Purificación de dsRNA por TriReagent (Ambion) producido en el vector L4440 regulado por la cepa HT115 de <i>E. coli</i>	64
Figura 29. Efecto de la ingestión de Bacteria HT115 expresando dsRNA específico del gen PGRP	65
Figura 30.- Porcentaje de sobrevivencia mediante el efecto de dsRNA-PGRP y su efecto con la exposición a <i>Bt</i>	66

NOMENCLATURA

ADNc	Ac. Desoxiribonucleico complementario
AcMNPV	Virus de Nucleopoliedrosis de <i>Autographa californica</i>
ARN	Acido ribonucleico
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grados centigrados
Cis	Cisteína
CIF	Factor inmunoresponsable de cecropia
CsA	Ciclosporina A
Ct	Ciclo Umbral
DEPC	dietil pirocarbonato
DIF	Factor inmunoresponsable relacionado a Dorsal
DNTP's	desoxinucleotidotrifosfato
DL₅₀	Dosis letal media
dsRNA	ARN de doble cadena
FAM	Fluoresceína
FO	Fenoloxidasa
GFP	Proteína verde fluorescente
h	horas
IL-1	Interleucina 1
IPTG	Isopropil tiogalactopiranosido
kDa	kilodalton
L-DOPA	L- Dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolisacáridos
µl	microlitros
µM	micromolar
min	minutos
mM	milimoles
MMLV	virus de la leucemia murina Moloney
mL	mililitros
NFκB	Factor Nuclear kappa Beta
ng	nanogramos
nm	nanomoles
PAMs	Péptidos antimicrobianos
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	potencial de hidrógeno
PGRP	Proteína de Reconocimiento d Peptidoglucanos
proFO	Profenoloxidasa
PRS5	Proteína Ribosomal S5
RISC	complejo de silenciamiento por ARN de interferencia
RNAi	ARN de Interferencia
Rpm	revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Reversa
seg	segundos
UI	Unidades Internacionales
2XYT	Medio 2X extracto de levadura-triptona

RESUMEN

El uso amplio de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) para el control de lepidópteros plaga de importancia económica en la agricultura se basa en que esta bacteria puede producir una o más endotoxinas, las cuales son responsables de los daños patológicos a nivel de intestino medio, pero existe poca información de la regulación de la respuesta inmune innata de insectos después de la exposición a *Bt*. En el presente trabajo nos propusimos estudiar el papel de la inmunidad innata en *Trichoplusia ni* después de la exposición a *Bt*, y determinar si la respuesta inmune está involucrada en las diferencias en susceptibilidad a *Bt*. Inicialmente se analizó la expresión de péptidos antimicrobianos (PAMs) por RT-PCR en tiempo real en larvas de *T. ni* expuestas a los bioinsecticidas a base de *Bt* Dipel® y Xentari®. Después se inhibió la activación de PAMs específicos por medio de ARN de interferencia (RNAi). Entre los resultados más notables encontramos que al exponer a *Bt* se disminuía la expresión de los PAMs atacina, defensina, cecropina, gallerimicina, gloverina, lebocina y lisozima; mientras que se sobreexpresaba el receptor de peptidoglucanos (PGRP). Después se produjo RNAi dirigido al transcrito PGRP en el vector L4440, introducido en la cepa HT115 de *Escherichia coli*. Posteriormente, se sometieron larvas neonatas a *Bt* combinado con el RNAi dirigido al gen PGRP y se encontró que cuando se inhibía este gen, se incrementaba la susceptibilidad a *Bt*. Poco se conoce del impacto que tienen los inmunosupresores en la respuesta inmune de *T. ni*. Para determinar su papel en la respuesta inmune de *T. ni*, se midió la producción de fenoloxidasa en la hemolinfa. Los resultados mostraron una disminución en los niveles de fenoloxidasa en relación al control cuando se sometía a inmunosupresores. Específicamente encontramos que al aplicar ciclosporina A o feniltiourea se incrementaba la susceptibilidad a *Bt*. Estos datos presentados pueden confirmar que la inmunidad innata de *T. ni* juega un papel importante en su relación con la susceptibilidad del hospedero a los bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (*Bt*) has been used worldwide for Lepidoptera biocontrol of agriculture important pests. *Bt* biocontrol potential relies on the ability to produce one or more endotoxins, which are responsible of Lepidoptera pathological midgut damage, leading in many cases to insect death. Regulation of the insect' innate immune response after *Bt* exposure needs is not fully understand. The aim of the present work was to study the regulation of *Trichoplusi ni* innate immune response after *Bt* exposure and to determine if immune response is involved in *T. ni* showing differences in susceptibility to *Bt*. We first analyzed antimicrobial peptides (AMPs) expression on Xentari® and Dipel® exposed *T. ni* larvae by using real time RT-PCR. Then we inhibit specific AMPs activation by using interference RNA (RNAi). Results showed that after *Bt* exposure, the attacine, defensine, cecropine, gallerimecine, gloverin, lebocine and lysozyme gene expression was diminished, whereas peptidoglycan receptor (PGRP) was over-expressed. RNAi directed to PGRP transcript was produced in L4440 vector, using the *Escherichia coli* HT115 strain. *T. ni* neonates were then exposed to this RNAi and we observed that, if PGRP gene was inhibited, susceptibility to *Bt* was increased. In order to study the role of immune-suppressors on *Bt* susceptibility, phenoloxidase (PO) production in *T. ni* hemolymph was evaluated. Results showed that PO production diminished after immune-suppressors exposure, compared with the unexposed control. Specifically, after cyclosporine A or phenylthiourea immune-suppressors application, *T. ni* susceptibility to *Bt* increased. Based on our results, we can conclude that *T. ni* innate immune response is regulated by and linked with *Bt* toxicity and susceptibility.

1. INTRODUCCIÓN

Las pérdidas en cultivos de interés económico ocasionadas por factores ambientales se ven incrementadas por la presencia de fitopatógenos e insectos plaga. El uso constante de insecticidas de origen químico y biológico (bacterias, hongos, nemátodos, protozoarios y virus entomopatógenos), ha ocasionado la aparición de poblaciones de insectos plaga resistentes; este fenómeno se ha presentado asimismo en la aplicación de los planes de manejo integrado de plagas debido a la disminución de susceptibilidad de las poblaciones de insectos a la infección por organismos entomopatógenos utilizados como control biológico. La bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se ha utilizado en el país como el principal bioinsecticida, principalmente para el control de larvas de lepidópteros. Debido a lo anterior se han realizado investigaciones para determinar los mecanismos fisiológicos de los insectos que evitan la infección de patógenos, tales como los cambios en receptores de toxinas, detoxificación a nivel de intestino, modificación de pH, cambios en la flora microbiana y recientemente el papel de la inmunidad innata como mecanismo de modulación y susceptibilidad a microorganismos patógenos. Los mecanismos de defensa de los insectos involucran reacciones de tipo celular y humoral. Algunos mecanismos para evitar patógenos incluyen endurecimiento de la exocutícula, melanización del invasor para inmovilizarlo mediado por la fenoloxidasa (FO), fagocitosis, nodulación y la producción de péptidos antimicrobianos que se acumulan en la hemolinfa. Actualmente, se tienen reportes parciales de los mecanismos de inmunidad innata presentes en los insectos durante la infección con *Bt*, y las diferencias en la susceptibilidad al mismo. Anteriormente habíamos reportado diferencias en la expresión de péptidos antimicrobiales (PAMs) en un insecto que mostraba diferencias en la susceptibilidad a ciertas toxinas Cry de *Bt*, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae), conocido como gusano falso medidor, insecto plaga que reduce el rendimiento de hortalizas. El presente estudio se enfocó en el análisis de la inmunidad innata usando este insecto como modelo para tratar de relacionar su

efecto en la susceptibilidad a *Bt* cuando se interrumpe o afecta la respuesta inmune. Con el fin de detectar si los cambios en la modulación del sistema de defensa en insectos plaga durante los procesos infectivos con *Bt* podrían modificar la susceptibilidad, especialmente en poblaciones que han desarrollado tolerancia a uno o más productos bioinsecticidas utilizados para el control biológico del mismo. Por lo tanto, nuestra propuesta se divide en dos fases: la primera fue la de determinar si los niveles de expresión génica de la inmunidad innata están modificados en relación a las diferencias de susceptibilidad, ya que dicha expresión nos apoyaría para seleccionar los genes blanco. La segunda fase se enfocó en comprobar la modulación de los genes involucrados en la inmunidad innata, por medio del bloqueo transcripcional por ARN de interferencia dirigido a estos genes, como una nueva estrategia de disminución de los mecanismos inmunes presentes en el proceso de defensa contra la infección por entomopatógenos y así incrementar la susceptibilidad y mortalidad del insecto plaga.

2. HIPÓTESIS

La inmunidad innata en *Trichoplusia ni* es regulada en respuesta a la exposición con bioinsecticidas elaborados a base de *Bt*, y la expresión de mediadores relacionados a la respuesta, tanto humoral como celular, es variable entre poblaciones de insectos que presentan diferencias en la susceptibilidad al bioinsecticida.

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar y modular la inmunidad innata en el lepidóptero de importancia económica *Trichoplusia ni* por medio de RNAi e inmunosupresores y determinar su relación con la susceptibilidad a un bioinsecticida basado en *Bacillus thuringiensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la dosis letal media de dos bioinsecticidas elaborados a base de *B. thuringiensis* (*Bt*) en larvas neonatas de *Trichoplusia ni*.
2. Detectar y clonar los transcritos que codifican para genes involucrados en la inmunidad innata en *Trichoplusia ni*.
3. Producir dsRNA de los genes involucrados en la inmunidad innata en el vector L4440 regulado por la cepa de *Escherichia coli* HT115.
4. Inhibir los genes sobrepresados durante la exposición con *Bt* involucrados en la inmunidad innata en *T. ni* (atacina, defensina, cecropina, gallerimicina, gloverina, lebecina, lisozima y el receptor de peptidoglucanos) por medio de dsRNA.
5. Analizar la actividad fenoloxidasa en la hemolinfa en diferentes fases de desarrollo de *T. ni*.
6. Inhibición de la actividad fenoloxidasa en *Trichoplusia ni* por medio de drogas utilizadas como inmunosupresores.
7. Efecto de la inhibición de la actividad fenoloxidasa en *T. ni* por medio de inmunosupresores y su efecto en la susceptibilidad a *Bt*.
8. Efecto del bloqueo postranscripcional por medio de dsRNA del gen PGRP sobrepresado durante la exposición con *Bt* y observar su efecto en las diferencias de susceptibilidad.

4. ANTECEDENTES

4.1 Inmunidad innata en insectos

Durante la evolución, los insectos han desarrollado un complejo y efectivo sistema de inmunidad innata, aparentemente diferente al sistema inmune adquirido de los vertebrados. El mecanismo de la selección clonal en los insectos no es evidente ya que no existe memoria, los mecanismos de defensas son rápidos y permanecen por pocos días y promueven una resistencia fuerte contra las infecciones microbianas. La primera línea de defensa puede ser ambiental, en la que el insecto evita entrar en el contacto con el potencialmente agente infeccioso. La segunda línea de defensa está formada por las barreras mecánicas y fisiológicas a la entrada del agente infeccioso, como el exoesqueleto y las enzimas digestivas y/o el pH del intestino medio. Si un patógeno logra la entrada en el insecto encontrará un complejo inmunitario el cual comprende distintos sistemas, ambos celulares y humorales, los cuales están coordinados para protegerse de una invasión por microorganismos (Vizioli y cols., 2002). Los mecanismos de defensa en insectos están mediados o estimulados por reconocimientos de componentes de superficie de microorganismos: en Gram negativas son los lipopolisacáridos, en Gram-positivas los peptidoglucanos, y en hongos el β -1-3 glucano (**Fig.2**). Así también, la defensa se manifiesta por reconocimiento de distintos patógenos y desencadena mecanismos de transducción de señales que desencadenan la expresión de péptidos antimicrobianos (PAMs), factores de opsonización, cascadas de serín proteasas, etc. (**Fig. 3**). La respuesta inmune en insectos se manifiesta como inmunidad humoral procesada en tres diferentes reacciones; melanización mediada por PO, serin proteasas y precursor de formación de quinonas y melanina, coagulación de la hemolinfa y síntesis de PAMs. La inmunidad celular está dada o efectuada hacia microorganismos o hacia células apoptóticas que son fagocitadas o capturadas por formación de nódulos, o encapsuladas por hemocitos (**Fig. 1**) (Vilmos y cols., 1998).

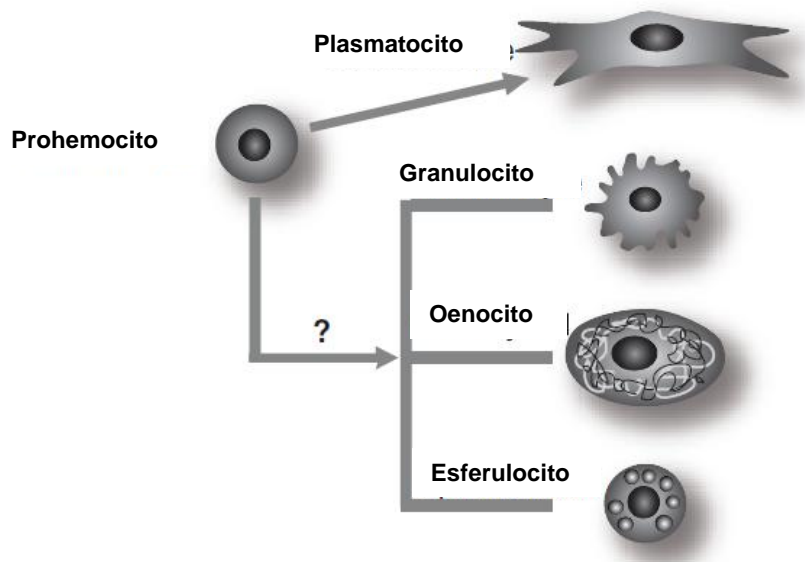


Figura 1 - Tipos de Hemocitos involucrados en la inmunidad de insectos (Strand, 2008).

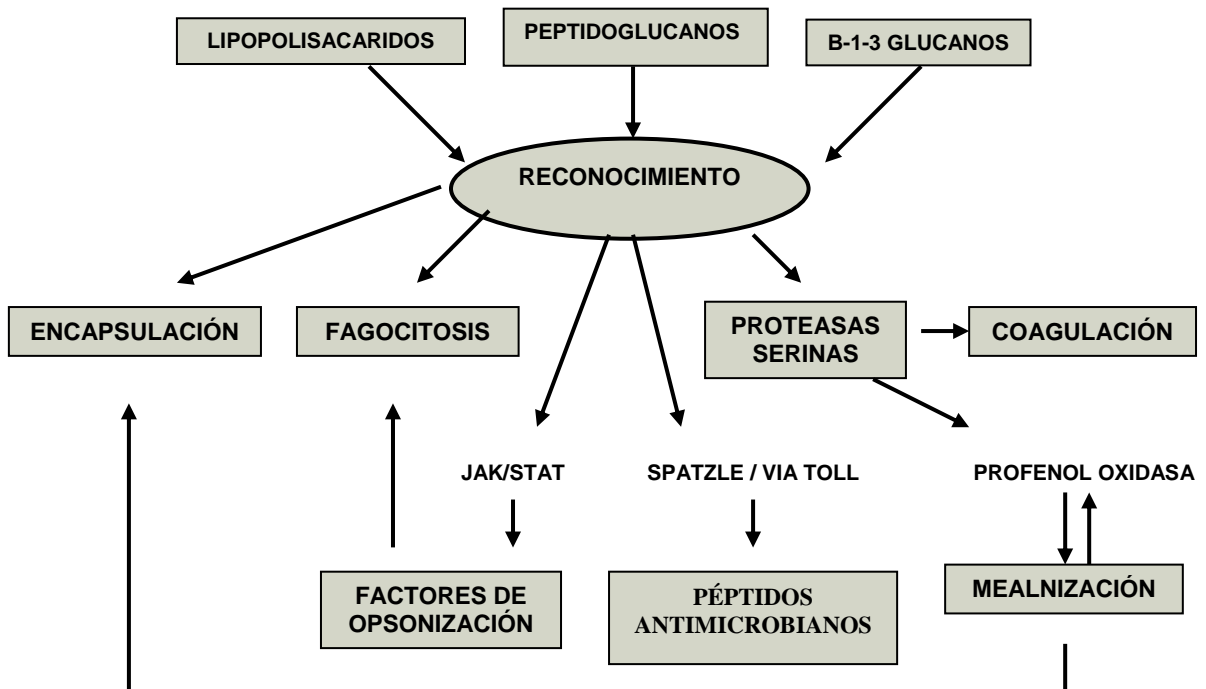


Figura 2.- Mecanismos de defensa en insectos.

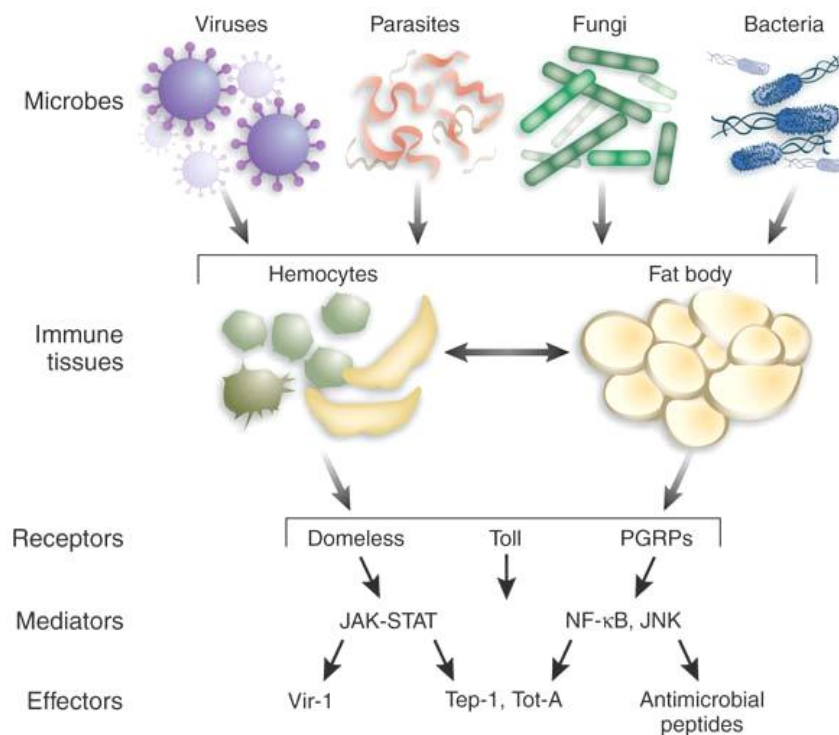


Figura 3. - Regulación de la inmunidad innata en insectos y Activación de señales de transcripción mediado por distintos patógenos (Ip, 2005).

4.1.2 Respuesta humoral de insectos

Melanización: es la formación del pigmento melanina que contiene quinonas y aniones de superóxido y son tóxicos a microorganismos. La melanina es sintetizada por la enzima fenoloxidasa (FO) que es activada por cascada de serin-proteasas y se produce la proenzima profenoloxidasa (proFO) que es sintetizada en los hemocitos y después liberada por ruptura celular y transportada a la cutícula como fenoloxidasa, o depositada alrededor de los parásitos encapsulados. Principalmente esta vía de activación se inicia en la hemolinfa reconociendo los componentes lipopolisacáridos de unión de superficie de patógenos y se activa el receptor asociado a la señalización de

vías inmunidad como el PGRP o el β GRP, posteriormente se inicia la cascada activando la proteasa HP14 y HP21 las cuales cortan y activan la proteasa 3 activadora del precursor profenoloxidasa (PAP3) e interactúan con serin proteasas para activar la vía de producción de fenoloxidasa (**Fig.4**).

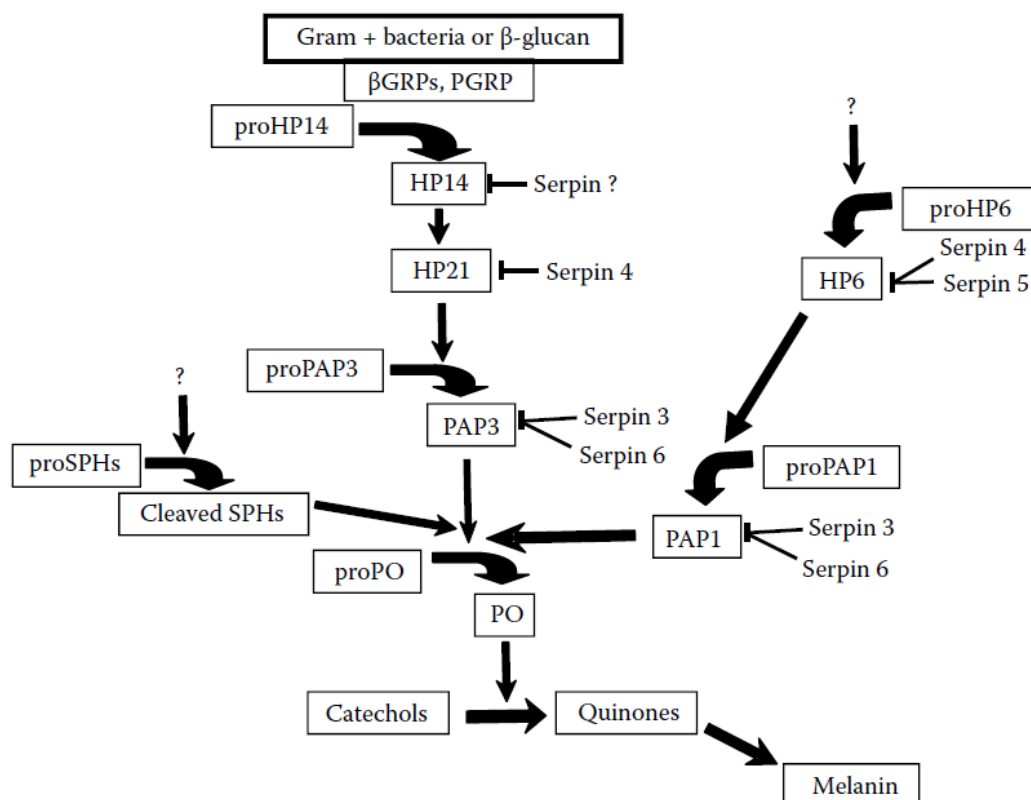


Figura 4 - Señalización y activación de la melanización mediado por la actividad fenoloxidasa en *Manduca sexta* (Kanost y cols. 2010).

Coagulación de la hemolinfa: en los insectos hay dos mecanismos de coagulación, uno de ellos ha sido descrito en la cucaracha *Leucophaea maderae* (Fabricius) donde la polimerización de las proteínas del coágulo son catalizadas por transglutaminasa dependiente de calcio y liberada por los hemocitos: las proteínas coagulantes son la lipoforina y la vitelogenina. El otro tipo de coagulación ha sido estudiado en el cangrejo herradura *Limulus polyphemus* (L.). En este, actúan los lipopolisacáridos (LPS) o peptidoglicanos (1-3)-B-D-glucano, mediando la activación de la coagulación activada por medio de la cascada de las serin-proteasas.

Proteínas de respuesta inmune; la tercera reacción humoral a la infección es rápida y es mediante una síntesis de una batería de PAMs. La síntesis principal es en el cuerpo graso, pero también se sintetizan en hemocitos, células epiteliales de la cutícula, intestino, glándulas salivales y el tracto reproductor. Estos péptidos son diversos en estructura, los péptidos maduros son anfipáticos y actúan hacia membranas y eliminan a células extrañas por lisis. En respuesta a cada infección se sintetizan PAMs, los cuales actúan sobre diferentes componentes de la envoltura microbiana. Entre los péptidos que se activan para la respuesta inmune se han descrito atacinas, cecropinas, dipterocinas, drosomicinas, defensinas, lebecinas, gloverinas y lisozimas.

4.1.3 Reacciones celulares de insectos

Fagocitosis: las células con actividad fagocítica usualmente representan una subpoblación de hemocitos de insectos y consta de células granulares y plasmotocitos. Ambos son responsables primarios de la fagocitosis. Las moléculas de la superficie de las células fagocíticas de insectos exhiben similitud a los receptores encontrados en las células fagocíticas de mamíferos.

Formación de nódulos: Durante la formación del nódulo los insectos agregan hemocitos para atrapar bacterias. Los nódulos pueden adjuntarse a los tejidos para ser encapsulados. Se ha reportado que la lectina de insectos, llamada escolexina, está involucrada en la formación de nódulos en el lepidóptero *Manduca sexta* (L.). Esta escolexina es producida en tejido epidermal y en células de intestino medio.

Encapsulación: la encapsulación es un mecanismo de defensa multicelular donde la cápsula es formada por traslapes de capas de hemocitos y es formada alrededor de protozoarios, nemátodos y huevecillos de larvas parásitas. La encapsulación no induce expresión de PAMs, pero si está asociado con la melanización, en la cual contribuye a la eliminación del patógeno (Vilmos y cols., 1998).

Se han investigado los efectos patogénicos de bacterias y reacciones de defensa en insectos, como respuesta a infecciones causadas por virus, hongos, protozoarios, nemátodos y parásitos. Los insectos exhiben resistencia particular a infecciones. Esta resistencia consiste en un sistema de inmunidad innata, que contiene órganos compuestos (cuerpo graso) y de diferentes tipos de hemocitos, además dependen de una amplia gama de péptidos antimicrobianos (PAMs) los cuales responde al estímulo y la defensa contra patógenos (Haine y cols, 2008).

4.2 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)

Se han descubierto un gran número de PAMs en diferentes organismos, como en mamíferos, plantas e insectos. Estas moléculas son constitutivas y la gran mayoría necesitan de una inducción o un estímulo. Estos péptidos son catiónicos anfipáticos y de estructura secundaria, la cual tiene una alta afinidad con las membranas bacterianas, las cuales están cargadas negativamente, con LPS en la membrana exterior y fosfolípidos aniónicos, tales como el fosfatidilglicerol y la cardiolipina. En contraste, la membrana celular exterior de mamíferos está compuesta de fosfolípidos zwitteriónicos de carga neutra, tales como la fosfatidil-colina y la esfingomiélinina en la que los péptidos tienen poca afinidad debida a su baja hidrofobicidad. Otra diferencia química es la composición de las membranas de procariotes, que poseen esteroides, mientras que los eucariotes contienen colesterol, el cual estabiliza la membrana, la cual protege a las células eucariotas del péptido magainina de vertebrados (**Fig. 5**).

Se considera que estos péptidos logran matar bacterias por permeabilización o disrupción de la membrana bacteriana. En adición de magainina o taquiplesina, en *Escherichia coli* induce una reversión intracelular de los iones K^+ y ocurre una reducción en la viabilidad celular. Los péptidos imponen una curvatura positiva en las membranas y expanden la cabeza polar del poro toroidal que se encuentran de forma natural en las membranas para la semi-permeabilización, donde los péptidos pueden translocar hacia los lados del poro y hacia el interior, ocurriendo una desintegración del poro, ya que ocurre un aumento en las cargas positivas dadas por el péptido y deja

inestable al poro: consecuentemente, ocurre una disrupción irreversible de la membrana (**Fig. 6**). Los mecanismos fisicoquímicos en la superficie celular contribuyen a la rápida eliminación del microorganismo y la prevención de desarrollo de resistencia. Algunos de los mecanismos de resistencia por los microorganismos están dados por mecanismos enzimáticos como proteasas, que evaden la acción antimicrobiana o por mutaciones que impidan la especificidad e interacción con los lípidos y por lo tanto los péptidos anfipáticos puedan unirse débilmente a las células patógenas por interacción hidrofóbica (Matsuzaki y cols., 2001).

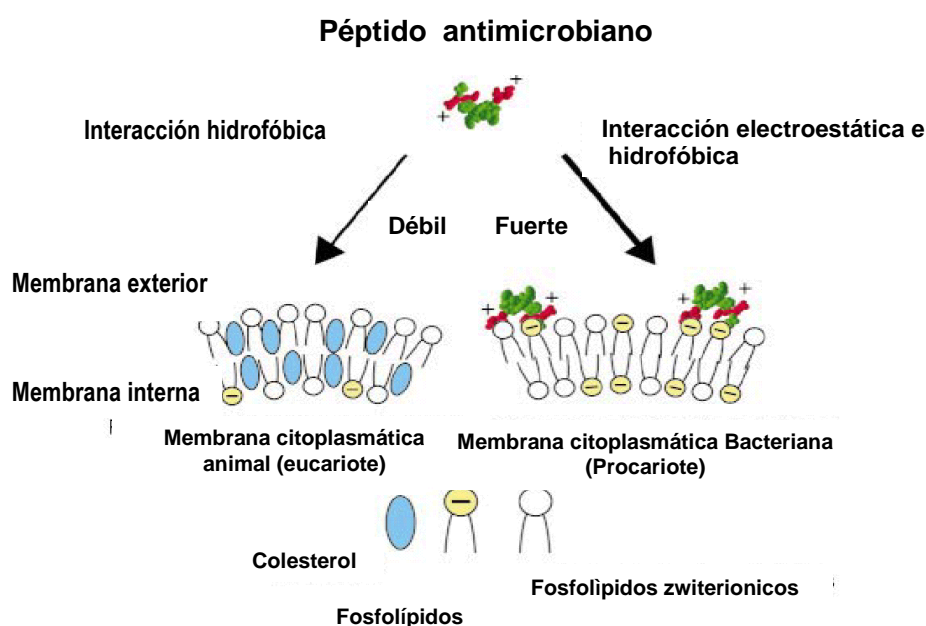


Figura 5. Interacción y reconocimiento de moléculas de membrana, pared de eucariotas y procariotas mediante los péptidos antimicrobianos (Matsuzaki y cols., 2001).

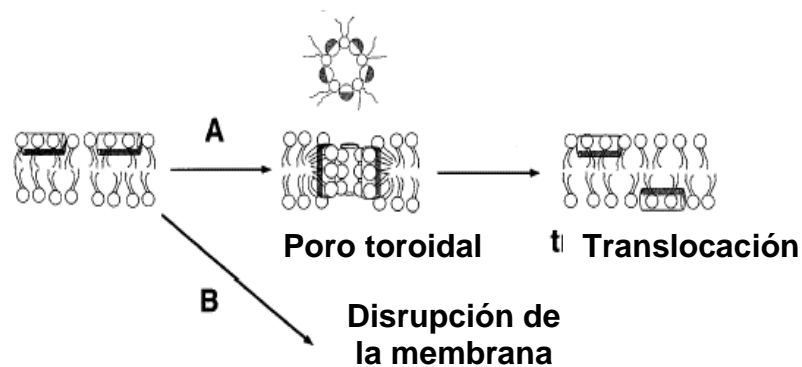


Figura 6. Formación del poro por los péptidos antimicrobianos (Matsuzaki y cols., 2001).

