

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación

Mario Soberón y Alejandra Bravo

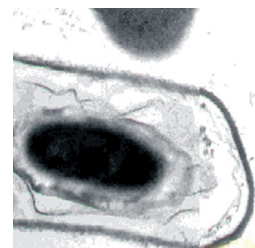
El control de insectos plaga en la agricultura y de vectores de enfermedades humanas se ha realizado principalmente con la aplicación de insecticidas químicos. Estos insecticidas han generado problemas de contaminación ambiental, de toxicidad a insectos no blancos y, de manera más importante, a los agricultores que los aplican. Se estima que cada 40 segundos muere un humano por problemas generados por contaminación con plaguicidas. Por otra parte, los insecticidas químicos han perdido su eficacia en el control de insectos, ya que su aplicación ha generado la aparición de poblaciones de insectos resistentes. La pregunta es: ¿existe un insecticida ideal, que sea tóxico sólo para su insecto blanco, que no sea recalcitrante, que no contamine el ambiente y que no genere la aparición de insectos resistentes?

Bacillus thuringiensis (Bt) es el insecticida biológico más utilizado comercialmente, y tradicionalmente se ha ocupado para el control de insectos plaga en la agricultura y de mosquitos vectores de enfermedades como la malaria y el dengue. Una característica importante de las proteínas Cry producidas por Bt es que son altamente específicas e inocuas para vertebrados y otros insectos no blanco. Es por estas características que se desarrolla-

ron plantas transgénicas que producen toxinas Cry1A (específicas contra larvas de lepidópteros) que le confieren la característica de resistencia al ataque de insectos plaga. Si embargo, esta tecnología corre el riesgo de que aparezcan poblaciones de insectos resistentes a las toxinas Cry. De hecho, se han aislado en el laboratorio poblaciones de insectos lepidópteros resistentes a estas toxinas. En las siguientes líneas hablaremos sobre estas proteínas, cómo matan a su insecto blanco y cuáles son sus aplicaciones más importantes.

***Bacillus thuringiensis* (Bt)**

Es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales: *crecimiento vegetativo*, donde las bacterias se duplican por bipartición, y *esporulación*, un programa de diferenciación de bacteria a espora. Bt es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. A Bt se le caracteriza por producir un cuerpo paraesporal conocido como *crystal* durante su fase de esporulación, el cual es de naturaleza proteínica y tiene propieda-



303

des insecticidas (**figura 1**). El cristal proteínico está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry ó Cyt. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoarios.

Clasificación de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*

Como se mencionó, existen dos tipos de δ -endotoxinas: las proteínas Cry y las proteínas Cyt. A la fecha se han clonado y secuenciado más de 200 diferentes genes *cry* y 16 diferentes genes *cyt*. Esto es sin duda un arsenal muy valioso para el control de diferentes insectos plaga y de insectos transmisores de enfermedades. La nomenclatura de las δ -endotoxinas está basada exclusivamente en la similitud de la secuencia primaria. La definición de proteínas Cry es cualquier proteína paraesporal de Bt que muestre un efecto tóxico hacia algún organismo, verificable por medio de bioensayos o cualquier proteína que muestre similitud con las proteínas Cry. Actualmente se han encontrado toxinas Cry en otras especies de bacterias como *Clostridium bifementans* (clasificadas como Cry16A y Cry17A) con actividad hacia mosquitos. Las proteínas Cyt denotan a las proteínas paraesporales de Bt que muestren actividad hemolítica o tengan similitud a la secuencia de las toxinas Cyt.

A la fecha, las proteínas Cry están distribuidas en 50 grupos y varios subgrupos, y las proteínas Cyt en dos grandes grupos y varios subgrupos. Cada grupo muestra una especificidad muy grande hacia ciertos tipos de insectos. La figura 2 muestra un filograma de las toxinas Cry descritas a la fecha. Esta información se actualiza constantemente y puede consultarse en la siguiente dirección URL: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

Las líneas verticales de la **figura 2** representan los límites en identidad que marcan las

diferentes categorías en la nomenclatura. El número arábigo se designa con la primera fila que corresponde hasta 45% de identidad (por ejemplo: Cry1, Cry2, etc.). La segunda hilera cataloga a las proteínas con una letra mayúscula y corresponde a identidades de 45 a 78% (Cry1A, Cry1B, etc.). La tercera fila asigna una letra minúscula y corresponde a identidades de 78 a 95% (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, etc.). La última fila incluye un número arábigo al final de la nomenclatura indicando más de 95% de identidad (Cry1Aa1, Cry1Aa2, etc.). El grupo mayoritario de toxinas Cry se les conoce como la familia de tres-dominios, ya que están constituidas por tres dominios estructurales (**figura 3**).

