

# Adaptação da lagarta de soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina

Anderson Martins Pilon<sup>1</sup>, Maria Goreti Almeida Oliveira<sup>2</sup>, Franciny Martins Pilon<sup>3</sup>, Raul Narciso Carvalho Guedes<sup>4</sup>, Joel Antônio Oliveira<sup>5</sup>, Anderson Fazollo<sup>6</sup>

## RESUMO

O inibidor de serino protease benzamidina inibe a hidrólise protéica das proteases digestivas do tipo tripsina, no intestino médio das larvas de *Anticarsia gemmatalis*. No presente trabalho, lagartas de *A. gemmatalis* recém-eclodidas foram alimentadas com o inibidor de tripsina benzamidina nas concentrações 0; 0,25; 0,50; e 0,75% (p/p de dieta artificial). As diferentes concentrações do inibidor causaram impactos negativos ao desenvolvimento larval do inseto, como aumento do período larval e maior porcentagem de mortalidade. Entretanto, observou-se que, mesmo nas maiores concentrações testadas de benzamidina, o inseto consegue se adaptar ao inibidor por remodelagem na quantidade e no tipo de enzima presentes durante a digestão da dieta artificial.

**Palavras-chave:** Serinoproteases, inibição proteásica, soja, interação planta-inseto.

## ABSTRACT

### Adaptation of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) to the protease inhibitor benzamidine

The serine protease inhibitor benzamidine inhibits hydrolyses of trypsin-like digestive proteases in the midgut of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. In this study, newly-emerged *A. gemmatalis* caterpillars were fed on artificial diet containing increasing concentrations of benzamidine (0, 0.25, 0.50 e 0.75% w/w). This inhibitor caused negative effects in the insect development, by increasing the larval cycle and higher mortality. Nonetheless even at the highest benzamidine concentration, the insect mortality was low, suggesting that the insect is able to adapt to this inhibitor. Such adaptation may take place by increasing the amount of protease produced for digestion or changing the prevailing type of protease.

**Key words:** Serine-proteases, proteolytic inhibition, soybean, insect-plant interaction.

Recebido para publicação em outubro de 2008 e aprovado em junho de 2009

<sup>1</sup>Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Bolsista de Pós-doutorado, Departamento de Bioquímica Agrícola e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Bacharel em Química, Doutora. Departamento de Bioquímica Agrícola e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. malmeida@ufv.br.

<sup>3</sup>Bacharel em Química, Mestre. Estudante de Doutorado, Departamento de Bioquímica Agrícola e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000- Viçosa, Minas Gerais, Brasil. francinyp@bol.com.br

<sup>4</sup>Engenheiro-Agrônomo, Ph. Doctor. Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. guedes@ufv.br.

<sup>5</sup> Engenheiro- Agrônomo, Doutor. Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n,36570-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. joel@ufv.br

<sup>6</sup> Bacharel em Bioquímica. Departamento de Bioquímica Agrícola e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa. Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000- Viçosa, Minas Gerais, Brasil. afazollo@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

Os métodos usuais de controle de pragas para prevenir danos às culturas de interesse econômico são baseados principalmente no uso de pesticidas químicos. Uma forma de limitar os efeitos prejudiciais dessas moléculas sintéticas tanto no ambiente como para o homem é pela utilização da engenharia genética como alternativa para criar plantas resistentes a insetos. Assim, foram criadas numerosas plantas transgênicas de várias origens expressando proteínas entomotóxicas (Carlini & Grossi-de-Sa, 2002). Entre as proteínas que exibem efeito inseticida proveniente de plantas, os inibidores de proteases apresentam-se como estratégias interessantes para controle de inseto-praga (Lawrence & Koundal, 2002). Estratégias baseadas em inibidores de proteases visam, principalmente, insetos que se alimentam de folhas, que utilizam proteases digestivas para degradar proteínas ingeridas.

Os efeitos inseticidas de inibidores de proteases, especialmente de serino e de cisteíno proteases, têm sido estudados por meio da incorporação em dieta artificial ou por estudos de inibição *in vitro*. Alguns autores obtiveram excelentes resultados com a utilização de inibidores sintéticos ou provindos de fontes alternativas contra enzimas-alvo, ocasionando redução do peso e aumento da mortalidade do besouro *Nebria brevicollis* (Burgess *et al.*, 2002) e diminuição da taxa de postura do inseto *Frankliniella occidentalis* (Annadana *et al.*, 2002).

