

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**UREASES DE *Canavalia ensiformis*: PROCESSAMENTO E MECANISMO DE
AÇÃO EM INSETOS.**

Fernanda Stanisçuaski

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Célia R. Carlini

Co-orientador estágio sanduíche: Dr. Ian Orchard

Porto Alegre
Outubro de 2007

Instituições e Fontes Financiadoras

Partes deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX) no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Centro de Investigação da Faculdade de Ciências Biomédicas, Universidade Austral (Argentina) e no Laboratório de Neurofisiologia de Insetos, Departamento de Biologia da Universidade de Toronto em Mississauga (Canadá).

As fontes financiadoras foram: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

As bolsas de doutorado no Brasil e doutorado sanduíche no exterior foram concedidas pela CAPES.

Banca Examinadora

Dr. Carlos Peres Silva

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina.

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dr. Rafael Roesler

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – CBiot.

Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr. Carlos Termignoni

Revisor da tese e membro suplente da banca examinadora.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – CBiot

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecimentos

Ao terminar de escrever esta tese, completo 3142 dias de vida como membro da UFRGS.

Durante a maioria absoluta desses 3142 dias, estive longe das pessoas mais importantes da minha vida. Pessoas que, mesmo sem entender muito a respeito do complicado mundo da bioquímica e insetos, orgulhosos, comemoram cada resultado positivo e, pacientes, entenderam cada segundo de decepção diante dos resultados negativos. Quando a saudade apertou, mostraram que eu estava no caminho certo e que todo esforço seria recompensado. Apesar dos 370 Km, sei que tive meus pais, irmãos e a sobrinha mais linda do mundo ao meu lado e sou infinitamente grata por isso.

Não teria chegado aqui sem meus amigos. Lu e Ju, obrigada por existirem na minha vida e pelos 15 anos de amizade. Cami, Vê, Flá e Ale, vocês foram parte de toda essa jornada e devo muito à vocês. Fabi, Carolzinha, Victor e Renato, vocês são amigos mais que especiais. Pablo e Ed, seguimos caminhos diferentes, mas guardo vocês no meu coração. A todos os amigos matemáticos (escaladores ou não), obrigada por terem me acompanhado (e ajudado muito) nessa trajetória.

Destes 3142 dias, 2928 vivi como membro do LAPROTOX. Foram 2928 dias onde aprendi e cresci muito, fiz amigos para uma vida toda e descobri a paixão pela pesquisa.

Célia, obrigada, acima de tudo, pela confiança. Quero que saibas que foste a responsável por eu seguir meus sonhos profissionais. Espero ter alcançado as tuas expectativas.

Angela, durante os últimos três anos tentei te mostrar como vale a pena seguirmos nossos sonhos e que cada esforço é recompensado. A hora de seguir teus próprios passos está próxima. Sei que és capaz de chegar onde quiser.

Todos os “laprotoxianos” (remanescentes e já partidos), espero que vocês saibam como foram importantes durante toda essa fase. E obrigada por me aguentarem.

Rafa, obrigada pelos 1128 dias de companheirismo. Obrigada por entender minhas decisões, me apoiar e estar ao meu lado (mesmo que nem sempre fisicamente). Outros 1128 dias não seriam suficientes para te agradecer por tudo.

Muito obrigada ao pessoal do Lab de Neurofisiologia de Insetos, em Mississauga, Canadá. Vicki, Ian, Angela, Jean-Paul, Rosa e Lisa, não consigo transformar em palavras toda a gratidão que sinto por vocês. Eu não poderia ter tido maior sorte do que encontrá-los. O aprendizado foi imensurável e a experiência de vida maravilhosa.

Muito obrigada a todos que fizeram com que essa fase da minha vida se completasse. Espero que na próxima jornada, vocês continuem ao meu lado.

ÍNDICE

i – Lista de Abreviaturas	9
ii – Resumo	11
iii – Abstract	14
1 - Introdução	
1.1 – Ureases Vegetais – A Canatoxina	16
1.2 – Insetos como Modelo	17
1.2.1– <i>Callosobruchus maculatus</i>	19
1.2.2 – <i>Dysdercus peruvianus</i>	20
1.2.3 – Triatomíneos <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Triatoma infestans</i>	20
1.2.4 – Os Sistemas Digestório e Excretório	21
1.2.5 – O Sistema Nervoso	23
2 – Objetivos	25
2.1 – Objetivos específicos	25
3 – Materiais e Métodos	
3.1 – Ureases e peptídeos derivados	27
3.2 – Insetos e Bioensaios	27
3.2.1 – <i>Callosobruchus maculatus</i>	27
3.2.2 – <i>Dysdercus peruvianus</i>	27
3.2.3 – <i>Rhodnius prolixus</i>	28
3.2.4 – <i>Triatoma infestans</i>	28
3.3 – Preparação do homogeneizado de larvas de <i>C. maculatus</i> e de intestinos de <i>D. peruvianus</i>	29
29	
3.4 – Atividade proteolítica sobre azocaseína	29

3.5 – Atividade proteolítica sobre hemoglobina	30
3.6 – Atividade sobre substratos sintéticos	30
3.7 – Proteínas, proteases e inibidores	30
3.8 – Cromatografia por gel-filtração em Sephacryl S-200HR	31
3.9 – Eletroforese em SDS-PAGE	31
3.10 – Hidrólise <i>in vitro</i> das ureases	31
3.11 – Análise por cromatografia em Superdex 75 (FPLC)	32
3.12 – Western Blots	32
3.13 – Salina para <i>Rhodnius prolixus</i>	32
3.14 – Medida de secreção de fluídos: Ensaio de Ramsay modificado	33
3.15 – Radioimunoensaio (RIA) para quantificação de AMPc e GMPc	33
3.16 – Medida do potencial transepitelial (PTE)	34
3.17 – Quantificação dos movimentos peristálticos do estômago	34
3.18 – Quantificação de contrações do Intestino Posterior	35
3.19 – Ensaio do vaso dorsal	35
3.20 – Imunohistoquímica	35
3.21 – Análises estatísticas	36

4 – Resultados e Discussão

Parte I – Efeito Inseticida das ureases e de Jaburetox 2Ec

4.1.1 – Efeito inseticida da CNTX no inseto manchador do algodão	38
4.1.2 – Estudos com <i>Dysdercus peruvianus</i>	39
4.1.3 – Estudos com <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Triatoma infestans</i>	42

Parte II – Processamento das ureases por enzimas digestivas de *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus*

4.2.1 – Hidrólise <i>in vitro</i> de JBU: processamento diferencial dependente do estágio do inseto	46
4.2.2 – Caracterização da atividade proteolítica no homogeneizado de intestinos de ninfas e adultos de <i>D. peruvianus</i>	47
4.2.3 – Caracterização das enzimas presentes no homogeneizado de <i>C. maculatus</i>	51
4.2.4 – Hidrólise <i>in vitro</i> da CNTX e JBU com enzimas semi-purificadas de <i>C. maculatus</i>	57
Parte III – Mecanismo de Ação das Ureases e de Jaburetox 2Ec em insetos modelo	
4.3.1 – Secreção dos túbulos de Malpighi de <i>R. prolixus</i>	61
4.3.2 – Segundos mensageiros envolvidos na ação antidiurética	65
4.3.3 – Comparação do efeito antidiurético de diferentes ureases	74
4.3.4 – Ação em diferentes tecidos musculares de <i>R. prolixus</i>	75
4.3.5 – Efeito da alimentação com JBU na secreção de serotonina	89
4.3.6 – Efeitos <i>in vitro</i> x efeitos <i>in vivo</i>	92
5 – Conclusões	93
5.1 – Do efeito inseticida de ureases e peptídeos derivados	93
5.2 – Do processamento das ureases por enzimas digestivas de insetos	93
5.3 – Da ação das ureases e Jaburetox 2Ec na diurese de insetos	94
6 – Referências Bibliográficas	95
7 – Anexos	106

i – Lista de Abreviaturas

5-HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)

Abz: albendazol

AC: corrente alternada

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

BCIP: fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil

BSA: albumina sérica bovina

CNTX: Canatoxina

DEX: dexametasona

DH: *diuretic hormone* (hormônio diurético)

DUMs: neurônios medianos dorsais não pareados

E-64: L-trans-epoxisuccinil-leucilamino-(4-guanidino)-butano

EDTA: ácido etilenodiamino-tetraacético

EDDnp: etileno-diamino-dinitrofenila

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

HPU: urease de *Helicobacter pylori*

JBU: urease de *Canavalia ensiformis*

MTGM: massa ganglionar mesotorácica

NBT: *Nitro Blue Tetrazolium*

PA: Pico A

PB: Pico B

Pep-A: pepstanina A

PGE₂: prostaglandina E₂

PMSF: fluoreto de fenilmetil sulfonila

PTE: potencial transepitelial

PVDF: difluoreto de polivinilideno

SBU: urease de *Glycine max*

SDS PAGE: gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SNC: sistema nervoso central

TCA: ácido tricloroacético

TMB-8: (8-(N,N-dietilamino) octil-3,4,5-trimetoxibenzoato)

ii – Resumo

Ureases (E.C. 3.5.1.5) são metaloenzimas distribuídas em plantas, fungos e bactérias. As duas isoformas de ureases de *Canavalia ensiformis* (canatoxina - CNTX e urease do feijão de porco - JBU) são altamente tóxicas para insetos de diferentes ordens. A toxicidade dessas proteínas é dependente da liberação de um fragmento de cerca de 10 kDa a partir da proteína nativa. Essa liberação se dá por ação das enzimas digestivas cisteínicas e aspárticas (tipo catepsina B e D) presentes no trato digestivo de algumas ordens de insetos. Ureases não são tóxicas para insetos com digestão baseada em enzimas serínicas (tipo tripsina). Esse peptídeo de 10 kDa foi isolado e caracterizado, recebendo o nome de Pepcanatox. Um peptídeo recombinante, equivalente ao Pepcanatox, foi expresso em *Escherichia coli* e chamado Jaburetox 2Ec. Jaburetox 2Ec é tóxico, por via oral, para ninfas de *Dysdercus peruvianus* e, por injeção torácica, para ninfas de *Rhodnius prolixus* e ninfas e adultos de *Triatoma infestans*. CNTX e JBU, dados por via oral, são tóxicos para ninfas de *D. peruvianus* e *R. prolixus*, mas não são tóxicas para as formas adultas desses insetos. O processamento de CNTX e JBU por enzimas de ninfas e adultos de *D. peruvianus* mostraram um perfil distinto, podendo ser esse diferencial o responsável pela falta de efeito tóxico observado em adultos. Usando *Callosobruchus maculatus* como modelo, as enzimas responsáveis pelo processamento das ureases foram investigadas. A purificação parcial das enzimas de *C. maculatus* por gel-filtração resultou em uma fração (Pico B) capaz de liberar um peptídeo de aproximadamente 10 kDa a partir de CNTX e JBU. A atividade proteolítica do Pico B é completamente inibida por Pep-A e parcialmente inibida por E-64, indicando a presença de aspártico (majoritária) e cisteíno proteases. Observamos que tanto E-64 (inibidor de cisteíno proteinases) quanto Pepstatina-A (inibidor de aspártico proteinases) diminuem a formação do peptídeo entomotóxico pelo Pico B, sugerindo que cisteíno e aspártico proteases estão envolvidas nesse processo.

O mecanismo de ação em insetos das ureases, assim como dos peptídeos derivados, ainda não é conhecido. Um efeito observado *in vivo* é a diminuição da taxa de perda de peso de *R. prolixus* após a alimentação com ureases, indicando uma possível alteração no sistema excretório. Para avaliar o efeito das ureases e de Jaburetox 2Ec na secreção de *R. prolixus*, realizamos ensaios de secreção de fluídos pelos túbulos de Malpighi isolados, assim como ensaios de contrações dos intestinos anterior e posterior e vaso dorsal. JBU e Jaburetox 2Ec inibem a secreção de fluídos por túbulos de Malpighi isolados, de maneira dose dependente. CNTX também tem efeito antidiurético, enquanto a urease de *Helicobacter pylori* (HPU) não causa nenhuma alteração na secreção dos túbulos de Malpighi. Jaburetox 2Ec, mas não JBU, causa um aumento dos níveis de GMPc nos túbulos sendo esse o segundo mensageiro de sua ação. Metabólitos de eicosanóides e cálcio (intra e extracelular) influenciam a ação de JBU, mas não de Jaburetox 2Ec. Ensaios de potencial transepitelial realizados com túbulos de Malpighi indicaram que Jaburetox 2Ec, mas não JBU, alteram a ação de uma H^+ -ATPase presente na membrana dos túbulos, causando um desequilíbrio no transporte iônico e, como consequência, alteração na secreção de fluídos. Os dados obtidos não mostram que JBU e Jaburetox 2Ec desencadeiam rotas distintas nos túbulos de Malpighi, ambos culminando em antidiurese. Assim como nos túbulos de Malpighi, JBU diminui o transporte de fluídos pelo epitélio do estômago de *R. prolixus*. Jaburetox 2Ec e JBU causam um aumento na frequência de contrações do estômago estimuladas por serotonina. No intestino posterior, observamos que JBU também causa um aumento na frequência e amplitude das contrações, e mudança no tônus basal do tecido. No vaso dorsal, nenhuma alteração significativa nas contrações foram observadas. Também avaliamos por microscopia o efeito da alimentação com JBU na liberação de serotonina, hormônio envolvido em diversos processos fisiológicos. Não observamos nenhuma alteração significativa na liberação desse hormônio a partir das células do sistema nervoso, assim como nos órgãos controlados por serotonina.

A liberação de fragmento(s) entomotóxico(s) a partir de ureases vegetais, assim como o mecanismo de ação dessas ureases e fragmentos, são processos

bastante complexos. Nessa tese tivemos êxito em caracterizar várias etapas desses processos, esclarecendo pontos chaves e levantando evidências para guiar trabalhos futuros.

iii – Abstract

Ureases (E.C. 3.5.1.5) are metalloenzymes widespread in plants, fungi and bacteria. Two isoforms of *Canavalia ensiformis* urease, (canatoxin - CNTX and jack bean urease – JBU), are toxic to insects from different orders. The toxicity of these proteins is due to the release of a 10 kDa peptide from the native protein. This release is due to the action of acidic digestive enzymes present in the insect digestive tract. Ureases are not toxic to insects with digestion relying on trypsin-like enzymes. The entomotoxic peptide, called Pepcanatox, was isolated and characterized and a recombinant peptide, equivalent to Pepcanatox was expressed in *Escherichia coli*. Jaburetox 2Ec, the recombinant peptide, is toxic by oral route to nymphs of *Dysdercus peruvianus* and by injection to nymphs of *Rhodnius prolixus* and nymphs and adults of *Triatoma infestans*. CNTX and JBU, administered by oral route, are toxic to nymphs of *D. peruvianus* and *R. prolixus*, but are innocuous to adults of these insects. Proteolytic processing of JBU and CNTX by digestive enzymes from *D. peruvianus* nymphs and adults showed a distinct profile. This differential processing could be related to the lack of toxic effect of the proteins in adults. Using *Callosobruchus maculatus* as a model, the digestive enzymes involved in urease's processing were investigated. The partial purification of *C. maculatus* enzymes resulted in a protein fraction (Pool B) capable of releasing a 10kDa peptide from JBU and CNTX. The proteolytic activity of Pool B was completely abolished by Pep-A and partially inhibited by E-64, indicating the presence of aspartic (majoritary) and cysteine proteinases. Both E-64 and Pep-A decrease the formation of the entomotoxic peptide, suggesting that both classes of enzymes may be involved in this process. The purification of the enzymes present on Pool B will clarify the role of each of these enzymes on urease processing and release of the entomotoxic peptide.

The mechanisms of action of ureases as well as urease-derived peptides in insects is still poorly characterized. A lower rate of weight loss in *R. prolixus* fed on a urease-containing meal was observed *in vivo*, indicating a possible alteration on the

excretory system. To evaluate the effect of ureases and Jaburetox 2Ec on *R. prolixus* excretion, we performed fluid secretion assays on isolated Malpighian tubules, as well as fore- and hindgut contractions assays. JBU and Jaburetox 2Ec inhibit Malpighian tubules fluid secretion in a dose dependent fashion. CNTX is also antidiuretic, while *Helicobacter pylori* urease (HPU) does not alter the secretion rate. Jaburetox 2Ec, but not JBU, increases tubules levels of cGMP. No changes in AMPc was seen with either polypeptide. Eicosanoid metabolites and calcium (intra- and extracellular) modulate the antidiuretic effect of JBU, but not that of Jaburetox 2Ec. Measurements of the transepithelial potential in Malpighian tubules indicated that Jaburetox 2Ec, but not JBU, disrupts the activity of a H⁺-ATPase present on tubules' membranes, causing changes in fluid secretion due to an imbalance of ions transport. The data obtained show that JBU and Jaburetox 2Ec are acting on Malpighian tubules through different pathways, both leading to antidiuresis. As seen in Malpighian tubules, JBU also decrease the fluid transport across the crop epithelium of *R. prolixus*. Jaburetox 2Ec and JBU cause an increase of the frequency of crop contractions stimulated with serotonin. In the hindgut, JBU increases the frequency and amplitude of contractions, and alters the muscle basal tonus. In the dorsal vessel, no significant alterations were observed. Using microscopy, we also evaluated the effect of JBU feeding in the release of serotonin, a hormone involved in several physiological processes. There is no alteration in the release of this hormone from nervous system cells, as well as in tissues regulated by serotonin. All these data indicate that JBU and its derived peptide cause major alterations of post feeding physiological process in *R. prolixus* that contribute to, or can be the cause of the entomotoxic effect.

The release of entomotoxic fragment(s) from plant ureases and their mechanism of action are complex processes. Here, we were successful in characterizing several steps of these processes, clarifying crucial points and providing leads for future work in this field.

1. Introdução

1.1 - Ureases Vegetais – a Canatoxina

As sementes de *Canavalia ensiformis* (Fabaceae), conhecida vulgarmente como “feijão de porco”, são fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como a urease (“Jack bean urease” - JBU) e a lectina concanavalina-A (Sumner e Howell, 1936). Em 1981, Carlini e Guimarães isolaram uma nova proteína tóxica, distinta da concanavalina-A, denominada de canatoxina (CNTX). Esta proteína contém zinco e níquel, e apresenta grande homologia com a seqüência primária da JBU, presente na mesma semente, tratando-se de uma forma variante dessa enzima. A CNTX apresenta uma massa molecular de 184 kDa quando analisada por gel-filtração em pH 7,5. Em SDS-PAGE, em meio redutor ou não, seu peso molecular é de 95 kDa, sugerindo que a forma nativa da proteína é provavelmente um dímero (Follmer *et al.*, 2001; Follmer *et al.*, 2002).

Em camundongos e ratos, a CNTX induz, quando injetada por via intraperitoneal, bradicardia, hipertensão e hipotermia, que precedem convulsões características de sua ação tóxica e a morte dos animais (Carlini *et al.*, 1984). Nenhum efeito é observado quando a toxina é administrada por via oral. *In vitro*, a CNTX tem efeito secretagogo em diferentes sistemas celulares isolados, induzindo secreção e agregação plaquetária (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a), liberação de histamina em mastócitos (Grassi-Kassisse e Ribeiro-DaSilva, 1992) e secreção de insulina em ilhotas pancreáticas (Barja-Fidalgo *et al.*, 1991b). A maioria dos efeitos, *in vivo* e *in vitro*, da CNTX envolvem a ativação do metabolismo do ácido araquidônico, principalmente pela rota das lipoxigenases (Oliveira-Severo *et al.*, 2006).

Um papel fisiológico da CNTX na planta foi proposto com base na evidência de que proteínas CNTX-like (ou seja, imunoreativas contra anticorpos anti-CNTX) são altamente conservadas em leguminosas (Carlini *et al.*, 1988). Observa-se também que o conteúdo de CNTX aumenta progressivamente durante a maturação

de sementes de *Canavalia*, atingindo os níveis máximos na semente madura (Barcellos *et al.*, 1993). Oliveira *et al.*, 1999, observaram que a CNTX apresenta efeitos fungicidas e fungiestáticos, inibindo o crescimento de hifas em vários fungos filamentosos. Estes dados nos levam a acreditar que esta proteína desempenhe um papel de defesa da planta contra fitopatógenos. Em sendo a CNTX uma isoforma de urease, vale ressaltar que, apesar de intensamente estudada, não se conhece até hoje o papel fisiológico das ureases em vegetais (Pollaco e Holland, 1993; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002). JBU e CNTX compartilham várias atividades biológicas, sendo a maior parte delas independente da atividade enzimática (Follmer *et al.*, 2001 e 2004a).

1.2 - Insetos como Modelo

Em outra abordagem experimental, a CNTX foi testada em diferentes espécies de insetos, revelando atividade entomocida. Estes testes também mostraram uma relação entre as enzimas digestivas dos insetos e a toxicidade da CNTX (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Os insetos testados foram:

<i>Schistocerca americana</i>	(Orthoptera, Acrididae)	} Enzimas digestivas tipo tripsina - Insetos Não Susceptíveis
<i>Drosophila melanogaster</i>	(Diptera, Drosophilidae)	
<i>Aedes aegypti</i>	(Diptera, Culicidae)	
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	(Lepidoptera, Noctuidae)	
<i>Manduca sexta</i>	(Lepidoptera, Sphingidae)	
<i>Callosobruchus maculatus</i>	(Coleoptera, Chrysomelidae)	} Enzimas digestivas tipo catepsinas - Insetos Susceptíveis
<i>Rhodnius prolixus</i>	(Hemiptera, Reduviidae)	
<i>Nezara viridula</i>	(Hemiptera, Pentatomidae)	

A hipótese de que a CNTX pudesse agir como um inibidor das enzimas digestivas dos insetos susceptíveis foi testada por Gombarovits (1999), que mostrou

que a CNTX não apresenta atividade inibitória sobre as atividades azocaseinolítica e hemoglobinolítica de homogeneizados de larvas de *C. maculatus* (caruncho de feijão) e *R. prolixus* (barbeiro), quer em pH 3,5 como 5,6, que são os pH ótimos de suas principais proteinases (Silva e Xavier-Filho, 1991).

A outra hipótese levantada foi a de que a CNTX poderia ser ativada proteoliticamente pelas enzimas digestivas dos insetos, sendo o efeito tóxico decorrente da formação de peptídeo(s) inseticida(s). Estudos com o hemíptero *R. prolixus* mostraram que, quando estes insetos eram alimentados com a CNTX juntamente com pepstatina-A, inibidor de aspártico-proteinases, e/ou E-64, inibidor de cisteino-proteinases, a taxa de sobrevivência dos insetos era significativamente aumentada (Ferreira-DaSilva, 1998; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Estes dados indicam que a ativação da CNTX envolve hidrólise por enzimas acídicas, tipo catepsina D e B. Em ensaios realizados com *M. sexta* (lagarta do tabaco) e *S. americana* (gafanhoto), não foram encontrados fragmentos de CNTX nas fezes destes insetos, indicando que a toxina havia sido completamente digerida. Isto leva a crer que enzimas de caráter básico destroem a toxina, sem formar peptídeos inseticidas, justificando a ausência de efeitos da CNTX nesses insetos. Um fato interessante é que somente ninfas, mas não adultos de *R. prolixus* são sensíveis a CNTX, sugerindo um processamento diferenciado da toxina nos diferentes estágios de vida do inseto (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000).

Um dos peptídeos entomotóxicos derivado da hidrólise *in vitro* da CNTX por enzimas de *C. maculatus* foi isolado e caracterizado (Carlini *et al.*, 2000). Esse peptídeo, chamado Pepcanatox, é um fragmento de aproximadamente 10 kDa, tóxico por via oral para ninfas e por injetada para adultos de *R. prolixus* (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Posteriormente, um peptídeo recombinante equivalente ao Pepcanatox foi obtido através de expressão recombinante em *Escherichia coli* (Mulinari *et al.*, 2004 e 2007). A sequência de aminoácidos desse peptídeo é apresentada na figura 1. Jaburetox possui 93 aminoácidos correspondentes ao peptídeo entomotóxico, mais o epitopo V-5 e a cauda de polihistidina, totalizando 125 aminoácidos.

M	G	P	V	N	E	A	N	C	K	A	A	M	E	I	V	C	R	R	E	20
F	G	H	K	E	E	E	D	A	S	E	G	V	T	T	G	D	P	D	C	40
P	F	T	K	A	I	P	R	E	E	Y	A	N	K	Y	G	P	T	I	G	60
D	K	I	R	L	G	D	T	D	L	I	A	E	I	E	K	D	F	A	L	80
Y	G	D	E	S	V	F	G	G	G	K	V	I	k	g	e	l	n	s	k	100
l	e	g	k	p	i	p	n	p	l	l	g	l	d	s	t	r	t	g	h	120
h	h	h	h	h																125

Figura 1: Sequência de Jaburetox 2Ec. Em letras maiúsculas, a sequência de aminoácidos correspondentes ao peptídeo entomotóxico. Em letras minúsculas, o epítipo V-5 e a cauda de polihistidina (Mulinari *et al.*, 2007).

1.2.1 - *Callosobruchus maculatus*

O coleóptero *C. maculatus* é uma das principais pragas da cultura do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), atacando a semente tanto no campo quanto durante o armazenamento, afetando severamente a qualidade do produto. Além disso, é capaz de preda outras 13 espécies de leguminosas, no Brasil e no norte da África. No entanto, o *C. maculatus* não é capaz de preda outros feijões, como, por exemplo, *Phaseolus vulgaris* (feijão preto), devido principalmente à presença na semente de grande quantidade de inibidores de enzimas (proteases e α -amilases) (Xavier-Filho *et al.*, 1989; Ishimoto e Kitamura, 1989). As larvas do *C. maculatus* possuem um sistema digestório baseado em proteinases do tipo cisteínicas e aspárticas, além de α -amilases e α -glicosidases, sendo que as principais enzimas proteolíticas são do tipo cisteíno-proteinases (Silva e Xavier-Filho, 1991; Silva *et al.*, 1999).

Este inseto mostrou-se sensível aos efeitos da CNTX (Carlini *et al.*, 1997), tornando-se um dos principais modelos utilizados em estudos com esta proteína.

1.2.2 - *Dysdercus peruvianus*

D. peruvianus Guérin-Ménéville (Hemiptera: Pyrrhocoridae) é um inseto praga da cultura de algodão, conhecido vulgarmente como percevejo manchador do algodoeiro. Este inseto causa danos como a queda ou mau desenvolvimento das maçãs do algodão, manchas nas fibras, introdução de fungos e bactérias, levando a perdas totais da cultura do algodão (Gallo *et al.*, 1988).

Silva e Terra, 1994 mostram a presença de cisteíno-proteinases no trato digestivo destes insetos, o que nos sugeriu que este inseto fosse susceptível aos efeitos da CNTX. Para os estudos com este modelo, foi necessário desenvolver uma nova metodologia para alimentação que permitisse a introdução de substância-teste em sua dieta (Stanisçuaski, 2002). Em se tratando de uma proteína, a ingestão é a maneira mais eficiente de administrá-la aos insetos, que apresentam uma cutícula impermeável de quitina, impossibilitando aplicações tópicas de uma macromolécula hidrofílica. Ninfas desse inseto mostraram-se susceptíveis à CNTX, à JBU e à SBU (“Soybean Urease”), urease presente nas sementes de soja (Follmer *et al.*, 2004). Juntamente com *C. maculatus*, este inseto tornou-se um dos principais modelos utilizado atualmente em nosso laboratório.

1.2.3 – Triatomíneos *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*

R. prolixus Stal 1859 (Hemiptera: Reduviidae), é uma espécie que tem sido largamente estudada, principalmente pela sua importância na saúde pública, mas também pelo fato de ter se tornado um inseto modelo para o estudo de fisiologia, devido as suas características peculiares (Wigglesworth, 1972). O seu ciclo evolutivo apresenta cinco estágios de larva e um de imago, em período de 4 a 5 meses. Este inseto é capaz de sugar, em poucos minutos, até 12 vezes seu próprio peso em sangue. A ecdise nas ninfas e a ovoposição nos adultos, estão relacionadas com o ciclo da alimentação (Wigglesworth, 1972). A intensa postura de ovos pelas fêmeas adultas e a facilidade em aceitar alimentação artificial facilitam a manutenção de uma colônia destes hemípteros, assim como a manipulação dos componentes da sua dieta no laboratório (Azambuja e Garcia, 1995). Estudos prévios mostraram que este

inseto é sensível à CNTX (Carlini *et al.*, 1997, Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000), sendo um importante modelo para o entendimento do mecanismo de ação das ureases em insetos.

T. infestans (Hemiptera: Reduviidae) é o principal vetor da Doença de Chagas na América do Sul e é amplamente usado como modelo experimental em estudos fisiológicos (Villar *et al.*, 1994).

1.2.4 – Os Sistemas Digestório e Excretório

O trato digestivo e excretório dos insetos, com algumas variações, é composto por intestino anterior, médio e posterior (Fig. 2 – Daly *et al.*, 1998). No intestino anterior, existe o estômago (“crop”), que serve como órgão de armazenagem. O intestino médio é o principal órgão de digestão e absorção de nutrientes. O intestino posterior e os túbulos de Malpighi são órgãos de reabsorção e de excreção (Terra, 1988).

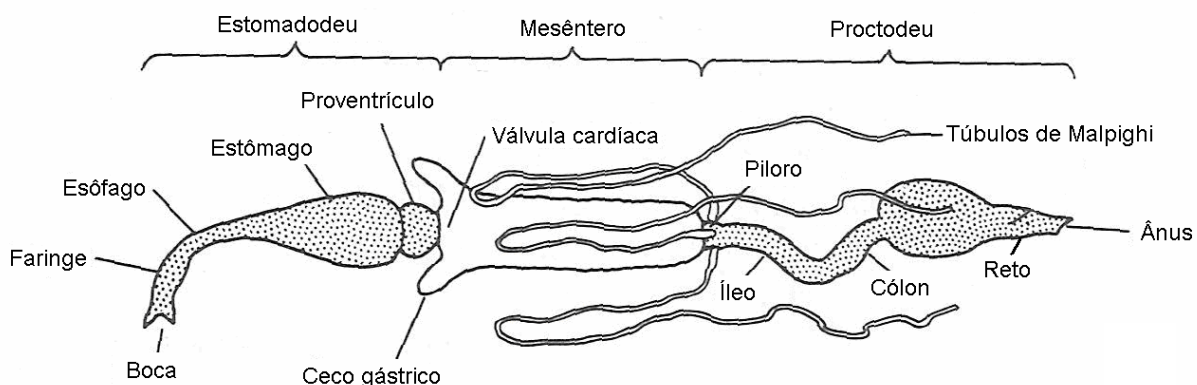


Figura 2: esquema geral do trato digestório e excretório de insetos (Retirado de “Introduction to Insect Biology and Diversity” - Daly *et al.*, 1998).

Padrões complexos de enzimas digestivas estão presentes no intestino médios dos insetos, e a composição desse complexo enzimático é diferenciado entre as ordens dos insetos (Terra, 1988). De interesse para o presente trabalho, são as enzimas do tipo catepsina das classes cisteíno e aspártico proteases encontradas

em insetos das ordens Coleoptera e Hemiptera (Cristofolletti *et al.*, 2005) e as enzimas da classe serino protease (tipo tripsina), encontradas em Lepidoptera (Oliveira *et al.*, 2005).

A excreção em insetos acontece pela ação dos túbulos de Malpighi e do intestino posterior. ATPases e metabolismo de eicosanóides estão envolvidos no controle da secreção de fluídos e equilíbrio de eletrólitos em túbulos de Malpighi em alguns insetos e outros artrópodes (Petzel, 1993 e Stanley-Samuelson, 1994). Estudos prévios do grupo mostraram que a CNTX desacopla o transporte de Ca^{+2} pela $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ ATPase em vesículas do retículo sarcoplasmático (Alves *et al.*, 1992). De forma interessante, um dos efeitos vistos em *R. prolixus* alimentado com CNTX é uma perda de peso mais lenta após a alimentação, sugerindo um prejuízo na secreção de água e de eletrólitos (Carlini *et al.*, 1997).

Insetos hematófagos, como *R. prolixus*, ingerem refeições de sangue equivalentes a até 10 - 12 vezes seu peso inicial. A rápida diurese nestes insetos é um processo fundamental, responsável pela eliminação de 40% do peso da refeição de sangue (Te Brugge *et al.*, 2002) em um período curto de tempo, de modo a permitir que o inseto se afaste do local da alimentação e diminuindo o risco de predação. O sistema secretório de insetos inclui os túbulos de Malpighi e o intestino posterior (“hindgut”), ambos sob controle neuroendócrino. Hormônios diuréticos são liberados em resposta à alimentação e estimulam a produção de urina primária (Coast, 1996). A formação de urina primária pelo túbulos de Malpighi é regulada através de dois hormônios: um peptídeo diurético (“Diuretic Hormone” - DH) e serotonina (5HT), ambos liberados a partir de nervos abdominais originados no gânglio mesotorácico (Maddrell *et al.*, 1993). Tanto DH como 5HT utilizam AMPc como segundo mensageiro (Aston, 1975). A alimentação também é um estímulo para a liberação de hormônios antidiuréticos (Coast, 1996). Fatores antidiuréticos normalmente reduzem a perda de fluídos, estimulando a reabsorção pelo intestino posterior (Spring *et al.*, 1990). Porém, alguns hormônios antidiuréticos do *corpora cardiaca* inibem a secreção de fluídos pelo túbulos de Malpighi, mas não têm nenhum efeito no intestino posterior (Spring *et al.*, 1988; Paluzzi e Orchard, 2006).

Outras substâncias também agem como fatores antidiuréticos em túbulos de Malpighi. GMPc inibe a formação de urina primária pelos túbulos de Malpighi superiores de *R. prolixus* (Quinlan *et al.*, 1998), em contraste com o que é visto em túbulos de *Drosophila*, onde tanto AMPc quanto GMPc estimulam secreção (Davies *et al.*, 1995).

Todos estes dados fazem do sistema de excreção de insetos um potencial alvo dos estudos do mecanismo de ação da CNTX/JBU e seus peptídeos derivados. Usando *R. prolixus* como modelo, é possível ter algumas pistas interessantes sobre o mecanismo pelo qual as ureases e peptídeos derivados influenciam a diurese em insetos.

1.2.5 – O Sistema Nervoso

Várias substâncias atuam no sistema nervoso dos insetos, como transmissores. As mais estudadas são a serotonina (Miggiani *et al.*, 1999), o óxido nítrico (Villar *et al.*, 1994) e a família de peptídeos FMRFamida (Hill and Orchard, 2003, Settembrini *et al.*, 2005). Um esquema do sistema nervoso de *R. prolixus* é apresentado na figura 3.

A serotonina tem importantes funções no SNC dos insetos, atuando como neurotransmissor convencional ou como modulador de funções integradas. Também atua em órgãos periféricos como coração, glândulas salivares, músculos bucais, túbulos de Malpighi e cutícula (Settembrini e Villar, 2004).

FMRFamida são peptídeos pertencentes a uma família encontrada no sistema nervoso, central e periférico, com funções estimulatórias na contração muscular, principalmente do coração e vísceras (Greenberg e Price, 1992).

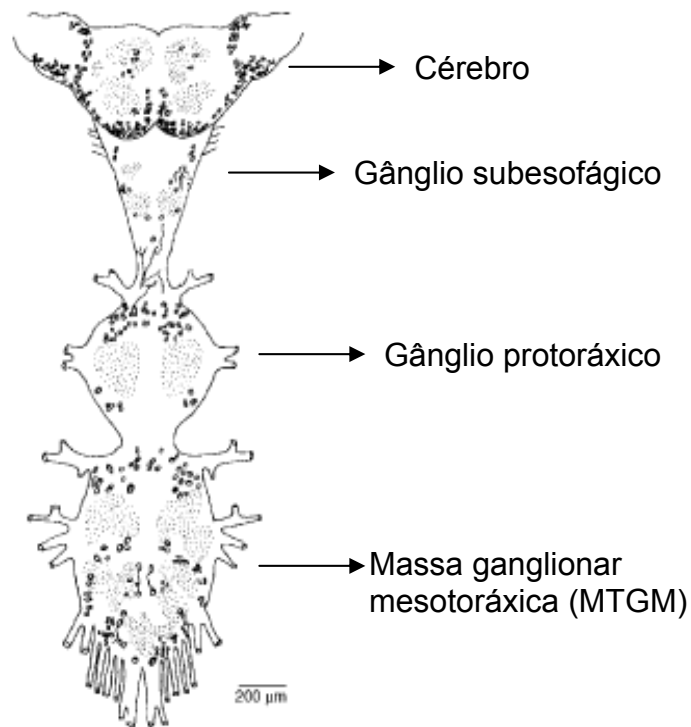


Figura 3: Esquema do sistema nervoso de *R. prolixus*, adaptado de Kwok *et al.*, 2005.

O óxido nítrico é um neurotransmissor difusível no cérebro, que leva a formação de GMPc nas células alvo. Participa de muitos processos, como: olfato, visão, desenvolvimento, sensor de oxigênio, associado a locomoção, formação de memória. Também está associado às glândulas salivares.

Dados anteriores revelam que insetos tratados com a urease apresentam vários processos com controle neurohormonal afetados (Carlini *et al.*, 1997, Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Isso pode significar que as ureases e/ou o peptídeo Jaburetox 2Ec podem estar competindo com neurotransmissores ou alterando a transdução de sinal envolvida, causando um prejuízo em processos mediados pelos mesmos.

2. Objetivos

A atividade entomotóxica das ureases de *Canavalia ensiformis*, assim como de peptídeos derivados, é de interesse biotecnológico, uma vez que essas proteínas/peptídeos tem grande potencial para uso em controle biológico de insetos. Com isso, tornou-se importante aumentar o conhecimento a respeito da ação desses compostos em insetos.

Os objetivos gerais dessa tese são:

- Aumentar a gama de insetos (e estágios de vida) testados com CNTX, JBU e Jaburetox 2Ec;
- Estudar o processamento das ureases vegetais em insetos, caracterizando as enzimas responsáveis pela liberação do(s) peptídeo(s) tóxico(s);
- Estudar o mecanismo de ação das ureases e seus peptídeos derivados em um inseto modelo, *R. prolixus*.

2.1 - Objetivos específicos:

- Atividade Inseticida:
 - Testar o efeito de JBU/CNTX/Jaburetox 2Ec em diferentes estágios de *D. peruvianus*, *R. prolixus* e *T. infestans*.
- Processamento das ureases:
 - Avaliar as diferenças entre ninfas e adultos de insetos que possam explicar porque a susceptibilidade às ureases depende do estágio.
 - Isolar e caracterizar as enzimas digestivas de *C. maculatus* envolvidas no processamento das ureases de *C. ensiformis*.
- Mecanismo de ação das ureases e peptídeos derivados:
 - Estudar a atividade antidiurética das ureases/peptídeos na secreção de fluídos por túbulos de Malpighi isolados.
 - Avaliar o conteúdo de AMPc/GMPc em túbulos de Malpighi na presença de ureases/peptídeos.

- Estudar o efeito de ureases/peptídeos em tecidos musculares de insetos, através da avaliação do tônus basal e frequência e amplitude de contrações.
- Avaliar a influência da alimentação com ureases na liberação de hormônios diuréticos no sistema nervoso central e também nos diferentes tecidos alvo desses hormônios.

3. Materiais e Métodos

3.1 - Ureases e peptídeos derivados

CNTX e JBU foram isoladas das sementes de *Canavalia ensiformis* de acordo com Carlini e Guimarães (1981) e modificações introduzidas por Follmer *et al.* (2001 e 2004a). A concentração protéica foi estimada pela absorvância a 280 nm (A280) e/ou pelo método de Bradford (1976). Alternativamente, JBU foi obtida de fonte comercial (Tipo III da Sigma).

O peptídeo Jaburetox 2Ec foi obtido através da expressão heteróloga em *E. coli*, segundo Mulinari *et al.*, 2007.

3.2 - Insetos e Bioensaios

3.2.1 - *Callosobruchus maculatus*: Os insetos foram provenientes de uma colônia estabelecida no laboratório, a partir de insetos cedidos pelo Dr. J. Xavier Filho (Universidade Estadual do Norte Fluminense) e pela Dra. Ilka Vasconcelos (Universidade Federal do Ceará). A colônia é mantida em sementes de *Vigna unguiculata*, a 28°C, umidade relativa de 70%. A retirada das larvas de *C. maculatus* é feita entre 18 e 20 dias de desenvolvimento. Cinquenta larvas são colocadas em 0,5 mL de tampão acetato de sódio 30 mM, pH 5,6 e armazenadas a – 20° C até o uso.

3.2.2 - *Dysdercus peruvianus*: A colônia de *D. peruvianus* foi estabelecida a partir de insetos cedidos pelo Dr. Carlos Peres da Silva (Universidade Estadual do Norte Fluminense). A criação é feita em sala climatizada, com temperatura mantida entre 22-25°C (Milano *et al.*, 1999) e umidade relativa de 75%, com um fotoperíodo de 16:8 h (Claro: Escuro). Os insetos são mantidos em frascos de tereflato de polietileno, fechados com tela de tecido serigráfico e com uma camada de areia autoclavada no fundo. Os insetos têm livre acesso a água, mantida em bebedouros de plástico, e são alimentados com sementes lintadas de algodão (*Gossypium*

hirsutum). Estas sementes são mantidas dentro dos frascos durante o período de reprodução e postura, até o primeiro estágio de ninfa. Após este período, as sementes são colocadas sob o tecido que fecha os frascos, para evitar contato com as fezes dos insetos.

O ensaio de toxicidade para este inseto é realizado segundo Stanisçuaski (2002). Resumidamente, os cotilédones são retirados das sementes de algodão e moídos em um moinho. A essa farinha é adicionada uma solução da substância a ser testada (JBU/CNTX/Jaburetox 2Ec) nas concentrações indicadas nos resultados, ou o volume equivalente de tampão de diálise (controle). Essa mistura é então liofilizada e utilizada para o preenchimento de cápsulas de gelatina que são oferecidas aos grupos de insetos (ninfas ou adultos). A sobrevivência é acompanhada diariamente até que o conteúdo das cápsulas seja totalmente consumido.

3.2.3 - *Rhodnius prolixus*: Os insetos utilizados nos experimentos realizados no Brasil foram cedidos por Dr. Hatisaburo Masuda e Dr. Pedro L. Oliveira, vindos de uma colônia mantida na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os ensaios realizados durante o estágio sanduíche foram realizados com insetos originados de colônia do Departamento de Biologia na Universidade de Toronto. Os insetos, em ambas colônias, são mantidos em condições controladas (25°C, umidade relativa de 70-80% e fotoperíodo de 12h:12h claro:escuro) e alimentados em coelhos.

O ensaio de toxicidade para este inseto é realizado segundo Ferreira *et al.* (2000). Resumidamente, ninfas de diferentes estádios (6-7 semanas de jejum) são alimentadas com solução salina de *R. prolixus* (Lane *et al.*, 1975) contendo a proteína a ser testada (dose de 2 µg/mg do inseto) e 1 mM de ATP, em sistema aquecido (37°C). Os insetos alimentam-se por quinze minutos e a sobrevivência é acompanhada diariamente.

Alternativamente, ninfas de quarto estágio foram injetadas (seringa Hamilton) na hemocele com 3-5 µL de solução contendo Jaburetox 2Ec na concentração de 0,03 µg/mg do inseto ou com o mesmo volume de solução salina (controle).

3.2.4 - *Triatoma infestans*: Os ensaios com este inseto foram realizados na Universidad Austral, Buenos Aires. Os insetos são provenientes do Centro de

Controle da Doença de Chagas, em Córdoba, e mantidos em condições controladas (27°C, umidade relativa de 70-80% e fotoperíodo de 12:12h claro:escuro).

O ensaio de toxicidade para este inseto foi realizado através de injeção de Jaburetox 2Ec na hemocele de ninfas de quinto estágio ou adultos, na dose de 0,1 µg/mg do inseto. Um grupo controle é injetado com o mesmo volume de tampão.

3.3 - Preparação do homogeneizado de larvas de *C. maculatus* e de intestinos de *D. peruvianus*

Para o preparo do homogeneizado de *C. maculatus*, 1000 larvas foram homogeneizadas em micro Potter manual de vidro, em banho de gelo, em tampão formiato de amônio pH 5,6, em um volume para que obtivessemos a concentração final de 100 larvas por mL. O material foi então centrifugado a 5000 g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em algodão embebido com tampão e este material foi aliquoteado e armazenado a – 20°C até os ensaios.

Para o homogeneizado de intestinos de *D. peruvianus*, ninfas de 4^o estágio e adultos machos foram dissecados (50 intestinos/mL) em microscópio estereoscópico e todo o trato digestivo foi isolado e homogeneizado em micro Potter manual de vidro, em banho de gelo, tampão formiato de amônio pH 5,6. O material foi então centrifugado a 4500 rpm por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado, aliquoteado e armazenado a – 20°C até os ensaios.

3.4 - Atividade proteolítica sobre azocaseína

A atividade proteolítica dos homogeneizados foi verificada pela hidrólise de azocaseína (0.2%), a 37°C por 3 horas. O volume da reação era de 300 µL. A reação era interrompida adicionando-se TCA 10%, sendo as frações centrifugadas por 5 minutos a 16.000 g. A 250 µL do sobrenadante adicionou-se 250 µL de NaOH 2N. Os azo-peptídeos solúveis foram medidos através da absorbância em 420nm. Uma

unidade (U) de atividade corresponde à quantidade de enzima que produz leitura de 1 A420 por hora, nas condições descritas acima (Carlini *et al.*, 1997).

3.5 - Atividade proteolítica sobre hemoglobina

A atividade proteolítica de ambos homogeneizados também foi verificada pela ação enzimática sobre hemoglobina bovina (0,2%) a 37°C por 3 horas. O volume da reação era de 300 µL. A reação foi interrompida pela adição de TCA 10%, sendo as frações centrifugadas por 5 minutos a 16.000 g. A 250 µL do sobrenadante adicionou-se 250 µL de NaOH 2N e os peptídeos liberados foram medidos através da absorbância em 280nm. Uma unidade (U) de atividade corresponde à quantidade de enzima que produz leitura de 100 A280 por hora, nas condições descritas acima (Carlini *et al.*, 1997).

3.6 – Atividade sobre substratos sintéticos

A atividade dos homogeneizados sobre os substratos sintéticos equivalentes aos possíveis sítios de clivagem N e C-terminal do peptídeo entomotóxico a partir das ureases foi realizada. O volume da reação era de 100 µL. Os substratos sintéticos são Abz-NAIADGPVQ-EDDnp (N-terminal) e Abz-KVIRDGMGQ-EDDnp (C-terminal). O ensaio foi realizado em fluorímetro (excitação em 320 nm e emissão em 430 nm), pH 5,6 a 37°C por uma hora.

3.7 – Proteínas, proteases e inibidores

Albumina sérica bovina (BSA), catepsinas B e D e tripsina foram obtidos da Sigma. Tireoglobulina foi obtida do kit de peso molecular para cromatografia da Amersham. Pepstatina-A, inibidor de proteinases aspárticas, E-64 (L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino-(4-guanidino)-butane), inibidor de proteinases cisteínicas,

EDTA (ácido etilenodiamino-tetraacético), inibidor de metaloenzimas e PMSF, inibidor de proteinases serínicas, foram obtidos da Sigma. As concentrações finais utilizadas estão indicadas nos resultados.