Los PAMs se codifican en genes que se expresan a partir del fragmento de ARN mensajero. El producto primario es una pre-proteína de 62 a 170 aa, posteriormente procesada para la formación del péptido maduro activo, que es de pH básico, debido a que las membranas bacterianas generalmente tienen cargas negativas. La evolución de los genes de estos péptidos, se ha transferido horizontalmente. Sin embargo, el número de exones e intrones se conserva entre las especies. Los péptidos antimicrobianos se agrupan de acuerdo a sus propiedades químicas y bioquímicas, principalmente por su estructura tridimensional; sin embargo, la característica principal entre ellos es la presencia o no de cisteína (Cis). Por lo tanto los PAMs se agrupan en 4 grupos: péptidos lineales sin Cis, péptidos lineales sin Cis pero con otros residuos aminoacídicos como glicina y prolina, péptidos con un puente disulfuro, péptidos con dos o más puentes disulfuro (Tabla 1) (Villaruel y cols., 2004, Vizioli y cols., 2002).

Tabla I.- Agrupación de PAMs de acuerdo a su composición Bioquímica y acción. (Villaruel y cols., 2004).

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS GRUPO I				
LINEALES, HELICOIDALES, SIN CIS, CON O SIN BISAGRA				
Nombre	Origen	Estructura	Gen	Act. Antimicrobiana
Cecropinas I, A, B, D, P1	Drosophila Cerdo Bombyx Cecropia Sarcophaga	35-39 AA, 2 hélices anfipáticas Residuos conservados: Trp, Lis y Arg1	Genes de cecropina, controlados por el factor de transcripción Cif	Bact. G- : <i>S. typhimurium</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>P. aeruginosa</i> . Bact. G+: <i>Bacillus megaterium</i> . No tóxico a hongos y otros eucariontes.
Andropinas	Drosophila	Péptidos de doble hélice con 32 residuos	Ligado al <i>cluster</i> de cecropina	Antibacteriana y hemolítica
Ceratotoxinas	<i>Cerratitis capitata</i>	Similar a cecropina y toxina melittina del veneno de abeja		Antibacteriana y hemolítica
Seminalplasma	Semen de toro	47 residuos. Péptido FALL-39 expresado en médula ósea y testículos	FALL-39	Hemolítica. <i>E. coli</i>
Magaininas PGLa	Piel y estómago de <i>Xenopus</i>	23 residuos		G+ y G- Protozoarios y Hongos
Bombinina H3-H5	Especies de <i>Bombina</i> y <i>Rana</i>	27-34 residuos. D-iso-leucina. No forma hélice anfipática.		Antibacteriana, hemolítica
Dermaseptina	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	34 residuos. Forma alfa hélice anfipática		Fungicida

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS GRUPO II			
LINEALES, SIN CIS, CON ALTA PROPORCIÓN DE CIERTOS RESIDUOS			
Nombre	Origen	Estructura	Act. Antimicrobiana
Apidecinas Abaecina Hymenoptaecina Defensina	Miel de abeja	18 residuos de longitud 34 residuos, prolina 29% 93 residuos, glicina 18% 51 residuos, 6 medias cistinas	Inducida por infecciones bacterianas en la abeja. Contra Gram -
Drosocina	Drosophila	19 residuos, ricos en prolina	
Bac 5 Bac 7	Neutrófilos de bovino Precusores fam. catelicidina	43-59 residuos, prolina 45-49% y 24-29 % arginina	Gram -
PR-39	Intestino porcino, síntesis en médula ósea	39 residuos, rico en prolina y arginina	Gram - al bloquear la síntesis de DNA
Indolicidina	Neutrófilos de bovino	13 residuos y 5 son Triftofano.	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
Coleopterina Holotricina 2	Escarabajo	7-8 kDa, glicina 12%, prolina 10%	
Atacinas y gloverinas	Insectos	Proteínas 14-20 kDa. Ricos en prolina y glicina	Afectan células en crecimiento. Bloqueo de transcripción <i>omp</i> en superficie bacteriana

TABLA 3
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS GRUPO III
ANTIBACTERIANOS, CON UN PUENTE DISULFURO

Nombre	Origen	Estructura	Act. Antimicrobiana
Bactenecina	Neutrófilos bovinos	12 residuos, 4 son arginina	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , toxicidad vs células neuronales y gliales
Brevinina 1 Brevinina 2 Brevinina 1E Brevinina 2E	Piel de rana: <i>Rana</i> japonesa <i>Rana</i> europea	7 residuos forman una asa en el extremo C y una cola larga	Antibióticos potentes Brevinina 2: hemolítico fuerte
Esculentina	<i>Rana</i> esculenta	7 residuos forman una asa en el extremo C y una cola larga	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , hongos
Ranalexina	<i>Rana</i>	Similar a polimixina 20 aa	G + y G -

TABLA 4
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS GRUPO IV
CON DOS O MÁS PUENTES DISULFURO, ESTRUCTURA EN HOJA BETA

Nombre	Origen	Estructura	Almacenamiento y liberación	Gen	Act. Antimicrobiana
Defensinas	PMN de conejo, fagocitos de mamíferos y humanos, células de Paneth (criptidinas) de ratones	3 puentes S-S-, 29-34 aa, ricos en cisteína y arginina (no Lisina). Preproteínas de 95 residuos	En gránulos	Cromosoma 8 en humanos y ratones	Citotóxica, lítica, antibact. G+ y G-. Fungicida por concentración de cationes divalentes
α defensinas	Fagocitos de humano, conejo, rata y cobayos, tráquea bovina (TAP)	6 cistrinas unidas	En gránulos-fusión con fagosomas de contenido microbiano		
β defensinas	Neutrófilos de bovino Células epiteliales Células Paneth-ratón	38-42 residuos. En hoja β . Familia de 13 diferentes defensinas			Se inactiva con iones en moco traqueal-fibrosis quística
Defensinas de insectos	<i>Phormia sarcophaga</i> , no contenidos en fagocitos	Semejante a α defensinas			Inducidas como respuesta a infecc. bacteriana. Gram + No fungicidas
Galanicinas	Neutrófilos de pollos	Semejante a β defensinas			
NK lisina	Intestino porcino	78 residuos. Similares a proteína 519 y NK65 en humano.			Algunas bacterias, antitumoral, no lisa eritrocitos.
Amibaporos	<i>E. histolytica</i>				Lisis bacterias

4.2.1 Péptidos antimicrobianos en insectos

Bacterias inyectadas en el hemocelo de los insectos conducen a la expresión de una gran cantidad de PAMs y otras proteínas, las cuales son secretadas en la hemolinfa. El cuerpo grasso es el tejido primordial de la síntesis de estas proteínas. También pero en menor proporción se sintetizan en los hemocitos y otros tejidos como en la región oral, glándulas salivales, túbulos de malpighi, intestino medio y células pericardiales (**Fig. 7**). Los PAMs pueden inducirse en células epidérmicas por un estímulo en la cutícula. Algunos péptidos han sido estudiados intensamente en pocas especies de insectos, como en *H. cecropia*, *M. sexta*, *Bombyx mori* (L.), *Drosophila melanogaster* (Meigen) y *S. peregrina*. La lisozima de los insectos se expresa constitutivamente, pero puede ser inducida por una pobre inducción microbiana. Estas lisozimas pesan 14 kDa y guardan similitud a la lisozima del pollo. La expresión de la lisozima es altamente inducida por bacterias, primariamente en el cuerpo grasso, en donde se ha observado su expresión en el intestino medio de *D. melanogaster* (Ourth y cols., 1994).

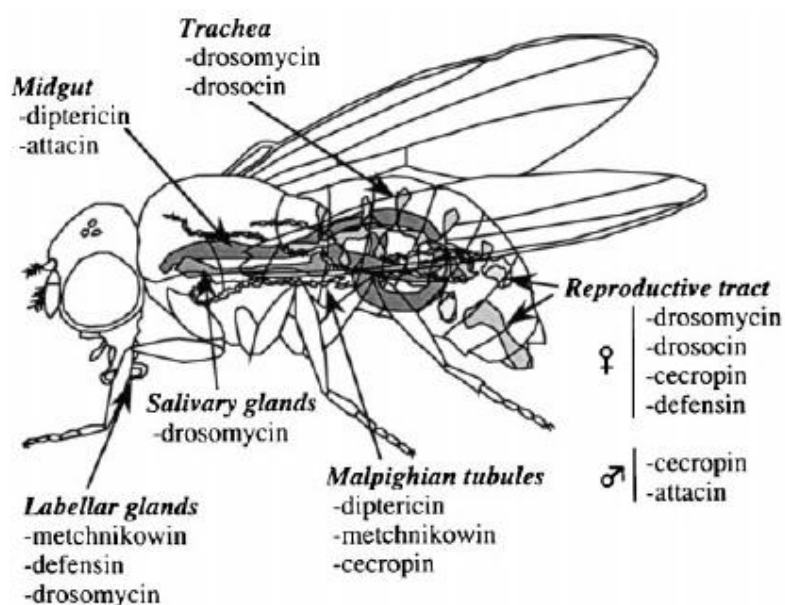


Figura 7. Expresión de péptidos antimicrobianos en diferentes tipos de tejido en el estadio larvario de insectos (Tzou y cols., 2000).

Las cecropinas son péptidos de 4 kDa y tienen amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y negativas. Estos péptidos poseen 2 α -hélices anfipáticas. Estos actúan sobre lípidos de membranas y generan una disrupción y desintegración por lo que producen una lisis bacteriana (Ourth y cols., 1994).

Las atacinas/sarcotoxinas II, son proteínas inducidas por bacterias y pesan alrededor de 20-28 kDa y han sido identificadas en lepidópteros y dípteros. Estas proteínas no son de amplio espectro y son activas solamente contra bacterias Gram negativas: previenen la división celular por inhibición de la biosíntesis de las proteínas de la membrana exterior (Ourth y cols., 1994).

Las dipterocinas pesan alrededor de 9 kDa y poseen dominios ricos en glicina en la región carboxilo terminal, son efectivas sólo contra Gram negativas. Funcionan al igual que las atocinas (Ourth y cols., 1994).

Otra familia distinta de los PAMs de insectos son las defensinas, las cuales fueron originalmente descubiertas en *S. peregrina* y en *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) y fueron llamadas sapecinas. Las defensinas afectan solamente bacterias Gram-positivas. Las defensinas están presentes en Dípteros, Coleópteros, Hemípteros y Odonatos. Estas secuencias presentan una alta similitud con las defensinas de mamíferos. Las defensinas de insectos son de 29-34 aminoácidos y contienen seis residuos conservados de cisteínas, ligadas a tres puentes disulfuro. Estudios de resonancia magnética nuclear indican que la molécula de la defensina consiste de un asa N- terminal seguida por una α -hélice que está ligada a través de puentes disulfuro a dos cadenas β -antiparalelas en la región C- terminal. Las defensinas actúan sobre la membrana citoplasmática bacteriana y terminan rompiendo las células por formación de canales en la membrana. (Ourth y cols., 1994).

Se han identificado una familia de PAMs ricos en prolina, los cuales son de 18-34 aminoácidos, las apiadecinas de himenópteros, abecina de *Apis*

mellifera, drosocina y metchnikowina de *D. melanogaster*, metalnikowinas de hemípteros como *Palomena prasina* (L.), pyrrocoricina del hemíptero *Pyrrochoris apterus* (L.), y lebocina de *B. mori*. La prolina constituye un 25% del total de estos péptidos. La drosocina, la metchnikowina y la lebocina son glicosilados en los residuos de treonina, donde aparentemente es importante para su actividad antimicrobiana. Estos péptidos son aparentemente activos contra membranas celulares bacterianas. Otros PAMs que son ricos en glicina son coleopterina y holotricina de *Holotrichia diomphalia* (Bates-Bates), son ricos en residuos de glicina y son activas contra Gram-negativas. Estos péptidos son de 42 residuos de aminoácidos. La moricina es activa contra bacterias Gram-positivas y negativas. El péptido tanatina, con secuencia similar a la brevinina de rana, fue aislada del hemíptero *Podisus maculiventris* Say; este péptido es activo contra bacterias Gram-negativas y positivas. La gallsina, de 75 kDa, fue aislada de la hemolinfa de *Galleria mellonella* (L.); este péptido daña la membrana exterior y lisa células de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Ourth y cols., 1994).

Por otra parte se han identificado múltiples péptidos en los distintos órdenes y familias de artrópodos en la que resalta *D. melanogaster*, el organismo más estudiado para conocer la inmunidad en insectos. Posteriormente se han secuenciados distintos genomas como el de abeja, escarabajo rojo y gusano de seda, de los cuales también se han utilizado de plataforma para el análisis de inmunidad de insectos (**Fig. 8**) (Gerardo y cols, 2010).

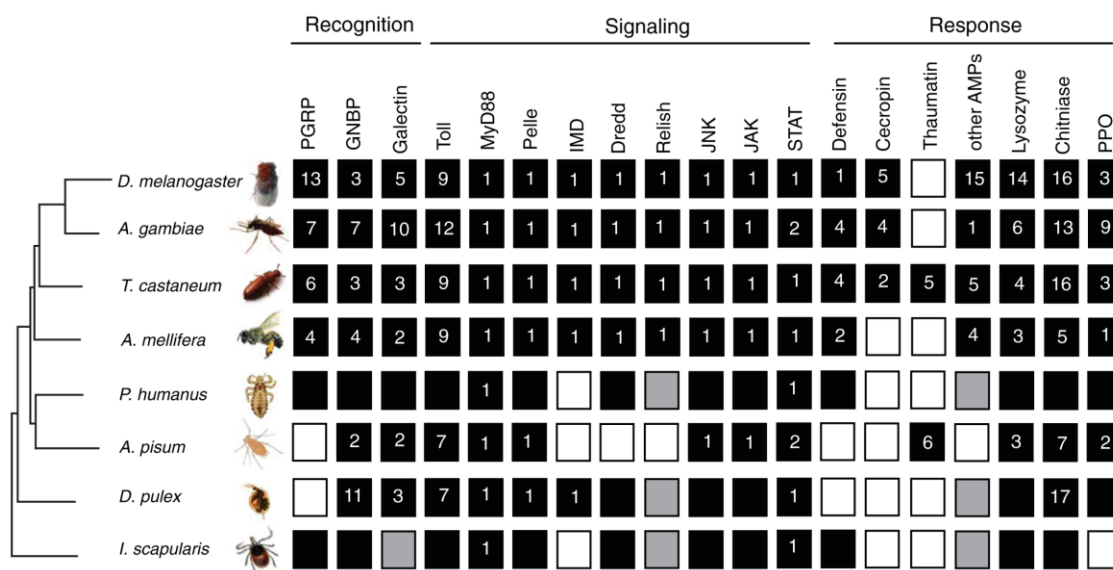


Figura 8. Familia de genes de artrópodos involucrados en la inmunidad innata (Gerardo y cols, 2010).

4.2.2 Péptidos antimicrobianos en lepidópteros

Los insectos lepidópteros son conocidos por producir factores antimicrobianos en la hemolinfa en respuesta a una inyección con bacterias; los factores más caracterizados son las cecropinas y las atacinas aisladas de *H. cecropia*, con un peso molecular alrededor de 4 -7 kDa. Se ha demostrado que la respuesta inmune humoral en *Heliothis virescens* (F.) es inducible con bacterias, en donde se encontró la expresión en péptidos parecidos a cecropinas y atacinas extraídos de la hemolinfa y que tienen actividad *in vitro* contra bacterias Gram-negativas y contra envolturas de virus (Ourth y cols., 1994).

Los insectos lepidópteros son conocidos por producir factores antimicrobianos en la hemolinfa en respuesta a un estímulo mediado por un patógeno. Se ha demostrado que la respuesta inmune humoral en *H. virescens* es inducible por bacterias, en donde se encontró la expresión en péptidos como

cecropinas y atacinas extraídos de la hemolinfa y que tienen actividad *in vitro* contra bacterias Gram-negativas y contra envolturas de virus (Ourth y cols., 1994, 1996).

Actualmente en el lepidóptero plaga *T. ni* se han encontrado genes involucrados en la respuesta inmune, en los cuales han sido inducidos y expresados a la exposición de agentes no patogénicos como *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli* (Tamez-Guerra y cols., 2008). Entre los genes que se han expresado y se ha determinado su función en la defensa contra patógenos están: atacina (antiviral), cecropina (antibacteriano, antiviral), defensina (antibacteriano), gloverina (antifúngico), gallerimicina (antifúngico), hemolina (antiviral), lebecina (antifúngico), y lisozima (antibacteriano) (Freitak y cols., 2007).

En un estudio se comprobó que la cecropina aislada de la hemolinfa de *H. virescens* forma pequeños poros en la membrana celular y causó lesiones en *E. coli*; estos poros producen la lisis y pérdida del contenido citoplasmático y posteriormente la bacteria moría (**Fig. 9**) (Ourth y cols., 1996).

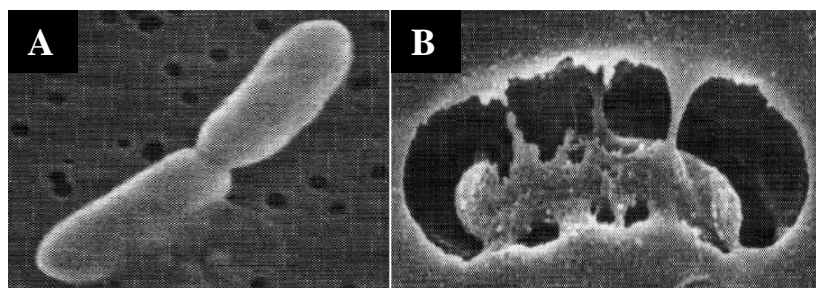


Figura 9. Foto de microscopio electrónico. Efecto de la cecropina en *Escherichia coli*. **A)** Bacteria sin tratar (16,000 x); **B)** Bacteria sometida al péptido cecropina (20,000 x).

La proteína atacina se expresa en el lepidóptero *H. cecropia* en respuesta a infección con bacterias, donde se ha observado que las atacinas contienen tres regiones hidrofóbicas en la parte N- terminal. La atacina inhibe el crecimiento de bacterias Gram-negativas, incrementa la permeabilidad de la

membrana externa e induce la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel transcripcional, donde los lipopolisacáridos juegan un papel importante en el estímulo para la expresión de la atacina (Carlsson y cols., 1998).

Se ha reportado en la hemolinfa de *H. virescens* una molécula hidrofóbica rica en cisteínas con actividad antifúngica y actividad contra bacterias Gram-positivas y, ocasionalmente, contra Gram-negativas, donde se le encontró similitud con las defensinas de insectos y también tuvo una alta similitud con la drosocina de *D. melanogaster* (Lamberty y cols., 1999). Esta molécula se le ha denominado heliomicina y se le encontró actividad contra las levaduras *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Lamberty y cols., 2001).

En otro experimento, a *H. virescens* se le inyectó la bacteria *Enterobacter cloacae* en el quinto estadio larvario y como prepupa. Los resultados mostraron que se incrementó la actividad de la lisozima en la hemolinfa. La lisozima es importante en el desarrollo de la especie, ya que esta proteína está involucrada en la metamorfosis. Esta proteína tiene un peso molecular de 16 kDa y es homóloga a las lisozimas de *M. sexta* y *G. mellonella* (Kyung y Ourth, 2000a). Posteriormente, en un experimento similar se utilizó un sistema de cromatografía de filtración en gel y se observó una proteína de 12 kDa la cual no había sido identificada en insectos y no pudo ser reconocida por el anticuerpo contra cecropina B. Por lo tanto, a esta proteína se le denominó viresina y tiene actividad antibacterial contra bacterias Gram-negativas (Kyung y cols., 2000b).

Por medio de la técnica de despliegue diferencial por PCR se pudo aislar un gen de respuesta inmunitaria en *T. ni*, el cual fue inyectado con bacterias usando amplificaciones de PCR. Después del estímulo, se encontró una alta similitud con las atacinas de *H. cecropia*. Posteriormente, el gen fue clonado y secuenciado y se le encontró un sitio de módulo "G" (regiones ricas en glicina) característica de la atacina. Esta secuencia que se obtuvo de la atacina posee dos intrones, y por ensayos de RT-PCR se observó un incremento de la expresión del transcrito de la atacina a las 20 h de ser estimulada con bacterias (Kang y cols. 1996).

Por medio de la misma técnica, se obtuvo un DNA complementario similar al de las gloverinas; este gene fue inducido con estímulo bacteriano. Este gen codifica para 174 aminoácidos, es reducido a 14 kDa y es idéntico a las gloverinas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) y *Hyalophora gloveri* (Strecker). Esta proteína fue detectada en la hemolinfa y hemocitos de las larvas de *T. ni* infectadas con bacterias. Además, es estimulada con LPS e inhibe la síntesis de proteínas de la membrana exterior, lo cual incrementa la permeabilidad de la membrana (Kang y cols., 2002).

Con esta misma técnica también se obtuvo un DNA complementario que codifica para la lebocina en *T. ni*, donde estos transcritos fueron encontrados en cuerpo graso y en hemocitos. La expresión se logró ver a las 20 h y continuó expresando hasta las 60 h después de la inyección bacteriana. La proteína es deducida a una proteína rica en prolinas y contiene en total 128 aminoácidos, y también se le encontró, como en otras lebocinas, un sitio de glicosilación. Esta lebocina tiene una alta similitud con la lebocina de *B. mori* (Liu Gang y cols., 2000).

Como hemos mencionado anteriormente, los mecanismos de inmunidad innata en insectos son primordiales para su adaptación y estabilidad; sin embargo, algunos patógenos han desarrollado estrategias de evasión contra la inmunidad entre los mecanismos que están involucrados son: degradación de PAMs por proteasas, inhibición de la respuesta celular e inhibición de la transcripción de genes involucrados en la respuesta inmune, estos tipo de mecanismos están involucrados en la defensa de hongos (Naranayan, 2005).

4.3 Vías de señalización en inmunidad innata en insectos y mamíferos

Los insectos tienen dos vías inmunes de señalización, y ambas llevan a la activación del factor de transcripción Rel. Una de ellas da respuesta primariamente a hongos y a infección de bacterias Gram-positivas, y la otra vía responde a LPS por infección con bacterias Gram-negativas. La vía antifúngica requiere componentes del receptor transmembranal rico en leucinas (TLR's) por medio de la señalización de Toll, ya que éstas vías son requeridas durante el desarrollo dorsoventral embrionario. La inducción de Toll/vía antifúngica conlleva a la activación de dos homólogos de NF-kB de insectos, llamados Dorsal y Dif, resultando en la producción de péptidos antifúngicos tales como la drosomicina. Dorsal es requerido en la etapa temprana de la embriogénesis para el desarrollo del axis dorsoventral dependiente de Toll. Dif es requerido para la inmunidad antifúngica en moscas adultas, donde se ha considerado tanto como Dorsal o Dif son suficientes para la sobrevivencia de la larva. En contraste, la vía antibacterial es inducida por LPS y requiere del tercer homólogo de NF-kB, Relish, el cual activa la expresión de PAMs tales como la diptericina. Relish es sintetizado como una proteína precursora de NF-kB, que es cortada y activada en respuesta a infecciones bacterianas o tratamientos con LPS. Algo interesante pasa con el péptido cecropina, ya que puede ser activado por ambas vías ya sea por antibacterial o antifúngica (Silverman y cols., 2001). En algunos casos un mecanismo es usado directamente a aparatos de transcripción a distintos pasos tales como las respuestas a expresión de genes de PAMs en respuesta a diferentes patógenos (**Fig. 10**).

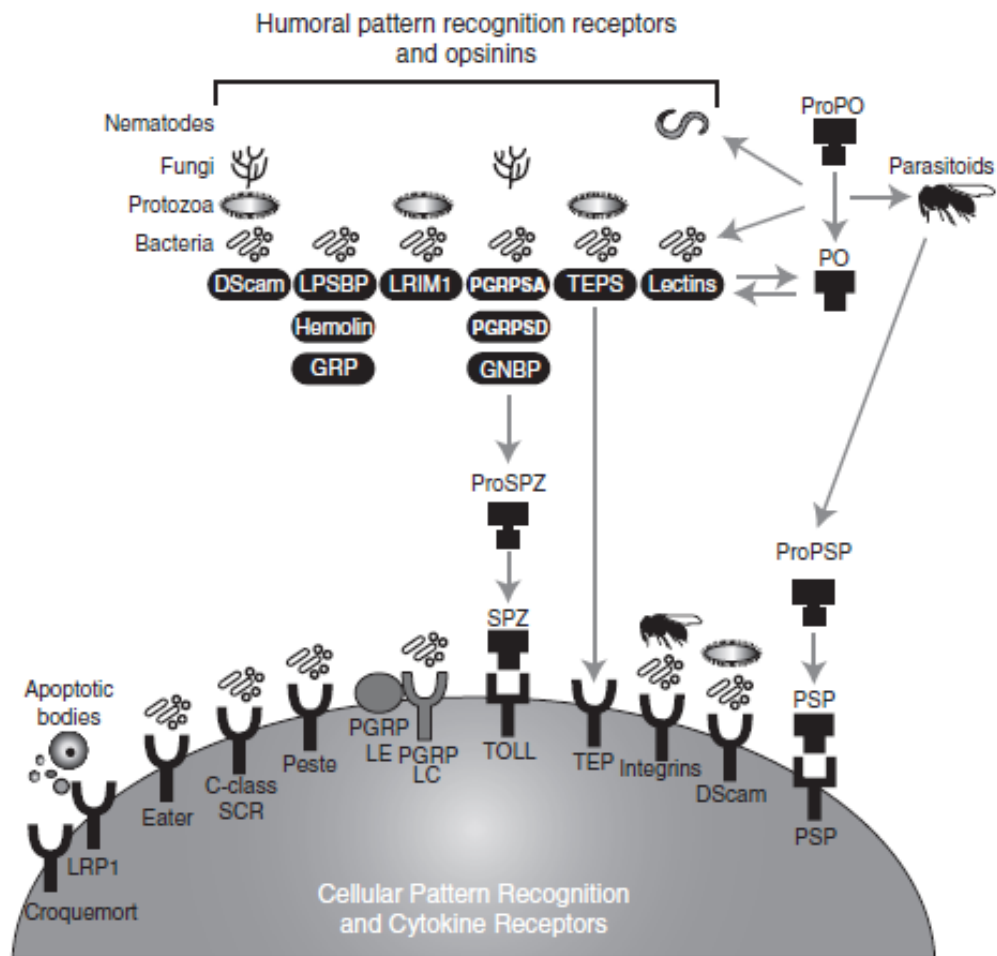


Figura 10. Receptores involucrados en el reconocimiento de patógenos (Strand, 2008) .

Por otra parte, en el reconocimiento de componentes extracelulares de patógenos están implicados los peptidoglucanos, los cuales son reconocidos por las proteínas de reconocimiento de peptidoglucanos (PGRP). Todos los PGRPs de invertebrados contienen un dominio similar a la amidasa tipo 2 lítica de peptidoglucano procarionta, pero solo algunos tienen actividad enzimática y otros PGRPs juegan un papel fundamental en el reconocimiento de patógenos. En *D. melanogaster* para discriminar entre Gram - y Gram + se reconocen las variantes de peptidoglucanos. La vía de Toll es activada por Gram + y hongos

e induce la síntesis de péptidos, incluyendo el antifúngico drosomicina. El reconocimiento de peptidoglucanos tipo lisina, los cuales son encontrados en Gram +, es mediado por PGRP-SA y PGRP-SD. La vía *Imd* es activada por Gram – y es mediado por el reconocimiento del ácido diaminopimélico tipo peptidoglucano (DAP), el cual es específico para el PGRP-LC; esta activación induce la expresión de PAMs y activa la defensa contra hongos y bacterias (**Fig. 11**) (Valley-Gelly y cols., 2008).

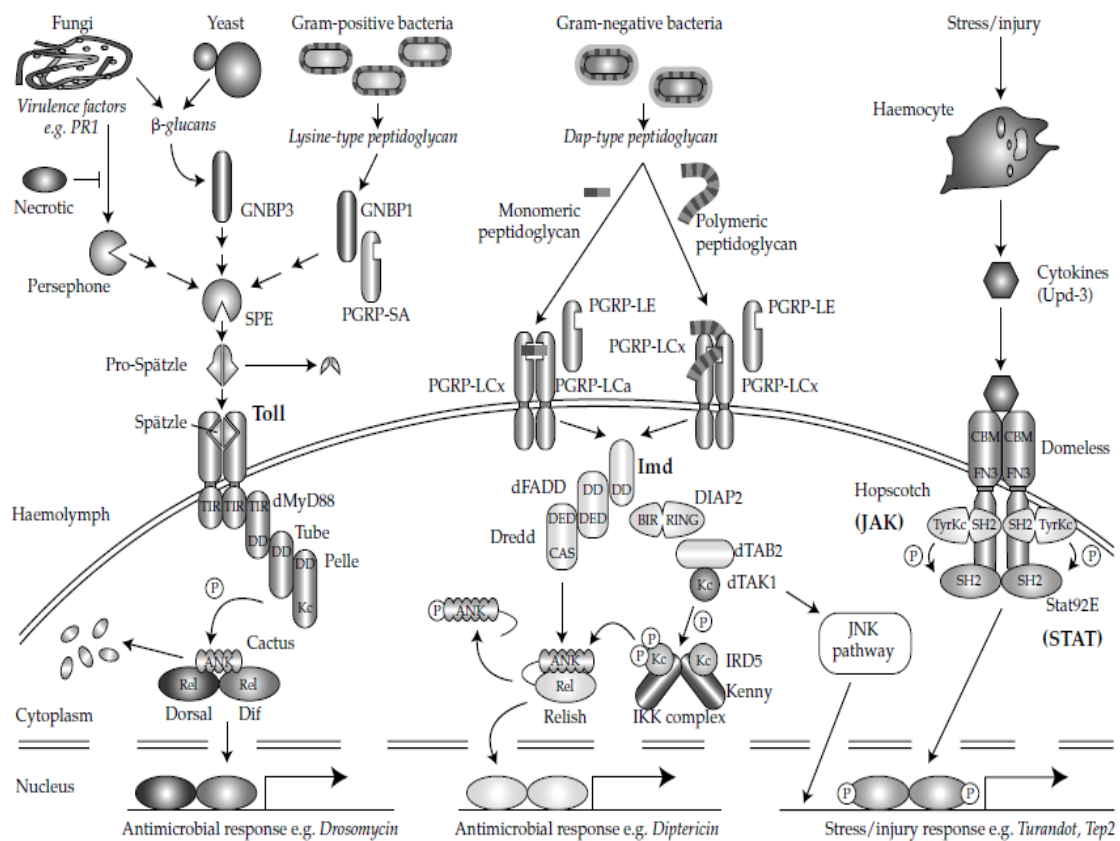


Figura 11. Mecanismos transduccionales en la activación transcripcional de genes que codifican para reacciones involucradas en la defensa en insectos (Broderick y cols 2009).