Um número crescente de trabalhos tem mostrado que os insetos são capazes de se adaptarem aos inibidores de proteases (Michaud, 1997; Jongasma & Bolter, 1997). Os mecanismos envolvidos nesse processo têm despertado muito interesse no meio científico e sido tema de trabalhos recentes (Brito *et al.*, 2001 & Zhu-Salzaman *et al.*, 2003). Assim, foi realizado um estudo da digestibilidade proteica da lagarta da soja após ingestão crônica do inibidor de serino protease (benzamidina) e sua relação com possíveis alterações no desenvolvimento do inseto, a fim de compreender melhor o mecanismo de interação planta-inseto.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ovos de *A. gemmatalis* foram obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (Embrapa-Soja), Londrina/PR, e mantidos em condições controladas a  $25 \pm 2$  °C de temperatura,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotoperíodo 14:10 (L:D). Após a eclosão dos ovos, iniciou-se a alimentação das lagartas de *A. gemmatalis* com dieta artificial descrita por Hoffmann-Campo *et al.* (1985). Todos os reagentes utilizados na confecção da dieta foram obtidos da Sigma-Aldrich Química Brasil (São Paulo, SP, Brasil), exceto agar, oriundo da Isofar Ind. Com.(Jacaré, RJ, Brasil), e ácido ascórbico e niapagin, que foram obtidos a partir da SynthLabSynth Ltda. (São Paulo, SP, Brasil). Soja, leve-

do, germe de trigo, proteína de soja e vitaminas foram obtidos no comércio local.

O experimento foi montado em delineamento de blocos ao acaso, sendo cada tratamento composto de cinco repetições, cada uma constituindo-se de grupos de 10 lagartas individualizadas, que foram colocadas em potes plásticos individuais, onde receberam dietas artificiais *ad libitum* até a fase pré-pupa.

Para determinação da digestibilidade, as lagartas foram transferidas para potes contendo dietas com as respectivas concentrações do inibidor de protease benzamidina. As fezes foram coletadas a partir da introdução da dieta até a fase pré-pupa e mantidas em recipientes individuais, sob refrigeração. Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar, a 105 °C, por 24 h. Em seguida, foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador, para determinação da concentração de nitrogênio pelo método micro-kjeldahl, com amostras em triplicata. A digestibilidade foi então calculada medindo a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta e a quantidade excretada nas fezes de acordo com a fórmula: % digestibilidade (app.) = (PI-PE) x 100 / PI, em que PI corresponde à proteína ingerida e PE à proteína excretada.

O intestino médio foi extraído por meio da dissecação de larvas de 1°, 2°, 3°, 4°, 5° e 6° instares, em presença de HCl  $10^{-3}$  M a 4 °C. O extrato enzimático foi obtido por meio do rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C (Oliveira *et al.*, 2005). Após os ciclos, as frações de 1 mL do extrato foram centrifugadas em tubos plásticos de 2 mL, com tampas, a 100.000 g por 30 min, a 4 °C. O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e estocado a -18 °C, para análises posteriores de proteases.

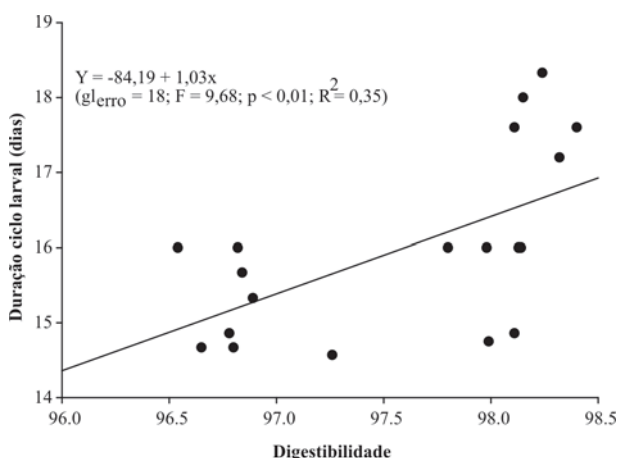
A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por (Bradford, 1976), utilizando-se como padrão uma solução 0,2 mg/mL de albumina do soro bovino (BSA). A atividade proteásica foi determinada, utilizando-se caseína como substrato na concentração final de 1% (p/v). A atividade foi monitorada espectrofotometricamente a 280 nm, utilizando-se o método descrito por (Kunitz, 1947). A reação foi realizada em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, a 37 °C.

