

Insecticidas clásicos y biopesticidas modernos: avances en el entendimiento de su mecanismo de acción.

Jorge G. Rocha-Estrada y Fernando L. García-Carreño*

*Laboratorio de Bioquímica. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste.
Apartado Postal 128; La Paz, B. C. S. 23000. fgarcia@cibnor.mx*

Palabras clave: inhibidores enzimáticos, proteasas, α -amilasas, control de plagas

Keywords: enzymatic inhibitors, proteases, α -amylases, pest control

RESUMEN

Desde el inicio de la agricultura, el ser humano ha buscado procedimientos para eliminar las plagas de sus cultivos y cosechas. Aunque en la segunda mitad del siglo XX se logró aumentar los rendimientos gracias al uso de pesticidas sintéticos, la biotecnología actual busca igualar estos rendimientos, utilizando compuestos que no son nocivos para el ambiente. El desarrollo de plantas transgénicas, que sintetizan inhibidores de enzimas vitales para los insectos, es una opción. En este artículo se revisan las bases moleculares del funcionamiento de los insecticidas sintéticos utilizados y de los inhibidores naturales de plantas de uso potencial, así como las estrategias seguidas para las investigaciones en el tema.

ABSTRACT

Since the beginning of agriculture, humanity has looked for eliminating plagues from crops. Although in the second half of 20th century, harvest yields were raised by the use of synthetic pesticides, modern biotechnology concerns about reaching the same yields by using non-toxic compounds. The development of transgenic plants synthesizing plant or bacterial proteinaceous inhibitors for insect vital enzymes, is an actual option. In this paper, we review the molecular basis of the classic synthetic and modern natural insecticides with potential use. Research strategies for the topic are also discussed.

INTRODUCCIÓN.

La lucha del hombre contra las plagas de cultivos comenzó hace unos 16,000 años, a la par con la domesticación de plantas y animales que después, permitieron el desarrollo de la agricultura (Thacker, 2002). El 37% de las pérdidas de las cosechas en todo el mundo se debe a plagas, siendo los agricultores en pequeña escala los más afectados. El efecto es aún mayor en las semillas que deben ser almacenadas por largos períodos (Franco *et al.*, 2002). En el siglo XX, el uso de insecticidas sintéticos fue un paso fundamental en el control de plagas y por lo tanto en el aumento de rendimiento de los cultivos. Sin embargo, los

efectos nocivos sobre la salud humana y la ecología han limitado su uso, y una preocupación general de la sociedad es encontrar alternativas que ofrezcan rendimientos en los cultivos similares a los obtenidos con insecticidas sintéticos, sin comprometer a la salud pública y al ambiente. Aunque se han comercializado insecticidas sintéticos con mecanismos de acción novedosos, que afectan procesos que los mamíferos no llevan a cabo, como la muda en insectos (Nauen & Bretschneider, 2002; Tunaz, 2004), su uso presenta desventajas como alto costo, al ser necesario utilizar más de un compuesto debido a su

especificidad. Además, mantienen cierta toxicidad hacia mamíferos (Grafton-Cardwell *et al.*, 2005).

La biotecnología agrícola ofrece soluciones a los problemas de pérdidas de cultivos y cosechas por plagas, así como a los riesgos de salud que representa la utilización de insecticidas convencionales. Los biopesticidas, incluyen a organismos entomopatógenos (bacterias, virus, hongos, nemátodos), entomófagos (insectos predadores o parasitoides) o algunos compuestos orgánicos e inorgánicos (Tamez Guerra *et al.*, 2001). Entre las sustancias orgánicas, los inhibidores de enzimas de origen proteico son de especial interés. Las enzimas son proteínas con una importancia biológica indudable, ya que catalizan reacciones centrales en procesos metabólicos (Mahan *et al.*, 2004) y sus inhibidores están presentes en la naturaleza jugando importantes papeles fisiológicos, como la regulación de actividad de enzimas propias (García-Carreño & Hernández-Cortés, 2000) o en las plantas como defensa ante enzimas de predadores (Konarev *et al.*, 2000). La síntesis, tanto de estos inhibidores como de algunas enzimas de defensa como quitinasas y proteasas puede ser inducida por arriba de los niveles basales en algunos órganos, como las hojas, en respuesta a los ataques de plagas (Moreno *et al.*, 1994). En agricultura se ha recurrido al estudio de estas moléculas para encontrar soluciones a dos grandes retos: la pérdida de cultivos por ataque de plagas y la utilización de compuestos sintéticos tóxicos para su control.

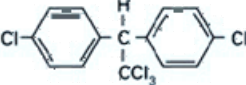
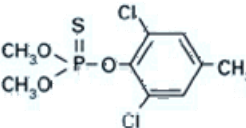
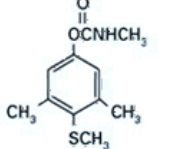
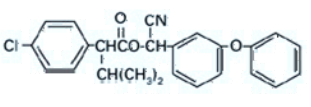
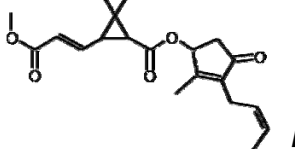
Las herramientas de la ingeniería genética son útiles para transferir genes de especies resistentes a otras no resistentes, otorgando la posibilidad de que esos cultivos se desarrollen en presencia de plagas que normalmente podrían dañarlas. A la fecha, se han producido plantas transgénicas con la capacidad de sintetizar enzimas hidrolíticas, lectinas o inhibidores de enzimas (Bell *et al.*, 2001). Sin embargo, la utilización de este tipo de herramientas requirió, en un principio, el

conocimiento de las interacciones moleculares que suceden durante la inhibición de las enzimas, así como estudios de factibilidad biológica en biotecnología, que son los pasos previos al diseño de inhibidores más eficientes y específicos. En éste artículo se revisan las estrategias y avances en el campo de control de plagas, a través del conocimiento de las interacciones moleculares que se dan entre los cultivos y sus plagas, cuando estos se encuentran en contacto. Específicamente, el estudio de los inhibidores naturales y sintéticos que reducen la capacidad catalítica de algunas enzimas de organismos plaga, como acetilcolinesterasa, quitín sintasa, α -amilasas y proteasas.