Modo de acción de las toxinas Cry

Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. De manera general se acepta que las toxinas Cry son toxinas formadoras de poro que ejercen su actividad tóxica al provocar un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde se insertan en la membrana. Datos obtenidos por nuestro grupo de investigación apoyan de manera contundente el modo de acción que propone la formación de un poro lítico una vez que las toxinas se insertan a la membrana.

Las proteínas Cry son producidas como protoxinas que requieren ser procesadas proteolíticamente por proteasas presentes en el intestino de insectos susceptibles. Este procesamiento proteolítico libera fragmentos tóxicos de 55 a 65 kDa que interaccionan con proteínas receptoras presentes en la microvellosidad de las células intestinales de los insectos blanco. Posteriormente, las toxinas se insertan en la membrana formando un poro lítico.

A la fecha se han resuelto las estructuras tridimensionales de varias toxinas Cry activas contra insectos coleópteros, lepidópteros, dípteros y una con actividad dual. A pesar que la identidad entre estas toxinas es baja (en algu-

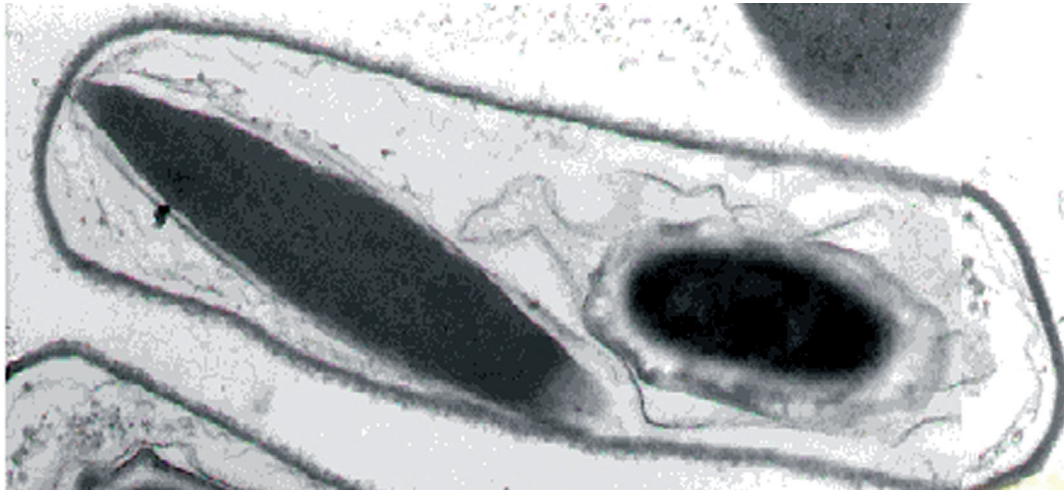


Figura 1.
Microfotografía de *Bacillus thuringiensis* en microscopio electrónico de transmisión. Se muestra el cristal proteínico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso.

nos casos menores al 25 %), muestran una estructura similar compuesta por tres dominios (**figuras 2 y 3**). El dominio I está constituido por siete hélices α antiparalelas y anfipáticas. Seis de éstas forman un ramillete que rodea a la hélice α 5. Éste es el dominio que forma el poro iónico. El dominio menos conservado en secuencia y estructura terciaria entre las toxinas Cry es el dominio II. Este dominio está formado por tres láminas plegadas β y por tres asas. En las asas de estas láminas β se observa la mayor diferencia estructural. El dominio II juega un papel fundamental en la especificidad de la toxina, donde las asas interactúan con el receptor localizado en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio. El dominio III está formado por dos láminas plegadas β antiparalelas formando un sándwich. El dominio III también está involucrado en la interacción con receptores (**figura 3**).

Las proteínas que se han propuesto como posibles receptores de las toxinas Cry1A en insectos lepidópteros son la aminopeptidasa N (APN) y una proteína de la familia de las caderinas (BtR). La APN es una proteína con masa aparente de 120 kDa que se encuentra anclada a la membrana a través de un grupo glicosilfosfatidil-inositol (GPI), mientras BtR tiene una masa de entre 175 a 210 kDa dependiendo del insecto lepidóptero. Por otra parte, en mosquitos identificamos una proteína anclada a través de un grupo GPI con actividad de fosfatasa alcalina de 65 kDa que interactúa con la toxina Cry11Aa (Fernández *et al.*, 2006).