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por (Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-argininil p-nitroanilida (L-BAPNA) na concentração final de 0,5 mM, a 25 °C, em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2, contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub> e 1% (v/v) de dimetilformamida (DMF). As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, por meio da medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de  $8.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

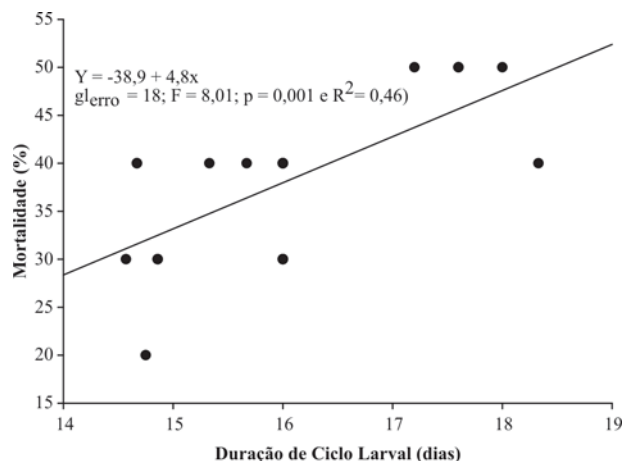
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de dieta proteica com inibidores de protease em baixa concentração 0,25 (% p/p) de benzamidina reduziu a digestibilidade proteica de *A. gemmatalis*. Já nas concentrações 0,50 e 0,75% de benzamidina há aumento da digestão proteica, porém, essas duas concentrações não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (dados não apresentados). Logo, em larvas de *A. gemmatalis*, a ingestão de inibidores enzimáticos não eliminou a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos, em vez disso resultou em aumento da digestibilidade em altas concentrações de benzamidina. Esses resultados sugerem que, possivelmente, ocorreu hiperprodução de enzimas proteolíticas no intestino das lagartas e, conseqüentemente, grande parte dos aminoácidos essenciais foram utilizados para a biossíntese de mais proteases. Como resultado, a biodisponibilidade desses aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas pode ter sido limitada, afetando o crescimento e atrasando o desenvolvimento do inseto. No presente trabalho, observou-se que o aumento da digestibilidade, devido à presença de benzamidina, causou aumento da duração do ciclo larval de *A. gemmatallis* (Figura 1) e que esse aumento foi altamente relacionado com a mortalidade (Figura 2).

Bolter & Jongsma (1995) observaram fato semelhante quando submeteram *Leptinotarsa decemlineata* (Say) à alimentação com folhas de batata tratadas com metiljasmonato gasoso, que induziu altos níveis de inibidores proteolíticos de cisteína e aspartil protease, ocasionando atraso significativo no desenvolvimento do inseto. Mesmo quando esse inseto se alimentou em dieta contendo inibidores de proteases com E64, inibidor sintético de cisteínprotease, verificou-se atraso no crescimento, aumento na



**Figura 1.** Correlação entre a duração do período larval e a digestibilidade aparente (%) de *Anticarsia gemmatalis*, quando alimentada com dieta artificial contendo o inibidor de protease benzamidina.



**Figura 2.** Correlação entre a mortalidade (%) e a duração do período larval (d) de *Anticarsia gemmatalis*, quando alimentada com dieta artificial contendo o inibidor de protease benzamidina.

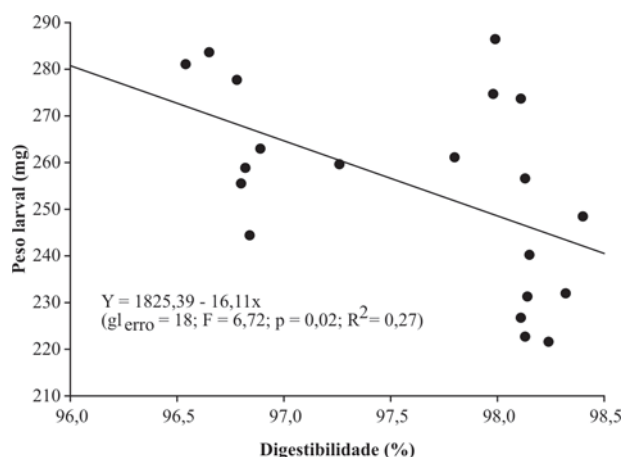
mortalidade dos insetos, além de diminuição da taxa de fecundidade de adultos (Bolter & Latoszek-Green, 1997).