4.3.1 Regulación genética de la inmunidad de insectos

Algunos factores de transcripción y señales de transducción son procesados e involucrados en la regulación de genes de respuesta inmunitaria en insectos. Los mecanismos moleculares son similares en mamíferos. La comparación de regiones río arriba de genes de inmunidad (atacina) del *Hyalophora cecropia* (L.) y *D. melanogaster*, tienen similitud con regiones promotoras de unión al factor de transcripción *NF-kB* en mamíferos. La atacina tiene actividad similar al *NF-kB* de mamíferos y tienen una importante regulación en los genes de inmunidad en insectos. En *H. cecropia*, la proteína nuclear, que es un factor inmunoresponsable de cecropia (CIF), se une a secuencias de *NF-kB* y se induce por infección bacteriana. CIF es similar en tamaño al *NF-kB* de mamíferos. Esta proteína fue aislada de la línea celular de *Sarcophaga peregrina* (Sarpe). En los insectos existen dos proteínas que contienen proteínas como Rel, relacionados con la familia Rel de *NF-kB*. Una de éstas es el factor inmune relacionado a Dorsal (DIF). Este último está involucrado en la activación transcripcional de cecropinas y contiene sitios similares a *NF-kB*. La otra proteína es Dorsal y se expresa en el embrión. Dorsal es altamente expresada en cuerpo graso de adultos y es sobre-expresada en estímulo a bacterias. La translocación de Dorsal hacia el núcleo es controlada en el desarrollo embrionario por la vía de señalización de Toll. Toll es un receptor transmembranal rico en leucinas; este receptor es homólogo al receptor interleucina-1 (IL-1) en mamíferos. La proteína I κ B de insectos es conocida como cactus; en ésta existe una degradación similar como en mamíferos, mediante una degradación controlada por una fosforilación de serinas. La unión al ligando Toll resulta en una disrupción del complejo de las proteínas dorsal con cactus, este último es homólogo al inhibidor I κ B de *NF-kB* en mamíferos. Cuando cactus es liberado por fosforilación, dorsal se mueve hacia el núcleo donde actúa como factor de transcripción de genes involucrados en la inmunidad en los insectos (Gillepsie y cols., 1997; Bulet y cols., 1999). De tal manera se observa una similitud en los mecanismos de activación de Dorsal y Dif de *Drosophila* durante el desarrollo temprano de

inmunidad antifúngico con alta homología requerida para la activación de *NF- κ B* en mamíferos (**Fig. 12**) (Hoffmann y cols., 1996).

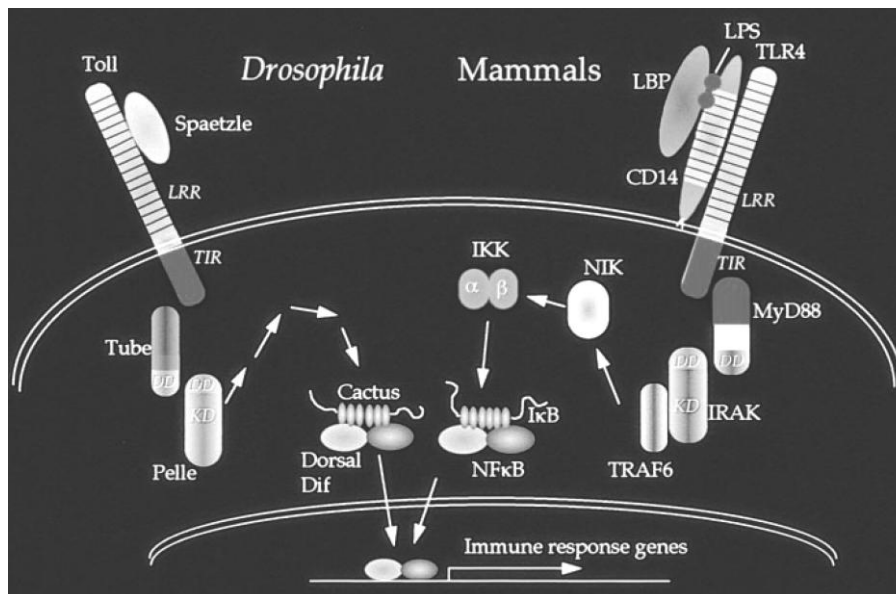


Figura 12. Mecanismos de activación de genes de respuesta inmune en mamíferos e insectos y su homología en la transducción de señales (Hoffmann y cols., 1996).

4.4 Inmunosupresores

El uso de inmunosupresores en invertebrados ha sido muy poco común, debido a que estas drogas son utilizadas para suprimir el sistema inmunitario en pacientes con transplantes, para disminuir procesos de rechazo por respuesta inmune. Como modelo de estudio se han evaluado en algunos insectos como es el caso de *D. melanogaster*, en el cual utilizaron el inhibidor de eicosanoides, la dexametasona. Este experimento constó de inyectar a la larva dexametasona y posteriormente la retaron contra un parasitoide, y observaron que había parasitismo en menor tiempo comparado con un control, por lo tanto se concluyó que la dexametasona disminuía los niveles de respuesta celular contra parasitoides (Carton y cols., 2002).

En estudios recientes se han utilizado inmunosupresores para modular la vía de melanización y los resultados apoyan el papel de la FO cuando se observan diferencias en la susceptibilidad a entomopatógenos y su participación en la evasión contra ellos. En una investigación reciente, Broderick y cols., (2010) se encontraron que al usar inmunosupresores de eicosanoides (dexametasona y esculetina) se incrementaba la susceptibilidad a *Bt* (Dipel) en *Limantria dispar* (L.), debido a la supresión de la FO, lo cual se relacionó a la melanización, y se relacionó con la susceptibilidad a *Bt*. En otro estudio se observó el efecto de la aplicación del inmunosupresor ciclosporina A en *G. mellonella*, en el cual se observó una reducción de la expresión del PAM cecropina y los niveles de actividad de lisozima (Fiolka y cols., 2008).

En otro reporte en la polilla de la harina *Ephestia kuehniella* Zeller donde expusieron a *Bt* y analizaron la inmunidad innata por medio de la melanización, encontraron que una cepa tolerante a *Bt* tenía una mayor reacción de melanización, concluyendo que la melanización es un mecanismo de detoxificación al *Bt* (Rahman *et al*, 2003). Otro reporte en donde analizaron el efecto de un inmunosupresor del sistema de defensa mediado por la FO, en el cual utilizaron el metabolito tropolona, el cual es un potente inhibidor de la FO, encontraron que al retar al insecto con este inmunosupresor había un incremento en la susceptibilidad al *Bt* (Rahman y cols., 2007).

4.5 RNA de Interferencia en Insectos

Actualmente, la técnica con RNA de interferencia (RNAi) se ha utilizado para bloquear la expresión de genes, en la cual el RNAi o RNA de doble cadena (dsRNA) se une a su gen específico, provocando la activación de enzimas como DICER y RISC, lo cual lleva a la degradación y por lo tanto la inhibición de la proteína de interés. Estos mecanismos se han utilizado para inhibir genes en la mayoría de los organismos procariotas, eucariotas y virus (**Fig. 13**) (Hannon y cols, 2002).

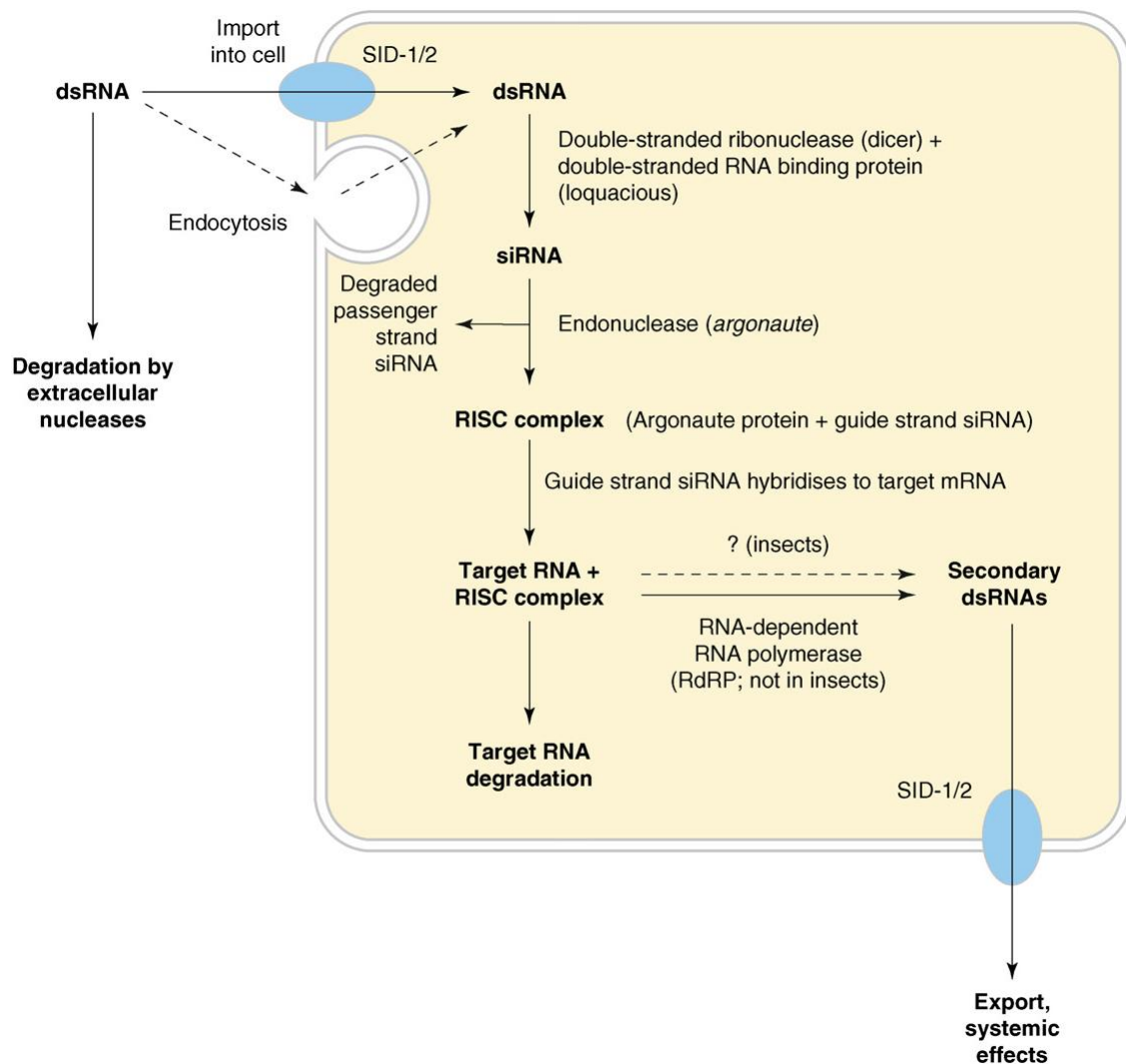


Figura.13. Mecanismo de RNA de interferencia (Price y cols., 2008).

En los insectos se ha observado y demostrado inhibición de la expresión de genes con RNAi. Entre los ejemplos destacan la mosca de la fruta *D. melanogaster*, la garrapata *Boophilus sp.*, el mosquito *Anopheles gambiae* Giles (Ghanim y cols., 2007) y recientemente en Lepidópteros (Fang y cols., 2010).

En cuanto a la inhibición de los genes de inmunidad mediada por RNAi, en lepidópteros se ha utilizado en *H. cecropia* para observar el papel de la proteína de inmunidad hemolina, que está encargada de modular a los hemocitos para que activen la respuesta celular contra patógenos. En el estudio bloquearon con RNAi la expresión de la hemolina a nivel de huevecillo y el resultado fue que los embriones resultantes desarrollaron deformaciones,

encontrando el papel de la hemolina en la diferenciación embrionaria (Terenius y cols., 2006).

Otro estudio *in vitro* en la línea celular TN-368 de *T. ni* evaluaron la infección del virus AcMNPV, en la cual se conoce que la apoptosis esta ampliamente relacionada en la disminución de la infección y la replicación viral. Desarrollaron un modelo para inhibir la apoptosis bloqueando un precursor como la caspasa, donde encontraron que al inhibir este gen, observaron que se incrementaban los niveles replicación viral y su infección (Bryant y cols., 2007).

Recientemente se han realizado estudios para inhibir la expresión de genes en respuesta a entomopatógenos y en particular a *Bt*, como una forma de analizar la participación de estos genes y sus proteínas en la infección por este patógeno. En este sentido, Rodriguez y cols., (2010) inhibieron por ingestión dsRNA en la dieta el gen SPT6 de *Spodoptera frugiperda* (Hübner), y redujeron la toxicidad de la toxina Cry1Ca1 de *Bt*. En un estudio similar al anterior inyectaron RNAi en larvas del tercer estadio de *Plutella xylostella* (L.) y obtuvieron una disminución en la susceptibilidad a la toxina Cry, confirmando la participación del receptor de la caderina con la toxicidad a la misma (Yang, 2009). En otro estudio encontraron la asociación de la expresión de la Map Kinasa p38 cuando se sometía a *Manduca sexta* (L.) a la toxina Cry ---, y observaron que se reducía la expresión génica de mismo, pero no analizaron si había un diferencia en la susceptibilidad a la toxina (Cancino y cols., 2010).

Debido a que el silenciamiento por RNAi ha revolucionado el estudio de la función de genes, particularmente en insectos lepidopteros, se ha observado que es difícil la estandarización de la inhibición. De hecho se han encontrado más resultados negativos que positivos en alrededor de 150 experimentos publicados en relación de genes inhibidos involucrados en la inmunidad. Se ha encontrado que la zona de mayor dificultad para silenciar es en el epitelio y cutícula, además de requerir de altas concentraciones de ingesta de dsRNA. En los estudios que se ha observado mayor frecuencias de silenciamiento es por inyectado en el hemocele (Terenius y cols., 2010).

Recientemente se han implementado las estrategias de silenciamiento mediado por dsRNA, en el cual se produce dentro de una bacteria y se agrega a la ingesta para el bloqueo de genes en invertebrados en el cual han utilizado a *Caenorhabditis elegans* (Timmons y cols., 2001). Este sistema es utilizando el vector L4440 y la cepa de *E. coli* usada es la HT115 la cual es deficiente de la enzima RNasa III involucrada en la degradación de dsRNA. Este sistema se confirmó en *C. elegans* cuando se bloqueó la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante la ingesta de la cepa HT115 expresando el dsRNA específico de la GFP por medio del vector L4440. Esta técnica de silenciamiento se empleó impregnando una placa de agar y se sometieron a larvas juveniles de *C. elegans* transgénicas para GFP y se observó la disminución de la expresión de GFP a las 48 h. (Timmons y cols., 2003). En otros estudios en los que han utilizado este sistema para bloquear genes en *C. elegans* han dirigido la interferencia para genes involucrados en la inmunidad en la que han encontrado resultados satisfactorios (Troemel y cols., 2008).

En otro estudio similar pero utilizando este sistema se empleó para bloquear el gen de la quitina a nivel de la cutícula del lepidoptero plaga *Spodoptera exigua* (Hübner). Encontrando resultados positivos de la inhibición del transcrito de quitina y el aporte de utilizar el sistema de ingestión vía digestiva de la bacteria expresando dsRNA y bloquear el gen de quitina en cutícula, además de encontrar letalidad hasta un 25 % en comparación con el control y efecto en el desarrollo de la cutícula en el 5to. estadio cuando se aplicaba la interferencia en el estadio 3ro. (Tian y cols., 2003).

Actualmente no se han hecho investigaciones donde involucren a la especie *T. ni* en el silenciamiento de genes relacionados a la inmunidad por RNAi, además de que no se han implementado estrategias en un manejo integrado de plagas donde se administren RNAi asociados a bioinsecticidas en los programas de control biológico, ya que actualmente los bioinsecticidas utilizados para el control de plagas disminuyen su eficiencia debido a factores bióticos y abióticos, por tal motivo disminuyen su potencial de infección.

Actualmente, el comercio mundial de bioinsecticidas es muy importante y cada año van en aumento. Tan sólo en Canadá y México se estiman ventas por más de 20 mdd, 90 en EUA, 101 mdd en Europa y 49 mdd en el resto del mundo, con amplias expectativas de desarrollo para el control de plagas en diferentes cultivos en los países con mayor producción de alimentos en el mundo. En México se estima que el empleo de *Bt* para el control de plagas en campo es de 4 al 10% del total de insecticidas, mientras que el empleo de hongos entomopatógenos y organismos entomófagos es cada vez mayor en las principales regiones de producción agrícola. Este tipo de biocontrol se utiliza en México para el control de plagas de maíz, algodón, caña de azúcar, café, hortalizas, frutales y áreas forestales. Por otro lado, se espera que en las próximas décadas el crecimiento de insecticidas químicos será del 2%, debido entre otras cosas a que el uso de estos productos ha generado problemas de resistencia de plagas, mientras que los bioinsecticidas crecerán en un 10-15%, esto debido a las expectativas de ocupar nuevos nichos de mercado (plagas, artrópodos de importancia médica y pecuaria). En este escenario, los bioinsecticidas figuran como nuevos productos para una agricultura sustentable (García, 2006).

4.6 Ficha técnica de *Trichoplusia ni*

Trichoplusia ni pertenece al orden Lepidoptera y a la familia Noctuidae. Comúnmente conocido como gusano falso medidor, es un insecto plaga que se distribuye desde Canadá hasta México, afectando cultivos de hortalizas y cucurbitáceas, resaltando como plaga principal de la col. *T. ni* es un fitófago el cual tiene como etiología en los primeros tres *estadios* estar en el envés de las hojas, dejando el haz intacto; el cuarto y quinto *estadio* defolia las hojas, generando grandes agujeros. Esta plaga consume de alimento tres veces su masa corporal y su ciclo comprende de huevo, larva, pupa y adulto; la duración del ciclo es entre 30-35 días (**Fig. 14**). En México para su control se utiliza el control a base de insecticidas químicos y biológicos entre los cuales destacan: *Bacillus thuringiensis* como biológico, y químicos; azaridactina, endosulfan, fenvalerato, metamidofos, metomilo, naled, permetrina (SAGAR, 2000). En cuanto a lo insecticidas de origen biológico se ha observado diferencias en la susceptibilidad a algunas toxinas Cry en cepas colectadas de cultivos en el

estado de Guanajuato en donde se ha aplicado el formulado biológico Xentari (Tamez-Guerra y cols., 2006).

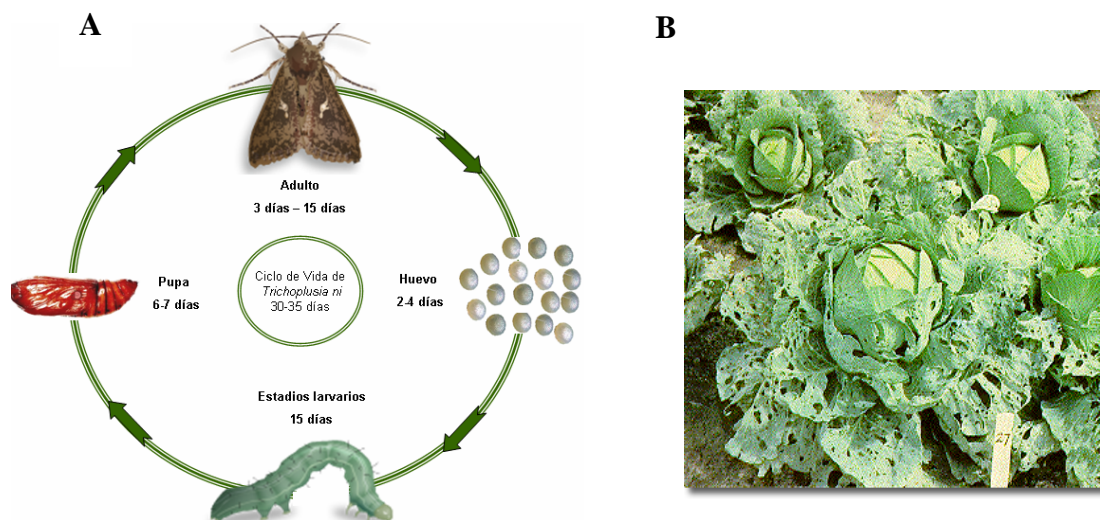


Figura 14.- Plaga principal de la col. A) Ciclo de vida del gusano falso medidor *Trichoplusia ni* (Hübner) y B) daños ocasionados en hojas de Col.

4.7 *Bacillus thuringiensis*

4.7.1 Morfología de *Bt*

Bt es una bacteria de entre 1.0-1.2 μm de ancho por 3-5 μm de largo, perteneciente a la familia Bacillaceae. El género *Bacillus*, situado taxonómicamente dentro del grupo de bacilos Gram positivos formadores de endosporas, engloba a especies con flagelación peritrica, con arreglo a la morfología de la spora y su ubicación en la célula esporulante o esporangio (Gordon y cols., 1973). La principal diferencia de *Bt* y otros bacilos estrechamente relacionados es la formación, durante el proceso de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la spora. El cristal presenta una importante diversidad de formas dependiendo de las proteínas que lo integran, encontrándose cristales bipiramidales, cúbicos, romboidales, esféricos, rectangulares, triangulares e irregulares, y con tamaños desde los 350 nm de diámetro con algunos cristales irregulares a las 2 μm de longitud en muchos bipiramidales (**Fig. 15**) (Bulla y cols., 1985). Entre las proteínas cristalinas que forman el cristal paraesporal se

encuentran 2 grupos de proteínas; son las proteínas Cry y Cyt. Desde el punto de vista del uso de las proteínas de *Bt* como materia activa de bioinsecticidas, las proteínas Cry son de un gran interés por su elevada toxicidad y su relativa especificidad ya que, en general, su espectro de huéspedes lo constituyen un reducido número de especies de insectos (Yu y cols., 1997). Las proteínas insecticidas de *Bt* fueron clasificadas en base a su estructura, secuencia de aminoácidos y espectro de huéspedes (Crickmore y cols., 1998).



Figura 15. Morfología de espora y cristal de *Bt*.

4.7.2 Espectro de huéspedes de las proteínas Cry

Muchos grupos taxonómicos de invertebrados son susceptibles a la acción tóxica del cristal de *Bt*. Dentro de la Orden Lepidóptera, encontramos especies susceptibles en la mayor parte de sus familias, destacando por su interés agronómico a Cossidae, Gelechiidae, Lymantriidae, Noctuidae, Pieridae, Pyralidae, Thumetopeidae, Tortricidae e Yponomeutidae. En el Orden Díptera, el espectro de actividad del cristal es menor, afectando, entre otras, a especies de Tephritidae, Culicidae, Muscidae, Simuliidae, y Tipulidae; mientras que en Coleóptera se reduce principalmente a Chrysomelidae, Curculionidae, Tenebrionidae y Scarabeidae. También hay cepas de *Bt* que producen cristales tóxicos para especies pertenecientes a los órdenes de Himenóptera, Hemíptera y Neuróptera. La actividad tóxica de los cristales no es activa tan sólo a insectos, extendiéndose también a nemátodos, protozoarios, tremátodos y ácaros (Tabla 2) (Addison y cols., 1993). Las proteínas Cry1 han sido consideradas tradicionalmente con una actividad específica contra insectos del orden Lepidóptera (Lereclus y cols., 1993).

Tabla II. Clasificación de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* según Hofte y Whiteley (1989).

Clase	Patotipo	Peso molecular (kDa)	Tipo de cristal
CryI	Lepidoptera	130-140	Bipiramidal
CryII	Lepidoptera/Díptera	65	Cúbico
CryIII	Coleóptera	73	Plano
CryIV	Díptera	135, 128, 65	Semiesférica/esférica
CryV	Lepidoptera/Coleóptera	81	Críptico
Cyt	Inespecífico	27	Redondeado- poliédrico

4.7.3 Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bt*

Ciertas cepas de *Bt*, durante el periodo de esporulación, producen inclusiones cristalinas proteicas que se denominan delta-endotoxinas, toxinas *Bt*, proteínas cristalinas insecticidas (abreviadas ICP, por sus siglas en inglés), conocidas generalmente como toxinas Cry. La mayor parte de la información sobre el modo de acción de las proteínas cristalinas se ha obtenido de estudios con larvas de lepidópteros. En general, a un nivel macroscópico se observa que durante la primera hora de haber ingerido alimento tratado con proteína cristalina, se deja de alimentar. Dentro de la segunda hora, el insecto va reduciendo su movilidad, llegando a paralizarse en unas 6 h o menos, dependiendo de la dosis de proteína cristalina ingerida. Finalmente, el insecto muere por inanición o por septicemia. A un nivel microscópico, las células intestinales pierden su estructura progresivamente. Las microvellosidades desaparecen y el retículo endoplásmico y las mitocondrias se desintegran gradualmente. Las células se vacuolizan e hinchan y algunas se desprenden de la membrana basal del tejido. Finalmente, las células afectadas se lisan (Mathavan y cols., 1989; Forcada, 1999). La mayor parte de las pruebas existentes indican que la acción de las proteínas cristalinas se produce exclusivamente al nivel de la membrana apical de las células epiteliales (Bravo y cols., 1992).

En general se ha podido establecer que, en el intestino de los insectos susceptibles, el daño celular se produce siguiendo básicamente los siguientes pasos: las proteínas cristalinas de *Bt* son ingeridas en su forma de protoxina y a continuación se solubilizan en el intestino medio del insecto liberando las proteínas cristalinas (toxina activada) las cuales se producen mediante una activación proteolítica. Las moléculas de proteína cristalina atraviesan la membrana peritrófica y se unen a moléculas específicas de la membrana epitelial; a continuación se insertan en la misma, produciendo poros que terminan provocando un desequilibrio osmótico y la lisis celular. El tejido intestinal, fuertemente dañado, impide la asimilación y retención de los compuestos vitales para la larva, lo cual acaba provocando la muerte del insecto (Fig. 10) (Knowles y cols., 1993).

4.7.4 Ingestión, solubilización y activación

Los cristales pasan a través del estomodeum (primer tramo del tubo digestivo del insecto) prácticamente intacto, hasta llegar al mesenterón (intestino medio). El cristal sólo se disuelve en un ambiente químico particular, tal como el pH altamente alcalino, existente en el intestino de ciertos insectos susceptibles (Fig. 10) (Koller y cols., 1992). Una vez solubilizadas, las proteínas cristalinas son procesadas, liberándose el fragmento tóxico. La digestión proteolítica de las protoxinas se realiza mediante distintos tipos de proteasas (la tripsina y la quimiotripsina) del intestino (Cannon, 1996). En la activación de la protoxina se produce una digestión progresiva de la proteína por el extremo carboxilo terminal hacia el amino terminal (Hodgaman y cols., 1990). Así, la ausencia en el intestino de condiciones para la solubilización impedirá que una proteína cristalina sea tóxica para una determinadas especie de insecto. Por ejemplo, se ha observado que protoxinas procedentes de la serovariedad *aizawaki* de *Bt* procesadas por jugo intestinal de lepidópteros, eran tóxicas para lepidópteros y dípteros, pero si eran procesadas con jugo intestinal de dípteros, sólo resultaban tóxicas para dípteros. Un dato adicional sobre la importancia de la activación proviene de insectos que han desarrollado resistencia frente a

proteínas cristalinas de *Bt* debido, al menos en parte, a cambios en la actividad proteolítica implicada en la activación de las protoxinas (Oppert y cols., 1994).

4.7.5 Paso a través de la membrana peritrófica

La membrana peritrófica recubre a la membrana apical de las células epiteliales, funcionando como una membrana de diálisis, permitiendo el paso de moléculas de un tamaño, inferior a 60 kDa y protegiendo al tejido de ataques bacterianos y de daños mecánicos que se pudieran derivar debido al paso del alimento (**Fig. 16**) (Dow y cols., 1986). Se sabe que ciertas moléculas de aminopeptidasa N (una enzima de membrana que parece ser que actúa *in vivo* como receptor de Cry1Ac en varias especies de lepidópteros), son liberadas del anclaje glicosídico que las une a la membrana epitelial y se podrían acumular en la membrana peritrófica (Lu y cols., 1996).

4.7.6 Unión al receptor e inserción en la membrana

En los pasos siguientes a la activación de las proteínas cristalinas, éstas se unen a las microvellosidades del tejido epitelial del intestino medio, insertándose posteriormente en la membrana de las células. Experimentos de aislamiento de proteínas de membrana han dado lugar a la caracterización de distintas proteínas con alta afinidad a las proteínas cristalinas del subgrupo Cry1A en distintos insectos. Las más numerosas corresponden a moléculas pertenecientes a la familia de las aminopeptidasas N. Distintas variedades de aminopeptidasa N de entre 120 y 170 kDa han sido identificadas como moléculas de unión para Cry1A en varias especies de lepidópteros (Luo y cols., 1997). Es un hecho generalizado el que las poblaciones altamente resistentes a un tipo de proteína cristalina tengan modificado el receptor para dicha proteína, de manera que su unión se ve disminuida de forma importante.