PLAGUICIDAS CONVENCIONALES.

Los plaguicidas son sustancias que sirven para combatir a los organismos que afectan el desarrollo de los cultivos y del ganado. Normalmente, incluyen compuestos de las clases de organofosfatos, carbamatos, piretrinas, piretroides sintéticos y organoclorados (Tabla 1). Los dos primeros son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (ver siguiente apartado), mientras que los tres últimos afectan los canales iónicos de las neuronas (canales de sodio) (Skinner, 2005), los cuales son regulados por voltaje y sirven para transmitir impulsos nerviosos a través de potenciales de acción que se esparcen por las dendritas y axones (Raymond-Delpech *et al.*, 2005). Las vías por las que los plaguicidas sintéticos afectan al humano, son la exposición directa o el consumo de alimentos con residuos de estos compuestos (Pitarch-Arquimbau, 2001). Todos los organismos con un sistema neuronal pueden ser afectados por estas clases de compuestos químicos. Esto representa una desventaja para el uso de insecticidas sintéticos. Por otro lado, el costo de desarrollo de nuevos insecticidas es alto, ya que cada uno se selecciona de entre cientos de candidatos, en base a características deseadas de actividad insecticida alta y baja toxicidad ante mamíferos, entre otras (Casida, 1973).

Tabla 1. Clases químicas y características generales de algunos insecticidas sintéticos.

Clase química	Ejemplo	Estructura	Mecanismo de acción
Organoclorados	DDT		Afecta el cierre de los canales de sodio de las neuronas. a c
Organofosfatos	Ticlofos metil		Inhibidores de acetilcolinesterasa. Afectan irreversiblemente el sistema nervioso. a d
Carbamatos	Metiocarb		Inhibidores de acetilcolinesterasa. Afectan reversiblemente el sistema nervioso. a d
Piretroides	Fenvalerato		Bloqueo de los canales iónicos neuronales. Afectan el sistema nervioso. a d
Piretrinas	Cinerin II		Bloqueo de los canales iónicos neuronales. Afectan el sistema nervioso. b d

^aKojima *et al.* (2004), ^bGerberding (2003), ^cVijverberg *et al.* (1982), ^dSkinner (2005).

Inhibidores de acetilcolinesterasa

Por mucho tiempo se ha sabido que el bloqueo de acetilcolinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7; acetilcolina hidrolasa) por los compuestos organofosforados, como los insecticidas y sustancias utilizadas para la guerra, ocasiona rápidamente la muerte por fallas respiratorias (Chatonnet *et al.*, 2003). La acetilcolina (ACh), participa en la neurotransmisión en sinapsis neuromusculares, y su concentración en las hendiduras sinápticas esta regulada por la enzima AChE. La AChE está presente en el tejido nervioso, músculos y células rojas, y cataliza la hidrólisis de acetilcolina a colina y ácido acético, permitiendo la transmisión del impulso neuronal a través de la sinapsis (Chatonnet *et al.*, 2003). Este mecanismo

es utilizado para la neurotransmisión por diversos grupos de animales.

Con el uso rutinario de los inhibidores de AChE, desde mediados del siglo XX, se han reportado más de 500 especies de artrópodos considerados plaga que presentan resistencia ante ellos (Levitin & Cohen, 1998). Smissaert (1964), demostró que la resistencia de la araña *Tetranychus urticae* a los compuestos organofosforados, estaba relacionada a un cambio estructural en la acetilcolinesterasa, que hacía a la enzima menos reactiva a dichos compuestos. De igual manera, estudios realizados sobre la especie de barrenador de granos resistente a insecticidas organofosfatados, *Rhyzopertha dominica*, demostraron que no existían compuestos detoxificantes en el organismo, sino que la resistencia se lograba a

causa de la insensibilidad de la enzima ante las sustancias (Guedes & Dover, 1997). Para entender el mecanismo de la resistencia de acetilcolinesterasas de insectos hacia sus inhibidores, se ha recurrido al estudio tanto de las proteínas, como de los genes que las codifican. La secuenciación del genoma completo de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* fue un paso prometedor en el área de estudio (Raymond-Delpech *et al.*, 2005). Para el entendimiento de las causas estructurales de la resistencia a compuestos organofosfatados, se han realizado experimentos usando mutagénesis dirigida, en los cuales se ha encontrado que la insensibilidad de la enzima a dichos inhibidores, puede estar relacionada con algunos cambios conformacionales en el sitio activo, y en sus parámetros cinéticos (Vontas *et al.*, 2002). Recientemente se han caracterizado genes de AChE de otras especies. En el caso de la cucaracha alemana *Blattella germanica*, se caracterizaron dos genes codificantes de acetilcolinesterasa, en busca de funciones no sinápticas de esta enzima en el organismo. La presencia de dos acetilcolinesterasas con funciones diferentes en insectos, ha propiciado una serie de investigaciones que buscan definir cuál de las dos es responsable de la resistencia que presentan algunas especies ante insecticidas organofosfatados y carbamatos (Kim *et al.*, 2006), lo cual permitiría el desarrollo de sustancias que actúen específicamente inhibiendo la enzima deseada.

