



MECANISMO DE AÇÃO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Lidia Mariana Fiuza

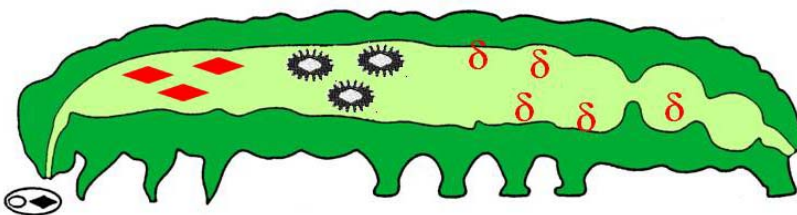
Engenheira Agrônoma (UPF), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS),
Doutora em Ciências Agronômicas (ENSAM-Montpellier) e Pós-Doutora em
biotecnologia Vegetal (CIRAD-Montpellier).

O estudo do modo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* será abordado revelando a especificidade dessas toxinas através da detecção de receptores presentes no sistema digestivo dos insetos-alvo. O tema trata do modo de ação completo de *B. thuringiensis*, desde a ingestão do entomopatógeno até a morte do inseto. O processo de análise de receptores nos tecidos dos insetos é descrito detalhadamente, envolvendo diferentes abordagens metodológicas de detecção de sítios de ligação das proteínas inseticidas e uma discussão com dados de diversos autores que desenvolvem pesquisas nessa área.

1.1 Modo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis*

As análises do modo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* visam esclarecer os mecanismos pelos quais estas proteínas exercem seu efeito entomopatogênico e elucidar a especificidade das diferentes toxinas (Endo e Nishiitsutsuji-Uwo, 1980; Höfte e Whiteley, 1989; Gill et al., 1992; Schnepf et al., 1998; Fiuza, 2004). Considerando o conjunto de informações atualmente disponíveis sobre as fases entre a ingestão dos cristais e a morte das larvas dos insetos suscetíveis às proteínas Cry de *B. thuringiensis*, descreve-se como fases do mecanismo de ação:

- (i) Inicia pela solubilização dos cristais em pH alcalino no intestino médio dos insetos, liberando as protoxinas de 130-140 kDa para Cry1 e 70 kDa para Cry2. Essa etapa é determinante à especificidade do isolado de *B. thuringiensis* à espécie alvo, tanto pela alcalinidade do sistema digestivo quanto pela composição dos cristais de *B. thuringiensis*.
- (ii) Protoxinas são ativadas pelas enzimas digestivas, formando fragmentos tóxicos de 60-65 kDa. Nessa etapa tanto a composição proteolítica quanto a estrutura protéica do cristal são importantes.
- (iii) Toxinas reconhecem receptores específicos às microvilosidades das células epiteliais do intestino médio das larvas suscetíveis às quais elas se ligam. Os estudos realizados com BBMV (*Brush Border Membrane Vesicles*) isoladas de larvas de lepidópteros mostram que a ligação de forte afinidade entre a toxina e o receptor é reconhecido como um fator importante na determinação do espectro inseticida das proteínas Cry (Fiuza et al., 1996). Dados de pesquisa mostram que há uma correlação positiva entre a ligação, *in vitro*, da toxina no receptor intestinal e a toxicidade, *in vivo*. Por outro lado, outros estudos descrevem que o reconhecimento do receptor é necessário, mas não é suficiente para provocar a toxicidade, sugerindo a existência de outros fatores relacionados ao modo de ação das proteínas Cry. Em 1994, Knight et al., isolaram de BBMV de larvas de *Manduca sexta*



(Lep., Sphingidae) uma aminopeptidase N implicada na interação da toxina Cry1Ac. Os modelos de receptores atualmente descritos mostram que um inseto pode apresentar, em quantidade variável, diversas classes de receptores que podem ser reconhecidos por diferentes toxinas. Dados de pesquisa revelam que estes modelos podem explicar a especificidade das toxinas de *B. thuringiensis*.

- (iv) Após o reconhecimento do receptor, a toxina induz a formação de poros na membrana celular do epitélio intestinal. A formação dos poros na membrana celular provoca o desequilíbrio iônico entre o citoplasma e o meio externo à célula. As análises histopatológicas realizadas após a intoxicação dos insetos mostram a destruição das microvilosidades, hipertrofia das células epiteliais, vacuolização do citoplasma e *lyse* celular, levando o inseto a paralisia e morte.

