

EMPREGO DE INIBIDORES DE PROTEASE VEGETAIS COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA ALTERNATIVA NO CONTROLE DE PRAGAS

Caio Fernando Ramalho de Oliveira

Doutorando em Biologia Funcional e Molecular/Laboratório de Química de Proteínas/UNICAMP/SP
c4io_bio@yahoo.com.br

Maria Lígia Rodrigues Macedo

Pós-doutora em Fisiologia Vegetal/UNICAMP/SP
Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas/UFMS/MS
bioplant@terra.com.br

RESUMO

Estatísticas dão-nos conta que em 2050 a população humana será de 9,1 bilhões de habitantes. Nestas circunstâncias, recursos básicos como água e alimentos tornar-se-ão escassos. Em especial, o fornecimento de alimento para a população em rápida expansão será um desafio para a humanidade. Há muito tempo o homem busca maneiras de combater as perdas agrícolas. A introdução dos inseticidas químicos nas lavouras foi muito importante, no entanto, seus efeitos tóxicos são indesejados. Por isso, a busca por agentes inseticidas que não apresentem efeitos indesejáveis sobre a saúde e ao meio ambiente tornou-se necessária. Dentre as possibilidades existentes, a biotecnologia de plantas aparece como uma importante ferramenta para o controle de pragas, auxiliando no oferecimento de alimento com uma menor carga de produtos tóxicos. Os inibidores de proteases constituem uma interessante classe de proteínas vegetais bioinseticidas com potencial biotecnológico. Durante décadas seu uso no combate a pragas agrícolas vem sendo estudado e plantas transformadas expressando diferentes inibidores apresentaram resultados satisfatórios, mostrando perspectivas animadoras de sua aplicação como ferramenta biotecnológica para a proteção dos cultivares. Nesta revisão apresentamos algumas informações sobre a biologia destas moléculas vegetais e sua história, relatos de trabalhos onde sua atividade inseticida foi estudada em plantas modificadas geneticamente e ainda o futuro desta tecnologia, que poderá envolver a combinação de diferentes proteínas inseticidas e até mesmo a fusão de proteínas para a obtenção de plantas mais eficientes.

Palavras-chave: biotecnologia, controle de pragas, plantas transgênicas, proteínas inseticidas.

ABSTRACT

Statistics give us account that in 2050 the human population will be 9.1 billion people. In these circumstances, basic resources like water and food will become scarce. In particular, the supply of food for the rapidly growing population that will be a challenge for humanity. Long ago, the man seeks ways to combat crop losses. The introduction of chemical insecticides in crops was very important, however, its toxic effects are unwanted. Therefore, the search for insecticidal agents that do not show adverse effects on health and the environment has become necessary. Among the possibilities, the plant biotechnology appears as an important tool for pest control, assisting in the delivery of food with a lower burden of toxic products. The protease inhibitors constitute an interesting class of biopesticide plant proteins with biotechnological potential. For decades its use against agricultural pests has been studied and transformed plants expressing different inhibitors showed satisfactory results, showing positive outlook of its application as biotechnological tool for the protection of the cultivars. In this review we present some information about the biology of plant molecules and their history, studies where its insecticidal activity was studied in genetically modified plants and even the future of this technology, which may involve a combination of different insecticidal proteins and even the merging of proteins to obtain the most efficient plants.

Keywords: biotechnology, pest control, transgenic plants, insecticide proteins.

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial estimado em 34%, a produção agrícola destinada à alimentação e produção de biocombustíveis terá de aumentar pelo menos 70% (FAO, 2009). Ou seja, caso não haja uma considerável elevação da produtividade agrícola instalaremos uma condição permanente de déficit alimentar. Sabe-se ainda que uma considerável parcela da produção mundial de alimentos, que pode chegar a 20% para as principais culturas, perde-se devido ao ataque de insetos-praga, um fator limitante na produção de alimento (FERRY *et al.*, 2004; ABRAMILHO, 2010) isso sem contabilizarmos os prejuízos provenientes dos ataques de nematoides e microrganismos fitopatogênicos. Este problema é ainda mais grave nas regiões tropicais e subtropicais onde o clima altamente propício e a imensa oferta alimentar aprovencionam um ambiente favorável à reprodução de insetos, exigindo grandes esforços para suprimir a densidade populacional de diferentes pragas agrícolas, para manter um fornecimento adequado de alimento. Ainda hoje, a maior parte dos métodos disponíveis para o controle de pragas emprega inseticidas químicos ambientalmente agressivos e altamente tóxicos ao ser humano, que apresentam uma baixa relação custo/benefício, uma vez que a aplicação sistemática nas lavouras leva a uma redução média nas perdas de somente 7% (OERKE *et al.*, 1994; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Este fato associado a todos os malefícios provenientes de seu uso, tanto do ponto de vista ambiental quanto de saúde pública, justificam o desenvolvimento de pesquisas que originem ferramentas alternativas para solucionar este problema.

