

Obtención de vesículas de las microvellosidades del epitelio intestinal del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache

Brush border membrane vesicle purification using Andean Potato Weevil (*premnortrypes vorax* Hustache) epithelial midgut tissue

Wilson Martínez O. *, Jairo Cerón S. **

RESUMEN

La exploración del uso potencial de microorganismos como agentes de control biológico de plagas requiere estudios básicos acerca de su mecanismo de acción en el insecto blanco seleccionado. El empleo de vesículas obtenidas a partir de las microvellosidades epiteliales del intestino de los insectos (BBMV's), se ha constituido en una herramienta valiosa a nivel mundial para el estudio del mecanismo de acción de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* considerado como el agente de control microbiológico por excelencia. El objetivo del presente trabajo fue normalizar una metodología para la obtención de BBMV's a partir del intestino del gusano blanco de la papa, con el fin de utilizarlas posteriormente en estudios para determinar la potencialidad de uso de proteínas de *B. thuringiensis* con actividad tóxica hacia coleópteros, para el control biológico de este insecto. El trabajo se llevó a cabo empleando larvas de último instar de *P. vorax*, obtenidas de una cría de laboratorio. Se partió de la metodología propuesta por Wolfersberger *et al.* (1987) con modificaciones desarrolladas por los autores. Las BBMV's obtenidas se caracterizaron mediante electroforesis de proteínas SDS PAGE y microscopía electrónica de transmisión. Así mismo, se cuantificó la cantidad de proteína total obtenida por ml de purificado. Se logró la obtención de un purificado de vesículas con tamaños y formas de características similares a los reportados en la literatura internacional por otros autores. La concentración promedio de proteína total obtenida fue de 1 mg/ml, siendo adecuada para estudios de unión con proteínas de *B. thuringiensis*. El análisis electroforético indicó la presencia de un complejo de proteínas en el purificado con pesos moleculares que oscilan entre 24 y 116 KDa. La metodología de purificación para obtener BBMV's será empleada en estudios de unión de proteínas de *B. thuringiensis* con las proteínas receptoras presentes en las microvellosidades del intestino del gusano blanco de la papa.

Palabras clave: Coleoptera, unión, proteínas Cry, plaga.

ABSTRACT

The use of micro-organisms as biological pest control agents requires basic studies related to their action mechanism inside the target insect. Brush border membrane vesicles (BBMV's) obtained from different insects' epithelial gut tissues have become a valuable tool worldwide in action mechanism studies employing *Bacillus thuringiensis*, which is considered to be the micro-organism most used for biological pest control in agriculture throughout the world. This work's objective was to standardise a BBMV purification methodology using Andean potato weevil gut tissues for use in further studies with coleopteran *B. thuringiensis* proteins, exploring their potential in turn as *P. vorax* biological control agents. This work was carried out with *P. vorax* late stage larvae, obtained from a laboratory colony. BBMV's purification methodology was standardised by using a basic methodology developed by Wolfersberger *et al.* (1987). BBMV's were characterised by SDS PAGE and electron microscopy analysis. Total protein present was also quantified. A BBMV purificate was obtained, having vesicles with size and shape similar to others reported in the international literature. Average total protein was 1 mg/ml, this being suitable for *B. thuringiensis* protein binding assays. BBMV SDS PAGE analysis showed a protein complex with proteins ranging from 24 KDa to 116 KDa. Nowadays, BBMV purification methodology is being used in *B. thuringiensis* protein binding studies with brush border receptors present in Andean potato weevil gut.

Key words: Coleoptera, binding, Cry proteins, pest.