3.8 - Cromatografia por gel-filtração em Sephacryl S-200HR

Uma alíquota de 2 mL do homogeneizado de *C. maculatus* foi aplicada em coluna Sephacryl S-200 HR (1,7 x 93 cm), equilibrada em 30mM de formiato de amônio, pH 5,6. Frações de 3,0 mL foram coletadas em um fluxo de 0,22 mL/min, sob pressão hidrostática de 100 cm. A concentração de proteínas das frações foi estimada por meio da absorbância em 280nm. As frações de cada pico foram ensaiadas para atividade proteolítica, reunidas e armazenadas a 4°C.

3.9 - Eletroforese em SDS-PAGE

Eletroforeses em gel de poliacrilamida (10%, 12% ou gradiente de 8-20%) foram realizadas utilizando o método de Laemmli, 1970. Os géis foram corados por 0,3% de Coomassie Brilliant Blue R ou pelo método de coloração com Prata (Blum *et al.*, 1987).

3.10 - Hidrólise *in vitro* das ureases

A hidrólise das ureases com homogeneizados, enzimas semi-purificadas e enzimas padrão foi realizada em dois níveis enzimáticos: 0,5 mU azocaseinolítica ou 1,5 mU hemoglobinolítica por micrograma de proteína, sendo uma mU definida como a quantidade de enzima necessária para gerar uma leitura de 0,001 A420 em 1 hora a 37°C para azocaseína e 0,1 A280 por hora para hemoglobina. As enzimas foram adicionadas à amostra de CNTX/JBU em duas etapas (0 e 16h), cada qual correspondente à metade do volume final desejado. A incubação por 24 horas foi feita sob agitação, a 37°C. A digestão foi interrompida por congelamento das

amostras, seguida de liofilização. A hidrólise foi analisada por cromatografia de gel-filtração e/ou western blot.

3.11 - Análise por cromatografia em Superdex 75 (FPLC)

As frações da hidrólise *in vitro* de JBU foram analisadas quanto a sua composição através de gel filtração em Superdex 75 em sistema de FPLC, equilibrada em tampão NaPB 50 mM pH 7,0, O monitoramento foi feito através da absorbância em 280 nm.

3.12 - Western Blots

A transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE para a membrana de PVDF 0,2 μm , foi feita por capilaridade, na presença do tampão de corrida e metanol 20%, por 16 horas. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado por 5 horas, em seguida incubada com anticorpo anti-Jaburetox 2Ec desenvolvido em coelho, com diluição de 1:25.000 em TTBS (0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 com 0,05% de Tween 20 e 1,5% de Leite Desnatado) por 16 h. Após, a membrana foi lavada com TTBS (4x) e incubada com anti-IgG de coelho, conjugado com fosfatase alcalina. A membrana foi lavada novamente e revelada para atividade fosfatásica em uma solução de NBT 0,03%, BCIP 0,015%, diluídos em tampão Tris HCl 10 mM, pH 9,6; NaCl 100 mM, MgCl 5 mM.

3.13 - Salina para *Rhodnius prolixus*

A salina para *R. prolixus* é preparada segundo Lane *et al*, 1975: NaCl 150 mM, KCl 8,6 mM, CaCl_2 2.0 mM, MgCl_2 8,5 mM, NaHCO_3 4.0 mM, glicose 34.0 mM e HEPES 5,0 mM. O pH é ajustado para 7,0.

Para a salina sem Ca^{+2} , é aumentada a concentração de MgCl_2 para 13 mM.

Para a salina com diferentes concentrações de potássio, a concentração de NaCl foi variada proporcionalmente, para a manutenção da osmolaridade.

3.14 - Medida de secreção de fluídos - Ensaio de Ramsay modificado

O ensaio de Ramsay (1954) foi modificado da maneira descrita abaixo. Um par de túbulos de Malpighi são dissecados e colocados em uma gota de salina (20 μL) em uma placa de Petri preenchida com óleo mineral hidratado. Em seguida, as extremidades dos túbulos inferiores são amarradas em alfinetes externos a gota e a salina é trocada por 10 μL de salina e 10 μL de serotonina na concentração indicada no ensaio. Os túbulos permanecem nessa solução por 20 min e a gota secretada no óleo mineral é medida usando um micrometro acoplado a lupa. Os túbulos são então lavados (3x com 20 μL de salina) e incubados com a urease ou Jaburetox 2Ec (pelo tempo e na concentração indicados no ensaio). Após 20 minutos, a gota secretada é medida. Os túbulos são então novamente lavados com 20 μL de salina (5x) para retirada da JBU/Jaburetox 2Ec e são adicionados 20 μL de serotonina 10^{-6}M para verificação da viabilidade e secreção máxima dos túbulos. A taxa de secreção na presença de JBU/Jaburetox 2Ec é expressa como porcentagem em relação ao controle (serotonina e salina). Para cada ensaio foram feitas 8-10 repetições.

3.15 – Radioimunoensaio (RIA) para quantificação de cAMP e cGMP

Para determinar se JBU/Jaburetox 2Ec teriam algum efeito na produção de AMPc e GMPc, dois pares de túbulos (do mesmo inseto) foram dissecados em salina. Os túbulos são então transferidos para microtubos, contendo salina. Em seguida, são adicionadas as substâncias a serem testadas (JBU/Jaburetox 2Ec na presença ou não de serotonina), seguido de 1 min de incubação a temperatura ambiente. Após a incubação, são adicionados 250 μL de acetato de sódio 1 M fervendo. As amostras são então fervidas por 5 minutos e congeladas por 18 h.

As amostras são descongeladas, sonicadas, centrifugadas (10 min a 8800 g). O precipitado é armazenado para posterior quantificação de proteínas (Bradford) e o sobrenadante é usado para os radioimunoensaios, com o kit de RIA para AMPc/GMPc (Perkin-Elmer). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do kit, com pequenas mudanças em relação ao volume e proporção dos reagentes (Paluzzi e Orchard, 2006).

3.16 – Medidas do potencial transepitelial (PTE)

O potencial transepitelial (PTE) foi medido como descrito por Ianowski e O'Donnell (2001) com algumas modificações. Um segmento do túbulo de Malpighi foi isolado em uma gota de 100 μ L de salina, coberta com óleo mineral. A extremidade cortada do túbulo foi presa fora da gota de salina, em um alfinete. O túbulo foi então estimulado com serotonina (2.5×10^{-8} M) por 20 min e lavado com salina. Então, o eletrodo de referência foi colocado na gota de salina e o eletrodo sensível a voltagem na gota de secreção no túbulo amarrado ao alfinete. Ambos eletrodos foram preenchidos com KCl 3 M. O túbulo foi novamente estimulado com serotonina (5×10^{-8} M) na presença de JBU/Jaburetox 2Ec/GMPc (nas concentrações indicadas nos resultados) e o PTE foi medido usando o sistema de aquisição de dados Powerlab e o software Chart5 v5.1.

3.17 - Quantificação dos movimentos peristálticos do estômago

Para avaliar o efeito da JBU/Jaburetox 2Ec sobre os movimentos peristálticos do estômago de *R. prolixus*, são utilizados estômagos de insetos de quinto estágio em jejum por 6-7 semanas. O estômago é retirado do inseto e colocado em uma gota de salina (100 μ L) em uma placa de petri com fundo preenchido com silicone. O estômago é preso com alfinetes, de modo a ficar levemente estendido (sem afetar os movimentos peristálticos). Os movimentos peristálticos são medidos em um conversor de impedância (UFI, modelo 2991), no modo AC (corrente alternada). A

solução de salina é trocada a cada cinco minutos por nova salina (controles), serotonina (controle positivo), JBU/Jaburetox 2Ec (teste 1) e urease/Jaburetox 2Ec na presença de serotonina (teste 2). É avaliada a frequência de contrações durante 5 min. Os resultados são expressos como porcentagem em relação a salina (controle).

3.18 - Quantificação de contrações do intestino posterior

A quantificação de contrações do intestino posterior foi feita em conversor de impedância (como o ensaio de estômago descrito anteriormente) e em transdutor de força. O inseto é dissecado dorsalmente, tendo o abdômem aberto e o corpo gorduroso, traquéias, túbulos de Malpighi, intestino anterior e parte do intestino médio retirados. O intestino posterior é mantido preso à cutícula pelo ânus. Para o conversor de impedância, a parte mantida do intestino médio é presa com alfinete e os eletrodos são colocados paralelamente ao intestino posterior. No ensaio com o transdutor de força (Aksjeselskapet Mikro-Elektronikk, Noruega), o intestino posterior é amarrado com fio de tecido e este fio é preso ao gancho do transdutor de força. O transdutor é acoplado ao computador e a aquisição dos dados é feita com o software AcqKnowledge 3.5.3 (Biopac Systems, Inc).

3.19 - Ensaio do vaso dorsal

Ninfas de quinto estágio foram dissecadas ventralmente para remoção dos intestinos anterior e posterior e exposição do vaso dorsal. As contrações do vaso dorsal foram quantificadas com conversor de impedância, como no ensaio do estômago. Os eletrodos foram colocados no penúltimo segmento abdominal, logo acima dos músculos alares.

3.20 – Imunohistoquímica

Ninfas de quinto estágio em jejum por 8 semanas foram alimentadas com salina na presença de 1 mM ATP (com ou sem JBU) por 15 minutos. Os insetos tiveram então a cutícula dorsal aberta (0, 3, 24 h após a alimentação) e foram fixados (paraformaldeído 2%) por 24 h. Após a fixação, os insetos foram dissecados para isolamento do sistema nervoso central, glândulas salivares, intestino anterior e médio e cutícula dorsal. Após dissecação, esses tecidos foram incubados com anticorpo anti-serotonina (1:1000) por 24 h, lavados com salina por 16 h, incubados com anticorpo secundário conjugado com CY3 ou FITC (1:200) por 24h e lavados por 16 h novamente. Após a última lavagem, os tecidos foram montados em lâminas com glicerol (“whole mount”) e analisados em microscópio de epifluorescência ou confocal.

3.21 – Análises estatísticas

Os dados são expressos como média e erro ou desvio padrão (conforme indicação nas legendas). A significância dos resultados foi determinada usando ANOVA de via única. Os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

Parte I

Efeito inseticida das ureases e de Jaburetox 2Ec

4.1.1 – Efeito inseticida da CNTX no inseto manchador da semente de algodão *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae).

Parte dos resultados descritos a seguir fazem parte do artigo “Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)” Stanisçuaski F., Ferreira-DaSilva C.T., Mulinari F, Pires-Alves and Carlini C.R.. *Toxicon* 45 (2005) 753–760,

Cópia do artigo é apresentada como anexo 1.

4.1.2 – Estudos com *Dysdercus peruvianus*

Efeito da CNTX em ninfas e adultos de *D. peruvianus*

Assim como JBU (Follmer *et al.*, 2004b), CNTX mostrou-se altamente tóxica para ninfas de terceiro estágio de *D. peruvianus*, de maneira dose dependente, atingindo 90% de letalidade em 10 dias para a dose de 0,01% p/p (Fig. 4). Ninfas de segundo e quarto estágio foram sensíveis à CNTX da mesma maneira (dados não mostrados).

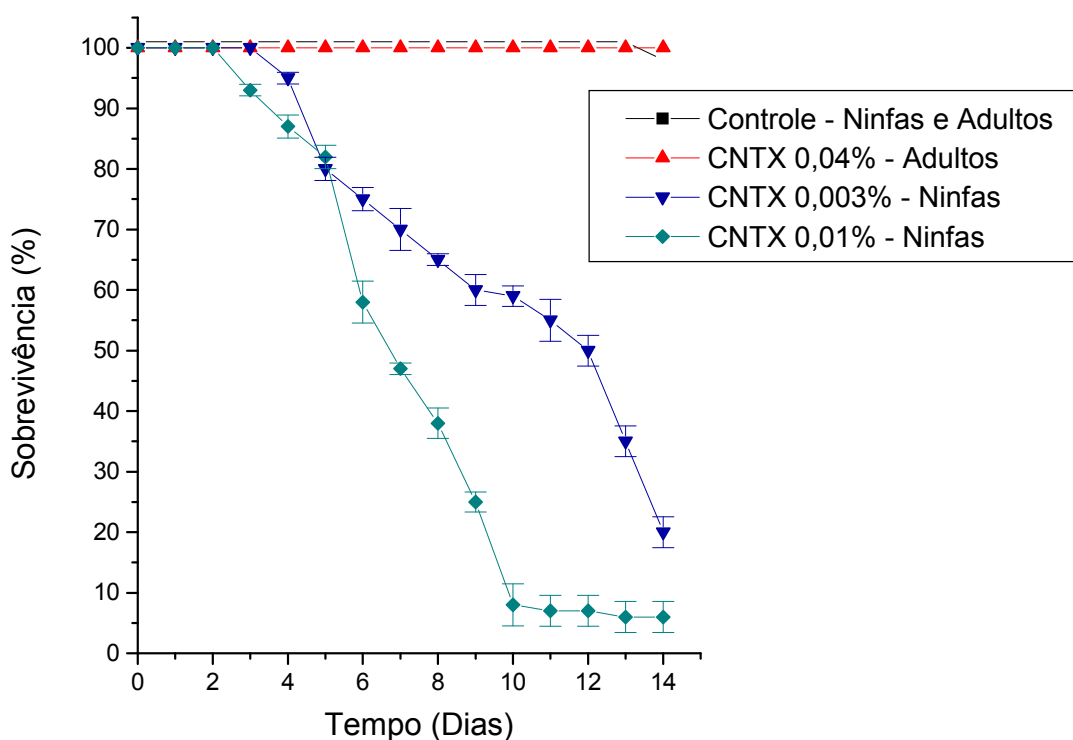


Figura 4: Efeito inseticida da CNTX em *D. peruvianus*. Ninfas (terceiro estágio) e adultos foram alimentados com sementes artificiais contendo CNTX nas concentrações indicadas. A sobrevivência foi acompanhada diariamente. Os dados são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes, com pontos em triplicatas. Resultados publicados em Stanisçuaski *et al.*, 2005, anexo 1.

Em contraste, 100% dos adultos sobreviveram os 14 dias do ensaio (Fig. 4), mesmo tendo sido alimentados com uma dose 4x maior do que a que causou quase 100% de mortalidade das ninfas.

Em estudos prévios, foi verificado que ninfas de terceiro e quarto estágio de *R. prolixus* são susceptíveis à CNTX, também de maneira dose dependente, enquanto adultos desse inseto, mesmo alimentados com altas doses da toxina, não mostraram sinais de intoxicação e nenhuma letalidade foi observada até 10 dias após a alimentação (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Um processamento distinto da toxina pelas ninfas e adultos de *R. prolixus*, resultando em um padrão diferencial de peptídeos coletados na hemolinfa dos insetos, foi previamente observado (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). O processamento das ureases por ninfas e adultos de *D. peruvianus* foi objeto de estudo na segunda parte desta tese.

Efeito de Jaburetox 2Ec em ninfas e adultos de *D. peruvianus*

O peptídeo Jaburetox 2Ec, correspondente à sequência de aminoácidos do peptídeo derivado da CNTX obtido por hidrólise *in vitro* da proteína com enzimas digestivas de *C. maculatus* (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Mulinari *et al.*, 2007), foi testado em ninfas de terceiro estágio e adultos de *D. peruvianus*. Jaburetox 2Ec é altamente tóxico para ninfas, atingindo 100% de letalidade na dose 0,01% p/p (Fig. 5), o que não acontece quando os insetos são alimentados com CNTX (Fig. 4). A mesma dose do peptídeo (0,01% p/p) foi testada em adultos, e nenhum efeito tóxico foi observado (dados não mostrados). Além de apresentarem uma menor sensibilidade, uma outra hipótese que poderia explicar a ausência de efeito nos insetos adultos é a presença do epitopo V5 e da cauda de histidina no C-terminal do peptídeo recombinante. Esses 32 aminoácidos podem exigir uma clivagem pelas enzimas dos insetos para liberação do peptídeo tóxico e, possivelmente, adultos não sejam capazes de realizar esta hidrólise. Outro peptídeo recombinante, equivalente ao Jaburetox 2Ec porém sem as sequências adicionais da cauda e do epitopo, já foi construído e ensaios futuros poderão validar esta hipótese.

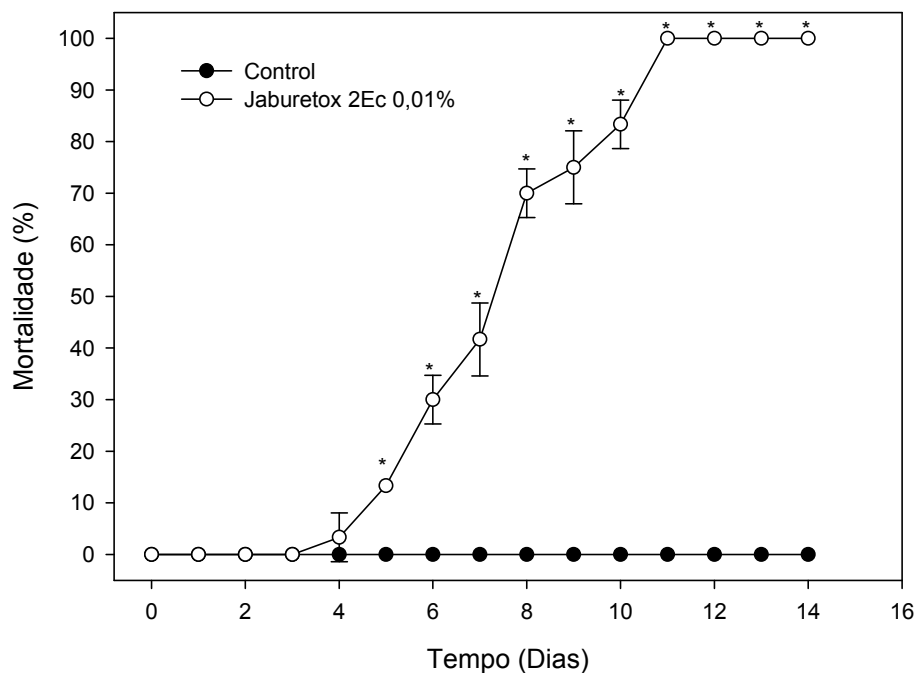


Figura 5: Efeito do peptídeo recombinante derivado da CNTX em *D. peruvianus*. Ninfas de terceiro estágio foram alimentadas com o peptídeo na dose 0,01% p/p e a letalidade acompanhada diariamente. Dados são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes, com pontos em triplicata. * indicam valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,001$). Resultados publicados em Mulinari *et al.*, 2007 (anexo 2).

O fato da CNTX e de Jaburetox 2Ec (nas concentrações testadas) não serem letais para insetos adultos, não deve ser considerado uma limitação ao uso em potencial desses compostos como bioinseticidas. Para várias espécies de insetos, adultos não se alimentam ou possuem hábitos alimentares distintos das ninfas, e não são considerados pragas importantes. A alta susceptibilidade das ninfas as tornam o alvo preferencial, e as concentrações usadas nos ensaios são ótimas para obtenção em plantas transgênicas. Além disso, não é necessário exterminar uma população inteira de insetos para reduzir o dano às culturas agrícolas, sendo o extermínio não desejado uma vez que aumenta a pressão de seleção para pestes resistentes

(Carozzi e Koziel, 1997). Em alguns casos, um atraso de 30% no ciclo de vida do inseto praga é suficiente para permitir que as plantas se desenvolvam e seja feita a colheita (Parra *et al.*, 2002).

4.1.3 – Estudos com *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*

Efeito de JBU em ninfas de *R. prolixus*

Ninfas de *R. prolixus* são susceptíveis à CNTX (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000), mas o efeito de JBU nesses insetos ainda não foi descrito.

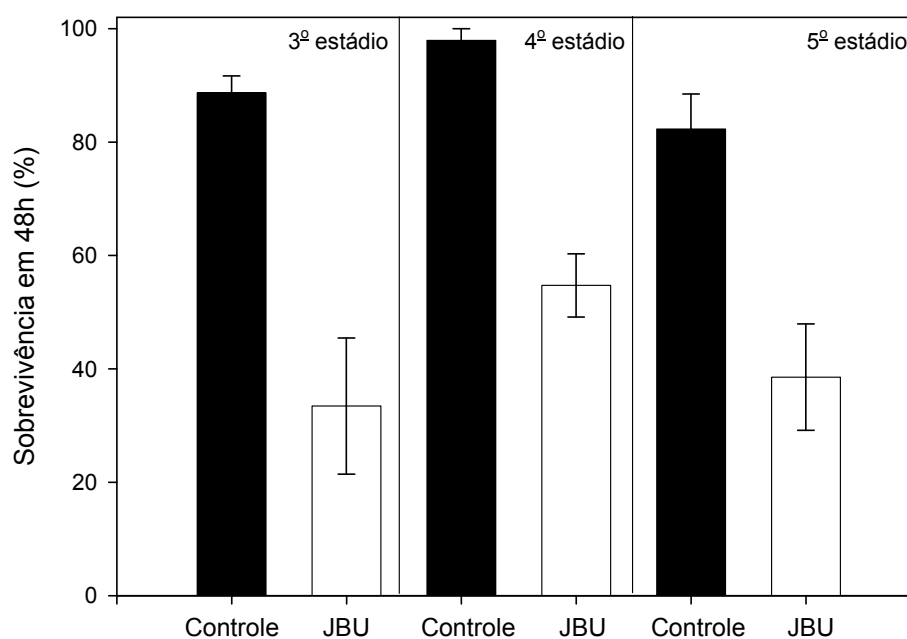


Figura 6: Efeito de JBU em diferentes estádios de *R. prolixus*. Ninfas de terceiro, quarto e quinto estágio foram alimentadas com solução salina (na presença ou não de JBU na dose 2mg/g do inseto), contendo 1 mM de ATP, por 15 min. Resultados são expressos como média e desvio padrão de quatro experimentos independentes, com pontos em quadruplicata.

Ninfas de terceiro, quarto e quinto estágio deste inseto foram alimentadas com solução salina contendo JBU, que mostrou-se tóxica para os três estádios testados, atingindo cerca de 50% de mortalidade em 48h (Fig. 6). Assim como para *D. peruvianus*, adultos de *R. prolixus* não são sensíveis à CNTX (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000) e à JBU (dados não mostrados).

Jbure-I (gene que codifica JBU) e Jbure-II (gene que possivelmente codifique a CNTX) possuem alta similaridade de sequência na região do peptídeo entomotóxico, o que indica que ambas proteínas devem ser clivadas pelas mesmas enzimas para liberarem esse peptídeo. Essas evidências são reforçadas pela toxicidade similar de ambas as proteínas para os diferentes insetos testados.

Efeito de Jaburetox 2Ec em *R. prolixus* e *T. infestans*

O peptídeo recombinante Jaburetox 2Ec foi injetado na hemocele de ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* e também em ninfas de quinto estágio e adultos de *T. infestans*. Como mostrado na tabela 1, 100% das ninfas de *R. prolixus* morreram em 48 h após injeção da dose de 0,03 µg/mg do inseto. Para *T. infestans*, a injeção de 0,1 µg/mg causou 100% de letalidade após 15 e 20 horas para ninfas e adultos, respectivamente.

Tabela 1: Efeito da injeção de Jaburetox 2Ec em *R. prolixus* e *T. infestans*

Inseto	Estágio	N	Dose injetada (µg/mg)	Tempo para 100% de letalidade (h)
<i>R. prolixus</i>	Ninfas 4 ^o estágio	5	0,00	*
		5	0,03	48
<i>T. infestans</i>	Ninfas 5 ^o estágio	5	0,00	*
		5	0,10	15
<i>T. infestans</i>	Adultos	5	0,00	*
		5	0,10	20

* Controles (injetados com solução salina) não apresentaram letalidade significativa durante o tempo acompanhado. Ensaio foram repetidos ao menos três vezes, com resultados similares. Esses dados foram publicados em Tomazetto *et al.*, 2007(anexo 3).

A toxicidade de Jaburetox 2Ec para adultos de *T. infestans*, através de injeção na hemocele, levanta duas hipóteses para explicar a falta de toxicidade de JBU/CNTX para insetos adultos. A primeira é que adultos não formem o peptídeo entomotóxico ou o degradem rapidamente. O processamento das ureases por diferentes insetos será discutida adiante. A outra hipótese é que o peptídeo seja formado, porém não alcance a hemolinfa dos insetos, não atingindo os alvos para sua toxicidade. O mecanismo de ação do peptídeo entomotóxico ainda não é conhecido, mas postula-se que ele seja transportado para a hemolinfa dos insetos e de lá para outros tecidos, onde exerça sua atividade tóxica (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Se, por alguma diferença morfológica do trato digestivo entre ninfas e adultos, o peptídeo não for transportado para a hemolinfa, a atividade entomotóxica pode ser abolida. Em apoio a esta hipótese, Ferreira-DaSilva *et al.* (2000) observaram que, de fato, a permeabilidade e/ou transporte de peptídeos derivados de imunoglobulinas de coelho através do intestino de *R. prolixus* é diferenciado entre ninfas e adultos

Parte II

**Processamento das ureases por enzimas digestivas de *Dysdercus peruvianus*
e *Callosobruchus maculatus***

4.2.1 – Hidrólise *in vitro* de JBU: processamento diferencial dependente do estágio do inseto.

O fato de adultos de *D. peruvianus* não serem susceptíveis às ureases poderia ser explicado por um processamento diferencial da proteína entre ninfas e adultos. Esse padrão diferencial de fragmentação foi observado para *R. prolixus* (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Para avaliar se isto também ocorre em *D. peruvianus*, JBU foi hidrolizada *in vitro* com homogeneizados de intestino de ninfas e adultos. Observamos que a hidrólise com o homogeneizado de ninfas leva a formação de um fragmento de aproximadamente 10 kDa (Fig. 7A).

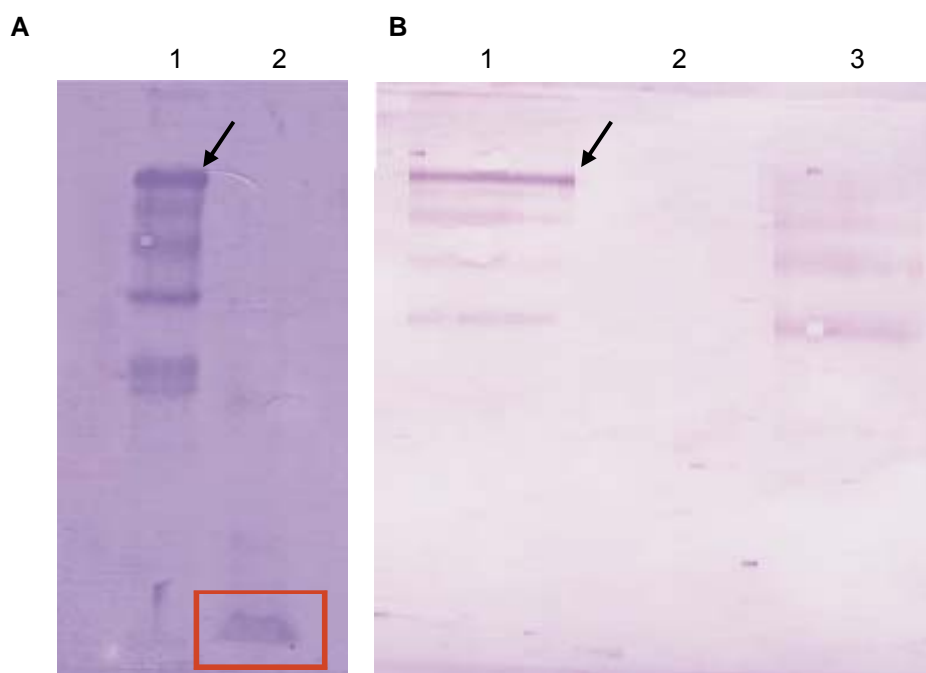


Figura 7: Western blots da hidrólise *in vitro* de JBU com homogeneizado de intestinos de ninfas (A) e adultos (B) de *D. peruvianus*. JBU foi incubada com os homogeneizados na proporção de 0,5 mU hemoglobinolíticas de homogenato para cada μg de JBU, em pH 5,6 por 24 h a 37°C. A: JBU (1) e JBU + Homogeneizado (2); B: JBU (1), homogeneizado (2) e JBU + Homogeneizado (3). As setas indicam JBU e a caixa vermelha marca o peptídeo de aproximadamente 10 kDa formado. Anticorpo primário anti-Jaburetox 2Ec (1:25.000).

Já na hidrólise com o homogeneizado de adultos (Fig. 7B), há a formação de fragmentos maiores de JBU, mas de nenhum fragmento, detectável, em torno de 10 kDa, peso do peptídeo entomotóxico isolado previamente (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Esse dado reforça a hipótese de que adultos não possuem enzimas capazes de clivar a urease especificamente na região de liberação do peptídeo entomotóxico. De maneira análoga aos resultados obtidos com *D. peruvianus* e *R. prolixus*, foi descrito um aumento na resistência de *Spodoptera frugiperda* contra Bt Cry1C em estádios larvais tardios quando comparado aos estádios mais jovens, sendo este atribuído a um processamento enzimático diferencial da toxina (Keller *et al.*, 1996).

4.2.2 - Caracterização da atividade proteolítica no homogeneizado de intestino de ninfas e adultos de *D. peruvianus*

Para confirmar a diferença enzimática entre ninfas e adultos de *D. peruvianus*, a atividade hemoglobinolítica dos homogeneizados de intestinos de ninfas e adultos foram ensaiada na presença de inibidores das diferentes classes de enzimas, em diferentes valores de pH (Fig. 8). Observamos que proteinases ativas em pH ácido predominam tanto em ninfas quanto em adultos, com uma pequena mudança no pH de maior atividade. O homogeneizado de ninfas tem maior atividade em pH 3,5 – 4,0, enquanto o homogeneizado de adultos em pH 4,5 – 5,0. Um segundo pico de atividade em pH 8,5 é visto somente para adultos. E-64 e Pep-A inibem significativamente a atividade proteolítica do homogeneizado de ninfas (Fig. 8A), indicando a prevalência de enzimas do tipo catepsina B e D, respectivamente. Em contraste, somente Pep-A inibiu significativamente a atividade hemoglobinolítica do homogeneizado de adultos, indicando uma participação minoritária de enzimas cisteínicas (Fig. 8C). Metaloproteases estão presentes tanto em ninfas quanto em adultos (Fig. 8B e D). Uma serino protease (inibida por PMSF), ativa em pH 8,5, está presente somente nos homogeneizados de adultos (Fig. 8D).

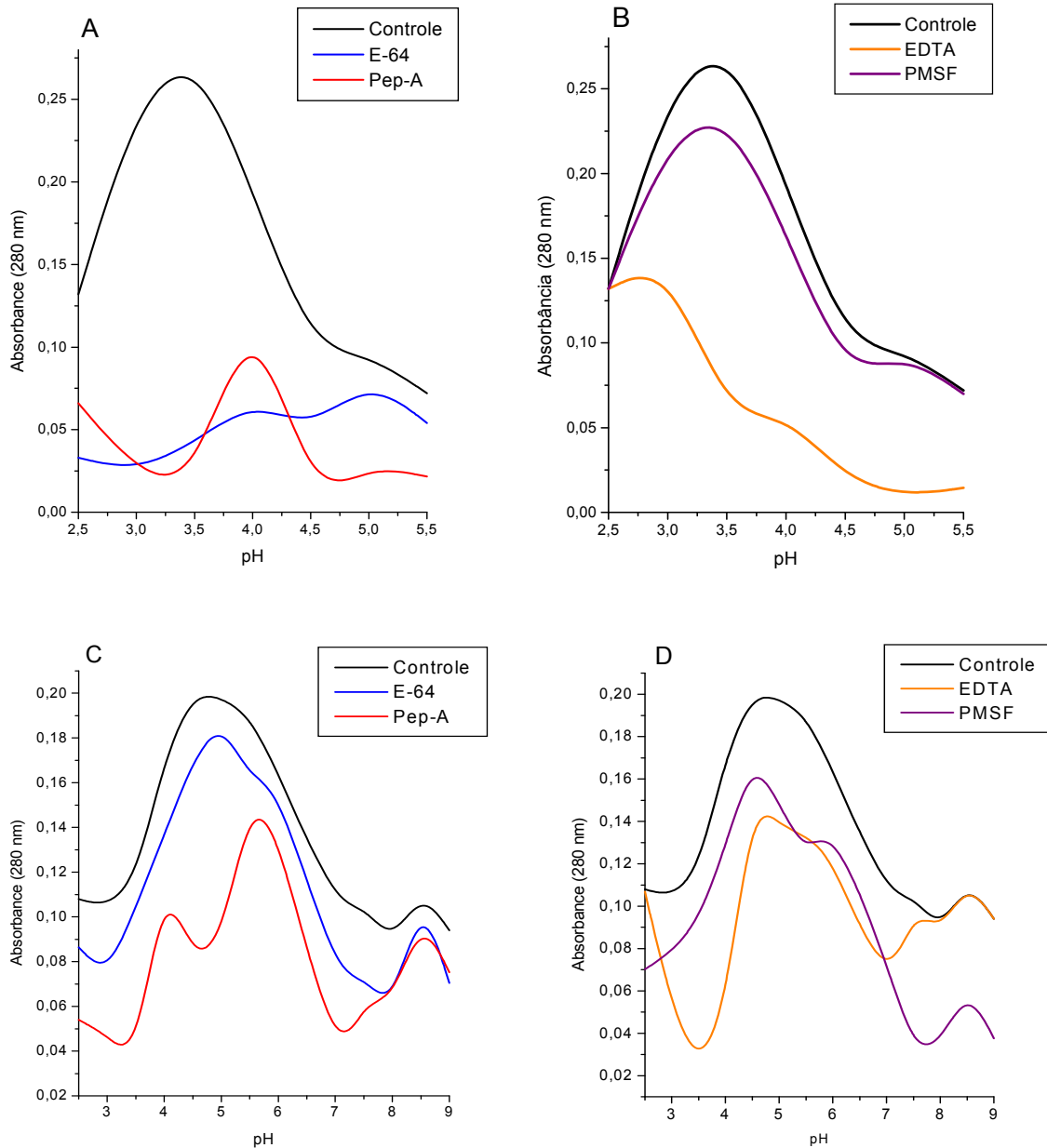


Figura 8: Efeito de diferentes inibidores sobre a atividade hemoglobinolítica dos homogeneizados de intestinos de ninfas (A – B) e adultos (C – D) de *D. peruvianus*. Dados são mostrados como a absorbância de peptídeos liberados após a incubação dos homogeneizados e hemoglobina (3 h a 37°C) na presença ou não dos inibidores (E-64 e Pep-A 8 μ M, EDTA 6.5 mM e PMSF 3mM). As curvas mostram o resultado típico de três ou mais experimentos independentes. Dados publicados em Stanisçuaski *et al.*, 2005 (anexo 1).

A ativação *in vitro* da CNTX por enzimas digestivas tipo catepsinas de *R. prolixus* foi demonstrada pela interferência no efeito inseticida da toxina pela ingestão simultânea da toxina e E-64 e/ou Pep-A (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Os resultados obtidos com *D. peruvianus* corroboram com a hipótese de que o processamento das ureases para liberação do peptídeo tóxico é feita por enzimas do tipo catepsina e que, em adultos, estas enzimas não estão presentes ou são minoritárias.

Para confirmar a hipótese de que somente ninfas são capazes de liberar o peptídeo a partir das ureases, foram sintetizados peptídeos fluorogênicos, acoplados com ABZ e EDDnp, correspondentes aos possíveis sítios de clivagem N e C-terminal do peptídeo entomotóxico a partir das ureases (Fig. 9). Essa região é idêntica em JBU e na sequência de JBUre-II, gene que possivelmente codifica a CNTX. Esses peptídeos foram utilizados como substrato, para confirmação da clivagem das ureases nessa região.

```

1 KLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGEKTVAQLM
  CLGQHLLGRRQVLPVPHLLNAVQVEATFPDGTKLVTVHDPISRENGELQEALFGSLL
  PVPSLDKFAETKEDNRIPGEILCEDECLTNIGRKAVILKVT SKGDRPIQVGSYHFIEV
  NPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCKSVTLVSIENKQVIRGGNAIADGPVNE
  TNLEAMHAVRSKGFGEHEEKDASEGFTKEDPNCFNTFIHRKEYANKYGPTTGDKI
  RLGDNTLLAEIEKDIALYGDCEVFGGKQVIRDGMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIDYT
  GIIKADIGIKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYIC
  PQLVYEAISSGITTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMRLMLQSTDDLPLNFGFTGK
  GSSSKPDELHEI KAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIHTDLNEAGFV
  EHSIAAFKGRTHIYHSEGAGGGHAPDIKVCGIKNVLPSSNPNTRPLTSNTIDEHLDML
  MVCHHLDREIPEDLAFASRIRKKTIAAEDVLNDIGAISSSDSQAMGRVGEVISRTWQ
  TADKMKAAQTGPLKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLADLVM
  WKPSFFGTPKPEMVIKGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRPMYGTLGKAGGALSIAF
  VSKAALDQRVNVLYGLNKRVEAVSNVRKLTKLDMKLN DALPEITVD PESYTVKADGKL
  LCVSEATTVPLSRNYFLF 839

```

Figura 9: Sequência de JBU. Em azul, a sequência correspondente ao peptídeo entomotóxico. As caixas vermelhas marcam a sequência dos peptídeos sintetizados.

Utilizados na mesma concentração proteica, observamos que o homogeneizado de intestinos de ninfas de *D. peruvianus* foi capaz de hidrolizar o peptídeo correspondente ao sítio de clivagem N-terminal de maneira bastante eficiente, enquanto o homogeneizado de adultos cliva o substrato de maneira muito mais lenta (Fig. 10A).

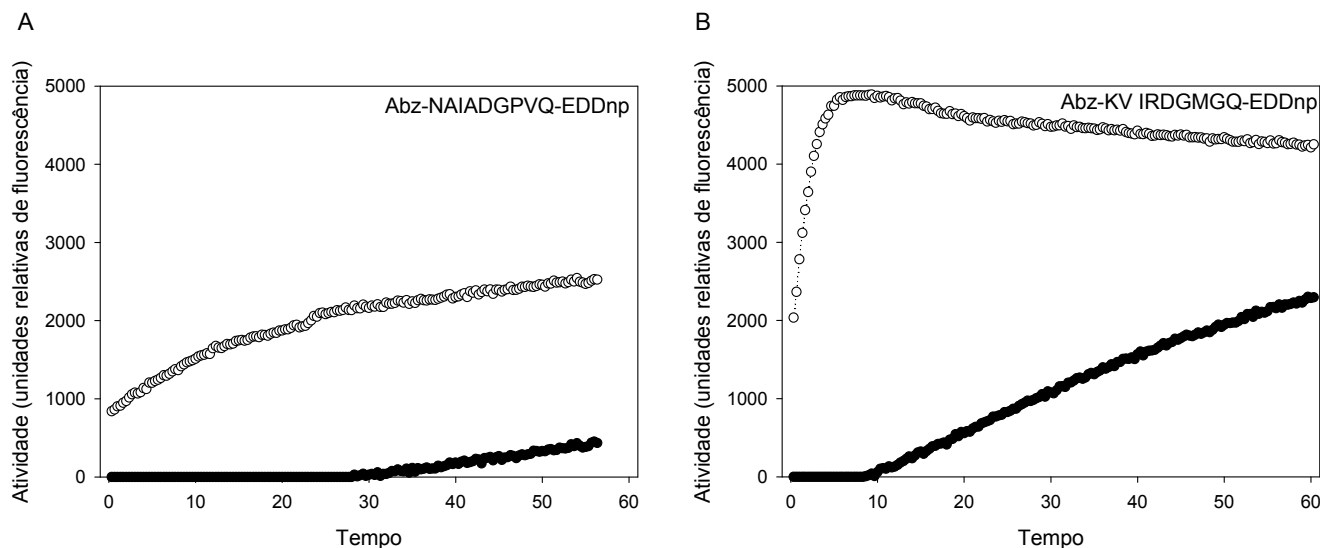


Figura 10: Hidrólise dos substratos peptídicos correspondentes aos sítios de clivagem do peptídeo entomotóxico a partir das ureases de *C. ensiformis* com substratos (A) correspondente ao sítio N-terminal e (B) correspondente ao sítio C-terminal. Pontos brancos representam homogeneizado de intestino de ninfas e pontos pretos, homogeneizado de intestinos de adultos. A reação ocorreu a 37°C, pH 5,6. Foi utilizado 20 μ M de substrato e 50 μ g de cada homogeneizado.

Para o substrato correspondente ao C-terminal, observamos o mesmo tipo de comportamento: uma hidrólise extremamente rápida pelo homogeneizado de intestinos de ninfas e uma hidrólise mais lenta pelo homogeneizado de intestinos de adultos (Fig. 10B). Aparentemente, as enzimas dos homogeneizados tem maior afinidade e/ou eficiência em clivar o sítio C-terminal para liberar o peptídeo

entomotóxico. Porém, houve um erro na sequência do substrato N-terminal, onde a última asparagina foi substituída por uma glutamina. Essa alteração pode ter causado a diferença nas taxas de clivagem observada para os dois substratos.

Apesar de ambos os homogeneizados clivarem os substratos, a menor eficiência da clivagem nos adultos sugere que não ocorra a formação do peptídeo inseticida em níveis suficientes para estabelecer o efeito tóxico. Outra possibilidade é que existam enzimas somente no homogeneizado de adultos que clivem o peptídeo entomotóxico em fragmentos menores que não são tóxicos e nem detectáveis no western blot, como verificado no caso dos insetos com enzimas do tipo tripsina (Carlini *et al.*, 1997).

Utilizando os softwares disponíveis online “Peptide Cutter” (<http://www.expasy.ch/tools/peptidecutter>) e “Cutter” (Cutter © 1998-1999 <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/cutter.html>), observamos que a enzima Asp-N endopeptidase clivaria o substrato equivalente ao C-terminal no ponto exato para liberação do peptídeo entomotóxico e o substrato equivalente ao N-terminal um aminoácido a montante do início do peptídeo. Esses dados, juntamente com os resultados mostrando a presença de aspártico proteases no trato digestivo de *D. peruvianus* são sugestivas de que essa classe de enzima poderia estar envolvida com a liberação do peptídeo entomotóxico. Porém, como cisteíno proteinases também parecem estar presentes em *D. peruvianus*, não podemos descartar o possível papel dessas enzimas no processamento das ureases.

Mais estudos nessa área, envolvendo a purificação e caracterização das enzimas digestivas, esclarecerão a diferença de susceptibilidade em ninfas e adultos de *D. peruvianus*.

4.2.3 - Caracterização das enzimas presentes no homogeneizado de *C. maculatus*

A atividade proteolítica do homogeneizado foi ensaiada sobre azocaseína na presença de E-64 e Pep-A, ambos capazes de inibir parcialmente a atividade (Fig.

11). Esses dados indicam a presença de cisteíno e aspártico proteinases no homogeneizado, estando de acordo com a literatura (Silva e Xavier-Filho, 1991; Pedra *et al.*, 2003).

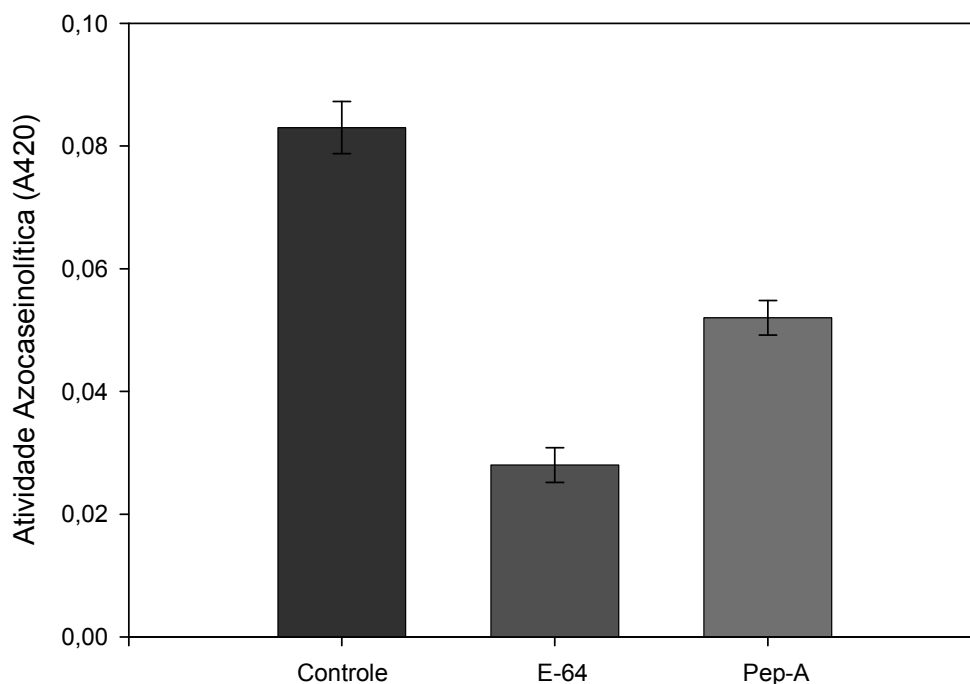


Figura 11: Efeito de inibidores sobre a atividade azocaseinolítica do homogeneizado. Controle: homogeneizado sem inibidores; E-64: homogeneizado na presença de 9 μ M de E-64; Pep-A: homogeneizado na presença de 9 μ M de Pep-A. As amostras foram incubadas por 30 min com os inibidores antes da adição do substrato. A reação ocorreu a 37°C, pH 5,6 por 3 h.

Dados preliminares obtidos por Gombarovitz (1999) indicaram que o primeiro pico da gel-filtração (Sephacryl S-200) do homogeneizado de larvas de *C. maculatus* poderia estar envolvido no processamento da CNTX. Para caracterizar as enzimas presentes nesse pico, uma alíquota do homogeneizado foi cromatografada em coluna de gel-filtração Sephacryl S-200.

Observamos o aparecimento de vários picos protéicos e a atividade azocaseinolítica de cada fração foi ensaiada (Fig. 12). Observamos uma grande atividade azocaseinolítica entre as frações 16 e 22. O mesmo perfil é obtido para a atividade hemoglobinolítica (dados não mostrados). As frações reunidas foram 6-15 (de 70 a 99 mL - Pico A) e 16-22 (de 100 a 120 mL - Pico B).

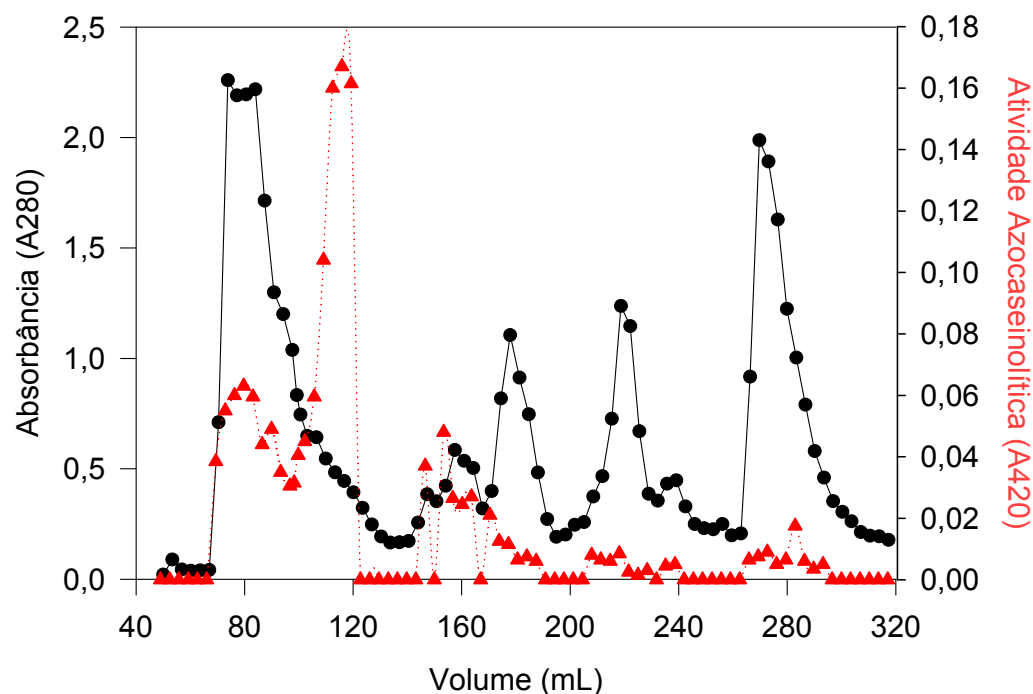


Figura 12: Perfil cromatográfico e atividade azocaseinolítica das frações da gel-filtração. Uma alíquota de 2 mL do homogeneizado de larvas de *C. maculatus* foi aplicada em Sephacryl S-200, equilibrada em tampão formiato de amônio pH 5,6. Frações de 3 mL foram coletadas em um fluxo de 0,2 mL/min. As frações (na concentração final de 0,3 mg/mL) foram incubadas com azocaseína (0,2%) a 37°C, pH 5,6 por 3 h para determinação da atividade proteolítica.