Nuestro grupo demostró que la interacción de la toxina con el receptor caderina promueve un corte adicional del extremo amino terminal, facilitando la formación de un oligómero o pre-poro formado por cuatro monómeros que es el responsable de la inserción a la membrana y la formación del poro. Para que el pre-poro se inserte a la membrana, se requiere que interactúe con el receptor APN. Las proteínas ancladas a la membrana por GPI se distribuyen de manera preferencial en regiones específicas de la membrana, conocidas como *balsas lipídicas*, que tienen características particulares debido a su alto

contenido de colesterol y glucolípidos. La interacción del pre-poro de la toxina Cry con la APN facilita la inserción del oligómero en las balsas lipídicas membranales, lo que resulta en la formación del poro (Bravo *et al.*, 2004). La **figura 4** muestra nuestra propuesta de modo de acción.

Bti, una bacteria inteligente

Un caso excepcional es el control de mosquitos por una cepa de Bt conocida como *Bacillus thuringiensis* subespecie *israeliensis* (Bti). Esta bacteria produce tres toxinas Cry (Cry4A, Cry4B y Cry11A) y dos toxinas Cyt (Cyt1A y Cyt2A) con alta actividad insecticida contra larvas de diferentes especies de mosquitos y otros dípteros. Bti se ha ocupado por más de 30 años en el control de mosquitos y moscas transmisores de enfermedades como el dengue, la malaria y la oncocercosis sin que a la fecha se haya reportado la aparición de resistencia. Distintos estudios en diferentes laboratorios demostraron que la no aparición de insectos resistentes a Bti se debe a la presencia de la toxina Cyt1Aa. Se han podido aislar poblaciones de moscos resistentes a las toxinas Cry4A, Cry4B y Cry11A, o a las tres toxinas, sin embargo no se han podido aislar poblaciones resistentes a la toxina Cyt1Aa. Es más, las poblaciones de mosquitos resistentes a las toxinas Cry recuperan la sensibilidad a estas toxinas en presencia de cantidades subletales de Cyt1Aa. Por otra parte, se ha demostrado que la toxina Cyt1A sinergiza la actividad insecticida de las otras toxinas Cry, es decir, la actividad tóxica de la mezcla de toxinas Cry con Cyt es mucho mayor que la suma de sus actividades individuales.

Las toxinas Cry y Cyt son toxinas formadoras de poro. Esto significa que para matar a su insecto blanco, las toxinas Cry y Cyt se insertan en la membrana de las células apicales del intestino formando un poro que permite el paso de iones y agua, provocando un desbalance osmótico y finalmente la lisis celular. Sin embargo, las toxinas Cry y Cyt tienen mecanismos diferentes para interactuar con la membrana. Es importante mencionar que el mecanismo más