4.7.7 Formación del poro y lisis celular

Las proteínas cristalinas Cry producen pequeños poros en la membrana apical de las células columnares del intestino. Las células son hipertónicas

respecto al medio circundante, debido a la presencia de moléculas de gran tamaño incapaces de atravesar la membrana plasmática. La integridad celular se mantiene gracias a la permeabilidad controlada de la membrana y a la creación de un gradiente electroquímico que compensa el gradiente osmótico. El gradiente electroquímico está basado principalmente en el bombeo de unión monovalente (Na^+ o K^+) al exterior, de forma que su concentración interna es muy inferior a la externa. La apertura de poros en la membrana, debida a las proteínas Cry, anula el gradiente electroquímico al permitir el libre movimiento de los iones. La mayor concentración interna de solutos no difusible a través de la membrana, provoca la entrada de agua para producir un equilibrio osmótico con el exterior. Dado que las membranas celulares no son rígidas, esto provoca un hinchamiento de las células hasta ocasiona su lisis (**Fig. 16**) (Ballester y cols., 1999).

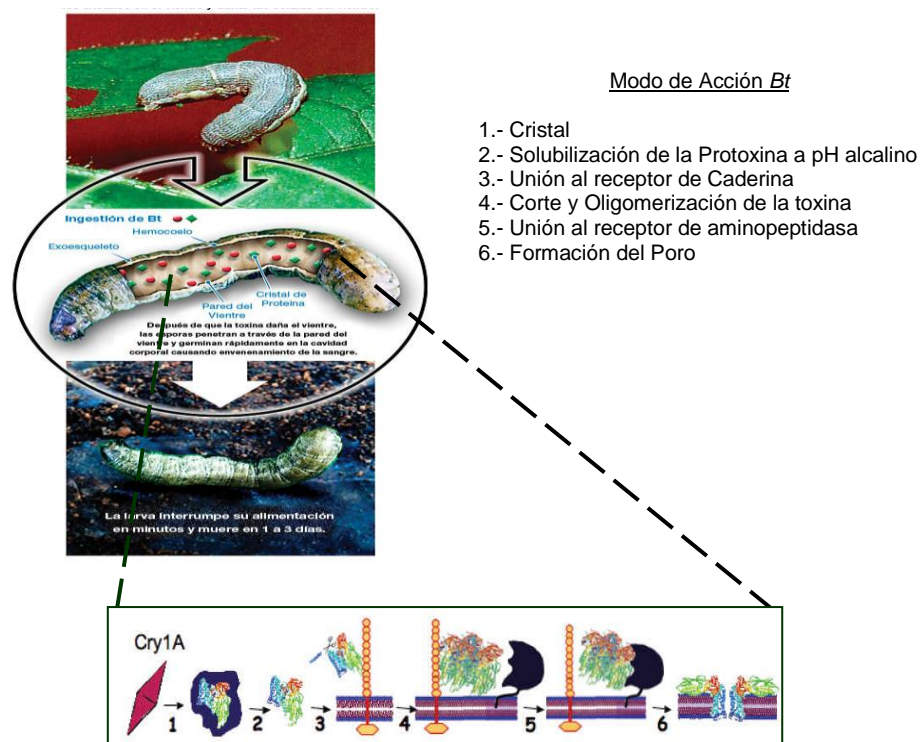


Figura 16- Modo de acción de toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

4.7.8 Bases de la resistencia a *Bacillus thuringiensis*

Mecanismos de resistencia en insectos

Los insecticidas actúan bloqueando o impidiendo un paso fisiológico indispensable en la vida del insecto. De esta forma, la resistencia podría aparecer si el insecto desarrolla un mecanismo que impida que un agente tóxico altere la función vital para la cual ha sido diseñada. Los mecanismos básicos de adquisición de resistencia son:

- 1) Evitando el contacto con el agente tóxico. Este mecanismo se encuentra poco estudiado y se presupone que debe ocurrir un cambio en el comportamiento del insecto,
- 2) Disminuyendo la penetración del agente tóxico, bien impidiendo su digestión o bien disminuyendo la permeabilidad a dicho agente,
- 3) Aumentando la velocidad de degradación del agente tóxico,
- 4) Modificando el blanco fisiológico sobre el que actúa el agente tóxico, de forma que no sea reconocido por este y la modificación no altere la función biológica normal, y
- 5) Reduciendo el efecto tóxico originado por el agente puede neutralizarse mediante un cambio metabólico que lo contrarreste.

Los productos comerciales basados en *Bt* han sido aplicados en los cultivos desde su aparición en el mercado en el año de 1957, especialmente en las zonas donde se había detectado casos de resistencia a los insecticidas químicos. Sin embargo, hasta el año de 1985 no se describieron casos de resistencia a productos basados en *Bt*. El primer caso descrito fue una población de *Plodia interpunctella* de los Estados Unidos, plaga de almacenes de grano, después de someterla a selección en el laboratorio. Por otro lado, el primer caso de resistencia encontrada en campo fue en *P. xylostela*. El descubrimiento de que los insectos podían también desarrollar resistencia frente a un patógeno natural como un modo de acción complejo, como es *Bt*, indujo a diversos investigadores a emprender estudios de selección en laboratorio con el fin de determinar los mecanismos fisiológicos y bases

genéticas de la resistencia a esta bacteria y a sus toxinas (MacGaughey y cols., 1992).

4.7.9 Resistencia de lepidópteros a *Bacillus thuringiensis*

Estudios en *Plodia interpunctella* (Hübner), empleando la toxina Cry1Ab marcada con I¹²⁵ mostraron que había una reducción en la unión de dicha toxina que se podía relacionar con una disminución de su toxicidad en una cepa resistente (cepa 343-R) al compararla con una cepa susceptible (Vanrie y cols., 1990).

Sin embargo, el papel de las proteasas intestinales en el desarrollo de resistencia a *Bt* se usó por primera vez en la cepa de *P. interpunctella* (cepa 198^R), resistente a *Bt* var *entomocidus*. Se encontró que los insectos resistentes activaban más lentamente la protoxina Cry1Ac que los insectos susceptibles, y que ello se debía a que los primeros carecían de una tripsín-proteasa en su intestino, supuestamente implicada en el procesado de las protoxinas Cry (Oppert y cols., 1994).

En una cepa de *H. virescens* (YHD2) con niveles muy altos de resistencia para las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1A y Cry1F, la única diferencia apreciable frente a una cepa susceptible era la pérdida total de la unión de la toxina Cry1Aa. En esta especie, las toxinas Cry1A comparten un sitio común. Un segundo sitio es compartido por las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac y un tercer sitio uno sólo Cry1Ac. La cepa resistente YHD2, el sitio compartido por las toxinas Cry1A estaría alterada, y que en los otros dos sitios de unión no modificados, no jugarían un papel importante en la toxicidad (Lee y cols., 1995).

A diferencia de lo encontrado en las poblaciones resistentes anteriores, dos estudios previos, llevados a cabo de forma independiente, demostraron que no existía una clara asociación entre la unión de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, y la resistencia de éstas en dos cepas resistentes de *H. virescens*. En uno de los estudios se observó que en los individuos resistentes había sólo una

disminución de la unión entre 2 y 4 veces al compararla con la encontrada en los insectos susceptibles, pero estas diferencias eran compensadas por la concentración de sitios de unión. En el otro estudio, no se encontraron diferencias significativas en la afinidad y concentración de los sitios de unión entre las larvas resistentes y sensibles. En un estudio posterior, se observó que había pequeñas diferencias en la velocidad del procesado proteolítico de las toxinas, entre la cepa resistente y una cepa susceptible, y que los insectos resistentes parecían tener una capacidad mayor de reparación del daño producido por la toxina en el epitelio intestinal (Forcada y cols., 1999).

Se ha visto que la herencia de la resistencia en una cepa de *H. virescens*, seleccionada con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* que había sido modificada para producir la protoxina Cry1Ab, era autosómica, parcialmente dominante y en la cual participan diversos factores génicos. En otra cepa de *H. virescens*, cepa YHD2, demostraron que la resistencia a Cry1Ab y Cry1Ac, era parcialmente recesiva y era debida a un único *locus* o un grupo de *loci* estrechamente ligados (Armstrong y cols., 1995).

En una cepa de *H. virescens* (YHD2), seleccionada con *Bt var kurstaki* HD-73 (que sólo produce la toxina Cry1Ac), se observó una considerable resistencia cruzada a las toxinas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1F. En base a los modelos de receptores y al mecanismo de resistencia descrita en *P. xylostella*, parece claro que la resistencia cruzada entre toxinas del grupo Cry1A, y entre éstas y Cry1F, sea debido a la pérdida de unión de dichas toxinas al receptor compartido. La resistencia cruzada a Cry1J, así como la encontrada en el cepa YHD2 de *H. virescens*, es muy probable que también sea debida a la alteración de un receptor común, aunque todavía no existen datos publicados al respecto (Sayyed y cols., 2000).

En cuanto a los fenómenos de resistencia encontrados en reportes recientes de lepidópteros se ha observado el modo de acción de las toxinas Cry1A. Se han agrupado estos eventos como el modo 1 en insectos que han desarrollado resistencia, en el cual es caracterizado a la herencia recesiva, en el cual se han encontrado resistencia a más de 500 veces debido a la

reducción de la unión de Cry1A y se ha observado resistencia cruzada con Cry1C. Este denominado fenómeno de modo 1 se ha caracterizado en tres especies de lepidópteros plaga; *H. virescens*, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) y *Helicoverpa armigera* (Hübner). Este modo 1 es causado por mutaciones en la unión de la toxina Cry1A al dominio 12 del receptor caderina en intestino medio, presumiblemente fue removido o modificado el sitio de unión. En otra especie en *P. xylostella* el modo 1 ligado a la modificación en caderina, no esta relacionado a la resistencia, pero similar a *P. interpuunctella* el fenómeno de resistencia esta ligado a la solubilización de la protoxina mediado por proteasas (Heckel y cols., 2007).

Por otro lado, en otro grupo de investigadores relacionaron la inmunidad en *T. ni* contra *Bt Kurtsaki*, en el cual compararon una colonia susceptible y una resistente expuestas a *Bt* en organismos de campo en Canadá, encontraron que en la colonia susceptible había una disminución significativa en los niveles y cantidad de hemocitos circulantes, además de observar que también se disminuía los niveles de FO los cuales están involucrados en la melanización y mecanismos de defensa en cuerpos extraños (Ericsson, 2009).

Por lo anterior expuesto en este trabajo nos enfocamos en evaluar la relación entre la exposición y susceptibilidad de *T. ni* a *Bt* y la respuesta inmune innata, de forma normal o después de la aplicación de dsRNA e inmunosupresores.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material Biológico

Cepas de lepidópteros

El lepidóptero empleado como modelo de inmunidad innata en nuestros experimentos fueron dos cepas, una de laboratorio y otra de campo de *Trichoplusia ni*. Las cepas se mantuvieron en dieta artificial, en incubación, a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $75\% \pm 10\%$ (Tamez-Guerra y cols., 2006).

Cepas bacterianas

Escherichia coli, cepa DH5 α

Escherichia coli, cepa HT115

Plásmidos utilizados para clonar transcritos (pGEMT). Y para producir dsRNA (pL4440).

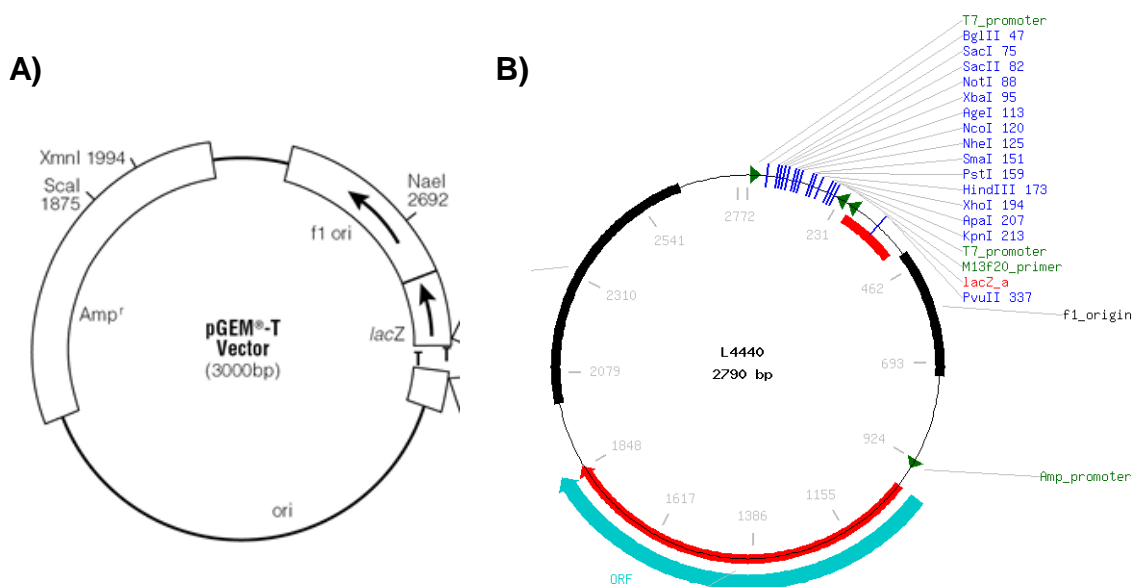


Figura 17. Plásmidos utilizados, A) Vector de clonación de Productos de PCR pGEMT (Promega), B) Vector de Producción de dsRNA L4440 (Adgene).

Formulados a base de *Bt* empleados

Xen Tari:

Valent USA Corporation

XenTari®

Biological Insecticide

Dry Flowable

ACTIVE INGREDIENT:

Bacillus thuringiensis, subsp. *aizawai*, Lepidopteran

active toxin(s) 10.3% w/w

INERT INGREDIENTS 89.7% w/w

TOTAL 100.0% w/w

Potency: 35,000 Diamondback Moth Units per mg of product or 15.9 billion Diamondback Moth Units per pound of product.



Dipel:

Ingrediente activo:

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki*
con una potencia de 32,000 unidades
Internacionales por mg de producto

No menos de:..... 10.30

(Equivalente a 103 g de I.A./kg)

Ingredientes inertes:

Diluyentes, humectantes y dispersantes

No más de:..... 89.70

Total: 100.00



5.2. Método de infección con entomopatógenos

Los bioensayos se realizaron en laboratorio y se utilizaron los entomopatógenos en este caso un derivado de la bacteria entomopatógena (formulado a base de esporas y cristales de *Bt*. Dichas técnicas de infección se desarrollaron como lo indica la referencia (Navon y Ascher, año). Estos bioensayos se realizaron a la dosis calculada de concentración letal media (CL₅₀) mediante el análisis Probit (Polo-Plus, 2007) (LeOra, 1987).

Bioensayo con *Bacillus thuringiensis*

Para este bioensayo se empleó el bioinsecticida Dipel (Valent Biosciences) el cual está hecho a base de esporas y cristales. Este formulado es específico para control de plagas de lepidópteros, especialmente para

controlar poblaciones de *T. ni*. Dicho productose usó en larvas neonatas de *T. ni* y se administró sobre la superficie de la dieta en un rango de 100 – 1000 Unidades internacionales (UI). Cabe mencionar que el producto está a una concentración de 32000 UI/mg) y para determinar la CL₅₀ por medio de un ensayo de dosis-respuesta, empleando el análisis probit por medio del programa computacional POLO-Plus (Tamez-Guerra *et al.*, 1998).

5.3.- Obtención de especímenes a evaluar

Se obtuvieron larvas neonatas de 1er. *estadio T. ni* posteriormente a la sobrevivencia a los 7 días post-bioensayo con *Bt*, en el cual se encontraban entre 2do y 3er *estadio* larval. Se congelaron a -70°C para su posterior evaluación. Se extrajo ARN de larvas totales y se realizó el ADNc para los análisis de transcritos involucrados en la inmunidad innata.

5.4.- Ensayo de fenoloxidasa (FO).

Para determinar por un método colorimétrico la actividad de la FO se tomaran 10 µL de la hemolinfa de larvas neonatas de 1er. *estadio T. ni* posteriormente a la sobrevivencia a los 7 días post-bioensayo con *Bt*, dichas larvas se homogenizaron con un pistilo en un tubo eppendorf y se realizó una centrifugación para obtener hemolinfa libre de restos celulares. Posteriormente se colocaran 10 µL en pozos de una multiplaca para ELISA de 96 pozos, y se les agregó 200 µL del substrato L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa - 100mM en amortiguador PBS 1X), se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min en oscuridad, se observaron los resultados y se midieron las densidades ópticas a 570 nm (Lanz, 1993).

5.5.- Inmunosupresores

Se utilizaron dosis independientes para cada droga para cada inmunosupresor. Cada inmunosupresor se administró en la dieta colocando en

la superficie 50 μ L, se dejó secar por 10 min y posteriormente se colocaron las larvas de *T. ni* del 4to. *estadio* para observar los efectos del supresor, debido a que este *estadio* es el que mayor nivel de fenoloxidasa se encuentra. Para los biensayos de reto con *Bt* más inmunosupresor se realizó al 1er. *estadio*.

Dosis utilizadas de cada Inmunosupresor:

Dexametasona - 50 ng/ μ L

Tropolona - 1 mM/ μ L

Feniltiourea - 10 mM/ μ L

Pentoxifilina - 500 ng/ μ L

Ciclosporina A - 100 ng

5.6.- Oligonucleótidos para la detección de transcritos

En primera instancia se realizó una búsqueda de secuencias disponibles de DNA complementario de *T. ni* para los genes que codifican para los genes involucrados en inmunidad innata: atacina, cecropina, defensina, gloverina, gallerimicina, hemolina, lebocina, lisozima y receptor de peptidoglucanos. Las secuencias se obtuvieron de la base electrónica de datos de PUBMED y se analizaron para el diseño de oligonucleótidos específicos que permitan amplificar secuencias del RNAm de cada gen seleccionado (Tabla 3).

Tabla III- Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR punto final.

GEN	Genbank	Oligonucleotidos	Tamaño	Alineamiento
		F- ATG GCT GAA GAA AAC TGG AAT		

PRS5	AY837869	R- TTA ACG GTT GGA CTT AGC AAC	782 pb	54 °C
Atacina	U46130	F- ATG TTC ACC TAC AAA TTG ATT R- CTA CCA CTT ATT ACC AAA AGA	764 pb	51 °C
Cecropina	U38645	F- ATG AAT CTC GTG AAG ATT TTG R- CTA TTT TCC AGT GAT AGA GGC	189 pb	54 °C
Gloverina	AF233590	F- ATG CAG TCG TCT ATT TTA TTA R- TTA AAA ATC ATG TTC AAT TTT	525 pb	50 °C
Lebocina	AF233589	F- ATG AGT AAA TAC ATT CTG GTG R-TTA AAC GTA GAT AGG GAA CCG	432 pb	54 °C
Lisozima	U38782	F- ATG CAA AAA CTC AGA GTA TTT R- TTA GCA TTT GCT GAT GTC GCA	706 pb	58 °C
PGRP	AF076481	F- ATG GAA ATA CTA TTT GTG CTA R- TCA GTT ATC TAG GAA ATG GTC	549 pb	58 °C

5.7.- Extracción de RNA *T. ni*.

Se homogenizó un grupo de tres intestinos medios ó 20 larvas completas de 1er estadio con 1 mL de Trizol (Gibco BRL), para la extracción del RNA. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente y se le añadió 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de Trizol utilizado, y se homogenizó en vortex por 15 seg. Posteriormente se incubó de 2-3 min a temperatura ambiente y entonces se centrifugó a 12,000 rpm/15 min. Para la obtención de RNA, se recuperó la fase transparente del sobrenadante, y se transfirió este contenido a otro tubo eppendorf, al cual se agregaron 500 µL de isopropanol, se agitó con vortex e incubó a -20°C por 15 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante, se lavó la pastilla de RNA con 1 mL de etanol al 75% con agua DEPC, se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua DEPC. Finalmente se incubó a 65°C por 10 min.

5.8.- Síntesis de DNAc

Para la síntesis de la hebra de DNAc (DNA complementario) a partir de RNA se llevó a cabo la reacción de RT – PCR. Para ello se adicionaron 5µg de RNA, buffer de reacción 5X (250 mM tris-HCL pH 8.3, 375 mM KCL, 1.5 mM

MgCl₂), 50 mM de dithiothreitol, 1U de inhibidor de RNAsas, 800 μM de dNTPs, 2.5 μM de oligo dT12-18, 200 U de transcriptasa reversa del virus de la leucemia Moloney Murina (MMLV) y la mezcla se incubó para que se realizara la reacción a 37°C por 2 h: finalmente se inactivó la enzima a 60°C por 10 min.

5.9.- Análisis de la expresión de genes involucradas en la inmunidad innata por PCR punto final.

Los genes analizados fueron: atacina, cecropina, gloverina, gallerimicina, lebocina, lisozima y el receptor de peptidoglucanos utilizando como control el gen constitutivo de la proteína ribosomal S5. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen de 50 μL, en presencia de 5 μL de templado (DNAc), buffer 1X (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 800 μM dNTP's, 10 pmol de cada oligonucleótido para cada transcrito, 1 U de taq DNA polimerasa (Promega). Las muestras se amplificaron en un termociclador (PTC-200, MJ RESEARCH). La reacción de PCR se inició con una fase de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, y posteriormente 35 ciclos. Cada ciclo consistió de 92°C por 1 min; la fase de alineamiento a 48 - 62°C por 1 min, y una extensión por 2 min. Finalmente, se usó una extensión por 7 min a 72°C. Se tomaron 8 μL de la reacción de PCR para observar la amplificación en un gel de agarosa al 1.2 % y se visualizaron por medio de la tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta en un transiluminador.

5.10.- RT-PCR en Tiempo Real

Esta técnica se realizó para poder comparar y valorar las diferencias de expresión en los transcritos de los genes involucrados en la inmunidad innata. Para la reacción se tomaron 2 μL de DNAc para cada reacción y 1 μL para control endógeno; además se usó el buffer MasterMix (Applied Biosystems) que contenía 400 μM de cada dNTP, 40 nM Tris-HCl pH 8.4, 100 mM KCl, 6 nM de MgSO₄, 2.5 unidades de Taq polimerasa y se usaron 100 ng de oligo por

cada reacción de 50 μ L. Las condiciones estimadas de temperaturas en la reacción de PCR tiempo real fueron las siguientes:

Paso	<u>Protocolo de reacción</u>		
	Temperatura	Tiempo	PCR Tiempo real
1 ciclo (desnaturalización inicial)	94°C	10 min.	-----
40 ciclos de reacción de PCR (alineamiento y extensión)	94°C	30 seg.	-----
	64°C	30 seg.	Lectura de fluoróforo (FAM)

Todas las reacciones se realizaron por duplicado y el análisis de resultados se realizó con ayuda del software del termociclador PCR en tiempo real (Bio-rad). El juego de oligos para PCR cuantitativo se sintetizó por medio de la compañía Applied Biosystems, los cuales incluyeron el par de oligos sentido y antisentido, además de la sonda TaqMan®. (Tabla 4).

Tabla IV. Secuencias de Oligonucleotidos marcados con FAM (Sondas Taqman) utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR en tiempo real.

Gen	Sondas TaqMan (Applied Biosystem) FAM
<u>PRS5</u>	Forward - TGTTGAGCGCTTGACAACTCT Sonda - ACGTCCGTGCATCATC Reverse - GCCATAAGTTTCTTGCCGTTGTT
<u>Atacina</u>	Forward - CGGCTTGTCCGTAATGAAGGA Sonda - CTGTCGCCGAAGCCA Reverse - TGCCAGTCCCGTCAG

<u>Cecropina</u>	Forward - TGTTTCGCTTGTCTGGTCTTCAC Sonda - CAGGGACCGCCGTCACA Reverse - TGTTCTGTCCAACCTTTTCAATTTTCTTG
<u>Defensina</u>	Forward - GATGAAAGTGTGTGCCAATAAGCA Sonda - TTGCTGCCAAGGCTTC Reverse - TGATTTCTCCAATTTTGTGGTATCCTCTT
<u>Gallerimicina</u>	Forward - TTCCTGGCGCAGTAGAATCTG Sonda - ATGTCCCCATTTTGCC Reverse - TCGGCCCTTGGATAGTAACCTT
<u>Gloverina</u>	Forward - CGACTATGGTGGCAGCAGTATA Sonda - CTTGGTGGCAAAGTAG Reverse - GCTCTTGC GTTGTGCTTAGAC
<u>Lebocina</u>	Forward - CATCATGGTGAGAGGGTTGAGA Sonda - TCGGCGTCCCAAGACT Reverse - GGCCGGCTGCTACCA
<u>Lisozima</u>	Forward - GCGCCAAGAAGATCTACAAACG Sonda - ACGCCTGGAAGTTGT Reverse - AGTTCCCTGGCAGTGGTTAC
<u>PGRP</u>	Forward - GCCCTGAGAGCATTGCTTAGAT Sonda - CCTCGCTCCACACCAC Reverse - GGTAGTTGGCGGTGAGATGA

5.11.- Método de análisis de muestras por PCR tiempo real

Se realizó la cuantificación relativa de cada transcrito usando el método de Livak, como se describe a continuación.

A) Primer paso, normalizar el ΔC_t del gen problema restando el gen de referencia.

- ΔC_t (calibrador) = C_t (gen problema) - C_t (control endógeno)
- ΔC_t (muestra) = C_t (gen problema) - C_t (control endógeno)

B) Segundo paso, normalizar ΔCt de la muestra restando el calibrador

➤ $\Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct muestra}) - (\Delta\text{Ct calibrador})$

C) Tercer paso, calcular la expresión en radios

➤ $2(-\Delta\Delta\text{Ct}) = \text{expresión normalizada en radios}$

Posteriormente se analizaron y se graficaron las diferencias de expresión de los distintos genes.

5.12.- Producción y Purificación de RNA de interferencia

Para la producción de RNAi se tomó la secuencia completa de los genes de mayor respuesta a la infección de entomopatógenos en *T. ni*. Los genes previamente clonados en el vector pGEMT se subclonaron con los sitios de restricción Not I y Apa I en el vector L4440 (el cual consta de dos secuencias promotoras T7 para expresión bidireccional y es un sistema inducible con IPTG). Los RNAi se produjeron en la cepa de *E. coli* HT115. Esta cepa carece de la enzima Rnasa III, la cual es responsable de la degradación de RNA de doble cadena.

Las construcciones de los genes seleccionados de inmunidad innata clonados en el vector L4440 se transformaron en la cepa HT115 de *E. coli* usando la metodología estándar de células calcio competentes y posteriormente se obtuvo una colonia transformante para iniciar la inducción de producción del RNAi. Para la inducción de la producción de RNAi se inoculó la colonia transformada en caldo 2XYT y se agregó los antibióticos ampicilina (50 ug/mL) y tetraciclina (40 ug/mL). Posteriormente se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, para inmediatamente después agregar 0.5 mM del inductor IPTG por 4 h para inducir la producción de los RNAi clonados en el vector L4440. En cuanto a la purificación de los RNAi, se realizó una extracción total de ácidos nucleicos, al cual ya purificado se le agregó DNAsa I para remover DNA, RNAsa pancreatica para remover RNA de cadena sencilla. Posteriormente se observaron los RNA de doble cadena producidos en un gel de agarosa para visualizar en un transiluminador la producción de los RNAi (Timmons, 2001).

5.13.- Administración del RNA de Interferencia y análisis de inhibición.

La aplicación de los RNAi seleccionados se administró mediante la impregnación sobre la dieta de la cepa inducida y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente se sometió a las larvas neonatas de *T. ni* a la bacteria que producía el dsRNA. La eficiencia de la inhibición por interferencia *in vivo* se corroboró mediante el análisis por RT-PCR punto final (30 ciclos).



5.14.- Análisis estadístico

Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y se compararon contra un control no tratado. Estos resultados se analizaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) mediante el software SPSS versión 15 y se analizaron las diferencias significativas con un límite de confianza de 0.05, para observar diferencias en relación al control y así poder observar las variantes en la mortalidad con *Bt*.

6. RESULTADOS

6.1 Detección de Transcritos por RT-PCR

Se detectaron por RT-PCR los transcritos en el lepidóptero *T. ni* en el cual se analizaron los que codifican para los genes involucrados en la inmunidad innata y como control endógeno se utilizó la proteína ribosomal S5 (PRS5). La detección se realizó por medio de la técnica de RT-PCR convencional utilizando larvas totales para la extracción de ARN, utilizando oligonucleotidos específicos para cada gen. Para el gen constitutivo se detectó a 782 pb, atacina 764 pb, cecropina 189 pb, gloverina 525 pb, lebocina 432 pb, lisozima 706 pb y PGRP a 549 pb (**Fig. 18**).

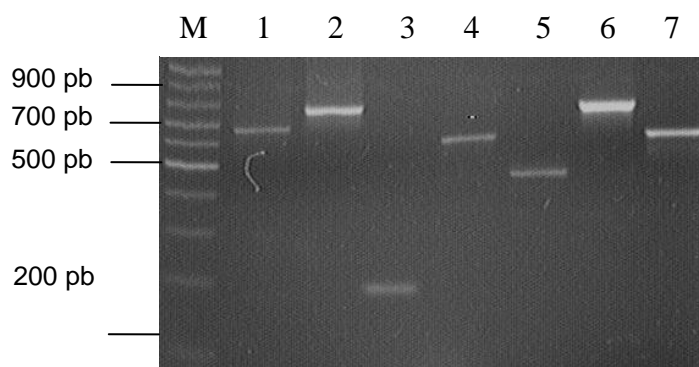


Figura 18. **Detección por RT-PCR punto final de los transcritos que codifican para péptidos antimicrobianos.** M; marcador 100 pb (Promega), 1; Proteína Ribosomal S5 (Control endógeno), 2; Atacina, 3; Cecropina, 4; Gloverina, 5; Lebocina, 6; Lisozima, 7; Proteína de reconocimiento de peptidoglucanos (PGRP). Gel de azarosa al 1.2%.

6.2 Análisis de la actividad de fenoloxidasa

Niveles de actividad de la fenoloxidasa en el desarrollo de *Trichoplusia ni*.

Los ensayos de FO se realizaron en la hemolinfa, ya que la actividad de esta enzima es un indicador de los niveles de melanización involucrada en la respuesta celular contra patógenos. Como parte de los primeros análisis se evaluó y determinó la actividad de la FO en *T. ni* en los distintos *estadios* larvarios y fases de desarrollo del ciclo del lepidóptero (**Fig. 19**). Esta evaluación nos sirvió de plataforma para observar los cambios y niveles de defensa durante su desarrollo. Encontrando que en los primeros *estadios* (1,2 y 3) se encontraban menor actividad con respecto a los *estadios* tardíos (4, 5, prepupa y pupa) de hasta 100 %-500% mayor, otro resultado fue que la fase de adulto se observaba menor actividad hasta 30 % del macho en relación a la hembra.