Na seleção das proteínas inseticidas, sintetizadas por essa bactéria, as análises *in vitro* dos receptores membranares podem viabilizar uma rápida determinação do espectro de ação das proteínas Cry contra as espécies alvo, sendo em seguida efetuada a avaliação da toxicidade *in vivo*, apenas para os isolados pré-selecionados como ativos *in vitro*. Sendo assim, o presente trabalho trata de diferentes métodos de análise de receptores de proteínas de *B. thuringiensis* em formas imaturas de lepidópteros.

1.2 Análise de receptores em cortes histológicos de insetos

1.2.1 Tecidos dos insetos

As larvas de insetos podem ser obtidas de coletas a campo, as quais devem passar por um período de quarenta em condições controladas, ou oriundas de criação massal de insetos mantida em laboratório, em condições controladas de temperatura, umidade relativa e fotofase, as quais podem variar de acordo com a espécie do inseto. Os tubos digestivos dos insetos são dissecados e fixados 24 h, em *Bouin Hollande Sublimé* a 10%, lavados por 12 h em água destilada e desidratados em séries crescentes de etanol, 70 a 100% (Brandtzaeg, 1982). Em seguida os tecidos são impregnados em

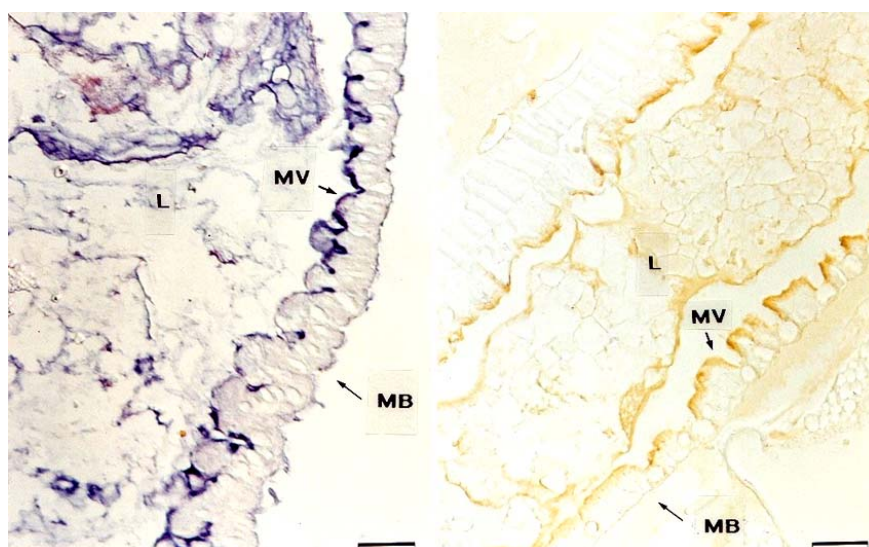


Figura 1. Receptores de proteínas Cry biotiniladas, revelados nos tecidos de larvas de lepidópteros, com fosfatase alcalina e peroxidase (Fiuza, 1995)

banhos mistos (etanol/tolueno/paraplasto) e incluídos em paraplasto 100% a 58°C. Os cortes longitudinais ou transversais, de 7 a 10 µm de espessura, preparados com micrótomo LKB, são montados em lâminas de vidro, tanadas com *poly-L-lysina* a 10%, e conservadas a 4°C para posterior análise de receptores em cortes histológicos.

1.2.2 Proteínas Cry

As cepas de *B. thuringiensis* podem ser cultivadas em meio usual glicosado por aproximadamente 5 dias, conforme o método de Mahillon & Delcour (1984). Após a lise bacteriana devem ser centrifugadas e lavadas com tampão fosfato, pH 6. Os cristais são separados dos esporos e das células bacterianas em gradiente de renografina ou sacarose por ultra centrifugação, conforme metodologia descrita por Sharpe *et al.* (1975). As bandas, contendo os cristais puros, são lavadas e diluídas em água *milli-Q* esterilizada, contendo *phenylmethylsulfonyl* (PMSF).