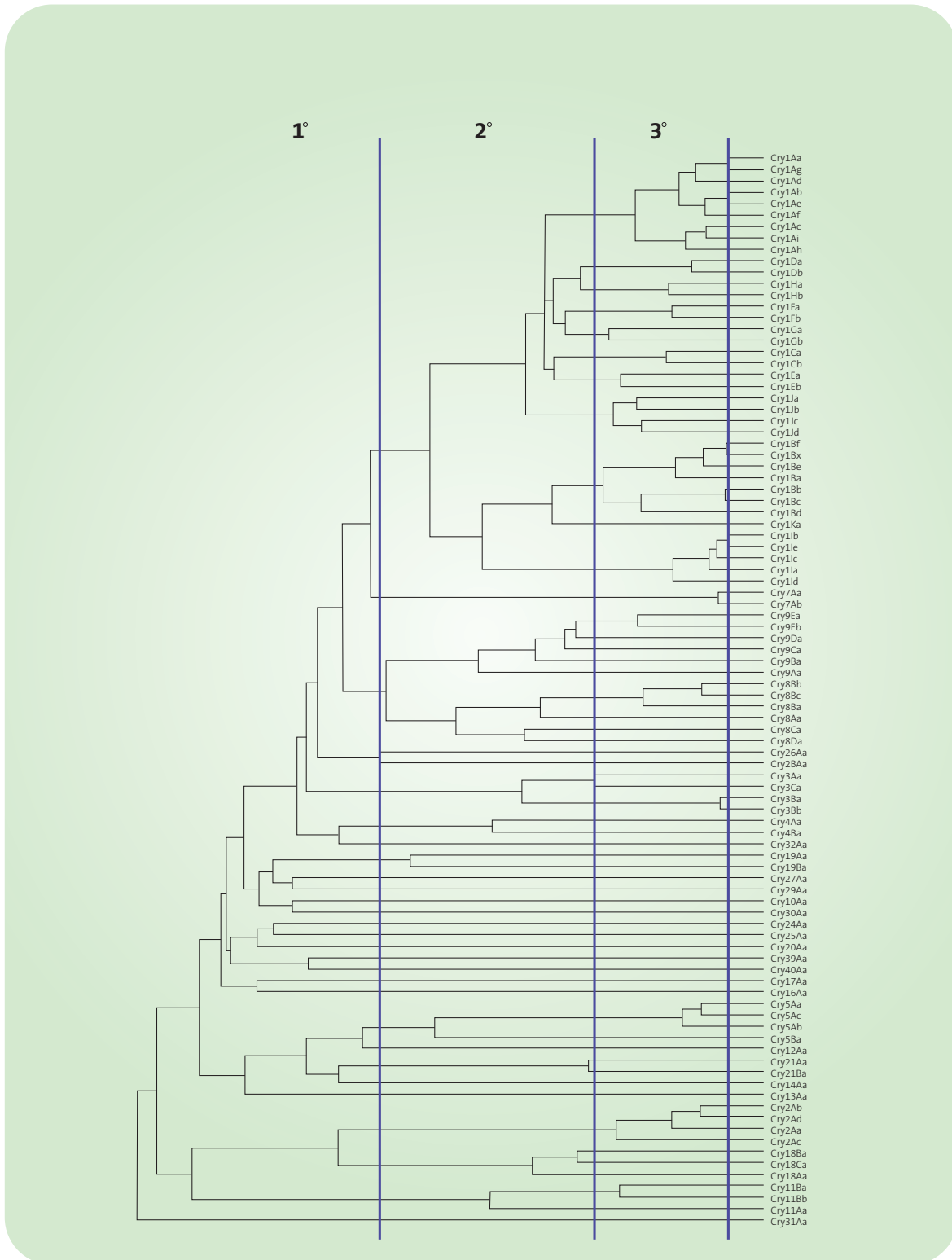


Figura 2. Filograma de identidades entre las secuencias Cry. Las líneas verticales denotan los cuatro niveles de la nomenclatura. Tomado y adaptado de http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