El estudio de la interacción de inhibidores con la acetilcolinesterasa ha sido útil para resolver el problema de las pérdidas de cultivos por insectos; sin embargo, el uso de pesticidas sintéticos va en descenso (Thacker, 2002), debido a que existen otro tipo de compuestos que ofrecen alternativas para el control de plagas, que reducirían el daño que provocan los pesticidas convencionales al ambiente. Una de ellas, es la utilización de reguladores del crecimiento de insectos. Estos compuestos, actúan bloqueando algunas rutas del

metabolismo de los insectos alterando la muda. Aunque el mecanismo de algunos de ellos no es comprendido adecuadamente, se sabe que afectan la síntesis de la quitina, ya sea directamente sobre la enzima quitín sintasa, o bien sobre procesos relacionados a ella.

Inhibidores de quitín sintasa.

La quitina es un homopolímero de N-acetilglucosamina, que entre muchas otras funciones forma el exoesqueleto de artrópodos (Tellam *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002). Como su nombre lo indica, la quitín sintasa, E.C. 2.4.1.16; UDP-N-acetil-D-glucosamina: quitina 4-β-N-acetilglucosaminil transferasa, es la enzima encargada de la síntesis de quitina. En insectos, se ha demostrado que la enzima quitín sintasa actúa coordinadamente con la quitinasa durante la muda y el desarrollo (Bolognesi *et al.*, 2005) y por lo tanto es blanco de investigaciones que buscan interferir con el vital proceso.

El primer inhibidor conocido de quitín sintasa, es el diflubenzuron. El mecanismo de este insecticida no es bien comprendido, pero se proponen tres posibles mecanismos de este compuesto: 1) inhibición de quitín sintasa, 2) inhibición de proteasas involucradas en la activación de quitín sintasa y 3) inhibición de el transporte de UDP-N-acetilglucosamina a través de la membrana celular (Tunaz, 2004).

Las investigaciones que tratan este tipo de inhibidores sintéticos siguen vigentes, sin embargo la biotecnología tiene la posibilidad de sustituir los compuestos sintéticos por inhibidores enzimáticos de origen proteico, que están presentes naturalmente en algunas plantas, como defensa ante ataques de plagas. La utilización de estos compuestos tiene la ventaja de no presentar ningún riesgo para organismos mamíferos, pero requiere el seguimiento de estrategias que van desde la identificación de compuestos candidatos para su estudio, hasta el entendimiento del mecanismo de

acción, utilización, y diseño de compuestos con características mejoradas.

INHIBIDORES PRESENTES NATURALMENTE EN PLANTAS.

Muchas plantas contienen inhibidores para enzimas, principalmente hidrolasas, inhibidores que generalmente son proteínas. Estos inhibidores forman complejos con las enzimas, bloqueando el sitio catalítico o modificando la conformación de la

enzima, lo cual trae como consecuencia la reducción de la actividad catalítica (Kokiladevi *et al.*, 2005). En la figura 1, se esquematizan las estrategias que se siguen en las diversas investigaciones que tratan el tema de los inhibidores de enzimas presentes en plantas, con posible utilización biotecnológica. Cada uno de estos pasos ya ha sido abordado, ya sea para inhibidores de α -amilasas o proteasas, en plantas de diferentes especies.