Assim, o principal desafio está em aumentar e sustentar a produtividade agrícola com uma menor dependência do emprego de agroquímicos. Até recentemente, variedades de plantas resistentes a pragas têm sido obtidas basicamente através da aplicação dos princípios da genética mendeliana clássica e métodos de melhoramento convencional de plantas (BABU *et al.*, 2003). Os recentes avanços na biologia celular e molecular abriram novos caminhos para a produção de animais geneticamente modificados (transgênicos) e plantas com novas propriedades genéticas. Estas culturas muitas vezes mencionadas como geneticamente modificadas (GM), representam uma oportunidade promissora no manejo integrado de pragas (MIP). (BABU *et al.*, 2003). Em relação aos genes que conferem as plantas resistência a insetos, muitos candidatos vêm sendo avaliados, dentre eles diversos genes isolados de diferentes espécies vegetais. Nesta revisão daremos ênfase na transformação de plantas que expressam genes de inibidores de protease, tornando-as resistentes ao ataque de insetos.

2. VISÃO GERAL SOBRE OS INIBIDORES DE PROTEASE

Inibidores de protease são proteínas ou peptídeos capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas (LINGARAJU & GOWDA, 2008). Sua existência na natureza foi relatada pela primeira vez no século XIX por Fermi & Pernossi (1894). Estas moléculas são encontradas em todas as formas de vida, no entanto, são mais estudadas em famílias de plantas como Fabaceae, Poaceae e Solanaceae, sendo detectadas em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva (MACEDO *et al.*, 2009). Recentemente, a presença de inibidores em outras famílias botânicas, tais como a Cactaceae (Angiospermas), além de relatos da ocorrência destes em famílias de Gimnospermas (Cycadales, Coniferales e Ginkgoales) tem sido registrado. (SAWANO *et al.*, 2008; TORRES-CASTILLO *et al.*, 2009). Estudos apontam que em plantas, os inibidores apresentam variadas funções, podendo atuar como reguladores de proteases endógenas, proteínas de reserva e como agentes de defesa vegetal contra insetos, microrganismos e outros animais herbívoros (RICHARDSON, 1977). As moléculas descobertas até o momento são específicas para cada uma das 4 classes de enzimas proteolíticas e são classificadas em inibidores de serino-, cisteíno-, aspártico- e metaloprotease (RICHARDSON, 1977; MACEDO *et al.*, 2007). Diferenças entre estruturas primárias e topologia são observadas entre os inibidores de diferentes famílias, ainda assim, seu mecanismo de ação é bastante preservado (CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002). A inibição da atividade catalítica é alcançada pela interação entre o inibidor e o sítio catalítico enzimático, fato que os caracteriza como competitivos.

A região molecular responsável pela formação do complexo enzima-inibidor é chamada de sítio reativo e apresenta uma composição de aminoácidos diferente para cada uma das classes de inibidores. Esta diferença de composição de aminoácidos é que determina a especificidade de um inibidor para uma determinada classe de enzimas. O sítio reativo é então reconhecido pela enzima, ocorrendo à formação do complexo. Na Figura 1 podemos observar a representação da estrutura tridimensional de um inibidor de tripsina (ILTI) isolado de sementes de *Inga laurina* (MACEDO *et al.*, 2007), espécie popularmente

conhecida como ingá branco. Este inibidor pertence à família Kunitz de inibidores de serinoprotease e apresenta uma massa molecular de 20 kDa. Além da região N-terminal e C-terminal, está presente o aminoácido lisina localizado na posição 64 (Lys64). Tal resíduo está presente no sítio reativo de ILTI e é reconhecido, especificamente, pelo sítio de ligação primário da enzima tripsina (Figura 1A), e por isso é denominado resíduo P₁. Esta característica, a presença de uma lisina na posição P₁, determina que ILTI seja específico para serinoproteases do tipo tripsina. Na figura 1B, ainda é possível observar as interações moleculares formadas durante o complexo enzima-inibidor. O átomo de oxigênio do resíduo de Lisina 64 interage com o grupo hidroxila do resíduo de Serina 195, formando uma ponte de hidrogênio de 2,92 Å. Esta interação é favorecida pela atração que os resíduos Histidina 57 e Aspartato 102 promovem ao redor do resíduo Serina 195, também representada na figura 1B como linhas pontilhadas (Macedo *et al.*, 2011). Além das pontes de hidrogênio, outros elementos como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas estão envolvidos nas interações entre os inibidores e as proteases (BIRK, 2003).