Cry1Aa

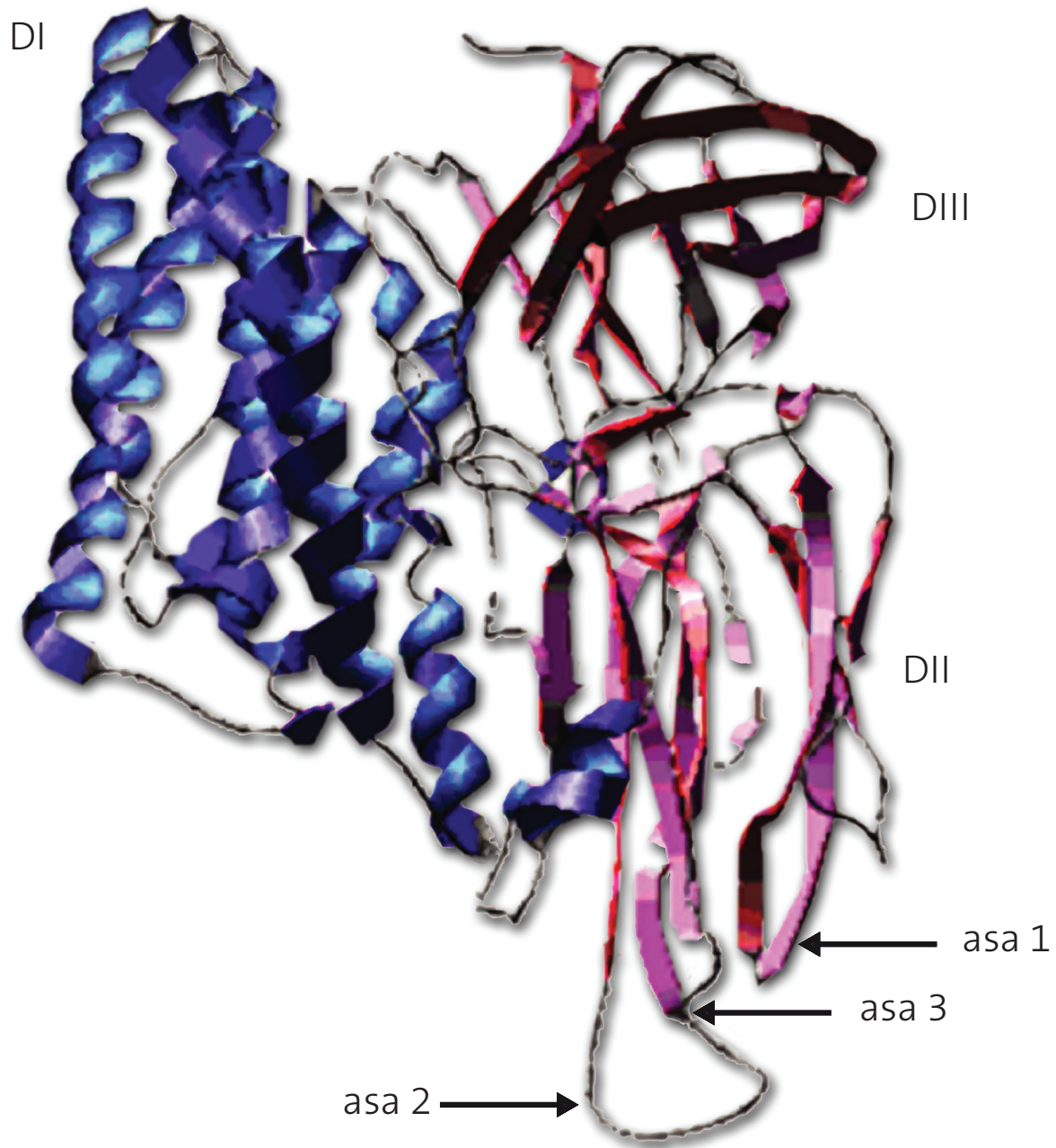


Figura 3.
Estructura tridimensional de la proteína insecticida
Cry1Aa producida por *Bacillus thuringiensis*.

común de la resistencia a las toxinas Cry son mutaciones que afectan a los receptores proteínicos, lo que evita así la unión de la toxina a su membrana blanco. En cambio, las toxinas Cyt, formadas por un solo dominio estructural, no interaccionan con proteínas de membrana, si no que interaccionan directamente con lípidos específicos de la membrana de mosquitos formando el poro.

Nuestro grupo reportó recientemente el mecanismo molecular del sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt. Los datos mostraron que la toxina Cyt1Aa se inserta a la membrana y funciona como un receptor proteínico de las toxinas Cry (figura 5). Este mecanismo explica la falta de aparición de insectos resistentes a Bti en la naturaleza. Este es el primer ejemplo de una bacteria patógena cuya virulencia se basa en toxinas formadoras de poro y que produce una proteína que funciona como receptor de las otras toxinas. Sin duda Bti se puede considerar una bacteria inteligente, ya que desarrolló un mecanismo que le permite aumentar su actividad tóxica y además evitar la aparición de insectos resistentes a sus toxinas (Pérez *et al.*, 2005).

Ventajas y limitaciones del uso de *Bacillus thuringiensis*

Varios factores han hecho posible su éxito en la agricultura y en el control de mosquitos transmisores de enfermedades. El más importante es su alta especificidad hacia el insecto blanco y su inocuidad para mamíferos, otros vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos. Las toxinas de Bt se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años, principalmente en cultivos de hortalizas y cereales. Como se mencionó antes, también Bti se ha ocupado con éxito durante 30 años para el control de mosquitos. Sólo existe un ejemplo de generación de resistencia a Bt en campo. Esto se debe a que los tiempos de permanencia de las proteínas Cry en el ambiente son muy cortos, por lo que la presión de selección es muy