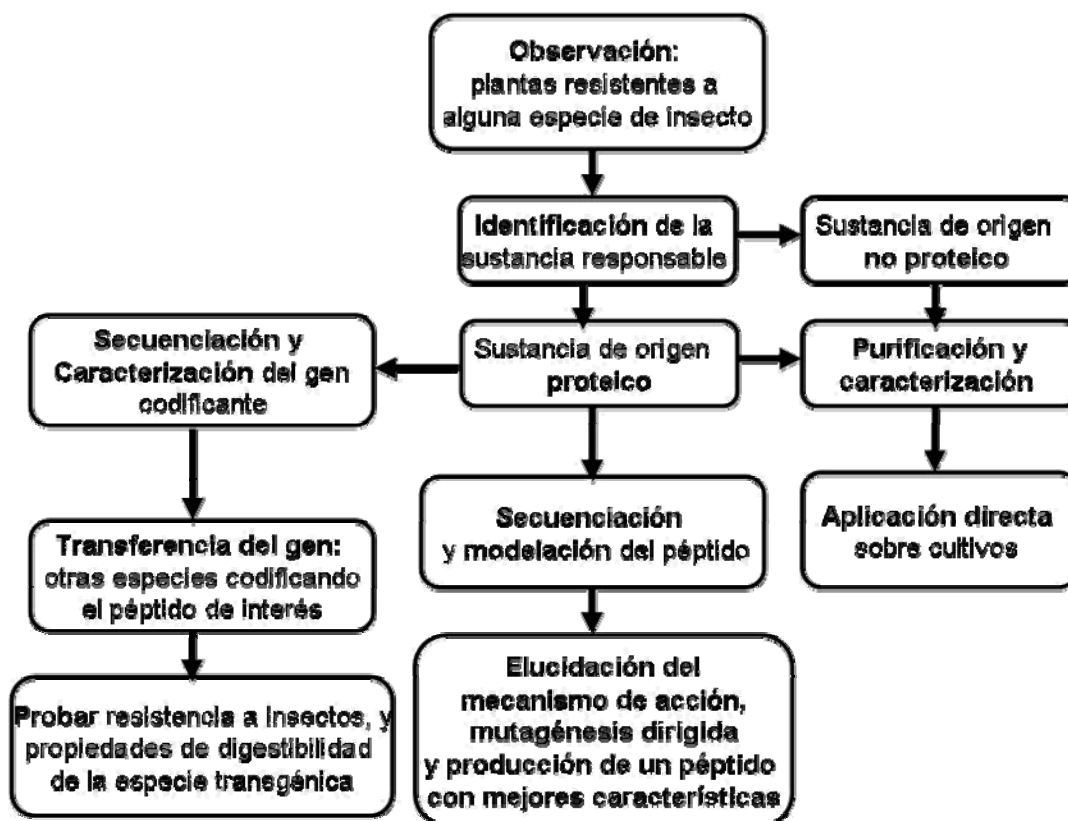


Fig. 1. Estrategias seguidas en la búsqueda y utilización biotecnológica de inhibidores de enzimas, para el combate de plagas.

Inhibidores de α -amilasas

Las α -amilasas (EC 3.2.1.1; α -1,4,-glucano-4-glucanohidrolasas) son enzimas hidrolíticas ampliamente distribuidas en la naturaleza, encontradas en animales, plantas y microorganismos. Pertenecen a la familia 13 de las

glicanohidrolasas (Koukiekolo *et al.*, 1999) y están encargadas de la degradación de polisacáridos unidos por enlaces α -1,4, como lo son el almidón y el glucógeno. También tienen utilización biotecnológica para la degradación de almidón, y en química sintética para la producción de

oligosacáridos por transglicosilación (Franco *et al.*, 2000). La α -amilasa más conocida es la de páncreas porcino (PPA, Porcine Pancreatic Amylase). Por lo tanto, los estudios involucrados con la actividad e inhibición de la actividad de α -amilasas de diversas especies toman como referencia las características de la PPA, cuyo mecanismo ha sido ampliamente descrito (Koukiekolo *et al.*, 1999; Oudjeriouat *et al.*, 2003). Las α -amilasas pueden ser inhibidas por una serie de compuestos proteicos y no proteicos (Franco *et al.*, 2000). A diferencia de los inhibidores naturales de proteasas, los inhibidores de α -amilasas presentes naturalmente en plantas han sido menos estudiados. La enzima blanco, la α -amilasa, juega un rol crucial en los organismos, entre ellos los que son considerados plagas, por lo tanto el conocimiento del mecanismo de inhibición y la relación entre estructura y función es objeto de diversos estudios. Se han descrito inhibidores presentes en plantas que actúan selectivamente sobre amilasas de insectos sin afectar amilasas de mamíferos (Martins *et al.*, 2001). Esta característica es una de las más importantes para considerar la utilización de un inhibidor natural como pesticida.

Algunas de las plantas que contienen inhibidores de α -amilasas son el frijol, amaranto, papa, maíz, trigo y cebada. Estos inhibidores son responsables de la toxicidad de algunas plantas hacia insectos, y su conocimiento es relativamente reciente. Anterior al trabajo de Huesing *et al.* (1991), se comercializaba lectina de frijol como un producto insecticida. En dicho trabajo, se comprobó que la contaminación con un inhibidor de α -amilasas, y no la lectina fitohemaglutinina, ocasionaba que el producto fuera tóxico contra insectos. En 1990, Moreno *et al.* purificaron y caracterizaron un inhibidor de α -amilasas, tipo lectina, de la misma especie de frijol. Este inhibidor se encuentra en forma de agregados ($M_r=32,000$) de 5 cadenas peptídicas de $M_r=14,000$ a 19,0000, cuatro de las cuales se encuentran glicosiladas. Este polipéptido es capaz de inhibir α -amilasas tanto de mamíferos

como de insectos, pero no de plantas, por lo que se sabe que es una proteína con funciones de defensa contra depredadores. Para ser activo, el inhibidor debe pasar por un procesamiento postraducción o activación. La activación de estos péptidos fue estudiada por Pueyo *et al.* (1993). Se encontró una correlación entre la disminución de la concentración de un péptido de 32 kDa, con la aparición de uno de 19 kDa, acompañado de la actividad inhibitoria. También lograron producir un mutante Asn77Asp, que no podía ser activado. Por lo tanto, concluyeron que estos inhibidores se sintetizan como proproteínas, y se demostró que la activación incluye un corte proteolítico. Genes de inhibidores de α -amilasas presentes en frijol han sido transferidos a otras plantas para probar su efecto insecticida. De igual manera, se ha probado el efecto antinutricional en ratas alimentadas con el inhibidor como ingrediente del alimento. Aunque se sabe que un inhibidor aislado e incluido en alimento para ratas retarda el crecimiento de estos organismos, se ha demostrado que la transferencia del gen de un inhibidor de α -amilasa de frijol no tiene efecto sobre el valor nutricional de una planta de chícharo transgénica, que sintetiza dicho inhibidor (Pusztai *et al.*, 1995; 1999). Además, los genes transferidos a esta planta le han ofrecido resistencia al ataque de gorgojos (*Bruchus pisorum*) (Morton *et al.*, 2000).