A atividade proteolítica dos picos A e B sobre hemoglobina (pH 3,5) e azocaseinolítica (pH 5,6) foi ensaiada. A maior atividade é encontrada em pH 3,5 utilizando hemoglobina como substrato (Fig. 13).

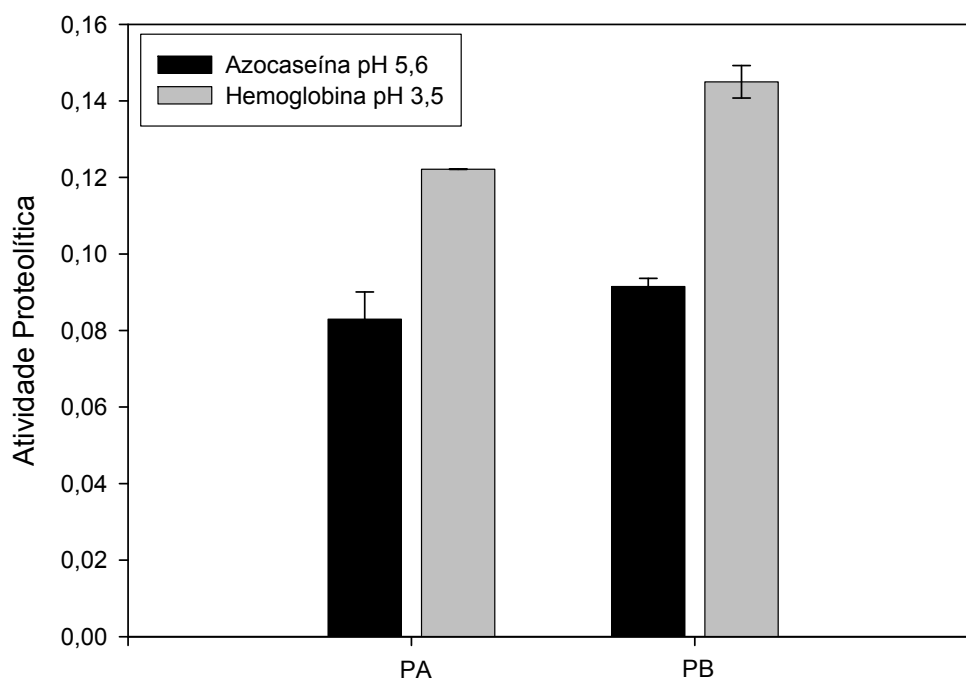


Figura 13: Atividade Hemoglobinolítica e Azocaseinolítica dos Picos A e B da gel-filtração. Os picos (0,3 mg/mL) foram incubados com 0,2% de azocaseína e hemoglobina, pH 5,6 e 3,5, respectivamente, a 37°C por 3 h. A atividade proteolítica é expressa como absorbância em 280 nm (hemoglobina) e 420 nm (azocaseína).

O efeito de inibidores sobre a atividade desses dois picos foi ensaiado (Fig. 14). E-64 e Pep-A inibem cerca de 80% da atividade de PA, enquanto PMSF não inibiu a reação. Para a atividade do PB, E-64 inibiu 40% e Pep-A aboliu completamente a clivagem do substrato. Como para PA, PMSF não inibiu a atividade de PB. Esses dados indicam que PB se trata, majoritariamente, de uma aspártico protease, enquanto PA possui atividade de cisteína e aspártico proteases.

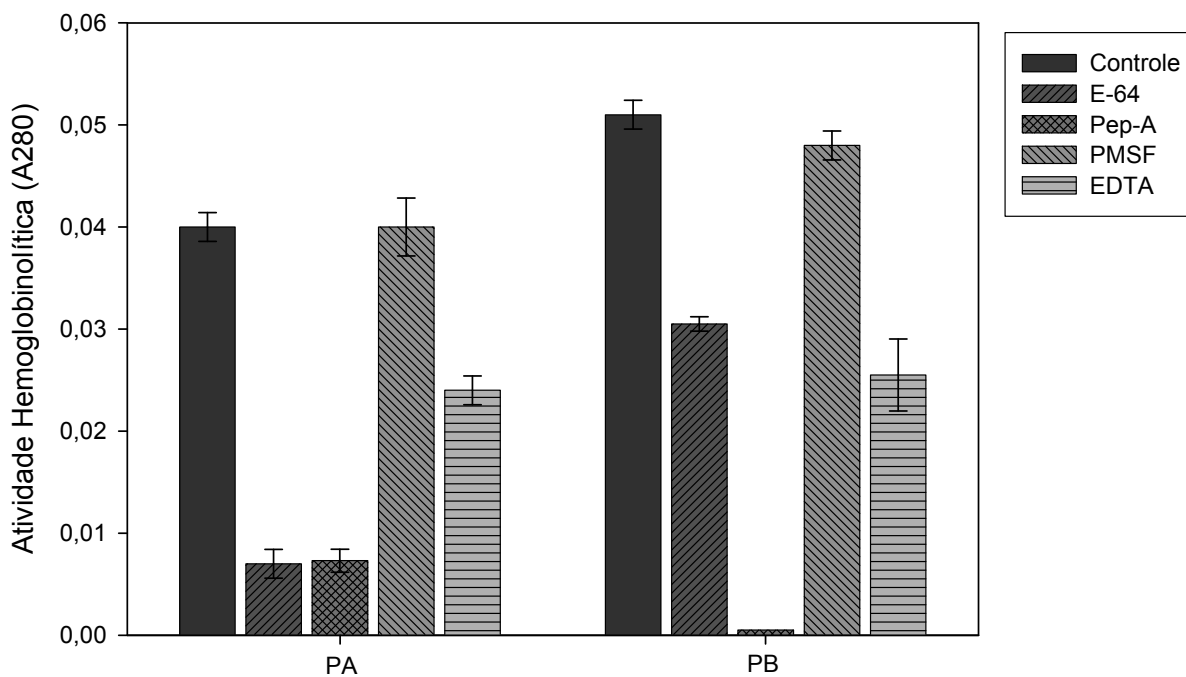


Figura 14: Efeito de inibidores sobre a atividade hemoglobinolítica dos Picos A (PA) e B (PB). Controle: Pico sem inibidores; E-64: 9 μ M; Pep-A: 9 μ M; PMSF: 9 mM; EDTA: 3,5 mM. As amostras (0,3 mg/mL) foram incubadas com os inibidores por 30 min antes da adição do substrato. A reação ocorreu a 37°C, pH 3,5 por 3 h.

Analizando o PB em gel de poliacrilamida (10%), observamos a presença de uma banda majoritária de aproximadamente 40 kDa (Fig. 15). Provavelmente esta banda corresponda a enzima sensível a Pepstatina-A.

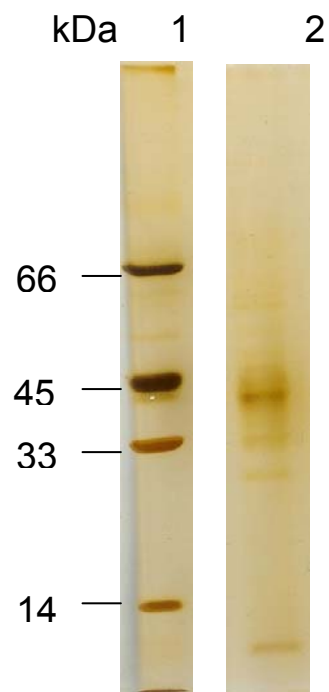


Figura 15: Gel de poliacrilamida (10%) de PB. Linhas (1) padrão de peso molecular; (2) 5 μ g de PB. Gel corado com prata.

4.2.4 – Hidrólise *in vitro* da CNTX e JBU com enzima semi-purificadas de *C. maculatus*

A CNTX foi hidrolisada *in vitro* com os Picos A e B da gel-filtração, além de enzimas padrões (Fig. 16). Podemos observar que o Pico B age sobre a CNTX, liberando um peptídeo do tamanho esperado.

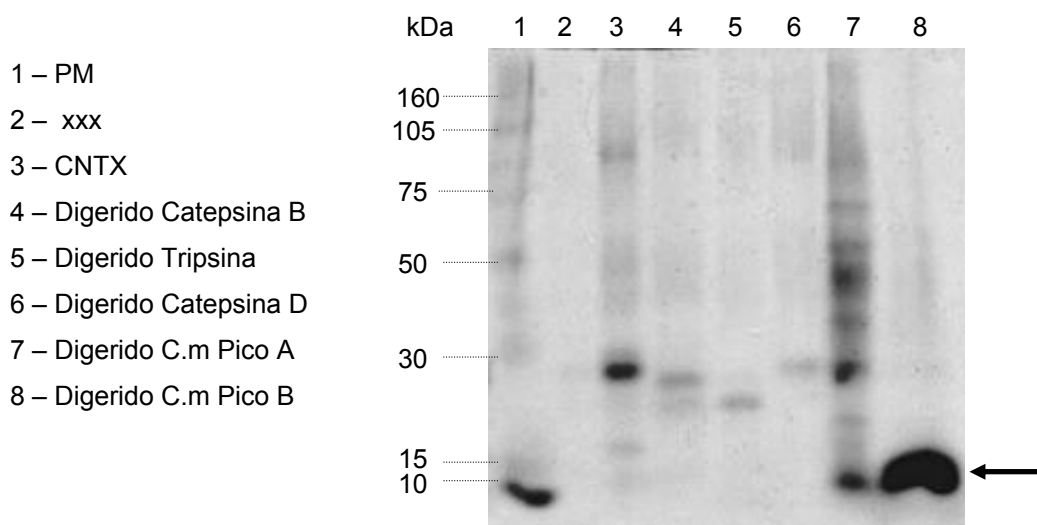


Figura 16: SDS-PAGE (8-20%) da hidrólise *in vitro* da CNTX. CNTX foi incubada por 24 h (37°C, pH 5,6) com diferentes enzimas padrão e com os picos (A e B) de *C. maculatus* obtidos na gel-filtração. A relação utilizada foi 0,5 mU azocaseinólíticas das enzimas para cada μg de CNTX. A seta indica o peptídeo no peso molecular esperado (cerca de 10 kDa). Gel corado com prata.

Aparentemente, nenhuma das enzima padrão utilizadas (Catepsinas B e D suínas e tripsina bovina) hidrolizam CNTX em fragmentos próximos de 10 kDa.

A hidrólise da JBU foi realizada com o pico B da gel-filtração, na presença de inibidores específicos e analisada por gel-filtração (Fig. 17). Observamos que tanto E-64 quanto Pep-A inibem parcialmente a hidrólise da JBU e liberação do peptídeo.

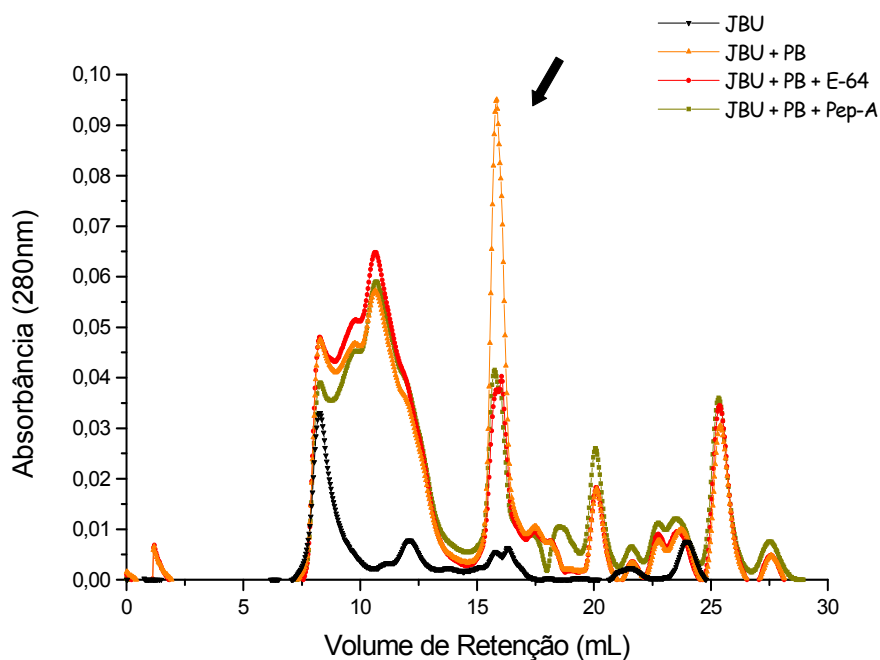


Figura 17: A gel-filtração da hidrólise *in vitro* de JBU com o Pico B (PB) foi feita em FPLC, usando a coluna Superdex 75, Pico B foi incubado com JBU sem inibidores (JBU+PB), com 15 μ M E-64 (JBU+PB+E-64) ou com 15 μ M Pep-A (JBU+PB+Pep-A). A seta indica o peptídeo no volume de retenção esperado.

Os dados das hidrólises *in vitro* deixam claro que a(s) enzima(s) de *C. maculatus* presentes no PB são capazes de liberar um peptídeo com o mesmo peso molecular do peptídeo entomotóxico. O fato de ambos inibidores (E-64 e Pep-A) diminuírem a formação desse peptídeo de 10 kDa por PB indica a presença de mais de uma enzima nesse pico e que ambas são capazes (ou necessárias) para clivagem das ureases na região do peptídeo entomotóxico. Outra hipótese é que os fragmentos formados pelas duas enzimas sejam fragmentos distintos e somente um deles seja o equivalente ao Pepecanatox.

Ensaio de toxicidade e o sequenciamento dos fragmentos formados *in vitro* pelo Pico B (na presença dos diferentes inibidores) serão necessários para esclarecer se a formação do peptídeo entomotóxico é dependente de mais de uma classe de enzima.

Parte III

Mecanismo de ação das ureases e de Jaburetox 2Ec em insetos modelo.

4.3.1 - Secreção dos túbulos de Malpighi de *R. prolixus*

Túbulos de Malpighi de *R. prolixus* secretam em níveis muito baixos quando não são estimulados. Todos os experimentos realizados neste trabalho utilizaram serotonina como fator de estimulação. A serotonina é um hormônio diurético em *R. prolixus* que estimula a secreção dos túbulos cerca de 1000 vezes (Orchard, 2006). Usando serotonina $2,5 \times 10^{-8}$ M, JBU inibe 40-75% da secreção, de maneira dose dependente (Fig. 18A). A dose mais efetiva foi 5×10^{-10} M, causando 75% de inibição. JBU não é capaz de inibir a secreção dos túbulos quando estimulados com serotonina 10^{-6} M e os níveis de inibição são baixos (cerca de 15%) com serotonina 5×10^{-8} M (dados não mostrados). Para Jaburetox 2Ec, doses muito baixas inibiram a secreção (Fig. 18B). A dose 10^{-15} M causou 70% de inibição.

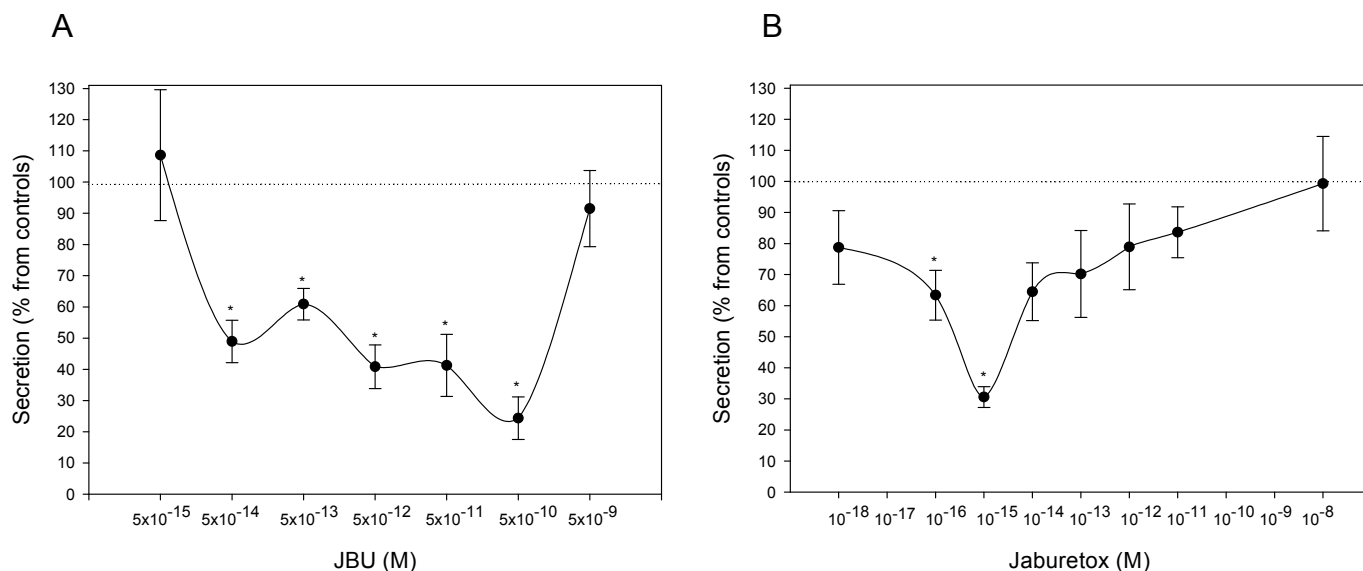


Figura 18: Efeito de JBU (A) e Jaburetox 2Ec (B) na secreção dos túbulos de Malpighi. Os túbulos foram incubados com serotonina por 20 min, lavados e incubados novamente com serotonina na presença de JBU ou Jaburetox 2Ec por mais 20 min. A taxa de secreção é expressa como porcentagem do controle (serotonina sem JBU/Jaburetox 2Ec). Os valores são média e erro padrão. * indica valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,05$).

Para excluir algum efeito inespecífico devido à adição de proteínas no meio, duas proteínas foram utilizadas como controle: BSA (69 kDa) e tireoglobulina (660 kDa). Nas doses de 5×10^{-10} M e 5×10^{-9} M, essas proteínas não causaram nenhum efeito na secreção dos túbulos de Malpighi isolados (dados não mostrados).

Tanto JBU quanto Jaburetox 2Ec possuem uma curva de dose-resposta incomum que sugerem dessensibilização em altas doses, indicando que os receptores podem estar dessensibilizados ou internalizados. Um fator antidiurético isolado de *Tenebrio molitor* (Eigenheer *et al.*, 2000), que atua em concentrações muito baixas, também mostra dessensibilização em doses altas. Outra hipótese para explicar as curvas incomuns, principalmente para Jaburetox 2Ec, é que estamos observando múltiplos efeitos. É possível que JBU e Jaburetox 2Ec ativem mais de uma rota levando a efeitos contrastantes, dependendo da dose testada. Rafaeli e Applebaum (1982) mostraram, em gafanhotos, que canavanina (aminoácido não proteico isolado de *C. ensiformis*) causa uma diminuição da secreção dos túbulos de Malpighi *in vitro*, mas também aumenta a resposta dos túbulos ao hormônio diurético, levando a um aumento na secreção dos túbulos. A hipótese levantada por esses autores é que o aumento na secreção é devido a um efeito indireto da canavanina, que baixa os níveis basais de secreção levando a uma resposta máxima dos túbulos quando estimulados. Também é importante lembrar que segundos mensageiros usados em diferentes rotas, como GMPc, AMPc, cálcio, ATP e prostaglandinas, não somente regulam respostas sozinhos, mas também interagem entre si, desencadeando processos bastante complexos.

O efeito de pré-incubação com JBU/Jaburetox 2Ec, antes da adição de serotonina, também foi avaliado. Os túbulos foram pré-incubados por 5, 10 ou 20 min com JBU (Fig 19) e 5 e 10 min com Jaburetox 2Ec (Fig 20), seguidos da adição de serotonina e incubação por mais 20 min para medida do fluido secretado.

Para JBU, a pré-incubação mudou o perfil de ação antidiurética. Sem pré-incubação, as doses inibitórias foram 5×10^{-10} a 5×10^{-14} M (Fig 16A). Com 5 min de pré-incubação, as doses inibitórias foram 5×10^{-11} a 5×10^{-13} M (Fig. 19A), com 10 min

as doses foram 5×10^{-11} a 5×10^{-15} M (Fig. 19B) e com 20 min de pré-incubação, nenhum efeito inibitório foi observado (Fig. 19C).

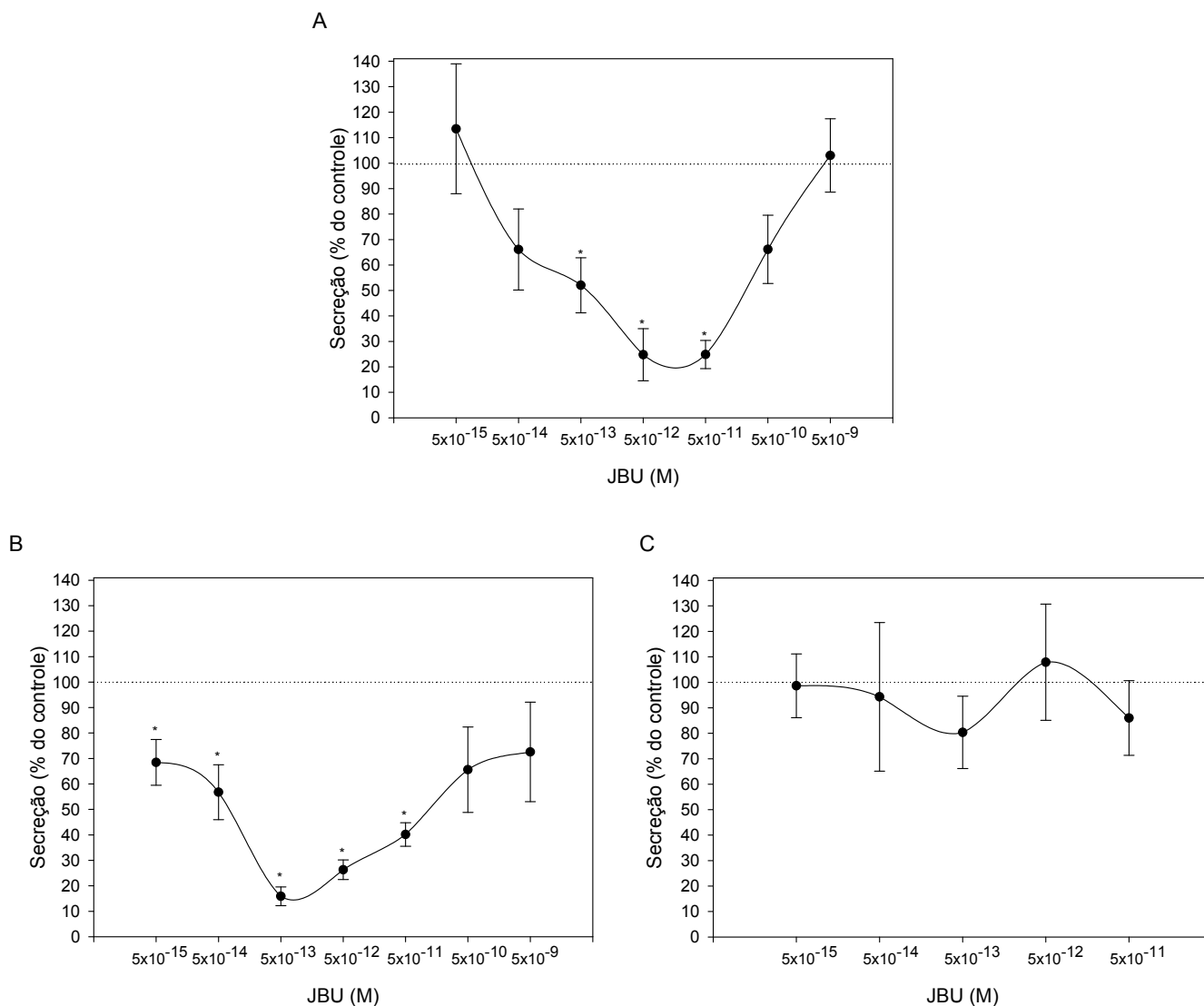


Figura 19: Efeito da pré-incubação dos túbulos com JBU, antes da adição de serotonina, por 5 min (A), 10 min (B) e 20 min (C). Após a incubação, serotonina foi adicionada e a taxa de secreção medida. Dados são expressos como média e erro padrão. * indicam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Em relação a pré-incubação com Jaburetox 2Ec (Fig. 20), as doses inibitórias também mudaram em comparação com o experimento sem pré-incubação (Fig. 16B).

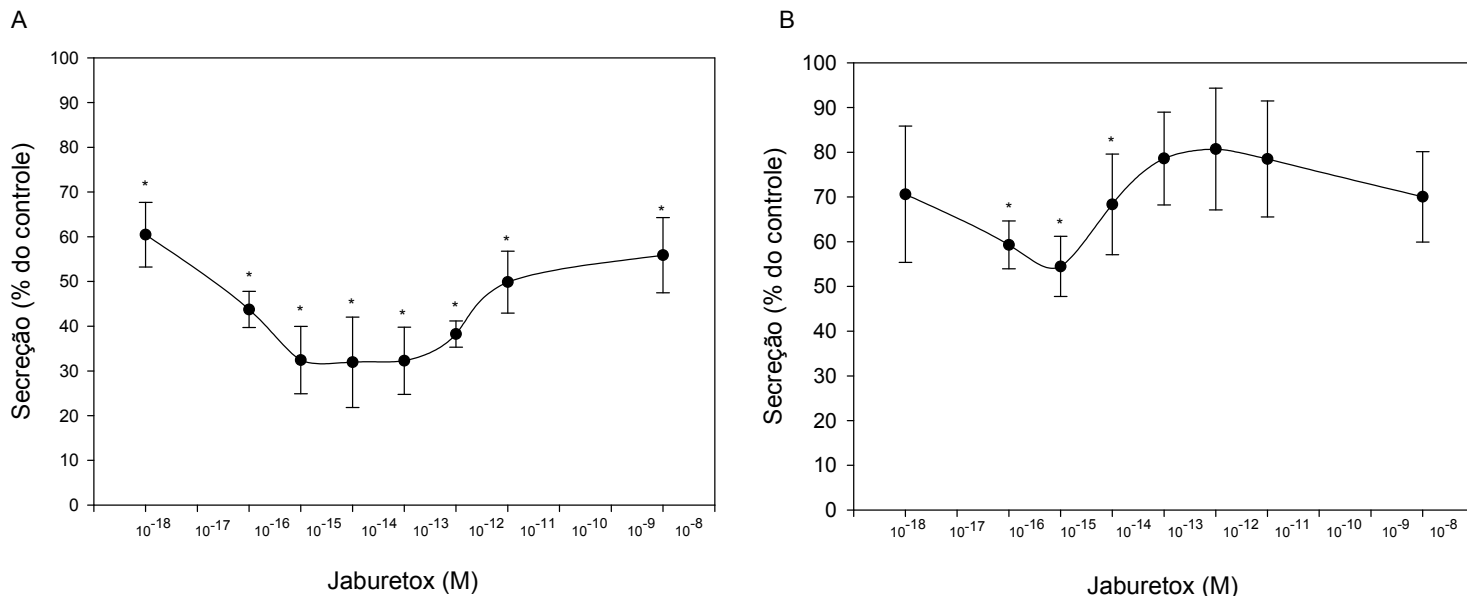


Figura 20: Efeito da pré-incubação dos túbulos com Jaburetox 2Ec, antes da adição de serotonina, por 5 min (A) e 10 min (B). Após a incubação, serotonina foi adicionada e a taxa de secreção medida. Dados são expressos como média e erro padrão. * indicam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Com 5 min de pré-incubação, todas as doses testadas causaram inibição da secreção de fluídos (Fig. 20A). Com 10 min de pré-incubação, três doses foram efetivas: 10^{-16} , 10^{-15} e 10^{-14} M, porém os níveis de inibição foram baixos, entre 20 e 40% (Fig. 20B).

Essas diferenças de efeitos observadas para JBU e Jaburetox 2Ec podem ocorrer por diferentes razões. Para JBU, a perda de efeito em 20 min pode ocorrer devido a uma instabilidade da proteína em si, ou da interação de JBU com a molécula de membrana (receptor) responsável pela propagação do sinal. Quando os

túbulos são lavados com salina após a incubação com JBU e serotonina (quando os níveis de secreção diminuem significativamente) e estimulados novamente na ausência de JBU, os níveis de secreção voltam ao normal (dados não mostrados), indicando que não há nenhum dano permanente aos túbulos, e que o sinal desencadeado por JBU levando a antidiurese não é mantido na ausência da proteína. A mesma instabilidade da proteína e/ou interação poderia explicar a redução da inibição por Jaburetox 2Ec após 10 min de pré-incubação. Outra possível causa da diminuição ou perda do efeito antidiurético poderia ser que, com a pré-incubação, o efeito desensibilização observado para doses altas sem pré-incubação, poderia estar acontecendo com as doses mais baixas. Com a pré-incubação, os receptores para JBU/Jaburetox 2Ec poderiam não responder mais ao estímulo dessas proteínas, fazendo com que os níveis de secreção voltassem ao normal quando a serotonina era adicionada ao ensaio.

Esses resultados salientam a complexidade dos efeitos desencadeados pelas ureases/peptídeos. Não é inesperado que uma proteína tão grande e complexa quanto a urease (cerca de 540 kDa) tenha efeitos distintos (e até contrastantes), uma vez que diferentes regiões/domínios dessa proteína podem ser responsáveis por diferentes ações. Estudos futuros com fragmentos da urease podem ajudar a esclarecer os dados obtidos com os ensaios apresentados aqui.

4.3.2 – Segundos mensageiros envolvidos na ação antidiurética

Serotonina e outros fatores diuréticos estimulam a secreção em túbulos de *R. prolixus* através do segundo mensageiro AMPc (Barret e Orchard, 1990; Montoreano *et al.*, 1990; Te Brugge *et al.*, 1999) e fatores antidiuréticos agem em *R. prolixus* usando GMPc como segundo mensageiro (Paluzzi e Orchard, 2006). JBU não causa nenhuma alteração significativa nos níveis de AMPc ou GMPc nos túbulos estimulados com serotonina (Fig. 21A e C). Jaburetox 2Ec não causa nenhuma diferença nos níveis de AMPc (Fig. 21B), mas aumenta os níveis de GMPc (Fig. 21D). Isso indica que Jaburetox 2Ec, mas não JBU, pode usar GMPc como segundo

mensageiro e também que JBU e Jaburetox 2Ec podem inibir a diurese através de mecanismos diferentes.

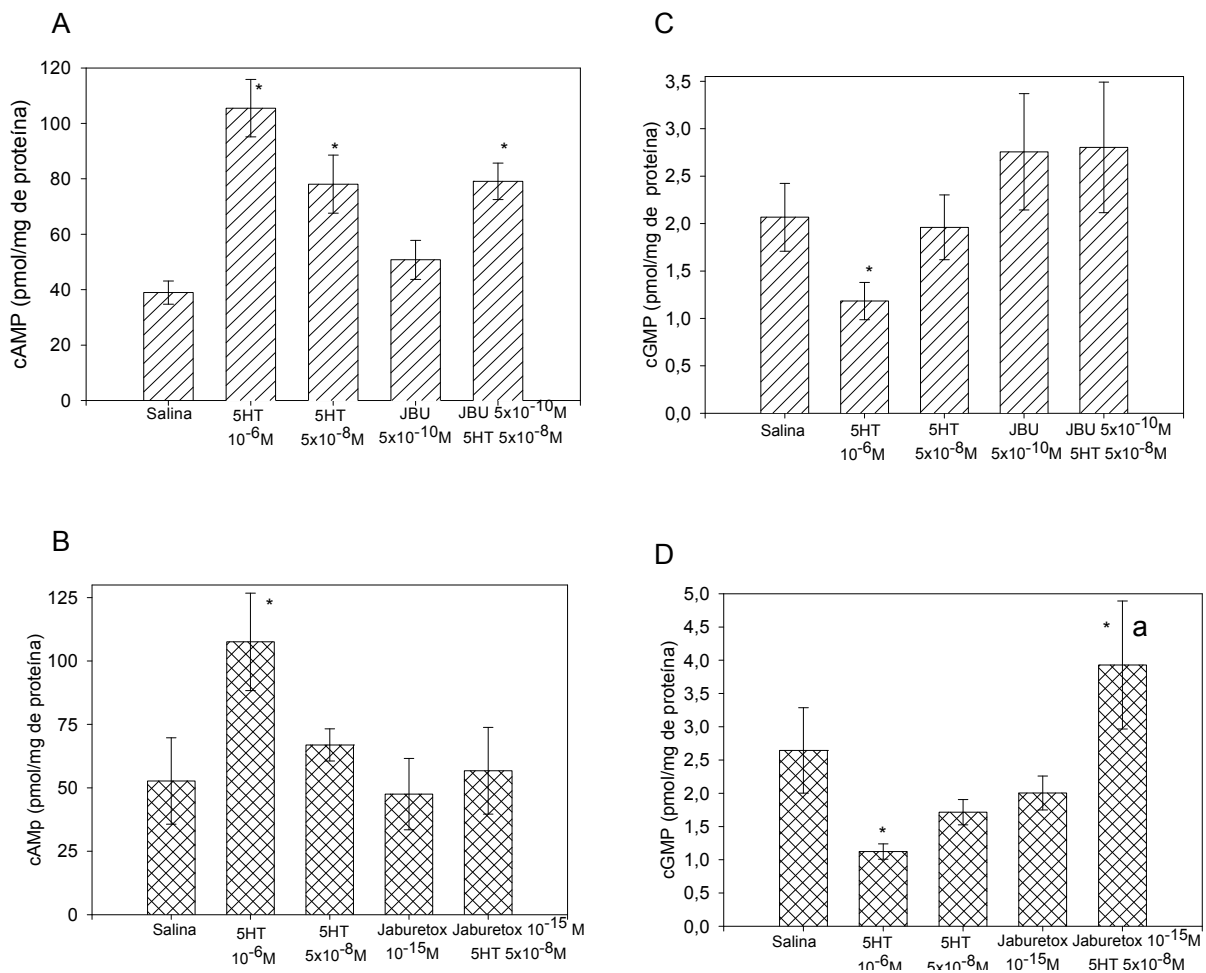


Figura 21: Quantificação de AMPc e GMPc. Os níveis de AMPc e GMPc foram avaliados, através de radioimunoensaio, em túbulos estimulados com serotonina ($5 \times 10^{-8}M$) na presença ou ausência de JBU (A e C) ou Jaburetox 2Ec (B e D). Serotonina $10^{-6}M$ foi utilizada como controle positivo do ensaio. Os valores são média e erro padrão. * indica valores estatisticamente diferentes do controle de salina ($p \leq 0,05$). ^a indica valores estatisticamente diferentes do controle com serotonina $5 \times 10^{-8}M$ ($p \leq 0,05$).

GMPc é o segundo mensageiro de alguns fatores antidiuréticos já descritos em *R. prolixus* (Quinlan *et al.*, 1997; Paluzzi and Orchard, 2006). O mecanismo preciso pelo qual GMPc inibe a secreção em *R. prolixus* ainda não é conhecido. O'Donnell e Quinlan (1998) sugerem que GMPc estimula uma fosfodiesterase específica para AMPc, reduzindo assim os níveis de AMPc e, por consequência, as taxas de secreção de fluídos.

Foram realizados experimentos de medida do potencial transepitelial (PTE) dos túbulos de Malpighi, para avaliar o transporte iônico. Uma resposta trifásica no PTE foi descrita para a estimulação dos túbulos isolados de *R. prolixus* com 10^{-6} M de serotonina. Essas fases correspondem a ativação sequencial de canais de Cl^- apicais (fase 1), seguida pela ativação de uma H^+ -ATPase apical (fase 2) e pela ativação do cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ basolateral (fase 3, Iwanowski e O'Donnell, 2001). Como JBU e Jaburetox 2Ec inibem a estimulação com 10^{-6} M de serotonina, a primeira avaliação foi se a resposta trifásica ocorre com a dose 5×10^{-8} M de serotonina. Todas as fases ocorrem quando os túbulos são estimulados com doses menores de serotonina (Fig. 22A). JBU não altera o PTE (Fig. 22B), indicando que canais de cloreto, H^+ -ATPase e o cotransportador de $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$ não são afetados por essa proteína. Por outro lado, Jaburetox 2Ec altera o perfil de PTE (Fig. 22C), principalmente na segunda fase, sugerindo que a atividade da H^+ -ATPase é alterada pelo peptídeo. O mesmo efeito é observado quando os túbulos são tratados com GMPc (Fig. 22D). Isto suporta a observação anterior de que Jaburetox 2Ec aumenta o nível de GMPc nos túbulos e que GMPc é o segundo mensageiro usado por Jaburetox 2Ec.

Os dados de PTE (Fig. 22D) indicam que GMPc altera o transporte de íons em túbulos de *R. prolixus*. Massaro *et al.* (2004) mostraram que GMPc inibe mecanismos de transporte eletroneutro em túbulos de *A. aegypti*, sugerindo que os transportadores $\text{Na}:\text{K}:2\text{Cl}$ ou $\text{Na}:\text{H}$ são possíveis alvos da sua ação antidiurética. Nossos resultados com PTE sugerem que, em *R. prolixus*, GMPc bloqueia a atividade da H^+ -ATPase e, conseqüentemente, a secreção de fluídos.

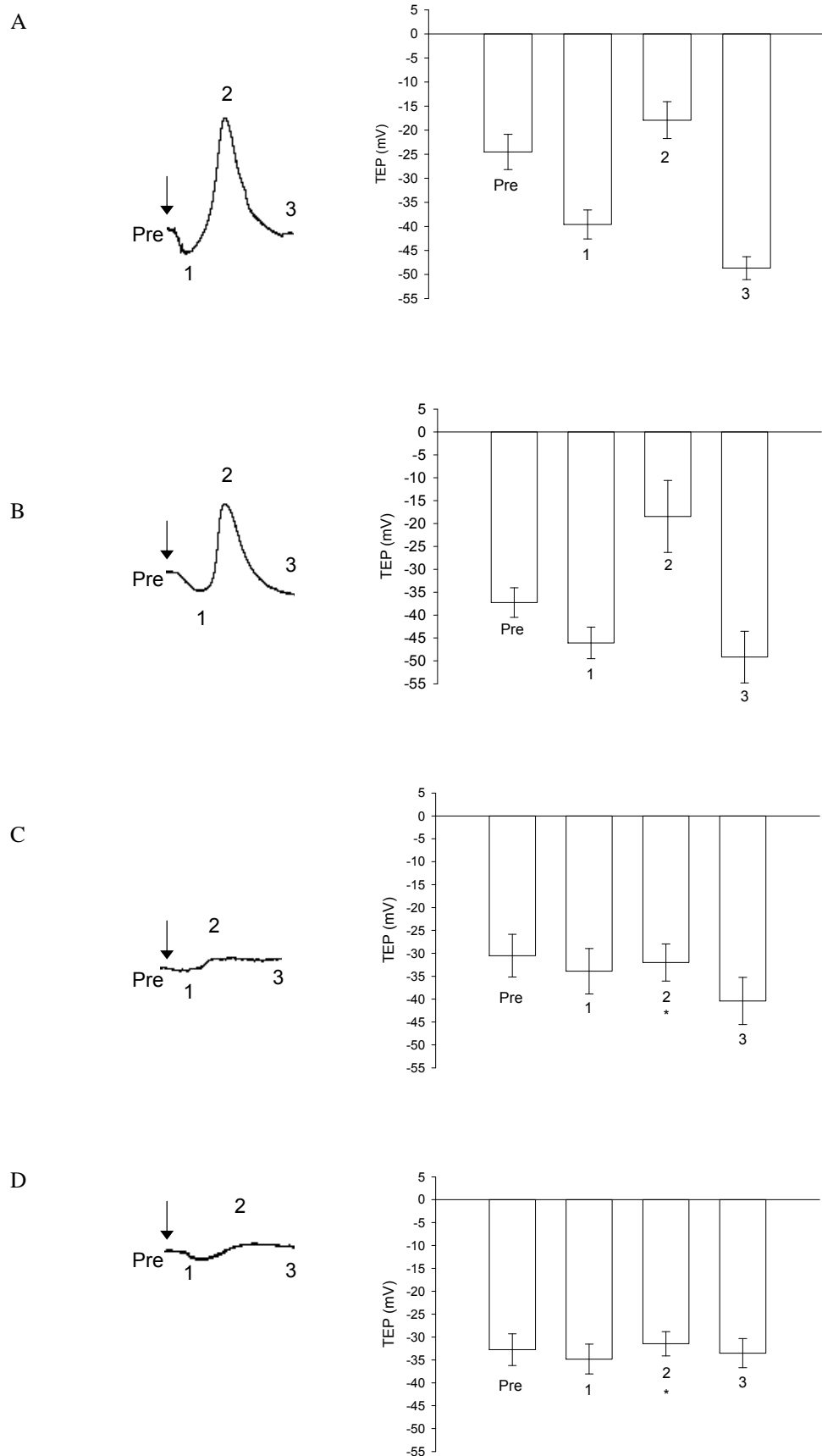


Figura 22: Medida do Potencial Transepitelial (PTE) em túbulos de Malpighi de *R. prolixus*. PTE foi medido em túbulos estimulados apenas com serotonina 5×10^{-8} M (A), ou na presença desta e 5×10^{-10} M JBU (B), 10^{-15} M Jaburetox 2Ec, ou 10^{-3} M GMPc (D). O potencial pré-estímulo (Pre) e as três fases são indicadas. A seta indica a aplicação de serotonina com ou sem as substâncias teste. Na esquerda, um traçado típico é mostrado e, na direita, a média e erro padrão de 6-10 repetições são mostrados. * indica valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) do controle (A) na respectiva fase (1, 2 ou 3).

Como JBU não age através de AMPc e GMPc, e também considerando todos os dados mostrando que ureases agem em modelos mamíferos usando eicosanóides como segundos mensageiros (revisto em Oliveira-Severo *et al.*, 2006), a rota do metabolismo do ácido araquidônico foi examinada nos túbulos de Malpighi. A dexametasona (DEX) é um inibidor de fosfolipase que bloqueia a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolípídeos de membrana, inibindo assim a biossíntese de eicosanóides. DEX é capaz de abolir a inibição causada por JBU, mas não é efetiva contra a inibição causada por Jaburetox 2Ec (Fig. 23).

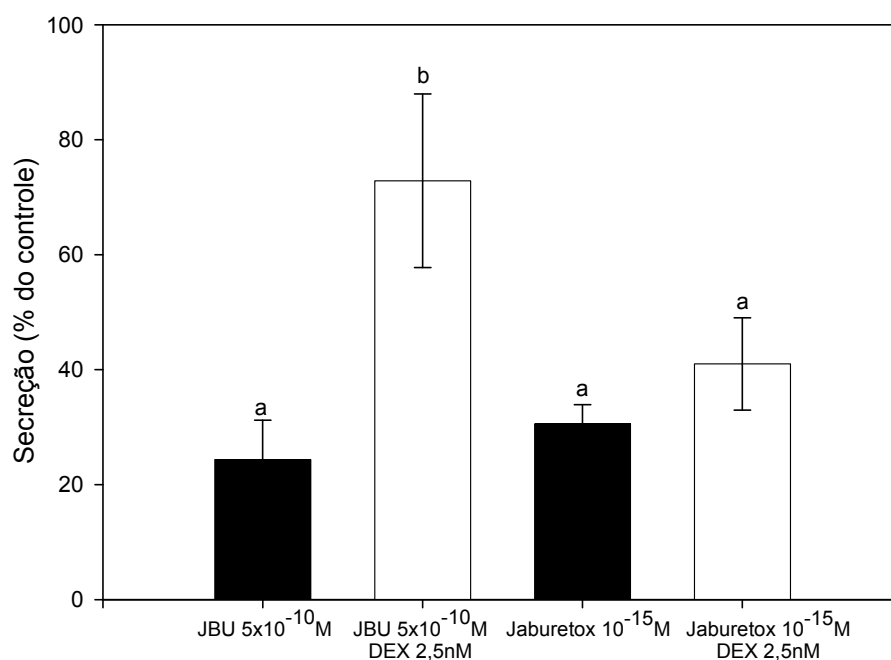


Figura 23: Efeito de dexametasona na ação de JBU e Jaburetox 2Ec. Túbulos foram tratados com JBU/Jaburetox 2Ec na presença de 2,5 nM de dexametasona. A taxa de secreção é expressa como porcentagem dos controles (serotonina ou serotonina + dexametasona). Os valores são média e erro padrão. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \geq 0,05$).

A importância do cálcio extra e intracelular foi avaliada usando salina livre de cálcio (substituído por magnésio), cloreto de cobalto e TMB-8 (Fig. 24).

