

INTERAÇÃO PLANTA-INSETO

Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidos pelas plantas

Fotos cedidas pelos autores

Marcio Castro Silva-Filho

Prof. Dr. da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP)
Departamento de Genética
Laboratório de Biologia Molecular de Plantas
mcdsilva@carpa.ciagri.usp.br

Maria Cristina Falco

Pós-Doc. do Departamento de Genética
da ESALQ/USP
mcfalco@carpa.ciagri.usp.br

A co-evolução de inibidores de proteinases (IPs) de plantas e proteinases de insetos fornece um interessante e novo paradigma para pesquisas ecológicas, fisiológicas e bioquímicas. As plantas parecem ter desenvolvido IPs com extraordinárias propriedades contra proteinases de insetos. Eles são extremamente resistentes à proteólise e permanecem ativos sob diversos pHs intestinais (Christeller *et al.*, 1994), além de ser identificados como inibidores contra quase todas as classes de proteinases. Os IPs tendem a ser sensivelmente amplos em seus campos de ação, e há indicações que eles têm propriedades parecidas com a dos anticorpos para precipitar proteinases intestinais, retirando-as da solução. Por outro lado, as pragas conhecidas apresentam diversas formas de evitar os efeitos negativos dessas proteínas de defesa presentes nas plantas hospedeiras. Estas incluem o uso de proteinases para as quais as plantas hospedeiras não tenham inibidores, a degradação proteolítica de inibidores, e mutações adquiridas que resultam em proteinases menos sensíveis aos IPs sem a perda da atividade proteolítica. Além disso, o monitoramento de mecanismos de atividade proteolítica, aparentemente leva para uma rápida resposta aos altos níveis de IPs na dieta. A expressão de proteinases insensíveis aos IPs parece ser flexivelmente regulada para compensar as proteinases inibidas.

Controle de Insetos

Estima-se que as perdas provocadas por pragas e doenças na agricultura mundial atinjam 37% da produção, dos quais cerca de 13% devido a insetos (Fig. 1). Atualmente os métodos de controle concentram-se basicamente