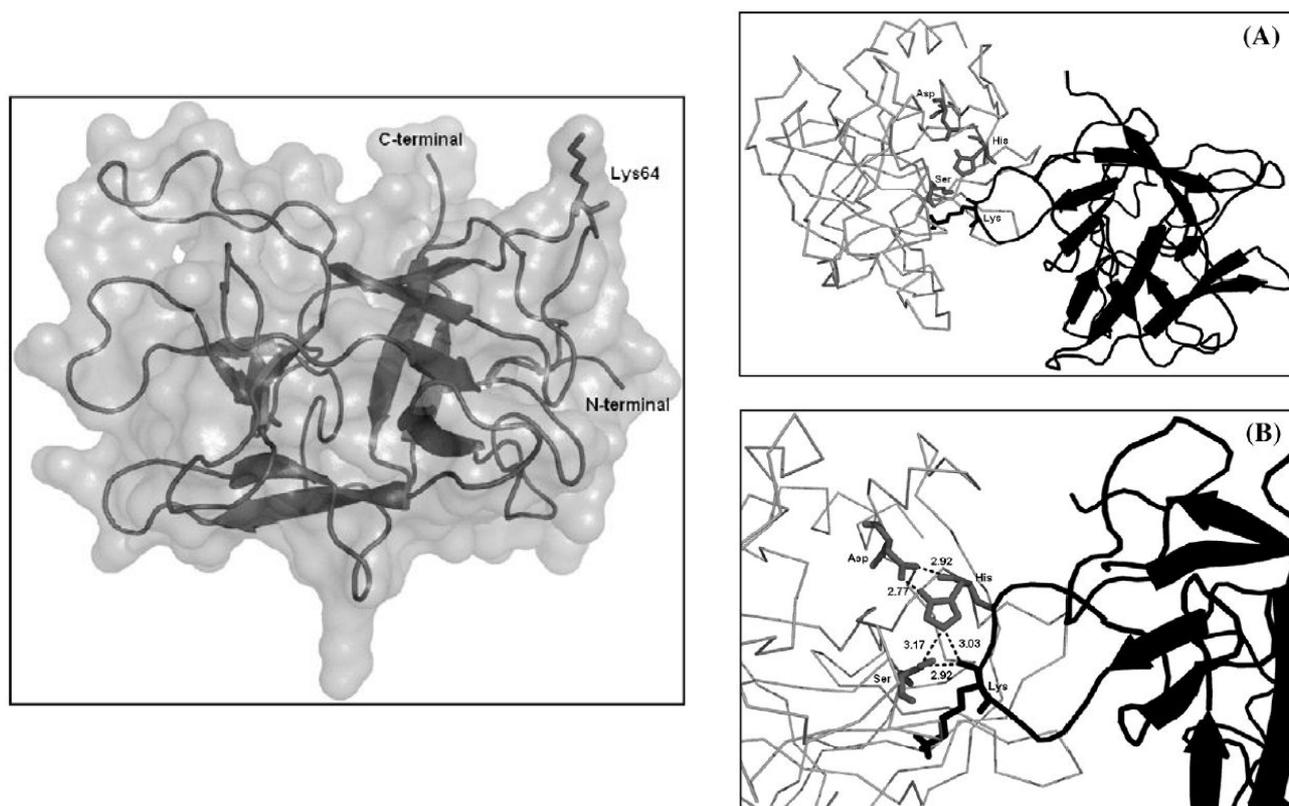


Figura 1 - Representação da estrutura tridimensional do inibidor de tripsina de *Inga laurina*. (A) Visão geral da formação do complexo entre o inibidor e a enzima tripsina e (B) detalhe da interação entre o resíduo de Lisina 64 e os resíduos da tríade catalítica (Ser195, His57 e Asp102) presentes no sítio catalítico durante a formação do complexo (adaptado de MACEDO *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, os inibidores têm sido agrupados em famílias conhecidas como Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e II, Abóbora, Cevada, Cistatinas, Thaumatin-like e Ragi A1 (RICHARDSON, 1991; BIRK, 2003; OLIVA *et al.*, 2010). Dentre todas as famílias de inibidores de serinoproteases, as família Kunitz e Bowman-Birk são as mais estudadas e melhor caracterizadas. O padrão estrutural da maioria dos inibidores da família Kunitz é uma cadeia polipeptídica única de aproximadamente 20 kDa contendo duas pontes dissulfeto (cys39 – cys86 e cys136 – cys145) e a presença de um único sítio reativo (KOIDE *et al.*, 1973; LEHLE *et al.*, 1994; OLIVA *et al.*, 2010). O estudo cristalográfico de inibidores depositados em bancos de dados revela que estes possuem uma estrutura terciária globular, composta por 12 folhas β -pregueadas antiparalelas interligadas por longos “loops”. Inibidores da família Bowman-Birk possuem massa entre 8-10 kDa, bem como um alto conteúdo de cisteína (geralmente 14, formando 7 pontes dissulfeto) e apresentando ainda dois sítios reativos (RICHARDSON, 1991, BHATTACHARYYA & BABU, 2009) com a capacidade de inibir simultaneamente e independentemente duas proteases distintas, como tripsina e quimotripsina (CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002).

O emprego de inibidores vegetais no combate às pragas agrícolas é pertinente, pois as proteases intestinais de insetos representam um interessante alvo, possuem ocorrência indiscriminada e são indispensáveis aos processos de digestão e absorção de nutrientes (FRANCO *et al.*, 1999). Quando o alimento contendo inibidor chegar ao intestino médio do inseto, ele irá se complexar com as proteases cognatas, e estas serão inativadas. Ou seja, neste momento haverá um comprometimento do processo digestivo, haja vista que algumas enzimas encontram-se impossibilitadas de realizar a catálise enzimática, como mostra a Figura 2. O resultado da inativação das proteases intestinais tem efeito direto na eficiência digestiva bem como sobre a disponibilidade e a absorção de nutrientes, podendo eventualmente levar à morte por inanição (GATEHOUSE *et al.*, 1979; MACEDO *et al.*, 2002).