As proteínas Cry são solubilizadas em tampão fosfato, pH 10. Esse pH deve ser ajustado a 8,6 por diálise contra o tampão 20 mM Tris e as proteínas Cry são ativadas por *bovine pancreatic trypsin* (Type I), sendo a reação inativada com *trypsin inhibitor* (Type II). A pureza e a integridade das proteínas pode ser avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). A concentração

pode ser determinada pelo método Bradford (1976), usando a *bovine serum albumin* (BSA) como proteína padrão.

1.2.3 Proteínas biotiniladas

As proteínas Cry podem ser biotiniladas, conforme o método descrito por Bayer & Wilcheck (1990), onde a incorporação da biotina na parte N-terminal da proteína é feita usando o BNHS (biotinyl-N-hydroxysuccinimide) em tampão de bicarbonato de sódio, pH 9. O produto da reação deve ser purificado em *sephadex G-25* (Sigma) e as frações biotiniladas identificadas por *dot-blot*, onde se utiliza membrana de nitrocelulose, o conjugado de estreptavidina-fosfatase-alcalina diluída no tampão TST (*Tris-Saline-Triton*, pH 7,6) e o substrato de revelação (BCIP e NBT em tampão Tris; pH 9,5). A concentração das proteínas Cry biotiniladas pode ser determinada pelo método Bradford (1976), usando a BSA como proteína padrão. A pureza e a integridade das proteínas marcadas pode ser avaliada em *western-blot*, usando membrana de nitrocelulose (Sigma) e o tampão *Towbin*, pH 8,3 com 10% etanol. As membranas podem ser reveladas usando a mesma técnica descrita no *dot-blot*.

1.2.4 Anticorpos

As proteínas Cry são preparadas, conforme descrito anteriormente na purificação, e depois são utilizadas na obtenção de anticorpos em pequenos animais como: coelhos, ratos e camundongos, entre outros. O soro coletado dos animais é utilizado na obtenção das imunoglobulinas (IgGs), as quais podem

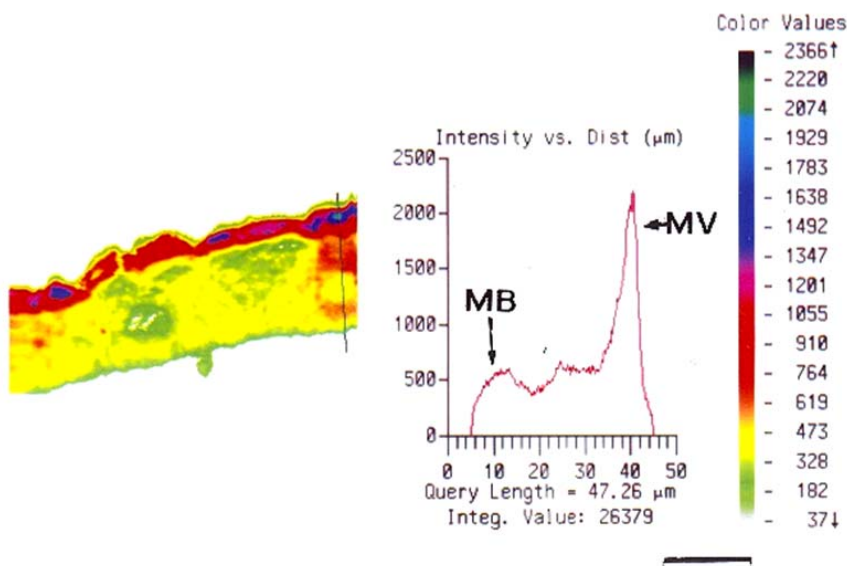


Figura 2. Receptores de proteínas Cry biotinizadas, detectados nos tecidos de larvas de lepidópteros com fluoresceína e observados em microscopia de varredura laser (Fiúza, 1995)

ser separadas em colunas de *sepharose protein-A* e as frações purificadas por afinidade incubando os IgGs e as membranas de nitrocelulose, contendo os antígenos previamente transferidos por *western-blot* conforme descrito por Burke et al. (1982). A especificidade e sensibilidade dos anticorpos policlonais é determinada pelo método de *dot-blot* e ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*.