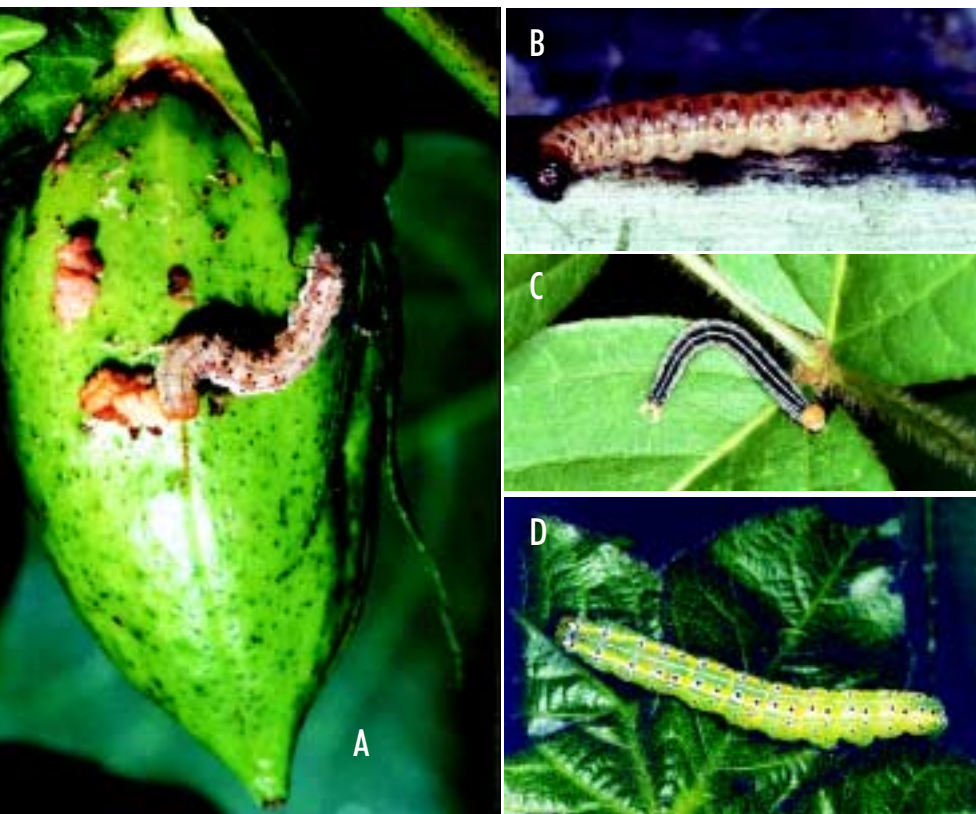


Figura 1. Pragas de importância econômica. A) Lagarta da maçã do algodoeiro (*Heliothis virescens*). B) Broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). C) Lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). D) Lagarta do algodoeiro (*Alabama argillacea*). Fotografias cedidas por Heraldo Negri de Oliveira (Depto de Entomologia ESALQ/USP)

Tabela 1. Propriedades cinéticas e peso molecular de diferentes atividades tripsínicas presentes em lagartas alimentadas com dieta artificial e à base de folhas

Enzima	Dieta à base de folhas ^a		Dieta artificial	
	Km (mM)	Peso Molecular (kDa)	Km (mM)	Peso Molecular (kDa)
T1	0,27	70	-	-
T2	0,35	67	-	-
T3	2,4	29	2,9	29
T4	15	17	*	17

^a Folhas de fumo transgênico e não transgênico apresentaram os mesmos resultados

* Atividade não detectada

na utilização de agroquímicos dentro de um manejo integrado de pragas. Entretanto, há uma grande demanda por parte da sociedade pelo desenvolvimento de uma agricultura limpa, que diminua o uso de energia e produtos químicos, que não deixe resíduos indesejáveis no meio ambiente e nos alimentos, além de reduzir as contaminações aos agricultores. Entre as alternativas para contornar estes problemas estão o controle biológico e o uso de variedades resistentes.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular que permitem a manipulação de genes de interesse, aliadas às metodologias de transformação genética de plantas, uma nova e interessante abordagem no controle de insetos vem atraindo a atenção de pesquisadores em todo o mundo. Genes que codificam para proteínas com atividade inseticida tornaram-se uma arma bastante poderosa e com um amplo potencial de utilização. Por outro lado, estudos envolvendo a interação entre as plantas hospedeiras com seus insetos, notadamente as pragas, não se desenvolveram com a mesma intensidade. Um dos sistemas mais fascinantes envolvendo esse tipo de interação é baseado nos estudos com inibidores de proteinases produzidos pelas plantas e insetos herbívoros.

Inibidores de Proteinases de Plantas Contra Insetos Herbívoros

Sabe-se há mais de 60 anos que as plantas contêm peptídeos que atuam

como inibidores de proteinases (IPs). Este grupo de proteínas está amplamente distribuído no reino vegetal e faz parte de um mecanismo de defesa das plantas contra o ataque de pragas e patógenos (Richardson, 1991). As proteínas de defesa podem ser produzidas constitutivamente em tecidos que são particularmente vulneráveis ao ataque de insetos, como as sementes, ou podem ser induzidos por danos mecânicos, como ocorre quando um inseto se alimenta de uma folha (Jouanin *et al.*,

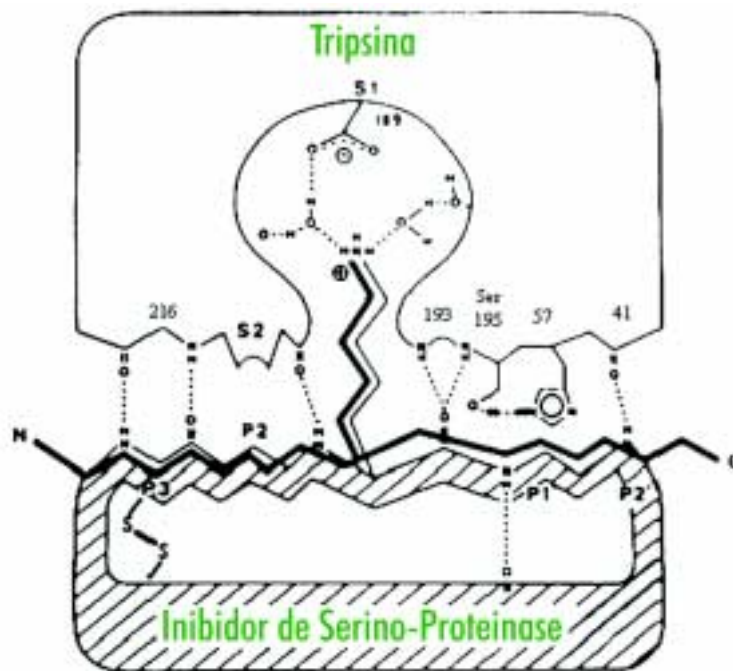


Figura 2-

Esquema representativo da ligação de uma serino-proteinase (tripsina) ao inibidor correspondente (Adaptado de Bode & Huber, 1992)