baja. También existen evidencias de mutaciones que afectan la expresión de los receptores tipo caderina, que resultan en insectos resistentes a las toxinas Cry1A, y tienen un costo en el desempeño de los insectos en la naturaleza, evitando que las mutaciones que afectan a esta proteína se fijen en la población de insectos. En el caso de Bti, como ya se mencionó, la falta de resistencia se debe a la presencia de la toxina Cyt1A. Paradójicamente, las ventajas de Bt se convierten en importantes desventajas para su uso comercial. El estrecho rango de huésped ocasiona que no se cuente con toxinas para cada plaga que afecta la actividad humana. También, la reducida permanencia en el ambiente hace necesario un profundo conocimiento de la biología y comportamiento de la plaga que se quiere controlar, ya que una toxina puede ser activa para los estadios larvarios, pero disminuir o incluso no ser tóxica para los adultos. Por lo tanto, los tiempos y formas de aplicación deben seleccionarse cuidadosamente. Otra limitante ha sido la utilización de Bt para el control de insectos barrenadores y chupadores, ya que su aplicación se ha dado tradicionalmente como producto asperjado, y el hábito alimenticio de estos insectos impiden la ingestión de la toxina Cry. Este problema se ha resuelto con la creación de plantas transgénicas que producen sistémicamente la toxina Cry haciéndola accesible a insectos barrenadores. Por último, existe el riesgo de desarrollo de resistencias por el incremento en el uso de Bt como aspersiones de cristales y sobre todo en plantas transgénicas que expresen constitutivamente una o varias toxinas Cry. El objetivo es que la planta, una vez transformada con el gen de la toxina, exprese suficiente cantidad de ésta como para aniquilar a las plagas susceptibles que las consumen. Desde 1987 aparecieron los primeros reportes sobre plantas de tabaco y tomate que presentaban suficiente expresión de la toxina de Bt como para conferir niveles altos de resistencia. En la actualidad, universidades, centros de investigación y compa-

ñas privadas llevan a cabo proyectos sobre el desarrollo de plantas transgénicas con capacidad insecticida, una gran variedad de importancia económica. La adopción de plantas transgénicas en la agricultura está ocurriendo a velocidad vertiginosa. Sólo en Estados Unidos, el 50% de la superficie sembrada con soya consiste de plantas transgénicas resistentes a herbicidas. En México, por ejemplo, el 60% del algodón que se cultiva es Bt. En la actualidad existen ocho cultivos importantes con cultivares transgénicos registrados: soya, maíz, algodón, canola, papa, tomate, tabaco y remolacha, y muchas otras plantas están próximas a registrarse. La introducción de plantas transgénicas a nuestro país ha sido estrictamente regulada, y el caso de la introducción de maíz transgénico reviste singular importancia, dado que Mesoamérica es sitio fundamental en la evolución del maíz, donde aún existen sus posibles ancestros. Es necesario evaluar el impacto del maíz transgénico sobre las poblaciones de sus ancestros, la posibilidad de que los transgenes eventualmente pudieran introducirse en las plantas silvestres. Un uso racional de esta tecnología redundará sin duda en mayor producción al resolver el grave problema agrícola del ataque de insectos, así como evitar la contaminación del medio ambiente con pesticidas químicos y la exposición de los agricultores a esto agentes químicos.

Perspectivas del uso de las toxinas Cry

Sin duda las toxinas Cry producidas por Bt se acercan al ideal de un insecticida específico contra su insecto blanco, que no contamina el ambiente y que no genera poblaciones de insectos resistentes. Sin embargo, todavía existen problemas para su aplicación en el control de insectos plaga y transmisores de enfermedades con vistas a reemplazar el uso de insecticidas químicos. Uno de los principales es que, como ya se mencionó, existen insectos plaga que no son controlados eficientemente por las toxinas Cry descubiertas a la fecha. Por esta

razón es necesario continuar con proyectos de búsqueda de nuevas proteínas cry que tengan actividad contra estos insectos. Otra alternativa es evolucionar la actividad de toxinas Cry ya caracterizadas para que tengan actividad contra otros insectos por técnicas de evolución molecular. Para cumplir este propósito es necesario entender las bases moleculares de la especificidad de estas toxinas, en particular identificar las moléculas receptoras en diferentes especies de insectos y definir los sitios de interacción entre las toxinas y sus receptores. Con este conocimiento y con metodologías que permitan el tamizado de bibliotecas de mutantes de toxinas en los sitios de reconocimiento de los receptores, se podrán identificar proteínas Cry que reconozcan y tengan actividad tóxica contra diferentes insectos.