* MSc. Entomología, Instituto de Biotecnología, U.N. Bogotá. E-mail: wilmarti@ibun.unal.edu.co **

PhD. Biotecnología. Instituto de Biotecnología, U.N. Bogotá. E-mail: jaceron@ibun.unal.edu.co

Recibido: enero 10 de 2002; **aceptado:** septiembre 19 de 2002

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis es un microorganismo habitante natural del suelo que se ha convertido en el agente de control microbiológico de plagas más empleado a nivel mundial. Las investigaciones sobre este microorganismo se han enfocado hacia diversos campos, siendo el estudio de su mecanismo de acción el aspecto más relevante cuando se desea explorar el uso potencial de las proteínas tóxicas que produce (Glare y O'callaghan, 2000). En los últimos años, la realización de ensayos *in vitro* utilizando vesículas obtenidas a partir de las microvellosidades epiteliales del intestino de los insectos, comúnmente llamadas BBMV's (Brush Border Membrane vesicles), se han constituido en herramientas de gran valor para estudios de mecanismo de acción de *B. thuringiensis*. El método desarrollado por Wolfersberger y colaboradores en 1987, para la extracción de BBMV's empleando larvas de *Pieris brassicae*, ha servido de base para que varios investigadores realicen pruebas *in vitro* con proteínas de *B. thuringiensis* en otro tipo de insectos. En general este es un método de centrifugación diferencial que hace uso de la mayor densidad de cargas electrostáticas negativas de la membrana luminal en comparación con la membrana basolateral del intestino de los insectos, para separar estas dos fracciones (Van Rie *et al.*, 1989). Las investigaciones sobre mecanismo de acción de *B. thuringiensis* empleando BBMV's se han desarrollado utilizando generalmente insectos del orden lepidoptera (Van Rie *et al.* 1990; Denolf *et al.* 1993; Aranda *et al.* 1996; Lee *et al.* 1999; Rausell *et al.* 2000) y en pocos casos insectos de otros ordenes como díptera (Abdul-Rauf & Ellar, 1999) y coleoptera (Belfiore *et al.* 1994). En Colombia, la exploración del uso de proteínas de *B. thuringiensis* con actividad tóxica hacia insectos coleopteros plaga aún no ha sido desarrollada; por lo tanto, como punto de partida para el inicio de estudios de este tipo, en el presente trabajo se plantea la estandarización de una metodología para la obtención de BBMV's tomando como insecto blanco a *Premnotrypes vorax* Hustache.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue desarrollado en los laboratorios de entomología y biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

Material entomológico

El material biológico para llevar a cabo los diferentes ensayos se obtuvo mediante cría del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache, bajo condiciones de laboratorio (15°C y 60% HR). La alimentación del insecto se hizo con dieta natural consistente en plantas y tubérculos de papa. Los insectos adultos se mantuvieron en recipientes plásticos y se alimentaron con hojas y tubérculos de papa. Se colocaron tallos secos de gramíneas dentro de los recipientes para proporcionar sitios de oviposición a las hembras (Valencia y Bohorquez, 1994). Los trozos de tallo con los huevos se ubicaron en recipientes plásticos con papel absorbente humedecido. Una vez obtenidas las larvas de primer instar, una parte se utilizó para el mantenimiento del pie de cría y otra parte para la obtención de larvas de último instar para los ensayos.

Purificación de vesículas

La preparación de las vesículas de las microvellosidades de células epiteliales del intestino de *P. vorax* se realizó tomando como patrón la metodología desarrollada por Wolfersberger *et al.* en 1987 y Macintosh *et al.* en 1994, a las cuales se le introdujeron algunas modificaciones según las características de los materiales empleados y los equipos disponibles.

El proceso de purificación se inició pesando 20 gramos de larvas (aproximadamente 300 larvas) de último instar del gusano blanco de la papa (Figura 1), las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% y lavadas dos veces con agua destilada estéril.

El material fue luego macerado en mortero preenfriado adicionando solución buffer MET pH 7.5 (Manitol 300 mM, Tris 17 mM, EGTA 5mM, DTT 2mM, PMFS 0.5 mM, Hepes 10 mM, EDTA 1mM, SBT y neomicina sulfato 1 µg/ml), igualmente refrigerada.

