

## 1. RESUMEN

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria gram positiva que forma una endospora y un cristal proteico cuando se encuentra en condiciones de privación de nutrientes. Las proteínas que forman el cristal (Cry) son tóxicas para larvas de insectos. Las toxinas Cry son especie-específico y usualmente su toxicidad está restringida a unas cuantas especies dentro de un orden en particular de insectos, tales como: *Lepidóptera*, *Díptera*, *Coleóptera* e *Himenóptera*. Esta característica le da a esta bacteria un uso extenso como insecticida biológico en contra de plagas de cultivos de importancia comercial como la papa, el algodón y el maíz.

Las toxinas Cry son toxinas citolíticas que actúan modificando la permeabilidad de la membrana, a lo que deben el nombre de toxinas formadoras de poro, cuando se aplican en altas concentraciones matan a sus células blanco por oncosis. La oncosis es una vía preletal que conlleva a la muerte de la célula acompañada de la inflamación celular y de los organelos, vacuolarización y aumento de la permeabilidad de la membrana. Sin embargo, antes de que este daño irreversible ocurra, la célula puede desencadenar mecanismos sofisticados y presentar vías de transmisión de señales como respuesta a concentraciones bajas o sub-líticas de toxinas formadoras de poro. Para las toxinas formadoras de poro se ha descrito la inducción de apoptosis (pneumolisina, hemolisina- $\alpha$  y toxina  $\alpha$ ) y piroptosis para la toxina letal de Ántrax.

Dados los casos anteriores y habiendo investigaciones previas de los mecanismos de muerte celular que provocan las toxinas Cry en células intestinales de larvas de *Manduca sexta* cuando se aplican en dosis alta, el objetivo de este trabajo fue determinar el tipo de muerte celular que provoca la toxina Cry1Ab en las células de las vellosidades intestinales de las larvas de *M. sexta* de primer instar. Para lograr esto hicimos un análisis de la inducción de la expresión de los genes de Caspasas-1 y -3 como indicadores de muerte celular por piroptosis y apoptosis respectivamente. En el análisis de la inducción de la expresión de los genes de Caspasas-1 y -3, causada por la intoxicación de las larvas de *M. sexta* con la toxina Cry1Ab con una  $LD_{50}$  se induce la expresión de la Caspasa-3 entre las

24 y las 48 horas después de aplicada la toxina. Por otro lado, se puede observar la inducción de la expresión de la Caspasa-1 en un rango de tiempo de entre 48 y 72 horas a la misma dosis letal. Esto nos permite sugerir que a tiempos más cortos, la célula responde a la intoxicación induciendo apoptosis. Sin embargo, a tiempos más largos y con una intoxicación sostenida, que es como se hicieron estos experimentos, el sistema de defensa opta por responder induciendo piroptosis que involucra la formación del complejo multiproteico inflamasoma y la activación de otras moléculas del sistema inmune.

## 2. SUMMARY

*Bacillus thuringiensis* is an endospore-forming bacterium characterized by the presence of a protein crystal within the cytoplasm of the sporulating cell. The proteins within this crystal are toxic to insects. The Cry toxins are species-specific and usually their insecticidal activity is restricted to a few species within one particular order of insects, such as: *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* and *Himenoptera*. These characteristics explain the extensive use of *Bacillus thuringiensis* as biological insecticides towards insect plagues on high commercial interest crops like potato, cotton and corn.

The Cry toxins are cytolytic toxins that act by modifying the cell membrane permeability, that's why they belong to the pore forming toxins group, killing their target cell via oncosis when used in high concentrations. The term oncosis is defined as a pre-lethal pathway leading to cell death accompanied by cellular swelling, organelle swelling, blebbing, and increased membrane permeability. However, before the irreversible damage occurs, the cell may trigger sophisticated mechanisms and display signal-transduction pathways as responses to sub cytolytic concentrations of pore forming toxins. For Cry toxins it has been reported the induction of apoptosis occurs (pneumolysin,  $\alpha$ -haemolysin and  $\alpha$ -toxin) and pyroptosis occurs for the anthrax lethal toxin.

With all this background and with previous research of the Cry toxin mode of action in *M. sexta* larvae intestinal tissue when used in high doses, the objective of this project was to determine the type of cell death that the Cry toxin provokes in the intestinal cells of the first instar *M. sexta* larvae. To achieve this we analysed the induction of the expression of the Caspase-1 and -3 genes as markers of cell death via pyroptosis and apoptosis, respectively. In the analysis of the induction of the expression of the Caspase-1 and -3 genes, caused by the *M. sexta* larvae intoxication with Cry1Ab toxin, we observed that at a LD<sub>50</sub> the Caspase-3 expression is induced between 24 and 48 hours after the toxin application. On the other hand, we observed the induction of the expression of Caspase-1 in a time range of 48 and 72 hours. This suggests that in short-term exposures the cell responds to the intoxication by inducing apoptosis. However in long-term sustained

intoxication, as these bioassays were done, the defence system chooses to respond inducing pyroptosis that involves the formation of multiprotein inflammasome complexes and the activation of other immune system molecules.