Otro problema importante en el uso de las proteínas Cry para el control de insectos es la generación de insectos resistentes a las toxinas. En este aspecto también es importante continuar con la búsqueda de nuevas toxinas que reconozcan diferentes receptores proteínicos en los insectos blanco, de manera que la resistencia a una toxina Cry por mutaciones en un receptor específico se pueda evitar con la aplicación de otra toxina Cry que reconozca otros receptores en ese insecto. De igual forma, la evolución molecular de las toxinas Cry puede generar toxinas con estas características. Finalmente, una posibilidad interesante es buscar o generar toxinas Cyt que sinergicen la actividad de toxinas Cry que sean tóxicas a insectos lepidópteros, evitando así la resistencia, como es el caso de Bti.

Un aspecto fundamental para la aplicación de las toxinas Cry y para evitar la aparición de insectos resistentes es determinar el modo de acción de estas toxinas en diferentes órdenes de insectos. Las características celulares y fisiológicas de cada orden de insectos son muy diferentes, por ejemplo el pH del intestino, los tipos celulares, la composición proteínica de las microvellosidades del intestino en el estado larvario, la dieta de los insectos etc. Todos estos factores sin duda deben influenciar el modo de

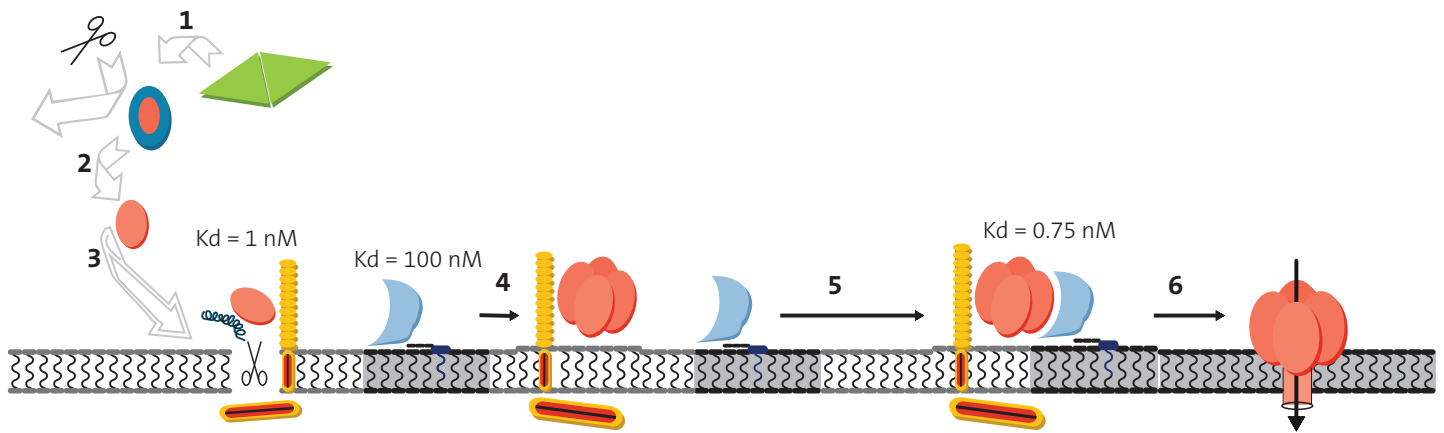


Figura 4. Esquema de los diferentes eventos en el modo de acción de las proteínas Cry. (1) Solubilización, (2) procesamiento, (3) unión a receptor caderina, (4) formación de pre-poro, (5) unión a receptor aminopeptidasa, (6) inserción a membrana.