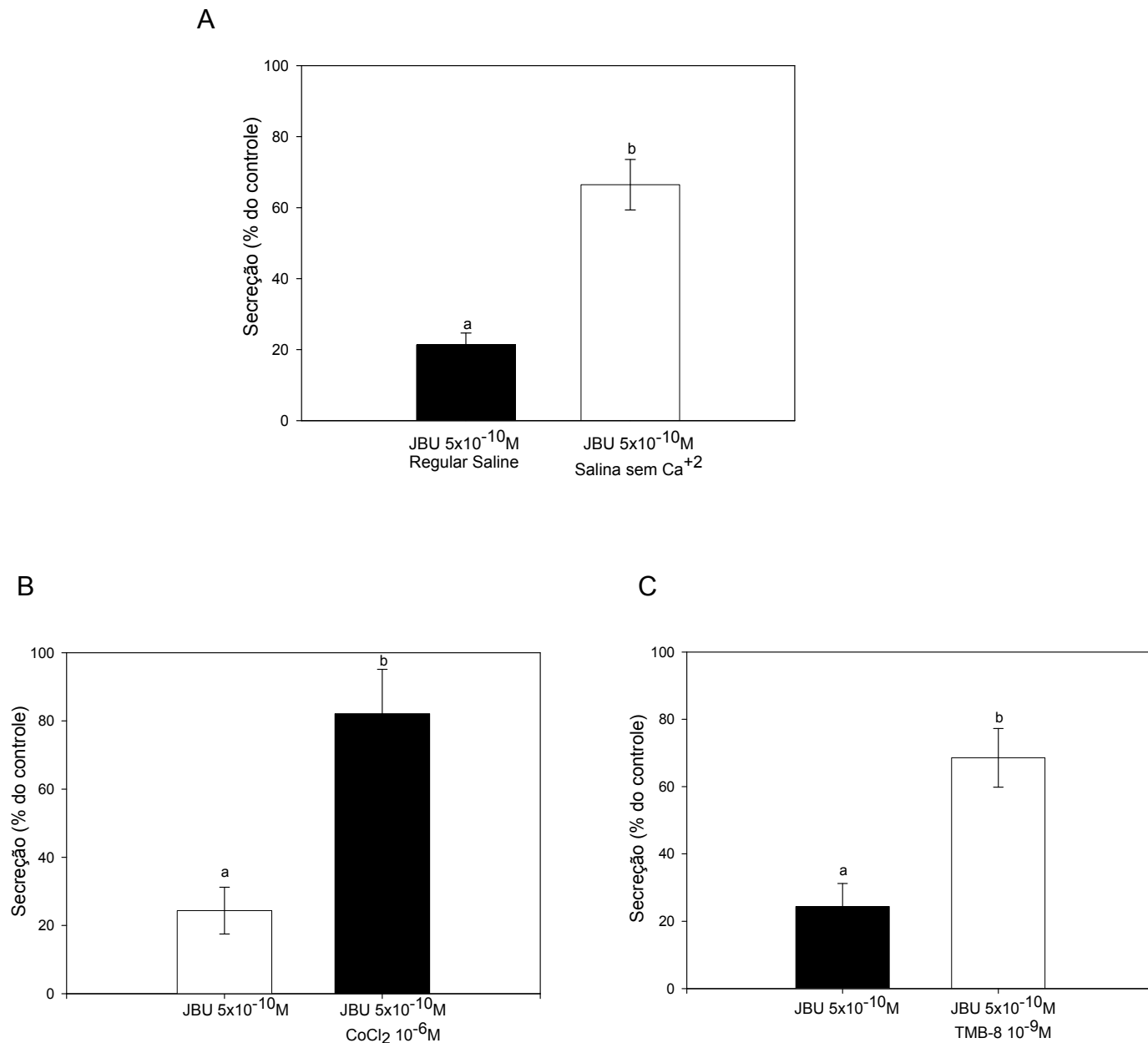


Figura 24: Influência do cálcio no efeito antidiurético de JBU. Túbulos foram tratados com JBU ($5 \times 10^{-10} \text{M}$) em salina livre de cálcio (A) ou na presença de 10^{-6}M de cloreto de cobalto (B) ou 10^{-9}M de TMB-8 (C). Valores são média e erro padrão. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Na salina livre de cálcio (Fig. 24A) e na presença de cloreto de cobalto (Fig. 24B), JBU não inibe a secreção dos túbulos, comprovando a importância do cálcio extracelular para a atividade antidiurética. Cálcio intracelular também é importante para a ação de JBU, uma vez que a adição de TMB-8 (antagonista da liberação de reservatório intracelulares de cálcio) bloqueia o efeito inibitório de JBU (Fig. 24C). As mesmas condições foram testadas com Jaburetox 2Ec, mas nenhum efeito foi observado, indicando que o cálcio não é importante para a ação do peptídeo (dados não mostrados).

Os dados mostrando que cálcio intra e extracelular são importantes para o efeito de JBU reforçam a importância da atividade de fosfolipase e da rota do ácido araquidônico nesse sistema. Vários estudos já descreveram a ativação de fosfolipases intracelulares em células de mamífero por ligantes extracelulares (Murakami *et al.*, 1997), e cálcio está envolvido em vários desses sistemas (Liu *et al.*, 1993; Schalkwijk *et al.*, 1995), sendo responsável pela translocação das fosfolipases do citosol para a membrana plasmática (Channon e Leslie, 1990). A relação entre elevação do cálcio intracelular e a ativação da fosfolipase foi descrita para alguns sistemas em insetos, como para o corpo gorduroso em baratas (Sun e Steele, 2002), e acreditamos que uma interação similar ocorra nos túbulos de *R. prolixus*, quando tratados com JBU.

Prostaglandinas podem regular a secreção de fluídos basal em túbulos de Malpighi de fêmeas de *Aedes aegypti* (Petzel e Stanley-Samuelson, 1992) e de operárias de *Formica polyctena* (Van Kerkhove *et al.*, 1995). Não existem estudos publicados sobre a importância de eicosanóides nos túbulos de *R. prolixus*. O efeito de prostaglandina E₂ (PGE₂) na secreção de túbulos foi testado. PGE₂ (5μM) inibe 60% da secreção (Fig. 25). Quando os túbulos são tratados com PGE₂ juntamente com JBU (5x10⁻¹⁰ M), não existe soma ou sinergismo dos efeitos, indicando que tanto JBU quanto PGE₂ podem estar agindo através da mesma rota.

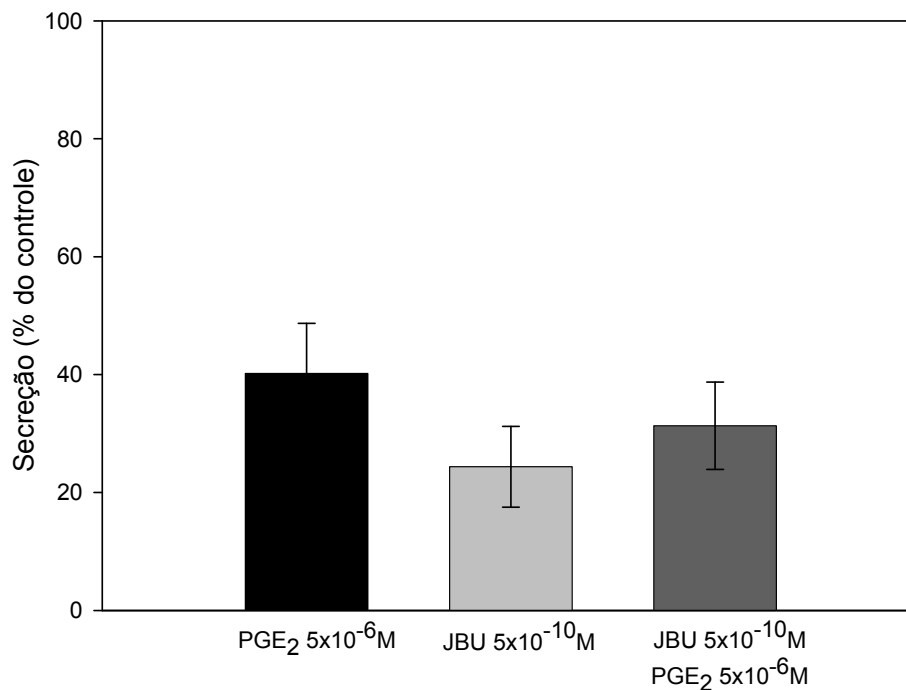


Figura 25: Efeito de PGE₂ na diurese. Túbulos estimulados com serotonina ($2,5 \times 10^{-8}$ M) foram tratados com PGE₂ (5×10^{-6} M) na presença ou ausência de JBU (5×10^{-10} M). Dados são expressos como porcentagem em relação ao controle (túbulos estimulados com serotonina na ausência de JBU e PGE₂). Valores são média e erro padrão.

O alvo da ação de PGE₂ nos túbulos ainda não é conhecido. Norregaard *et al.* (2007) demonstraram que, em rins de ratos, PGE₂ estimula a remoção de aquaporinas da superfície das células principais e que inibidores da ciclooxigenase (enzima da rota de degradação do ácido araquidônico) previnem a diminuição da expressão de aquaporinas. Uma vez que aquaporinas já foram descritas em túbulos de *R. prolixus* (Echevarria *et al.*, 2001), e também considerando que JBU não parece estar alterando o transporte iônico dos túbulos, esses canais são ótimos candidatos como possíveis alvos para JBU. Mais estudos nessa área são necessários para avaliar essa hipótese.

O mecanismo de ação em túbulos de Malpighi de *R. prolixus* proposto para JBU e Jaburetox 2Ec está resumido na figura 26. Tanto JBU quanto Jaburetox 2Ec devem agir através da interação com moléculas da membrana do túbulo, desencadeando diferentes rotas que levam ao efeito antidiurético.

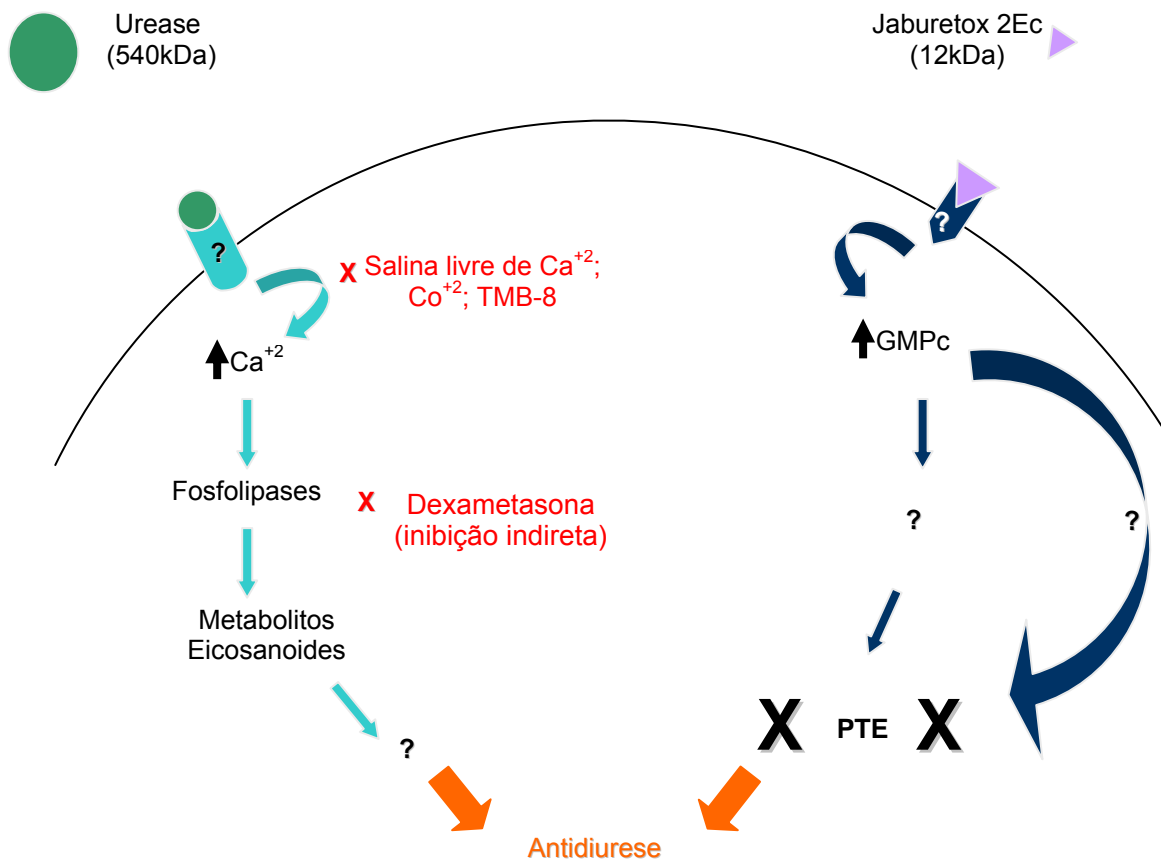


Figura 26: Possíveis rotas envolvidas na ação antidiurética de JBU e Jaburetox 2Ec. PTE: potencial transepitelial. "X" indicam bloqueio das respectivas etapas.

JBU, interagindo com fatores da membrana, pode levar a um aumento nos níveis de cálcio intracelular e ativação da atividade de fosfolipases. O aumento do cálcio intracelular é bloqueado pela adição de cloreto de cobalto (bloqueador extracelular não específico para canais de cálcio) e TMB-8 (antagonista intracelular

do cálcio), enquanto a ativação da fosfolipase é inibida por dexametasona. Essa atividade fosfolipásica age nos fosfolídeos de membrana, liberando ácido araquidônico, que entra na rota dos eicosanóides. Metabólitos dessa rota (possivelmente PGE_2), através de um mecanismo ainda não conhecido, levariam à antidiurese. Jaburetox 2Ec, também interagindo com moléculas da membrana, causa um aumento dos níveis de GMPc que, alterando o transporte de íons, inibe a secreção de fluídos.

4.3.3 – Comparação do efeito antidiurético de diferentes ureases

Para comparar o efeito de diferentes isoformas de urease, foi testado o efeito da CNTX e HPU na secreção dos túbulos de Malpighi.

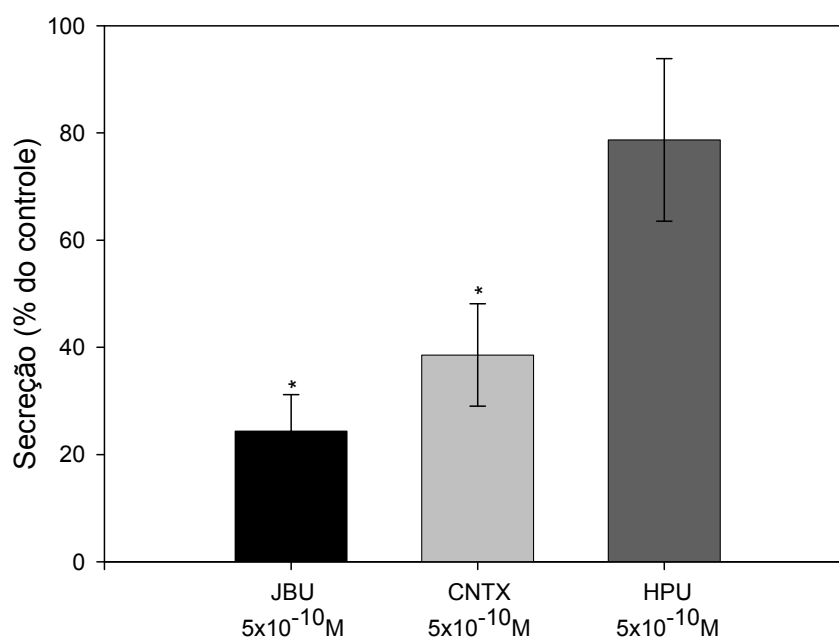


Figura 27: Comparação do efeito antidiurético de diferentes isoformas de urease (JBU, CNTX e HPU) na dose $5 \times 10^{-10} \text{ M}$. A inibição é expressa como porcentagem do controle (serotonina na ausência de urease). Valores são média e erro padrão. * indica valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,05$).

Não existe diferença entre o efeito de JBU e CNTX, mas HPU não inibe significativamente a secreção na dose testada. Usando 5×10^{-10} M, os níveis de inibição foram 75, 60 e 20% para JBU, CNTX e HPU, respectivamente (Fig. 27).

Ureases de plantas e bactérias compartilham algumas atividades biológicas, como agregação plaquetária e efeitos pro-inflamatórios (Oliveira-Severo *et al.*, 2006), mas diferem no efeito inseticida. Ureases vegetais são tóxicas para insetos, mas as bacterianas não, devido a ausência de parte da região correspondente ao peptídeo entomotóxico (Follmer *et al.*, 2004). É interessante observar que HPU não é capaz de inibir a secreção como JBU e CNTX, uma vez que o efeito dessas proteínas nos túbulos não parece estar relacionado ao peptídeo entomotóxico.

4.3.4 – Ação em diferentes tecidos musculares de *R. prolixus*

Estômago

A intensa diurese após a alimentação em *R. prolixus* exige um rápido movimento de água e íons do lúmen do estômago para a hemolinfa (Orchard, 2006). O estômago de *R. prolixus* tem a frequência de contrações aumentada 30s após o início da alimentação (Maddrell, 1964) e a serotonina (5×10^{-7} M) aumenta essa frequência de contrações *ex vivo*. Esse aumento na frequência de contrações contribui para a mistura do sangue ingerido na alimentação, facilitando o transporte de íons (Orchard, 2006). As contrações também homogenizam a hemolinfa e ajudam a circulação de hormônios em direção aos túbulos de Malpighi (Maddrell, 1964).

Alterações nessas contrações podem ocasionar mudanças nos processos fisiológicos desencadeados pela alimentação, inclusive na secreção de fluídos pelo inseto. Para avaliar se JBU/Jaburetox 2Ec influenciam esse processo, foi avaliado o efeito dessas proteínas nas contrações estimuladas por serotonina. O tratamento do tecido com JBU sozinha não causa nenhuma alteração significativa na frequência de contrações, quando comparada com salina. A adição de serotonina (5×10^{-7} M) aumenta a frequência de contrações em cerca de 3x (Fig. 28). Quando o tecido é

tratado com JBU, na presença de serotonina $5 \times 10^{-7} \text{M}$, observamos um aumento dose dependente na frequência de contrações, quando comparado com o tecido tratado somente com serotonina (Fig 28). Esse aumento chega a quase 5x para as doses 10^{-9} e 10^{-8}M de JBU.

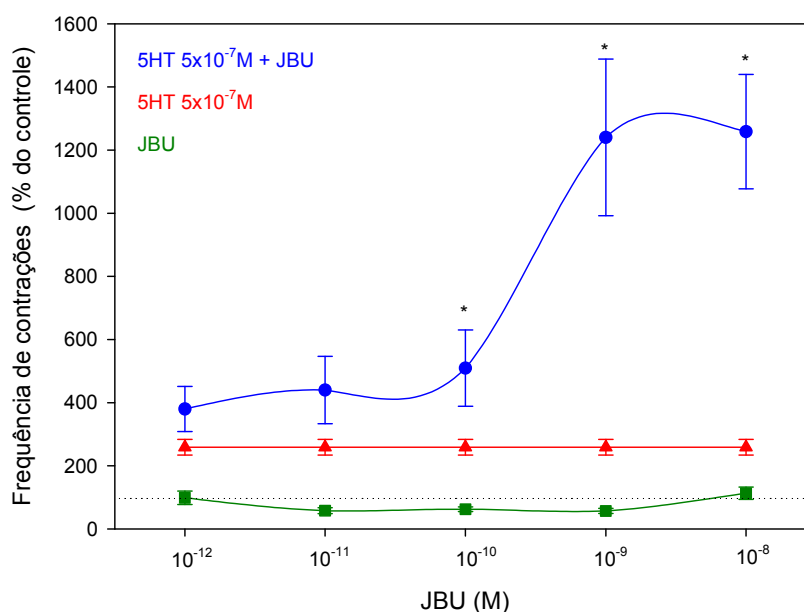


Figura 28: Efeito de JBU nas contrações estimuladas ou não por serotonina no estômago de *R. prolixus*. O estômago foi isolado de ninfas de quinto estágio e colocados em uma gota de $100 \mu\text{L}$ de salina. Os eletrodos do conversor de impedância foram colocados paralelamente ao intestino dentro da gota. O tecido foi então tratado com serotonina $5 \times 10^{-7} \text{M}$, JBU e JBU + serotonina, como descrito nos materiais e métodos. Valores são expressos como média e erro padrão de 8-10 replicatas. * indicam valores estatisticamente diferentes do tratamento somente com serotonina ($p \leq 0,05$).

Para avaliar se esse efeito de aumento na frequência da contrações era dependente de serotonina, as contrações foram estimuladas com o análogo de AMPc, 8-bromo-AMPc (Fig 29). Observamos que JBU também causa um aumento

na frequência das contrações estimuladas por AMPc, mas não de maneira tão expressiva como no estímulo por serotonina.

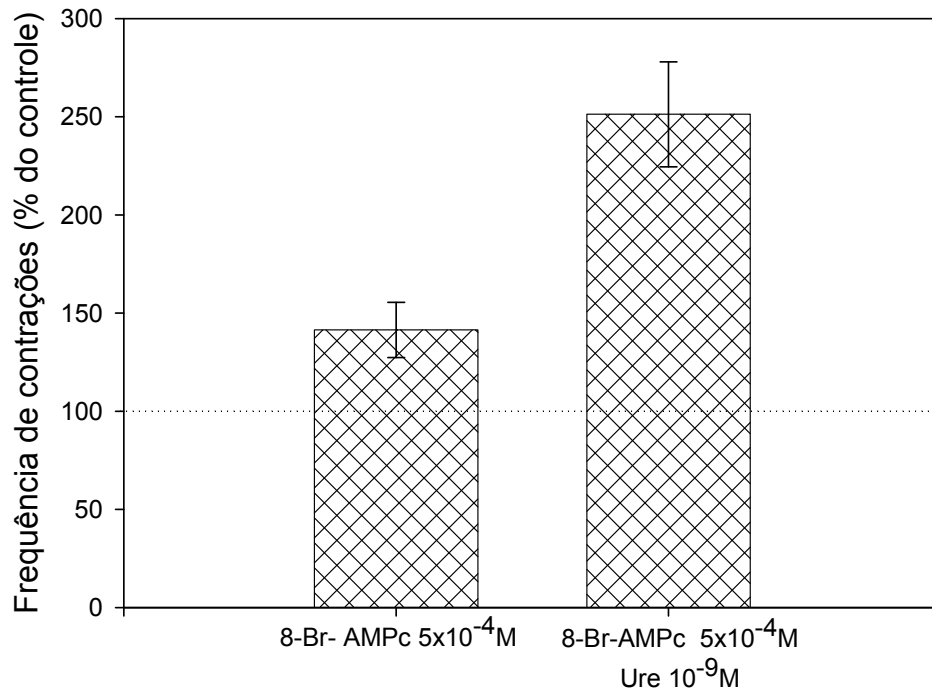


Figura 29: Efeito de JBU nas contrações do intestino anterior estimuladas com análogo de AMPc (5×10^{-4} M). Dados são mostrados como porcentagem em relação ao controle (salina). Valores são expressos como média e erro padrão.

Além das contrações, outro processo importante é o transporte de água e íons para a hemolinfa (Orchard, 2006). Para avaliar o efeito de JBU no transporte de fluídos através do epitélio do estômago, JBU foi injetada no lúmen desses intestinos, formando “bolsas” de tecido preenchidas com JBU (10^{-9} M) ou salina (controle). O peso dessas “bolsas” foi medido logo após a injeção e 30 min após incubação com salina ou serotonina, e o volume transportado através do epitélio foi calculado (Fig. 30).

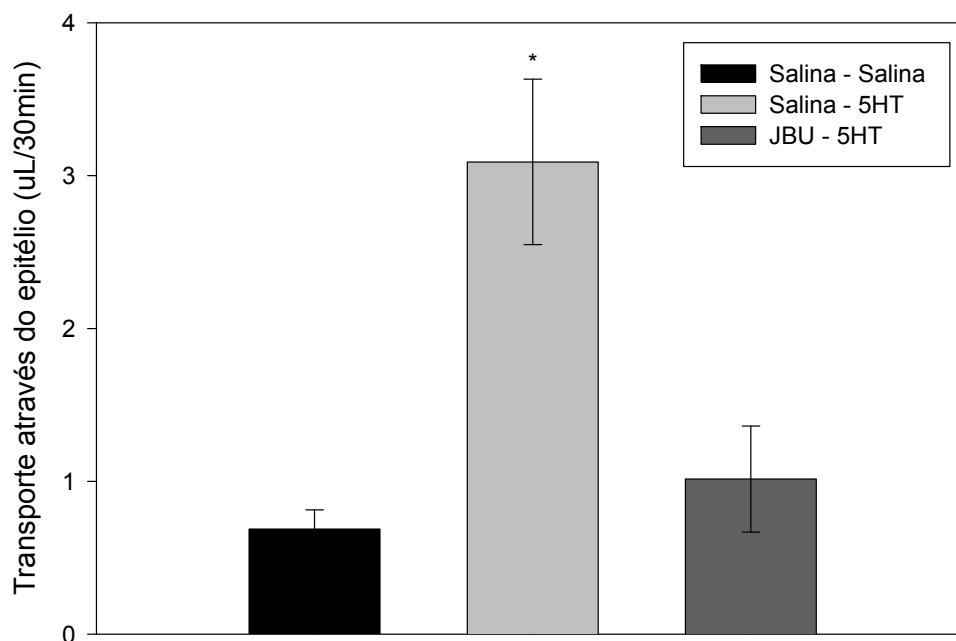


Figura 30: Transporte de fluídos através do epitélio do estômago. Estômagos isolados foram inoculados com salina (controle) ou JBU (10^{-9} M) e incubados por 30 min com salina ou serotonina (10^{-6} M). O peso antes e após a incubação foi medido e o volume de fluido transportado foi calculado.

O transporte de fluido dependente de sódio concentra as proteínas do plasma e células vermelhas do sangue no lúmen do intestino anterior, movendo água, sódio e cloreto até a hemolinfa, para serem eliminados durante a diurese (Farmer *et al.*, 1981). *In vitro*, esse transporte é estimulado quando serotonina (2×10^{-7} M) ou AMPc (2×10^{-3} M) são aplicados exteriormente ao tecido (Farmer *et al.*, 1981). Nossos resultados mostram um aumento de cerca de 4 vezes no transporte de fluido quando salina é injetada no lúmen e serotonina (10^{-6} M) é aplicada externamente (Fig. 30). Esse aumento não ocorre quando JBU (10^{-9} M) é injetado e serotonina é aplicada

externamente, indicando que JBU perturba o transporte de fluídos no intestino anterior e isto poderia contribuir para a diminuição da perda de peso observada *in vivo*.

CNTX

Em estudos anteriores do nosso grupo, mostrou-se que a CNTX não apresenta nenhum efeito em diferentes tipos de preparações de órgãos e músculos isolados vertebrados (Carlini *et al.*, 1984), tornando importante mostrar se os efeitos observados com JBU seriam exclusivos dessa isoforma de urease ou se também seriam desencadeados pela CNTX. O ensaio de estômago foi então realizado com CNTX (Fig 31).

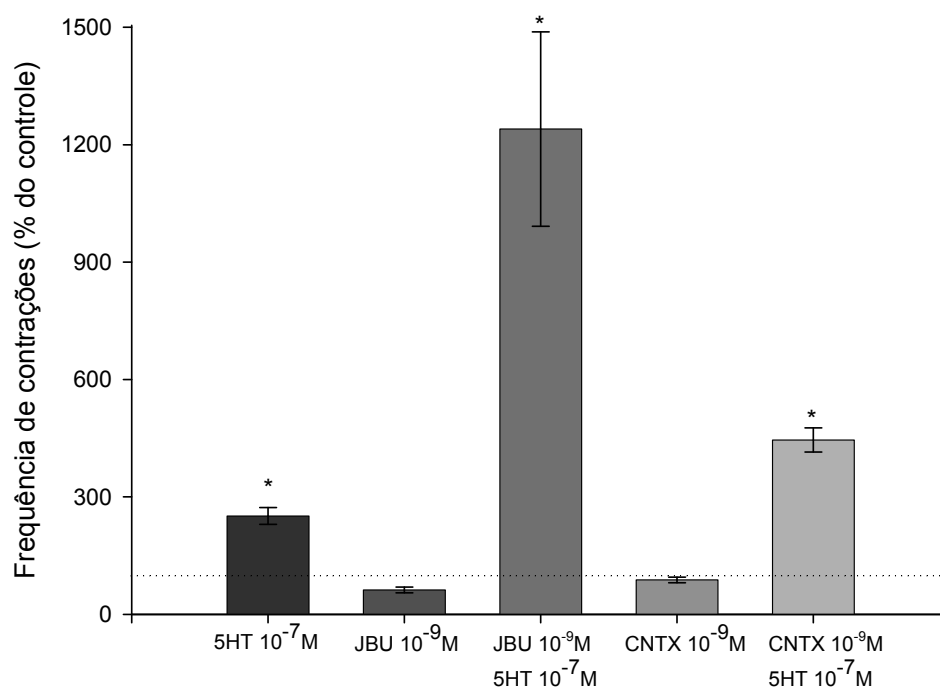


Figura 31: Efeito das duas isoformas de urease de *C. ensiformis* (JBU e CNTX) na frequência de contrações do estômago de *R. prolixus*. Os dados são expressos como porcentagem do controle (salina). Os valores são média e erro padrão de 6-8 duplicatas. * indica valores estatisticamente diferentes do controle ($p \leq 0,05$).

Comprovamos que a CNTX também afeta as contrações do estômago, aumentando significativamente a frequência das contrações estimuladas com serotonina. Na ausência de serotonina, CNTX não causa nenhuma alteração no tecido. A diferença na potência de ação observada entre JBU e CNTX poderia ser explicada pela estrutura da proteína nativa. JBU é um hexâmero, enquanto a CNTX é um dímero. Ainda não sabemos se os efeitos observados são desencadeados pela proteína nativa ou se ocorre a desnaturação da estrutura quaternária e o monômero da proteína é o responsável pelas ações das ureases. Se for o monômero o fator ativo, ao usarmos a mesma dose molar para as duas isoformas (calculada levando em consideração a proteína nativa), haveria 3x mais monômeros de JBU do que de CNTX, o que poderia explicar a diferença observada entre o efeito das duas isoformas.

Existem poucos dados publicados a respeito da morfologia dos músculos e dos receptores presentes no estômago de insetos, especialmente de *R. prolixus*. Essa falta de informações detalhadas dificulta a comparação dos resultados obtidos em insetos com os dados mostrados para vertebrados. É visível que o efeito das ureases no estômago é dependente da presença de serotonina. Receptores de serotonina já foram caracterizados no estômago do gafanhoto *Schistocerca gregaria* (Banner *et al.*, 1987). O receptor presente no estômago desse inseto tem propriedades em comum com os receptores de mamíferos 5HT₂. No estômago de adultos machos de *R. prolixus* também foi caracterizado um receptor de serotonina do tipo 5HT₂ (Barret *et al.*, 1993). É possível que as ureases estejam agindo como agonistas desse tipo de receptor, potenciando o efeito da serotonina nas contrações do estômago. Barret *et al.* (1993) mostraram que serotonina causa um aumento nos níveis de AMPc no estômago de *R. prolixus*, sendo esse o segundo mensageiro utilizado pela serotonina. O fato de JBU não aumentar tão drasticamente a frequência das contrações estimuladas por 8-bromo-AMPc (Fig. 29) como acontece com as contrações estimuladas por serotonina (Fig. 28), reforça a hipótese de que JBU pode estar agindo como um modulador positivo dos receptores de serotonina.

Uma das principais dificuldades em se caracterizar receptores, não só para serotonina, em tecidos de insetos é o fato dos compostos farmacológicos (agonistas e antagonistas) terem sido desenvolvidos para sistemas vertebrados. Vertebrados e invertebrados provavelmente utilizem diferentes receptores para a comunicação celular (Osborne *et al.*, 1990), não permitindo comparações mais concretas entre os dados obtidos em sistemas vertebrados e invertebrados.

Jaburetox 2Ec

Para verificar se, assim como nos túbulos de Malpighi, Jaburetox 2Ec também age sobre tecidos musculares de *R. prolixus*, o efeito desse peptídeo nas contrações do estômago também foi avaliado (Fig. 32).

Assim como JBU, Jaburetox 2Ec também aumenta a frequência das contrações estimuladas por serotonina. A curva de dose resposta para Jaburetox 2Ec apresenta um comportamento não usual, como foi visto também no ensaio com os túbulos de Malpighi. Todas as doses aumentam significativamente a frequência das contrações do estômago, mas com uma potência menor do que a observada para JBU. Como nos túbulos de Malpighi, é possível que JBU e Jaburetox 2Ec estejam agindo através de rotas diferentes. Mais estudos farmacológicos poderão esclarecer esses efeitos.

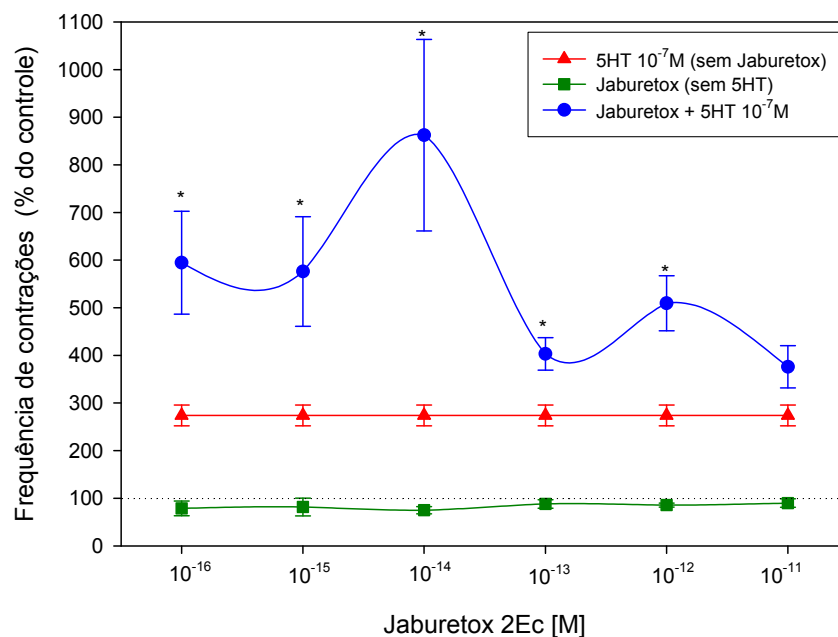


Figura 32: Efeito de Jaburetox 2Ec na frequência de contrações do estômago de *R. prolixus* estimuladas ou não por serotonina. O estômago foi isolado de ninfas de quinto estágio e colocados em uma gota de 100 μ L de salina. Os eletrodos do conversor de impedância foram colocados paralelamente ao intestino dentro da gota. O tecido foi então tratado com serotonina 5×10^{-7} M, Jaburetox 2Ec e Jaburetox 2Ec + serotonina, como descrito nos materiais e métodos. Valores são expressos como média e erro padrão de 8-10 replicatas. * indicam valores estatisticamente diferentes do tratamento somente com serotonina ($p \leq 0,05$).

Intestino Posterior

A eliminação da urina em *R. prolixus* se dá pelo intestino posterior, que está sob controle de nervos originados no MTGM (Orchard, 2006). Como em outros tecidos existe um plexo nervoso, serotoninérgico, no intestino posterior e a serotonina estimula a frequência de contrações (Barret *et al.*, 1993). A ação da serotonina ajuda na expulsão da excreção, na mistura do conteúdo do intestino e

também auxilia na homogeneização da hemolinfa localmente. Essa homogeneização da hemolinfa é altamente importante, uma vez que os túbulos de Malpighi estão ao lado do intestino posterior, em uma massa bastante enovelada (Orchard, 2006).

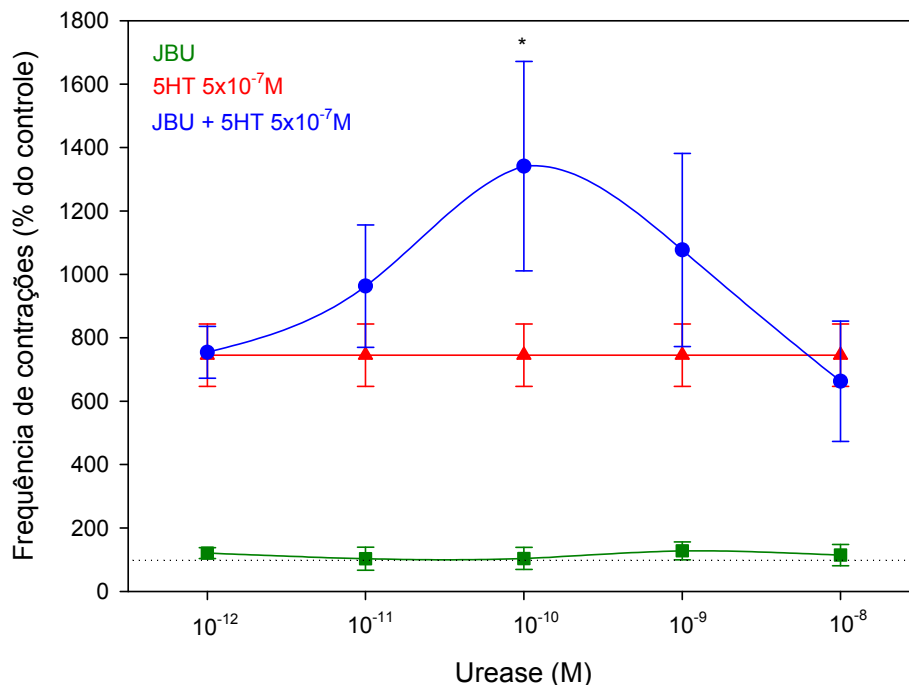


Figura 33: Efeito de JBU nas contrações do intestino posterior espontâneas ou estimuladas por serotonina em *R. prolixus*. Dados são expressos como porcentagem do controle (salina). Os valores são mostrados como média e erro padrão. * indica valores estatisticamente diferentes do grupo tratado com serotonina.

Na dose de 10^{-10} M, JBU causa um efeito semelhante ao observado no estômago, aumentando a frequência das contrações (Fig. 33).

Para avaliar se JBU também causava alterações na amplitude das contrações e no tônus basal do intestino posterior, ensaios usando um transdutor de força foram realizados.

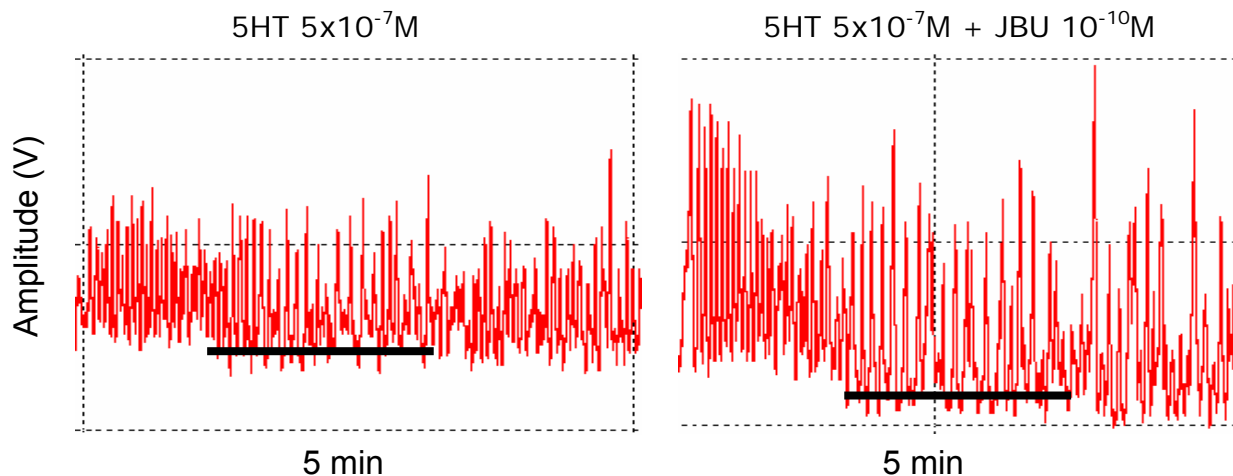


Figura 34: Traçado típico do ensaio de intestino posterior do transdutor de força. A linha indica o tônus basal do tecido no momento do ensaio.

Analizando o traçado do ensaio no transdutor de força (Fig.34), utilizando JBU na dose 10^{-10} M, podemos observar o aumento da amplitude das contrações na presença de JBU, assim como uma mudança no tônus basal (indicada pela linha preta na base do traçado). Quatro repetições para cada dose de JBU foram feitas e os valores de amplitude de contração foram calculados e estão apresentados na Fig. 35.

Todas as doses de JBU testadas aumentam significativamente a amplitude das contrações estimuladas por serotonina.

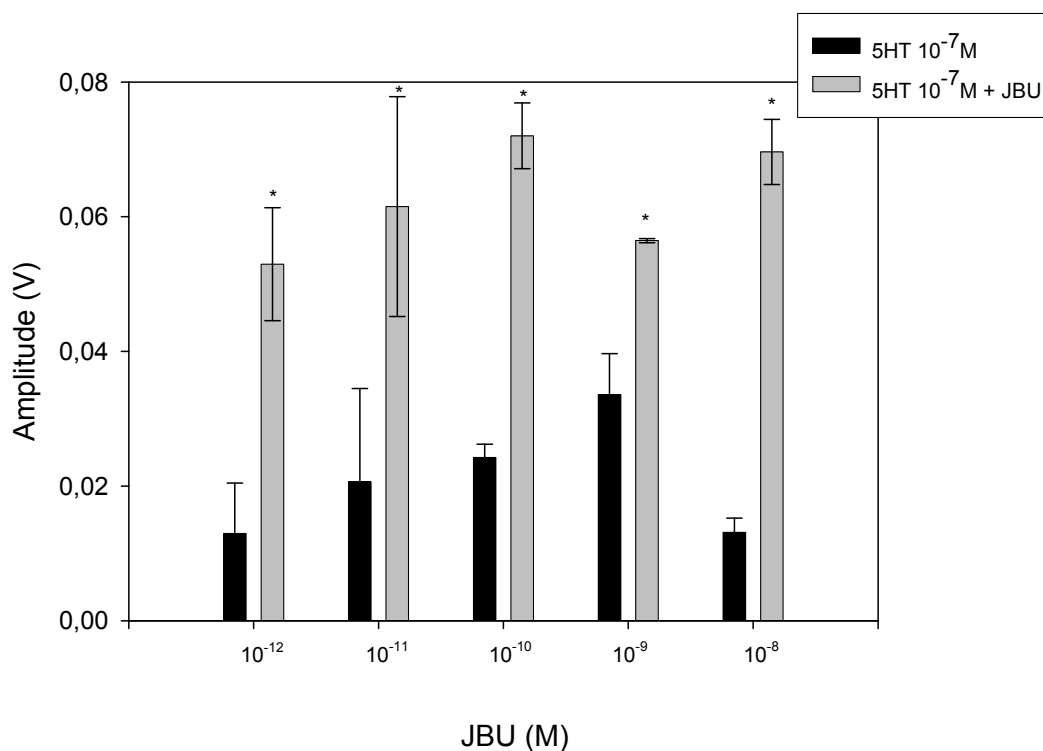


Figura 35: Efeito de JBU na amplitude das contrações estimuladas por 10^{-7} M serotonina. Valores são mostrados como média e desvio padrão. * indicam valores estatisticamente diferentes do controle (serotonina sem JBU) para $p \leq 0,05$.

Em invertebrados, o movimento peristáltico de intestino envolve as contrações coordenadas de músculos longitudinais e circulares (Mercier e Lee, 2002). O tônus basal é atribuído aos músculos circulares, enquanto a amplitude e frequência são decorrentes das contrações dos músculos longitudinais. Como JBU altera tanto o tônus basal quanto a frequência e amplitude das contrações, podemos inferir que os dois tipos musculares são afetados por essa proteína. Estudos farmacológicos são necessários para esclarecer o mecanismo de ação das ureases nos diferentes tecidos musculares testados.

Os resultados obtidos avaliando as contrações dos intestinos anterior e posterior foram inesperados. Considerando que fatores diuréticos, como a

serotonina, aumentam a frequência e intensidade das contrações do intestino anterior e posterior (Orchard, 2006), esperávamos que fatores antidiuréticos como JBU e Jaburetox 2Ec, que reduzem a secreção dos túbulos de Malpighi, reduzissem (ou ao menos não alterassem) a frequência/intensidade das contrações, especialmente do intestino posterior. Porém, apesar de inesperados, os resultados não são contraditórios ao efeito antidiurético observado. Uma vez que JBU reduz o transporte de fluídos através do epitélio do estômago, todo o processo de diurese fica comprometido, independente do aumento das contrações do trato digestivo. A alimentação em insetos hematófagos como *R. prolixus* desencadeia uma série de eventos fisiológicos finamente coordenados e bastante complexos e qualquer alteração nesses processos pode levar a um desequilíbrio no organismo.

Vaso dorsal

O vaso dorsal (aorta) transporta hemolinfa da parte posterior para a cabeça de *R. prolixus*. Durante a alimentação, o tamanho do intestino anterior repleto de sangue pode bloquear a circulação de hemolinfa, e o aumento do fluxo de hemolinfa transportada pelo vaso dorsal pode se contrapor a esse efeito (Orchard, 2006). Barker e Davey (1981) e Davey e Chiang (1989) também sugerem que o vaso dorsal seja um caminho de transporte de neurohormônios na hemolinfa. A serotonina aumenta a frequência de contrações do coração (região do vaso dorsal localizada nos segmentos posteriores do abdomen) de maneira dose dependente (Chiang *et al.*, 1992).

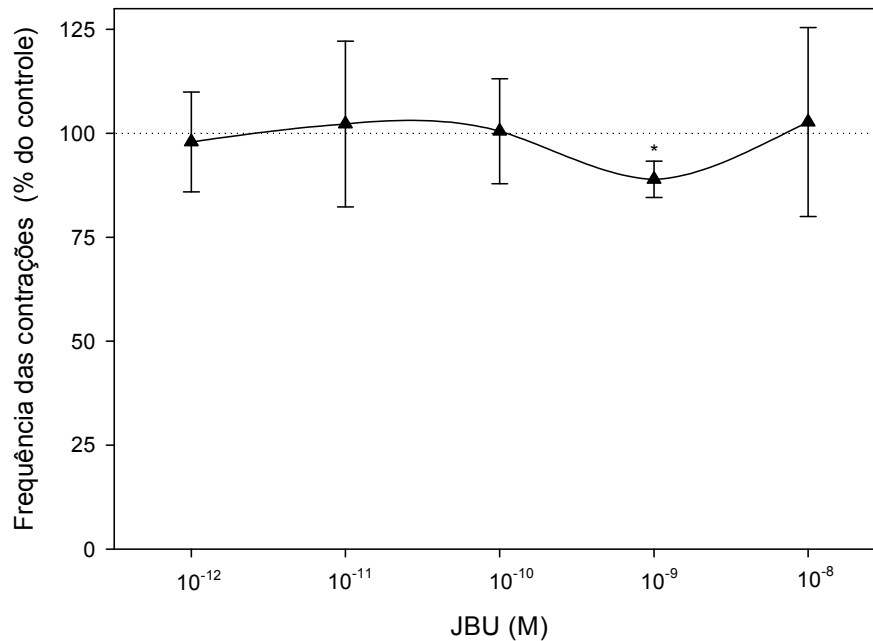


Figura 36: Efeito de JBU na frequência de contrações do vaso dorsal. Insetos de quinto estágio foram abertos e o trato digestivo foi retirado, para expor o vaso dorsal. Os eletrodos do conversor de impedância foram colocados paralelamente ao vaso dorsal, no penúltimo segmento do abdômen para monitoração da frequência das contrações.

O efeito de JBU nas contrações espontâneas do vaso dorsal foi avaliado *ex vivo* (Fig 36). Nenhum efeito significativo na frequência de contrações foi causado por JBU. Na dose de 10^{-9} M, houve uma redução na frequência das contrações. Somente nessa dose, após a aplicação de JBU, foi observada um parada nas contrações, de duração variável. Após essa parada, as contrações voltam a frequência normal (Fig. 37).