El material obtenido fue centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos y filtrado para eliminar el material no triturado. La pastilla obtenida se resuspendió en solución buffer MET y se homogenizó empleando un macerador de tejidos Potter-Elvehjem (Wheaton) adaptado a un motor a 2000 rpm. El homogenizado se mezcló con una solución de MgCl₂ 24 mM y se dejó en hielo por 15 minutos. Se realizó una

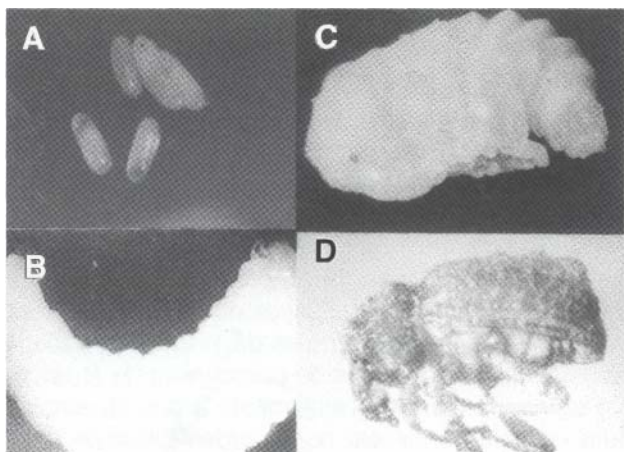


Figura 1. Ciclo de vida de *Premnotrypes vorax* Hustache (Coleoptera: Curculionidae). A, huevos; B, larva de último instar; C, pupa; D, adulto.

centrifugación a 4500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 16000 rpm por 30 minutos. La pastilla obtenida se suspendió nuevamente en buffer MET y se repitió el proceso anteriormente descrito.

La pastilla obtenida se suspendió en buffer MET y se alicuotó en tubos eppendorf de 500 μ l. Los tubos se marcaron y se almacenaron en nevera a -70°C . Se realizó cuantificación de la proteína total presente en el purificado de las BBMV's obtenido, empleando la metodología de Bradford (Bollag y Edelstein, 1991).

El purificado de las BBMV's obtenidas se caracterizó posteriormente mediante electroforesis de proteínas SDS-PAGE en gel al 9% y microscopía electrónica de transmisión para corroborar la presencia, características y abundancia de las vesículas de la membrana epitelial del intestino del gusano blanco de la papa. Las muestras para observación en microscopio electrónico se prepararon con anterioridad empleando un proceso de tinción negativa sobre una microrejilla de cobre (Kessler *et al.* 1978).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de vesículas

El canal alimenticio de los insectos consta de tres partes principales: estomodeo, mesenterón y proctodeo. Las células más características del mesenterón o intestino medio son alargadas y con microve-

llosidades regulares formando un borde estriado adyacente al lumen. Dichas células llamadas "columnares" están involucradas en secreciones enzimáticas y absorción de los productos de digestión en el intestino de los insectos; así mismo, tienen un papel importante en el mecanismo de acción de *B. thuringiensis*, ya que es en la membrana plasmática de estas células donde están localizadas las proteínas receptoras a las cuales se unen las toxinas de esta bacteria. El protocolo de purificación de vesículas (BBMV) busca básicamente obtener segmentos de la membrana plasmática de las células columnares presentes en el intestino de *P. vorax*. Dichos segmentos de membrana forman estructuras similares a vesículas o vacuolas cuya parte externa contiene las proteínas receptoras pudiendo ser utilizadas para ensayos de unión con proteínas de *B. thuringiensis*.

La caracterización del purificado de las BBMV's de *P. vorax* por microscopía electrónica de transmisión (Figura 2) indicó la presencia de vesículas formadas por los segmentos de membrana epitelial del intestino de este insecto. Se observaron múltiples vesículas ovoides de diferentes tamaños con contornos pilosos. Estas observaciones indicaron que el purificado de las BBMV obtenido presentó similitud en sus características morfológicas con los purificados de membranas epiteliales de intestino reportados por Wolfersberger *et al.* (1987) y Abdul-Rauf y Ellar (1999) en insectos y Kessler *et al.* (1978) en roedores.