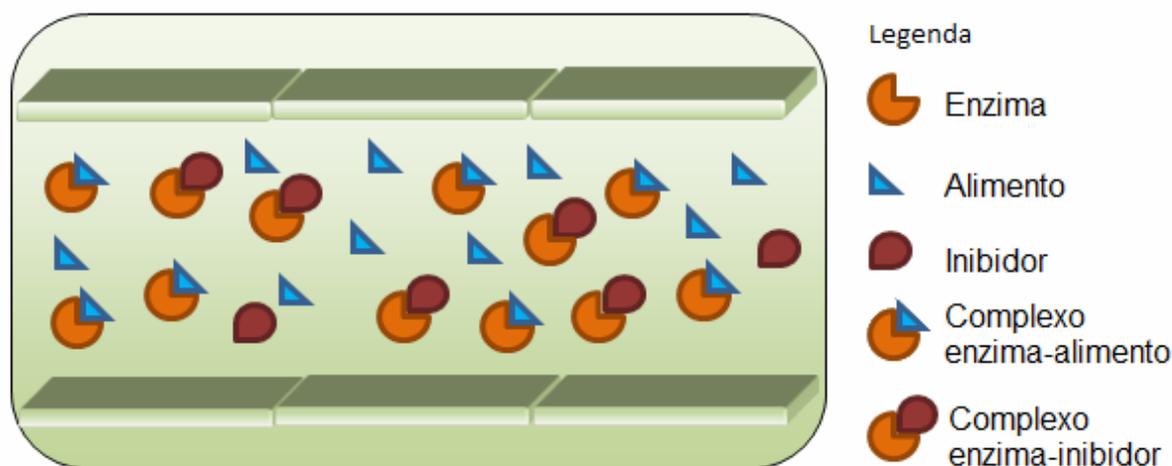


Figura 2 - Representação do processo digestório na presença de inibidores de protease. O esquema mostra que uma parcela das enzimas é temporariamente inativada pela formação do complexo enzima-inibidor, diminuindo a eficiência do processo de digestório.

Desde sua descoberta, ainda no século XIX até os dias de hoje, um grande conjunto de conhecimentos acerca da estrutura e atividade biológica dos inibidores de protease foram somados. Mais tarde, a partir do isolamento de genes que codificam inibidores em diferentes espécies vegetais foi possível, através do desenvolvimento da biotecnologia vegetal, expressar estas moléculas em plantas geneticamente modificadas. Os estudos agora caminham para a avaliação do potencial destas plantas transformadas em campo, com o intuito de a médio-longo prazo, oferecer ao mercado agrícola uma alternativa efetiva no combate a pragas de diferentes lavouras.

3. A HISTÓRIA DA BIOTECNOLOGIA VEGETAL RELACIONADA À DEFESA DE PLANTAS

A contínua necessidade de aumentar a produção de alimentos requer o desenvolvimento e a aplicação de ferramentas biotecnológicas inovadoras capazes de oferecerem variedades de culturas melhoradas, oportuna e economicamente rentáveis (HAQ *et al.*, 2004). Um marco nesse campo foi à introdução de genes de proteínas entomotóxicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) em plantas. A bactéria foi primeiramente descoberta no Japão em 1902 (BABU *et al.*, 2003) e as delta-endotoxinas, toxinas *Bt* ou ainda conhecidas como toxinas Cry, são proteínas com propriedades inseticidas produzidas durante a fase da esporulação, que tem sido utilizadas como inseticida comercial por mais de duas décadas. Estas toxinas são específicas para insetos da ordem Lepidoptera (OLSEN & DALY, 2000) e promovem o rompimento das células do intestino médio. Elas são dissolvidas pelo suco alcalino no lúmen intestinal e convertidas pelas proteases do inseto alimentado em fragmentos tóxicos (BABU *et al.*, 2003). A partir daí, agrupam-se em oligômeros, criando poros na membrana intestinal, levando à morte do inseto pela descompartimentalização gerada. As primeiras culturas transgênicas de milho, algodão e batata resistentes a insetos expressando genes *Bt* foram lançadas comercialmente nos Estados Unidos em 1995 (FAN & WU, 2005), e desde 1996 ao ano 2000 a área plantada de culturas transgênicas aumentou de 1,7 para mais de 44 milhões de hectares (JAMES, 2000; BABU *et al.*, 2003).

De acordo com Haq *et al.* (2004), genes *Bt* já perfazem 98% de todos os genes empregados no desenvolvimento de culturas transgênicas. No entanto, existem algumas limitações no uso de plantas *Bt* que devem ser consideradas, por exemplo: 1) a persistência da toxina *Bt* ao longo de todo o período de crescimento da planta seleciona intensivamente a resistência de insetos (HAQ *et al.*, 2004; MOAR *et al.*, 1995; FAN & WU, 2005); 2) a variedade de insetos que podem ser controlados por estas toxinas é relativamente pequena (HAQ *et al.*, 2004). Além disso, outro ponto importante é que a atividade inseticida exercida pelas proteínas *Bt* tem um complexo modo de ação, já que muitas classes destas pró-toxinas devem ser proteoliticamente ativadas para exercerem seu papel funcional. Uma série de trabalhos baseados em observações de laboratório, estufa e campo sobre a resistência de insetos a plantas expressando proteínas *Bt* tem sido relatada (TABASHNIK *et al.*, 2000, FERRÉ & VAN RIE, 2002; JANMAAT & MYERS, 2003), apesar do curto espaço de tempo transcorrido desde o início de sua comercialização. No mais recentemente deles, Tabashnik *et al.* (2008) observaram que *Helicoverpa zea* desenvolveu resistência ao algodão *Bt* cultivado no Arkansas e Mississippi.