1998). Entretanto, muitas delas são tóxicas também a mamíferos, o que indica que devam ser cautelosamente estudadas para uso como mecanismo de pro-

teção de plantas a insetos.

De acordo com sua especificidade, as proteinases podem ser divididas em quatro classes: as serino-, cisteíno-, metalo- e aspartil-proteinases. Os IPs mais abundantes e estudados são aqueles capazes de inibir as serino-proteinases, grupo das tripsinas e quimotripsinas, enzimas encontradas majoritariamente em insetos da ordem Lepidoptera (Ter-ra & Ferreira, 1994). Os inibidores de serino- e cisteíno-proteinases são amplamente distribuídos em sementes e tecidos de reserva de plantas. Portanto, além de protegerem as plantas contra o ataque de insetos, os IPs são utilizados como proteínas de reserva em algumas sementes.

O mecanismo de ação de um IP baseia-se na inibição competitiva de uma proteinase, via bloqueio de sua atividade proteolítica (Fig. 2). A ingestão de IPs pelos insetos herbívoros interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio. Assim sendo, os inibidores são considerados agentes anti metabólicos, pois levam a uma deficiência proteica dos insetos. A atividade antibiótica dos IPs é atribuída à sua interferência na digestão proteica que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução. Uma outra hipótese é que os inibidores afetem o desenvolvimento de forma indireta, via um mecanismo de "feedback", que levaria a um aumento da produção de proteinases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis. Os aminoácidos seriam deslocados para a síntese de proteinases em detrimento de outras proteínas essenciais. Entretanto, investi-

gações mais recentes mostraram que a deficiência de aminoácidos essenciais resultantes da hiperprodução de proteinases em lagartas de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea* deveu-se à redução da atividade proteolítica intestinal (Broadway, 1995).

Uma vez estabelecido que os IPs são produzidos pelas plantas em resposta ao ataque de pragas, suas propriedades antimetabólicas foram testadas contra diversos insetos. Resultados *in vitro* ba-

seados na combinação de extratos intestinais com diferentes inibidores, mostraram que os IPs foram efetivos na inibição das proteinases digestivas. Além disso, a incorporação de IPs em dietas artificiais mostrou-se eficiente em vários estudos. Desta forma, foram obtidas plantas transgênicas resistentes a pragas via expressão de genes de IPs (Hilder *et al.*, 1987; Duan *et al.*, 1996; Gatehouse *et al.*, 1997).

Paralelamente aos resultados positivos com as plantas transgênicas, um número crescente de trabalhos mostrou que os insetos eram capazes de adaptar-se à presença dos inibidores produzidos pelas plantas (para uma revisão, veja Jongma & Bolter, 1997).

Mecanismos de Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinase

Em um trabalho pioneiro, Jongma e colaboradores (1995a) observaram que lagartas de *Spodoptera exigua* adaptaram-se à presença de IPs expressos em plantas transgênicas via indução de proteinases insensíveis ao inibidor. A partir de então, estas observações foram extendidas à uma ampla gama de insetos-praga. No entanto, um outro mecanismo adaptativo baseado na síntese de proteinases capazes de inativar, via degradação proteolítica, os IPs produzidos pelas plantas foi descrito por outros grupos (Giri *et al.*, 1998; Girard *et al.*, 1998).

O Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ/USP iniciou, recentemente, estudos envolvendo o uso de IPs visando a obtenção de resistência a pragas de importância econômica. Os trabalhos também tiveram como objetivo o estudo a nível molecular da interação entre plantas de interesse econômico e insetos herbívoros. O primeiro trabalho avaliou os efeitos da presença do inibidor de proteinase do tipo 2 de batata (PIN-2) em plantas transgênicas de tabaco, sobre o desenvolvimento, metabolismo e proteinases intestinais da lagarta da maçã do algodoeiro, *Heliothis virescens* (Brito *et al.*, submetido). Os ensaios biológicos, realizados com apoio do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP mostraram não haver diferenças significativas quando comparados com o trata-

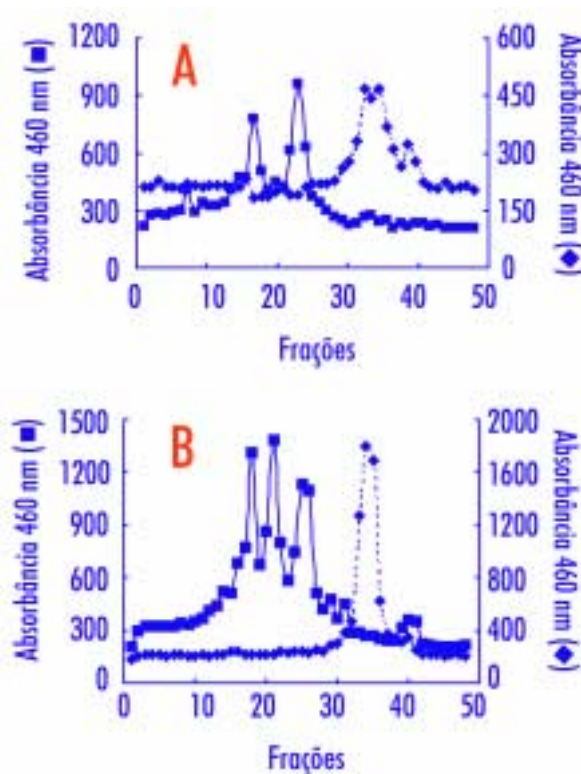


Figura 3.

Separação das tripsinas (■) e quimotripsinas (◆) presentes em extrato intestinal de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com dieta artificial (A) e com dieta artificial suplementada com 0,5 % (p/v) de IPs extraídos de sementes de soja (B)

mento à base de plantas não transformadas. Estas observações levaram à hipótese de uma adaptação deste inseto ao inibidor. A fim de estudar o possível mecanismo adaptativo das lagartas, foram caracterizadas as proteinases digestivas dos insetos, com apoio do Laboratório de Bioquímica de Insetos do Departamento de Bioquímica do IQ/USP. Assim, as lagartas foram submetidas a três dietas distintas: 1) à base de folhas de plantas transgênicas de fumo, 2) folhas de plantas de fumo não transformado e, 3) dieta artificial sem a presença de IPs. A combinação de técnicas de separação de proteínas e estudos cinéticos, revelaram a presença de duas tripsinas e uma quimotripsina no tratamentos à base de dieta sem inibidor. No entanto, em lagartas alimentadas à base de folhas transgênicas ou não, foram detectadas quatro atividades tríplicas, sendo que duas eram totalmente no-

vas (Tab. 1). Uma única atividade de quimotripsina foi observada. Uma observação interessante foi que as novas tripsinas apresentavam pesos moleculares bem superiores aos demais e maior afinidade pelo substrato. A filtração em gel na presença ou ausência de SDS, revelou que as tripsinas de alto peso molecular seriam originadas a partir das tripsinas de menor peso recém sintetizadas, via um processo de oligomerização. Portanto, trata-se de mais um novo mecanismo de adaptação dos insetos aos IPs produzidos pelas plantas.

Novas evidências de adaptação dos insetos à presença de inibidores de proteinases foram verificadas em um estudo envolvendo um outro inseto polífago (múltiplos hospedeiros), a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, e inibidores de serino-proteinases extraídos de soja.

Os inibidores de proteinase de soja “Bowman-Birk” e “Kunitz” foram incorporados em dietas artificiais que foram utilizadas na alimentação das lagartas desde as primeiras fases do desenvolvimento. Embora os ensaios de inibição *in vitro* tenham mostrado uma alta eficiência contra as proteinases da lagarta, os ensaios biológicos mostraram que não houve alterações significativas no desenvolvimento e metabolismo de lagartas alimentadas com dieta artificial contendo inibidores extraídos da soja. Esse fato levou à investigação do mecanismo responsável pela adaptação dos insetos à presença dos inibidores. Para isso, foram analisados extratos intestinais das lagartas alimentadas com dietas contendo os inibidores. O mecanismo adaptativo desenvolvido pelas lagartas de *S. frugiperda* estava relacionado à alteração na expressão das serino-proteinases. Os resultados mostraram o aparecimento de uma nova atividade tríplica e um aumento significativo na atividade quimotríptica do inseto (Fig. 3). A polifagia do inseto pode ter facilitado o desenvolvimento de proteinases que tenham reduzida afinidade aos IPs da soja. Como a eficiência de um inibidor específico é dependente da compatibilidade estrutural do seu sítio reativo com o sítio ativo da proteinase, é provável que as enzimas digestivas tenham sofrido alterações nos amino-