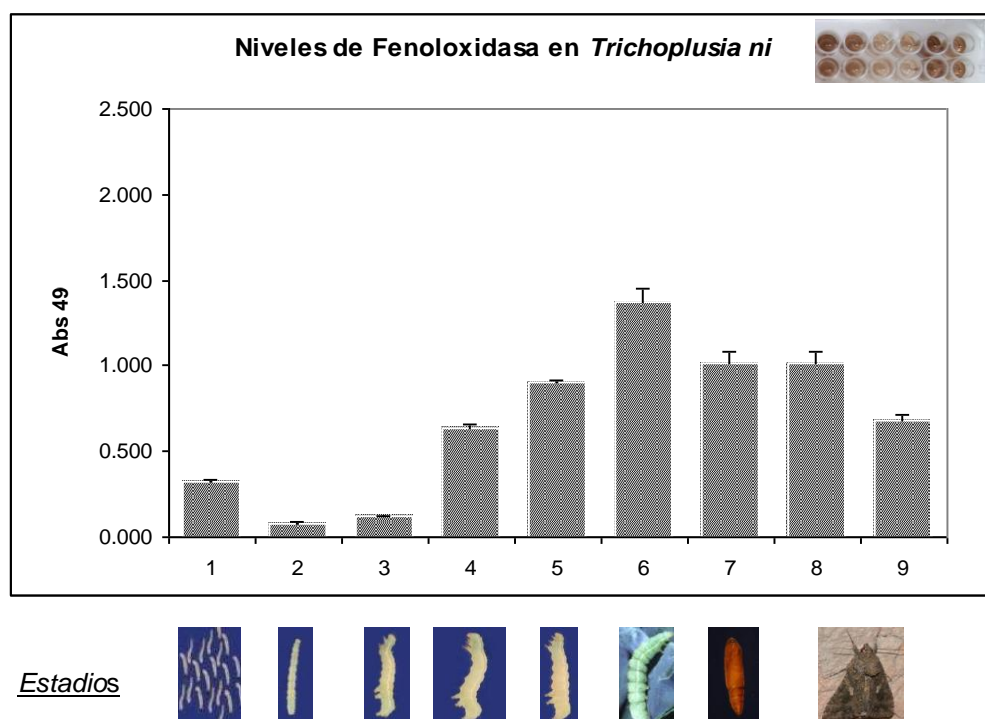


Figura 19. Niveles de fenoloxidasa en los distintos *estadios* de desarrollo de *Trichoplusia ni*.

6.3 Efecto de *Bt* sobre la actividad de Fenoloxidasa

En cuanto a la relación que existe en respuesta de la FO cuando se somete a *Bt* en su respectiva DL₅₀. Se aplicó el bioinsecticida en larvas neonatas y se analizó al 7mo día para su evaluación. En dicho experimento se compararon dos colonias de *T. ni*, una de laboratorio expuesta a *Bt* (200 UI) y una de campo que se estableció en el laboratorio y fue expuesta a misma dosis. El resultado mostró un ligero incremento del 10 % de la FO en la colonia de laboratorio, mientras que en la cepa de campo mostró un ligero descenso del 10 % de los niveles de la misma. Dicha comparación no mostró diferencia significativa (**Fig. 20**). Por otra parte cuando se analizó el contenido total de hemocitos en la hemolinfa se observó una disminución de un 25 % cuando se trataba con *Bt*.

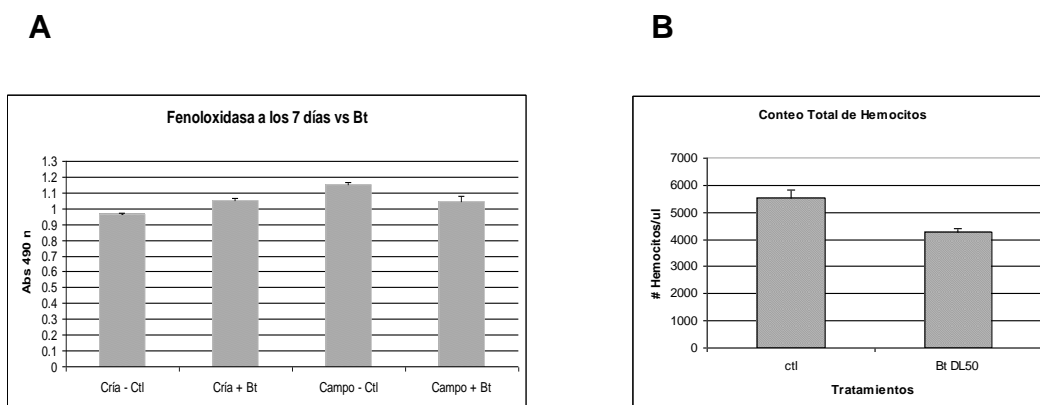


Figura 20. **Evaluación de parámetros inmológicos en hemolinfa de larvas expuestas a *Bt*.** A) Niveles de Fenoloxidasa en dos colonias de *Trichoplusia ni* expuesta a *Bt*. B) Cantidad de Hemocitos totales en respuesta a *Bt*.

6.4 Efecto de Inmunosupresores sobre Fenoloxidasa

En este experimento se evaluó el efecto que tienen los inmunosupresores en los niveles de FO de la hemolifa de larvas de 4to. estadio, los inmunosupresores tuvieron efecto en la disminución de la FO. Entre los cuales se encontró un mayor efecto supresor ; en feniltiourea reducción de FO hasta 40 %, dexametasona 30 %, tropolona 60 %, ciclosporina A 50 %, siendo estos dos últimos los más potentes inmunosupresores que disminuyen la FO hasta 2 veces. Por otra parte se reto a *Microccocos luteus*, un inductor de la inmunidad de insectos utilizado para incrementar niveles de defensa, encontrando un incremento en la FO de 30 % cuando se expuso a dicha bacteria (**Fig. 21**).

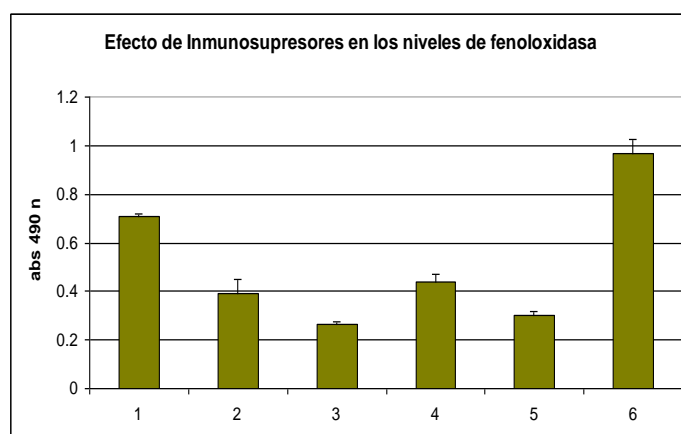


Figura 21. **Niveles de fenoloxidasa en larvas expuestas a inmunosupresores.** 1) Control, 2) Feniltiourea, 3) Tropolona, 4) Dexametasona, 5) Ciclosporina A, 6) *Microccocos luteus*.

Debido a la disminución de la FO por medio de inmunosupresores se amplió el uso de ellos para observar los efectos cuando se sometía a los tratamientos de *Bt*. Para este experimento se expuso a la DL₂₅, la cual corresponde a 100 UI, posteriormente cada uno de los inmunosupresores. Encontrando resultados notables con los tratamientos con inmunosupresores (feniltiourea y CsA) encontrando un incremento a la susceptibilidad hasta un 50 % con FTU y 75 % con CsA en relación al control usando solo *Bt*. Por lo tanto se logro incrementar la susceptibilidad mediado por inmunosupresores (**Figs. 22 y 23**).

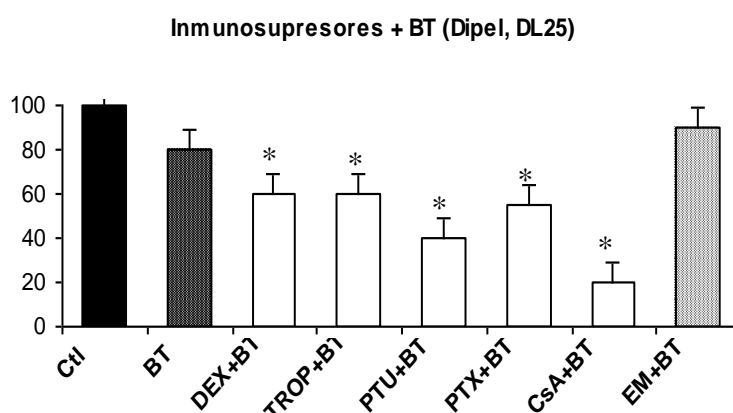


Figura 22. **Efecto de los inmunosupresores y la exposición a *Bt* en larvas de *T ni***. Se tomaron larvas neonatas de 1er. *Estadio* y analizada la mortalidad al 7mo. Día. * Diferencia significativa en respecto al tratamiento con *Bt* comparado con el control.



Figura 23.- **Efecto de de la exposición con *Bt* en presencia del inmunosupresor Ciclosporina** A. A) Control, B) Tratamiento con Ciclosporina + *Bt*.

6.5 Efecto del Inductor de fenoloxidasa *Micrococcus luteus* sobre *Trichoplusia ni*

Debido a que se determinó que los niveles de FO se incrementaban cuando se expuso a la bacteria *M. luteus* se prosiguió a retar con la bacteria e inducir la FO y posteriormente agregar el *Bt* (Dipel) a 200 UI y observar la respuesta de susceptibilidad/sobrevivencia después de la inducción. En este experimento se encontro que la sobrevivencia incrementaba hasta un 30 % más en relación al control con *Bt*, usando la dosis letal media en ambos tratamientos. Este resultado nos muestra la participación de la inmunidad innata en la tolerancia al *Bt* (Fig. 24).

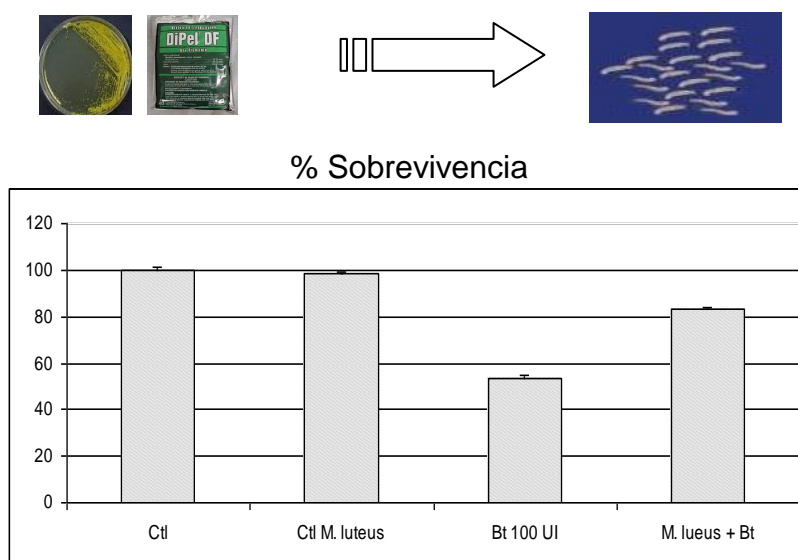


Figura 24. Efecto del inductor *Micrococcus luteus* sobre *Trichoplusia ni* y su efecto a la exposición a *Bt*.

6.6 Análisis transcripcional de *Trichoplusia ni* expuesto a *Bt* (Xentari)

Entre los primeros experimentos con *T.ni* se expuso al formulado a base de *Bt* Xentari-Dupont. En este bioensayo se expuso a una colonia de campo y otra de laboratorio y se analizó la expresión semicuantitativa de transcritos que codifican para inmunidad innata por RT-PCR punto final. Durante el análisis se observó que los niveles de expresión de la lisozima y al receptor de peptidoglucanos (PGRP) se encontraban en la mayoría de los *estadios* con mayor frecuencia de detección entre las distintas etapas de desarrollo. Por otra parte se encontró que la cepa de campo se encontraba con mayor frecuencia la expresión de transcritos, encontrándose en mayor proporción la lisozima y el PGRP, en el caso de este último hasta un 50 % en relación a la cepa de laboratorio (**Fig. 25**). Sin embargo cabe resaltar que estos dos transcritos se encontraron presentes a nivel de intestino medio y larvas totales. En la cepa de campo se encontró sobreexpresión relativa en comparación a la no expuesta y a la cepa de laboratorio (**Fig. 26**). Estos resultados se sometieron a 500 UI de Xentari en larvas neonatas y se analizó hasta su respectivo *estadio*. En el caso de Intestino medio fue hasta el 4to. *estadio* larvario.

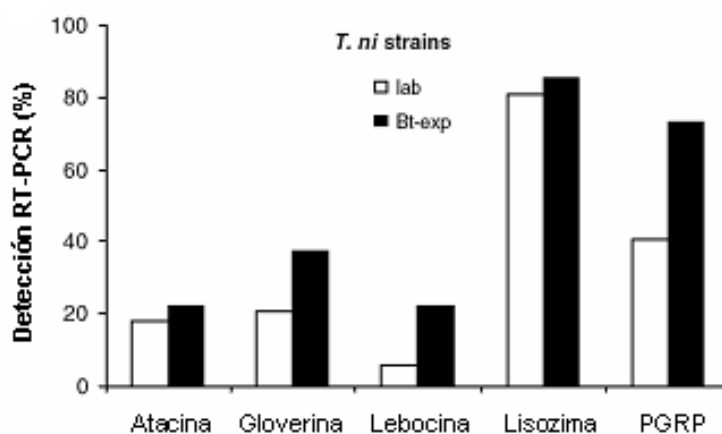


Figura 25. Frecuencia de detección de transcritos involucrados en la inmunidad innata en *Trichoplusia ni* expuesto a *Bt* (Xentari).

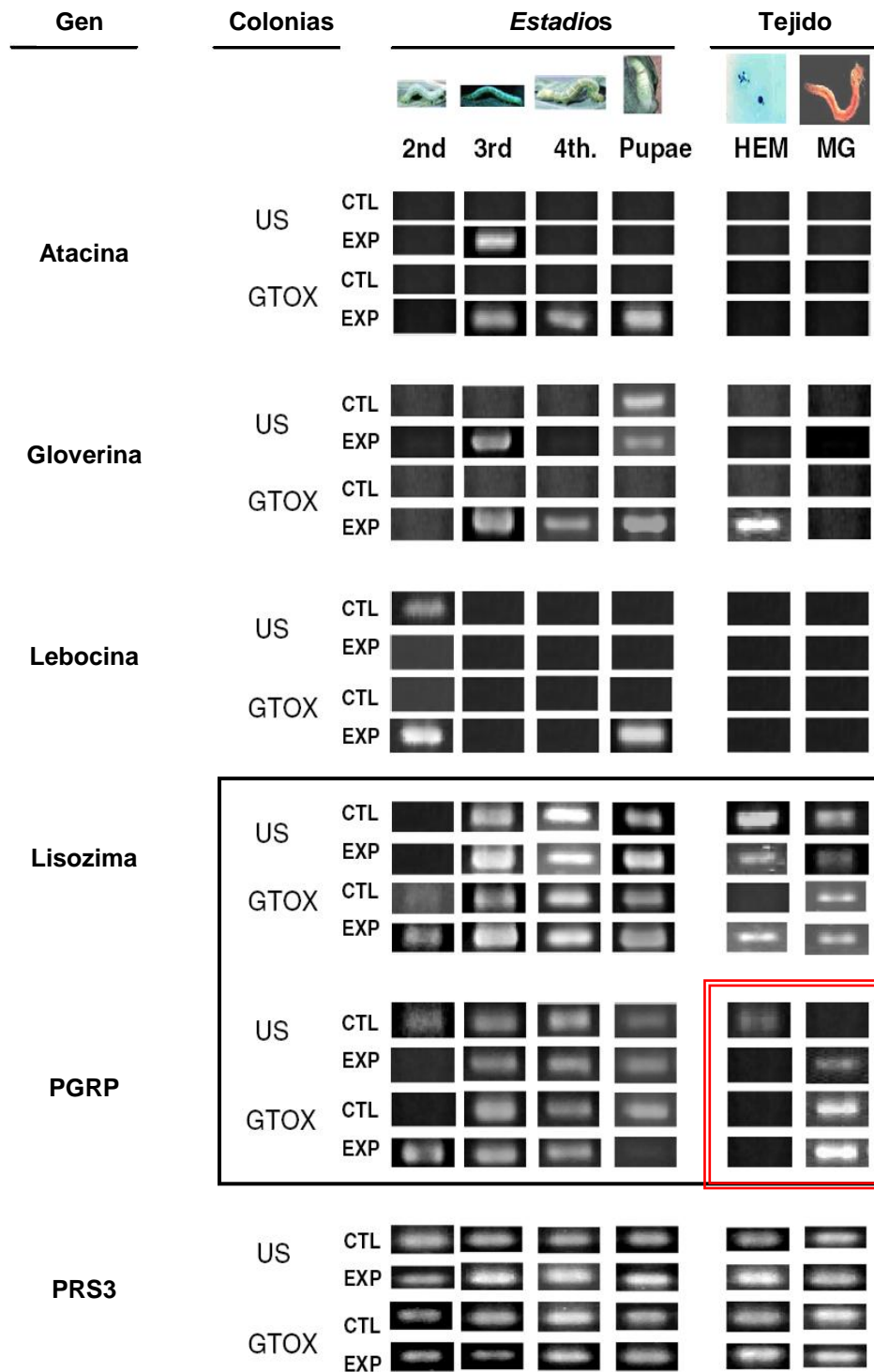


Figura 26. **Análisis de transcritos involucrados en la inmunidad innata en *Trichoplusia ni* expuesto a *Bt* (Xentari).** US (Cepa de laboratorio), GTOX (Cepa de campo). Ctl; control no expuesto, Exp; Expuesto a 500 UI.

6.7 Análisis transcripcional de *Trichoplusia ni* expuesto a *Bt* (Dipel)

En este otro bioensayo se planteo utilizar el formulado a base de *Bt* Dipel el cual es el más común utilizado en control biológico en los campos agrícolas mexicanos para el control de plagas de lepidópteros. Este experimento consto de someter a larvas neonatas de *T. ni* a la DL50 de 200 UI, y posteriormente analizar al 7mo día y evaluar las sobrevivientes por RT-PCR en Tiempo Real mediado por sondas Taqman. En este experimento se expuso a *Bt* y se observo que se disminuían los niveles de expresión de PAMs, en el caso de la cecropina no se encontró detección. En atacina disminuyo hasta 8 veces, defensina disminuyo 4 veces, gallerimicina 2 veces, gloverina 4 veces, lebocina un ligero incremento de 0.5, lisozima disminución de 8 veces en relación al control, pero el resultado mas sobresaliente de este experimento fue que se observo un incremento y sobreexpresión del receptor PGRP hasta 2 veces. Todos los niveles cuantitativos de expresión se compararon por el método Livak, para demostrar las diferencias de expresión de cada gen en comparación con el control no tratado con *Bt* (Fig. 27).

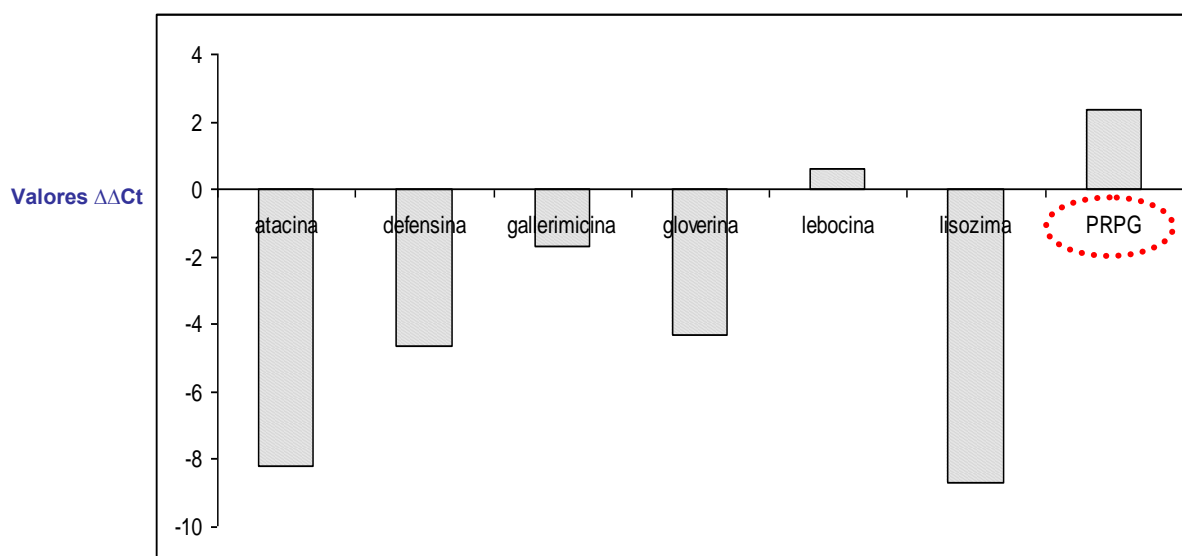


Figura 27.- Análisis transcripcional de genes que codifican para inmunidad innata por RT-PCR en Tiempo Real (Taqman), en tratamiento con *Bt*. Analizados al 7mo. Día posteriormente a la exposición a *Bt* (Dipel).

6.8 Producción y efecto de dsRNA sobre *Trichoplusia ni*

Para la producción de dsRNA el cual se utilizó para bloquear los genes relacionados a la inmunidad, fue mediante el vector de producción de dsRNA L4440 y transformado en la cepa de *E. coli* HT115 (**Fig. 28A**). Las clonas que se realizaron para producir los dsRNA fueron las que contenían el gen de atacina, cecropina, gloverina, lisozima y PGRP. Posteriormente se produjo el dsRNA y se realizó una purificación de ARN para confirmar la producción de dsRNA por medio de la técnica de Trireagent (Ambion) (**Fig. 28B**).

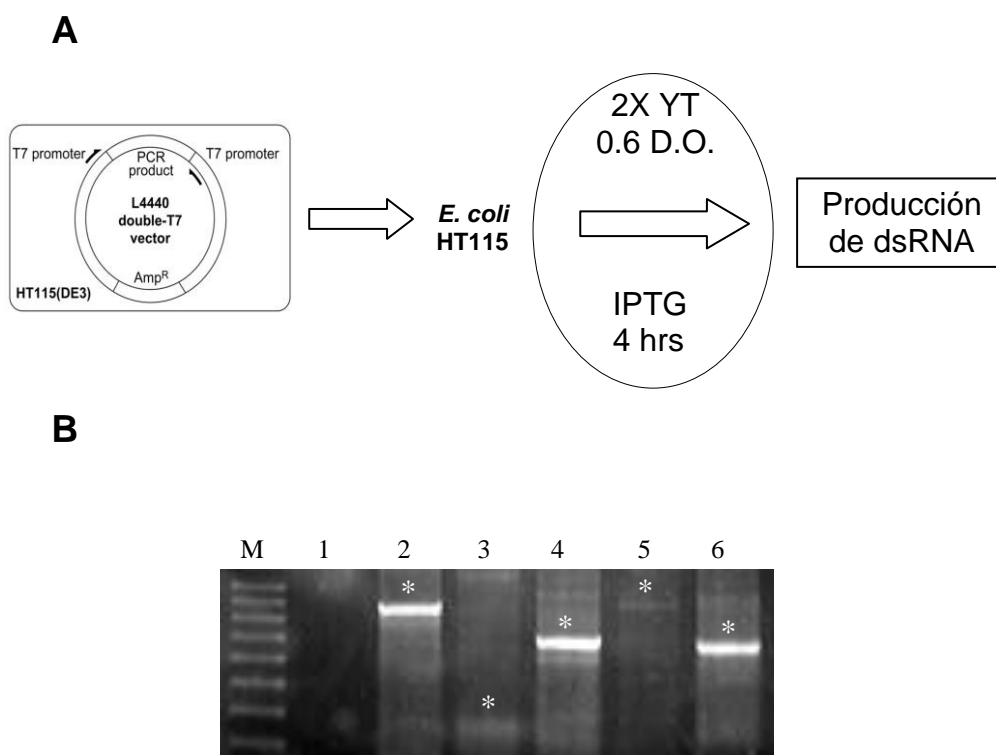


Figura 28.- **Producción y Purificación de dsRNA por TriReagent (Ambion)**. A) producido en el vector L4440 regulado por la cepa HT115 de *E. coli* inducida con IPTG 0.4 mM. B) dsRNA. M; Marcador 100 pb (Promega), 1; Control negativo HT115 + L4440, 2; HT115+ L4440+ Atacina, 3; HT115+ L4440 + Cecropina, 4; HT115+L4440+ Gloverina, 5; HT115+L4440+Lisozima, 6; HT115+L4440+PGRP. Gel de Agarosa 1%.

6.9 Inhibición por dsRNA

Posteriormente a la confirmación de la producción de dsRNA, se procedió a bloquear el PGRP, debido a que fue nuestro gen candidato debido a que fue sobreexpresado por RT-PCR en tiempo real cuando se expuso a *Bt*. Dicha bacteria HT115 con la clona L4440-PGRP se administró en la dieta artificial para inducir el efecto transitorio de bloqueo del ARN que codifica para PGRP, observándose una disminución relativa del transcrito a las 72 h. (**Fig. 29**).

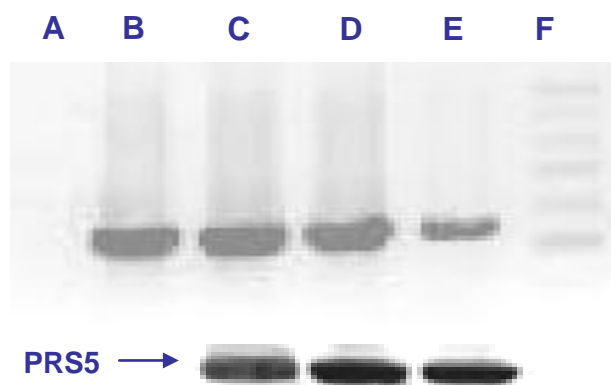


Figura 29. **Efecto de inhibición por dsRNA del gen PGRP por la ingestión de Bacteria HT115 en la expresión del gen PGRP. El efecto se observó en el 1er. estadio y se analizó por RT-PCR convencional a las 72 hrs. en larvas totales.** A) control negativo de reacción, B) control positivo clona pGEMT-PGRP, C) Larvas control sin tratamiento, D) Control negativo Bacteria produciendo dsRNA-Lizosima aplicado a 1er. estadio, E) Bacteria produciendo dsRNA-PGRP aplicado a 1er. estadio, F) Marcador 100 pb.

6.10 Bloqueo de PGRP por dsRNA y su efecto en susceptibilidad a *Bt*.

Debido a la disminución en la expresión del transcrito PGRP. Se administró en dieta artificial y expuso en larvas neonatas por 24 h. Posteriormente se administró el formulado de *Bt* a la concentración de DL₂₅ la cual corresponde a 100 UI. Dicho experimento se evaluó a los 7 días post-infección con *Bt* y se encontró un incremento de hasta 4 veces en los niveles de susceptibilidad en el tratamiento con dsRNA-PGRP + *Bt*, lo cual confirma la participación de la inmunidad innata en la regulación de toxicidad a *Bt* (**Fig. 30**).

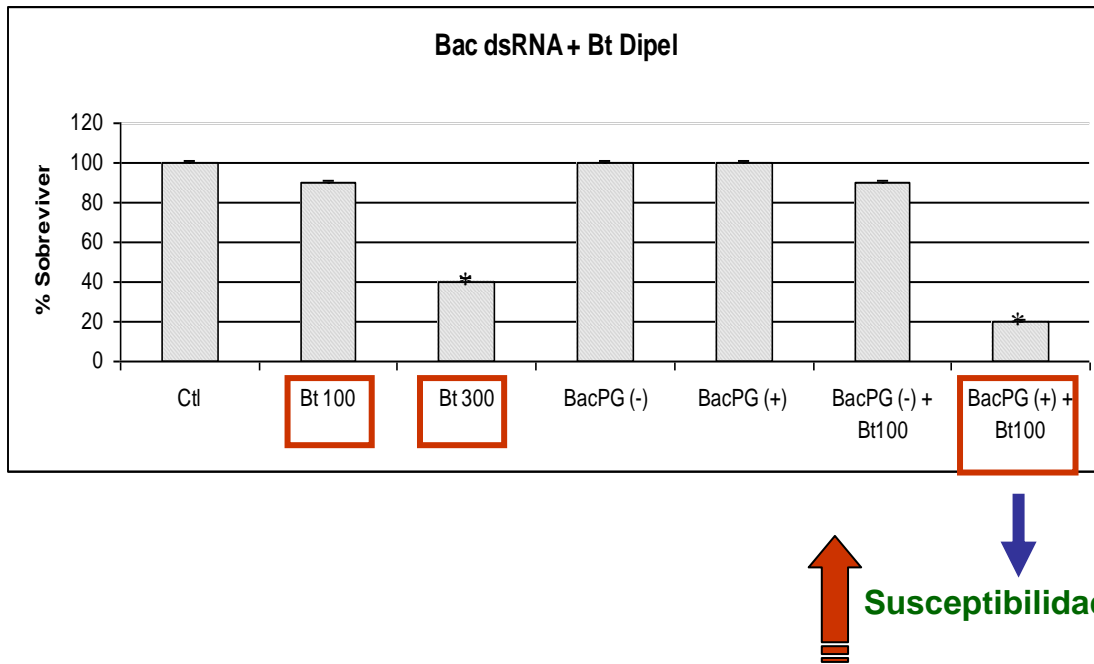


Figura 30.- **Porcentaje de sobrevivencia mediante el efecto de dsRNA-PGRP y su efecto con la exposición a *Bt* (Dipel).** Ctl; control, *Bt*100; 100 UI del formulado Dipel, *Bt*300; 300 UI de Dipel, BacPG(-); Bacteria transformada con clona L4440+PGRP sin inducir, BacPG(+); Bacteria transformada con clona L4440+PGRP inducida con IPTG. BacPG (-)+*Bt*100; Bacteria transformada con clona L4440+PGRP sin inducir mas la exposición a 100 UI de Dipel. BacPG (-)+*Bt*100; Bacteria transformada con clona L4440+PGRP inducida con IPTG mas la exposición a 100 UI de Dipel. * Diferencia significativa en respecto al tratamiento con *Bt* comparado con el control.