4. INIBIDORES ENZIMÁTICOS COMO FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA ALTERNATIVA

A resistência adquirida por parte dos insetos impulsiona pesquisas por novas ferramentas para o controle de pragas. Dentre elas, a transformação de plantas com genes de inibidores enzimáticos como uma ferramenta biotecnológica alternativa no combate de insetos-praga ganha força. Muitos pesquisadores defendem seu uso por constituir uma estratégia de defesa utilizada extensivamente pelas plantas (THOMAS *et al.*, 1995; BABU *et al.*, 2003). Outro ponto interessante é que seu emprego em culturas transgênicas não deixaria resquícios de inseticidas nas plantas ou no solo e, além disso, não acarretaria efeitos sobre outros insetos que não se alimentem exclusivamente da planta (os principais pontos negativos do emprego dos inseticidas químicos convencionais).

Atualmente, as plantas podem ser transformadas com genes de inibidores associados a fortes promotores para expressá-los em níveis relativamente altos em intervalos de tempos específicos (DUAN *et al.*, 1996; COLFALONIERI *et al.*, 1998; MOCHIZUKI *et al.*, 1999). Este efeito tóxico agudo dificulta a adaptação por parte dos insetos. A expressão destes também pode ocorrer em tecidos particularmente vulneráveis ao ataque, como sementes, ou induzidos através de ferimentos no tecido atacado pela mastigação, como as folhas (DATTA *et al.*, 1998; MOCHIZUKI *et al.*, 1999; LARRY & RICHARD, 2002). Baseado nos diversos estudos publicados acerca do papel destas proteínas em cultivares transgênicos, verificou-se que inibidores de serinoproteases são preferencialmente efetivos contra insetos da ordem Lepidoptera (MC MANUS *et al.*, 1994; YEH *et al.*, 1997) enquanto os de cisteinoprotease são preferencialmente efetivos contra insetos da ordem Coleoptera (LECARDONNEL *et al.*, 1999; LEPLÉ *et al.*, 1995).

A expressão de inibidores em plantas transgênicas foi primeiramente demonstrado por Hilder *et al.* (1987), através da expressão do gene do inibidor de tripsina (CpTI) do feijão caupi (*Vigna unguiculata*) em tabaco, conferindo resistência a uma grande variedade de insetos-praga, incluindo espécies dos gêneros *Heliothis* e *Spodoptera* (Lepidoptera), *Diabrotica* e *Anthonomous* (Coleoptera) e *Locusts* (Ortoptera) (GATEHOUSE *et al.*, 1992). Após este estudo de sucesso, muitos outros inibidores de diversas espécies vegetais vêm sendo estudados e empregados na transformação de plantas. Na revisão bibliográfica de Fan & Wu (2005) são apresentados mais de 50 trabalhos de plantas transgênicas expressando inibidores de diferentes famílias resistentes a insetos, com esta característica passada por várias gerações. Contudo, plantas transgênicas expressando IP ainda não são comercializadas. Além de apresentar atividade inseticida, os inibidores vegetais são efetivos contra nematoides, vírus, bactérias e fungos patogênicos, podendo exercer um efeito protetor cumulativo para as plantas. Os inibidores são componentes comuns em alimentos vegetais destinados a alimentação de seres humanos e animais e, facilmente inativados pelo cozimento; assim a introdução dos genes destes em plantas cultivadas pode ser considerada segura (DUAN *et al.*, 1996; COLFALONIERI *et al.*, 1998; MOCHIZUKI *et al.*, 1999; LARRY & RICHARD, 2002; BABU *et al.*, 2003).

Apesar de todos os benefícios, os genes de IP apresentam certas limitações: uma das mais preocupantes é que diferentes espécies de insetos são afetadas diferencialmente quando alimentadas com o mesmo inibidor. Considerando a alta complexidade das interações entre protease/inibidor e a diversidade de enzimas proteolíticas utilizadas pelas diversas pragas no processo de digestão do alimento, a escolha de um IP e sua especificidade representa um ponto crucial no sucesso de qualquer estratégia de controle que

dependa da inibição enzimática. Primeiramente, a escolha de um inibidor deve ser baseada em um profundo entendimento do sistema biológico de uma praga específica, baseado em testes *in vitro* e *in vivo*.

Muitos inibidores têm sido utilizados em estudos aprofundados e muitos outros têm sido isolados e apresentado diferentes respostas contra espécies de pragas. No entanto, a resistência do inseto pode surgir após a exposição prolongada e pressões seletivas mediadas por uma proteína inseticida ou gene de resistência (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). A menos que a estratégia biotecnológica seja desenhada e implementada para superar estes problemas, esta se tornará ineficaz com o passar do tempo como qualquer estratégia de gestão baseada no emprego de pesticidas. Assim como as plantas transformadas que expressaram apenas as proteínas *Bt* não obtiveram um completo sucesso, é presumível que o mesmo aconteça com os inibidores vegetais. A combinação de inibidores e outras proteínas inseticidas ou que provoquem algum tipo de estresse no inseto sugere que esta técnica pode levar a níveis mais satisfatórios de controle (ZHAO *et al.*, 1998; CORNU *et al.*, 1996; FRANCO *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 2000; BABU *et al.*, 2003). Lectinas, inibidores de α -amilase e as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) constituem um grupo de proteínas vegetais que poderiam ser utilizadas em sinergismo com os inibidores de protease. Estas proteínas são estudadas por diversos grupos e apresentam o mesmo potencial de aplicação biotecnológica dos inibidores (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

5. O FUTURO DOS INIBIDORES DE PROTEASES E A BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

Com o conhecimento adquirido acerca dos mecanismos de resistência apresentado pelas diferentes espécies de insetos-praga, a nova geração de plantas geneticamente modificadas emprega diferentes ferramentas de estudo biotecnológico: genes de proteínas *Bt* em conjunto aos genes de inibidores. Muitos inibidores de serinoprotease são capazes de potencializar a atividade inseticida de toxinas Cry em 3 diferentes ordens de insetos: Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (HILDER *et al.*, 1987; MACINTOSH *et al.*, 1990; PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009). Este novo enfoque está baseado no processo de piramidação de plantas, na qual duas ou mais proteínas corroboram para uma maior eficiência no controle do desenvolvimento e sobrevivência do inseto-praga.