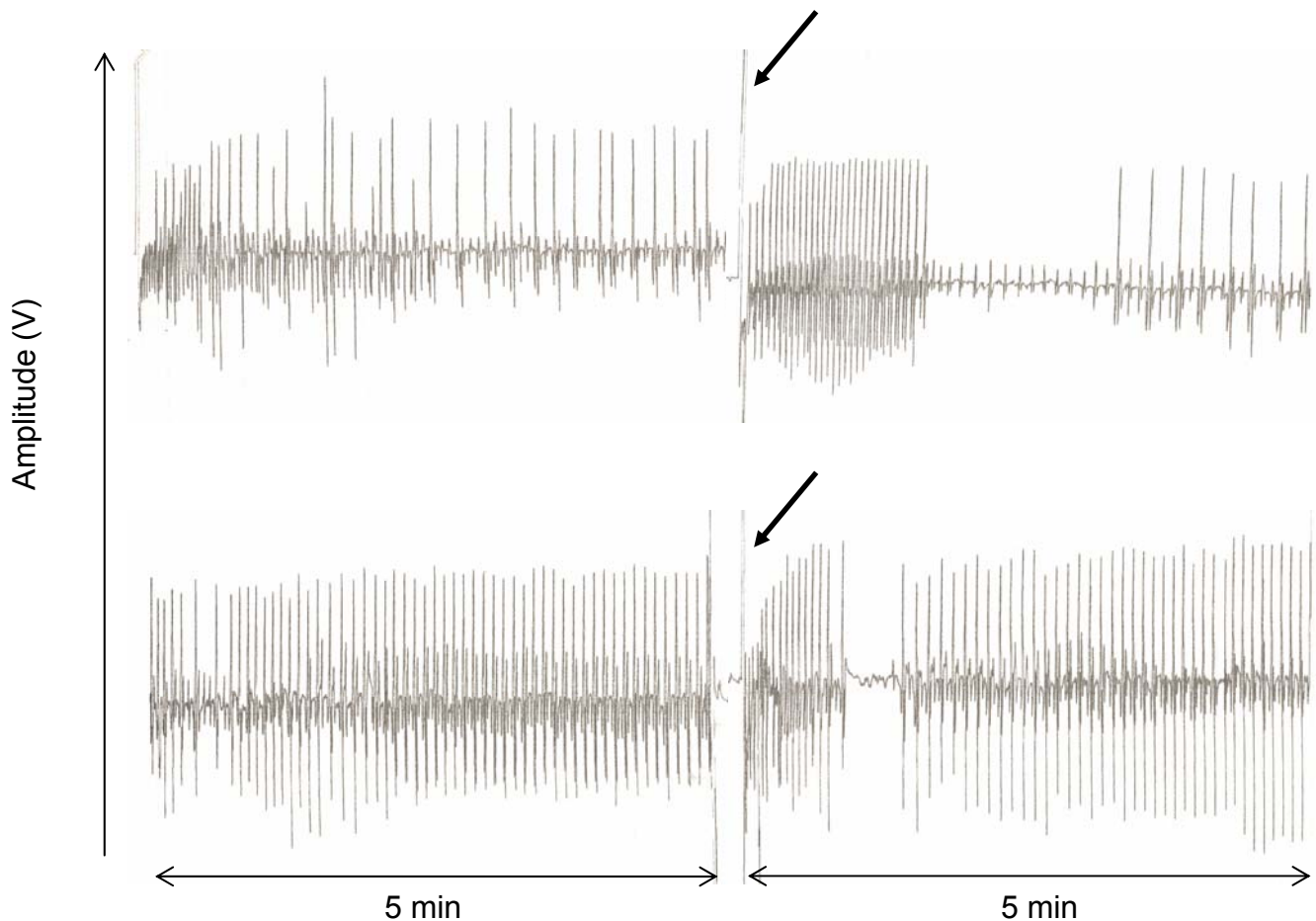


Figura 37: Traçados típicos do ensaio de monitoração das contrações do vaso dorsal no conversor de impedância. Cada flexão do traçado representa uma contração. As contrações voluntárias são monitoradas em salina e após a adição de JBU (indicada pela seta).

Sarkar *et al.* (2003) relatam o efeito de um peptídeo tipo alatostatina isolado de *Diploptera punctata* sobre as contrações do vaso dorsal de *R. prolixus*. A aplicação desse peptídeo na preparação do tecido causa, primeiramente, um aumento nas contrações, seguido por uma inibição completa das contrações peristálticas. Esse período de inibição é seguido por um retorno ao normal da frequência das contrações. Especula-se que esses peptídeos perturbem o funcionamento do “marca-passo” do coração de *R. prolixus* e, conseqüentemente, iniba as contrações. É possível que JBU esteja agindo da mesma maneira.

É intrigante o fato de somente uma dose de JBU causar alteração nas contrações espontâneas do vaso dorsal. *In vivo*, uma faixa de ação tão restrita pode não ser atingida e possivelmente JBU não cause nenhuma alteração nesse tecido. Nos intestinos anterior e posterior, JBU somente altera a frequência/intensidade das contrações estimuladas por serotonina, não tendo nenhum efeito significativo nas contrações espontâneas. O efeito de JBU nas contrações do vaso dorsal estimuladas por serotonina não foi avaliado.

4.3.5 – Efeito da alimentação com JBU na secreção de serotonina

A alimentação em *R. prolixus* estimula a liberação de serotonina, a partir de uma rede extensa de processos que partem da massa mesotoraxica ganglionar (MTGM), e inervam o integumento abdominal ventral e dorsal (Lange *et al.*, 1988 e 1989; Orchard *et al.*, 1989). Processos serotoninérgicos também se projetam até o sistema digestório, incluindo as glândulas salivares, o esôfago, os intestinos anterior e posterior, e o vaso dorsal (Orchard *et al.*, 2006). Além disso, a serotonina é liberada na hemolinfa após a alimentação, agindo como um neurohormônio e estimulando a secreção dos túbulos de Malpighi em até 1000x (Orchard *et al.*, 2006).

A redução de perda de peso observada após a alimentação de *R. prolixus* com urease (Carlini *et al.*, 1997) poderia ser decorrente da inibição da liberação de serotonina, bloqueando os processos fisiológicos coordenados por esse hormônio. Para testar essa hipótese, ninfas de quinto estágio de *R. prolixus* (em jejum a aproximadamente 7 semanas), foram alimentadas com JBU e a liberação de serotonina dos neurônios medianos dorsais não pareados (DUMs) foi avaliada (Fig. 38).

Observamos que há uma marcação intensa dos DUMs para serotonina, nos insetos não alimentados (Fig. 38A) e que a alimentação induz a liberação dessa serotonina (Fig. 38B).

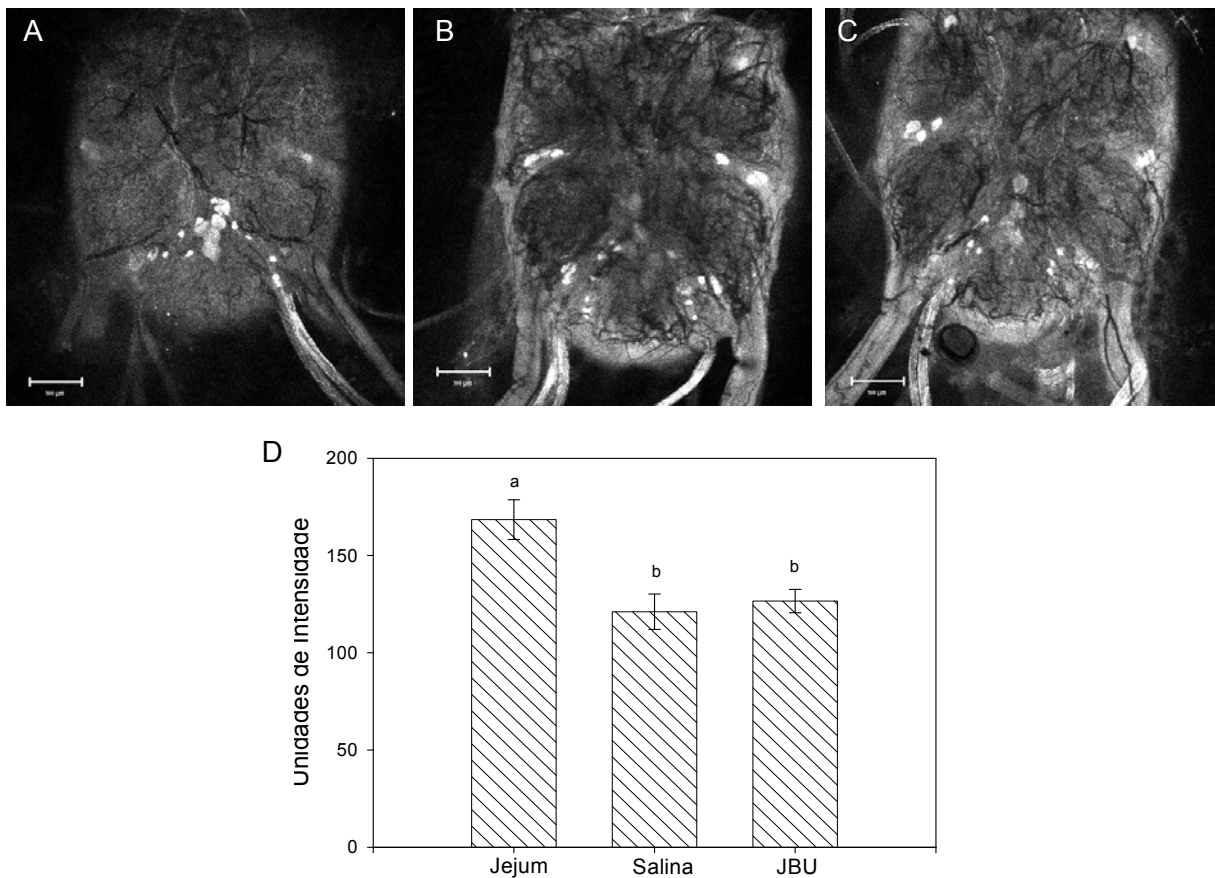


Figura 38: Microscopia confocal do MTGM de *R. prolixus* marcado com anticorpo anti-serotonina. MTGM foi isolado de insetos em jejum (A), alimentados com salina (B) e alimentados com salina + JBU (C). Os insetos foram dissecados 15min após o início da alimentação. A barra indica 100 μm. (D) Quantificação da intensidade de marcação para serotonina dos DUMs de insetos em jejum ou alimentados com salina ou JBU. Os dados são apresentados como média e desvio padrão das unidades (arbitrárias) de intensidade de 4-5 MTGMs. Colunas com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Usando o software de domínio público “Image J” (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA), a intensidade de coloração dos DUMs de cada tratamento foi medida (Fig. 38D). A alimentação com JBU não causa nenhuma alteração na liberação de serotonina quando comparada com os insetos alimentados com salina.

A mesma avaliação foi feita para MTGMs dissecados 3 e 24 h após a alimentação, e nenhuma diferença entre os insetos alimentados somente com salina ou com salina e JBU foi observada (dados não mostrados).

Também avaliamos a presença de serotonina em diferentes órgãos que têm sua função regulada por esse hormônio e estão envolvidos no processo de alimentação. Glândulas salivares e esôfago foram dissecados e a presença de serotonina foi avaliada (Fig. 39), além dos intestinos anterior e médio e a cutícula dorsal (dados não mostrados). A alimentação com JBU não causa alteração no padrão/intensidade de marcação do anticorpo anti-serotonina nesses tecidos, nos tempos avaliados (15min, 3h e 24 h).

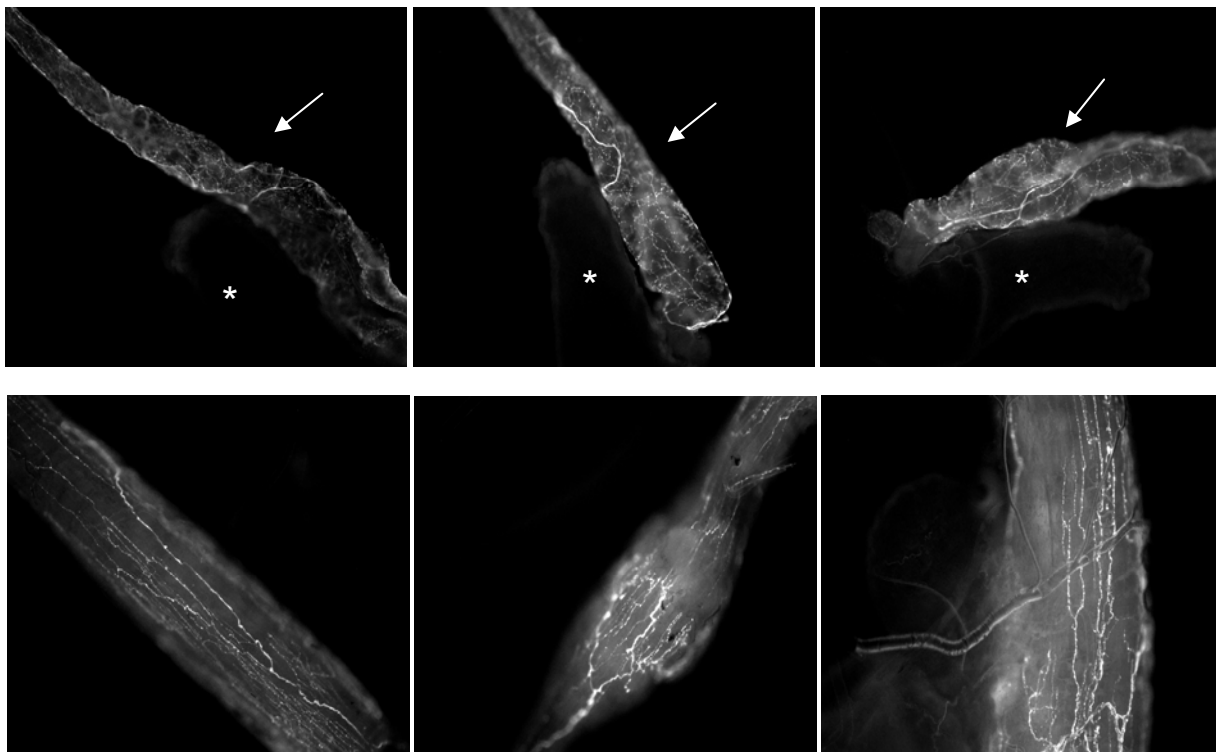


Figura 39: Imagens em microscópio de epifluorescência. Marcação com anticorpo anti-serotonina nas glândulas salivares (A, B e C) e esôfago (D, E e F) de insetos em jejum (A e D) ou alimentados com salina (B e E) ou alimentados com JBU (C e F). Anticorpo secundário marcado com FITC. Em A, B e C, as setas indicam o ducto das glândulas salivares e os asteriscos indicam a glândula, que não é corada.

Esses dados são uma forte evidência que JBU não causa a redução de perda de peso em *R. prolixus* por bloquear a liberação do hormônio diurético serotonina. A serotonina não é o único hormônio envolvido na diurese e nos processos desencadeados pela alimentação, e outros hormônios/peptídeos poderiam ter sua liberação/ação alterada após a alimentação com JBU.

4.3.6 – Efeitos *in vitro* x efeitos *in vivo*

Diversos ensaios de alimentação artificial e coleta da hemolinfa em diferentes tempos pós-alimentação foram realizados, com o intuito de avaliar quando e em que concentrações JBU aparece na hemolinfa. ELISA e western blots foram empregados, porém não foi possível determinar se JBU passa intacta pelo epitélio do estômago, provavelmente por causa das pequeníssimas quantidades de JBU testadas. Proteínas como BSA e algumas lectinas são capazes de atravessar o epitélio do trato digestivo de *Nilaparvata lugens* (Gatehouse *et al.*, 1998), *Lacanobia oleracea* (Fitches *et al.*, 2001) e *Bombyx mori* (Casartelli *et al.*, 2005). A urease de *Morus alba* também é capaz de atravessar o epitélio do intestino de *Bombyx mori*, sendo encontrada ativa na hemolinfa do inseto (Hirayama *et al.*, 2000 e Kurahashi *et al.*, 2005). Portanto, não é improvável que JBU possa cruzar o epitélio do intestino de *R. prolixus* e que os efeitos observados *in vitro* ocorram também *in vivo*. Além disso, para os efeitos observados com estômago, a alteração no transporte de fluídos foi observada quando JBU foi administrada no lúmen do órgão. Então, mesmo que JBU não passe pelo epitélio, a diminuição de perda de peso *in vivo* poderia ser decorrente de alterações causadas no estômago.

5. CONCLUSÕES

A liberação de fragmento(s) entomotóxico(s) a partir de ureases vegetais, assim como o mecanismo de ação dessas ureases e fragmentos, são processos bastante complexos. Conseguimos caracterizar várias etapas desses processos, esclarecendo pontos chaves e levantando evidências para guiar trabalhos futuros.

5.1 – Do efeito inseticida de ureases e peptídeos derivados

CNTX, JBU e Jaburetox 2Ec se mostraram tóxicos para diferentes espécies de insetos. Essa toxicidade tornam esses compostos potenciais ferramentas para o controle de pragas, uma vez que a busca por inseticidas de origem não química é uma área de grande interesse agrícola e ambiental.

5.2 – Do processamento das ureases por enzimas digestivas de insetos

A liberação de um peptídeo (reativo ao anticorpo antiJaburetox 2Ec) a partir de JBU e CNTX parece ser mediada por aspártico proteinases presentes no trato digestivo dos insetos. Entretanto, a presença de cisteíno proteinases na fração que cliva as ureases e o bloqueio da liberação do peptídeo por Pep-A e também por E-64, pode ser um indicativo de um processamento dependente de mais de uma enzima.

O processamento das ureases por formas jovens e adultas dos insetos é diferenciado e este fato pode explicar a diferença de susceptibilidade às ureases durante os dois estágios de vida do inseto. O perfil de clivagem dos substratos correspondentes aos sítios de liberação do peptídeo entomotóxico a partir da JBU indica que adultos possivelmente não formem o peptídeo entomotóxico em concentrações suficientes para que o efeito tóxico ocorra.

5.3 – Da ação das ureases e Jaburetox 2Ec na diurese de insetos

Ambas isoformas de urease de *C. ensiformis* e Jaburetox 2Ec atuam sobre os túbulos de Malpighi de *R. prolixus*, diminuindo a secreção de fluídos. Esse efeito pode ser o responsável pela diminuição de peso observada *in vivo* em insetos alimentados com CNTX.

JBU e Jaburetox 2Ec ativam diferentes rotas que levam ao mesmo efeito (antidiurese). Para JBU, evidenciamos que metabólitos de eicosanóides e cálcio são os mensageiros de sua ação, enquanto GMPc é o mensageiro da ação antidiurética de Jaburetox 2Ec.

JBU diminui o transporte de fluídos através do epitélio do estômago de *R. prolixus*, efeito que também contribui para a ação antidiurética.

JBU e Jaburetox 2Ec influenciam a frequência de contrações do estômago. JBU também altera a frequência e amplitude do intestino posterior, além de alterar o tônus basal do músculo.

Todos esses dados evidenciam a influência das ureases e peptídeos derivados em processos fisiológicos importantes para o inseto. Esses efeitos provavelmente contribuem para o efeito tóxico dessas proteínas.

6. Referências

Alves E.W., Teixeira-Ferreira A., Teixeira-Ferreira C. & Carlini C.R. (1992). Effects of canatoxin on the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum membranes. *Toxicon* 30:1411-1418.

Aston R.J. (1975). The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in relation to the diuretic hormone of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 21:1873-1877.

Azambuja P. & Garcia E.S. (1995). Care and maintenance of triatomine colonies. In: The molecular biology of insect disease vector: A methods manual. Eds. Crampton, J.M.; Beard C.B. & Louis, K., WHO/TDR.

Banner S.E., Osborne R.H. & Cattell K.J. (1987). The pharmacology of the isolated foregut of the locust *Schistocerca gregaria* – II. Characterization of a 5HT₂-like receptor. *Comp. Biochem. Physiol.* 88:139-144.

Barcellos G.B.S, Almeida L.A., Moreira R.A., Sousa-Cavada B., Oliveira J.T.A. & Carlini C.R. (1993). Canatoxin-, concanavalin A-, and canavalin-cross reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Planta* 189:397-402.

Barker J.K. & Davey K.G. (1981). Neuroendocrine regulation of protein accumulation by the transparent accessory reproductive gland of male *Rhodnius prolixus*. *Int. J. Invertebr. Repro.* 3:291-296.

Barret F.M., Orchard I. & Te Brugge V. (1993). Characteristics of serotonin-induced cyclic AMP elevation in the integument and anterior midgut of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 39:581-587.

Barrett M. & Orchard I. (1990). Serotonin-induced elevation of cyclic AMP levels in the epidermis of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 36:625–633.

Barja-Fidalgo C., Guimarães J.A. & Carlini C.R. (1991a). Canatoxin, a plant protein, induces insulin secretion from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 128:675-679.

Barja-Fidalgo C., Guimarães J.A. & Carlini C.R. (1991b). Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* 29:453-459.

Blum H., Beier H. & Gross H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Carlini C.R. & Guimarães J.A. (1981) Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19:667-676.

Carlini C.R., Barcellos G.B.S., Baeta-Neves A.D.V. & Guimarães J.A. (1988). Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin-A among proteins from leguminous seeds. *Phytochemistry* 27:25-30.

Carlini C.R., Oliveira A.E., Azambuja P., Xavier-Filho J. & Wells M.A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90:340-348.

Carlini C.R., Gomes C.B., Guimarães J.A., Markus R.P., Sato H. & Trolin, G. (1984). Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacol. Tox.* 54:161-166.

Carlini C.R., Ferreira-Da Silva C.T. & Gombarovits M.E.C. (2000). Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina: Processo de Produção. Patente No. 0003334-0, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil.

Carlini C.R. & Grossi-de-Sá M.F. (2002). Plant Toxic Proteins with Insecticidal Properties. A Review on their Potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.

Carlini C.R., Guimarães J.A. & Ribeiro J.M.C. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidences for the involvement of platelet lipoxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 84:551-560.

Carozzi N. & Koziel M. (1997). In: *Advances in Insect Control. The Role of Transgenic Plants.* Taylor and Francis, UK.

Casartelli M., Corti P., Giovanna Leonardi M., Fiandra L., Burlini N., Pennacchio F. & Giordana B. (2005). Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva. *J. Insect Physiol.* 51:933-940.

Channon J.Y. & Leslie C. (1990). A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J. Biol. Chem.* 265:5409–5413.

Chiang R.G., Chiang J.A. & Davey K.G. (1992). A sensory input inhibiting heart rate in an insect *Rhodnius prolixus*. *Experimentia* 48:1122–1125.

Coast G.M. (1996). Neuropeptides implicated in the control of diuresis in insects. *Peptides.* 17:327-36. Review.

Cristofolletti P.T., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (2005). The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35:883-901.

Davey K.G & Chiang R.G. (1989). The effect of severing the dorsal vessel on egg production in *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 11:139-146.

Davies S.A., Huesmann G.R., Maddrell S.H.P., O'Donnell M.J., Skaer N.J.V., Dow J.A.T. & Tublitz N.J. (1995). CAP2b, a cardioacceleratory peptide, is present in *Drosophila* and stimulates tubule fluid secretion via cGMP. *Am. J. Physiol.* 269:1321-1326.

Daly H.V., Doyen J.T. & Alexander H. Purcell (1998). Introduction to Insect Biology and Diversity. Second Edition. Oxford University Press, New York.

Echevarria M., Ramirez-Lorca R., Hernandez C.S., Gutierrez A., Mendez-Ferrer S., Gonzalez E., Toledo-Aral J.J., Ilundain A.A. & Whitembury G. (2001). Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. Pflugers Arch. 442:27-34.

Eigenheer R.A., Nicolson S.W., Schegg K.M, Hull J.J & Schooley D.A. (2002). Identification of a potent antidiuretic factor acting on beetle Malpighian tubules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:84-89.

Farmer J., Maddrell S.H.P. & Spring J.H. (1981). Absorption of fluid by the midgut of *Rhodnius prolixus*. J. Exp. Biol. 94:301-306.

Ferreira-DaSilva C.T. (1998) Proteolytic Activation of Canatoxin by Cathepsin-like Enzymes. Studies of Effects in the Different Phases of *Rhodnius prolixus* Life Cycle. Tese de Mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ferreira-DaSilva C.T., Gombarovits M.E., Masuda H., Oliveira C.M. & Carlini C.R. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. Arch. Insect Biochem. Physiol. 44:162-171.

Fitches E., Woodhouse S.D., Edwards J.P. & Gatehouse J.A. (2001). *In vitro* and *in vivo* binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. J. Insect Physiol. 47:777-787.

Follmer C., Barcellos G.B., Zingali R.B., Machado O.L., Alves E.W., Barja-Fidalgo C., Guimaraes J.A. & Carlini C.R. (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. Biochem. J. 15:217-224.

Follmer C., Carlini C.R., Yoneama M.-L & Dias J.F. (2002). PIXE analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. Nuclear Instr. Method Physics Res. 189:482-486.

Follmer C., Wassermann G.E. & Carlini C.R. (2004a). Separation of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. Plant Sci. 167:241-246.

Follmer C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Olivera-Sevedo, D. & Carlini, C.R. (2004b). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. Eur. J. Biochem. 271:1357-1363.

Gallo D. (1988). Manual de Entomologia Agrícola. Segunda Edição. CERES. São Paulo. 649p.

Gatehouse A.M., Gatehouse J.A., Bharathi M., Spence J. & Powell K.S. (1998). Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). J. Insect Physiol. 44:529-539.

Gombarovits M.E.C. (1999). Peptídeos Entomotóxicos gerados a partir da Canatoxina: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. Tese de Mestrado da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Grassi-Kassisse D.M. & Ribeiro-DaSilva G. (1992). Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. Agents Actions 37:204-209.

Greenberg M.J. & Price D.A. (1992). Relationships among the FMRFamide-like peptides. Prog. Brain Res. 92:25-37. Review.

Hirayama C., Sugimura M., Saito H. & Nakamura M. (2000). Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 46:1415-1421.

Hill S.R. & Orchard I. (2003). FMRFamide-related peptides in the gut of *Locusta migratoria* L.: a comprehensive map and developmental profile. *Peptides* 24:1511-1524.

Ianowski J.P. & O'Donnell M.J. (2001). Transepithelial potential in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: lumen-negative voltages and the triphasic response to serotonin. *J. Insect Physiol.* 47:411-421.

Ishimoto M. & Kitamura K. (1989). Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Entomol. Zool.* 24:281–286.

Keller M., Sneh B., Strizhov N., Prudovsky E., Regev A., Koncz C., Schell J. & Zilberstein A. (1996). Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26:365-373.

Kurahashi H., Atiwetin P., Nagaoka S., Miyata S., Kitajima S. & Sugimura Y. (2005). Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 51:1055-1061.

Kwok R., Chung D., Te Brugge V. & Orchard I. (2005). The distribution and activity of tachykinin-related peptides in the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Peptides* 26:43-51.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lange A.B., Orchard I. & Lloyd R.J. (1988). Immunohistochemical and electrochemical detection of serotonin in the nervous system of the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 8:187-201.

Lane N.J., Leslie R.A. & Swales, L.S. (1975). Insect peripheral nerves: accessibility of neurohaemal regions to lanthanum. *J. Cell Sci.* 18:179-197.

Liu P., Wen M. & Hayashi J. (1993). Activation of phospholipase A2 and stimulation of prostaglandin E2 production by transforming growth factor- α in rat thymic epithelial cells requires influx of calcium. *Biochem. J.* 293:109–113.

Maddrell S.H.P. (1964). Excretion in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus* Stal. II. The normal course of the release of the diuretic hormone. *J. Exp. Biol.* 41:459-472.

Maddrell S.H.P., Herman W.S., Farndale R.W. & Riegel J.A. (1993). Synergism of hormones controlling epithelial fluid transport in an insect. *J. Exp. Biol.* 174:65–80.

Massaro R.C., Lee L.W., Patel A.B., Wu D.S., Yu M.J., Scott B.N., Schooley D.A., Schegg K.M. & Beyenbach K.W. (2004). The mechanism of action of the antidiuretic peptide Tenmo ADFa in Malpighian tubules of *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 207:2877-2888.

Mercier A.J. & Lee J. (2002). Differential effects of neuropeptides on circular and longitudinal muscles of the crayfish hindgut. *Peptides* 23:1751-1757.

Miggiani L., Orchard I. & Te Brugge V. (1999). The distribution and function of serotonin in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. A comparative study with the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 45:1029-1036

Milano P., Consoli F.L., Zerio N.G. & Parra, J.R.P. (1999). Thermal Requirements of the Cotton Stainer *Dysdercus peruvianus* Guerin-Meneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28:233-238.

Montoreano R., Triana F., Abate T. & Rangel-Aldao R. (1990). Cyclic AMP in the Malpighian tubule fluid and in the urine of *Rhodnius prolixus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77:136-142.

Mulinari F., Stanisçuaski F., Bertholdo-Vargas L.R., Postal M., Oliveira-Neto O.B., Ridgen D.J., Grossi-de-Sá M.F. & Carlini C.R. (2007). Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28:2042-2050.

Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G., Inoue K. & Kudo I. (1997). Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit. Rev. Immunol.* 17:225-283.

Norregaard R., Jensen B. L., Topcu S. O., Diget M., Schweer H., Knepper M. A., Nielsen S. & Frokiaer J. (2007). COX-2 activity transiently contributes to increased water and NaCl excretion in the polyuric phase after release of ureteral obstruction. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292:1322-1333.

O'Donnell M.J. & Quinlan M.C. (1998). Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stal: antagonistic actions of cAMP and cGMP and the role of organic acid transport. *J. Insect Physiol.* 44:561-568.

Oliveira-Severo D., Wassermann G.E. & Carlini C.R. (2006). Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39:851-861.

Oliveira M.G., De Simone S.G., Xavier L.P., Guedes R.N. (2005). Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 140:369-380.

Oliveira A.E.A., Gomes V.M., Sales M.P., Fernandes K.V.S., Carlini C.R. & Xavier-Filho, J. (1999). The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis*(L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Ver. Brasil. Biologia* 59:59-62.

Orchard I., Lange A.B., Cook H. & Ramirez J.M. (1989). A subpopulation of dorsal unpaired median neurons in the blood-feeding insect, *Rhodnius prolixus*, displays serotonin-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 289:118-128.

Orchard, I. (2006). Serotonin: A coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 144:316 – 324.

Osborne R.H., Banner S.E. & Wood S.J. (1990). The pharmacology of the gut of the desert locust, *Schistocerca gregaria* and other insects. *Comp. Biochem. Physiol. C* 96:1–9.

Paluzzi J. P. & Orchard I. (2006). Distribution, activity and evidence for the release of an anti-diuretic peptide in the kissing bug *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 209:907-915.

Parra J.R.P., Botelho P.S.M., Correa-Ferreira B.S. & Bento J.M.S. (Eds.) (2002). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Manole, Piracicaba, p. 609.

Pedra J.H., Brandt A., Westerman R., Lobo N., Li H.M., Romero-Severson J., Murdock L.L. & Pittendrigh B.R. (2003). Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and alpha-amylases associated with food breakdown. *Insect Mol. Biol.* 12:405-412.

Petzel H.D. & Stanley-Samuelson D.W. (1992). Inhibition of eicosanoid biosynthesis modulates basal fluid secretion in the Malpighian tubules of the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *J. Insect Physiol.* 38:1-8.

Petzel D.H. (1993). Prostanoids and fluid balance in insects, pp 139-178, In D.W. Stanley-Samuelson and D.R. Nelson (eds.), *Insect Lipids: chemistry, biochemistry and biology*. University of Nebraska Press, Lincoln.

Pollaco J.C. & Holland M.A. (1993). Roles of urease in plant cells. *Int. Ver. Cytol.* 145:65-103.

Quinlan M.C., Tublitz N.J. & O'Donnell M.J. (1997). Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stal: the peptide CAP2b and cyclic GMP inhibit Malpighian tubule fluid secretion. *J. Exp. Biol.* 200:2363-2367.

Quinlan M.C. & O'Donnell M.J. (1998). Anti-diuresis in the blood-feeding insect *Rhodnius prolixus* Stal: antagonistic actions of cAMP and cGMP and the role of organic acid transport. *J. Insect Physiol.* 44:561-568.

Rafaelli A. & Applebaum S.W. (1982). The influence of canavanine and related compounds on the water balance system of locust. *J. Insect Physiol.* 28:201-204.

Ramsay J.A. (1954). Active transport of water by the Malpighian tubules of the stick insect, *Dixippus morosus* (Orthoptera, Phasmidae). *J. Exp. Biol.* 31:104-113.

Sarkar N.R.S., Tobe S.S. & Orchard I. (2003). The distribution and effects of Dippu-allatostatin-like peptides in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *Peptides* 24:1553-1562.

Schalkwijk C.G., Spaargaren M., Defize L.H.K., Verkleij A.J., Van den Bosch H. & Boonstra J. (1995). Epidermal growth factor (EGF) induces serine phosphorylation-dependent activation and calcium dependent translocation of the cytosolic phospholipase A2. *Eur. J. Biochem.* 231:593-601.

Settembrini B.P. & Villar M.J. (2004). Distribution of serotonin in the central nervous system of the blood-feeding Heteropteran, *Triatoma infestans* (Heteroptera:Reduviidae). *J. Morphol.* 260:21-32.

Settembrini B.P. & Villar M.J. (2005). FMRFamide-like immunocytochemistry in the brain and subesophageal ganglion of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). Coexpression with beta-pigment-dispersing hormone and small cardioactive peptide B. *Cell Tissue Res.* 321:299-310.

Silva C.P. & Xavier-Filho J. (1991). Comparison Between The Levels Of Aspartic And Cysteine Proteinases Of The Larval Midguts Of *Callosobruchus maculatus* And *Zabrotes subfasciatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99:529-533.

Silva C.P. & Terra W.R. (1994). Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera:Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24:493-505.

SILVA C.P., Terra W.R., Xavier-Filho J., SA M.F.G., Lopes A.R. & Pontes E.G.. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) with emphasis on alpha-amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:355-366.

Spring J.H., Morgan A.M. & Hazelton S.R. (1988). A novel target for antidiuretic hormone in insects. *Science* 241:1096-1098.

Spring J.H. (1990). Endocrine Regulation of Diuresis in Insects. *J. Insect Physiol.* 36:13-22.

Stanley-Samuelson D.W. (1994). Assessing the significance of prostaglandins and other eicosanoids in insect physiology. *J. Insect Physiol.* 40:3-11.

Stanisçuaski F. (2002). Efeitos da Canatoxina em Hemípteras. Caracterização das Enzimas Proteolíticas Envolvidas. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Sumner J.B. & Howell S.F. (1936). Identification of the hemagglutinin of jack bean with Con A. *J. Bacteriol.* 32:227.

Sun D. & Steele J.E. (2002). Control of phospholipase A(2) activity in cockroach (*Periplaneta americana*) fat body trophocytes by hypertrehalosemic hormone: the role of calcium. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1133-1142.

Te Brugge V.A., Miksys S.M., Coast G.M., Schooley D.A. & Orchard I. (1999). The distribution of a CRF-like diuretic peptide in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 202:2017-2027.

Te Brugge V.A., Schooley D.A. & Orchard I. (2002). The biological activity of diuretic factors in *Rhodnius prolixus*. *Peptides* 23:671-681.

Terra W.R. (1988). Physiology and Biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 21:675-734.

Van Kerkhove E., Pirotte P., Petzel D.H. & Stanley-Samuelson D.W. (1995). Eicosanoid biosynthesis inhibitors modulate basal fluid secretion rates in the Malpighian tubules of the ant, *Formica polyctena*. *J. Insect Physiol.* 41:435-441.

Villar M.J., Settembrini B.P., Hokfelt T. & Tramezzani J.H. (1994). NOS is present in the brain of *Triatoma infestans* and is colocalized with CCK. *Neuroreport*. 6:81-84.

Wigglesworth V.B. (1972) In: *The principles of insect Physiology*, (ed) 7a. edition, Chapman & Hall Ltd., Londres.

Xavier-Filho J., Campos F.A.P., Ary M.B, Silva C.P., Carvalho M.M.M., Macedo M.L.R., Lemos F.J.A. & Grant G. (1989). Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea and resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.* 37:1139-1143.

7 - ANEXOS

CURRICULUM VITAE Resumido

STANISÇUASKI, F.

1. DADOS PESSOAIS:

Nome: Fernanda Stanisçuaski

Nascimento: Erechim (Rio Grande do Sul – Brasil), 05 de Janeiro de 1981.

Endereço Profissional: Laboratório de Proteínas Tóxicas - LAPROTOX

Av. Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43422, Sala 204

Bairro Agronomia – Porto Alegre

91501-970

(55) 51 3308-7600

fers1981@cbiot.ufrgs.br

<http://www.ufrgs.br/laprottox>

2. FORMAÇÃO

1999 – 2002: Graduação em Ciências Biológicas – UFRGS

3. ESTÁGIOS

1999 – 2002: Bolsista de Iniciação Científica CNPq

Laboratório de Proteínas Tóxicas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Célia R. Carlini

“Caracterização das enzimas digestivas de *Dysdercus peruvianus*”

2006 – 2007: Doutorado Sanduíche

Laboratório de Neurofisiologia de Insetos

Universidade de Toronto em Mississauga (Canadá)

“Efeito de ureases vegetais no inseto modelo *Rhodnius prolixus*”

4. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

STANISCUASKI F., FERREIRA DASILVA C. T., MULINARI F., PIRES-ALVES M. & CARLINI C. R.. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753-760, 2005.

TOMAZETTO G., MULINARI F., STANISCUASKI F., SETTEMBRINI B. P., CARLINI C. R. & AYUB, M. A. Z.. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 821 – 827, 2007.

RAMOS M. V., FREITAS C. D.T., STANISCUASKI F., MACEDO L. L.P., SALES M. P., SOUSA D. P. & CARLINI, C. R.. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: Role of laticifer proteins in plant defense. *Plant Science* 173: 349 – 357, 2007.

MULINARI F., STANISCUASKI F., VARGAS L. R., POSTAL M., OLIVEIRA-NETO O.B., RIDGEN D., GROSSI-DE-SÁ M.F. & CARLINI, C. R.. Jaburetox 2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, 2007. **No prelo.**

5. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

5.1 CONGRESSOS INTERNACIONAIS

STANISCUASKI F., TE BRUGGE V., CARLINI C. R. & ORCHARD I.. Effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox 2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian Tubules. Seventh International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2007.

5.2 CONGRESSOS NACIONAIS

STANISCUASKI F., TE BRUGGE V., CARLINI C. R. & ORCHARD I.. Effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox 2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. 46th Annual Meeting of the Canadian Society of Zoologists, 2007, Montreal - Canada.

STANISCUASKI F., POSTAL M. & CARLINI C. R.. Proteolysis of Canatoxin: Characterization of *Callosobruchus maculatus* Digestive Enzymes Involved in the Process. Insect Biotech Conference, 2006, St Catharines – Ontario, Canada.

PIOVESAN A.R., STANISCUASKI F. & CARLINI C. R.. Differences in the proteolytic processing of plant urease in adults and nymphs of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pyrrhocoridae). XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006.

REAL-GUERRA R., STANISCUASKI F., FOLLMER C. & CARLINI C. R.. Chemical Modification of Jack Bean Urease Promoting Differences in its Biological Activities. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular, 2006.

STANISCUASKI F., POSTAL M. & CARLINI C. R.. Proteolysis of Canatoxin: Characterization of *Callosobruchus maculatus* Digestive Enzymes Involved in the Process. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005.

REAL-GUERRA R., STANISCUASKI F. & CARLINI C. R.. Stability and oligomerization of Jaburetox 2Ec-2Ec, an insecticidal recombinant peptide derived from Canatoxin. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005.

PIOVESAN A.R., STANISCUASKI F. & CARLINI C. R.. Differences in the Proteolytic Processing of Plant Urease in Adults and Nymphs of *Dysdercus peruvianus*. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005,

MULINARI F., STANISCUASKI F., GROSSI-DE-SÁ M.F. & CARLINI C. R.. Jaburetox 2Ec-2Ec, a potent insecticidal peptide, obtained from a truncated cDNA encoding an isoform of urease. The Annual Meeting of the American Society of Plant Biologist. Plant Biology 2005, Seattle - Washington.

MULINARI F., STANISCUASKI F., FRAGOSO R.R., OLIVEIRA-NETO O.B., CARLINI C. R. & GROSSI-DE-SÁ M.F.. Jaburetox 2EC, a Potent Inseticidal Peptide Derived from *Canavalia ensiformis* Ureases. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambu.

MULINARI F., STANISCUASKI F., GROSSI-DE-SÁ M.F. & CARLINI C. R.. Jaburetox 2Ec: Peptídeo Recombinante derivado de Urease de *Canavalia ensiformis* com Atividade Inseticida. XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

STANISCUASKI F., POSTAL M., SALVADORI J.M. & CARLINI C. R.. Isolamento e Caracterização das Enzimas Digestivas de *C. maculatus* Responsáveis pelo Processamento da Canatoxina. XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

VARGAS L.R., STANISCUASKI F., STIRPE F., BARROS N.M. & CARLINI C. R.. Ação Entomotóxica de Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIP's) Tipo 1 em *Anticarsia gemmatalis*. XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

POSTAL M., STANISCUASKI F., CARLINI C. R. & BLOCHTEIN B.. Identificação de Tecidos Alvos do Efeito Inseticida de Ureases no Percevejo *Dysdercus peruvianus*. XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

SALVADORI J.M., STANISCUASKI F. & CARLINI C. R.. Purificação e Caracterização das Enzimas Digestivas de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) Responsáveis pelo Processamento da Canatoxina. XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

STANISCUASKI F., POSTAL M., FERREIRA-DASILVA C. T. & CARLINI C. R.. Insecticidal Effect of Canatoxin in *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) is dependent on the Life Cycle Stage. Partial Characterization of Digestive Enzymes of Nymphs and Adults. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003.

POSTAL M., STANISCUASKI F., CARLINI C. R. & BLOCHTEIN B.. Histological analyses of Canatoxin Effects on the Digestive Tract of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera:Pyrrhocoridae) Nymphs. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003.

STANISCUASKI F., FERREIRA-DASILVA C. T. & CARLINI C. R.. Novo Método de Alimentação Artificial de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2002.

STANISCUASKI F., FOLLMER C., FERREIRA-DASILVA C. T. & CARLINI C. R.. Insecticidal Properties of Jack Bean Urease Isoenzymes. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002.

FERREIRA-DASILVA C. T., STANISCUASKI F. & CARLINI C. R.. Toxic Effect of Canatoxin Peptide on *Dysdercus peruvianus* (HEMIPTERA: PYRRHOCORIDAE).

XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2002.

STANISCUASKI F., FERREIRA-DASILVA C. T. & CARLINI C. R.. Entomocidal Activity of Canatoxin in Hemipteran Insects: *Nezara viridula* and *Dysdercus peruvianus*. Partial Characterization of Acidic Proteinases in the Insect's Midguts. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2001.

5.3 EVENTOS REGIONAIS

STANISCUASKI F., POSTAL M., FERREIRA-DASILVA C. T. & CARLINI C. R.. Atividade Inseticida da Canatoxina em Diferentes Estágios de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Caracterização das Enzimas Envolvidas. XIV Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2002.

POSTAL M., STANISCUASKI F., FERREIRA-DASILVA C. T., CARLINI C. R. & BLOCHTEIN B.. Microanatomia do Trato Digestivo de Formas Jovens de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). XIV Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2002.

STANISCUASKI F., FERREIRA-DASILVA C. T. & CARLINI C. R.. Caracterização Parcial das Enzimas Digestivas de Ninfas de *Dysdercus peruvianus*, um Hemiptera Suscetível a Canatoxina. XIII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2001.

STANISCUASKI F., FERREIRA-DASILVA C. T. & CARLINI C. R.. Atividade Entomotóxica de Canatoxina em Insetos Modelos: *Nezara viridula* (Hemiptera) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). XII Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2000.

Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)

F. Stanisçuaski^a, C.T. Ferreira-DaSilva^a, F. Mulinari^a, M. Pires-Alves^a, C.R. Carlini^{b,*}

^aGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, IB, Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartment of Biophysics, IB, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, CEP 91.501-970, Brazil

Received 23 June 2004; revised 21 January 2005; accepted 25 January 2005

Abstract

Canatoxin (CNTX) is a variant form of urease isolated from *Canavalia ensiformis* (Leguminosaea) seeds. A possible role in the plant defense was proposed for CNTX, due to its toxicity upon feeding to the beetle *Callosobruchus maculatus*, and the hematophagous bug, *Rhodnius prolixus*. The toxic effect is caused by a canatoxin-derived peptide (~10 kDa) formed by insect cathepsin-like digestive enzymes. In order to evaluate their potential as bioinsecticides, the effects of CNTX and its peptide were evaluated on a phytophagous hemipteran insect *Dysdercus peruvianus*, a pest of cotton culture. For the bioassays, the insects fed on gelatin capsules containing powdered cotton seeds, mixed with the freeze-dried protein and other test materials and were observed for survival rate, weight gain and molting. Ingestion of canatoxin, or a recombinant 10 kDa peptide derived from it, severely affected young forms of the insects, delaying their development or leading to their death. In contrast, adults were insensitive to diets containing higher concentrations of canatoxin. Cathepsin-like proteinases predominated and showed distinct pattern of enzymatic activities in midguts homogenates according to the developmental stage of the insect, a fact which may explain the different susceptibility of nymphs as compared to adult *D. peruvianus*. The data presented confirm the potential use of canatoxin-like proteins and derived peptides as bioinsecticides.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Canavalia ensiformis*; Canatoxin; *Dysdercus peruvianus*; Insecticide; Proteolytic enzymes

1. Introduction

Canatoxin (CNTX) is a toxic protein accounting for 0.5% dry weight of the jackbean *Canavalia ensiformis* (L.) DC seed. When injected intraperitoneally, the toxin induces convulsions and death (LD₅₀ 1–2 µg/g) in mice and rats; however, it is inactive if given orally to these animals (Carlini and Guimarães, 1981, 1991). Recently, CNTX was characterized as a variant form of jackbean urease

(EC 3.5.1.5), consisting of a noncovalently linked dimer of a 95,000 acidic polypeptide chain (Follmer et al., 2001).

The widespread presence of canatoxin-like proteins in leguminous seeds and their accumulation pattern during seed maturation have suggested a protective role in the plant (Carlini et al., 1988; Barcellos et al., 1993). In previous works it was found that CNTX displays fungicidal (Oliveira et al., 1999) and insecticidal properties (Carlini et al., 1997, Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). We have shown that CNTX is lethal when fed to insects relying on cathepsins as their main digestive enzymes such as the hematophagous kissing bug, *Rhodnius prolixus* (Stål) (Hemiptera:Reduviidae), and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.)

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 7606; fax: +55 51 3316 7003.

E-mail address: ccarlini@ufrgs.br (C.R. Carlini).

(Coleoptera:Bruchidae). In contrast, insects with trypsin-based digestion were not affected by ingestion of canatoxin. Subsequently, the proteolytic ‘activation’ of CNTX by insect cathepsins was demonstrated by interfering in the toxin’s effect with the enzyme inhibitors, E-64 and/or pepstatin A and by the in vitro formation of entomotoxic peptides (Ferreira-DaSilva et al., 2000). Jackbean urease also displays insecticidal activity although it is less potent than CNTX (Follmer et al., 2004).

Considering the potential use of CNTX or its peptide as an insecticide, it became important to investigate its effects in other insects economically important as crop pests. The cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Guérin-Ménéville) (Hemiptera: Pyrrhocoridae) feeds on the cotton seeds, resulting in damage to the seed and stains on the cotton fibers, besides being a vector for phytopathogenic bacteria and fungi, and may cause heavy losses in cotton plantations (Gallo, 1988). Previous studies by Silva and Terra (1994) have shown the presence of a major E-64 inhibitable cystein proteinase in midgut homogenates of *D. peruvianus*, prompting us to test the effects of canatoxin on this model of a phytophagous hemipteran insect. Our results demonstrated the potent insecticidal effect of CNTX and of a peptide derived from it, for the cotton culture pest *D. peruvianus*, confirming the potential use of these compounds as bioinsecticides.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Dextran Blue (Amersham, Pharmacia Lot 0168), sodium azide (Merck, Lot 108). From Sigma Chem. Co: casein, bovine hemoglobin, dithiothreitol, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pepstatin A, E-64 [L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)-butane], PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride).