Ainda a alta correlação entre aumento de ciclo larval (Figura 1) e a mortalidade (Figura 2) caracteriza-se como resposta indireta dos inibidores. Assim, as lagartas de *A. gemmatalis* alongam o ciclo larval, devido à deficiência na absorção de aminoácidos essenciais, e morrem sem completar o seu desenvolvimento.

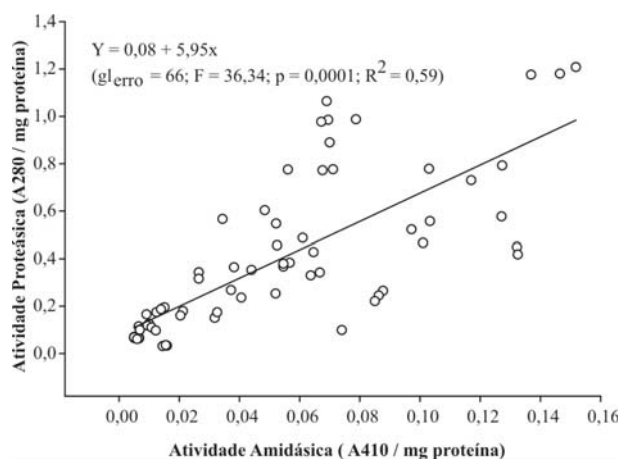
O aumento da digestibilidade, ao contrário do que se esperava, ocasionou redução no crescimento (Figura 3). A ingestão crônica de benzamidina ocasionou redução de 13,5% do peso das larvas de *A. gemmatalis* na maior concentração de inibidor. Esse aumento pode ter ocorrido em consequência do aumento da síntese de proteases. Assim, a biodisponibilidade de aminoácidos pode ter sido utilizada para a síntese de mais proteases, em vez da biossíntese de outras proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto.

A incorporação do inibidor de protease pode causar efeitos negativos na taxa de crescimento não somente em lepidópteras, como ocorreu com *A. gemmatalis*, neste trabalho, ou com *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua* alimentadas de dieta contendo tripsina de soja (SBTI) e inibidor de protease ÉÉ de batata (Broadway & Duffey, 1986), mas também em outros insetos, como o coleóptero *Tribolium castaneum*. Este inseto teve o seu crescimento retardado quando oryzacistatina I foi adicionada a sua dieta (Michaud *et al.*, 1995).

O questionamento sobre a produção de outras proteases foi feito, e na tentativa de responder essa pergunta viu-se a necessidade de verificar a correlação da atividade geral versus atividade trípica (Figura 4). Observou-se que não houve diferença significativa na correlação de atividade proteolítica versus amidásica para os diferentes instares ( $p > 0,05$ ), por análise de covariância,



**Figura 3.** Correlação entre as variações no peso larval de *A. gemmatalis* em função da digestibilidade aparente (%), quando alimentada com dieta contendo o inibidor de protease benzamidina.



**Figura 4.** Correlação entre as atividades proteásica e amidásica observadas no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta contendo o inibidor de protease benzamidina.

tendo-se instares como covariável. Portanto, foi estabelecida uma única curva para todos os tratamentos, podendo-se verificar que essa foi uma correlação positiva; ou seja, à medida que o inseto crescia ele se alimentava mais e suas atividades amidásica e proteásica aumentavam conjuntamente, independentemente do tratamento. Como *A. gemmatalis* respondeu à ingestão crônica de benzamidina com aumento na atividade proteolítica do intestino médio, o substrato específico para serino protease (BAPNa) foi utilizado para averiguar se esse aumento na atividade proteolítica estava atribuído à hiperprodução de tripsinas-like. Com essas duas atividades pode-se diagnosticar que *A. gemmatalis* pode responder à ingestão do inibidor benzamidina com uma hiperprodução de tripsinas-like sensíveis ao inibidor e sugere apresentar a síntese de formas insensíveis, além