A presença de níveis extremamente baixos de inibidores aumenta a atividade inseticida de algumas proteínas Cry em até 20 vezes (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009). Em seus estudos, Macintosh *et al.* (1990) observaram a potencialização do efeito de um inibidor de tripsina isolado de sementes de *Curcubita maxima* (CmTI) a uma concentração 10^5 vezes abaixo do seu nível inseticida. Plantas de tabaco expressando CmTI e a toxina Cry1Ab mostraram um aumento de 6 vezes na atividade inseticida contra a lagarta do tabaco, *Heliothis virescens*, quando comparadas com plantas expressando apenas a toxina Cry1Ab.

O mecanismo completo pelo qual os inibidores aumentam a atividade das proteínas Cry ainda é desconhecido, embora eles possam inibir proteases intestinais específicas que normalmente inativariam as proteínas *Bt* ou podem limitar a proteólise de proteínas de membrana, aumentando sua meia vida e a habilidade de ligar-se a proteínas *Bt*. O mecanismo mais aceito é mostrado na Figura 3. Inicialmente, há a solubilização da proteína Cry no lúmen do intestino médio (1) seguida da ativação da pró-toxina e sua translocação através da membrana peritrófica (2). Em seguida, ocorre ligação da toxina a receptores primários e a clivagem da hélice α -1 (3). Por fim, a oligomerização da toxina e ligação a receptores ancorados a GPI é observada (4). A inserção da toxina na membrana acontece, levando a formação dos poros (5) (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2010).

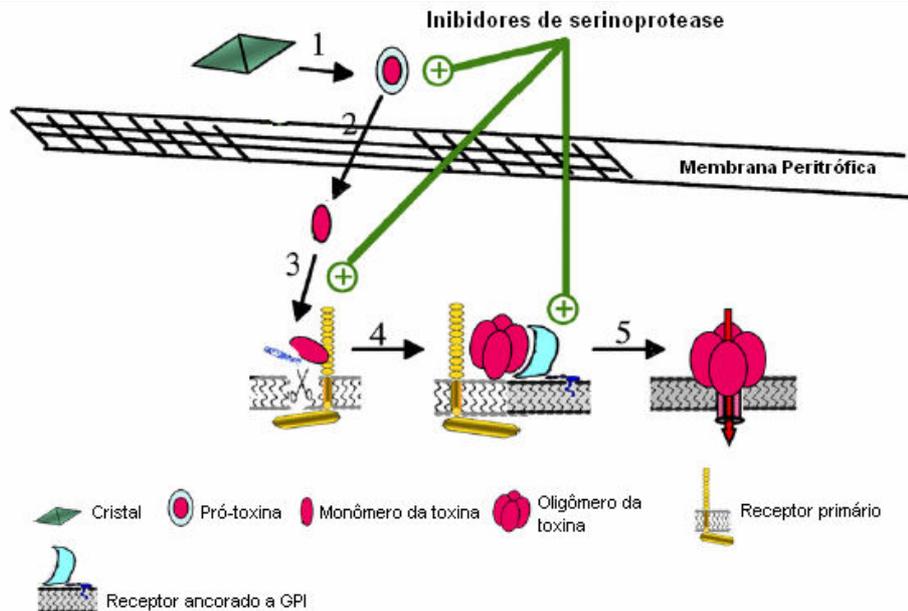


Figura 3 - Modelo do modo de ação das proteínas Cry e a potencialização de seu efeito exercido por inibidores de protease (adaptado de PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2010).

Além da utilização de proteínas *Bt* e inibidores enzimáticos, esta nova geração de plantas modificadas apresenta ferramentas inovadoras, como a fusão de outras proteínas tóxicas. Recentemente, o grupo de pesquisa liderado pelo pesquisador John A. Gatehouse publicou alguns trabalhos onde descrevem a fusão de uma lectina vegetal, GNA, isolada dos bulbos de *Galanthus nivalis* com a toxina ButaIT, isolada do escorpião vermelho africano *Mesobuthus tamulus* (TRUNG *et al.*, 2006). A partir do conhecimento de que GNA é transportada para a hemolinfa do inseto após sua ingestão, fusionaram as proteínas para que GNA funcionasse como um transportador da toxina ButaIT. A atividade biológica de ButaIT/GNA (denominação dada a proteína fusionada) foi testada; e os resultados dos bioensaios com dieta artificial contendo a proteína mostraram que houve elevada mortalidade da lagarta do tomate *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera). Além do aumento da taxa de mortalidade, houve uma redução na taxa de crescimento e na taxa de alimentação. ButaIT/GNA foi detectada na hemolinfa das larvas alimentadas, mostrando que o fluxo do intestino para a hemolinfa não foi alterado. Ensaios posteriores também apontaram um efeito altamente tóxico de ButaIT/GNA para uma das pragas do arroz, *Nilaparvata lugens* (Homoptera) (TRUNG *et al.*, 2006).