7. DISCUSIÓN

Las pérdidas en cultivos de interés económico ocasionadas por factores ambientales se ven incrementadas por la existencia de enfermedades vegetales y el incremento de las poblaciones de insectos plaga. El uso constante de insecticidas de origen químico y biológico ha ocasionado el fenómeno de aparición de poblaciones de insectos plaga resistentes; este fenómeno se ha presentado paralelamente en la aplicación de los planes de manejo integrado de plagas debido a la disminución de susceptibilidad de las poblaciones de insectos a la infección por organismos entomopatógenos utilizados como Control Biológico (bacterias, hongos, nemátodos, protozoarios y virus), de los cuales *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) se ha utilizado en el país como principal bioinsecticida.

En la actualidad no existen investigaciones enfocadas a determinar el papel absoluto de los mecanismos de inmunidad innata de los insectos durante la infección por *Bt* y mucho menos el papel que juega la inmunidad innata en los insectos resistentes o susceptibles a la misma bacteria. Nuestro organismo de estudio *T. ni*, conocido como el gusano falso medidor, es un insecto plaga que reduce el rendimiento de hortalizas.

Esta propuesta de investigación se enfoca particularmente en el análisis de la inmunidad innata en el lepidóptero plaga *T. ni* como modelo y su efecto en la susceptibilidad cuando se interrumpe el proceso inmunológico. Posibles cambios en la expresión genética durante los procesos infectivos por *Bt* y la modulación del sistema de defensa en insectos plaga, podrían modificar la susceptibilidad a la infección. Tal modulación es especialmente importante en poblaciones que han desarrollado tolerancia, posiblemente existan mecanismos de defensa que pudieran estar involucrados en la entrada del patógeno y a su vez disminuyendo la eficacia del producto bioinsecticida utilizado para el control biológico del mismo. Por lo tanto, esta propuesta se

enfoca a determinar si los niveles de expresión de genes involucrados en la inmunidad innata se alteran durante la exposición a *Bt*. Posteriormente realizar un bloqueo transcripcional por RNAi dirigido a estos genes y determinar el efecto en la represión de los mecanismos inmunes presentes en el proceso de defensa contra la infección por entomopatógenos y el papel en la susceptibilidad del insecto plaga a la infección.

En estudios recientes se ha estudiado el papel de los inmunosupresores como la dexametasona, esculetina, ciclosporina A y tropolona para modular la vía de la melanización, estos estudios apoyan el papel de la Fenoloxidasa (FO) durante la susceptibilidad o la participación en el proceso de evasión del insecto contra entomopatógenos. En una investigación reciente (Broderick y cols., 2010) se encontró que al usar eicosanoides (dexametasona y esculetina) como inmunosupresores, se incrementaba la susceptibilidad a *Bt* (Dipel) en *Limantria dispar*, debido a la supresión de la FO, lo cual se relacionó a la melanización como participante durante la susceptibilidad a *Bt*. En otro estudio se observó el efecto de la aplicación del inmunosupresor ciclosporina A, en *Galleria mellonella* en el cual se observó reducción de la expresión del péptido antimicrobiano cecropina y los niveles de actividad de lisozima (Fiolka, 2008). Tomando en cuenta estos datos, este inmunosupresor se utilizó para retar a *T. ni* y determinar la susceptibilidad a *Bt*; en este experimento se encontraron diferencias significativas respecto al uso de la ciclosporina A y la tropolona, incrementando niveles de susceptibilidad al formulado de *Bt* Dipel hasta 3 veces en relación al control. Estos resultados apoyaron la observación que la inhibición de la actividad FO mediante el uso de estas drogas, y que la FO juega un papel importante en la regulación de la susceptibilidad a *Bt* mediada por la inmunidad innata.

La expresión de genes relacionados a la inmunidad innata en lepidópteros se han relacionado con la exposición a *Bt*. Anteriormente se han reportado algunas investigaciones entre las cuales resaltan el estudio de exposición de larvas de *T. ni* a las bacterias *E.coli* y *M. luteus*, en el que se encontró sobreexpresión de genes involucrados en la inmunidad innata los cuales en su mayoría codificaban para PAMs. (Freitak y cols, 2007). En otro

grupo de investigaciones se relacionó la inmunidad en *T. ni* contra la infección por *B. thuringiensis var. kurtsaki*, en el cual compararon colonias susceptibles y resistentes de *T. ni* expuestas a *Bt*. Encontrando que en la colonia susceptible había una disminución significativa en los niveles de hemocitos circulantes, además de observar que también se disminuía los niveles de FO los cuales están involucrados en la melanización y mecanismos de defensa en cuerpos extraños (Ericsson y cols., 2009).

La resistencia en los insectos se define por cambios genéticos, en una población de una especie, en respuesta a la selección con tóxicos, que puede disminuir el control en campo. Debido a la descripción anterior nuestro trabajo radica en analizar los perfiles de expresión de genes de defensa y a su vez relacionarlos con la adaptación a *Bt*. En 2006 en México, se analizó una colonia de *T. ni* de campo aislada de un cultivo localizado en el bajo mexicano donde se aplicaban formulados a base de *Bt*. En estos experimentos se encontró diferencia significativa en relación a una colonia de laboratorio susceptible a *Bt*, encontrando disminución de la susceptibilidad a *Bt* hasta 10 veces (Tamez y cols., 2006).

En esta investigación, inicialmente se sometió *T. ni* a formulado Xentari a base de *Bt*, se observó que la exposición a una DL50 incrementa la expresión de los genes lisozima y el receptor de peptidoglucanos, tanto en la colonia de laboratorio como en la de campo, en esta última colonia, se encontró un incremento de la expresión del PGRP en relación a la de laboratorio (Tamez y cols., 2008). Esta observación fue la base para proponer un posible papel de la inmunidad en las diferencias de susceptibilidad a *Bt* en cepas de campo que se fueran adaptando a la exposición a bioinsecticidas a base de *Bt*. Debido a la observación de este fenómeno, se evaluó el efecto del formulado Dipel, este formulado fue el de mayor frecuencia de aplicación en campo para control de lepidópteros plaga en los cultivos.

El experimento subsecuente consistió en la exposición a *Bt* y análisis de genes de PAMs por RT-PCR en Tiempo real y comparación del nivel de expresión durante la sobrevivencia a la exposición a *Bt*. El propósito de este

diseño experimental fue el de seleccionar el gen sobreexpresado para su uso como gen blanco para RNAi.

En este trabajo se analizó el perfil de expresión de genes involucrados en la inmunidad innata cuando se expuso a *Bt* y los genes que codificaban para PAMs disminuyeron, se encontró que la exposición a *Bt* induce la disminución de la cantidad de hemocitos totales. Este resultado en el que se encontró la disminución de expresión de PAM y hemocitos, se corrobora con el estudio realizado por Ericsson y cols. (2009). En este análisis se observó el efecto de *Bt* sobre la inmunidad, asociando la disminución de estos valores con un proceso de adaptación de los insectos plaga con un fenómeno de costo beneficio en el caso de la tolerancia a *Bt*.

En el análisis de los perfiles de expresión de genes relacionados a la inmunidad, se destacó la expresión del gen PGRP con una sobreexpresado de hasta 5 veces mayor en relación al control. el gene PGRP fue seleccionado como gen blanco para inhibir por RNAi mediante la estrategia de ingestión bacterias de bacteria HT115 + vector L4440. La inhibición de este gen fue confirmada por RT-PCR a las 72 hrs posterior a la ingesta.

Actualmente se emplean estrategias de inhibición de genes por RNAi en el caso de insectos plaga, en el cual se han encontrado resultados satisfactorios en cuanto el empleo de estas técnicas de bloqueo génico. En los estudios que se ha observado mayor frecuencia de silenciamiento es inyectado directo en el hemocele, en el cual son introducidos los hemocitos y se distribuyen a través de todo el cuerpo del insecto. Recientemente se han realizado estudios para inhibir la expresión de genes en respuesta a entomopatógenos y en particular a *Bt* como una forma de analizar la participación de estos genes y sus proteínas en la infección por este patógeno (Rodríguez y cols., 2010). Recientemente se reportó la inhibición del gen SFT6 de *Spodoptera frugiperda* por ingestión dsRNA en la dieta, observándose una reducción de la toxicidad de la proteína Cry1Ca1.

El ensayo de inhibición determinó la plataforma experimental para la realización del bioensayo de *T. ni* bajo un reto con *Bt*. Cuando se retaron larvas de *T. ni* neonatas al dsRNA dirigido a PGRP, se encontraron un significativo incremento en los índices de mortalidad en presencia de *Bt* de hasta 4 veces en relación a los controles (no tratado y solo en presencia de *Bt*). Es importante mencionar que dicho gen PGRP que se utilizó como gen blanco, no se había reportado que respondiera sobreexpresándose bajo la inducción de *Bt*. Por lo tanto PGRP puede representar mecanismo adicional involucrado en la regulación de la tolerancia y adaptación al *Bt*. Es probable que la vía de activación de la variante de PGRP de *T. ni* la cual se desconoce cual isoforma estaría involucrada; la variante PGRP-SA probablemente se asocia al grupo de la vía Toll, ya que en esta vía se activan mecanismos distintos a la activación de transcripción de péptidos antimicrobianos como sucede en la vía *Imd*, en la cual la señalización esta regulada por PGRP-LC y se inducen mecanismos transcripcionales de péptidos antimicrobianos. Debido a que se encontraron niveles disminuidos de transcritos PAMs asociados a la sobre expresión de PGRP, es la razón por la cual se consideró que la variante de PGRP esta asociada a los tipos de reconocimiento y activación de señales mediadas extracelularmente por PGRP-SA.

Es importante resaltar que este representa de los primeros trabajos en que se relaciona a los mecanismos de defensa en el lepidóptero *T. ni* y su interacción e incremento de susceptibilidad al patógeno *Bt* principal agente de control biológico que son utilizados y contra los cuales se han generado poblaciones tolerantes. Además de la utilización del sistema de silenciamiento por RNAi de genes de inmunidad innata en *T. ni* utilizado como modelo de estudio. Entre lo notable de esta estrategia resalta la aplicación de los dsRNA para la inhibición de la inmunidad y la utilización de este sistema o prototipo para diseños específicamente para *T. ni*. Finalmente el resultado de esta investigación tiene potencial para aplicarse directamente al campo agrícola mexicano analizando la inmunidad como parámetro fisiológico y obtener perfiles de defensa para potenciar la rotación de entomopatógenos y por otro lado incrementar la efectividad de los bioinsecticidas contra el lepidóptero plaga *T. ni* y posteriormente reducir los costos en la obtención de los mismos,

reducción del uso de insecticidas de origen químico, reflejando un incremento en el rendimiento de los cultivos en el mercado.

8. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permitieron establecer que:

1. El lepidóptero *Trichoplusia ni* se puede emplear como modelo de estudio de la inmunidad innata para evaluar los efectos de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) presente en dos bioinsecticidas comerciales (Dipel y Xentari).
2. El empleo de compuestos químicos que se han identificado como inmunosupresores en vertebrados, disminuyen la actividad de la fenoloxidasa en *T. ni*.
3. La presencia de los inmunosupresores Tropolona y Ciclosporina A incrementan la susceptibilidad de *T. ni* a *Bt*.
4. La exposición de *T. ni* a la bacteria *Micrococcus luteus*, incrementa en un 30% la tolerancia a *Bt*, apoyando la teoría de que existe una regulación por la inmunidad innata y la activación de fenoloxidasa con la toxicidad a *Bt*.
5. Existe una disminución en la expresión de los genes que codifican para PAM y cantidad total de hemocitos en larvas de *T. ni* expuestas al *Bt*, pero inducen un aumento significativo hasta 2 veces en la expresión del gen que codifica para el receptor de peptidoglucanos (PGRP).

6.- La clonación de transcritos de péptidos antimicrobianos (PAMs) y PGRP, se subclonaron en el vector L4440 y se obtuvo la producción de dsRNA en la cepa de *E. coli* HT115 para cada gen.

7.- La administración de dsRNA en larvas neonatas de *T. ni* por ingestión con la cepa L4440 + PGRP por medio de la técnica de capa superficial, disminuye la expresión del transcrito que codifica para el receptor de peptidoglucanos a las 72 hrs de aplicación.

8.- La inhibición de PGRP por dsRNA incrementa la susceptibilidad a *Bt*.

9.- Esta investigación representa una estrategia novedosa al utilizar la defensa de insectos como blanco para el control por entomopatógenos.

9. REFERENCIAS

Addison U. 1993. Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: a review. *Can. J. For. Res.* 23: 2329–2443.

Armstrong C. and Stone T. 1995. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Science.* 35: 557.

Ballester V. and Ferré J. 1999. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xilostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1413-1419.

Bulla L. 1985. Insecticidal bacilli. En: D.A. Dubnau (ed.), *The molecular biology of the bacilli.* Academic Press, New York. pp. 185.

Bravo A. and Peferoen M. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 247-253.

Broderick N., Welchman D., and Lemaitre B.. 2009. Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. *Insect Infection and Immunity Evolution, Ecology, and Mechanisms.* Rolff J. (Ed). Oxford University Press. pp. 16.

Broderick N., Raffa K. and Handselman J. 2010. Chemical modulators of the innate immune response alter gypsy moth larval susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *BMC Microbiology.* 10,:129.

Bryant Bart and Clem Rollie J. 2009. Caspase inhibitor P35 is required for the production of robust baculovirus virions in *Trichoplusia ni* TN-368 cells. *vol. 90:654-661.*

Cancino Rodenzo A., Alexander C., Villaseñor R. Pacheco S., Soberon M. and Bravo A. 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 40:.60-63.

Cannon R. 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol. Rev.* 71: 561-636.

Carlsson A. and Bennich H. 1998. Attacin an insect immune protein binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer membrane protein synthesis. *Microbiology.* 144: 2179–2188.

Carton Y., Frey F. Stanley D., Vass E. and Nappi A. 2002. Dexamethasone inhibition of the cellular immune Response of *Drosophila melanogaster* against a parasitoid. 88: 405-407.

Crickmore L. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807- 813.

Dow J. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect. Physiol.* 19: 187-328.

Ericsson JD, Janmaat AF, Lowenberger C, Myers JH. 2009. Is decreased generalized immunity a cost of *Bt* resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *J Invertebr Pathol.* 100. 61-67.

Fang Q. Wang L. Zhu J. Li Y. Song Q. Stanley D. Akhtar Z. Ye G. 2010. Expression of immune response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from and endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *BMC Genomics.*11. pp.484.

Fiolka J. 2008. Immunosuppressive effect of cyclosporine A on insect humoral immune. *J. Invertebrate pathology.* 98..287-292.

Forcada C. and Martínez. R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut *Arch Insect Biochem Physiol.* 42: 51-63.

Freitag D, Wheat CW, Heckel DG, Vogel H. 2007. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. *BMC Biol.* Dec 21;5:56.

García Gutierrez C. y Hiram Medrano Roldán. 2008. *Biología Financiera Aplicada a Bioplásticos*. La Impresora. Capítulo 1, El mercado de los Bioplásticos en México. pp. 17-19.

Gerardo N., Altincicek B. Vilcinskas A. et al. 2010. Immunity and other defenses in pea aphids *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biology.* 10. 378.

Gillepsie J. and Kanost M. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 611-43.

Gordon. 1973. The genus *Bacillus*. En: *US Department of Agriculture Handbook No. 427*, USDA, Washington, D.C. pp. 106-126.

Ghanim M., Kontsedalov S. and Czosnek H. 2007. Tissue specific silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Bioch. And Mol. Biol.* 37:. 732-738.

Hannon G. Rna interference. *Nature.* 2002 Jul 11;418(6894):244-51.

- Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J. 2008. Antimicrobial Defense and Persistent Infection in Insects. *Science*. Nov 21;322(5905):1257-1259.
- Heckel D., Gahan L. , Baxter S., Shelton A., Bruce E. Tabashnik D. 2007. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology* 95 192–197.
- Hodgaman T. and Ellar D. 1990. Models for the structure and function of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins determined by compilational analysis. *DNA Seq.* 1: 97-106.
- Hoffmann J. 1996. *Drosophila* immunity: comparative analysis of the Rel proteins dorsal and Dif in the induction of the genes encoding dipterin and cecropin. *Nucleic Acids Research* 24:1238-1245.
- Ip Y Tony. 2005. *Drosophila* innate immunity goes viral. *Nature Immunology* 6, 863 – 864.
- Kang D. and Steiner H. 1996. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. *Gene*. 174: 245-249.
- Kang D. and Steiner H. 2002. *Trichoplusia ni* gloverin, an inducible immune gene encoding an antibacterial insect protein. *Insect Biochem and Mol Biol.* 32: 795–801.
- Kanost M. and Nardi J. 2010. Innate Immune Responses of *Manduca sexta*. *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. Goldsmith M. (Ed.). CRC Press. pp. 771.
- Koller C. and Hollingworth R. 1992. Characterization of the pH- mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. San Diego native delta-endotoxin crystals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 692-699.
- Knowles B. and Dow J. 1993. The crystal of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*. 15: 469-476.
- Kyung T. and Ourth D. 2000. Viresin a novel antibacterial protein from immune hemolymph of *Heliothis virescens* pupae. *Eur. J. Biochem.* 267: 677–683.
- Lamberty M. and Bullet P. 1999. Isolation from the Lepidopteran *Heliothis virescens* of novel insect defensin with potent antifungal activity. *Journal of Biol Chem.* 274: 9320–9326.
- Lamberty M. and Vovelle F. 2001. Solution structures of the antifungal Heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochemistry*. 40: 11995 – 12003.

Lee M. 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3836-3842.

LeOra. 1987. POLO-PC, user's guide to probit or logit analysis. LeOra Berkeley, CA.

Lereclus T. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.

Liu G., Kang D. and Steiner H. 2000. *Trichoplusia ni* leboicin, an inducible immune gene with a downstream insertion element. *Biochem and Biophys Research Commun.* 269: 803–807.

Lu Y. and Adang M. 1996. Conversion of *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac- binding aminopeptidase to a soluble form by endogenous phosphatidylinositol phospholipase C. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 33-40.

Luo K. and Adang M. 1997. The *Heliothis virescens* 170 kDa amonopeptidase functions as receptor by mediating specific *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxin binding and pore formation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 735-743.

Matsuzaki K. 2001. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defense?. *Biochemical Society.* 29: 598-601.

McGaughey W. and Whalon E. 1992 .Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science.* 258: 1451-1455.

Naranayan, K. 2004. Insect defence: its impact on microbial control of insect Pests. *CURRENT 800 SCIENCE*, 86,. 6. pp. 123.

Oppert, B. and McGaughey W. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 940-947.

Ourth D. and Lockey T. 1994. Biochemical and biophysical research communications.12: 200-1.

Ourth D. and Lockey T. 1996. Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 236: 263–71.

Price DR, Gatehouse JA. 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol.* Jul;26(7):393-400.

Rahman, M., Roberts, S., Sarjan, M and Schmidt, O. 2003. Induction and transmission de *Bacillus thuringiensis* tolerance in *Ephestia kuehniella*. *PNAS*; pp.1324-1327.

Rodríguez-Cabrera L, Trujillo-Bacallao D, Borrás-Hidalgo O, Wright DJ, Ayra-Pardo C. 2010. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. *Environ Microbiol.* 2010 Nov;12(11):2894-903.

SAGAR. 2000. Guía de Plaguicidas Autorizados de uso Agrícola. Dirección General de Sanidad Vegetal. Celaya, Gto. pp. 504.

Sayyed A. and Wright D. 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIAc in a field population of the diamondback moth. *Appl Environ Microbiol.* 66: 1509-1516.

Silverman N. and Maniatis T. 2001. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes and Development* 15: 2321-2342.

Strand M. 2008. Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. In: Beckage N. (Ed.). *Insect Immunology*. Academia Press. pp. 41.

Tamez-Guerra P., Damas G., Iracheta M., oppert B., Gomez-Flores R. and Rodríguez-padilla C. 2006. Differences in Susceptibility and Physiological Fitness of Mexican Field *Trichoplusia ni* Strains Exposed to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 99(3): 937 – 945.

Tamez Guerra P. Valadez lira JA. Alcocer Gonzalez JM. Gomez flores R. and Rodriguez Padilla C. 2008. Detection encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* exposed to *Bacillus thuringiensis*. *Journal Invertebrate Pathology.* Jun. pp. 218-227.

Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, and Sriramana K, 2010. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J Insect Physiol.* Nov 19. pp. 409.

Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, et al. (2009) Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. *PLoS ONE* 4(7): 6225.

Timmons L, Court DL, Fire A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene.* Jan 24;263(1-2):103-12.

Timmons L, Tabara H, Mello CC, Fire AZ. 2003. Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 2003 Jul;14(7):2972-83.

Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH. 2006. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 2006 Nov 10;2(11):e183.

Tzou P., Ohreser S., Lemaitre B., Hoffman J. and Imler J. 2000. Tissue specific Inducible Expression of antimicrobial peptide gens in *Drosophila* Surface epithelia. *Immunity*. Vol. 13.pp. 737-748.

Vallet-Gely I., Lemaitre B. and Boccard F.. 2008. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology* 6, 302-313.

Vanrie J, McGaughey H., De Johnson, Barnett B. and Van-Mellaert H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247:72–74.

Vilmos P. and Kurucz E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*. 62: 59-66.

Villarruel Franco R., Guisar Lopez R., Corrales M. Sanchez T. E islas Rodríguez A. 2004. Peptidos naturales Antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. *Investigación en salud*. Vol. VI. Pp. 170-179.

Vizioli J. and Salzet M. 2002. Review. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci*. 23:494-6.

Yu C. G., Mullins M.A., Warren G.W., Koziel M.G., Estruch J.J. 1997. The *Bt* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Envirom Microbiol*. 63: 532-6.

RESUMEN CURRICULAR

José Alberto Valadez Lira

Candidato para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Microbiología

Tesis: Modulación de la Inmunidad innata de *Trichoplusia ni* expuesta a *Bacillus thuringiensis*

Campo de Estudio: Biotecnología Agrícola – Control Biológico

Datos Personales: Nacido en Monterrey N. L. el 6 de Julio de 1979, hijo de Esther Lira Díaz y José Javier Valadez Liñan.

Formación Académica:

Biólogo egresado de la Fac. Ciencias Biológicas de la UANL. **2001.**

Maestría en Inmunobiología en la misma Institución y Dependencia. **2005.**

Distinciones:

Primer Lugar en Ciencias Aplicadas al Deporte, en el Certamen Nacional de Investigación en Cultura Física **2010** – CONADE. Con el trabajo: Detección de polimorfismos genéticos en atletas de alto rendimiento con el enfoque en el aprovechamiento de estrategias de entrenamiento.

Segundo Lugar en el área de Ciencias Naturales del Congreso Nacional de Investigación Biomédica **2002**. Con el trabajo: Clonación y Expresión del gen L1 de HPV-16 en células *in vitro*, Tejido Muscular y Epitelio vaginal.

Presentaciones en Congreso: 21 Exposiciones (8 Oral y 13 Cartel).

Publicaciones: 4

- Detection of genes encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* (Hubner) exposed to *Bacillus thuringiensis*. Journal Invertebrate Pathology. **2008.**

- Comparative Evaluation of Phenoloxidase Production by Lepidopteran Pest Developmental Stages. Aceptado para revisión- Journal Insect Science. **2010.**

- Detección de Polimorfismos Genéticos del Gen *ACE* en Atletas de Alto Rendimiento del Estado de Nuevo León. REVISTA DE CIENCIAS DEL EJERCICIO-FOD. ISSN: 1870-3941. Volumen 6. pp.15-18. **2010.**

- Detección de polimorfismos genéticos en atletas de alto rendimiento con el enfoque en el aprovechamiento de estrategias de entrenamiento. Revista Mexicana de Investigación en Cultura Física y Deporte. Aceptado para publicación. **2011.**

ARTICULOS

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Invertebrate Pathology 98 (2008) 218–227

Journal of
INVERTEBRATE
PATHOLOGYwww.elsevier.com/locate/jyip

Detection of genes encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* (Hübner) exposed to *Bacillus thuringiensis*

P. Tamez-Guerra^{a,*}, J.A. Valadez-Lira^a, J.M. Alcocer-González^a, B. Oppert^b,
R. Gomez-Flores^a, R. Tamez-Guerra^a, C. Rodríguez-Padilla^a

^a Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL), AP 46-F, 66450 San Nicolás de los Garza, N.L., Mexico

^b USDA-ARS Grain Marketing and Production Research Center, 1515 College Avenue, Manhattan, KS 66502, USA

Received 15 October 2007; accepted 13 February 2008

Available online 20 February 2008

Abstract

The systemic immune response of *Trichoplusia ni* after *Bacillus thuringiensis* (Bt) exposure was evaluated by comparing the expression of genes encoding antimicrobial peptides (AMPs) in Bt-susceptible and -resistant *T. ni* strains that were either exposed or not to Xen-Tari® (Bt-XT). AMP genes were detected by RT-PCR using primers for attacin, gloverin, lebocin, lysozyme, and peptidoglycan recognition peptide (PGRP). In general, AMP genes were detected more frequently in Mexican field strains previously exposed to Bt (SALX and GTOX) than in a Mexican laboratory strain (NL), but expression was similar to the AMP expression in USA laboratory strains (US and USX). Among the AMPs, transcripts for lebocin were the least detected (11.7%) and those for lysozyme were the most detected (84.8%) in all samples. Lebocin was detected only in 2nd instar and pupa. All untreated controls expressed attacin. Attacin and gloverin were not detected in any midgut sample, and their highest detection was in pupa. Lysozyme was rarely detected in 2nd instar larvae from any strain or treatment but was detected in almost all midgut and hemolymph samples. Overall, AMPs were found more in *T. ni* strains previously exposed to Bt-XT, especially lebocin and gloverin (1.8-fold increase) and PGRP (3.8-fold increase). The data suggest that the expression of AMPs in *T. ni* correlates to previous Bt exposure.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Trichoplusia ni* immune response; *Bacillus thuringiensis*; Antimicrobial peptides; Bt-susceptibility

1. Introduction

Insects represent three-fourths of all animal species and have confronted many potentially pathogenic microorganisms, including those used in pest control. However, insects have developed protective mechanisms to evade the pathogenic effects of microbes (Vilmos and Kurucz, 1998; Gillespie et al., 1997). Insect defense mechanisms are diverse and involve cellular and systemic type reactions (Jarosz, 1996; Hultmark et al., 1983; Marchini et al., 1993). Cellular-mediated reactions mainly involve phagocyte cells and the formation of a capsule produced by hemolymph cells (Jarosz, 1996). The systemic responses usually involve a rapid syn-

thesis of small cationic peptides, such as defensins, cecropins, and attacins (Marchini et al., 1993; Natori, 1995). Following a bacterial infection, antimicrobial peptides are produced in the insect fat body (analogous to the liver in mammals) and in hemolymph cells, and accumulate in the hemolymph of the infected insect (Gillespie et al., 1997; Hoffmann, 1997).

Bacillus thuringiensis (Bt) has been the most commercially used bioinsecticide among entomopathogenic microorganisms. The role of insect immune protective mechanisms to evade Bt infection is unknown, but the production of inhibitory factors from Bt strains can interfere with the insect immune response (Edlund et al., 1976). Insect immunity was reported to play an important role in the overall pathogenicity of another bacterium, *Serratia marcescens* (Flyg et al., 1980). However, *S. marcescens*

* Corresponding author. Fax: +5281 8352 4212.

E-mail address: patamez@hotmail.com (P. Tamez-Guerra).

spreads through the hemolymph, whereas Bt enters through the digestive system.

Insects with different Bt-susceptibility have been demonstrated to have variations in (1) toxin receptors in the midgut (DeMaagd et al., 2001), or (2) the production of digestive proteases resulting in differences in enzymatic activity levels (Oppert et al., 1997). However, other protective mechanisms may be responsible for varying susceptibility to bacteria harboring Bt toxins in insects (Tabashnik et al., 1997). Therefore, we compared the expression of genes encoding antibacterial peptides (AMPs) in strains of the cabbage looper *Trichoplusia ni* (Hübner) with varying susceptibility to Bt protoxins and toxins.

2. Materials and methods

2.1. Insects

Trichoplusia ni strains were selected based on differences in susceptibility to Bt toxins and protoxins (Tamez-Guerra et al., 2006) (Table 1). Strains included NL (a Mexican strain collected in Nuevo Leon and reared in our laboratory for 3 years), US (kindly provided by Dr. Behle from the National Centre for Agriculture Utilization Research, United States Department of Agriculture, Peoria, IL), and two wild strains from east central México, Guanajuato State (SAL and GTO). Selected strains were exposed in the laboratory to XenTari® (Bt-XT) (Valent Biosciences Corporation, Libertyville, Illinois, E.U.A.; imported and distributed in Mexico by DuPont México, S.A. de C.V.) over several generations (Tamez-Guerra et al., 2006) and were coded with an "X" (USX, SALX, and GTOX). All insect populations were reared on artificial diet (McGuire

et al., 1997) at 25 °C ± 2 °C, 55 ± 10% relative humidity and 16 h light/8 h dark photoperiod.