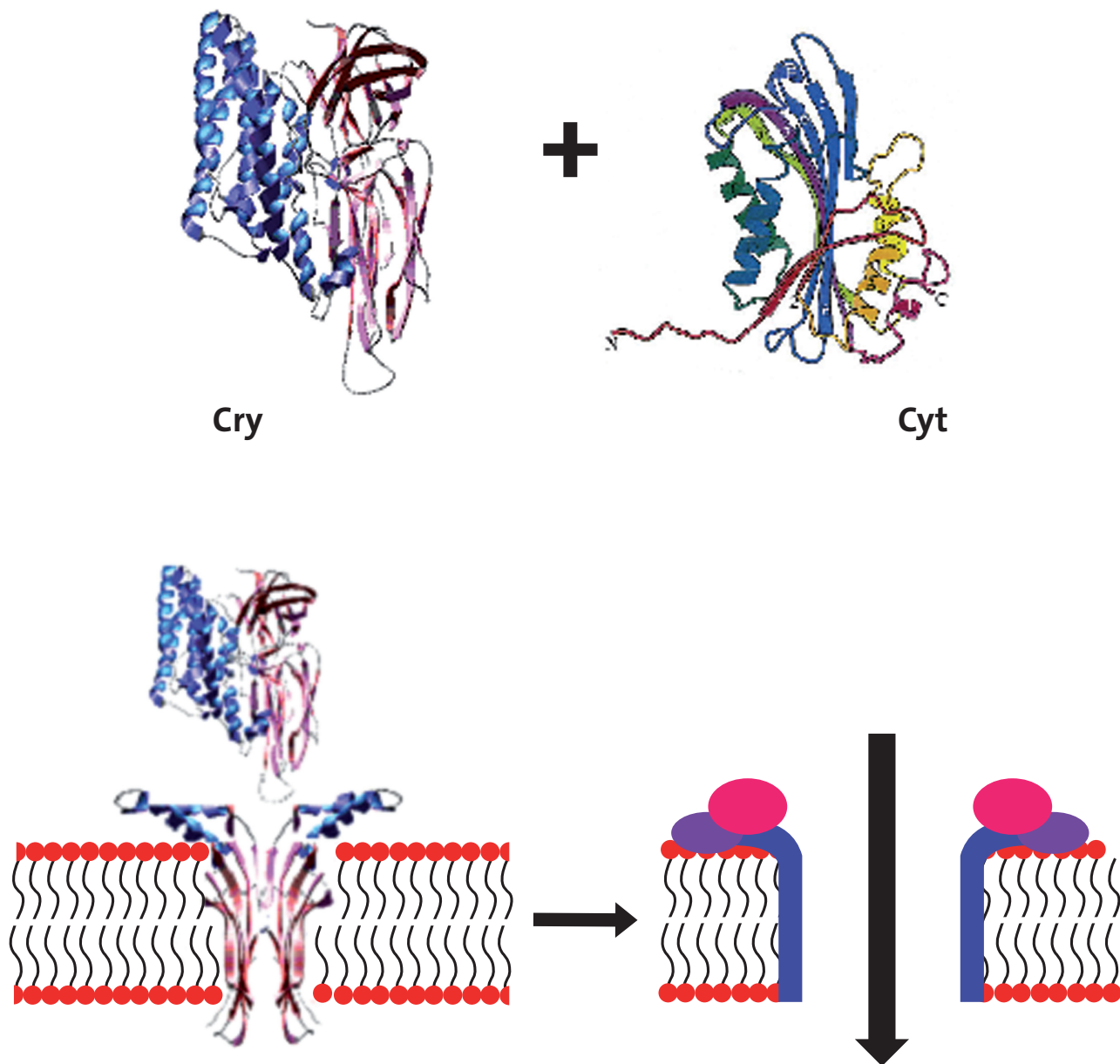


Figura 5.
Mecanismo del sinergismo entre las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* subs. *israeliensis*. La toxina Cyt1A funciona como receptor de la toxina Cry11Aa.

acción de las toxinas Cry para cada orden de insectos. Determinar el modo de acción de estas toxinas sin duda es un factor fundamental para su aplicación exitosa.

Es importante continuar la investigación en las formas de aplicación de las toxinas Cry. En el caso particular de las plagas de cultivos agrícolas, sin duda será muy importante la generación de plantas transgénicas en diferentes variedades vegetales con toxinas Cry que controlen los insectos plaga en México. En el caso del control de mosquitos, se tiene que investigar más sobre formulaciones que permitan aplicar de manera efectiva Bti para el control de larvas. Por ejemplo, las larvas del mosquito *Aedes aegypti*, transmisor del dengue, crecen en aguas cristalinas que se acumulan en depósitos en los domicilios. Una formulación de Bti que dure por más de un mes, que la puedan aplicar los propios habitantes de las casas y que no enturbie el agua sería muy útil para el control de esta enfermedad.

Queremos destacar finalmente que el estudio del modo de acción de las toxinas Cry no sólo tiene el reto biotecnológico de mejorar su aplicación, sino también el reto de contestar preguntas fundamentales en biología como establecer las bases moleculares de la interacción proteína-proteína y entender cómo una proteína pasa de un estado estable en solución a otro estado estable en un medio no polar como es la membrana lipídica. ●

Bibliografía

- Bravo, A. *et al.*, "Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains", en *Biochimica et Biophysica Acta*, 1667, 2004.
- Fernández, L. E. *et al.*, "A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae", en *Biochemical Journal*, 394, 2006.
- Pérez, C. *et al.*, "*Bacillus thuringiensis* subsp. *israeliensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor", en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 2005.