Fitches *et al.* (2009) avaliaram o efeito de ButaIT/GNA e SFI1/GNA, uma toxina isolada do veneno da aranha *Segestria florentina* (SFI1) fusionada com GNA. Ambas as proteínas criadas apresentaram toxicidade para insetos de diferentes ordens, como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Dictyoptera. Os autores concluem que as toxinas fusionadas com GNA apresentam uma ampla atividade inseticida com enorme potencial para o combate às pragas agrícolas.

O sucesso desta e de qualquer estratégia que empregue proteínas de defesa no melhoramento de plantas depende da execução de uma série de etapas: (1) purificação e caracterização da proteína de interesse, (2) investigação acerca de sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra patógenos, (3) determinação da sequência parcial ou total de aminoácidos da proteína, (4) clonagem de cDNAs e DNAs que codificam-na, (5) estudo da expressão destes genes sob condições normais de desenvolvimento e sob condições de estresse, (6) estudo da expressão transgênica dos genes transferidos para verificar se estes estão produzindo as proteínas correspondentes nas plantas transformadas e (7) verificação do aumento da resistência nas plantas transgênicas em campo (GARCÍA-OLMEDO *et al.*, 1996).

6. CONCLUSÕES

A biotecnologia e as possibilidades criadas por ela são inúmeras. No entanto, é preciso cuidado para a criação e liberação de plantas geneticamente modificadas. A população como um todo ainda apresenta certa hesitação em consumir alimentos de origem transgênica, este é um fato que deve ser levado em consideração além de outras questões de biossegurança que devem ser estudadas antes da liberação do

transgênico. Outro fato que deve ser esclarecido é que plantas geneticamente modificadas expressando inibidores não serão a solução dos problemas agrícolas e sim uma ferramenta alternativa empregada junto a outras já conhecidas e em desenvolvimento para alcançarmos resultados eficientes. Além disso, estudos que elucidem o mecanismo de adaptação dos insetos às defesas vegetais na interação inseto-planta são essenciais, pois conhecendo com maiores detalhes os acontecimentos que levam a este comportamento poderemos aprimorar a concepção de plantas transgênicas, tornando-as eficientes por um maior período de tempo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABU, R.M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. *Crop Protection*, v. 22, p. 1071–1086. 2003.

BHATTACHARYYA, A.; BABU, C.R. Purification and biochemical characterization of a serine protease inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: Insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry*, v. 70, p. 703–712. 2009.

BIRK, Y. Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-170. 2003.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, p. 1515-1539. 2002.

COLFALONIERI, M.; ALLEGRO, G.; BALESTRAZZI, A.; FOGHER, C.; DELLEDONNE, M. Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz protease inhibitor (Kti3) gene. *Mol. Breed.*, v. 4, p. 137–145. 1998.

CORNU, D.; LEPLE, J.C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; ROSS, A.; AUGUSTIN, S.; DELPLANQUE, A.; JOUANIN, L.; PILATE, G.; AHUJA, M.R. Expression of a protease inhibitor and a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin in transgenic poplars. In: Boerjan, W., Neale, D.B. (Eds.), Somatic cell genetics and molecular genetics of trees. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Netherlands, p. 131–136. 1996.

DATTA, K.; BAISAKH, N.; THET, K.M.; TU, J.; DATTA, S.K. Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight. *Theor. Appl. Genet.*, v. 106, p. 1–8. 1998.

DUAN, X.L.; LI, X.G.; XUE, Q.Z.; ABOELSAAD, M.; XU, D.P.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato protease inhibitor II gene are insect resistant. *Nat. Biotechnol.*, v. 14, p. 494–498. 1996.

FAN, S.G., WU, G.J. Characteristics of plant protease inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, v. 46; p. 273-292, 2005.

FAO. *How feed the world in 2050*. Roma, Itália. p. 1-35. 2009.

FERMI, C.; PERNOSSI, L. Untersuchungen über die Enzyme. Vergleichendes Studie. *Z Hyg Infeektionskr.*, v. 18, p. 83-89. 1984.

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 155-161. 2004.

FITCHES, E.C.; BELL, H.A.; POWELL, M.E.; BACK, E.; SARGIOTTI, C.; WEAVER, R.J.; GATEHOUSE, J.A. Insecticidal activity of scorpion toxin (ButaIT) and snowdrop lectin (GNA) containing fusion proteins towards pest species of different orders. *Pest Manag Sci.*, v. 66, p. 74–83. 2009.

FRANCO, O. L.; MELO, F.R., SILVA, M.C.M., GROSSI DE SÁ, M.F. Resistência de plantas a insetos. *Biociência*, v. 10, p. 36–40, 1999.

GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; SEGURA, A.; MORENO, M.; CASTAGNARO, A.; TITARENKO, E.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; PIÑERO, M.; DIAZ, I. Engineering plants against pathogens: A general strategy. *Field Crops Res.*, v. 45, p. 79-84. 1996.

GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; HILDER, V.A. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: GATEHOUSE, A.R., HILDER, V.A., BOULTER, D. (Eds.), *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. CAB International, Wallingford, England, p. 155–181. 1992.

GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; DOBIE, P.; KILMINSTER, A.M.; BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*, *J. Sci. Food Agric.*, v. 30, p. 948–958. 1979.

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein protease inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 431, p. 145–159. 2004.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, v. 330, p. 160–163. 1987.