2.2. Bioassays

We determined the presence of genes encoding AMPs in each *T. ni* strain under different Bt toxin exposures, using two bioassays: an overlay bioassay and a stained droplet-feeding bioassay (Tamez-Guerra et al., 2006; Behle et al., 2000). Bt-XT treatments consisted of five doses of XenTari®, based on international units (IU), as follows: 0, 500, 500* (exposed to Bt-XT until larvae reached a specific instar and analyzed 20 h after exposure), 2500, or 3500 IU/ml. Other treatments consisted of a fresh culture or a mixture of spore-crystals from Bt var *thuringiensis* BtUANL01001 (Btt) and *Escherichia coli* strain DH5- α (EC), either alone or with 500 IU/ml Bt-XT. The only *T. ni* strain that was susceptible to both Cry protoxin and toxin was US (Tamez-Guerra et al., 2006), and therefore the response of US to *E. coli* exposure was consistently tested for microbial peptide production. We tested fresh culture and spore-crystals of Btt to compare the infective stage (fresh culture) versus the insecticidal toxins present in crystals. *Escherichia coli* was tested because it is a Gram-negative bacterium commonly used as a positive control for AMP detection by PCR (Sugiyama et al., 1995; Axen et al., 1997; Lundstrom et al., 2002; Hara and Yamakawa, 1995; Spies et al., 1986). Btt and *E. coli* were kindly provided by the Laboratory of Immunology, Biological Sciences College, Autonomous University of Nuevo Leon, MX. Btt was originally isolated from soil in Guanajuato, MX, whereas *E. coli* was originally obtained from ATCC (Manassas, VA). *Escherichia coli* and Btt cultures (100 μ l) were at an optical density_{600 nm} of 0.6 U when harvested (Gene Quant Pro, Amersham Bioscience, Brazil). To obtain a spore-crystal mixture from a slant sample, Btt was inoculated in a Petri dish on nutrient agar (Spectrum) and incubated at 28 °C. After 5 days of culture, if spores and crystals were observed, culture was collected into 30 ml of sterile saline solution (0.1 M sodium chloride and 0.01% Triton-X 100 in distilled water) and washed three times, mixing it in distilled water and centrifuging at 20,000g for 30 min (Beckman, Avanti, J-25I). Spore-crystals were lyophilized (Labconco 77500-20, Kansas City, MO). The dried spore-crystal mixture was tested at a dose of 100 mg/ml.

Treatments of bacterial challenge consisted of Btt, Btt-EC, Bt-XT, and EC in the overlay bioassay in selected strains and developmental stages. Treatments were mixed in PBS, and 50 μ l of each treatment were applied to 2 cm² artificial diet mixed with 0.1% bovine serum albumin (BSA) in 12-well trays (Costar). PBS only was applied as a control (Tamez-Guerra et al., 2006). Doses were air-dried for 2 h and infested with one *T. ni* larva per well. For the Bt-XT treatments, larvae were fed artificial diet until they reached a specific instar, when they were transferred to treated diet and were collected and analyzed after 20 h

Table 1
Trichoplusia ni strains used in this study, and comparison of relative susceptibilities to Cry IAa, Cry IAb, and Cry IAc toxins and protoxins^a

Strain code ^b	Source	Resistance ratio ^c
NL	Laboratory UANL-FCB, Mexico	91, pAa vs. US
US	USDA-ARS, Peoria, IL, USA	None
USX		4.5, pAa vs. US 21, pAc vs. NL
SALX	Field, Salvatierra, Gto. Mexico	6.2, Ab vs. US 16, Ab vs. US
GTOX	Field, San Luis de la Paz, Gto., Mexico	16, pAa vs. US 40, Ab vs. US 50, pAb vs. NL 87, pAc vs. NL 22, pAc vs. US

^a Data from Tamez-Guerra et al., 2006.

^b Strains that were selected in the laboratory with XenTari were denoted by the designation of the strain followed by an "X".

^c Resistance ratio was based on confidence limits of the LC₅₀ value. Aa, Ab, or Ac, and pAa, pAb, and pAc = resistance to Cry IAa, Cry IAb, or Cry IAc toxins or protoxins, respectively, compared with laboratory strains (NL or US), as indicated.

exposure, based on previous reports of AMP gene expression time analysis (Chowdhury et al., 1995; Liu et al., 2000). For pupae analysis, larvae were fed on treated diet throughout larval development and were collected as pupa. Each bioassay was performed on different days with triplicate determinations.

Neonates were exposed to Bt-XT in a droplet-feeding bioassay. Neonates were fed on a colored solution with distilled water or a solution containing specific doses of each treatment. Positively treated larvae were selected by color from each treatment and were incubated in 14:10 light:dark photoperiod at 28 °C to the specific instar or pupae stage.

2.3. Antimicrobial peptide (AMP) gene detection

RT-PCR was used to detect genes encoding AMP in *T. ni* exposed to different bacterial treatments. Samples included the whole body of 2nd, 3rd, and 4th instar larvae and pupae (Kang et al., 1996a), and hemolymph or midgut of 4th instar larvae, exposed or not to the treatments described above (Wang et al., 2004; Hara and Yamakawa, 1995). The fat body was not analyzed separately, but was considered as the contributing factor if hemolymph and midgut were negative. In general, whole body, hemolymph or midgut samples were obtained after fasting larvae for 2–4 h, as recommended for midgut enzyme detection (Lam et al., 2000). For whole larvae or pupae, three individuals from each selected instar were homogenized in 1.5 ml of pre-chilled, 50 mM Tris–HCl buffer pH 8.0, containing 0.01 M CaCl₂ (PRO-250, PRO Scientific, Monroe, CT). From these samples, 50–100 mg were homogenized with 1 ml of TRI reagent (Molecular Research Center, Inc., Connecticut, OH). Midgut mRNA was obtained by a previous procedure (Chomezynski and Sacchi, 1987). In brief, three midguts with food bolus were dissected from 4th instar larvae and homogenized and added to 1 ml of TRI reagent. Hemolymph was obtained by a syringe from samples after the midgut was removed and added to pre-chilled TRI reagent (1:5 v:v). Samples were incubated 5 min at room temperature. In each sample, 0.2 ml of chloroform was added and vigorously mixed for 15 s and incubated at room temperature for 2–3 min. Samples were then centrifuged at 12,000g for 8 min at 2–8 °C. The upper layer (transparent phase) was isolated and transferred into a new tube, 500 µl of isopropanol was added, and the sample was mixed in a vortex, incubated at room temperature for 5–10 min, and centrifuged at 12,000g for 8 min. The supernatant was discarded, and the remaining pellet with RNA was washed with 1 ml of ethanol 75% in DEPC water (milli Q water mixed vigorously with 0.1% diethylpyrocarbonate for 2 h and autoclaved). The sample was centrifuged for 5 min at 7500g. The supernatant was discarded and the pellet was air-dried for 5–10 min. The pellet was dissolved by pipetting in 50–200 µl of DEPC water and was incubated at 55–60 °C for 10 min. AMP gene detection was performed in triplicate from randomly selected larvae from the same generation.

RT-PCR was used to synthesize complementary DNA (cDNA) from RNA. In each tube, 10 µl of 5× reaction buffer (250 mM Tris–HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂), 1 µl of 50 mM dithiothreitol, 1 µl of 1 U of RNAase inhibitor, 2 µl of 800 µM of dNTPs, 2 µl of 2.5 µM of primer dT12-18, and 1 µl of 200 U of Moloney murine leukaemia virus (MMLV) reverse transcriptase (PROMEGA) were added to 5 µg of RNA samples. This mixture was adjusted to 50 µl with DEPC water and was incubated at 37 °C for 2 h. The enzyme was inactivated by increasing the temperature to 60 °C for 10 min.

To identify transcripts of the constitutive ribosomal protein S3a (RPS3a, as positive internal expression gene) and AMPs (attacin, gloverin, lebocin, lysozyme, and peptidoglycan recognition peptide, PGRP), specific internal gene primers were used in a polymerase chain reaction (PCR). In a final volume of 50 µl, 1× buffer (200 mM Tris–HCl at pH 8.4, 500 mM KCl), 5 µl of template (cDNA), 3 µl 1.5 mM MgCl₂, 1 µl of 800 µM of dNTP's, and 10 pmol of each primer were mixed with 1 U of DNA taq polymerase (Bioline). RPS3a was amplified using the primers RPS3a-1-AGGCACC GTCTAGTTCACC-, RPS3a-2-GCCAGCGAGACTTCA AAAAC-) (Borovsky and Wuys, 2001). Attacin was amplified using the primers ATA1-CAAATTGATTTTGGGATTGG and ATA2-CACTTATTACCAAAGACCGGC, for an expected product of 750 bp (GenBank: U46130; Sugiyama et al., 1995; Kang et al., 1996b). Gloverin was amplified using the primers GLO1-GAATCGTTCACCAT GCAGTC, and GLO2-TCCTCATTTTAACCATACACG AAA, for an expected product of 808 bp (GenBank: AF233590; Lundstrom et al., 2002). Lebocin was amplified using the primers LEB1-TCTGGTGTGTGTGTGC TCTC, and LEB2-GGACAAAAACAGAAAAGTGCAA, for an expected product of 857 bp (GenBank: AF233589; Yamakawa and Tanaka, 1999). Lysozyme was isolated from *T. ni* (Kang et al., 1996a) using the primers LISHv-ATTC GCTAACAGTGGTTCGT, and LISHv2-GGTACAGT GCCTTTTAAATTTGC, and these primers were used to detect an expected product of 925 bp (GenBank: U50551; Spies et al., 1986). PGRP was amplified using the primers PGRP1-GACTGTGAGTGGAGATTGCG, and PGRP2-TTTTGGTCTATTTACCATTTACG, to obtain a 605 bp product (GenBank: AF076481).

Preliminary tests were performed to select the amplification cycle number for each sample. AMP transcripts were amplified for 25 cycles for whole body, 35 cycles for midgut, and 40 cycles for hemolymph in a thermocycler (Touchgene Techne, Cambridge, England). Each cycle had a denaturing step of 94 °C/1 min, an annealing step of 55 °C/1 min, and an extension step of 72 °C/2 min and a final extension of 72 °C/7 min. Ten microliters of the amplified sample was analyzed in a 1.5% agarose gel and ethidium bromide stain under UV light using a UVP trans-illuminator (VWR, USA). Optical densities of the DNA bands were detected using a UVP spectrometer (Bio-Spectrum Imaging Systems, UVP, Inc. Upland, CA). For each transcript, the RPS3 detection was used as internal

control. If inconclusive results were obtained in any replicate, samples were retested using more amplification cycles (up to 40).

3. Results

To detect genes that encode antimicrobial peptides (AMPs), mRNA was isolated from larval and pupal whole body and 4th instar larval hemolymph and midgut, and was used as a template for cDNA amplification by RT-PCR. The products of typical amplification reactions with US and GTOX are shown in Fig. 1. Constitutive RPS3 gene was used as internal positive control and was detected in all samples.

When all of the samples were combined from all developmental stages, the most frequently detected AMP genes were lysozyme and PGRP, found in 80.5% and 70.2% of the samples, respectively (Fig. 2A). Gloverin was found in 33.0% of samples, whereas attacin and lebecin were in less than 20.0% of all samples.

The expression of AMP genes (attacin, gloverin, lebecin, lysozyme, or PGRP) differed within the various developmental stages of the *T. ni* strains (Fig. 2B). However, lysozyme and PGRP were the most frequently detected AMP genes in all but 2nd instar larvae. Attacin was not detected in the midgut tissue of any strain, and was found in only 4.17% of 2nd instar and hemolymph samples, 16.0 and 8.70% of 3rd and 4th instar larvae, respectively, but

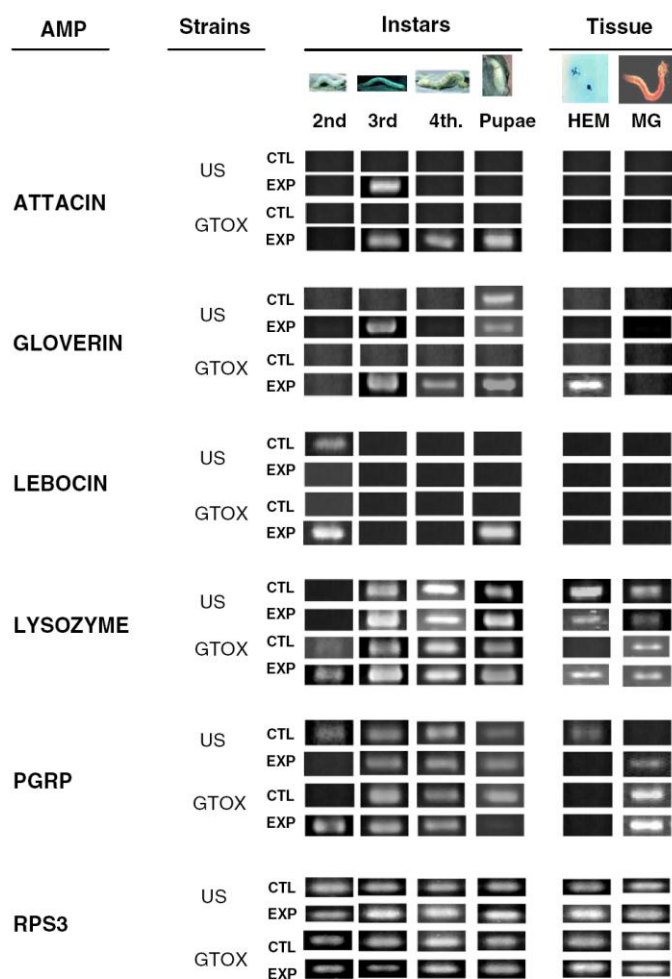


Fig. 1. Comparison of relative expression of antimicrobial peptide genes (attacin, gloverin, lebecin, lysozyme, and PGRP) in two *T. ni* strains (GTOX and US) in different larval instars and tissue samples by RT-PCR. CTL, unexposed control; EXP, exposed to Bt-XT (500 IU/mL) until larvae reached the indicated instar and analyzed 20 h after exposure; HL, hemolymph; MG, midgut.

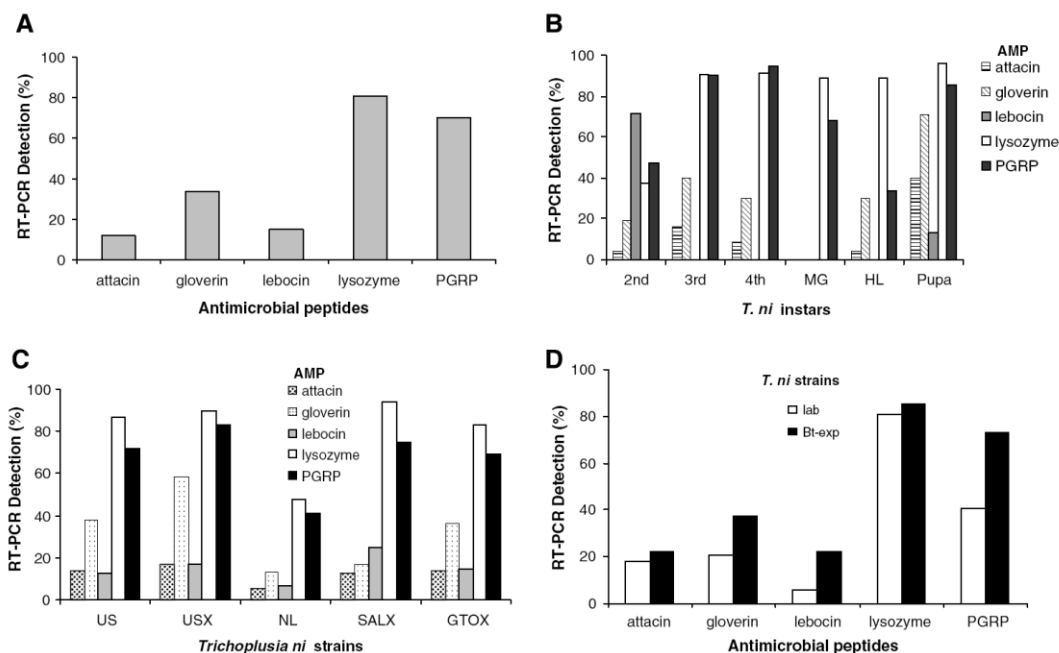


Fig. 2. Expression of antimicrobial peptide (AMP) genes in *T. ni* strains, as detected by RT-PCR and including all samples from all instars tested. (A) Percentage of total positive samples expressing AMP; (B) percentage of AMP detection in different *T. ni* instars; (C) comparison of AMP detection among *T. ni* strains; (D) percentage of AMP detection among control and treated samples. Lab = NL + US strains; Bt-exp, previously exposed to *Bacillus thuringiensis* (XenTari®, Bt-XT) for more than three generations in the laboratory (a combination of responses from USX + SALX + GTOX).

45.8% of the pupae samples. Similar to attacin, gloverin was not detected in any midgut sample, but was found in 19.4%, 40.0%, 30.0%, and 38.7% of 2nd, 3rd, and 4th instar and hemolymph samples, respectively, and in 71.0% of pupae samples. Lebobcin was detected in 71.4% of 2nd instar larvae, 13.0% of pupae, but not in any of the other developmental stages. Lysozyme was detected in more than 90.0% of the samples, except for 2nd instar larvae, of which 37.5% expressed the gene. PGRP also was highly expressed in most samples, detected in 33.3% of the hemolymph samples, 47.6%, 90.0%, and 95.0% of 2nd, 3rd, and 4th instar, respectively, 85.0% of pupa, and 65.4% of the midgut samples.

Regardless of the strain, lysozyme and PGRP were the more prevalent AMPs found in *T. ni* (Fig. 2C). In general, AMPs were detected more in Mexican strains that were previously exposed to Bt in the field and in the laboratory (SALX and GTOX) compared with a laboratory strain (NL), but expression was similar to that of the USA strains (US and USX). Surprisingly, the US laboratory strain had a similar AMP expression pattern compared to that of the Mexican field strain selected with Bt-XT, GTOX. The relative expression patterns of lysozyme and PGRP were the same in all of the strains, with lysozyme followed closely by PGRP as the most frequently encountered AMP genes. However, gloverin also was

prevalent, expressed in 36.1–58.3% of US, USX, and GTOX strains.

In comparisons of the relative expression of AMP genes in laboratory *T. ni* strains (NL + US, lab) and those exposed to Bt-XT (USX, SALX, and GTOX) in all treatments and samples tested, the expression of all AMPs was increased in the Bt-XT exposed strains, especially for gloverin, lebobcin, and PGRP (Fig. 2D). The smallest increase was observed with lysozyme, with only a 1.05-fold increase in the Bt-exposed *T. ni* strains.

3.1. Attacin expression

The attacin transcript was not detected in any developmental stage or tissue of untreated controls of *T. ni* strains (Tables 2 and 3, Fig. 1). Attacin gene expression generally increased in response to Bt-XT or Btt exposure, and most positive samples were from US, USX, and GTOX strains. The highest percentage of attacin expression was 66.7% in the GTOX strain exposed to 500 IU of Bt-XT and analyzed after 20 h. Expression of the attacin gene transcript was found in two treatments: first, exposed to Bt-XT in one given instar and tested after 20 h or as neonate using higher doses of Bt-XT (US, USX, and GTOX); or second, exposed to a lower dose of Bt-XT dose as a neonate (NL and SALX). Attacin gene expression was found in less than

Table 2
Relative expression of antimicrobial peptides (AMPs) in American *Trichoplusia ni* strains fed control or different diet treatments

<i>T. ni</i> strains	AMP	Treatments ^a							
		None	Doses of Xen-Tari [®] (Bt-XT, IU/ml)				EC	Btt	Btt-SC
			500	500*	2500	500 + EC			
US	Attacin	0.0	0.0	16.7	33.3	0.0	0.0	16.7	16.7
	Gloverin	16.7	33.3	33.3	33.3	50.0	6.7	33.3	33.3
	Lebocin	16.7	0.0	0.0	16.7	16.7	16.7	6.7	16.7
	Lysozyme	83.3	75.0	83.3	83.3	100	83.3	100	83.3
	PGRP	100.0	25.0	66.7	33.3	83.3	100	66.7	83.3
USX	Attacin	0.0		33.3	33.3	16.7		16.7	16.7
	Gloverin	16.7		66.7	50.0	83.3	66.7	50.0	66.7
	Lebocin	16.7		16.7	16.7				
	Lysozyme	83.3		66.7	100	100			100.0
	PGRP	100.0	50.0	83.3	83.3				

Data represent the percentage of all insects tested within each strain (including all developmental stages and tissues).

^a Treatments are detailed in Section 2. Numbers in bold show detection values at higher percentages in the same treatment/AMP comparing US versus USX. EC, *Escherichia coli*. Btt, fresh culture of *Bacillus thuringiensis* serovar *thuringiensis*. Btt-SC, spores and crystals of *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis*. Blanks indicate that results were either inconclusive or were not tested.

Table 3
Relative expression of antimicrobial peptides in Mexican *Trichoplusia ni* strains fed control or different diet treatments

<i>T. ni</i> strains	AMP	Treatments ^a					
		None	Doses of Xen-Tari [®] (Bt-XT, IU/ml)			Btt	Btt-SC
			500	500*	2500		
NL	Attacin	0.0	16.7		0.0		
	Gloverin	0.0	50.0		0.0	16.7	
	Lebocin	0.0	16.7				
	Lysozyme	33.3	66.7	100		100	0.0
	PGRP	50.0	50.0	0.0		0.0	
SALX	Attacin	0.0	25.0				
	Gloverin	16.7	5.0				
	Lebocin	16.7		33.3			
	Lysozyme	100.0	100	75.0		100	
	PGRP	80.0	0.0	100		0.0	
GTOX	Attacin	0.0		66.7		16.7	
	Gloverin	0.0	16.7	66.7		50.0	50.0
	Lebocin	0.0	0.0	33.3		33.3	
	Lysozyme	66.7	66.7	100		83.3	83.3
	PGRP	66.7	66.7	83.3		66.7	83.3

Data represent the percentage of all insects tested within each strain (including all developmental stages and tissues).

^a Treatments are detailed in Section 2. Numbers in bold show detection values at higher percentages in the same treatment/AMP comparing NL versus SALX and GTOX strains. EC, *Escherichia coli*. Btt, fresh culture of *Bacillus thuringiensis* serovar *thuringiensis*. Btt-SC, spores and crystals of *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis*.

half of pupae samples but not the hemolymph, except for NL, where it only was found in the hemolymph but not the pupae (Fig. 3A). After bacterial challenge trials, US and USX strains exposed to either fresh Btt culture or Btt-SC expressed attacin only in pupae stage, whereas the GTOX strain did not (data not shown).

3.2. Gloverin expression

Gloverin was detected in pupae samples of the untreated controls of US and USX (16.7%) and SALX (50.0%) (Tables 2 and 3, Fig. 1). SALX, USX, and GTOX strains had higher levels of gloverin when they were exposed to 500 IU of Bt-XT and tested after 20 h exposure, or when

given a higher dose (2500 IU). Similar to attacin, gloverin gene expression was generally at higher percentage in samples exposed to bacterial challenge. Bacterial challenge by Bt-XT and EC induced the highest gloverin expression in the USX strain (Table 2). Gloverin was expressed in all instars, hemolymph, and pupae of US, USX, and GTOX, but expression was variable (Fig. 3B). SALX was the only strain that did not express gloverin in the hemolymph.

3.3. Lebocin expression

Increased lebocin gene expression was noted only in field strains SALX and GTOX exposed to 500 IU of Bt-XT and tested after 20 h exposure, or when given a higher dose

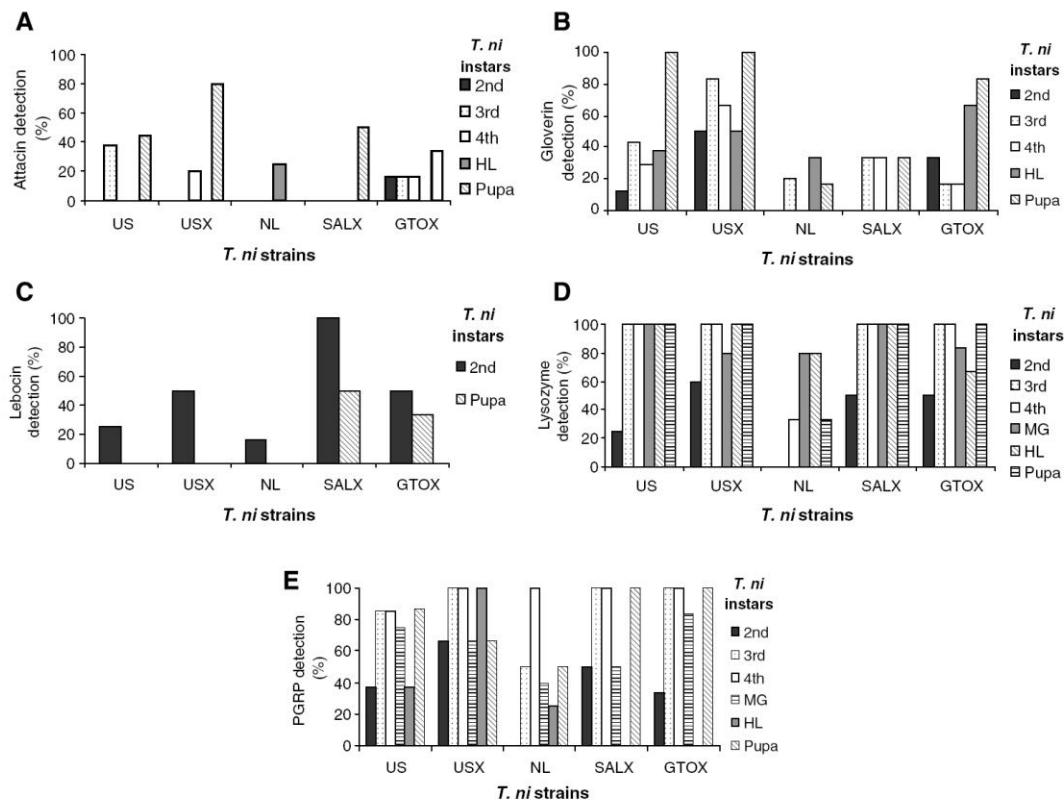


Fig. 3. Detection of antimicrobial peptides (AMPs) by RT-PCR among instars of *T. ni* strains, as a percentage of the total samples tested. (A) Attacin; (B) gloverin; (C) lebocin; (D) lysozyme; (E) peptidoglycan recognition protein (PGRP).

(2500 IU/ml) (Table 3). No differences in lebocin expression were observed in US and USX after bacterial challenge (Table 2). Lebocin gene expression was found in the 2nd instar of all strains, except by NL and GTO untreated controls. Lebocin was found only in pupae samples of the field strains SALX and GTOX (Fig. 3C). Of the 2nd instar samples, untreated controls of the US strain were positive but treatments with 500 or 500* IU/ml for were negative for lebocin, whereas the opposite was observed with GTOX (Fig. 1). None of the other developmental stages or tissues samples expressed lebocin.

3.4. Lysozyme expression

Lysozyme expression was found in all strains (Tables 2 and 3). Increased lysozyme expression was observed in NL and GTOX, in particular when exposed to 500 IU of Bt-XT and assayed 20 h later. Increasing the Bt-XT dose to 2500 IU generally caused an increased lysozyme gene expression in all strains except US. In general, after bacterial challenge the USX, NL, and GTOX strains expressed lysozyme in higher percentage compared with

US and SALX strains. Whereas attacin, gloverin, and lebocin transcripts were not detected in midgut from 4th instar larvae of any *T. ni* strain, lysozyme was detected in many of the midgut samples (Fig. 3D). In contrast, only the midgut and hemolymph samples of NL had higher lysozyme expression, and lysozyme was not detected in NL 2nd instar larvae.

3.5. PGRP expression

PGRP was found in all US and USX untreated controls, but bacterial challenge resulted in a decrease in PGRP expression (Table 2 and Fig. 1). The only samples that demonstrated increased PGRP gene expression were from SALX and GTOX larvae exposed to Bt-XT at 500 IU/ml and analyzed after 20 h. PGRP was not detected in hemolymph samples from SALX and GTOX nor in 2nd instar larvae of NL (Fig. 3E). Almost all midgut GTOX samples expressed PGRP, with the exception of those exposed to the Bt-SC (data not shown). Pupae from US and USX strains did not have PGRP after Bt challenge (data not shown).

4. Discussion

Innate immune systems in insects recognize microorganisms through a series of pattern recognition receptors that are highly conserved in evolution. For example, in *Drosophila*, the activation of the innate immune response involves recognition of the infectious agent and subsequent activation of cellular and humoral responses (Kurata, 2004). Humoral reactions depend on a primary response, which is mediated by the activation of cascades of constitutive proteins present in the hemolymph, and a secondary response, which requires transcriptional activation of AMPs (Kurata, 2004). These peptides accumulate in the infected insect's hemolymph and have the fundamental role of protecting the insect from the pathogenic microorganism (Hoffmann, 1997).

Because AMPs are transcriptionally induced peptides, the secondary humoral response of insects may be defined by a set of peptides that are absent in the naïve state, which has been especially noted with attacin. Bt is more than an infectious agent, because it produces insecticidal toxins that interact with specific receptors in the insect midgut that elicit secondary effects. Based on previous immunity studies (Gillespie et al., 1997), we hypothesized that the production of AMP in Bt exposed insects was the result of a secondary humoral response that result in differences in susceptibility to an infection. Similar results were reported by Crowley and Houck (2002), who found an increased immune response and, more specifically, the expression of cecropin B in pupae of *Calliphora vicina* after *E. coli* exposure. In this study, several comparisons were made based on the results from untreated diets. For example, NL and GTOX strains on untreated diets did not induce gloverin in the pupae stage, and lebecin in the 2nd instar, whereas other strains did.

It was previously reported that attacin expression by *Bombyx mori* larvae was rapidly induced by the injection of *E. coli* bacilli into larvae, and continued at least for 48 h, mainly in fat bodies and hemocytes (Sugiyama et al., 1995). Similarly, 5th instar *B. mori* larvae injected with lipopolysaccharide from *E. coli* showed a significant induction of attacin-like polypeptides, but the level decreased 48 h after injection (Wang et al., 2004). In addition, attacin was not detected in the midgut of lipopolysaccharide injected *B. mori* (Wang et al., 2004) or in immunized *Samia cynthia ricini* larvae (Kishimoto et al., 2002). Whereas attacin has been reported in midgut of *Drosophila* (Tzou et al., 2000), we did not detect attacin in the midgut samples of any *T. ni* strain. Expression of attacin in bacterial challenges of *T. ni* larvae was previously reported from hemolymph samples (Kang et al., 1996a). In the present study, attacin was expressed infrequently in *T. ni* strains exposed to bacteria, but it was induced in GTOX if the sample was analyzed following 20 h of exposure to Bt-XT.

Gloverin is an inducible antibacterial insect protein isolated from pupae of *Hyalophora cecropia* and suppresses *E. coli* growth at very low concentrations (Axen et al.,

1997). In our study, we observed that the expression of gloverin was, in many aspects, similar to that of attacin, as previously reported by Axen et al. (1997). We found that gloverin expression was related to insect stage, where the lowest expression was found in 2nd instar, increasing in 3rd and 4th instar larvae, and the highest at the pupae stage. In many cases, gloverin was induced in US or USX larvae under bacterial challenge. Other tests with *T. ni* have demonstrated that gloverin is expressed in hemolymph and hemocytes of bacteria-immunized larvae (Lundstrom et al., 2002). Based on these results, the gloverin expression in *T. ni* appears to be very specific.