2.2. Canatoxin

CNTX was prepared as described by Carlini and Guimarães (1981), with the modifications introduced by Follmer et al. (2001). Briefly, a 10% wt:vol crude extract of *C. ensiformis* seeds prepared in 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 was combined with ice-cold ethanol (30% vol:vol) to form a precipitate, and the supernatant was subsequently fractionated with ammonium sulfate at 0.35–0.55 saturation. The toxic material thus obtained was submitted to an ion exchange chromatography in DEAE-cellulose, equilibrated in 25 mM Tris-HCl–100 mM NaCl, pH 7.5. The toxin adsorbed to the resin was eluted with Tris buffer containing 200 mM NaCl and then gel-filtered in a Sephacryl S-300 column. The last purification step consisted of an immobilized metal affinity chromatography in a Zn²⁺-chelate resin, being the highly purified canatoxin eluted with Tris buffer

containing 10 mM EDTA. For the tests with insects, canatoxin’s solutions were previously dialyzed against 25 mM Tris-HCl to remove EDTA.

2.3. *Dysdercus peruvianus*

A colony of *D. peruvianus* was established from individuals kindly supplied by Dr Carlos Peres Silva, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. *D. peruvianus* were reared at a medium temperature of 23 °C (Milano et al., 1999), 75% relative humidity, with a 16 h light–8 h dark cycle. *D. peruvianus* life cycle is about 30–35 days from eggs to adult insects. Each female lays up to 100–200 eggs over the seeds. The eggs hatch after 6–9 days and the insects develop through five nymphal stages in about 20–25 days.

The insects were kept in transparent plastic pots, covered with screen tissue, with a layer (2 cm) of autoclaved sand in the bottom. The insects were fed with cotton seeds (*Gossypium hirsutum*) and had free access to water, stored in plastic flasks, located inside the pots. The seeds were put inside the pots during the mating and posture period, up to first instar. From the second instar on, the insects were transferred to a clean pot once a week and the seeds were kept over the tissue that closes the pots. This procedure avoids the contact of the seeds with insect feces and facilitates cleaning the pots.

2.4. Cotton seeds (*Gossypium hirsutum*)

Cotton seeds harvested from agrototoxic-free plantations were obtained from Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária—Algodão (IAC—Instituto Agronômico de Campinas). To make cotton seed flour, after opening the seed’s shells, the cotyledons were removed and lyophilized for 5 h to decrease the water content. The cotyledons were then processed in an analytical mill, the flour obtained was sifted and stored at –20 °C.

2.5. Artificial seeds

Gelatin Capsules (size 2 or 3, Eli Lilly Co.) were manually filled with cotton seed flour, containing or not added substances, to make artificial seeds. When testing a substance, solutions of this compound were rapidly mixed the cotton flour, the mixture was then frozen and freeze-dried, being the resulting powder used to make the artificial seeds. Concentrations of the tested substances were expressed as percentage of mass of the cotton flour. Control artificial seeds were prepared in the same way, with the equivalent volume of diluents used for the tested substances.

2.6. Insect bioassay

For the tests, groups of 20 insects in triplicates were used for each experimental condition. Control insects fed on cotton

seeds or artificial seeds containing cotton meal alone or the diluents of the tested compounds. The mean weight of insect groups was recorded before the experiments. The insects were observed daily for survival and molting, and the mean weight of surviving insects was recorded at given intervals.

2.7. Midgut homogenates

For determination of proteolytic activities in the digestive tracts of *D. peruvianus*, homogenates of whole intestines were used. For that, fourth instars or adults with no previous starving period were immobilized in ice and immersed in an ice-cold dissection solution (1.4 M sucrose, 0.1 M HEPES-Tris, pH 7.0, 2.5 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF). The whole intestines were removed and stored at -20°C in 50% v/v glycerol in water, in the proportion of 20 intestines per ml. For preparing the homogenates, the material was thawed, homogenized manually with an ice-cold Potter pestle, centrifuged at 4°C at 4000g (twice, 10 min each) and then at 12,000g for 5 min. The final supernatants were kept frozen at -20°C until used for the enzymatic assays.

2.8. Enzymatic assays

The midgut homogenates (final concentration, 1.0 A_{280} units of protein per ml) were tested for proteolytic activity

upon casein or hemoglobin (Lemos et al., 1990; Terra et al., 1988; Silva and Xavier-Filho, 1991). One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme releasing 0.001 A_{280} of acid-soluble peptides per hour at 37°C . The pH was varied in the range 2.6–9.0, using 30 mM citrate–phosphate buffer (pH 2.6–6.6) or Tris–HCl (pH 7.0–9.0). To identify the classes of proteinases (Barret, 1998) present in the homogenates, aliquots were pre-incubated overnight at 10°C with each of different inhibitors at the specific final concentration and then tested for hemoglobinolytic activity: 8 μM E-64, 8 μM pepstatin A, 3 mM PMSF or 6.5 mM EDTA.

2.9. Statistical analysis

Unpaired Student *t*-test was applied to the data and $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Lethal effect of canatoxin fed to *Dysdercus peruvianus*

To test the adequateness of the method developed to feed insecticidal compounds to the cotton sucker bug *D. peruvianus*, third instars and male adults were given artificial cotton seeds containing the polysaccharide dextran

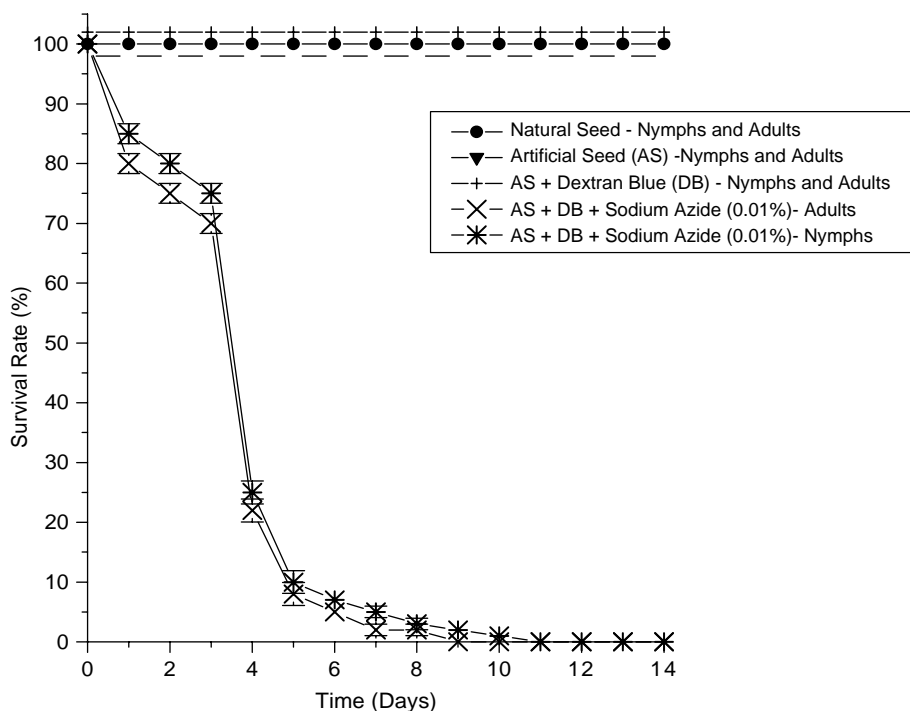


Fig. 1. Test of the artificial feeding method for *Dysdercus peruvianus*. Nymphs (third instar) and adults were fed on artificial seeds consisting of gelatin capsules filled with cotton flour alone or with addition of Dextran Blue (0.05% w/w) or Sodium Azide (0.01% w/w). A control group fed on natural cotton seeds. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates.

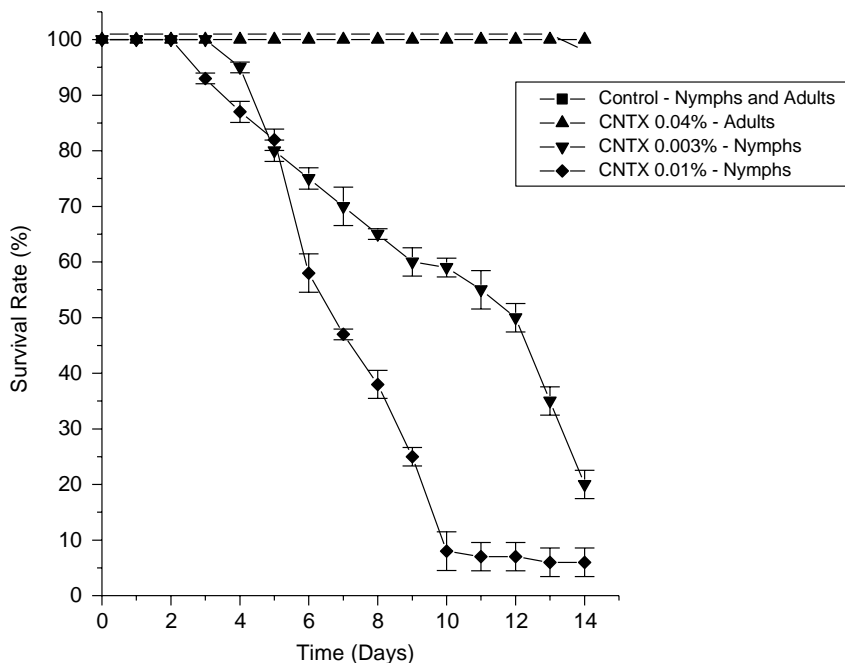


Fig. 2. Insecticidal effect of CNTX on *Dysdercus peruvianus*. Nymphs (third instar) or adults fed on artificial seeds containing CNTX in different concentrations. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates.

blue (0.05% w/w, in water) or sodium azide (0.01% w/w, in water). Fig. 1 shows that no lethality was seen for control insects feeding on artificial seeds made only of cotton meal or those containing dextran blue, which was visible inside the nymphs, indicating the insects had ingested the polysaccharide. On the other hand, as expected a high mortality rate was observed for insects that fed on seeds containing sodium azide, with no survivals after 8–9 days.

Fig. 2 illustrates the potent insecticidal effect of feeding canatoxin to third instar *D. peruvianus*. The effect was time dependent with a lag phase of 4–5 days, reaching 90–100% mortality after 10 days. Second or fourth instars were as sensitive to the toxic effects of CNTX as third instars (not shown). In contrast, 100% of the adults survived 14 days ingesting a concentration of CNTX 4-fold higher than that which killed almost all nymphs after 10 days. The adult insects, however, were as susceptible to sodium azide as the young forms.

Lethality was not the only toxic effect seen for CNTX-fed young *D. peruvianus*. The weight gain of nymphs which had survived 14 days on a CNTX-containing diet was significantly smaller (Fig. 3) and the duration of their larval stages increased (Table 1).

Midgut homogenates of adults and fourth instars were assayed for proteolytic activity upon hemoglobin and casein in the absence and in the presence of the inhibitors pepstatin A (aspartic proteinase and/or cathepsin D like enzymes), E-64 (cystein proteinases and/or cathepsins B like

enzymes), PMSF (trypsin-like enzymes) and EDTA (metalloproteinases). Fig. 4 illustrates typical patterns of proteolytic activity for midgut homogenates of nymphs and adult *D. peruvianus* as well as their residual activity in the presence of different enzyme inhibitors. It could be seen that acidic proteinases predominate either for young or adult insects although the proteolytic activity upon both substrates showed a shift to higher pH for the adults. Thus the midgut homogenates of nymphs showed maximal activities for casein (not shown) and hemoglobin at pH 3.5–4.0 while for adults the maximal activity was found at pH 4.5–5.0. Moreover, a second peak of activity upon hemoglobin at alkaline pH (pH 8.5) was found only in homogenates of adult midguts.

Fig. 4 also shows the decrease in the hemoglobinolytic activity of adult and nymph midgut homogenates after pre-incubation with different inhibitors. E-64 and pepstatin A inhibited substantially the proteolytic activity of nymph midguts, indicating the prevalence of cathepsin-like type B and D enzymes, respectively. In contrast, only pepstatin A inhibited significantly (about 70%) the hemoglobinolytic activity of adult midguts, pointing to a minor participation of the cystein proteinase(s) present in young insects. Metalloproteinase(s) are present in the midgut of nymphs and adults insects. A serine proteinase (trypsin-like) active in pH 8.5 was seen only in the midgut of adults.

In another experiment, third instar nymphs were fed on artificial seeds containing a recombinant peptide (0.01% w/w,

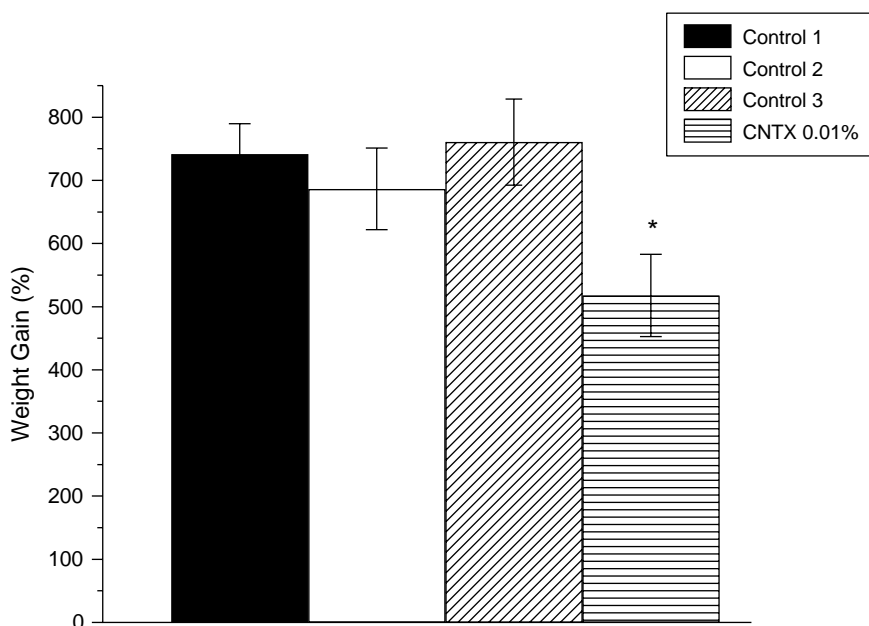


Fig. 3. Weight gain of Nymphs after 14 days on a CNTX-containing Diet. Control 1: Nymphs fed on natural seed; Control 2: Nymphs fed on artificial seed; Control 3: Nymphs fed on artificial seed containing Dextran Blue; CNTX: Nymphs fed on artificial seed containing CNTX 0.01% w/w. The mean weight of each insect group was recorded on day zero and for the surviving insects, after 14 days. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates. (* $p < 0.05$).

obtained by heterologous expression in *E. coli*), corresponding to the amino acid sequence of a canatoxin-derived entomotoxic peptide obtained by hydrolyzing the protein in vitro with *C. maculatus* digestive enzymes (Ferreira-DaSilva et al., 2000; Mulinari et al., unpublished results, patent pending). Fig. 5 shows that the recombinant peptide induced a more rapid entomotoxic effect when fed to the insects than did the intact protein. Thus after a 5–10 days feeding period, the mortality rate of insects fed on a diet containing 0.01% w/w recombinant peptide was about threefold higher than that of the group feeding on a canatoxin diet.

4. Discussion

In this work, we describe details of a new methodology developed for using the hemipteran bug *D. peruvianus*, a pest of cotton culture, as a model for testing insecticidal compounds active by oral route. This model system allowed us to demonstrate the potent insecticidal effect of canatoxin, and of a peptide derived from it, when added to the insect's diet. On weight basis, CNTX is about 25 times more toxic to *D. peruvianus* than to the cowpea weevil *C. maculatus* making this protein one of the most active insecticidal protein of plant origin known so far (Carlini et al., 1997; Carlini and Grossi-de-Sá, 2002).

In previous studies, it was shown that a single meal containing CNTX was lethal to nymphs (third and fourth instars) of the hematophagous hemipteran bug *R. prolixus*,

in a dose- and time-dependent manner, with a lag-phase of at least 24 h (Carlini et al., 1997; Ferreira-DaSilva et al., 2000). In contrast, adults *R. prolixus* receiving high doses of canatoxin in their diets showed no signs of intoxication and no lethality was seen up to 10 days after the meal. Differences in the fragmentation pattern of CNTX by adults and nymphs of *R. prolixus* resulted in distinct pattern of immunoreactive peptides in their hemolymph, as seen in Western blot analysis with anti-canatoxin antibodies. The permeability of midgut membranes to proteins (immunoglobulins) also differed in young forms as compared to adult *R. prolixus* (Ferreira-DaSilva et al., 2000).

Table 1

Duration of developmental stages in days

	Third stage	Fourth stage	Fifth stage
Control 1	6.5 ± 0.7	6 ± 1.4	6 ± 1.4
Control 2	6.5 ± 0.7	7 ± 1.4	6.5 ± 2.1
Control 3	6 ± 1.4	6 ± 1.4	6 ± 1.4
CNTX	10 ± 2.8	11 ± 1.4*	10 ± 1.4*

Note: *D. peruvianus* nymphs (third instar) fed on different diets and the number of insects undergoing ecdysis in each group was counted during 14 days. Control 1: Nymphs fed on natural seed; Control 2: Nymphs fed on artificial seed; Control 3: Nymphs fed on artificial seed containing Dextran Blue; CNTX: Nymphs fed on artificial seed containing CNTX 0.01% w/w. Results are expressed as means and standard deviations of the time required for molting of all the insects in each group. Data from three independent experiments, with points in triplicates. (* $p < 0.05$).

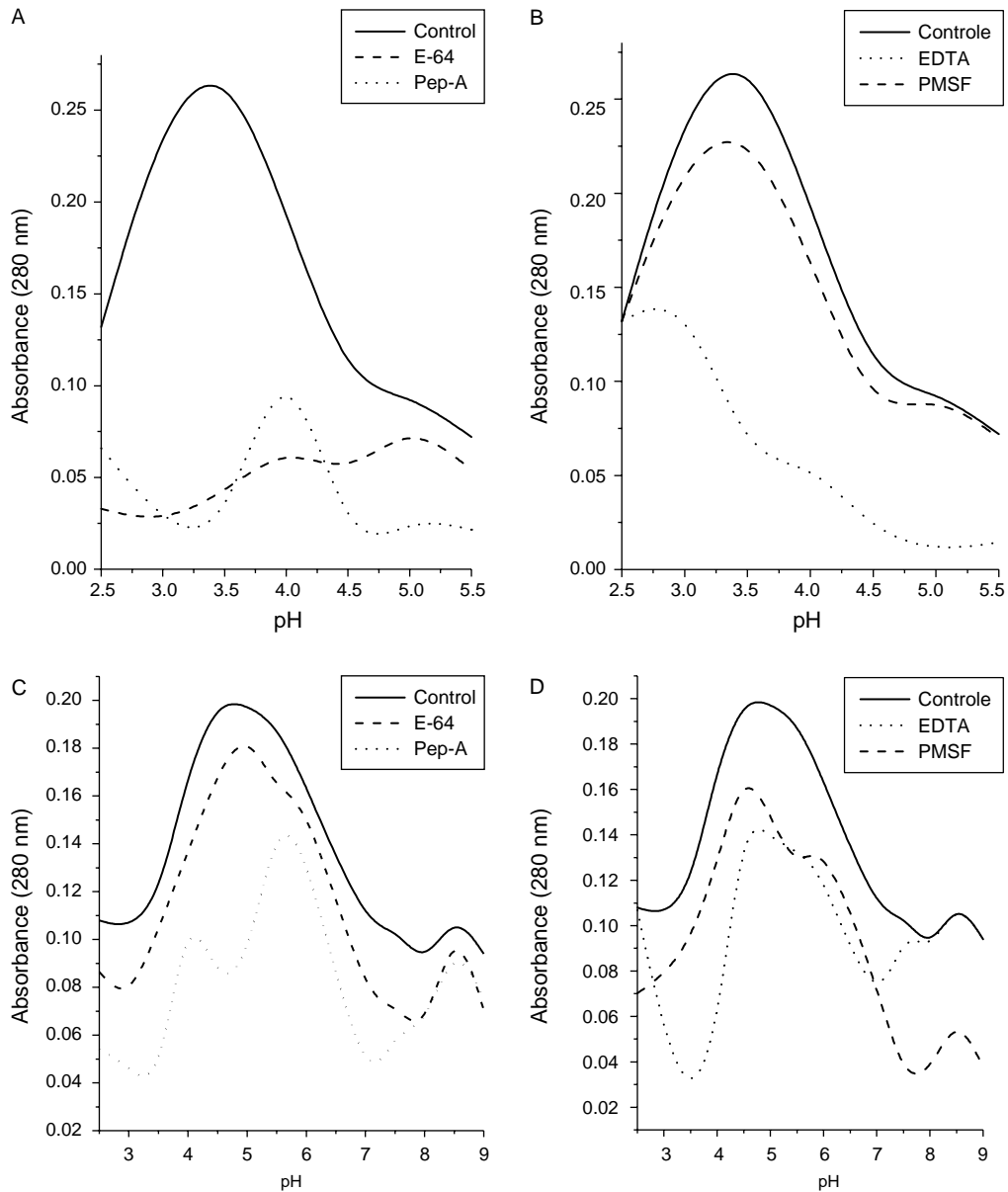


Fig. 4. Effect of different inhibitors upon the hemoglobinolytic activity of midgut homogenates of (A–B) nymphs or (C–D) adults of *Dysdercus peruvianus*. The results are shown as absorbance of acid-soluble peptides released after incubation of midgut homogenates and substrate for 3 h at 37 °C, in the absence or in the presence of the indicated inhibitors. Final concentrations: E-64 (8 μ M), Pepstatin-A (8 μ M), EDTA (6.5 mM) and PMSF (3 mM). The curves show typical results of at least three independent experiments.

Here we describe the lethal effect of CNTX in young forms of *D. peruvianus*, and show that adults were not affected at 4-fold higher doses. Thus the lack of susceptibility of adult hemipteran insects to ingested CNTX is not related to their food preference, since it was observed for both hematophagous (*R. prolixus*) and phytophagous species. Additional studies revealed distinct proteolytic activities in the intestines of young and adult *D. peruvianus*, which may result in different proteolytic fragmentation of

the protein. Differences in several physiological aspects during the life cycle of insects are well known. Similar to our results with CNTX in *R. prolixus* and *D. peruvianus*, increased resistance of late larval stages of *Spodoptera littoralis* to *Bacillus thuringiensis* endotoxins (CryIC) as compared to young larvae has been described and attributed to different enzymatic processing of the toxin (Keller et al., 1996). Altogether, the differences in intestinal permeability and/or digestive processing of dietary proteins according to

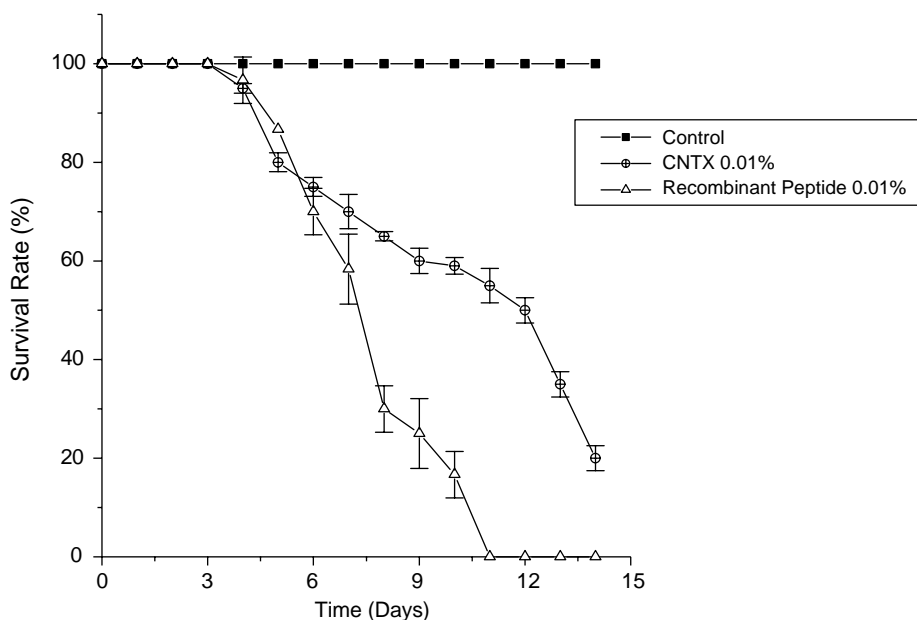


Fig. 5. Lethal effect of Canatoxin or a recombinant peptide derived from it in *D. peruvianus*. Nymphs (third instar) were fed with recombinant peptide (0.01% w/w) or canatoxin (0.01% w/w) and lethality was observed daily. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments, with points in triplicates.

the insect's life stage might explain the lack of effects of CNTX in adult hemipteran bugs.

The *in vivo* proteolytic 'activation' of canatoxin by *R. prolixus* digestive cathepsins was demonstrated by interfering in the toxin's effect by simultaneous ingestion of the enzyme inhibitors, E-64 and/or pepstatin A (Ferreira-DaSilva et al., 2000). In this work, we have characterized the classes of proteinases present in intestinal homogenates of nymphs (fourth instar) and adult *D. peruvianus*. For both forms of the insect, a predominance of cathepsin-like enzymes was seen, although the relative proportion and the pH for maximal activity of the enzymatic activities differed for each developmental stage. Thus it seems plausible that also for *D. peruvianus* larval stages there is a need of proteolytic processing of CNTX by cathepsin-like enzymes to release entomotoxic peptide(s).

As a matter of fact, *D. peruvianus* nymphs were susceptible to the entomotoxic effect of a 12.8 kDa recombinant peptide containing the amino acid sequence of a CNTX-derived peptide obtained by hydrolyzing the protein *in vitro* with *C. maculatus* digestive enzymes (Ferreira-DaSilva et al., 2000; Mulinari et al., unpublished results, patent pending). Present in the diet at 0.01% w/w, the toxic effect induced by the recombinant peptide was faster and the lethality observed after 10 days was about three times higher than that produced by the intact protein in the same condition. Although we did not quantify the amount of diet ingested by each insect thus not allowing a direct comparison of doses, the faster onset of insecticidal

activity of the recombinant peptide is probably due to the elimination of the need of proteolytic processing of intact protein. On the other hand, this concentration of recombinant peptide was not toxic to adult insects (results not shown). The fact that CNTX or its recombinant peptide are not lethal to adult insects at a 0.01% w/w concentration should not be taken as a limitation to their potential use as bioinsecticides. For a number of insects, adult forms do not feed at all or have different feeding habits as compared to their larval forms, and are not considered relevant as crop pests. Even if adult insects turn out to be affected by higher doses of CNTX or its recombinant peptide, the increased susceptibility of larval forms would make them the preferential targets and this concentration of recombinant protein/peptide is attainable in a transgenic plant approach. On the other hand, is not necessary to exterminate an entire insect population to reduce crop damage nor is this desirable as it would increase pressure selection for resistant pests (Carozzi and Koziel, 1997). In some cases, a 30% delay in the life cycle of the insect pest could be enough to allow plants to develop up to be harvested (Parra et al., 2002).

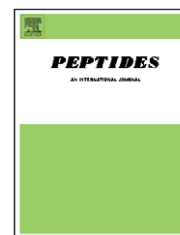
In conclusion, in this paper we give details on a new method developed for testing insecticidal compounds by oral route on the cotton stainer bug *D. peruvianus*. Our results demonstrated the potent insecticidal effect of canatoxin and of a peptide derived from it, on this cotton culture pest. These compounds may add new possibilities in the arsenal of available bioinsecticides to control crops pests that are not susceptible to *Bt* proteins.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Carlos Peres Silva, Universidade Estadual do Norte Fluminense, for the insects supply, and Maria Martha Guedes Chaves for preparation of Canatoxin. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Cooperação Acadêmica—Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Procad-CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT).

References

- Barcellos, G.B.S., Almeida, L.A., Moreira, R.A., Sousa-Cavada, B., Oliveira, J.T.A., Carlini, C.R., 1993. Canatoxin-, Concanavalin A- and Canavaliacross-reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Planta* 189, 397–402.
- Barret, A.J. (Ed.), 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, New York, p. 1666.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, F.M., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515–1539.
- Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin-A. *Toxicon* 19, 667–676.
- Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1991. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 29, 791–806.
- Carlini, C.R., Barcellos, G.B.S., Baeta-Neves, A.D.V., Guimarães, J.A., 1988. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin-A among proteins from leguminous seeds. *Phytochemistry* 27, 25–30.
- Carlini, C.R., Oliveira, A.E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M.A., 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90, 340–348.
- Carozzi, N., Koziel, M. (Eds.), 1997. *Advances in Insect Control. The Role of Transgenic Plants*. Taylor and Francis, UK.
- Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M.E., Masuda, H., Oliveira, C.M., Carlini, C.R., 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44 (4), 162–171.
- Follmer, C., Barcellos, G.B., Zingali, R.B., Machado, O.L., Alves, E.W., Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J.A., Carlini, C.R., 2001. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 15, 217–224.
- Follmer, C., Wassermann, G.E., Carlini, C.R., 2004. Separation of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Sci.* 167, 241–246.
- Gallo, D. (Ed.), 1988. *Manual de Entomologia Agrícola*, second ed. CERES, São Paulo, p. 649.
- Keller, M., Sneh, B., Strizhov, N., Prudovsky, E., Regev, A., Koncz, C., Schell, J., Zilberstein, A., 1996. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 365–373.
- Lemos, F.J.A., Campos, F.A.P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* 56, 219–227.
- Milano, P., Consoli, F.L., Zerio, N.G., Parra, J.R.P., 1999. Thermal requirements of the cotton stainer *Dysdercus peruvianus* Guerin-Meneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28 (2), 233–238.
- Oliveira, A.E.A., Gomes, V.M., Sales, M.P., Fernandes, K.V.S., Carlini, C.R., Xavier-Filho, J., 1999. The toxicity of jack bean *Canavalia ensiformis*(L.) DC. canatoxin to plant pathogenic fungi. *Ver. Brasil. Biologia.* 59, 59–62.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. (Eds.), 2002. *Controle biológico no Brasil—parasitóides e predadores*. Manole, Piracicaba, p. 609.
- Silva, C.P., Terra, W.R., 1994. Digestive and Absorptive Sites Along the Midgut of the Cotton Seed Sucker Bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24 (5), 493–505.
- Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1991. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 99B, 529–533.
- Terra, W.R., Ferreira, C., Garcia, E.S., 1988. Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochem.* 18, 423–434.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*

F. Mulinari^a, F. Stanisçuaski^a, L.R. Bertholdo-Vargas^{a,b}, M. Postal^a,
O.B. Oliveira-Neto^c, D.J. Rigden^d, M.F. Grossi-de-Sá^{a,c,*}, C.R. Carlini^{a,e}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Cenargen/EMBRAPA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, National Centre of Genetic Resources and Biotechnology, CP 02372, Brasília-DF CEP 70.770-900, Brazil

^d School of Biological Sciences, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZB, UK

^e Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2007

Received in revised form

2 August 2007

Accepted 3 August 2007

Published on line 17 August 2007

Keywords:

Canatoxin

Insecticide

Spodoptera frugiperda

Dysdercus peruvianus

Molecular modeling

Heterologous expression

ABSTRACT

Canatoxin, a urease isoform from *Canavalia ensiformis* seeds, shows insecticidal activity against different insect species. Its toxicity relies on an internal 10 kDa peptide (pepcanatoxin), released by hydrolysis of Canatoxin by cathepsins in the digestive system of susceptible insects. In the present work, based on the N-terminal sequence of pepcanatoxin, we have designed primers to amplify by PCR a 270-bp fragment corresponding to pepcanatoxin using JBURE-II cDNA (one of the urease isoforms cloned from *C. ensiformis*, with high identity to JBURE-I, the classical urease) as a template. This amplicon named jaburetox-2 was cloned into pET 101 vector to obtain heterologous expression in *Escherichia coli* of the recombinant protein in C-terminal fusion with V-5 epitope and 6-His tag. Jaburetox-2Ec was purified on Nickel-NTA resin and bioassayed in insect models. *Dysdercus peruvianus* larvae were fed on cotton seed meal diets containing 0.01% (w/w) Jaburetox-2Ec and, after 11 days, all individuals were dead. Jaburetox-2Ec was also tested against *Spodoptera frugiperda* larvae and caused 100% mortality. In contrast, high doses of Jaburetox-2Ec were innocuous when injected or ingested by mice and neonate rats. Modeling of Jaburetox-2Ec, in comparison with other peptide structures, revealed a prominent β -hairpin motif consistent with an insecticidal activity based on either neurotoxicity or cell permeation.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Canatoxin, a toxic protein isolated from *Canavalia ensiformis* seeds [5], and more recently identified as an isoform of urease [13], displays insecticidal properties when fed to insects that

rely on cathepsins as their main digestive enzymes as the kissing bug *Rhodnius prolixus*, the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*, the Southern green soybean stinkbug *Nezara viridula* and the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* [4,7,31]. The major form of *C. ensiformis* urease and the soybean seed urease

* Corresponding author. Tel.: +55 61 3448 4705/+55 61 3448 4902; fax: +55 61 3340 3658.

E-mail address: fatimasa@cenargen.embrapa.br (M.F. Grossi-de-Sá).

URL: <http://www.cenargen.embrapa.br/laboratorios/LIMPP/index.htm>, <http://www.ufrgs.br/laprotex>

Abbreviations: CNTX, canatoxin; IPTG, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside; JBURE-I, jack bean urease I (classical urease); JBURE-II, jack bean urease isoform II; LB, Luria-Bertani medium.

0196-9781/\$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2007.08.009

also have entomotoxic activity suggesting that this property may be common to all plant ureases [14].

The entomotoxic effect of urease is independent of its ureolytic activity [14] and requires proteolytic processing of the protein by insect enzymes [7,12]. Previous studies have shown that the entomotoxicity of canatoxin relies on an internal peptide (pepcanatox), which could be produced in vitro by hydrolyzing the protein with cathepsins obtained from susceptible insects [12,17].

To fully understand the biological activity and mode of action of urease-derived peptides would require large amounts of pepcanatox, which would be difficult to accomplish given the low yield of the production methods available [6].

In this report, we describe a method for production of a recombinant peptide equivalent to pepcanatox. For that, we have amplified a pepcanatox-like cDNA fragment from JBURE-II, a gene encoding one of the urease isoforms from *C. ensiformis* [26]. This amplicon, named *Jaburetox-2* (Jack bean urease toxin), was subcloned into an expression vector to produce recombinant *Jaburetox-2Ec* in *Escherichia coli* [25]. The entomotoxic effect of this recombinant peptide was demonstrated using the cotton stainer bug *D. peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), a model insect that utilizes cathepsins as the main digestive enzymes and features an acidic gut [28], as well as the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), a model insect displaying serine proteinases and an alkaline digestive system [11,13,28].

The mode of insecticidal action of plant ureases or derived peptides has not been studied in detail so far. In *Rhodnius prolixus* impairment of diuresis and symptoms suggestive of neurotoxicity, such as incoordinated movements of limbs and antenna and reversible paralysis in sub-lethal doses [17], are seen following a meal of urease or pepcanatox. In this work, the molecular modeling of *Jaburetox-2Ec* was proposed to aid the identification of possible motifs, which could be involved in entomotoxic activity.

2. Materials and methods

2.1. Primer design and polymerase chain reaction

The JBURE-II fragment corresponding to pepcanatox was identified by alignment of the pepcanatox N-terminal sequence with the deduced amino acid sequence of JBURE-II (Genbank Accession number AF468788). The CCAC sequence and an ATG start codon were added to the 5'-end of the forward primer (5'-CACCATGGGT CAGTTAATGAAGCC-3'). The reverse primer was designed based on JBURE-II sequence and the predicted size of the entomotoxic peptide (10 kDa), corresponding to 81 amino acid residues (Fig. 1, 5'-ATAACTTTTCCACCTCC-3'). PCR amplification of *Jaburetox-2Ec* fragment from JBURE-II gene was performed in a 25 μ l reaction, containing 500 ng of pGEMT-easy/JBURE-II as the template DNA, 400 nM of each primer, 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), and 2.5 U Pfu DNA polymerase (Stratagene) in buffer. The reaction was carried out in a programmable thermocycler using the following reaction cycles: initial denaturation at 94 °C for 1.5 min followed by 30 consecutive cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing for 45 s at 54 °C, and extension at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. The size (270 bp) and amount of the *Jaburetox-2Ec* amplicon was monitored on 1.5% agarose gel.

2.2. *Jaburetox-2Ec* amplicon cloning

The PCR product was purified from agarose gel using the GenClean kit (BIO 101) and cloned into the pET 101 D/TOPO vector (Invitrogen), using 5 ng of the PCR product in a reaction containing 200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ and pET 101 vector. Chemically competent *E. coli* (TOP 10) cells were transformed with 3 μ l of the ligation reaction and grown overnight in LB medium containing 100 μ g/ml ampicillin. The positive transformants were analyzed by PCR, using whole colonies as a source for DNA template. The amplification of *Jaburetox-2Ec*

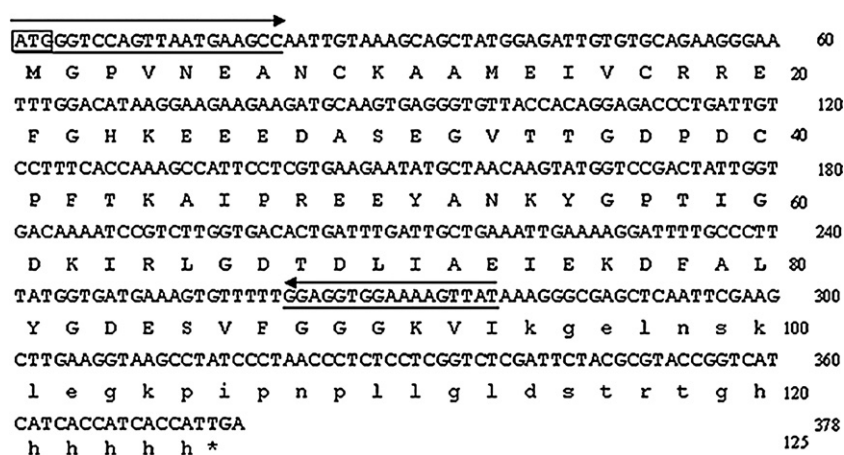


Fig. 1 – Nucleotide and its deduced amino acid sequence of a cDNA for the *Jaburetox-2Ec*. The deduced amino acid sequence is shown below their respective codons. Nucleotide and amino acid numbers of *Jaburetox* sequence are indicated on the right side. The box indicates an additional start codon. The primers regions are underlined. The *Jaburetox* sequence is shown in uppercase letters and fusion V-5 epitope and polyhistidine vector sequence is shown in lowercase letters.

was monitored by agarose gel electrophoresis with DNA stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml). Three recombinant plasmids containing insert of expected size were purified from recombinant colonies (mini-preparations) and sequenced on ABI 3700 automated sequence analyzer (Applied Biosystems, Perkin-Elmer), using T7 forward primer to confirm the presence, correct DNA sequence and insert orientation.

2.3. Expression of recombinant Jaburetox-2Ec and polyacrylamide gel electrophoresis

A pET 101/Jaburetox-2Ec recombinant plasmid was transformed into chemically competent *E. coli* BL21 Star (DE3) and inoculated into 10 ml of LB containing 100 µg/ml ampicillin. Cultures were incubated at 37 °C until OD₆₀₀ reached 0.6–0.8. IPTG was added to a final concentration of 0.75 mM and 0.5 ml of culture was sampled after 1 h after induction. Cultures without induction served as control. Cells were centrifuged (5000 × *g*, 10 min), resuspended into SDS-PAGE sample buffer and analyzed by Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel 12% (SDS-PAGE) according to Laemmli [20] and stained with Coomassie Blue R-250.

2.4. Purification of Jaburetox-2Ec using Ni-NTA agarose

For isolation and purification of Jaburetox-2Ec, 250 ml of LB medium containing 100 µg/ml ampicillin were inoculated with 5 ml of the above culture. The cells were grown 2 h at 37 °C under shaking (OD₆₀₀ = 0.7) and then IPTG was added to 1 mM. After 2 h, the cells were harvested by centrifugation and resuspended in 10 ml of lysis buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100 and 10 mM imidazole), sonicated, centrifuged (14,000 × *g*, 20 min) and 10 µl of supernatant or 5 µl of the pellet sample were analyzed by SDS-PAGE. The supernatant was loaded onto a 2 ml Ni affinity column (Ni-NTA—QIAGEN), which was previously equilibrated with the equilibration buffer (50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole). After 30 min, the column was washed with 20 ml of the same buffer, containing 20 mM imidazole. The protein was eluted with the equilibration buffer containing 200 mM imidazole and quantified by the Bradford method [2]. The samples were dialyzed against deionized water.

2.5. Western blot analysis

This was done according to the Towbin method [32]. Purified Jaburetox-2Ec was electrophoresed and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, then immersed in blocking buffer, consisting of 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, pH 7.3), and 0.05% Tween. After washing, the membrane was incubated with a rabbit IgG anti-canatoxin antibody [13], diluted 1:5000 in blocking buffer, with gentle shaking for 3 h at room temperature, followed by a 2 h incubation with anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chem. Co., 1:5000 dilution) as secondary antibody. The colorimetric detection was carried out by using BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate *p*-toluidine salt) and NBT (nitro-blue tetrazolium chloride).

2.6. Insect bioassays

2.6.1. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec in *D. peruvianus*

The bioassay was carried out according to Stanisçuaski et al. [31]. Third instars *D. peruvianus* were fed on artificial cotton seeds, consisting of gelatin capsules (size 2 or 3, Elli Lilly Co.) containing cotton seed flour and 0.01% (w/w) freeze-dried Jaburetox-2Ec or canatoxin (purified according Follmer et al. [15]). The purified Jaburetox-2Ec was exhaustively dialyzed against 5 mM sodium phosphate pH 7.5 buffer and the last change of dialysis buffer was used as control in the bioassay. Groups of 30 insects were tested in triplicates and monitored for survival during 15 days.

2.6.2. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec in *S. frugiperda*

Three groups of six third instar *S. frugiperda* were reared on *Phaseolus vulgaris* leaves. The insects were kept in individual plastic cups closed with silkscreen tissue at 26 °C, 85% humidity, 12-h dark–12-h light cycles. At days 0, 2 and 4, drops (20 µl) of a phosphate buffered solution containing 16.3 µg Jaburetox-2Ec were air-dried onto the surface of foliar discs (30.5 mm²) and fed to each larva. Control larvae received foliar discs containing 20 µl air-dried dialysis buffer. The mortality in the group and individual weight gain were measured daily.

2.7. Toxicity of Jaburetox-2Ec in mammalian models

Adult Swiss mice (males, 20 g) or neonate Wistar rats from the central animal facility of Universidade Federal do Rio Grande do Sul were used for these experiments. Groups of six animals each were injected by intraperitoneal route or received orally (intragastric tubing) a single dose of canatoxin [15] (3 mg/kg, equivalent to 1.5 LD₅₀ [13]) or Jaburetox-2Ec (10 mg/kg) in phosphate buffered saline. The animals were kept in individual cages, except neonate rats which were returned to their mother's, and observed daily during the next 5 days. The experimental protocols were designed according to approved institutional protocols for animal experimentation.

2.8. Statistical analysis of bioassays

Unpaired Student *t*-test was applied to the bioassay data and *p* < 0.05 was considered significant.

2.9. Ab initio modeling of Jaburetox-2Ec

ROSETTA was used for *ab initio* model building using default protocols: 2000 individual models were constructed from 3- and 9-residue segments using Monte Carlo substitution and optimization protocols [29,30]. These were clustered based on RMSD calculations [27] and visualized and compared with PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>).

3. Results

3.1. Jaburetox-2Ec cloning

The Jaburetox-2Ec fragment was amplified by PCR from the JBURE-IIB gene, previously cloned in pGEMT-easy by Pires-

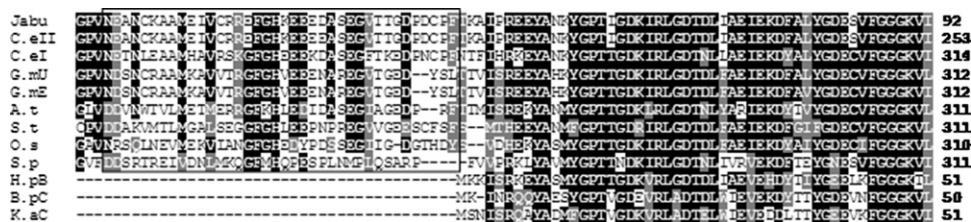


Fig. 2 – Alignment of Jaburetox-2Ec with other ureases. Alignment of Jaburetox-2Ec with plant, fungal and bacterial ureases using CLUSTAL W. The sequences are from *Canavalia ensiformis* JBURE-I (GenBank Accession no. AAA83831) C.eI, *Canavalia ensiformis* JBURE-II (AAN08919) C.eII, *Glycine max* embryo-specific (AAO85884) G.mE, *Glycine max* ubiquitous (AAO8583) G.mU, *Arabidopsis thaliana* (AAG52306) A.t, *Solanum tuberosum* (CAC43860) S.t, *Oriza sativa* (BAB78715) O.s, *Schizosaccharomyces pombe* (CAB52575) S.p, *Helicobacter pylori* chain B (AAL86896) H.pB, *Bacillus pasteurii* chain C (4UBPC) B.pC and *Klebsiella aerogenes* chain C (AAA25149) K.aC. The box indicates the region between beta and alpha domains (bacterial UreB and UreC).

Alves et al. [26] and introduced into pET 101 vector using primers that inserted an initiation codon (Fig. 1). The sequence was cloned in frame to V-5 epitope and a poly-Histidine tag. The Jaburetox-2Ec sequence was compared with other sequences from Databanks using BLASTp and showed identity ranging from 53 to 73% to plant ureases (*Oriza sativa* and JBURE-I isoform from *C. ensiformis*, respectively). The alignments in Fig. 2 show that Jaburetox-2Ec is located between the beta and alpha domains being partially absent in all microbial ureases sequenced so far.

3.2. Expression of V5-6His tagged recombinant Jaburetox-2Ec in E. coli and purification

The pET/Jaburetox-2Ec vector was transformed into *E. coli* strain BL21 Star (DE3). The resulting *E. coli* BL21 (pET101/Jaburetox-2Ec) strain produced V5-His6 tagged recombinant Jaburetox-2Ec, driven by the IPTG-inducible T7 promoter. A differential band, corresponding to the expected 13 kDa (10 kDa of Jaburetox-2 and 3 kDa of V-5 epitope and 6 His

tag) recombinant protein was observed in SDS-PAGE for the *E. coli* BL21 (pET101/Jaburetox-2Ec) total lysate after IPTG induction (Fig. 3A). This band was absent from the control (not induced) total lysate. The expression conditions were optimized to increase the yield of Jaburetox-2Ec and the best results were obtained after induction with 1 mM IPTG at 37 °C for 2 h. Using this condition, Jaburetox-2Ec was purified from 250 ml *E. coli* (pET 101/Jaburetox-2Ec) culture. The bulk of recombinant protein remained soluble after sonication of the cells, allowing the purification of the native protein by Ni²⁺ affinity chromatography (Fig. 3B). The final yield of purified Jaburetox-2Ec was estimated as 6.3 mg/L of *E. coli* culture. The recombinant Jaburetox-2Ec was recognized by anti-canatoxin polyclonal antibodies (Fig. 3B).