1.2.5 Detecção *in vitro* de receptores

As análises *in vitro* dos receptores de proteínas Cry de *B. thuringiensis* são realizadas com cortes histológicos do sistema digestivo das larvas dos insetos em estudo. A detecção propriamente dita corresponde a incubação dos tecidos com as proteínas, previamente desparafinados e reidratados.

Nas análises com proteínas Cry biotinizadas, os cortes histológicos são incubados à temperatura ambiente, durante 1h, com as proteínas biotinizadas. As proteínas não ligadas aos sítios receptores são removidas com TST, pH 7,6.

Na etapa posterior, os tecidos são tratados com estreptavidina conjugada a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina) ou fluorocromo (fluoresceína ou ficoeritrina), diluídos em tampão TST. O complexo da reação "proteína-receptor", usando o conjugado com enzimas pode ser revelado com substrato DAB para peroxidase e BCIP/NBT para fosfatase alcalina (Figura 1), sendo as seções montadas com *Pertex*, entre lâmi-

na e lamínula de vidro.

Nas revelações com fluorocromos, com a fluoresceína (Figura 2), os cortes histológicos são montados com *Mowiol* e conservados a 4°C para análise em microscopia óptica - MO ou microscopia de varredura Laser - MVL.

Nas análises imunohistoquímicas, com proteínas não marcadas (proteínas nativas), os receptores são revelados com o complexo anticorpo primário (AC₁, específico contra a proteína Cry) e anticorpo secundário (AC₂, dirigido contra o AC₁) conjugado a uma enzima ou fluorocromo, os quais são revelados e montados de acordo com o método descrito anteriormente. As testemunhas são preparadas pela omissão alternada de cada etapa da reação, a fim de eliminar a hipótese de reações falso-positivas. As amostras reveladas com enzimas, tipo peroxidase e fosfatase alcalina, podem ser avaliadas em microscopia óptica. Para as análises onde são utilizados os fluorocromos pode ser utilizada a microscopia de fluorescência convencional ou de varredura laser.

1.3 Considerações

As marcagens detectadas na região das microvilosidades das células do epitélio intestinal revelam a presença de receptores membranares às proteínas Cry, nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio das larvas dos insetos (Figuras 1 e 2).

No caso dos tecidos tratados como controle, representantes da omissão al-

ternada dos diferentes componentes da reação, pode-se observar a ausência de coloração nas microvilosidades das células do epitélio intestinal dos insetos em estudo.

As imunodeteccões e as deteccões de proteínas Cry biotinizadas foram utilizadas por diversos autores, para revelação de receptores membranares intestinais, em larvas de diferentes espécies de lepidópteros (Bravo et al., 1992a; Denolf et al., 1993a; Estada e Ferre, 1994; Fiúza, 1995), de dípteros (Ravoahangimalala et al., 1993) e de coleópteros (Bravo et al. 1992b; Denolf et al., 1993b; Boets et al., 1994). Esses autores comprovaram que as ligações das proteínas Cry nas microvilosidades do intestino médio das larvas de insetos correspondem à existência de um receptor específico à referida proteína no inseto-alvo.

Considerando, os estudos dos receptores *in vitro* e as análises da toxicidade *in vivo*, pode-se inferir que os métodos de detecção de receptores membranares podem ser aplicados na seleção das proteínas ativas contra insetos, havendo uma correlação positiva entre as análises *in vitro* e *in vivo*. Porém, para determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) de uma proteína Cry faz-se necessário o bioensaio uma vez que as ligações das proteínas aos receptores podem variar em concentração e afinidade, como já descrito por diversos autores, para diferentes espécies de insetos (Denolf et al., 1993a; Van Rie et al., 1990; Fiúza et al., 1996; Lee et al., 1996; Hua et al., 2001). Também há estudos demonstrando que as proteínas Cry tóxicas aos insetos correspondem àquelas que se ligam de forma irreversível aos receptores das células epiteliais dos insetos alvo (Liang et al., 1995).

No controle biológico de insetos, a espécie *Bacillus thuringiensis* oferece as melhores alternativas à produção de biopesticidas e à engenharia genética de plantas. Sendo assim, é fundamental avaliar o espectro de ação e a especificidade das proteínas potencialmente inseticidas e, nesse contexto, Fiúza (2004) menciona que a análise *in vitro* dos receptores membranares pode ser considerada uma ferramenta indispensável face ao grande número de isolados, cepas e proteínas de *B. thuringiensis* já identificados, que representam um potencial no manejo de insetos-praga.