La estructura de los inhibidores de α -amilasas ha sido estudiada para conocer las características moleculares que le otorgan la especificidad para enzimas de insectos. Dos inhibidores de α -amilasas de frijol (α -AI1, α -AI2) presentan diferente especificidad. Las α -amilasas de insectos son inhibidas por el α -AI2, pero no por el α -AI1. En contraste, la α -amilasa porcina es inhibida por el α -AI1, pero no por el α -AI2. La sustitución de la His33 de α -AI2, por una secuencia típica del α -AI1, Ser-Tyr-Asn, provocó la pérdida de la actividad inhibitoria de α -AI2 ante las α -amilasas de insectos. Sin embargo, esta pérdida de actividad inhibitoria sobre las α -amilasas de insecto no fue acompañada

por la adquisición de actividad inhibitoria ante α -amilasa porcina (Mattar da Silva *et al.*, 2004). El estudio computacional detallado de las interacciones entre el inhibidor y la enzima permitió establecer cual región en la estructura del inhibidor le dan la especificidad ante la enzimas de insectos o mamíferos.

Otra de las especies que han recibido atención por contener inhibidores de α -amilasas es el amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*). Chagolla-López *et al* (1994) describieron el inhibidor α -AI que inhibe α -amilasas de larvas del gorgojo *Tribolium castaneum* y del barrenador de granos *Prostephanus truncatus*, sin afectar α -amilasas de mamíferos. Este inhibidor es el más abundante presente en la especie, y es responsable de más de la mitad de la actividad inhibitoria de α -amilasas de los extractos crudos de amaranto. El inhibidor esta compuesto por 32 residuos de aminoácidos y contiene dos puentes disulfuro intercatenarios. Su estructura ha sido elucidada y se han descrito los cambios que presenta al unirse a la α -amilasas del escarabajo *Tenebrio molitor*, actuando como una cubierta que bloquea específicamente el sitio activo de la enzima (Lu *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2001).

Inhibidores de α -amilasas de trigo también han sido estudiados. Cinco inhibidores de esta planta fueron probados contra enzimas de tres especies de insectos y sus características estructurales fueron útiles para explicar el mecanismo de inhibición (Franco *et al.*, 2000). En ese estudio se observaron los efectos que el tamaño y carga de cadenas laterales de aminoácidos, así como una mutación dirigida Cys52Pro tienen sobre la conformación de los inhibidores, y por lo tanto sobre la especificidad hacia diferentes tipos de α -amilasas.

Inhibidores de proteasas.

Las proteasas (EC 3.4) catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos, reconociendo el extremo carboxilo de un residuo de aminoácido (García-Carreño & Navarrete del Toro, 1997). Estas

enzimas llevan a cabo importantes papeles fisiológicos, como lo son la digestión, activación de proenzimas o prohormonas, entre muchas otras (García-Carreño, 1992). Por ello, afectar la actividad de estas enzimas puede redundar en controlar plagas. Paradójicamente, la mayoría de los inhibidores de proteasas son proteínas, lo que obliga a conocer los mecanismos por medio de los que un inhibidor no sólo no es hidrolizado por una proteasa, sino que incluso le reduce la capacidad para hidrolizar otras proteínas no inhibidores. Estas propiedades ocasionan que los inhibidores de proteasas sean objeto de estudios tanto de ciencia básica como de aplicaciones de la misma. Los inhibidores proteínicos de enzimas proteolíticas han sido reportados en todos los taxos, y son particularmente abundantes en órganos de almacenamiento, como semillas o huevos, donde representan una gran proporción de la fracción soluble de proteínas (Konarev *et al.*, 2000). La presencia, evolución, tipos y potenciales aplicaciones en la lucha contra insectos y patógenos de inhibidores de proteasas en diversas especies de plantas han sido ampliamente revisados (Ryan, 1973; Lawrence & Koundal, 2002; Valueva & Mosolov, 2004; Christeller, 2005; Fan & Wu, 2005;). Una de las fuentes de inhibidores de proteasas más estudiadas es la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Inhibidores de proteasas, obtenidos de esta bacteria ya son aplicados de manera directa, o bien, los genes que codifican a los inhibidores son transferidos a las plantas de interés (Oppert, 1999). En esta sección se hablará de las estrategias seguidas para llegar al entendimiento de las características estructurales y la interacción entre las moléculas de insectos y plantas.

Distribuidas en diversas especies de plantas, existen al menos 10 familias de inhibidores de proteasas, específicos para una de las cuatro clases características de proteasas (serín-, cisteín-, aspartil- y metalo proteasas), que son sintetizados a causa de una herida, por una serie de genes involucrados en sanar estas heridas y prevenir

futuros ataques. Debido a que las pestes de insectos con importancia económica como las clases Lepidoptera, Diptera y Coleoptera, utilizan serín- y cisteín proteasas en sus sistemas digestivos para degradar proteínas que ingieren en el alimento, se han realizado esfuerzos para desarrollar plantas transgénicas utilizando clases de inhibidores que actúen sobre estas proteasas (Ussuf *et al.*, 2001).

La identificación de plantas que contienen naturalmente inhibidores de proteasas es uno de los primeros pasos en la búsqueda de proteínas con aplicaciones biotecnológicas potenciales. Inhibidores de serín- y cisteín proteasas se han identificado en algunas especies de plantas. En la planta de mijo perla, se encontró una función antifúngica del inhibidor de cisteín proteasas, que sirve además como defensa contra depredadores. En este estudio, se demostró que la actividad inhibitoria dependía de la presencia de iones de zinc, que son indispensables para mantener la estructura secundaria y terciaria (Joshi *et al.*, 1999).