de poder dispor da síntese de outras proteases, o que possivelmente explica a adaptabilidade dessa praga em vasta gama de plantas hospedeiras, estando, dessa forma, submetidas a uma variedade de inibidores. Isso mostra que *A. gemmatalis* tem como principais enzimas proteolíticas na digestão de proteínas as enzimas tripsinas-like, mesmo com a presença de alta concentração de benzamidina no trato intestinal. Brodway (1995) observou que outras espécies de lepidópteras, como *P. rapae*, *P. napi*, *P. xylostella*, *T. ni*, *L. dispar* e *H. zea*, também apresentaram atividades de tripsina e quimotripsina, sendo os índices muito maiores de atividade atribuídos às tripsinas.

Alterações na composição de proteases digestivas foram observada em lagartas como *Heliothis armigera* (Hübner) (Patankar *et al.*, 2001), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) e *H. zea* (Boddie) (Mazumdar-Leighton & Brodway, 2001) e *H. virescens* (Fabricius), (Brito *et al.*, 2001). Esses insetos foram capazes de superar os efeitos negativos da ingestão crônica de vários inibidores de protease de plantas hospedeiras, alterando a composição das enzimas do trato digestivo.

## CONCLUSÕES

O inibidor de protease benzamidina, quando adicionado em dieta da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, promove aumento na sua síntese de enzimas proteolíticas no intestino médio, aumentado, dessa forma, a digestibilidade proteica, o que assegura ao inseto a sua sobrevivência. Por outro lado, a absorção de aminoácidos essenciais não seria o suficiente para suprir o que foi gasto com o aumento na síntese de enzimas proteolíticas, comprometendo assim o seu desenvolvimento, pois prolonga o ciclo larval e promove maior porcentagem de mortalidade.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo suporte financeiro para a realização do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Annadana S, Peters SJ, Gruden K, Schipper A, Outchkourov NS, Beekwilder MJ, Udayakumar M & Jongsma MA (2002) Effects of cysteine protease inhibitors on oviposition rate of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Insect Physiology*, 48:701-706.
- Bolter CJ & Latoszek-Green M (1997) Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor E-64, on Colorado potato beetle gut proteinase. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83:295-303.
- Bolter CJ & Jongsma MA (1995) Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to protease inhibitor induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Journal of Insect Physiology*, 41:1071-1078.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248.
- Brito LO, Lopes AR, Parra JRP, Terra WR & Silva-Filho MC (2001) Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128:365-375.
- Broadway RM & Duffey SS (1986) Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 32:827-833.
- Broadway, RM (1995) Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology*, 41:107-116.
- Burgess EPJ, Lovei GL, Malone LA, Nielsen IW, Gatehouse HS & Christeller JT (2002) Prey-mediated effects of the protease inhibitor aprotinin on the predatory carabid beetle *Nebria brevicollis*. *Journal of Insect Physiology*, 48:1093-1101.
- Carlini CR & Grossi-de-Sa MF (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40:1515-1539.
- Erlanger BF, Kokowisy N & Cohen W (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 95:271-278.
- Hoffman-Campo CB, Oliveira EB & Moscardi F (1985) Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, EMBRAPA-CNPQ. 23p. Documento10
- Jongsma MA & Bolter C (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43:885-895.
- Kunitz M (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. II – General properties. *Journal of Genetic Physiology*, 30:291-310.
- Lawrence PK & Koundal KR (2002) Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5:93-109.
- Mazumdar-Leighton S & Broadway RM (2001) Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31:645-657.
- Michaud D (1997) Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends in Biotechnology*, 15:4-6.
- Michaud D, Bernier-Vadnais N, Overney S & Yelle S (1995) Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle. *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 25:1041-1048.
- Oliveira MGA, de Simone SG, Xavier LP & Guedes RNC (2005) Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140:369-380.
- Patankar AG, Giri AP, Harsulkar AM, Sainani MN, Deshpande VV, Ranjekar PK & Gupta VS (2001) Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31:453-464.
- Zhu-Salzaman K, Koiwa H, Salzaman RA, Shades RE & Ahn JE (2003) Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Molecular Biology*, 12:135-145.