JAMES, C. *Global status of commercialized transgenic crops: 2000*. ISAAA, Ithaca, New York, 15 pp. 2000.

JANMAAT, A.F.; MYERS, J.H. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage looppers, *Trichoplusia ni*. *Proc Roy Soc Lond B*, v. 270, p. 2263–70. 2003.

KOIDE, T.; TSUNASAWA, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 2. Amino-acid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Eur. J. Biochem.*, v. 32, p. 408-416. 1973.

LARRY, L.M.; RICHARD, E.S. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6605–6611. 2002.

LAWRENCE, P.K., KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458, v. 5, 15 de abril, 2002.

LECARDONNEL, A.; CHAUVIN, L.; JOAUNIN, L.; BEAUJEAN, A.; PREVOST, G.; SANGWAN-NORREEL, B. *Plant Sci.*, v. 140, p. 71–79. 1999.

LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. *Erythrina caffra* trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. *J. Mol. Biol.*, v. 239, p. 276-284. 1994.

LEPLÉ, J.C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S.; PILATE, G.; DUMANOIS-LE, T.V.; DELPLANQUE, A.; CORNU, D.; JOUANIN, L. *Mol. Breed.*, v. 1, p. 319–328. 1995.

LINGARAJU, M.H.; GOWDA, L.R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1784, p. 850–855. 2008.

MACEDO, M. L. R.; MELLO, G. C.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 40, p. 891-898. 2002.

MACEDO, M.L.R.; GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, v. 68, p. 1104–1111. 2007.

- MACEDO, M.L.R.; PANDO, S.C.; CHEVREUIL, L.R.; MARANGONI, S. Properties of a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Delonix regia* Seeds Against Digestive Proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Protein & Peptide Letters*, v. 16, p. 1459-1465. 2009.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; FRANCO, O.L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C.F.R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. v. 158, p. 164–172. 2011.
- MACINTOSH, S.C.; KISHORE, G.M.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; STONE, T.B.; SIMS, S.R. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. *J Agric Food Chem.*, v. 38, p. 1145–52. 1990.
- MC MANUS, M.T.; WHITE, D.W.R.; MC GRAGOR, P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Res.*, v. 3, p. 50–58. 1994.
- MOAR, W.J.; PUZSTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, M.J. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC Resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, p. 2086–2092. 1995.
- MOCHIZUKI, A.; NISHIZAWA, Y.; ONODERA, H.; TABEL, Y.; TOKI, S.; HABU, Y.; UGAKI, M.; OHASHI, Y. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 93, p. 173–178. 1999.
- OERKE, E.C., DEHNE, H.W., SCHÖNBECK, F., WEBER, A. *Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*. Elsevier, Amsterdam. 1994.
- OLIVA, M.L.V. A novel subclassification for Kunitz protease inhibitors from leguminous seeds, *Biochimie*, doi:10.1016/j.biochi.2010.03.021. 2010.
- OLSEN, K.M.; DALY, J.C. Plant-toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 93, p. 1293–1299. 2000.
- PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; PORTA, H.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, v. 30, p. 589-595. 2009.
- RICHARDSON, M. The protease inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, v. 16, p. 159–169. 1977.
- RICHARDSON, M., Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), In: *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*, v. 5. Academic Press, New York, p. 259–305. 1991.
- SAWANO, Y.; HATANO, K.; MIYAKAWA, T.; KOMAGATA, H.; MIYAUCHI, Y.; YAMAZAKI, H.; TANOKURA, M. Protease inhibitor from Ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol.*, v. 146, p. 1909-1919. 2008.
- SHARMA, H.C.; ORTIZ, R. Transgenics, pest management, and the environment. *Curr. Sci.*, v. 79, p. 421–437. 2000.
- TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.*, v. 26, p. 199–202. 2008.
- TABASHNIK, B.E.; PATIN, A.L.; DENNEHY, T.J.; LIU, Y.B.; CARRIERE, Y.; SIMS, M.A.; ANTILLA, L. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populatios of pink bollworm. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v. 97, p. 12980–12984. 2000.

THOMAS, J.C.; ADAMS, D.G.; KEPPELNE, V.D.; WASMANN, C.C.; BROWN, J.K.; KANOST, M.R.; BOHNERT, H.J. *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 33, p. 611–614. 1995.

TORRES-CASTILLO, J.A.; MONDRAGÓN JACOBO, C.; BLANCO-LABRA, A., Characterization of a highly stable trypsin-like protease inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire). *Phytochemistry*, v. 70, p. 1374-1381. 2009.

TRUNG, N.P.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J.A. A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotechnology*, v. 6, p. 1-12. 2006.

YEH, K.W.; LIN, M.I.; TUAN, S.J.; CHEN, Y.M.; LIN, C.Y.; KAO, S.S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep.*, v. 16, p. 696–699. 1997.

ZHAO, J.Z.; ZHAO, K.J.; LU, M.G.; FAN, X.L.; GUO, S.D. Interactions between *Helicoverpa armigera* and transgenic Bt cotton in North China. *Sci. Agric. Sin.*, v. 31, p. 1–6. 1998.

Webgrafia

ABRAMILHO, Associação brasileira dos produtores de milho. Panorama Rural, São Paulo. 01 set. 2010. (A escalada do milho BT). Disponível em: <<http://www.abramilho.org.br/noticias.php?cod=1169>>. Acesso em 17 mai. 2011, às 20:44 h.