Early studies of lebecin detection in *B. mori* indicated a gene expression pattern typical of an insect antibacterial peptide (Chowdhury et al., 1995). In this study, lebecin was the least detected AMP transcript, only detected in 2nd instar larvae and in three pupae samples. GTOX was the only strain that demonstrated an increase in lebecin in response to bacterial challenge. In a previous study with *T. ni*, a Northern blot analysis demonstrated that lebecin expression was inducible upon bacterial challenge, mainly in fat body and hemocytes, and that its expression reached its highest level after 20 h challenge and continued at least until 60 h after bacterial injection (Liu et al., 2000). Similarly, *B. mori* studies showed that lebecin gene expression occurred tissue-specifically in the fat bodies and continued at least 48 h post bacterial injection (Chowdhury et al., 1995). This may explain our detection of lebecin transcript primarily in 2nd instar larvae. These results also suggest a longer induction time for attacin and gloverin gene expression (and longer expression period) compared with that of lebecin.

One of the most recognized AMPs is lysozyme. Lysozyme has been detected in *H. cecropia* (Hultmark et al., 1983) and *Manduca sexta* larvae (Spies et al., 1986) after *E. coli* exposure. In the present study, lysozyme was the most detected AMP and was constitutively expressed. Lysozyme was detected at high levels in most instars, pupae, and tissues, and its expression levels fluctuated in response to bacterial challenge.

PGRPs are pattern recognition molecules that recognize bacteria and peptidoglycan molecules (Dziarski, 2004). PGRP expression has been reported after the exposure of Gram-positive bacteria or bacterial cell wall fragments in a differential display screen for up-regulated immune genes in *T. ni* (Kang et al., 1998). PGRPs are differentially expressed in various cells and tissues, their expression is often up-regulated by bacteria, and they mediate host responses to bacterial infections (Dziarski, 2004). In *Drosophila*, PGRP are the initial sensors of infecting bacteria that then trigger a cascade leading to the expression of antimicrobial peptides (Girardin and Philpott, 2004). Recent data suggested that in diverse PGRPs are involved in distinguishing between invading bacteria and activation of appropriate immune reactions (Kurata, 2004). Similar to observations with lysozyme, PGRP gene expression was constitutively expressed and fluctuated in response to bac-

terial challenge in the *T. ni* strains. PGRP was not detected in any hemolymph sample of SALX or GTOX, but was detected in all Bt-exposed midgut treatments, suggesting that it is expressed as a response to bacteria challenge or an immune signaling molecule.

Overall, the expression of attacin, gloverin, and lebecin gene in different stages of selected *T. ni* strains was related to bacterial challenge and instar/tissue, whereas lysozyme and PGRP were not. Different patterns of AMP gene expression were found in strains from the US and Mexico. However, all *T. ni* strains previously exposed to Bt demonstrated an increased AMP gene expression. More studies with individual AMP and Bt resistant strains are needed to determine a conclusive relationship between Bt-susceptibility and insect immunity.

Acknowledgments

We want to thank Ludek Zurek at Kansas State University and Pablo Zapata at University of Nuevo Leon for their thoughtful comments to improve the manuscript. This study was supported by the research and scientific exchange division, United States Department of Agriculture-Agricultural Research Services, Grant 210-22310-003-03S, PAICYT-UANL CN1355-06, and CONACyT 36815-B. Mention of trade names or commercial products in this publication is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the US. Department of Agriculture.

References

- Axen, A., Carlsson, A., Engstrom, A., Bennich, H., 1997. Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora pupae*. *Eur. J. Biochem.* 247, 614–619.
- Behle, R.W., McGuire, M.R., Tamez-Guerra, P., 2000. Effect of light energy on alkali released virions from *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 120–126.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Chowdhury, S., Taniai, K., Hara, S., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Xu, J., Choi, S.K., Debnath, N.C., Choi, H.K., et al., 1995. cDNA cloning and gene expression of lebecin, a novel member of antibacterial peptides from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 271–278.
- Crowley, L.D., Houck, M.A., 2002. The immune response of larvae and pupae of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae), upon administered insult with *Escherichia coli*. *J. Med. Entomol.* 39, 931–934.
- DeMaagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Rev. Trends Genet.* 17, 193–199.
- Dziarski, R., 2004. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol. Immunol.* 40, 877–886.
- Edlund, T., Siden, I., Boman, H.G., 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. *Infect. Immun.* 14, 934–941.
- Flyg, C., Kenne, K., Boman, H.G., 1980. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J. Gen. Microbiol.* 120, 173–181.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 611–643.
- Girardin, S.E., Philpott, D.J., 2004. Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *Eur. J. Immunol.* 34, 1777–1778.
- Hara, S., Yamakawa, M., 1995. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. J.* 310, 651–656.
- Hoffmann, J.A., 1997. Immune responsiveness in vector insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11152–11153.
- Hultmark, D., Engstrom, A., Anderson, K., Steiner, H., Bennich, H., Boman, H.G., 1983. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* 2, 571–576.
- Jarosz, J., 1996. Anti-infective defense strategies and methods of escape from entomologic pathogens under immunologic control of insects. *Wiad. Parazytol.* 42, 3–27.
- Kang, D., Liu, G., Gunne, H., Steiner, H., 1996a. PCR differential display of immune gene expression in *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 177–184.
- Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E., Steiner, H., 1998. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10078–10082.
- Kang, D., Lundstrom, A., Steiner, H., 1996b. *Trichoplusia ni* attacin A, a differentially displayed insect gene coding for an antibacterial protein. *Gene* 174, 245–249.
- Kishimoto, K., Fujimoto, S., Matsumoto, K., Yamano, Y., Morishima, I., 2002. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of attacin, an antibacterial protein, from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 881–887.
- Kurata, S., 2004. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by peptidoglycan recognition protein (PGRP)-family members in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 89–95.
- Lam, W., Cosat, G.M., Rayne, R.C., 2000. Characterization of multiple trypsin from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 85–94.
- Liu, G., Kang, D., Steiner, H., 2000. *Trichoplusia ni* lebecin, an inducible immune gene with a downstream insertion element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 803–807.
- Lundstrom, A., Liu, G., Kang, D., Berzins, K., Steiner, H., 2002. *Trichoplusia ni* gloverin, an inducible immune gene encoding an antibacterial insect protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 795–801.
- Marchini, D., Giordano, P.C., Amons, R., Bernini, L.F., Dallai, R., 1993. Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the med fly *Ceratitis capitata* (Insecta: Diptera). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 591–598.
- McGuire, M.R., Galán-Wong, L.J., Tamez-Guerra, P., 1997. Bacteria: bioassay of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran larvae. In: Lacey, L. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, New York, pp. 91–99.
- Natori, S., 1995. Antimicrobial proteins of insect and their clinical application. *Nippon Rinsho* 52, 1297–1304.
- Oppert, B., Kramer, K.L., Beeman, R.W., Johnson, D., McGaughey, W.H., 1997. Proteinase-mediated resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *J. Biol. Chem.* 272, 23473–23476.
- Spies, A.G., Karlinsey, J.E., Spence, K.D., 1986. Antibacterial hemolymph proteins of *Manduca sexta*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 83, 125–133.
- Sugiyama, M., Kuniyoshi, H., Kotani, E., Taniai, K., Kadono-Okuda, K., Kato, Y., Yamamoto, M., Shimabukuro, M., Chowdhury, S., Xu, J., et al., 1995. Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 385–392.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.-B., Malvar, T., Heckel, D.G., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Ménsua, J.L., Ferré, J., 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12780–12785.
- Tamez-Guerra, P., Damas, G., Iracheta, M.M., Gomez-Flores, R., Oppert, B., Rodríguez-Padilla, C., 2006. Differences in susceptibility and physiological fitness of *Trichoplusia ni* (Hübner) strains to *Bacillus thuringiensis* exposure. *J. Econ. Entomol.* 99, 937–945.

ACEPTADO PARA REVISIÓN EN:***JOURNAL OF INSECT SCIENCE***

Date: Tue, 3 Aug 2010 08:51:45 -0500
 From: jis@insectscience.org
 Subject: Re: [JIS] New User Registration
 To: patamez@hotmail.com

Dear Dr. Tamez Guerra,
 Your paper has been sent out for review.

Regards,
 Henry Hagedorn
 Editor
 Dear Henry Hagedorn

I submit a scientific note entitled Comparative Evaluation of Phenoloxidase Production by Lepidopteran Pest Developmental Stages to this journal but it seems I'm doing something wrong. Please let me know how to fix it or if it is good to go, just assign the manuscript with ID 1468 for its review.
 Sincerely

1 **Comparative evaluation of phenoloxidase production by lepidopteran pests during**
 2 **development**

3
 4 J. A. Valadez-Lira¹, J. M. Alcocer-Gonzalez¹, G. Damas¹, G. Nuñez-Mejía¹, B. Oppert², C.
 5 Rodríguez-Padilla, and P. Tamez-Guerra^{1*}

6
 7 ¹ Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad
 8 Autónoma de Nuevo León, México, 66450

9
 10 ² USDA-ARS, Center for Grain and Animal Health Research, 1515 College Ave., Manhattan,
 11 Kansas, 66502 USA

12
 13 Correspondence: jalvali79@yahoo.com.mx, jualcocer@gmail.com, gabydamas@hotmail.com,
 14 grisnzm@hotmail.com, brenda.oppert@ars.usda.gov, cirodrig@mail.uanl.mx,
 15 patamez@hotmail.com, *Corresponding author

16
 17 Key words: innate immune response, *Heliothis virescens*, *Plodia interpunctella*, *Spodoptera*
 18 *exigua*, *Trichoplusia ni*

19
 20 **Abstract**

21
 22 Some lepidopteran insects are important agricultural pests, causing serious crop damage.
 23 Microbial entomopathogen-based bioinsecticides are considered effective pest control
 24 alternatives to synthetic chemicals. However, insects can defend against pathogens by innate
 25 mechanisms, including phenoloxidase (PHO) and antimicrobial peptides, among others. More
 26 importantly, the immune response to biopesticides in arthropods may be related to their lack of
 27 efficacy. In the present study, we evaluated the differences in PHO production by life-cycle
 28 phases of the lepidopteran insect pests *Heliothis virescens*, *Plodia interpunctella*, *Spodoptera*
 29 *exigua*, and *Trichoplusia ni*. The results indicated significant differences in PHO production
 30 among larvae, pre-pupae, pupae and adults among all species. In general, all insects had a
 31 significantly higher PHO production in pre-pupae and pupae, compared with early-instar larvae
 32 and adults. When differences were observed between female and male, PHO production was
 33 higher in females. These results may be used to further investigate bioinsecticide performance in
 34 pest management strategies, and they may be useful particularly if application time is
 35 programmed accordingly to lower PHO production. However, more studies are needed to
 36 determine the relationship between PHO production and the susceptibility of an insect to a
 37 particular bioinsecticide.

ISSN: 1870-3941

REVISTA DE CIENCIAS DEL EJERCICIO -FOD-



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Volumen 6, Suplemento, Octubre 2010

Para enviar correspondencia/Send editorial correspondence to:
 Facultad de Organización Deportiva
 Cd. Universitaria, CP 66451
 San Nicolás de los Garza, Nuevo León
 México
 Tels.: (+52 81) 13404450 y 51
 jeanette.lopezw@uanl.mx
 jose.tristanrr@uanl.edu.mx
 mireya.medinavnva@uanl.mx
<http://www.fod.uanl.mx/>

La Revista en Ciencias del Ejercicio -FOD- (ISSN: 1870-3941) es publicada semestralmente por profesores de la Facultad de Organización Deportiva. Número de Reserva al Título de la Revista: 04-2005-062114425800-01.

Actualmente en trámite el nuevo registro e ISSN, ya que pasará como propiedad de la UANL.

Atención: No está permitida la reproducción total o parcial de esta revista, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares

©REVISTA DE CIENCIAS DEL EJERCICIO

DETECCION DE POLIMORFISMOS GENETICOS DEL GEN ACE EN ATLETAS DE ALTO RENDIMIENTO DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN.

Jose Alberto Valadez-Lira¹; Juan Manuel Alcocer-González¹; Edgar Treviño-García^{2,3};
 Cristina Rodríguez Padilla¹; Deyanira Quistián-Martínez¹.

¹Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León. ²Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Inmunología y Virología.

²Instituto Estatal de Cultura Física y Deporte (INDE). Monterrey N.L. ³Dirección General de Deportes (DGD - UANL). Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

El desempeño físico es una característica heredada de aspecto multifactorial en el cual las características físicas son influenciadas por la carga genética y factores ambientales de tal forma que las disparidades encontradas en el desempeño físico humano pudieran ser explicadas en parte por las diferencias genéticas y la interacción con el medio ambiente. En el atletismo, las distintas disciplinas comprenden acciones físicas que involucran fuerza, velocidad y/o resistencia y el desarrollo de estas características es el objetivo de un buen plan de entrenamiento en el deporte de alto rendimiento. Debido a que la condición física tiene un

fuerte componente genético, los atletas pueden presentar predisposición genética hacia un incremento en el desempeño de una actividad deportiva específica, y la dicha condición puede ser importante para el desarrollo de su carrera deportiva. Con el conocimiento de genes que predisponen al alto desempeño deportivo esta propuesta busca finalmente el desarrollo e implementación de un protocolo donde se aplique la genética en el desarrollo de programas de entrenamiento específicos para cada atleta que busquen el máximo aprovechamiento de tal condición genética. Para la aplicación de tal conocimiento en el deporte nacional, es necesario en primera instancia conocer la existencia de la predisposición o gen en un grupo de atletas consolidados con gran desempeño y relacionarlo con su disciplina y rendimiento. De esta forma este trabajo busca aportar las herramientas de la Biología Molecular en el desarrollo de los programas de formación de atletas de alto rendimiento en nuestro país. Por otra parte existen diversos reportes respecto a los análisis genéticos realizados en deportistas de la rama del atletismo sin distinción de categoría o perfil deportivo en donde se han aplicado las pruebas genéticas para determinar la existencia de predisposición a cierta actividad física; además que se ha utilizado esta información para relacionar estos genes con el rendimiento para otros deportes. En cuanto al rendimiento físico en los atletas en proceso se basa en los conceptos de evaluación de una totalidad de características complejas y definidas como bases para la mejora de los programas y eficiencia de entrenamientos para la búsqueda de un mejor desempeño en competencias en las que incluyen diagnósticos fisiológicos, psicológicos, métodos antropométricos y cualidades físicas. Durante el período de la postgenómica se han asociado características genéticas que han demostrado la fiabilidad de marcadores moleculares genéticos para pronóstico de rendimiento físico humano (Ahmetov, 2008). Una condición genética que se ha estudiado para tales fines es la enzima convertidora de angiotestina la cual es un regulador importante en las funciones relacionadas a la circulación y sistemas vasculares endoteliales. Esta enzima es codificada por el gen ACE localizado en el cromosoma 17 e incluye 3 genotipos distintos el *DD* homocigoto, *ID* Heterocigoto y el genotipo *II* Homocigoto, este ultimo genotipo es responsable de producir altos niveles de la enzima convertidora de angiotestina en el plasma el cual está involucrada en la conversión de angiotestina II actuando como un potente regulador de la estabilidad de las funciones vasculares. En otra investigación se asocio al genotipo *II*, que predispone a un incremento en la resistencia el cual brinda una homeostasis vascular y desarrollo anaerobio y aerobio, mientras que el genotipo *DD* brinda incremento condiciones vasculares y predisposición al desarrollo de velocidad de fuerza (Nazarov, 2001). La importancia del gen ACE ha llevado a los investigadores examinar sus efectos sobre los deportistas de élite y determinar si las variantes polimórficas del gen ACE están ligadas con la resistencia y el rendimiento del deportista (Yang, 2003).

Metodología

Grupo de estudio: Los estudios fueron realizados en 21 atletas del estado de Nuevo León con (11 mujeres y 10 hombres) que conforman el equipo estatal registrado en el CARE (Centro de Alto Rendimiento) pertenecientes al INDE (Instituto Estatal de Cultura Física y Deporte). Los

atletas pertenecen a las distintas categorías infantil, juvenil y elite, entre los cuales se encuentran seleccionados en base a su alto desempeño y su participación actual en competencias nacionales e internacionales (campeones nacionales de la Olimpiada Nacional 2009, campeones de Universiada 2009 y participantes en los Juegos Centroamericanos y del Caribe-Mayagüez 2010) conformando por un grupo de atletas consolidados por al menos 5 años de constancia y empeño en el atletismo Neolonés. Los individuos fueron agrupados de la siguiente forma: grupo A- salto (longitud, triple, altura), B- velocidad (100 m, 110 V, 200 m), C- velocidad (200 m, 400 m, 400 V), D- medio fondo (800 m), E - Fondo (10K-21 K). Análisis genético: La muestra del epitelio bucal se tomó mediante un hisopo estéril y posteriormente se extrajo el ADN (Acido Desoxirribonucleico). Posteriormente se procedió a una detección génica de los polimorfismos del gen ACE por medio de la técnica de Biología Molecular PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Para la distinción de las variantes de cada uno de los genes se procedió a realizar comparaciones en los patrones de migración en las bandas amplificadas por PCR en el caso del gen ACE se hace distinción de formas alternativas del gen (alelos) entre los cuales se encuentra una variante alélica la cual da la conformación de la presencia de características de cualidades de resistencia (alelo *I*) y velocidad (alelo *D*). En el cual se obtendrá un patrón polimórfico distinto asociado a la variante buscada en el caso del alelo *I* el peso esperado por electroforesis en gel de agarosa es de 490 pares de bases y para el alelo *D* un peso de 190 pares bases. En cuanto al análisis de resultados fue cualitativo, se agruparon en la presencia de distintos alelos en la que se determinaron solamente las variantes alélicas para cada polimorfismo del gen ACE y se diferenciaron en los alelos // Homocigoto, *I/D* Heterocigoto y *DD* en Homocigoto y los resultados se agruparon en frecuencias de polimorfismos respectivos.

Resultados y conclusión

Anteriormente se había reportado la existencia de genes o predisposiciones genéticas al alto desempeño deportivo. En este estudio se consideró la existencia de los polimorfismos o alelos ventajosos y su prevalencia en atletas agrupados específicamente por su prueba y requerimientos de velocidad y/o resistencia. En primera instancia se logró detectar la presencia de alelos considerados como favorables en atletas destacados del estado de Nuevo León, lo que confirma la asociación positiva entre la presencia de esta condición y el desempeño físico. En los datos obtenidos se encontró una relación clara entre el polimorfismo detectado y el requerimiento de la prueba por ejemplo. En pruebas que involucran características de fuerza, resistencia y velocidad como son las pruebas de velocidad (100m-400m planos) que presentaron el polimorfismo *DD*, los atletas con este alelo se confirman como buenos candidatos para estas pruebas además de la necesidad de mantener continuidad en su formación.

En atletas de velocidad con polimorfismo *I*, el desarrollar de estrategias de entrenamiento para potenciar su velocidad muy probablemente se vea reflejado en la competencia. En los grupos

de resistencia (grupos D y E), en donde se encontró el polimorfismo // se confirman como candidatos para la continuidad de procesos. Sin embargo aquellos atletas de esta prueba que se detectó el polimorfismo *DD* asociado a velocidad, podría considerarse ajustar su categoría de acuerdo a su predisposición o utilizarse en las estrategias de competencia. En el grupo de fondo, se caracterizó la presencia de los alelos de resistencia por lo que se confirma la existencia de una relación entre la predisposición genética y su desempeño, sin embargo en algunos de los otros atletas de las otras disciplinas se detectó el polimorfismo de velocidad por lo que sería ventajoso utilizar esta característica en estrategias de competencia.

Esta información es altamente aprovechable y los resultados de estos análisis son el resultado de las primeras investigaciones en el país en su tipo en los que se relaciona las condiciones genético-atléticas para la confirmación de genes favorables en deportistas mexicanos con un gran desempeño. Estos diagnósticos obtenidos deberán extenderse y así mismo comprobar su eficacia en atletas consolidados, además de que existe una amplia probabilidad de ampliarse a distintos deportes en los que implique características de resistencia y velocidad. A su vez podrían aplicarse a estrategias de juego en la que impliquen funciones específicas de cada posición dependiendo el deporte y la disciplina. Este estudio representa un enfoque vanguardista del conocimiento genético con aplicación a la mejora del atletismo de alto rendimiento y con amplias aportaciones en el deporte nacional reflejado a corto y largo plazo en un proceso de obtención de resultados.

ACEPTADO PARA PUBLICACIÓN EN 2011:***REVISTA MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN CULTURA FÍSICA
Y DEPORTE***

Nota: Las Investigaciones premiadas en el certamen de investigación de cultura física y deporte 2010, en automático son consideradas para publicación en el Num. 3, de dicha revista.

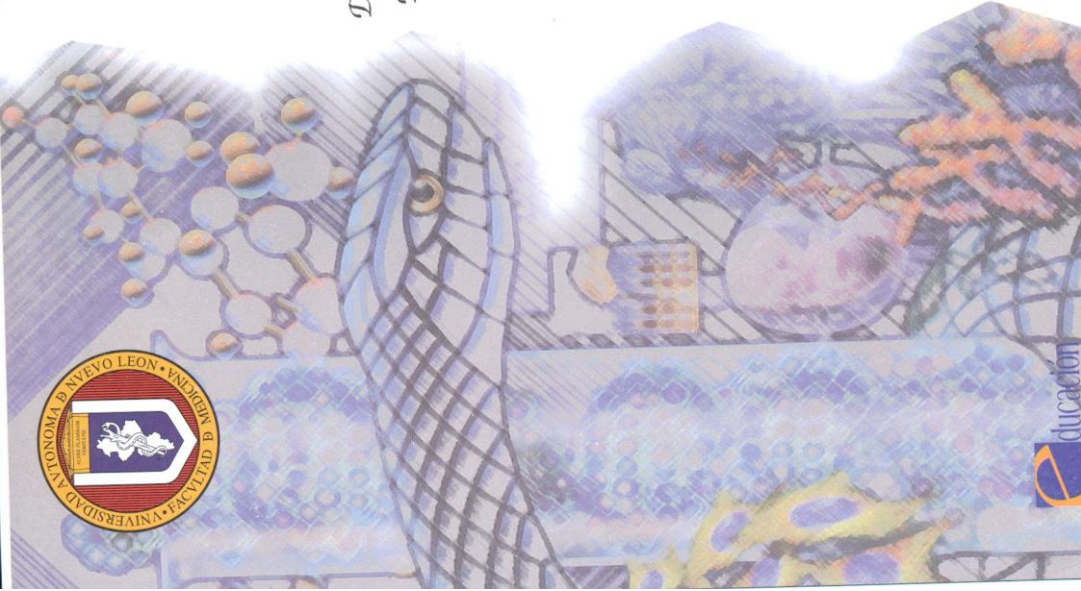
“Detección de polimorfismos genéticos enfocado al aprovechamiento en el desarrollo de estrategias de entrenamiento de atletas de alto rendimiento”**RESUMEN**

En este trabajo se estudiaron las características genéticas de atletas distinguidos con el propósito de su utilización como herramienta genética aplicada al deporte de alto rendimiento. El estudio genético consistió en el análisis de polimorfismos del gen ACE relacionado a resistencia y velocidad. Este estudio se realizó en atletas de las categorías infantil, juvenil y elite del estado de Nuevo León y selección nacional ambos competidores sobresalientes en pruebas multivariadas de velocidad. Se procedió a analizar su ADN por la técnica de PCR y posteriormente se analizó por electroforesis la presencia de los polimorfismos y su relación con su actividad y aptitud en las pruebas asociadas a velocidad y/o resistencia. A través del análisis se logró la detección de polimorfismos favorables en atletas destacados analizados para el gen ACE. Este estudio puede apoyar el diseño de entrenamientos en el atletismo mexicano de alto rendimiento con el fin de favorecer el máximo desempeño de acuerdo a sus cualidades genéticas. **Palabras clave:** polimorfismo, gen ACE, alto rendimiento

ABSTRACT

In this work we studied the genetic characteristics of elite athletes for the purpose of their use as genetic tool applied to high performance sport. The genetic study was the analysis of ACE gene polymorphisms related to endurance and speed. This study was performed in athletes of the categories child, youth and elite of the state of Nuevo Leon and national team competitors outstanding speed multivariate tests. We performed DNA analysis by PCR test and then analyzed by electrophoresis for the presence of polymorphisms and their relationship with their activity and fitness associated with speed tests and / or resistance. Through the analysis it was possible to detect polymorphisms in elite athletes tested positive for the ACE gene. This study may support the design of training in the Mexican high-performance athletics in order to promote maximum performance according to their genetic qualities.

Key words: polymorphism, ACE gene, high performance



Congreso Nacional de Investigación Biomédica

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Dr. Juan Manuel Alcocer González, Biol. Alberto Valadez Lira, Dra. Cristina Rodríguez Padilla y Dr. Reyes S. Tamez Guerra

Por haber obtenido el

SEGUNDO LUGAR

en el área de CIENCIAS BÁSICAS Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

En los Trabajos presentados para CONCURSO dentro del

XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica

efectuado del 23 al 25 de Octubre de 2002, con el trabajo:

Expresión del Gen L1 de Papiloma virus tipo 16 en tejido muscular y tracto genital mediante la administración de plásmidos.

"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, N.L. Junio de 2003.

Dr. Jesús Ancer Rodríguez
Director de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario

Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

Dr. Francisco Javier Bosques Padilla
Secretario de Investigación

MÉXICO 2010

Bicentenario Independencia
Centenario Revolución



El Sistema Nacional de Cultura Física y Deporte
a través de la
Comisión de Formación, Capacitación, Certificación e Investigación
Otorga el presente

Reconocimiento

José Alberto Valadez Lira

por haber obtenido el

**Primer Lugar de la Categoría Abierta en el Área de Ciencias Aplicadas
del Certamen Nacional de Investigación en Cultura Física 2010.**
Monterrey, Nuevo León 25 y 26 de noviembre de 2010.



Lic. Bernardo de la Garza Herrera
Presidente del Sistema Nacional
de Cultura Física y Deporte

Lic. Jaime Gutiérrez Jones
Secretario Técnico del Sistema Nacional
de Cultura Física y Deporte

Dr. William A. Maldonado Mauregui
Presidente de la Comisión de Formación,
Capacitación, Certificación e Investigación

GOBIERNO
FEDERAL

SEP



ENTREVISTA – CONADE



Gobierno Federal
SEP



Comisión Nacional
de Cultura Física
y Deporte

[Inicio](#) | [English](#) | [Mapa del Sitio](#) | [Contacto](#) | [RSS](#) |

www.conade.gob.mx

[Conade](#) | [Marco Jurídico](#) | [Comunicación Social](#) | [Programas](#) | [Eventos](#) | [Transparencia](#) | [Enlaces Externos](#)

COMUNICACIÓN SOCIAL

[NOTICIAS](#)

[FOTOGRAFÍAS](#)

BOLETÍN DEL VIERNES, 26 DE NOVIEMBRE DE 2010

Portal CONADE Fotos Noticias

2010, Año de la Patria. Bicentenario del Inicio de la Independencia y Centenario del Inicio de la Revolución
MONTERREY, Nuevo León

Aplican biología molecular para mejorar rendimiento de atletas mexicanos

** El doctor José Alberto Valdez obtuvo el primer lugar del Certamen Nacional de Investigación en Cultura Física 2010

MONTERREY, Nuevo León.- El uso de la biología molecular aplicada al deporte es aplicada ya para mejorar el rendimiento de los deportistas mexicanos y puesta en marcha por el investigador Alberto Valdez quien obtuvo el primer lugar en el área de ciencias aplicadas en el III Certamen Nacional de Investigación en Cultura Física, realizado en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, en donde presentó el trabajo denominado "Detección de polimorfismos genéticos enfocados al aprovechamiento en el desarrollo de estrategias de atletas de alto rendimiento".

"Es el primer trabajo conocido a nivel nacional que tiene la capacidad de aplicar esta tecnología al deporte, porque la mayoría de las investigaciones genómicas se enfocan a problemas de salud. El resultado más destacado en nuestro estudio fue encontrar qué característica individual tenía genéticamente cada deportista", detalló Valdez Lira.

"Explicó que las características individuales pueden ser un factor determinante en el proceso de su etapa de competencia. "Si el polimero o gen de un deportista está asociado a velocidad, buscamos darle trabajo en el aspecto de resistencia para que su velocidad de competencia, a nivel de cierre o en estrategia, sea más satisfactorio", dijo Valdez Lira, también licenciado en biología y maestro en inmunología.

Asimismo, destacó que la investigación se realizó en el transcurso de un año, "debido a que el prototipo que utilizamos fueron atletas de alto rendimiento de pista y campo. Trabajamos con sus resultados en la Olimpiada Nacional, Universiada y esperamos para ver si calificaban a algún evento internacional, como fue un panamericano y algunos mundiales juveniles".

Sostuvo que para este estudio buscaron a atletas consolidados "porque sabíamos que a ellos se les da seguimiento y tenían la oportunidad de ser deportistas elite".

Informó que el primer resultado de este trabajo fue la aplicación de las herramientas de la biotecnología, biología molecular y genética en la búsqueda de la predisposición de genes o polimorfismos favorables para el rendimiento físico. La segunda aportación fue encontrar qué cualidades están predispuestas en todo atleta y de que carecía cada uno.

"Actualmente, gracias a estos resultados, se han modificado los programas de entrenamiento para quienes carecían de resistencia; si eran velocistas les dimos más trabajo de resistencia, para que su velocidad fuera más prolongada. Ya hemos visto resultados en el incremento de su rendimiento, es un punto positivo porque obtuvimos las variantes de este grupo de atletas y se aprovechó a su favor", concluyó Valdez Lira, quien en el 2003 también ganó un premio en biomedicina.

Última modificación :
Miércoles 11 de Noviembre de 2010 por Nicolás G. Silva Contreras

Camino a Santa Teresa # 482, Colonia Peña Pobre, Delegación Tlalpan C.P. 14060 México D.F. (55) 59-27-52-00 Comentarios sobre este Sitio de Internet

COMISIÓN NACIONAL DE CULTURA FÍSICA Y DEPORTE, MÉXICO - ALGUNOS DERECHOS RESERVADOS © 2010 - POLÍTICAS DE PRIVACIDAD