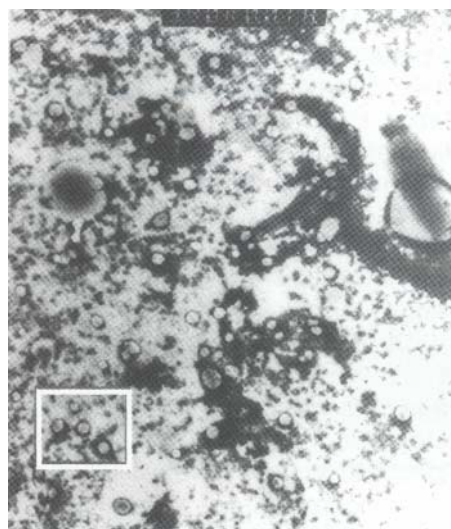


Figura 2. Caracterización por microscopía electrónica de transferencia del purificado de las BBMV's de *P. vorax*. Como ejemplo se muestra un grupo de 4 vesículas (ver recuadro).

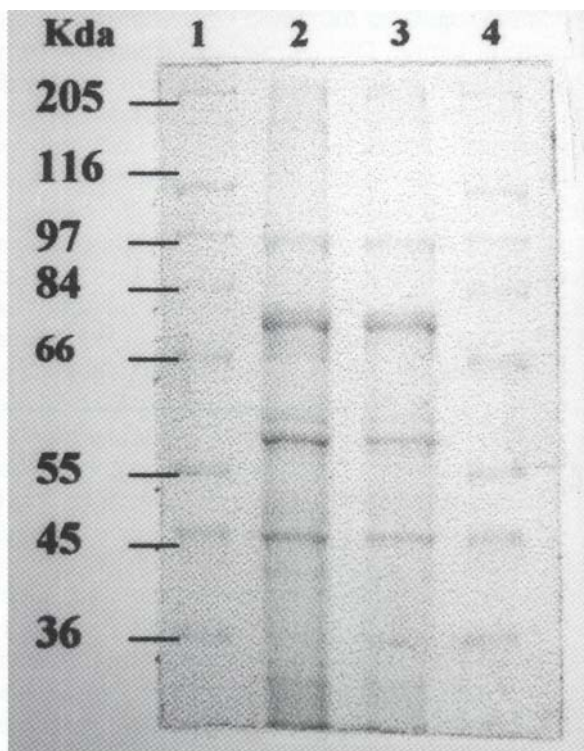


Figura 3. Caracterización por SDS-PAGE del purificado de BBMV's obtenido con larvas de último instar de *P. vorax*. Carril 1, Marcador de peso molecular; Carril 2, Purificado de BBMV's fresco; Carril 3, Purificado de BBMV's almacenado 6 meses a -70 °C; Carril 4, Marcador de peso molecular.

En la caracterización del purificado de las BBMV de *P. vorax* por electroforesis de proteínas (figura 3), se observó la presencia de un gran número de proteínas con un amplio rango de pesos moleculares que oscilan entre 116 y 24 KDa. Se presentaron cuatro bandas sobresalientes de aproximadamente 97, 75, 60 y 45 KDa. Las bandas de proteínas del purificado de las BBMV observadas en el análisis SDS-PAGE, presentaron un patrón similar a los reportados por Wolfersberger *et al.* (1986) para purificados de vesículas de *P. brassicae* y Abdul-Rauf y Ellar(1999) para purificados de *A. aegypti*.

Para la obtención de purificados de vesículas de insectos que presentan estadios larvales de tamaño pequeño como *P. opercullela* y *P. Xylostellla* y con concentraciones de proteína cercanas a 1mg/ml, se requieren hasta 1000 individuos. De acuerdo con esto, el protocolo de purificación de BBMV con *P.vorax*, fue ajustado a la cantidad de material disponible.