3.3. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec

The entomotoxic effect of recombinant Jaburetox-2Ec was tested against third instar *D. peruvianus*, fed on artificial cotton seeds containing 0.01% (w/w) freeze-dried purified Jaburetox-

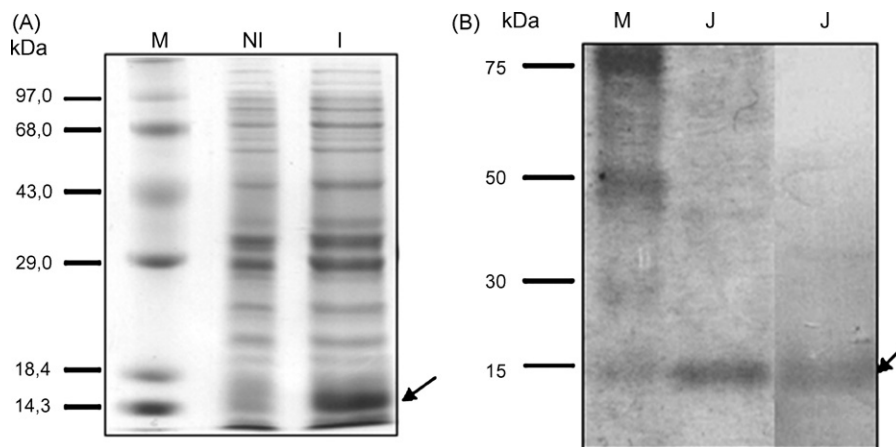


Fig. 3 – Production of recombinant Jaburetox-2Ec. (A) SDS-PAGE analysis of the recombinant Jaburetox-2Ec in cell lysates. Lane NI, without induction. Lane I, 1-h induction with 0.75 mM IPTG. (B) SDS-PAGE analysis of purified Jaburetox-2Ec. Lane J: 10 µg protein eluted from the Ni²⁺ affinity column chromatography. Right side: Western blot analysis of recombinant Jaburetox-2Ec with anti-canatoxin antibodies and anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugates. In all panels: lane M, molecular markers. The numbers on the left indicates molecular mass of markers in kDa. The gels were stained with Coomassie blue.

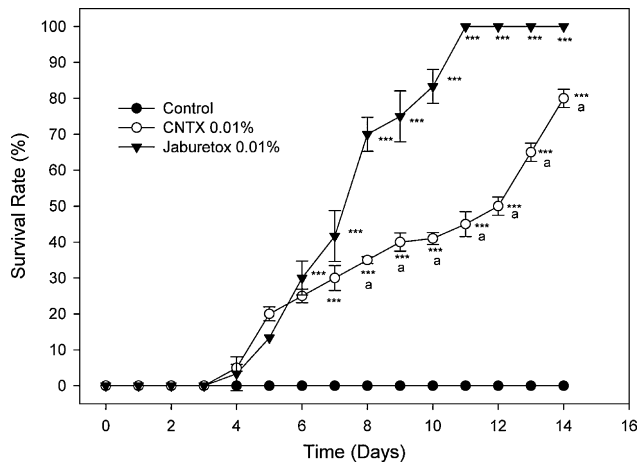


Fig. 4 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec on *D. peruvianus*. Third instar nymphs fed on artificial seeds containing 0.01% (w/w) Jaburetox-2Ec. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as mean mortality and S.E.M. of three independent experiments in triplicates. Level of significance in the t-test in comparison to control insects ($p < 0.001$) or between the experimental groups (^a $p < 0.001$) are indicated.**

2Ec. For comparison, canatoxin was fed to insects at the same dose. The insects were observed for mortality during 15 days. As shown in Fig. 4, the lethal effect of Jaburetox-2Ec was time dependent, with a lag phase of 3–4 days and 100% mortality being reached after 11 days. Mortality of canatoxin-fed insects showed a slower rate with 20% insects still alive at the end of the experiments.

In order to test the insecticidal activity against insects with trypsin-based digestion and alkaline midguts, which are insensitive to intact ureases [7], third instars *S. frugiperda* received a diet of *P. vulgaris* foliar discs containing air-dried Jaburetox-2Ec. The larvae were given 16.3 μg of Jaburetox-2Ec on days 0, 2 and 4. On the second day, the mean weight of

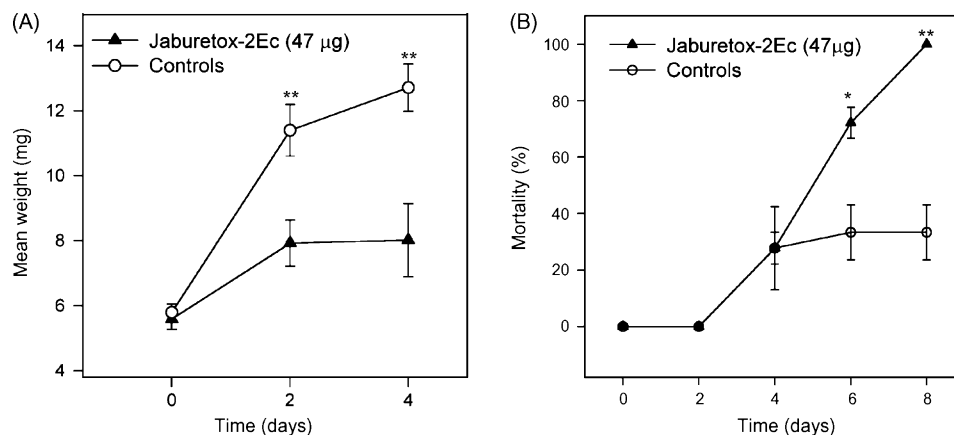


Fig. 5 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec in *S. frugiperda*. Three groups of six third instars *S. frugiperda* received at days 0, 2 and 4, a foliar (*P. vulgaris*) disc containing 16.3 μg air-dried Jaburetox-2Ec. (A) Weight gain of individual insects at days 0, 2 and 4. (B) Mortality (%) of larvae in each group was registered on days 0, 2, 4, 6 and 8. Data are expressed as mean and S.E.M. of one experiment out of three. Asterisks indicate level of significance in the t-test ($p < 0.05$; ** $p < 0.005$) in comparison to control insects.

larvae feeding Jaburetox-2Ec was approximately 30% smaller than the controls (Fig. 5A). A lag phase of 2 days was observed before lethality of the insects and on sixth day, after ingesting a total of 47 μg jaburetox-2Ec, all larvae were dead (Fig. 5B).

3.4. Toxicity of Jaburetox-2Ec to mice and neonate rats

Mice and neonate rats injected with a single dose of 10 mg/kg of Jaburetox-2Ec were alive and showed no signs of toxicity 5 days after the injection, contrasting to animals that received intraperitoneally 3 mg/kg of canatoxin (equivalent to 1.5 LD₅₀ [13]), which died within 12 h after injection. The toxic effects of canatoxin in mice and rats have been previously described [5,8]. When Jaburetox-2Ec or canatoxin were given by oral route at the same dose, all animals survived with no symptoms of intoxication.

3.5. Modeling of Jaburetox-2Ec

Modeling was carried out in order to see if the structural properties of Jaburetox-2Ec offered any clues as to its mode of action. As shown in Fig. 2, the N- and C-terminal portions of the peptide are homologous to regions of different chains of bacterial ureases, potentially providing templates for modeling of Jaburetox-2Ec. For example, the Jaburetox-2Ec sequence could be aligned with residues 204 onwards of chain A of the *H. pylori* urease crystal structure [18] (PDB code 1e9y) and the first 51 residues of chain B of the same structure. However, these regions have few contacts in the crystal structure, within themselves and between the chains—evidently once the Jaburetox-2Ec sequence is cleaved from its parent enzyme it must undergo significant structural reorganization.

We therefore employed the emerging technology of *ab initio* protein modeling to the Jaburetox-2Ec sequence. We used the Rosetta program [27,29,30] which assembles many different models from protein fragments and ranks them according to how many times similar models emerge from independent trials and are clustered together. In this case, no particular model emerged as appearing favorable with the top 10 models

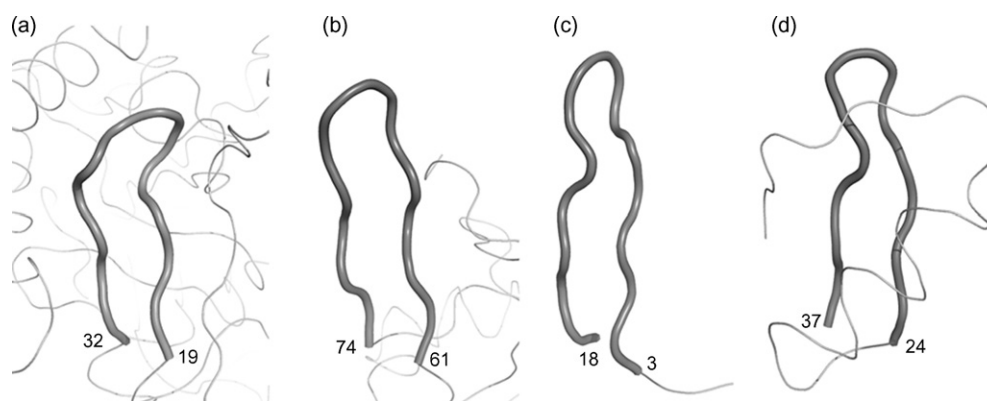


Fig. 6 – Ab Initio modeling of Jaburetox-2Ec and comparison to other β -hairpin motifs. β -Hairpin motifs (shown as cartoon representation in darker color) in (a) the intact *H. pylori* urease [24] (PDB code 1e9y), (b) one of the top 10 *ab initio* models of Jaburetox-2Ec, (c) protegrin [1] (PDB code 1pg1) and (d) charybdotoxin [21] (PDB code 2crd). The termini of the motifs are labeled with residue numbers.

all representing clusters of similar size. Nevertheless, although differing significantly in the packing of α -helices, with a single exception, they contained a large, generally exposed, β -hairpin structure (Fig. 6b). Since this feature was near-ubiquitous among the model set, and also present in the known crystal structures of urease (Fig. 6a), it was viewed as a reliable predictor with possible implications for function as discussed below.

4. Discussion

Plant genetic transformation with exogenous genes encoding factors of resistance to phytophagous insects is an interesting strategy to reduce crop losses due to insect attack. Efforts have been focused on studies of different insecticidal proteins [4].

In this work, we have expressed in *E. coli* a peptide derived from JBURE-II, an isoform of urease from *C. ensiformis*, and demonstrated its insecticidal effect. The conditions for expression of the pET 101/Jaburetox-2Ec amplicon were optimized and a satisfactory yield was obtained. Jaburetox-2Ec was recognized by anti-canatoxin polyclonal antibodies (Fig. 2B) and the sequence of recombinant Jaburetox-2Ec was determined by mass spectrometry, confirming the correct translation of the recombinant peptide (data not shown).

The entomotoxicity observed for this recombinant peptide, derived from the JBURE-II urease isoform, corroborates the hypothesis that plant ureases are protoxins able to release entomotoxic peptide(s) upon limited proteolysis, as demonstrated for canatoxin [12]. As reported for canatoxin [7], the insecticidal activity of Jaburetox-2Ec occurs at very low doses at 0.01–0.1% (w/w), as compared to other plant-derived entomotoxic proteins [4]. The mortality observed against *D. peruvianus* after 10 days on diet containing Jaburetox-2Ec was two times higher than that observed for canatoxin under the same conditions. Calculations of doses effectively administered to the insects are difficult in the conditions of our bioassay (30 insects feeding on a single artificial seed during 15 days). Since the same w/w proportion of Jaburetox-2Ec (12.6 kDa) and canatoxin (monomer, 90 kDa) were present in

the artificial seeds, the amount of processed/entomotoxic peptide released from canatoxin would be 7.5-fold lower, therefore the lower lethality could be related to a lower dose of active peptide in the insects. Additionally the increased lag phase observed for the entomotoxic effect of canatoxin could also reflect the need for proteolytic activation of the intact protein to release the active peptide. In a previous work, insects relying on serine-proteinases as their main digestive enzymes, including lepidopterans such as *S. frugiperda* [11,10], were shown to be resistant to canatoxin's insecticidal effect. This resistance was attributed to an extensive hydrolysis of canatoxin by this class of proteolytic enzymes [7]. Here we demonstrated that young forms of *S. frugiperda* are also susceptible to the entomotoxic activity of Jaburetox-2Ec. Other insects with trypsin-based digestion such as the soybean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*, the German cockroach *Blattella germanica* and the termite *Cornitermis cumulans*, are also susceptible to Jaburetox-2Ec but not to canatoxin or urease (unpublished data). Thus, it appears that the species-specificity of plant ureases insecticidal activity is mainly related to the ability of the insect's digestive enzymes to adequately process the protein into an active entomotoxic peptide. If this step is not necessary, either by exposure to a preformed or a recombinant peptide, a broader range of insects is expected to be effectively controlled by this class of compounds.

Feeding trials have shown that the major isoform of *C. ensiformis* urease JBURE-I was as lethal as canatoxin against the kissing bug *R. prolixus* [4] and *D. peruvianus*, whereas both jackbean ureases were three-fold more potent than the soybean embryo specific urease [14]. The variation in entomotoxicity among plant ureases already studied is probably related to differences in the sequences corresponding to the Jaburetox peptide or inter-domain regions. In fact the N-terminal region of Jaburetox shares only 51% identity with the same region in soybean ureases, which is significantly lower than the overall identity of plant ureases, for instance, the beta (about 80% identity) or the alpha (about 83% identity) domains of JBURE-II as compared to soybean ureases (Fig. 2). Since the sequence corresponding to Jaburetox in ureases is not involved either in the enzymatic activity or in

subunit association, as shown by its absence in bacterial ureases, it probably diverged at a faster rate. Thus, variations of the biological properties of these sequences among plant ureases can be expected.

This internal sequence is also not responsible for the toxicity of canatoxin as Jaburetox-2Ec was innocuous at a 20-fold higher protein mass/body weight ratio than the LD₅₀ for mice and rats [5,8], either by intraperitoneal injection or by oral route (neonatal rats were chosen because of the increased permeability of their digestive tract).

Examination of the bacterial urease structures makes clear that there must be significant rearrangement of the Jaburetox portion post-cleavage, ruling out conventional model building by homology. *Ab initio* models were therefore constructed with ROSETTA. These were used to provide clues as to the possible molecular mode(s) of insecticidal action of the peptide. It was already known that Jaburetox is not an inhibitor of insect digestive enzymes [7,17]. After Jaburetox ingestion, the insects were momentarily paralyzed and show uncoordinated movements of antennae preceding death, suggesting that it might act as a neurotoxin or lead to cell death by affecting membrane permeability.

Peptides capable of forming pores in cell membranes are a very diverse group, divided into classes based on size and other characteristics [3]. Some insecticidal proteins, the Cry δ -endotoxins, form pores by insertion of an α -helical hairpin (two α -helices lying antiparallel) into the membrane [22]. In the set of Jaburetox models this motif was absent, ruling out this mode of action. Single amphiphilic helices such as the antibiotic peptide melittin [33] or peptides derived from the apoptosis regulator Bax can form membrane pores [16] but none of the predicted helices of Jaburetox are amphiphilic in nature. Equally, there is no sign in the Jaburetox sequence of five consecutive hydrophobic residues forming a β -turn, the motif responsible for membrane insertion of the toxin aerolysin [19].

In contrast, nine of the 10 proposed *ab initio* models of Jaburetox contained β -hairpin structures, formed from residues whose counterparts in bacterial urease structures also form this motif (Fig. 7). Intriguingly, this motif is common (Fig. 7) to both a class of pore-forming peptides [3] and to a type of neurotoxin [23], represented by charybdotoxin [1], whose toxicity arises from binding to and inhibition of membrane ion (K⁺) channels. In this context it is noteworthy to mention that neurotoxic symptoms (such as paralysis and uncoordinated movements of limbs and antenna) are seen in *R. prolixus* intoxicated by Jaburetox-2Ec. In a study to be published somewhere else, we showed that very low concentrations (10⁻¹² M) of Jaburetox-2Ec inhibit in a [K⁺]-dependent manner the serotonin-stimulated diuresis of Malpighian tubules isolated from *R. prolixus* which probably is the cause of the impaired water excretion observed in intact insects after receiving a canatoxin meal [7].

In the above cases, a majority of natural peptides contain disulphide bridges but active cysteine-free analogues can be produced [21] and it is easy to imagine that the rest of the Jaburetox toxin folds so as to reproduce the role of the bridges in stabilizing the β -hairpin motif in the free peptide. The absence of the N-terminal part of the Jaburetox sequence in bacterial ureases would compromise this

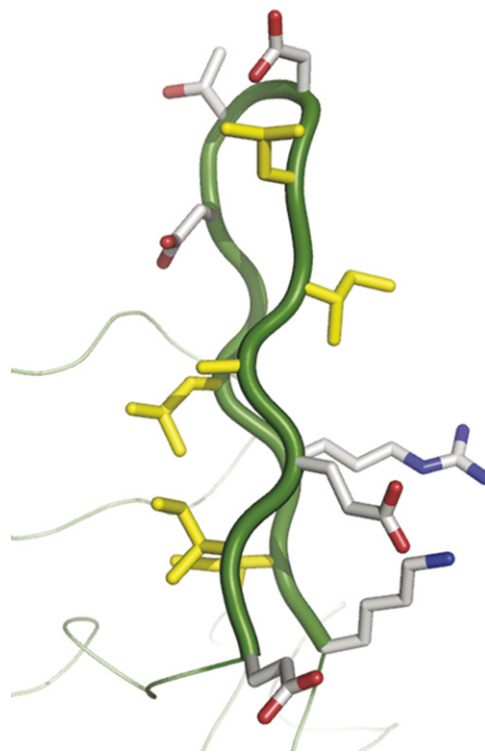


Fig. 7 – The amphiphilic character of the β -hairpin motif in one of the top 10 *ab initio* models of Jaburetox-2Ec. Hydrophobic residues (yellow carbon) predominate on the left face while hydrophilic residues (white carbon) form the majority of the other face. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

stabilization and no such structure would exist excised from the whole molecule, in agreement with our previous observation that *B. pasteurii* urease is not lethal to *D. peruvianus* [14].

In the case of protegrins, a class of pore-forming antimicrobial peptides, the β -hairpin motif has a pronounced amphiphilic character [9]. *Ab initio* models of Jaburetox contain β -hairpins with similar characteristics (Fig. 7). In summary, while it was unrealistic to expect modeling alone to produce a definitive mode of action prediction, it was certainly capable of clearly ruling several out of consideration. As a working hypothesis the modeling suggests that a β -hairpin motif present in Jaburetox may be responsible for its insecticidal property through either ion channel inhibition or pore-forming activity.

5. Conclusions

In conclusion, in this paper we described the heterologous expression of a new insecticidal peptide, derived from an internal sequence of JBURE-II urease isoform. This result corroborates the hypothesis that plant ureases are protoxins, and can be related to plant arsenal of defenses against insects. The molecular modeling suggested activity based on

neurotoxicity or cell permeation. The insecticidal properties at low doses and the lack of acute toxicity to mammals emphasize the potential use of this protein in the control of insect pests.

Acknowledgements

We are grateful to Maria Martha Guedes Chaves for preparation of Canatoxin and Jaburetox-2Ec. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Cooperação Acadêmica—Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Procad-CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX-MCT).

REFERENCES

- [1] Bontems F, Gilquin B, Roumestand C, Menez A, Toma F. Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. *Biochemistry* 1992;31:7756–64.
- [2] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [3] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3:238–50.
- [4] Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 2002;40:1515–39.
- [5] Carlini CR, Guimarães JA. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin-A. *Toxicon* 1981;19:667–76.
- [6] Carlini CR, Ferreira-Da Silva CT, Gombarovits MEC. Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina: Processo de Produção. Patent No. 0003334-0. Rio de Janeiro, Brazil: Instituto Nacional de Propriedade Industrial; 2000.
- [7] Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA. Biological effects of canatoxin in different insect models. Evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J Econ Entomol* 1997;90:340–8.
- [8] Carlini CR, Gomes CB, Guimarães JA. Central nervous effects of the convulsant-protein canatoxin. *Acta Pharmacol Toxicol* 1984;54:161–6.
- [9] Fahrner RL, Dieckmann T, Harwig SS, Lehrer RI, Eisenberg D, Feigon J. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem Biol* 1996;3:543–50.
- [10] Ferreira C, Capella AN, Sitnik R, Terra WR. Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* 1994;26:299–313.
- [11] Ferreira C, Capella AN, Sitnik R, Terra WR. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp Biochem Physiol* 1994;107A:631–41.
- [12] Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits ME, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol* 2000;44(4):162–71.
- [13] Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja-Fidalgo. et al. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* 2001;360:217–24.
- [14] Follmer C, Real-Guerra R, Wassermann GE, Oliveira-Severo D, Carlini CR. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem* 2004;271:1357–63.
- [15] Follmer C, Wassermann GE, Carlini CR. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Sci* 2004;167:241–6.
- [16] Garcia-Saez AJ, Coraiola M, Serra MD, Mingarro I, Muller P, Salgado J. Peptides corresponding to helices 5 and 6 of Bax can independently form large lipid pores. *FEBS J* 2006;273:971–81.
- [17] Gombarovits MC. Peptídeos Entomotóxicos gerados a partir da CNTX: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. M.Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil; 1999.
- [18] Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol* 2001;8:505–9.
- [19] Iacovache I, Paumard P, Scheib H, Lesieur C, Sakai N, Matile S, et al. A rivet model for channel formation by aerolysin-like pore-forming toxins. *EMBO J* 2006;25:457–66.
- [20] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [21] Lai JR, Huck BR, Weisblum B, Gellman SH. Design of non-cysteine-containing antimicrobial beta-hairpins: structure-activity relationship studies with linear protegrin-1 analogues. *Biochemistry* 2002;41:12835–42.
- [22] Leetachewa S, Katzenmeier G, Angsuthanasombat C. Novel preparation and characterization of the alpha4-loop-alpha5 membrane-perturbing peptide from the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba delta-endotoxin. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:270–7.
- [23] Menez A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon* 1998;36:1557–72.
- [24] Mobley HL, Island MD, Hausinger RP. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 1995;59:451–80.
- [25] Mulinari F, Freitas-silva MA, Grossi-de-Sá MF, Moraes MG, Kurtenbach E, Carlini CR. Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Patent INPI-RS, No. 001120/RS; 2004.
- [26] Pires-Alves M, Grossi-de-Sá MF, Barcellos GBS, Carlini CR, Moraes MG. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant Cell Physiol* 2003;44(2):139–45.
- [27] Shortle D, Simons KT, Baker D. Clustering of low-energy conformations near the native structures of small proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;111:58–62.
- [28] Silva CP, Terra WR. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochem Mol Biol* 1994;24(5):493–505.
- [29] Simons KT, Kooperberg C, Huang E, Baker D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions. *J Mol Biol* 1997;268:209–25.
- [30] Simons KT, Ruczinski I, Kooperberg C, Fox BA, Bystroff C, Baker D. Improved recognition of native-like protein

- structures using a combination of sequence-dependent and sequence-independent features of proteins. *Proteins* 1999;34:82-95.
- [31] Stanisçuaski F, Ferreira-DaSilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 2005;45:753-60.
- [32] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
- [33] Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 2001;81:1475-85.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity

Geizecler Tomazetto^a, Fernanda Mulinari^a, Fernanda Stanisçuaski^a, Beatriz Settembrini^b,
Célia Regina Carlini^c, Marco Antônio Záchia Ayub^{d,*}

^a Cellular & Molecular Biology Post-Graduation Program, Center of Biotechnology, IB, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Facultad de Ciencias Biomedicas, Universidad Austral, Pilar, Argentina

^c Department of Biophysics, IB, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500,
P.O. Box 15090, ZC 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves,
9500, P.O. Box 15090, ZC 91570-901 Porto Alegre, RS, Brazil

Received 27 March 2007; received in revised form 5 July 2007; accepted 6 July 2007

Abstract

The nucleotide sequence encoding for an insecticidal peptide derived from the *Canavalia ensiformis* urease gene *jbureII* (AF 468788), was cloned and expressed in the pET101/*Escherichia coli* expression system. Bacterial cultivation in shaker with lactose as inducer produced 1.26 µg of recombinant peptide/mg protein, after 8 h of growth. The plasmid stability and the expression of the recombinant peptide were studied in bioreactor. Expression of the recombinant peptide was strongly affected by pH of cultures, with a decrease of more than 50% when acidification was freely allowed. Likewise, peptide production and plasmid stability were shown to be affected by aeration and agitation speed, both decreasing for higher values of oxygen mass transfer rates. Despite these difficulties, in bioreactor cultures carried out with controlled pH, low oxygen mass transfer rates and using lactose as inducer, we were able to achieve a total peptide production of 7.14 µg/mg protein, which represents approximately 2% of total cell protein. Bioassays were carried out using the purified peptide on insect models. The peptide fed to *Dysdercus peruvianus* nymphs produced 100% mortality after 11 days, deaths starting with a lag phase of 3–4 days, confirming that the bioreactor-produced peptide retained its biological activity.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Plasmid stability; Recombinant *E. coli*; Bioreactor cultivation; Canatoxin; Bioinsecticide

1. Introduction

Canatoxin, a variant form of urease isolated from *Canavalia ensiformis* (Leguminosaea) seeds [1], was the first plant urease for which we have demonstrated insecticidal properties [2,3]. This toxicity is caused by an internal peptide (~10 kDa) released from ureases by proteolytic hydrolysis by insect cathepsin-like digestive enzymes [4], which was further confirmed in bioassays on *Dysdercus peruvianus*, a pest of cotton cultures [5]. The use of this recombinant peptide as bioinsecticide has emerged as an attractive biotechnological tool for the application in the control of insect pests of several crop cultures [6].

Escherichia coli is one of the most frequently used host system for recombinant protein production, mainly because it is such a well-characterized system [7]. Despite the extensive knowledge on the genetics and molecular biology of *E. coli*, there is always an uncertainty on whether a recombinant protein will accumulate in this bacterium [8]. Expression is a product of genetics of the host microorganism and process engineering, both being essential parts in the development of a successful bio-process [9]. As very often observed, high yields of recombinant proteins generally impose metabolic burdens to cells, negatively impacting plasmid stability during cultivation, with significant losses in productivity [10,11].

The *lac*, *tac* and *trc* promoters, which are induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), are frequently used in basic molecular biology research. However, due to its toxicity, IPTG should be considered unsuitable for the production of therapeutic proteins for human uses, besides being expensive, which

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33086685; fax: +55 51 33087048.
E-mail address: mazayub@ufrgs.br (M.A.Z. Ayub).

is a serious drawback for the large-scale production of recombinant protein. As an alternative, lactose could be employed as a much cheaper and safer inducer, and can be metabolized as carbon and energy source by many bacteria [12].

In this work, we studied the production of an insecticidal peptide, encoded by a truncated cDNA derived from the *jbureII* gene (AF 468788) coding for an isoform of *C. ensiformis* urease characterized in previous studies [13,14], and the stability of pET101-based plasmids expressing this gene in the commercial *E. coli* BL 21 system. Despite the plasmid instability, we were able to produce the recombinant peptide in a bioreactor culture, under controlled conditions regarding oxygen mass transfer rates, pH control and the use of lactose as inducer, instead of IPTG. The purified peptide was bioassayed to investigate its bioinsecticide activity.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strain and plasmid

The construction of the expression system in *E. coli* BL 21 (DE) is described elsewhere [13]. Briefly, this strain was transformed with plasmid pET101, which was constructed by inserting a nucleotide sequence of 270 bp derived from the *jbureII* gene (AF 468788) encoding the entomotoxic peptide Jaburetox-2Ec (81 aminoacids starting from G169) cloned in frame to V-5 epitope and a poly-histidine tag, resulting in a 270 bp insert. Expression of this sequence was under the control of the T7 promoter.

2.2. Cultivation experiments in shaker

Shake flask experiments with BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks filled with 50 mL Luria Bertini (LB) medium supplemented with 150 µg/mL ampicillin, incubated at 37 °C, 100 rpm. Cultures were inoculated with 0.5% (v/v) of an overnight preculture grown to 0.7 OD₆₀₀. Two concentrations of lactose were tested for induction: 10 and 20 g/L. Samples were taken at 1 h interval time after lactose induction and were analyzed for the production of recombinant peptide.

2.3. Bioreactor experiments

Pre-inoculae were prepared as follows. One hundred-millilitre Erlenmeyers containing 25 mL LB supplemented with 150 µg/mL ampicillin were inoculated from a single colony and incubated at 37 °C, 100 rpm for 18 h. These cultures were transferred to 500 mL flasks containing 150 mL LB (150 µg/mL ampicillin) and incubated under the same conditions as above. These cultures were grown to OD₆₀₀ of 1.0 and the whole volume (150 mL) was used to inoculate the bioreactors. Batch cultivations were performed using 2-L Braun bioreactors (B. Braun, Germany), fully equipped for temperature, aeration and pH control, with an initial medium volume of 1350 mL LB with 150 µg/mL ampicillin, and temperature was kept constant at 37 °C. The pH was controlled at 7.0 by phosphoric acid (5%, v/v) and sodium hydroxide (10%, v/v). In all batches, when the concentration of exponentially growing cells reached OD₆₀₀ 0.7, protein was induced by the addition of 45 g of lactose dissolved in 500 mL LB (150 µg/mL ampicillin). Batch experiments using mineral medium (MM) were carried out in the 2-L bioreactors with an initial working volume of 1350 mL medium, containing (in g/L): glucose, 10; KH₂PO₄, 3; NaCl, 0.5; NH₄Cl, 1; MgSO₄·7H₂O, 0.5; Na₂HPO₄·7H₂O, 12.8; bactopectone, 10; 150 µg/mL ampicillin; 1 mL/L of filtered sterilized trace metal solution (of 1 M solutions): FeSO₄·7H₂O, 2.8; MnCl₂·4H₂O, 2; CoSO₄·7H₂O, 2.8; CaCl₂·2H₂O, 1.5; CuCl₂·2H₂O, 0.2; ZnSO₄·7H₂O, 0.3. Glucose was sterilized separately. The culture temperature was kept constant at 37 °C and pH was controlled at 7.0 as described above. Aeration (L air/L medium/min, expressed as vvm) and agitation speed (rpm) were controlled either at 4 vvm and 400 rpm or 5 vvm and 500 rpm in order to produce different oxygen mass transfer rates (k_{la}), which was measured by the dynamic

gassing out method described by Doran [15]. Dissolved oxygen level in the broth was measured using a polarographic electrode and was expressed as percentage of O₂ saturation. The culture entering stationary phase was induced with lactose dissolved in the same medium (500 mL, supplemented with 150 µg/mL ampicillin). The pre-inoculae and inoculae were prepared with the same medium.

Samples of 10 mL were taken at frequent intervals in order to measure cell density, total reducing sugars, plasmid stability, total soluble protein and recombinant peptide.

2.4. Purification of the recombinant peptide

The cells were harvested by centrifugation and the pellet was suspended in 10 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) Triton X-100, 10 mM imidazole, sonicated and centrifuged (14,000 × g, 20 min). The supernatant was loaded onto a 2 mL Ni affinity column (Ni-NTA-QIAGEN), equilibrated in 50 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole. After 30 min, the column was washed with 20 mL of the same buffer, containing 20 mM imidazole. The protein was eluted with 200 mM imidazole and quantified by the Bradford method.

2.4.1. Analytical procedures

Biomass concentration was determined as optical density (OD) at 600 nm and converted to dry cell weight using a standard curve calibration. The total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE on 12.5% (w/v) polyacrylamide gels stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250. Total soluble protein was analyzed by the Bradford method and the amount of recombinant peptide was analyzed by ELISA assay, calibrated in 0.2–10 µg/mL concentration range of the recombinant peptide purified on Ni-NTA agarose [12]. Plasmid stability of cultures was determined by statistical colony counting on agar LB plates with and without ampicillin. After incubation at 37 °C for 24 h, plasmid stability was determined by calculating the percentage of colonies resistant to ampicillin. Reducing sugars were determined by the DNSA method [6].

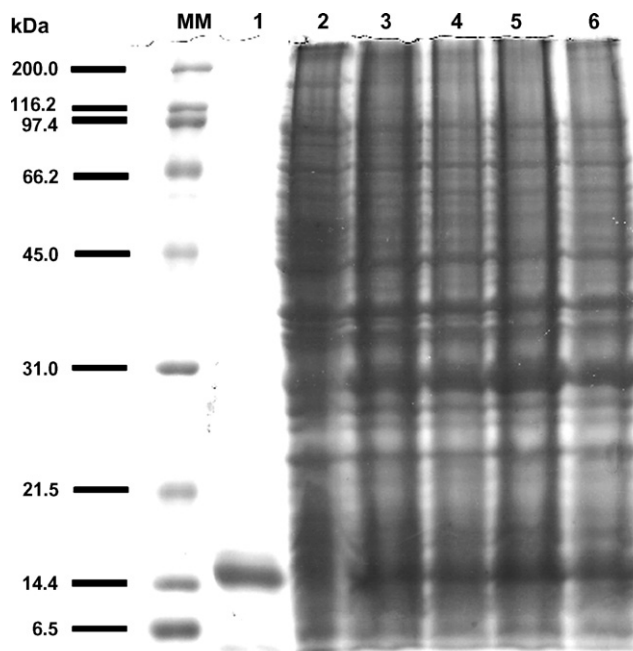


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of recombinant peptide Jaburetox-2Ec induction in *E. coli* BL 21 with the addition of 10 g/L of lactose. Lane 1: purified recombinant peptide; Lane 2: total cell extract without induction; Lanes 3–6: cell extracts after 2, 4, 6 and 8 h of induction, respectively. M, molecular weight mass standard. Arrows indicate the recombinant peptide.

2.5. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec

For the bioassays the purified Jaburetox-2Ec was exhaustively dialyzed against 5 mM sodium phosphate pH 7.5 buffer and the last change of dialysis buffer was used as control. Bioassays were carried out using as insect models the cotton stainer bug *D. peruvianus* [5] and the kissing bugs *Rhodnius prolixus* [4] and *Triatoma infestans*. Third instars *D. peruvianus* were fed on artificial cotton seeds, consisting of gelatin capsules filled with cotton seed flour and 0.01% (w/w) freeze-dried recombinant peptide. Groups of 30 insects were tested and monitored for survival during 15 days. Alternatively, *R. prolixus* (4th instars) and *T. infestans* (5th instars and adults) received 0.02–0.1 µg recombinant peptide/g body weight by intrathoracic injection with a Hamilton syringe. Control insects were injected an equivalent volume of buffer. Survival was followed up for 2 days.

3. Results and discussion

3.1. Peptide induction with lactose

The *pet* vectors family is designed to be used with IPTG as inducers. In a previous study [13], the peptide was induced with IPTG, with a final yield of purified Jaburetox-2Ec estimated as 0.6 µg/mg protein. We also observed that the time course

of Jaburetox-2Ec expression did not change after 1, 2, 3 and 6 h after IPTG-induction [13]. In order to investigate whether lactose could substitute IPTG for induction, several different experiments in shaker were run. Fig. 1 shows the SDS-PAGE pattern of cell protein after different regimes of induction. Results demonstrated that the production of recombinant peptide in presence of 10 g/L of lactose reached 1.26 µg/mg protein, while using a concentration of 20 g/L of lactose the accumulation of peptide was much lower (0.76 µg/mg protein, gel not shown) showing that 10 g/L was not only sufficient for expression, but also avoided substrate-induced protein repression, somehow contrasting with results from a previous work, when Gombert and Kilikian [12] suggested a concentration of 20–55 g/L lactose for the induction of the troponin C in *E. coli* BL 21. These discrepancies of data suggest that ideal lactose concentrations for the induction of different proteins will vary under specific culture conditions.

3.2. Influence of pH on induction and plasmid stability

The influence of pH on plasmid stability and peptide expression was studied in batch bioreactor cultures (agitation speed and

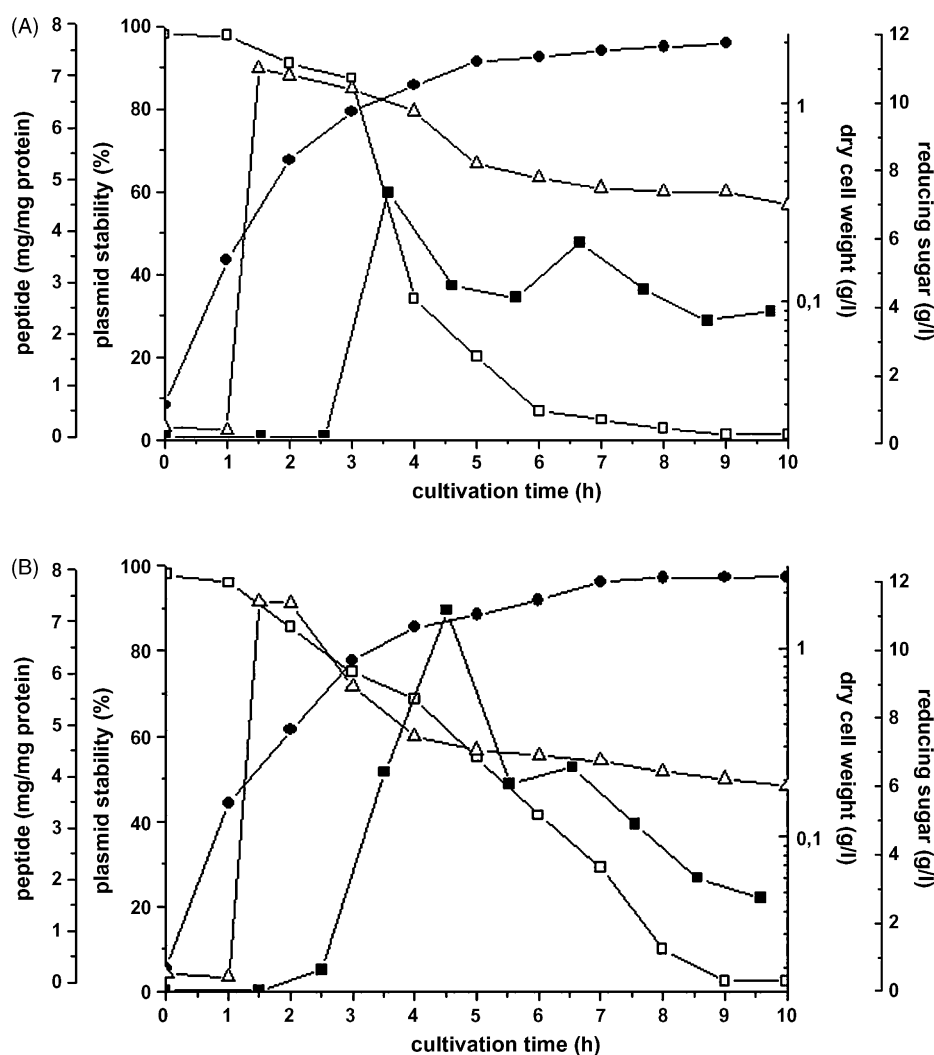


Fig. 2. Effect of pH on recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec in batch cultures. (A) Uncontrolled pH; (B) pH controlled at 7. Dry cell weight (●), plasmid stability (□), recombinant peptide (■) and reducing sugar (△). Results are presented as the mean of two experiments.

air flow rate set at 400 rpm and 2 vvm) and results are shown in Fig. 2(A and B). It can be observed that in the free varying pH batch, pH dropped from 7 to 5 and this variation was followed by decreased plasmid stability and decreased protein expression (4.74 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein), while in the controlled pH experiments, an increase of 50% of expression was achieved (7.15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein, Fig. 2B). Gupta et al. [16] reported that a variation of pH in the range of 5–8 had no significant effect on stability of the recombinant plasmid, pCPPS-31, in *E. coli* DH5 α , contrasting with our results. A pH variation could account for some loss of protein activity. However, in a previous work [4], we showed that the peptide is stable for pH in the range of 4.0–7.0.

3.3. Influence of aeration on induction and plasmid stability

In this series of batch experiments, with the purpose of establishing the influence of oxygen over plasmid stability and peptide expression, two sets of agitation speed and air flow rates were tested: 400 rpm, 2 vvm (Fig. 3(A)) and 500 rpm, 5 vvm

(Fig. 3(B)). The volumetric mass transfer rates for oxygen (k_{La}) for these two conditions were 17.2 and 41.3 h^{-1} , respectively. The pH was controlled and kept constant at 7. Under the higher oxygenation condition (500 rpm, 5 vvm), the expression of the recombinant peptide reached values 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of total protein, representing a seven-fold decrease when compared with batch under 400 rpm and 2 vvm (5.9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of total protein). De León et al. [17] reported similar results for recombinant penicillin acylase activity in *E. coli*. In their work, decreased dissolved oxygen tension had a positive effect on protein production.

3.4. Degradation of the peptide

Despite the fact that *E. coli* BL 21 has been reported to be protease-deficient (Novagen), in all batches shown in Figs. 2 and 3, after maximum expression of the recombinant peptide, there were always a decrease on its concentration, probably due to protein degradation. It might be possible that the rapid and massive expression of the recombinant protein imposed a

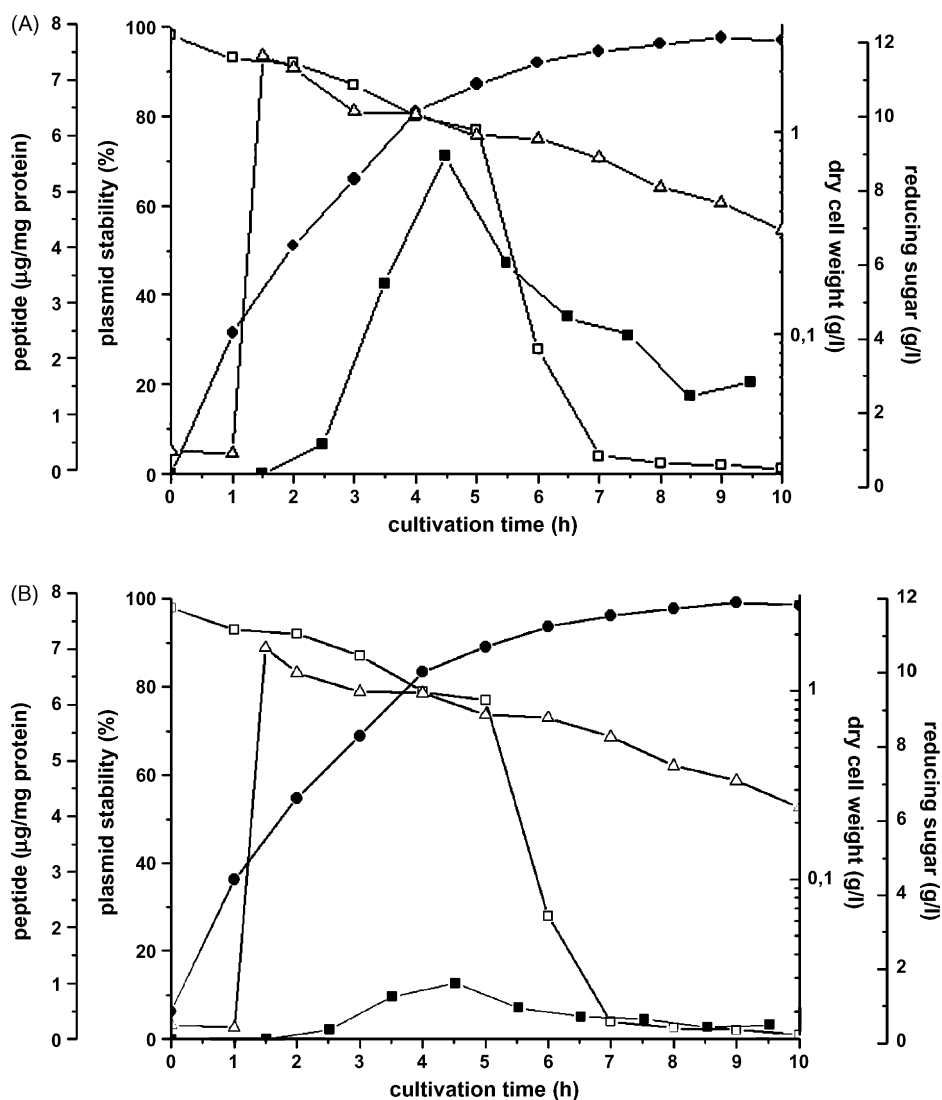


Fig. 3. Effect of aeration on recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec in batch cultures: (A) pH controlled at 7, agitation speed of 400 rpm and aeration of 2 vvm ($k_{\text{La}}=17.2 \text{ h}^{-1}$); (B) pH controlled at 7, agitation speed of 500 rpm and aeration of 5 vvm ($k_{\text{La}}=41.3 \text{ h}^{-1}$). Dry cell weight (●), plasmid stability (□), recombinant peptide (■) and reducing sugar (△). Results are presented as the mean of two experiments.

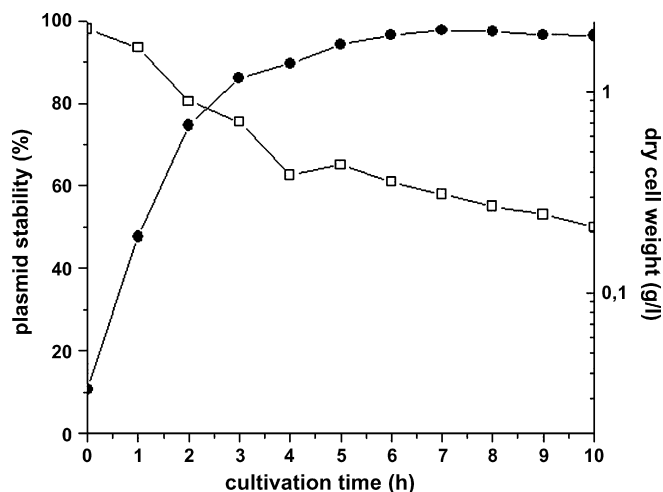


Fig. 4. Behavior of recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec in batch cultures without the addition of lactose as inducer. Dry cell weight (●) and plasmid stability (□). Results are presented as the mean of two experiments.

metabolic burden to the host cells, and increased the synthesis of the proteases in order to release amino acids from existing protein for incorporation into essential proteins [18].

3.5. Influence of peptide expression on plasmid stability

In order to further investigate the influence of expression over plasmid stability, a batch run without induction under the best condition for expression (controlled pH, 400 rpm, 2 vvm), was performed with results shown in Fig. 4. After 10 h of cultivation, there are still close to 50% of plasmid-harboring cells, compared to almost 0% in the previous batches with induction, further demonstrating that expression of the recombinant peptide imposed metabolic burden on the host cells, and can be one of the causes of plasmid instability. Sunitha et al. [19] described similar results, arguing that plasmid stability decreased with

increased phytase activity after induction, and concluded that a shorter expression time for higher protein productivity is necessary due to the instability of the plasmid upon longer cultivation times.

3.6. Influence of medium composition on induction and plasmid stability

According to Shiloach and Fass [20], growth of *E. coli* in Luria Bertani (LB) medium under controlled temperature, pH and oxygen can produce up to 1 g/L cell density. In this work, with different batch conditions, the cell density in LB medium reached in between 2 and 3 g/L, which represents a reasonable improvement of the process. However, in an attempt to increase both biomass and the expression of the recombinant peptide, we run an experiment where LB was replaced by defined mineral medium (MM) containing 10 g/L of glucose as carbon source. In these experiments, we followed the strategy of Ou et al. [21], who reported the induction with lactose after stationary phase was reached, which proved to be a better strategy for production of recombinant protein. In the results shown in Fig. 5, the cell density reaches 5.2 g/L, twice as much as obtained before, with 50% glucose conversion into biomass. Although lactose was able to induce the recombinant protein, the increased biomass formation did not represent any improvement in the specific amount of the recombinant peptide, which peaked around 1.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein at the end of the run, approximately four times lower than obtained for the cells growing in LB (Figs. 2 and 3). Plasmid stability observed after 14 h of cultivation was higher than 60% of plasmid-harboring cells. This higher stability observed in the minimal medium is probably due to lowest growth rate of cells ($\mu = 0.22 \text{ h}^{-1}$) when compared to their growth rate in LB broth ($\mu = 0.67\text{--}0.84 \text{ h}^{-1}$), with at least two mechanisms possibly involved: first, the lack of growth rate advantage for the plasmid-free cells over the plasmid-harboring cells and second, synchronized cell division and plasmid segregation [16].