ácidos que circundam o sítio de ligação, resultando em uma fraca interação com os inibidores (Paulillo *et al.*, no prelo).

Perspectivas na Utilização de Inibidores de Proteínas no Controle de Insetos

Ao se considerar a possibilidade de produzir plantas transgênicas expressando IPs, algumas considerações se fazem necessárias a fim de aumentar as chances de sucesso. Entre estas, incluem-se os níveis de expressão do IP, sua constante de inibição, a estabilidade do IP no intestino do inseto e a habilidade de adaptação do inseto aos inibidores via alteração da expressão gênica. Fatores ambientais secundários também podem interferir na severidade dos sintomas. Como os IPs agem causando uma deficiência na disponibilidade de aminoácidos, a digestibilidade do alimento, a concentração e a qualidade proteica da dieta serão determinantes para maximizar os efeitos dos IPs sobre os insetos. Além disso, inúmeros compostos fitoquímicos presentes ou induzidos pelas plantas também apresentam potencial de alterar a toxicidade dos IPs sobre os insetos hospedeiros (Broadway & Duffey, 1988).

A pressão de seleção sobre os insetos para desenvolver proteíases que são insensíveis aos IPs de plantas hospedeiras são consideráveis e a evolução de insetos em muitas gerações por ano oferece uma vantagem significativa sobre as plantas. Mas, além das altas concentrações de inibidores, as plantas podem encontrar alternativas de melhorar a eficácia de seus inibidores envolvendo multidomínios ou variantes multiméricos. Isso é antes regra que exceção entre os IPs vegetais, e uma ampla gama de combinações é observada. Além de serem encontrados inibidores com sítios ativos repetidos, é comum encontrar inibidores de serino-proteíases em combinações com inibidores de cisteíno-, aspartil-proteíases e amilases (Richardson, 1991). Isto, por um lado, parece uma elegante forma de economizar proteínas, mas o significado desses múltiplos sítios pode ser muito mais complexo. Ferreira *et al.* (1994) têm demonstrado que as enzimas digestivas de insetos ocorrem muitas vezes em formas multiméricas. Jongsma & Bolter (1997) pro-

põem que os efeitos da combinação de inibidores multiméricos com enzimas multiméricas em quantidades equimolares devem ser muito similar aos anticorpos policlonais e antígenos com múltiplos epitopos.

Os insetos polívoros são um caso interessante. Ao longo da evolução, estes insetos desenvolveram a capacidade de atacar uma grande variedade de espécies vegetais, incluindo mono e dicotiledôneas. Consequentemente, eles foram capazes de responder a uma gama de diferentes inibidores vegetais. Isso vai de encontro aos resultados obtidos pelo nosso grupo e descritos acima. Recentes experimentos com plantas transgênicas utilizando genes de IPs de monocotiledôneas expressos em dicotiledôneas e vice-versa, sugeriram que aqueles insetos que normalmente se

alimentam de mono ou dicotiledôneas são capazes de se adaptar a IPs de diversos tipos de plantas (Lepilé *et al.*, 1995). Para contornar estes problemas de adaptação, seria interessante utilizar IPs de espécies vegetais bastante separadas evolutivamente daquelas cujos insetos são predadores. Duan *et al.*, (1996) demonstraram que isso é possível a partir da obtenção de plantas transgênicas de arroz expressando o inibidor de proteinase do tipo 2 de batata. Os autores mostraram que as plantas transgênicas foram protegidas contra o ataque da praga *Sesamia inferens*.

Esta possibilidade está sendo testada no nosso laboratório com a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) e os inibidores de proteíases de soja (Kunitz e Bowman-Birk). Os resultados da caracterização das proteíases das lagartas, seguido da realização de ensaios biológicos com a incorporação dos IPs de soja em dieta artificial, mostraram-se muito promissores (Patrícia Pompermayer, comunicação pessoal). Assim, os genes que codificam para os IPs da soja foram clonados e utilizados na transformação genética da cana-de-açúcar (Maria Cristina Falco, comunicação pessoal).