Los productos obtenidos en varias purificaciones mostraron como es lógico un incremento en la concentración de proteína de los BBMV's a mayor número de larvas empleadas, aumentando desde 0.3 mg/ml con 100 larvas a 1.5 mg/ml con 300 larvas. Los valores de concentración de proteína de los últimos purificados empleando 300 larvas (20 gr aproximadamente) oscilaron entre 1.52 y 1.83 mg/ml; de acuerdo con esto, en nuestro caso, la concentración de proteína mínima requerida para ensayos de unión con proteínas de *B. thuringiensis* que es de 1 mg/ml, se obtiene con solo 250 - 300 larvas de último instar de *P. vorax*. Lo anterior atribuible posiblemente a que se empleó una especie de insecto de un orden diferente a las mencionadas anteriormente.

Siguiendo con los ajustes a la metodología base, el macerado inicial de las larvas que se realiza normalmente en un equipo especial, se realizó manualmente sobre un mortero pre-enfriado sobre hielo, adicionando un paso de filtrado luego de la centrifugación para eliminar el material sólido de los residuos cuticulares de las larvas. Por otro lado, la conservación del purificado obtenido no se hizo en nitrógeno líquido, como se plantea en la metodología de referencia, sino directamente en nevera a -70 °C.

Las observaciones en microscopio electrónico y el análisis de proteínas por SDS-PAGE se realizaron tanto para purificados de las BBMV recién purificados como para aquellos almacenados durante 6 meses; las observaciones anteriores indicaron que no había diferencias entre los dos tipos de purificados, lo cual confirma que la modificación en las condiciones de almacenamiento no alteraron el purificado de BBMV's, manteniéndose las características morfológicas y bioquímicas de las vesículas por dicho tiempo.

La metodología de purificación estandarizada en el presente trabajo se empleará para obtener BBMV's y realizar estudios de unión de proteínas de *B. thuringiensis* con las proteínas receptoras presentes en las microvellosidades del intestino del gusano blanco de la papa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y al programa INCO de la CEE contrato IC18-CT98-0303 por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, E., Sánchez, J., Peferoen, M., Güereca, L., Bravo, A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : noctuidae). *J. invertebr. pathol.* 68 : 203-212.
- Abdul-Rauf, M., Ellar, D. 1999. Isolation and characterization of brush border membrane vesicles from *Aedes aegypti* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 45-51.
- Belfiore C. J., Vadlamudi R. K., Osman Y. A., Bulla L.E. 1994. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol. 200, No 1. pp 359-364.
- Bollag, D., Edelstein, S. 1991. *Protein Methods*. Wiley and Sons Inc. New York, USA. 250 p.
- Denolf, P., Jansens, S., Van Houdt, S., Peferoen, M., Degheele, D., Van Rie, J. 1993. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* Insecticida! Crystal Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(6):1821-1827.
- Glare, T., O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Wiley and sons ed. West Sussex, U.K. 350 p.
- Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Muller, M., Semenza, G. 1978. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 506, 136-154.
- Lee, M., You, T., Gould, F., Dean, D. 1999. Identification of residues domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Ac toxin that affect binding and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10): 4513-4520.
- Macintosh, S., Lidster, B., Kirkham, L. 1994. Isolation of brush border membrane vesicles from whole diamonback moth (*lepidoptera: plutellidae*) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 97-98.
- Rausell, C., Martínez, A., García, I., Real, M. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* CryIAb toxin is lost during larval development in two forest pests. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1553-1558.
- Valencia, L., Bohorquez, C. 1994. Oviposición del gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) (Coleoptera:curculionidae). *Rev. Col. Entom.* 20(3):165-167.
- Van Rie, J., Jansen, S., Hofte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H, 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the especificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5): 1378-1385.
- Van Rie, J., Jansen, S., Hofte, H., Degheele, D., Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186: 239-247.
- Wolfersberger, M., Luthy, P, Maurer, A., Parenti, P, Sacchi, V., Giordana, B., Hanozet, G. 1987. Preparation and Partial Characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*P. brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.* 86:301-308.