Una vez identificados los genes que codifican para los inhibidores de proteasas, se ha intentado producir plantas transgénicas que sean capaces de resistir ataques de plagas. Pujol *et al.* (2005), produjeron plantas de tabaco transgénico, que sintetiza inhibidores de tripsina de chícharo. Estas plantas, fueron capaces de inhibir proteasas del gusano *Heliothis virescens*, lo cual fue observado a través de la inhibición del crecimiento de sus larvas. En otro estudio, se produjeron plantas transgénicas de la planta *Populus nigra*, sintetizando inhibidores de tripsina de tipo Kunitz. Aunque se demostró que el inhibidor reconocía las proteasas de las mariposas *Lymantria dispar* y *Clostera anastomosis*, un ensayo *in vivo* no arrojó diferencias significativas entre el crecimiento y mortalidad de los insectos alimentados con plantas transgénicas y plantas control (Confalonieri *et al.*, 1998). A la luz de estos resultados, se puede concluir que no basta con el manejo adecuado de la ingeniería genética para producir plantas

transgénicas efectivas. El conocimiento detallado de la fisiología de las especies consideradas peste es de suma importancia.

Debido a esto, el estudio de la resistencia de insectos, a algunas plantas transgénicas ha llevado al estudio detallado de las bases moleculares para que esto suceda. Una de las estrategias estudiadas, es la inactivación del inhibidor por parte de las proteasas blanco. Giri *et al.* (1998), identificaron los inhibidores de proteasas presentes en garbanzo (*Cicer arietinum*), y los probaron ante las proteasas digestivas del barrenador (*Helicoverpa armigera*). Se demostró que los inhibidores de la planta son propensos al ataque de las enzimas del insecto, lo cual permitiría el desarrollo normal del insecto. Otro mecanismo de la resistencia a inhibidores es la síntesis de enzimas que compensen la inhibición de otras por parte de los inhibidores de las plantas. Este mecanismo de adaptación fue estudiado por Jongsma *et al.* (1995) y su modelo de estudio fueron larvas de la mariposa *Spodoptera exigua*. Además, Ferry *et al.* (2003, 2005), realizaron un par de trabajos donde estudiaron un sistema que a diferencia de otros estudios, incluía 3 niveles tróficos (planta→plaga→depredador). Se intentó demostrar que una planta de colza transgénica, expresando inhibidores específicos para las proteasas de depredadores oportunistas que consumen a las plagas de las plantas, afectaba a dichos depredadores. Se observó que los organismos plaga acumulaban al producto del gen transferido a la planta, y que dichos inhibidores acumulados en las plagas, eran detectados en los depredadores de las plagas. Sin embargo, no encontraron diferencias en desarrollo ni supervivencia del depredador. La síntesis de proteasas insensibles al inhibidor, por parte del depredador, fue la causa por la que su desarrollo no fue afectado. Finalmente, el estudio de la resistencia de insectos fue explicado con bases de la estructura molecular de las proteínas involucradas por Bayés *et al.* (2005). Se estudio la razón de la insensibilidad de una carboxipeptidasa

del gusano de maiz *Helicoverpa zea*, sintetizada en respuesta a la presencia de un inhibidor de carboxypeptidasas de papa. La resistencia de la enzima, que es muy similar a una enzima susceptible al inhibidor, se debe a un reacomodo en las regiones de loops específicos, que lleva al desplazamiento del sitio activo, impidiendo la interacción con el inhibidor. Las estrategias utilizadas tanto por plantas e insectos para sobrevivir, es producto de una historia de co-evolución (Mello & Silva-Filho, 2002) que actualmente es un interesante modelo de estudio.

El diseño de inhibidores de proteasas con mejores características es una estrategia utilizada en investigaciones recientes. Outchkourov *et al.* (2004) diseñaron un inhibidor con múltiples dominios presentes en algunos inhibidores de cisteín proteasas. Este inhibidor fue probado primero ante proteasas presentes en las plantas y se demostró que era más resistente que los inhibidores que contienen los dominios individuales. Además, fue producida una papa transgénica, que sintetizaba el inhibidor multidominio, encontrándose un incremento de la resistencia ante el ataque de trips *Frankliniella occidentalis*.

CONCLUSIONES

El desarrollo de insecticidas es un área con muchas opciones para la investigación. Aunque se han utilizado por más de medio siglo, aún hay mucho que estudiar sobre los insecticidas sintéticos y su mecanismo de acción, así como de la respuesta que inducen en las plagas, ya sea para eliminarlas o para dar lugar a variedades resistentes. Esto es aún más cierto para el campo de los biopesticidas modernos. En este caso, los inhibidores de α -amilasas y proteasas son dos de los más conocidos y estudiados, debido a que el funcionamiento de dichas enzimas es vital para el desarrollo de los organismos que las sintetizan.

En base a procesos de co-evolución, las plantas y los insectos han adquirido mecanismos para desarrollarse, uno en presencia del otro. La

biotecnología ha intervenido en este proceso porque su entendimiento apropiado tiene importancia económica para el hombre. Factores adicionales como el crecimiento exponencial de la población humana han aumentado aun más el interés por afectar los procesos de producción.

Gracias a investigaciones básicas que han estudiado algunas moléculas encargadas de la defensa de las plantas, ante el ataque de sus depredadores, se ha llegado a la comercialización de algunas sustancias de origen natural que aumentan el rendimiento de cultivos y cosechas. De igual manera se comercializan semillas transgénicas, cuyas plantas tienen la capacidad de resistir al ataque de sus depredadores naturales. Dichos productos se encuentran hoy al alcance de agricultores interesados. Debido a la cantidad de información que se genera actualmente sobre el tema, se espera que el número de compañías dedicadas a su producción y comercialización crezca cada día, aumentando la disponibilidad de sus productos. Además, actualmente, ya se han logrado diseñar moléculas con características que sobrepasan a las que las plantas tienen naturalmente. Los pasos futuros son llegar a comprender a fondo fenómenos como la resistencia de algunos insectos a plantas que sintetizan inhibidores de enzimas, ya que los mecanismos de adaptación tienen bases moleculares y pueden ser abordados por la biotecnología.