Uma outra alternativa seria a geração de novas moléculas de inibidores de proteíases específicos contra enzimas de pragas de importância econômica. Esta estratégia pode ser testada utilizando-se IPs engenheirados, com suas afinidades otimizadas por modelos computacionais, como descrito por Urwin *et al.* (1995), ou por "phage display", como proposto por Jongsma *et al.* (1995b). Na metodologia do "phage display", múltiplas sequências de genes inibidores, que diferem apenas no sítio da proteína que interage com a proteína do inseto são geradas, utilizando-se a técnica da Reação da Polimerase em Cadeia -"PCR" e oligonucleotídeos degenerados. A biblioteca é clonada em um fagomídeo ou um vetor M13 fusionado ao gene da capa proteica - g3 - do fago, que expõe as proteínas em sua superfície. Esses fagos são selecionados contra uma proteína de interesse (proteíase digestiva de *D.*

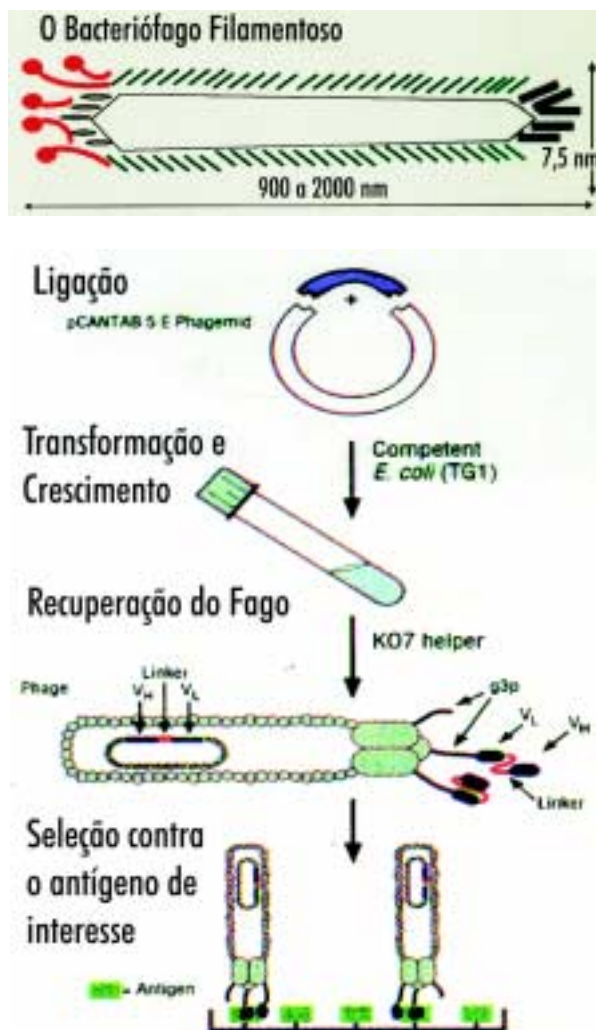


Figura 4. A metodologia do "Phage Display" (Adaptado de Webster, 1996)

saccharalis, por exemplo), imobilizada em suporte sólido (uma placa Elisa, p. ex.). Subseqüentes lavagens eliminam os fagos sem ou com pouca afinidade. As partículas do fago com alta afinidade são selecionadas para transformação de *E. coli*, fornecendo novos genes e codificando inibidores de proteinase mais específicos (Fig. 4). Essa metodologia foi utilizada para a família de inibidores do tipo Kunitz, gerando inibidores potentes e específicos contra várias proteinases do tipo serina (Roberts *et al.*, 1992; Dennis & Lazarus, 1994). Esta estratégia vem sendo explorada em nosso laboratório com o IP "Bowman-Birk" de soja, dirigido contra as proteinases digestivas da broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis* (Marcia O. de Mello, comunicação pessoal).