1.4 Referências

Bayer, E.; Wilcheck, M. 1990. Protein biotinylation. Methods in Enzymo-

- logy, 184: 138-159.
- Boets, A.; Jansens, S.; Denolf, P.; Peferoen, M.; Degheele, D.; Van Rie, J. 1994. Sequential observations of toxin distribution and histopathological effects of CryIIIa in the gut of intoxicated *Leptinotarsa decemlineata* larvae. XXVIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, p. 377.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brandtzaeg, P. 1982. Tissue preparation methods for immunocytochemistry. In: Bullock G. & Petruz P., *Techniques in immunocytochemistry*. Academic Press, London. pp. 49-51.
- Bravo, A.; Jansens, s.; Peferoen, M. 1992a. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60:237-246.
- Bravo, A.; Hendrickx, K.; Jansens, S.; Peferoen, M. 1992b. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60:247-253.
- Burke, B.; Griffiths, G.; Reggio, H.; Louvard, D. & Warren, G. 1982. A monoclonal antibody against a 135-K Golgi membrane protein. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1: 1621-1628.
- Denolf, P.; Jansens, S.; Peferoen, M.; Degheele, D.; Van Rie, J. 1993a. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Applied Environmental Microbiology*, 59(6):1828-1837.
- Denolf, P.; Jansens, S.; Van Houdt, S.; Peferoen, M.; Degheele, D.; Van Rie, J. 1993b. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Applied Environmental Microbiology*, 59(6):1821-1827.
- Endo, Y. & Nishiitsutsuji-Uwo, J. 1980. Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Histopathological Changes in the Silkworm Midgut. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36:90-103.
- Estada, U.; Ferre, J. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni* and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Applied Environmental Microbiology*, 60(10):3840-3846.
- Fiuza, L. M. 1995. Etude des sites récepteurs et de la toxicité des delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* Berliner chez les larves de la Pyrale du riz, *Chilo suppressalis* Walker. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques, ENSA-M, Montpellier, France. 180p.
- Fiuza, L. M.; Nielsen-Leroux, C.; Goze, E.; Frutos, R.; Charles, J-F 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera, Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Applied Environmental Microbiology*, 62:1544-1549.
- Fiuza, L. M. 2004. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos: análises *in vitro* de receptores membranares de proteínas Cry em larvas de lepidópteros. *Bioteologia Ciência & Desenvolvimento*, 32: 82-87.
- Gill, S.; Cowles, E. & Pietrantonio, P. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Reviews Entomology*, 37:615-636.
- Höfte, H. & Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bt*. *Microbiological Reviews*, 53: 242-255.
- Hua, G.; Masson, L.; Jurat-Fuentes, J. L.; Schwab, G.; Adang, M. J. 2001. Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied Environmental Microbiology*, 67(2):872-879.
- Knight, P.; Crickmore, N. & Ellar, D. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIaC delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11: 429-436.
- Knowles, B.H. & Bow, J.T. 1993. The delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*, 15: 469-476.
- Laemmlli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lee, M. K.; You, T. H.; Young, B. A.; Cotrill, J. A.; Valatis, A. P.; Dean, D. H. 1996. Aminopeptidase N purified from Gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied Environmental Microbiology*, 62:2845-2849.
- Liang, Y., Patel, S. S.; Dean, D. H. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins to Gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *Journal of Biology Cheml.* 270:24719-24724.
- Mahillon, J. & Delcour, J. A. 1984. A convenient procedure for the preparation of highly purified parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal. of Microbiology Methods*, 3:69-76.
- Ravoahangimalala, O.; Charles, J-F.; Schoeller-Raccaud, J. 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). *Research of Microbiology* 144:271-278.
- Sharpe, E.; Nickerson, K.; Bulla, L. & Aronson, J. 1975. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain x-ray contrasting agents. *Applied Microbiology*, 30(6): 1052-1053.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Vanrie, J., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology Molecular Biology Review* 62:775-806.
- Van Rie, J.; Jansens, S.; Höfte, H.; Degheele, D. & Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 1378-1385. 🌱