REFERENCIAS

- Bayés A, Comellas-Bigler M, Rodríguez-de-la-Vega M, Maskos K, Bode W, Aviles FX, Jongsma MA, Beekwilder J & Vendrell J (2005) Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors. *PNAS* 102: 16602-16607.
- Bell HA, Fitches EC, Down RE, Ford L, Marris GC, Edwards JP, Gatehouse JA & Gatehouse AMR (2001) Effect of dietary cowpea trypsin inhibitor (CpTI) on the growth and development of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera:

- Noctuidae) and on the success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Pest Management Science* 57: 57-65.
- Bolognesi R, Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Terra WR & Ferreira C (2005) Sequences of cDNAs and expression of genes encoding chitin synthase and chitinase in the midgut of *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1249-1259.
- Casida JE (1973) Insecticide biochemistry. *Annual Review of Biochemistry* 42: 259-278.
- Chagolla-López A, Labra AB, Patthy A, Sánchez R & Pongor S (1994) A novel α -amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 23675-23680.
- Chatonnet F, Boudinot E, Chatonnet A, Taysse L, Daulon S, Champagnat J & Foutz AS (2003) Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. *European Journal of Neuroscience* 18: 1419-1427.
- Christeller JT (2005) Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *The FEBS Journal* 272: 5710-5722.
- Confalonieri M, Allegro G, Balestrazzi A, Fogher C & Delledonne M (1998) Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (*KTi3*) gene. *Molecular Breeding* 4: 137-145.
- Fan S-G & Wu G-J (2005) Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytopagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 273-292.
- Ferry N, Raemaekers JM, Majerus MEN, Jouanin L, Port G, Gatehouse JA & Gatehouse MR (2003) Impact of oilseed rape expressing the insecticidal cysteine protease inhibitor oryzacystatin on the beneficial predator *Harmonia axyridis* (multicolored Asian ladybeetle). *Molecular Ecology* 12: 493-504.
- Ferry N, Jouanin L, Ceci LR, Mulligan EA, Emami K, Gatehouse JA & Gatehouse AMR (2005) Impact of oilseed rape expressing the insecticidal serine protease inhibitor, mustar trypsin inhibitor-2 on the beneficial predator *Pterostichus madidus*. *Molecular Ecology* 14: 337-349.
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Bloch Jr C, Silva CP & Grossi-de-Sá MF (2000) Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267: 2166-2173.
- Franco OL, Rigden DJ, Melo FR & Grossi-de-Sá MF (2002) Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. Structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry* 269: 397-412.
- García-Carreño FL (1992) Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnology Education* 3: 145-150.
- García-Carreño FL & Hernández-Cortés MP (2000) Use of Protease Inhibitors in Seafood Products. In *Seafood Enzymes. Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality* (ed. N. F. Haard & B. K. Simpson), pp. 531-547. New York: Marcel Dekker, Inc.
- García-Carreño FL & Navarrete del Toro MA (1997) Classification of proteases without tears. *Biochemical Education* 25: 161-167.
- Gerberding JL (2003) Toxicological profile for pyrethins and pyrethroids. In *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ed. U. S. D. O. H. A. H. SERVICES). Atlanta, Georgia, EU.
- Giri AP, Harsulkar AM, Deshpande VV, Sainani MN, Gupta VS & Ranjekar PK (1998) Chickpea defensive proteinase inhibitor can be inactivated by podborer gut proteinases. *Plant Physiology* 116.
- Grafton-Cardwell EE, Godfrey LD, Chaney WE & Bentley WJ (2005) Various novel insecticides