Provavelmente algum mecanismo adaptativo ocorrerá, apesar da utilização desta tecnologia. O que se procura, na verdade, é que esta adaptação seja mais lenta, de forma a permitir um maior tempo de cultivo sem que a presença dos insetos cause danos econômicos significativos à cultura. A utilização de vários métodos de controle dentro do manejo integrado de pragas, a diversificação do material cultivado, de forma a diminuir a pressão de seleção sobre a praga, rotação de culturas e práticas culturais, retardariam o aparecimento de insetos resistentes.

A maioria das pesquisas atuais estão focadas na expressão de inibidores de proteinases únicos em plantas transgênicas. O sucesso deve ser mais significativo quando combinações de IPs cobrirem o espectro de proteinases intestinais. Isto tornará mais difícil para o inseto superar os efeitos dos IPs simplesmente aumentando a expressão de genes de proteinases insensíveis aos IPs. Alguns desses genes podem ser encontrados na natureza, mas a engenharia genética tem permitido alterá-los de forma a torná-los mais eficientes.

Na verdade, é necessário compreender melhor o modo de ação dos IPs sobre os insetos e as formas pelas quais eles se adaptam. Esta promete ser uma linha de pesquisa com muito espaço para crescer nos próximos anos.

Agradecimentos

Agradecemos a colaboração dos professores Walter R. Terra (Depto. de Bioquímica, IQ/USP) e José Roberto P. Parra (Depto. de Entomologia, ESALQ/USP), à FAPESP pelo suporte financeiro, ao Biólogo Heraldo Negri de Oliveira

(Depto. de Entomologia, ESALQ/USP), pelas fotografias.

Referências Bibliográficas

Bode W & Huber R (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Europ Biochem* 204: 433-451.

Broadway RM & Duffey SS (1986) Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol* 32: 827-833.

Broadway RM & Duffey SS (1988) The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *J Insect Physiol* 34: 1111-1117.

Broadway RM (1995) Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *J Insect Physiol* 41: 107-116.

Christeller JT, Laing WA, Markwick NP, Burgess EPJ (1992) Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem Mol Biol* 22: 735-746.

Dennis MS & Lazarus RA (1994) Kunitz domain inhibitor of tissue factor-Factor VIIa. I. Potent inhibitor selected from libraries by phage-display. *J Biol Chem* 269: 22129-22136.

Duan X, Li X, Xue Q, Abo-El-Saad M, Xu D, Wu R. (1996) Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotech* 14: 494-498.

Ferreira C, Capella AN, Sitnik R, Terra WR (1994) Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp Biochem Physiol* 107: 631-640.

Gatehouse AMR, Davison GM, Newell CA, Merryweather A, Hamilton WDO, Burgess EPJ, Gilbert RJC, Gatehouse JA (1997) Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. *Mol Breed* 31: 49-63.

Girard C, Le Métayer M, Bonadé-Bottino M, Pham-Delègue M-H, Jouanin L (1998) High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 28: 229-237.

Giri AP, Harsulkar AM, Deshpande VV, Sainani MN, Gupta VS, Ranjekar PK (1998) Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiol* 116:

393-401.

Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163.

Jongsma MA, Bakker PL, Peters J, Bosch D, Stiekema WJ (1995a) Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8041-8045.

Jongsma MA, Bakker PL, Stiekema WJ, Bosch D (1995b) Phage display of a double-headed proteinase inhibitor analysis of the binding domains of potato proteinase inhibitor II. *Mol Breed* 1: 181-191.

Jongsma MA & Bolter C (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J Insect Physiol* 43: 885-895.

Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M. (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci* 131: 1-11.

Leplé JC, Bonadé-Bottino M, Augustin S (1995) Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol Breed* 1: 319-328.

Michaud D (1997) Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends Biotechnol* 15: 4-6.

Paulillo LCMS, Lopes AR, Cristofolletti P, Parra JRP, Terra WR, Silva-Filho MC (2000) Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) is responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *J Econ Entomol* (No Prelo).

Richardson MJ (1991) Seed Storage Protein: The Enzyme inhibitors. In: Roger L.J. ed. *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, New York, v.5, p. 259-305.

Roberts BL, Markland W, Siranosi-an K, Saxena MJ, Guterman SK, Ladner RC (1992) Protease inhibitor display M13 phage: selection of high affinity neutrophil elastase inhibitors. *Gene* 121: 9-15.

Terra WR, Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol* 109B: 1-62.

Webster RE (1996) Biology of the filamentous bacteriophage. In: Kay BK, Winter J, McCafferty J. *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*. Academic Press, Inc. 344p.