- are less toxic to humans, more specific to key pests. *California Agriculture* 59: 29-34.
- Guedes RNC & Dover BA (1997) Acetylcholinesterase inhibition in organophosphate-resistant *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 26: 561-564.
- Huesing JE, Shade RE, Chrispeels MJ & Murdock LL (1991) α -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiology* 96: 993-996.
- Jongsma MA, Bakker PL, Peters J, Bosh D & Stiekema WJ (1995) Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8041-8045.
- Joshi BN, Sainani MN, Bastawade KB, Deshpande VV, Gupta VS & Ranjekar PK (1999) Pearl millet cysteine protease inhibitor. Evidence for the presence of two distinct sites responsible for anti-fungal and anti-feedant activities. *Eur. J. Biochem* 265: 556-563.
- Kim JI, Jung CS, Koh YH & Lee SH (2006) Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the german cockroach *Blattella germanica*. *Insect Molecular Biology* 15: 513-522.
- Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K & Kobayashi K (2004) Screening for estrogen and androgen receptor activities on 200 pesticides by *in Vitro* reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives* 112: 524-531.
- Kokiladevi E, Manickam A & Thayumanavan B (2005) Characterization of α -amylase inhibitor in *Vigna sublobata*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 189-196.
- Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA, Rozhkova VT, Fido R, Tatham AS & Shewry PR (2000) Novel proteinase inhibitors in seed of sunflower (*Helianthus annuus* L.): polymorphism, inheritance and properties. *Theor Appl Genet* 100: 82-88.
- Koukiekolo R, Le Berre-Anton V, Desseaux V, Moreau Y, Rouge P, Marchis-Mouren G & Santimone M (1999) Mechanism of porcine pancreatic α -amylase. Inhibition of amylose and maltopentaosa hydrolysis by kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor and comparison with that by acarbose. *Eur. J. Biochem.* 265.
- Lawrence PK & Koundal KR (2002) Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5: 93-109.
- Levitin E & Cohen E (1998) The involvement of acetylcholinesterase in resistance of the California red scale *Aonidiella aurantii* to organophosphorus pesticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88: 115-121.
- Lu S, Deng P, Liu X, Luo J, Han R, Gu X, Liang S, Wang X, Li F, Lozanov V, Patthy A & Pongor S (1999) Solution structure of the major α -amylase inhibitor of the crop plant amaranth. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 20473-20478.
- Mahan JR, Dotroay PA & Light G (2004) Thermal dependence of enzyme function and inhibition; implications for herbicide efficacy and tolerance. *Physiologia Plantarum* 120: 187-195.
- Martins JC, Enassar M, Willem R, Wieruzeski J-M, Lippens G & Wodak SJ (2001) Solution structure of the main α -amylase inhibitor from amaranth seeds. *Eur. J. Biochem.* 268: 2379-2389.
- Mattar da Silva MC, Vieira Mello L, Ventura Coutinho M, Ridgen DJ, Neshich G, Chrispeels MJ & Grossi-de-Sá MF (2004) Mutants of common bean α -amylase inhibitor-2 as an approach to investigate binding specificity to α -amylases. *Pesq. Agropec. bras.* 39: 201-208.
- Mello MO & Silva-Filho MC (2002) Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defence mechanisms. *Braz. Plant. Physiol.* 14: 71-81.

- Moreno J, Altabella T & Chrispeels MJ (1990) Characterization of a-amylase-inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 92: 703-709.
- Moreno M, Segura A & García -Olmedo F (1994) Pseudothionin-St1, a potato peptide against potato pathogens. *Eur. J. Biochem* 223: 135-139.
- Morton RL, Schroeder HE, Bateman KS, Chrispeels MJ, Armstrong E & Higgins TVJ (2000) Bean a-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *PNAS* 97: 3820-3825.
- Nauen R & Bretschneider T (2002) New modes of action of insecticides. *Insecticides* 241-245.
- Oppert B (1999) Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42: 1-12.
- Oudjeriouat N, Moreau Y, Santimone M, Svensson B, Marchis-Mouren G & Desseaux V (2003) On the mechanism of a-amylase. Acarbose and cyclodextrin inhibition of barley amylase isozymes. *Eur. J. Biochem.* 270: 3871-3879.
- Outchkourov NS, Jan de Kogel W, Wieggers GL, Abrahamson M & Jongsma MA (2004) Engineered multidomain cysteine protease inhibitors yield resistance against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in greenhouse trials. *Plant Biotechnology Journal* 2: 449-458.
- Pitarch-Arquimbau E (2001) Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. In *Departament de Ciències Experimentals. Química Analítica*, pp. 463: Universitat Jaume I.
- Pueyo JJ, Hunt DC & Chrispeels MJ (1993) Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) a-amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. *Plant Physiology* 101: 1341-1348.
- Pujol M, Hernández CA, Amas R, Coll Y, Alfonso-Rubi J, Pérez M, Ayra C & González A (2005) Inhibition of *Heliothis virescens* larvae growth in transgenic tobacco plants expressing cowpea trypsin inhibitor. *Biotechnologia Aplicada* 22: 127-130.
- Pusztai A, Grant G, Duguid T, Brown DS, Peumans WJ, Van Damme EJM & Bardocz S (1995) Inhibition of starch digestion by a-amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. *Journal of Nutrition* 125: 1554-1562.
- Pusztai A, Grant G, Bardocz S, Alonso R, Chrispeels MJ, Schroeder HE, Tabe LM & Haggins TJV (1999) Expression of the insecticidal bean a-amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet. *The Journal of Nutrition*.
- Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ & Sattelle DB (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 5: 119-133.
- Ryan CA (1973) Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology* 24: 173-196.
- Skinner J (2005) Pest Control Technical Note. In *Commonly used pesticide chemical classes* (ed. D. o. H. Services), pp. 1-4. Melbourne: Victoria.
- Smissaert HR (1964) Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science* 143.
- Tamez Guerra P, Galán Wong LJ, Medrano Roldan H, García Gutierrez C, Rodríguez Padilla C, Gómez Flores RA & Tamez Guerra RS (2001) Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL* IV: 143-152.
- Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarmey J & Pearson RD (2000) Insect chitin synthase: cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur. J. Biochem.* 267: 6025-6042.

- Thacker JRM (2002) *An introduction to arthropod pest control*. Cambridge, UK.: Cambridge University Press.
- Tunaz H (2004) Insect growth regulators for insect pest control. *Turk J Agric For* 28: 377-387.
- Ussuf KK, Laxmi NH & Mitra R (2001) Proteinase inhibitors: plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science* 80: 847-853.
- Valueva TA & Mosolov VV (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 69: 1305-1309.
- Vijverberg HPM, Van Der Zalm JM & Van Der Bercken J (1982) Similar mode of action of pyrethroids and DDT on sodium channel gating in myelinated nerves. *Nature* 295: 601-603.
- Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M & Hemingway J (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* 11: 329-336.
- Zheng Y, Zheng S, Cheng X, Ladd T, Lingohr EJ, Krell PJ, Arif BM, Retnakaran A & Feng Q (2002) A molt-associated chitinase cDNA from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1813-1823.