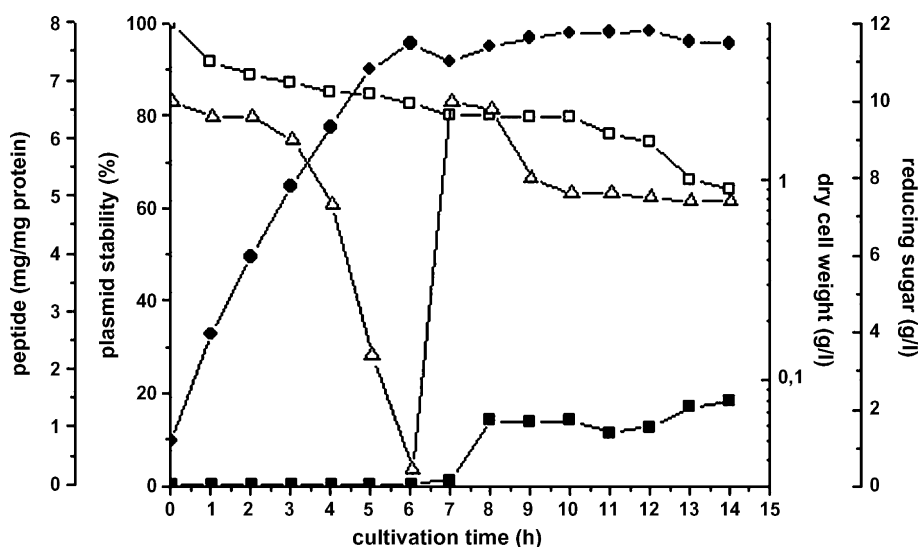


Fig. 5. Kinetics of batch cultures of recombinant *E. coli* BL 21 pET101/Jaburetox-2Ec growing in MM and glucose as carbon source. Conditions: pH controlled at 7; agitation speed 400 rpm; aeration 2 vvm. Lactose (10 g/L) was added as inducer at 6 h. Dry cell weight (●), plasmid stability (□), recombinant peptide (■) and reducing sugar (△). Results are presented as the mean of two experiments.

Table 1
Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec

Insect model (N)	Route–dose of purified peptide	Time for 100% lethality*
<i>D. peruvianus</i> 3rd instars (N=30)	Oral–peptide added to diet at 0.01% (w/w)	11 days
<i>R. prolixus</i> 4th instars (N=5)	Injection–0.026 mg/g	2 days
<i>T. infestans</i> 5th instars (N=5)	Injection–0.1 mg/g	15 h
<i>T. infestans</i> adult (N=5)	Injection–0.1 mg/g	20 h

* There was no significant lethality of control insects within the same period of time. The experiments were repeated at least three times with similar results.

3.7. Residual lactose concentration

Our results showed that there was always a residual concentration of lactose, which was not metabolized by cells. According to Gombert and Kilikian [12], lactose residue has an important role in the induction process of the expression of troponin C. Menzella et al. [22] have introduced two genetic modifications into *E. coli* BL 21, to allow this new strain an efficient use of lactose as inducer and carbon source. In their work, they showed that the complete metabolization of lactose had a clear positive effect on the final synthesis rate and concentration of recombinant protein.

3.8. Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec

Table 1 shows the lethal effect of the purified peptide Jaburetox-2Ec produced in the bioreactor in three different insects. As already described [5], the peptide fed to *D. peruvianus* nymphs produced 100% mortality after 11 days, deaths starting with a lag phase of 3–4 days. We previously reported the lack of effect of the intact urease/canatoxin from which the peptide is derived when fed to adult bugs [4,5] or when injected into the insect [23]. In contrast, the recombinant peptide killed either *R. prolixus* nymphs or nymphs and adults of *T. infestans* upon injection of 0.1 µg/g of insect body weight.

4. Conclusions

In this work, we were able to show that IPTG can be satisfactorily substituted by lactose for the induction and production of encoding canatoxin-derived peptide by recombinant *E. coli* BL 21 strain. Controlled bioreactor conditions were successful for increasing protein expression in shaker from 1.26 to 7.15 µg/mg total protein, representing an increase of six times in production. This is an important result, considering that most of the research on gene expression described in the literature is done by growing cells under uncontrolled shaker conditions. The insecticidal activity of Jaburetox-2Ec purified peptide occurs at very low doses, as compared to other plant-derived entomotoxic proteins, being the peptide active either given orally or by injection to the insects. Despite of excellent optimization of production of the peptide, plasmid instability remains a major setback for further studies aiming to scale up protein production. Moreover, the

concentration of the peptide did not remain constant throughout batch runs, probably due to cell protease activities causing degradation of the recombinant peptide. All these observations strongly suggest that the *E. coli* BL 21/pET101-based system expression is not suitable for commercial applications granting further studies aiming the biotechnological production of this newly identified bioinsecticide.

Acknowledgements

The authors wish to thank CNPq, CAPES and FAPERGS for their financial support of this research.

References

- [1] Follmer C, Barcellos GBS, Zingali RB, Machado OLT, Alves EW, Barja-Fidalgo C, et al. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* 2001;360: 217–24.
- [2] Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 2002;40:1515–39.
- [3] Follmer C, Real-Guerra R, Wassermann GE, Olivera-Severo D, Carlini CR. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem* 2004;271:1357–63.
- [4] Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits ME, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol* 2000;44:162–71.
- [5] Stanisquaski F, Ferreira-DASilva CT, Mulinari F, Pires-Alves M, Carlini CR. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 2005;45:753–60.
- [6] Chapplin MF, Kennety JF. Carbohydrate analysis: a practical approach. 2nd ed. Oxford: IRL Press; 1994.
- [7] Lee SY. High cell-density cultures of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1996;14:98–105.
- [8] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:411–21.
- [9] Andersson L, Yang S, Nuebauer P, Enfors SO. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 1996;46:255–63.
- [10] Nayak DP, Vyas V. Improved stability and expression of recombinant shuttle plasmid in *Escherichia coli* during fedbatch cultivation. *World J Microbiol Biotechnol* 1999;15:65–71.
- [11] Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Bahrami A, Maghsoudi N. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2003;25:1989–92.
- [12] Gombert AK, Kilikian BV. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. *J Biotechnol* 1998;60:47–54.
- [13] Mulinari F, Freitas-Silva MA, Grossi-De-Sá MF, Moraes MG, Kurtenbach E, Carlini CR. Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Patent registered at National Institute for Intellectual Property (INPI). Brazil; 08/04/2004 [protocol 001120/RS].
- [14] Pires-Alves M, Grossi-de-Sá M, Barcellos GBS, Carlini CR, Moraes MG. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean (*Canavalia ensiformis* DC). *Plant Cell Physiol* 2003;44:139–45.
- [15] Doran PM. Mass transfer. In: Doran PM, editor. Bioprocess engineering principles. London: Academic Press Limited; 2000. p. 190–217.
- [16] Gupta R, Sharma P, Vyas VV. Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 1995;41:29–37.
- [17] De León A, Hernández V, Galindo E, Ramirez OT. Effects of dissolved oxygen tension on the production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 2003;33:689–97.

- [18] Ramchuran SO, Karlsson EN, Velut S, de Maré L, Hagander P, Holst O. Production of heterologous thermostable glycoside hydrolases and the presence of host-cell proteases in substrate limited fed-batch cultures of *Escherichia coli* BL 21 (DE3). *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;60:408–16.
- [19] Sunitha K, Kim YO, Lee JK, Oh TK. Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 2000;5:51–6.
- [20] Shlioach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv* 2005;23:345–57.
- [21] Ou J, Wang L, Ding X, Du J, Zhang Y, Chen H, et al. Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:174–80.
- [22] Menzella HG, Cecarelli EA, Gramajo HC. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnol Bioeng* 2003;82:809–17.
- [23] Carlini CR, Oliveira AE, Azambuja P, Xavier-Filho J, Wells MA. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J Econ Entomol* 1997;90:340–8.

Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: Role of laticifer proteins in plant defense

Márcio V. Ramos^{a,*}, Cleverson D.T. Freitas^a, Fernanda Stanisquaski^b,
Leonardo L.P. Macedo^c, Maurício P. Sales^c, Diego P. Sousa^a, Célia R. Carlini^b

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Cx. Postal 6033, Fortaleza-Ceará, CEP 60.451-970, Brazil

^b Centro de Biociências and Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil

Received 5 June 2007; accepted 25 June 2007

Available online 29 June 2007

Abstract

Latex-producing plants are widespread in different habitats. Usually these plants secrete an endogenous milk-like fluid in a network of laticifer cells in which sub-cellular organelles intensively synthesize proteins and secondary metabolites. The biological importance of latexes is still unclear and accumulated evidences of their physiological role are still limited. Here laticifer proteins (LP) from *Calotropis procera* were assayed for insecticidal action against different crop pests in attempt to give new insights for the biological role of latexes. Diets containing 4% LP affected survival ($LD_{50} = 4.61\%$) and decreased weight gain ($ED_{50} = 3.07\%$) of third instars *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Third instars *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on diets containing 0.1% (w/w) of LP showed reduced body mass while survival was reduced ($LD_{50} = 0.48\%$) only for insects grown on 0.5% LP-containing diets. Nonetheless, 1% LP was ineffective against third instars *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Diets containing 1% LP slightly diminished survival of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) nymphs while 2% LP was more effective with consistent reduction in bodyweight ($ED_{50} = 1.4\%$) observed at the 14th day. Digestive enzymes of gut extracts of *D. peruvianus* were unable to breakdown LP. On the contrary, heat treated LP was capable of reducing by 50% proteolysis of gut extracts using BANA as substrate suggesting presence of inhibitory activity of cysteine proteinases. Adults of *D. peruvianus* were not affected when grown in diets containing 1% of LP. Laticifer proteins were shown to possess chitin-binding proteins and chitinolytic activity. Lectin activity was not detected. Occurrence of cysteine proteinase activity already reported in *C. procera* latex combined with the activities described here could explain, at least in part, the deleterious effects observed.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Anticarsia gemmatalis*; *Calotropis procera*; *Ceratitis capitata*; *Dysdercus peruvianus*; Latex; *Spodoptera frugiperda*

1. Introduction

Arka shrubs (*Calotropis procera* belonging to Asclepiadaceae family) grow uncultivated and are widespread in the tropical regions. The plant is well known for its abundant and continuous latex production that is mainly recovered in the green parts. Latex is a fluid secretion that is kept arrested in a cell network named laticifers. A laticifer has been defined as specialized cell or row of cells containing latex. It can be

formed by individualized cells (articulated) disposed longitudinally in which the lateral walls separating individual cells either remains intact, have become perforated or entirely eroded. Non-articulated laticifers are formed by a cell growing indefinitely allowing latex fluid to circulate and exudate faster after tissue damage [1,2]. This seems to be the case with *C. procera* as judged by intense recovery of latex after injury of its leaves. The latex of *C. procera* is highly abundant in leaves and it can be collected only in the green parts of the plant. It is poorly found in the sheathing of fruits and not observed in seeds or bark. As far as we are concerned there is no information about the presence of latex in roots of *C. procera*.

* Corresponding author. Fax: +55 85 3366 9789.

E-mail address: vramos@ufc.br (M.V. Ramos).

The role played by latex in plant physiology is not well defined yet. However, considering that latex synthesis requires high energetic cost and that latex exudates after wounding plants, the involvement of latex in plant protection against a wide range of organisms has been proposed [3,4]. This hypothesis is reinforced by the presence of pathogenesis-related proteins and plant defense proteins reported in distinct latex fluids [5–7]. Accordingly, evidence has been accumulated to support the defensive role of latex in protecting plants against different aggressors [8].

Poly-isoprene is commonly the most abundant component of the latex. Due to its intrinsic physical–chemical properties it forms a rubber-like structure [9]. The poly-isoprene fraction seems to participate in many toxic events of latex-derived materials, including insecticidal effects [10,11]. We determined that the dry mass of rubber in the latex of *C. procera* corresponds to more than 80% of the total dry mass while the remaining fraction comprises less than 20%. In this rubber-free fraction the content of soluble proteins was estimated to reach 8 mg/ml and this content represents approximately 17% of the dry mass of the latex. Defensive action of latex against microorganisms has been also reported [12]. On the other hand, little information is available on the actual involvement of latex proteins in protecting laticifer plants against insects. It is known that leaves of *C. procera*, source of latex, are heavily attacked by the caterpillars of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*.

In the present report, the latex of *C. procera* was fractionated in attempt to obtain a pool of endogenous proteins, separated from the poly-isoprene fraction and low molecular mass compounds. The aim of this work was to investigate any deleterious effects of latex proteins upon distinct crop pests and to provide new insights into the role of latex in plant defense. Selected insects in this study were chosen because they represent important agricultural pests that provoke economic losses and once laticifer proteins exhibit harmful or toxic effects against such insects they would be seen as a new source of possible insecticidal proteins to be exploited.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Healthy and non-cultivated plants of *C. procera* (Ait.) R.Br. (Asclepiadaceae), growing in the field around the beaches of Fortaleza-Brazil, were used as the source of fresh latex. The plant material was identified by Prof. Edson Paula Nunes and the voucher N.32663 was deposited at the Prisco Bezerra Herbarium of the Universidade Federal do Ceará, Brazil. The latex was collected by small incisions near the youngest leaves and left to flow off and placed in distilled water in order to obtain a 1:1 (v/v) ratio. The mixture was gently agitated during collection to overcome the natural coagulation-like effect of the material. Later in the laboratory, the samples were centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min at room temperature (25 °C). The rubber-like precipitate was discarded and the supernatant was exhaustively dialyzed in distilled water using membranes of

8000 molecular weight cut-off. The material was maintained for 60 h at 8 °C and dialysis water renewed each 4 h and centrifuged again using the conditions described above. The clean, rubber-free supernatant was lyophilized and used in all further experiments. From now on this material containing laticifer proteins will be referred as LP. One milliliter of the whole latex gives rise to approximately 13.8 mg of LP fraction and a solution of 10 mg/ml of LP was estimated to possess 8.85 mg/ml of soluble proteins as determined by the Bradford [13] method using BSA as standard.

2.2. Bioassays

2.2.1. *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

C. capitata causes damage in many edible tropical fruits and attempts to combat such attack are welcome. The insects develop into adults through three larvae stages in about 5 days. The performance of *C. capitata* in an artificial diet system was assessed. Artificial diets were prepared using 10.4% (w/w) finely ground sugar cane fiber, 3% wheat germ, 6.5% wheat flour, 12% saccharose (crystal sugar), 9.9% yeast, 0.3% sodium benzoate, 0.9% HCl and 57% H₂O, according to Gomes et al. [14]. Lyophilized LP at concentrations of 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4% (w/w) was added to the diet. Diets (ca. 500 mg each) were presented to six replicates of seven neonate larvae, kept in dark glass vials at 28 ± 1 °C and 60–70% relative humidity in the growth chamber. After 4 days fed on the experimental diets, the number of larvae and mass were recorded. Control insects fed on artificial diet made without LP. The experiments were carried out with six replicates ($n = 42$) and the mean (\pm S.E.M.) was calculated. Linear regression was used to describe the response of *C. capitata* to a series of doses of LP. Effective doses for 50% response (ED₅₀) are the concentrations fractions that decrease the mass of the larvae to 50% of the mass of the control. Lethal doses (LD₅₀) are the concentrations of the fractions that reduce larvae survey to 50% of the number found in the control.

2.2.2. *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

A. gemmatalis fed on leaves provoking considerable losses on soybean and rice in the field. The insects develop into adults through five larvae stages in about 19 days. Artificial diets were initially made of 125 g common bean flour, 100 g wheat germ, 50 g soybean protein, 50 g casein, 62.5 g yeast, 35 g agar and the volume was completed up to 2 l with distilled water as in [15]. The mixture was heated for 10 min at 98 °C, refrigerated at room temperature until reach 45 °C. Masses of 6 g ascorbic acid and 25 mg tetracycline and 6 ml of 40% Formol were added and the diet was allowed to cool at 8 °C. Samples of lyophilized LP were dissolved in 100 μ l distilled water and soaked in the semi-solid diet to give concentrations of 0.1, 0.5 and 1% (w/w). The diets (2 g) were presented to 5 third instar caterpillars, 9–10 days aged kept in plastic vials at 25 ± 1 °C and 60–70% relative humidity. The mass and number of larvae were recorded daily. Control insects fed on artificial diet made without LP. The experiments were carried out with four replicates ($n = 20$) each concentration and the mean (\pm S.E.M.)

was calculated. Doses corresponding to ED₅₀ and LD₅₀ were investigated as above.

2.2.3. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Similar to *A. gemmatalis*, caterpillars *S. frugiperda* defoliate target plants substantially reducing photosynthesis. The insects develop into adults through nine larvae stages in about 50 days. LP-containing diets for *S. frugiperda* caterpillars (third instar, 11–12 days old) were prepared essentially as that for *A. gemmatalis*. Lyophilized LP was dissolved in distilled water (100 µl) and added to the diet to give concentrations of 0.1, 0.5 and 1% (w/w). The diets (2 g) were presented to nine third instar caterpillars/replicate kept in plastic vials at 25 ± 1 °C and 60–70% relative humidity. Weight gain and survival rate of insects were evaluated periodically until the 17th day of assay. The experiments were carried out with 9 individuals = replicates for each concentration tested and the mean (±S.E.M.) was calculated. Replicates were constituted of one individual because practice of cannibalism was observed among individuals growing in the same plastic vials, including controls.

2.2.4. *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae)

The cotton stainer bug *D. peruvianus* feeds on the cotton seeds causing damage to the seeds and stains on the cotton fibers. This predatory activity implicates in loss of fiber quality. *D. peruvianus* were grown on cotton seeds and maintained at 23 ± 2 °C, 60–70% relative humidity, with a 16 h light–8 h dark cycle [16]. The insects develop into adults through five nymphal stages in about 20–25 days. Cotton seed were cut into halves to allow removal of the cotyledons and fine flour was prepared from partially lyophilized (5 h dehydrated) cotyledons in an analytical mill. Laticifer proteins (LP) were dissolved in 400 µl of distilled water and rapidly mixed to 300 mg of cotton seed flour prior to freeze-drying. Artificial seeds were prepared using gelatin capsules (size 2) filled with the diets [16].

For the tests, groups of 15 insects (adults or third instar) in triplicate ($n = 45$) were used for each experimental condition. LP was added to the diets to perform 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0% (w/w). Control artificial seeds were prepared in the same way, with the equivalent volume of distilled water. Weight gain and survival rate of insects were evaluated periodically until the 14th day of assay.

2.3. Analysis of LP digestion by gut homogenates of *D. peruvianus* nymphs

Homogenization of the gut epithelium and all contents of the digestive tube were done without removing the gut musculature and perivisceral fat body similar as described in the literature [16]. *D. peruvianus* nymphs, with no previous starving period, were dissected under ice-cold saline for removal of the entire digestive tube. N4 were chosen because they represented the stage observed nearly the 7th day of experiment. The guts of 25 nymphs (fourth instars, 13th days after hatching) were dissected, homogenized in 1 ml 50 mM acetate buffer, pH 5.6 and centrifuged at 5000 × *g* for 20 min at 4 °C [16]. The

supernatant was recovered and the total proteolytic activity was determined using 1% azocasein as substrate [17]. Laticifer proteins (400 µg in 50 mM acetate buffer, pH 5.6) were incubated with the gut extract (345 µl) in order to obtain a rate of 0.5 mUA/µg of protein (gut enzyme activity:LP). One milli-unit (mUA) of azocaseinolytic activity was defined as the amount of enzyme capable of increasing absorbance by 0.001, at pH 5.6 and 37 °C for 1 h. The digestion was performed for 2, 4 and 8 h at 37 °C. The reaction was stopped by immersing the tubes in ice-cold water. Products of digestion were detected by SDS-PAGE followed by protein gel blot analysis. To check endogenous proteolytic activity at pH 5.6 a similar assay was previously developed using the purified lectin from *C. brasiliensis* seeds.

2.4. Proteolytic activity of gut homogenates of *D. peruvianus* in the presence of heated LP

LP (100 mg/50 ml in distilled water) was heated at 98 °C for 30 min followed by immersion in ice. The samples were then submitted to centrifugation at 25 °C and 5000 × *g* for 10 min. The pellet and supernatant were separated and lyophilized individually. After treating, both samples were free of endogenous cysteine proteinase activity as determined using BANA as substrate.

The possible presence of cysteine proteinase inhibitors in LP was investigated against papain (Sigma P-4762) or gut homogenates of *D. peruvianus* prepared as described above. Two aliquots of the fraction supernatant (see above) (100 and 200 µl, corresponding to 47.2 and 94.4 µg of soluble protein) dissolved in 50 mM acetate-Na (pH 5.6) were pre-incubated with papain and gut homogenate for 30 min at 37 °C. Cysteine proteinase activity was measured spectrophotometrically at 540 nm using 1 mM BANA (SIGMA product N. B4750) as specific substrate. Results are expressed as means and standard deviations of three independent experiments.

2.5. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Pattern of digestion was estimated by polyacrylamide gel electrophoresis [18]. Samples of 10 µg LP and LP submitted to digestion by gut extract were mixed in 0.0625 M Tris buffer pH 6.8 containing 2% SDS and applied into 12.5% polyacrylamide gels containing 0.1% sodium dodecyl sulfate. Runs were performed at 25 mA per gel at 4 °C for 2 h. Protein bands were stained with silver nitrate according to [19].

2.6. Analysis by protein gel blot of LP digest by gut extracts

The procedure of Towbin et al. [20] was used. Following electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (0.45 µm) (Hybond-P, Amersham Life Science) by electro-blotting. After protein transfer, membranes were blocked in 5% (w/v) non-fat milk in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and containing 0.5% Tween-20, for 2 h at room temperature. The membranes were probed with polyclonal

rabbit anti-LP serum (1:30,000 dilution) and goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) as a secondary antibody (1:30,000 dilution). Bound secondary antibodies were detected by adding 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) in 20 mM Tris–HCl pH 9.0 containing 0.1 M NaCl and 2.5 mM MgCl₂.

2.7. Lectin activity assay

The presence of lectin activity in LP was tested by serial dilution hemagglutination assay in U-bottomed microplates, using 2% rabbit erythrocytes cell suspension according to [21].

2.8. Affinity chromatography on chitin

Samples of 30 mg of LP were dissolved in 3 ml 150 mM NaCl and subjected to centrifugation for 10 min at 10 °C and 10,000 × g for removal of insoluble materials. The cleared samples were applied into a chitin (from crab shells, Sigma product C7170) column (2 cm × 15 cm) previously equilibrated in 150 mM NaCl and the column was washed until the absorbance at 280 nm of samples reached a value close to zero. The proteins bound to the column were eluted 1 M acetic acid. Pooled fractions were submitted to dialysis in distilled water followed by lyophilization and further tested for chitinolytic activity.

2.9. Determination of chitinase activity

A colorimetric assay was carried out using a modification of Boller et al. [22]. The assay mixture contained 250 μl of LP (1 mg/ml) in 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.2 and 2 mg of colloidal chitin in a total volume of 500 μl. It was incubated at 37 °C for 60 min. The reaction was boiled for 5 min and then centrifuged (10,000 × g for 20 min). To 300 μl of each supernatant were added 100 μl of 0.6 M potassium tetraborate and the amount of *N*-acetyl-glucosamine released was determined according to Reissig et al. [23]. The controls included enzyme and substrate blanks as well as internal standards.

Alternatively, a zymogram procedure for detecting chitinolytic activity was used. Laticifer proteins were dissolved in

0.0625 M Tris buffer pH 6.8 containing 2% SDS, 10% glycerol in the absence of 2-mercaptoethanol. The samples were separated by electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gels containing 0.04% glycol–chitin at 25 °C. After electrophoresis, the gels were immersed in sodium acetate buffer, pH 5.2 containing 2.5% of Triton X-100 (renaturing solution) with gentle shaking for 30 min at 25 °C to remove SDS. After renaturation, the gels were incubated for 3 h at 37 °C in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.2. The gels were then incubated in 0.01% calcoflur MR 28 (Sigma, St. Louis, MO) at 25 °C for 5 min. Chitinase isozymes were visualized as cleared zones, by placing the gels on a UV transilluminator (UV ITF Labortechnik, Wasserburg, Germany).

3. Results

3.1. Effect of LP on larvae of *C. capitata*

Laticifer proteins (LP) added to the diet of *C. capitata* constituting up to 2% did not cause any detrimental effect on third instars. However, insects reared on diets containing 4% (w/w) LP for 4 days showed decreased survival (47.7% instead of 90%) and body weight was drastically reduced (1.47 ± 0.35 mg) as compared to controls (6.28 ± 0.39 mg) (Fig. 1). LP produced an estimated 50% mortality (LD₅₀) and a decrease of 50% weight (ED₅₀) corresponding to 4.61 and 3.07%, respectively. Diets composed of 4% LP caused retardation of development. Control individuals reached third instars while individuals fed on 4% LP attained second instars after 4 days. This effect was not observed at lower concentrations of LP.

3.2. Effect of LP on larvae of lepidopteran insects

3.2.1. *A. gemmatalis*

C. procera laticifer proteins (LP) produced severe reduction in the body mass of *A. gemmatalis* larvae. LP in concentration as low as 0.1% differentiated control and experimental groups (Fig. 2). Survival of caterpillars was only significantly affected on day 6 in groups fed on diets containing 0.5 and 1% LP. Caterpillars grown in 0.1% LP containing diets exhibited survival rate similar to controls despite the reduction in body

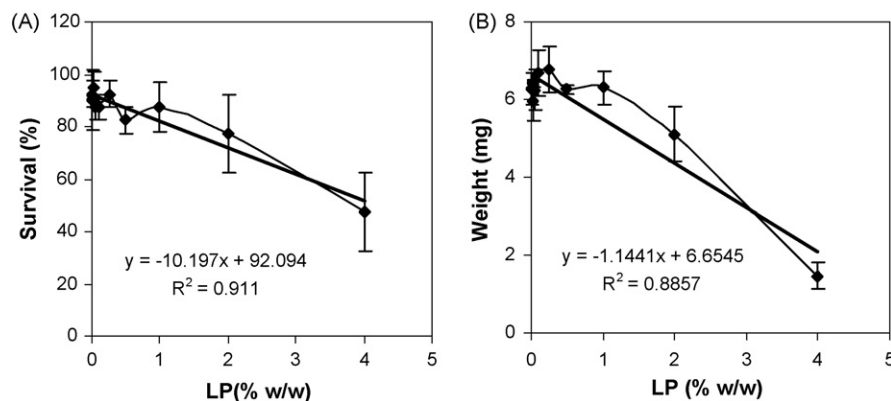


Fig. 1. Effect of dietary laticifer proteins of *Calotropis procera* on survival (A) and larvae weight (B) of *Ceratitis capitata* using an artificial diet bioassay. Each point has $n = 42$. Error bars indicate standard error of the mean.

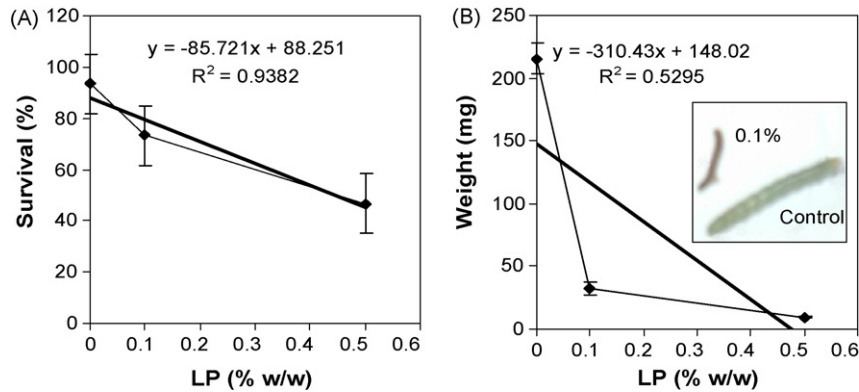


Fig. 2. Effect of dietary laticifer proteins on survival (A) and bodyweight (B) of *Anticarsia gemmatalis*. Caterpillars (third instars) fed on artificial diet containing LP in different concentrations after 6 days of assay. Figure inserted are caterpillars of 6th day. Each point has $n = 20$. Error bars indicate standard error of the mean.

mass. ED_{50} is expected to be lower than value estimated $ED_{50} = 0.13\%$. This is because a pronounced effect on mass of caterpillars was already observed on diets containing doses of LP as lower as 0.1%. After 48 h individuals of control exhibited mass increment of 23 ± 3.2 mg while individuals growing in 0.1% LP remained unaltered. LD_{50} was estimated to be 0.48%. Both data indicate a severe effect of LP. Accordingly, development was also strongly affected. Individuals grown on diets containing 0.1% LP stayed mainly as thirds instars while controls attained the pupae stage after 7 days of experiment.

3.2.2. *S. frugiperda*

No detrimental effects of LP on caterpillars of *S. frugiperda* were noticed when third instars were grown on diets containing 1% LP. Survival of caterpillars in control group was reduced to $68.15 \pm 21.8\%$ essentially similar to caterpillars grown in diets with 1% LP ($65.97 \pm 15.3\%$) at 17th day of the experiment. Caterpillars grown under experimental conditions reached sixth or seventh instars similar to what was observed in the control (day 17, 29 days old). The gain in body mass was essentially the same between the groups (Fig. 3). It is important to note that caterpillars were exposed to the diets for 17 consecutive days differing of what is usually found in the literature (5 days). This fact may explain the observed reduction of survival in the

control and experimental diets. However, as seen in Fig. 3 survival was only affected after day 4. Retardation of development was not observed and as cited above individuals reached pupae stage at time similar to control (after day 17). There was no direct correlation between increment of LP in diets and performance of caterpillars. Values for ED_{50} and LD_{50} were not calculated.

3.2.3. Effects of LP on *D. peruvianus*

Diets containing 1 or 2% LP were detrimental to nymphs of *D. peruvianus* inducing significant reduction on body mass observed on the 14th day (Fig. 4). Body mass of control nymphs on the 14th day was 43.82 ± 10.31 mg while nymphs fed on diets containing 1 or 2% of LP exhibited body mass of 22.93 ± 9.51 mg (52.32%) and 19.69 ± 5.14 mg (44.93%), respectively. Almost all nymphs of control and experimental groups attained fifth instars on 14th day. There was a correlation between increment of LP in diets and mass of nymphs and value of ED_{50} was estimated to be 1.4%. Survival of nymphs was not significantly affected even at the higher dose of LP tested. No detrimental effects were observed in adults of *D. peruvianus* fed on 1% LP-containing diets during the same period (Fig. 4).

Gut extracts of nymphs of fourth instars were tested for the ability to hydrolyze LP *in vitro*. As seen in Fig. 5, gut extracts were unable to digest LP even after 8 h of exposure at pH 5.6 at

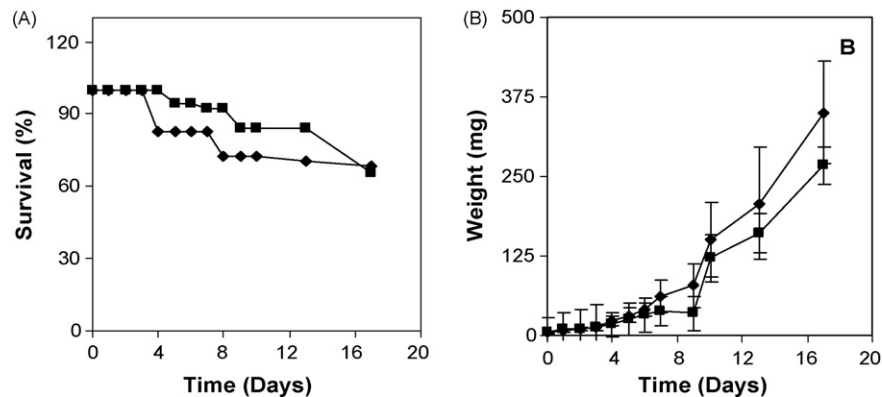


Fig. 3. Effect of dietary laticifer proteins on survival (A) and bodyweight (B) of *Spodoptera frugiperda*. Caterpillars (third instars) fed on artificial diet containing LP in different concentrations after 17 days of assay. Each point has $n = 9$. Error bars indicate standard error of the mean.

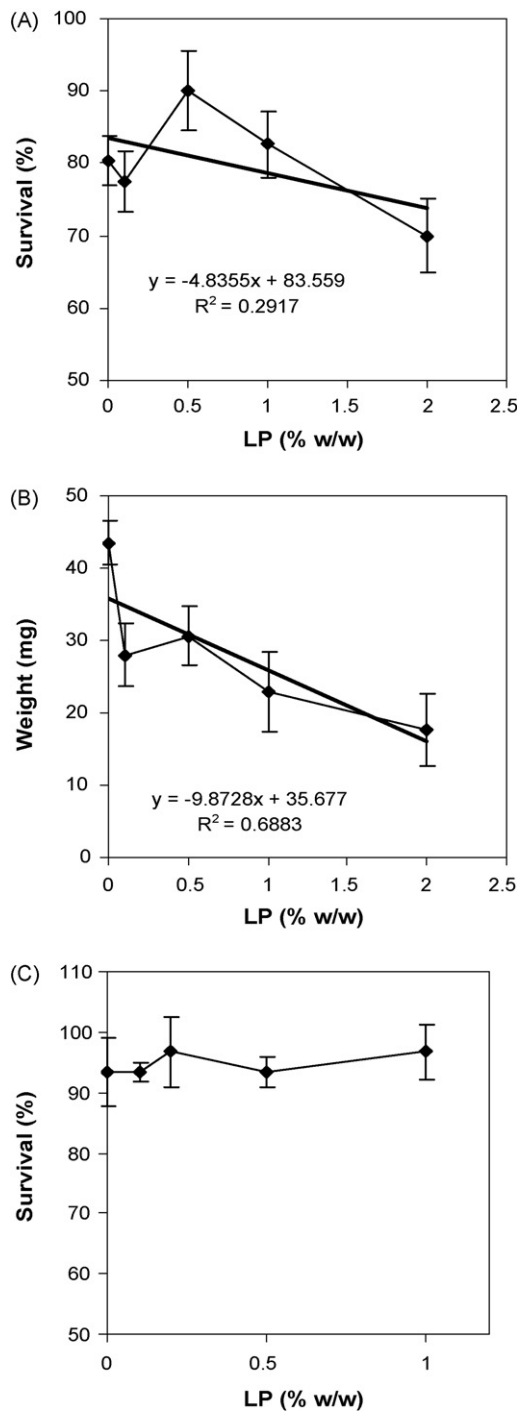


Fig. 4. Effect of laticifer proteins on nymphs of third instars (A and B) and adults (C) of *Dysdercus peruvianus* fed on artificial seeds containing LP in different concentrations after 14 days of assay. Each point has $n = 45$. Error bars indicate standard error of the mean.

37 °C. At similar pH conditions gut homogenates were capable of partially digesting the purified lectin from *Canavalia brasiliensis* used as a control of hydrolysis (data not shown). In another assay, LP devoid of endogenous cysteine proteinase activity was tested as a putative inhibitor of gut extracts of *D. peruvianus*. As shown in Fig. 6, the soluble fraction recuperated after heat treatment of LP was capable of consistently reducing papain activity upon BANA and diminished 50% the

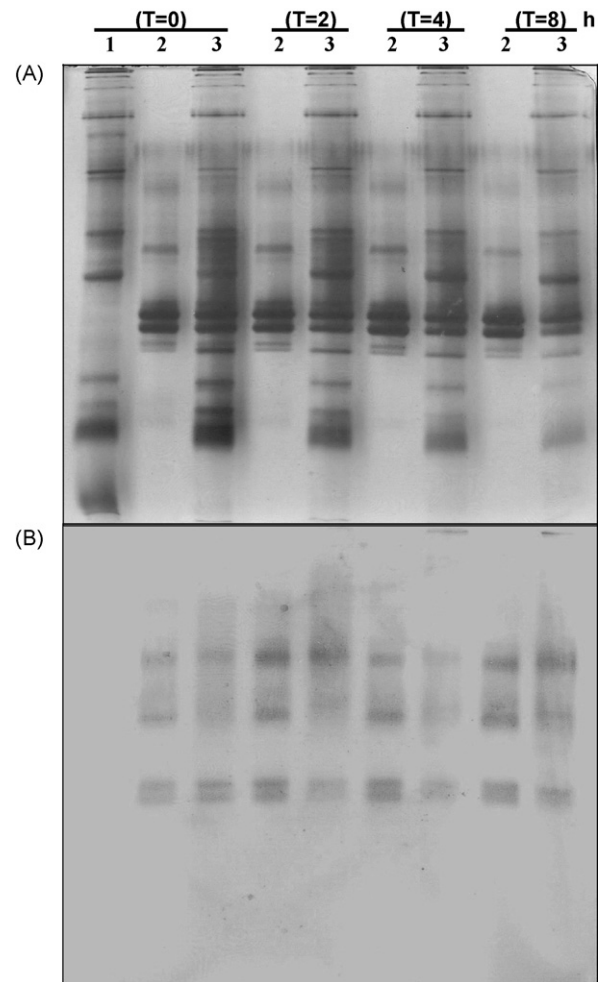


Fig. 5. (A) SDS-PAGE (12.5%) of LP (8 µg) incubated with gut extract (12 µg) of *D. peruvianus*. (B) Protein gel blot analysis. Laticifer proteins (LP) were detected using primary anti-LP antibody and goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate as a secondary antibody. Bound secondary antibodies were detected by adding 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium as substrate. (1) GUT; (2) LP; (3) GUT ± LP after 0, 2, 4 and 8 h of incubation at 37 °C, pH 5.6.

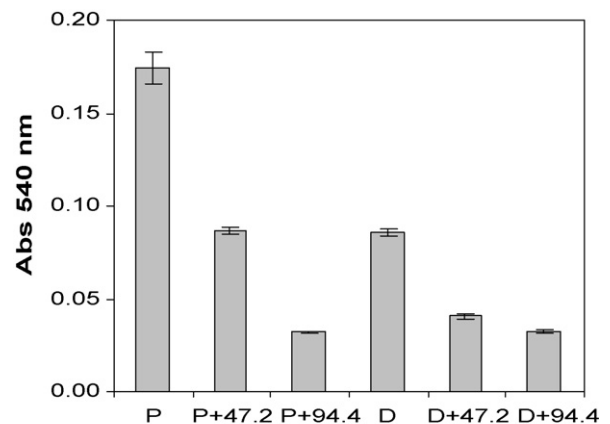


Fig. 6. Papain and gut homogenate of *Dysdercus peruvianus* enzymatic activities measured in the presence of different concentrations (47.2 and 94.4 µg of protein) of heated LP using 1 mM of BANA as substrate. Legends: papain (P) and gut homogenate of *D. peruvianus* (D).

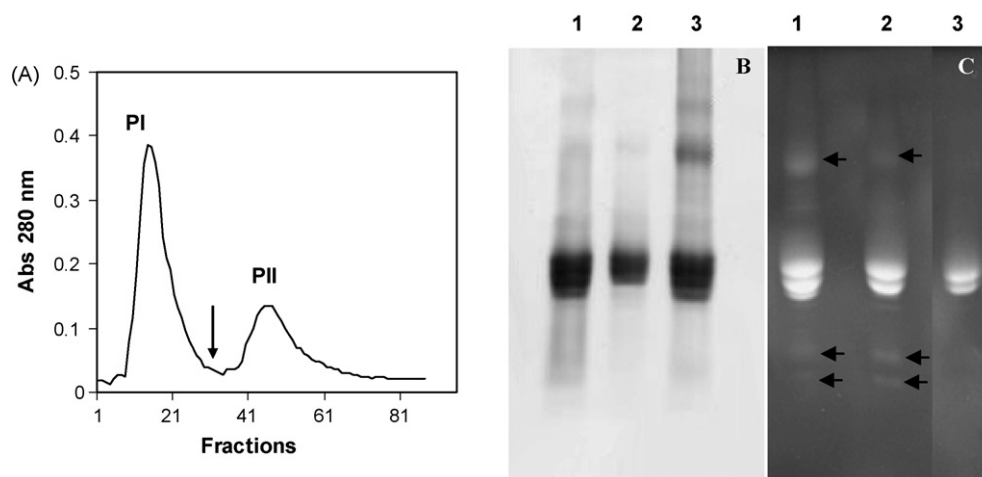


Fig. 7. (A) Elution profile on chitin column of LP. The column was equilibrated with 0.15 M NaCl and retained peak (PII) was eluted with 1 M acetic acid solution, monitored at 280 nm. (B) SDS-PAGE at 12.5% and (C) chitinase isozyme pattern on gel (same as in B) after electrophoresis. (1) LP, (2) non-retained and (3) retained peaks obtained after chromatography on chitin column. Arrows in (C), lanes 1 and 2 show chitinolytic activity of LP and PI, respectively, not seen in lane 3 (PII).

proteolytic activity of gut homogenates of *D. peruvianus*. Such an inhibitory activity was not perceived when unheated LP samples were used. On the contrary digestion of BANA by gut extracts was substantially augmented because the presence of endogenous cysteine proteinase activity of untreated LP.

3.2.4. Protein pattern of LP and enzymatic activity

LP represents the major soluble protein fraction found in laticifer of *C. procera*. No hemagglutinating activity was detected and this fact suggests absence of proteins with lectin activity. However, as seen in Fig. 7, the soluble proteins separated into two peaks upon affinity chromatography on a chitin column. After heat treatment of LP (not shown) the ability of the material to be retained on the chitin column was diminished suggesting that structural integrity of proteins is essential for the chitin-binding capacity. Chitinolytic activity was detected in non-fractionated LP (6.1 nKat/ml) and both, non-retained (PI, 1.9 nKat/ml) and retained proteins (PII, 4.5 nKat/ml) obtained after affinity chromatography. The chitinolytic activity was lost after heating (80 °C, 30 min) either LP, PI or PII. As seen in the zymogram analysis shown in Fig. 7, chitinases isozymes may be present in LP and both peaks from the chitin column. Although two major bands are seen in PI and PII, other minor active components seen only in LP and PI suggest the presence of distinct chitinases. On the other hand, the two major bands seen in PI and PII may be an effect of overload of the column since an additional passage of PI on the chitin column gave rise to a new retained fraction similar to PII.

4. Discussion

Studies involving chemical and biochemical aspects of latex of *Calotropis procera* are still incipient. Organic carbonates, cardenolides and histamine are among compounds already described in laticifer of *C. procera* in addition to isoprenoids that are precursors of rubber synthesis [24,25]. Until now the isolation of a cysteine protease named procerain is the only reported description of a laticifer protein purified from *C.*

procera [26]. Nonetheless, pharmacological and toxicological studies with *C. procera* latex extracts have highlighted very distinct actions of the latex components against microorganisms, insects and mammals [27,28].

Different lines of investigation have emerged to approach latex functions in plants. The high energetic costs involved in rubber synthesis and carbon sequestration for poly-isoprene formation are intriguing. Two dimensional electrophoresis of *Hevea brasiliensis* latex revealed the presence of at least 200 polypeptides suggesting extensive protein-based activities in the latex [2]. Hevein, the most studied protein of the latex of *H. brasiliensis*, displays anti-fungal activity [29]. Few other studies have demonstrated the toxicity of latex from different origins against microorganisms and insects. These findings contribute to the presumable defensive role of latex fluids [8,12].

Previous studies with *C. procera* latex showed insecticidal effects against mosquito larvae and *Musca domestica* [11,30]. Thus it would be of great relevance to investigate the actual role of laticifer proteins in protecting laticifer plants against other insects and especially those capable of feeding on the plant. Even, latex constituents involved in deleterious effects could be potentially used as insecticidal agents. In this context, the present investigation was focused in determining possible insecticidal activity of the laticifer fluid of *C. procera* that could be attributed to defensive proteins. To this, the latex was first processed to exclude its poly-isoprene content and low molecular mass substances apart from its protein contents. The pool of laticifer proteins was used in different bioassays to determine possible insecticidal effects towards important crop pests.

C. capitata (fruit fly) is one of the world's most destructive fruit pests. The species originated in sub-Saharan Africa is now well established in Brazil. Its larvae feed and develop on many deciduous, subtropical and tropical fruits. The larvae feed upon the pulp of host fruits reducing the economic value [31]. LP-containing diets affected the development and survival of second instars *C. capitata*. Silva et al. [32] have shown that *C.*

capitata is susceptible to a trypsin inhibitor added to its diet as expected for its serine protease-based digestive system. Similarly, caterpillars of *A. gemmatalis* were highly sensitive to the presence of LP in artificial diets. Among defoliating caterpillars, *A. gemmatalis* is a species that causes relevant damages to soybean in Brazil [33]. During their development, caterpillars attack severely leaves, compromising yield production. Lepidopterans such as *A. gemmatalis* also have a predominant trypsin-like digestive serine protease [34]. However, preliminary results suggested the absence of trypsin inhibitors in LP since no retained fraction was obtained upon an affinity chromatography on a soybean trypsin–agarose column (data not shown). Even, the fact that *C. capitata* was affected only at higher doses of LP (4%) while *A. gemmatalis* was sensitive at doses as low as 0.1% suggests different mechanisms of LP interference. Low performance of *C. capitata* and *A. gemmatalis* on LP-containing diets could be due to binding of the laticifer proteins to chitin structures in the peritrophic membrane rather than interfering in the digestive process. In addition, larvae of *C. capitata* exhibits reduced cysteine proteinase activity that could be affected by the cysteine proteinase inhibitor detected in LP. This could also explain the fact that LP was only active at higher percents (4%). The fact that LP did not affect survival of caterpillars at the same doses in which reduction of body weight was seen suggests that LP is primarily slows growth rather than killing the insects.

The fall armyworm, *S. frugiperda* is a periodic and significant economic pest capable of causing substantial losses in maize, sorghum and rice among others relevant crops [35,36]. The lack of detectable noxious or lethal effects of LP upon *S. frugiperda* was somewhat surprising since this caterpillar shares many similarities with *A. gemmatalis*. It is also relevant that *C. procera* latex is rich in cysteine proteinase activity and some published reports have shown that this proteolytic activity may account for the resistance against *S. frugiperda* in maize plants [37]. The fact that *A. gemmatalis* feeds almost exclusively on soybean plants while *S. frugiperda* is a more generalist phytophagous may explain their differential performance on artificial diets containing laticifer proteins of *C. procera*. Plants of *C. procera* and many other laticiferous plants of Asclepiadaceae are common hosts of the Monarch butterfly (*D. plexippus*). Monarch larvae feed intensively on leaves of *C. procera* unpunished. Larvae sequester the dietary cardenolides abundantly found in *C. procera* leaves and transfer them *via* pupae to adults which become unpalatable to predators [38]. Considering that no consistent information on Monarch's proteolytic system is yet available and that the biochemical basis of its resistance to Asclepiadaceae laticifers is not understood, no additional correlations could be carried out with the data presented here, but it is likely that this species has some form of resistance to the proteins in LP.

Possible deleterious effects of LP upon *D. peruvianus* were tested in nymphs and adults. Only a slight reduction of body mass was seen in nymphs fed on diets containing 1 or 2% LP, with no repercussion on the survival rate. On the other hand adults *D. peruvianus* were not affected when tested in the same

conditions. *D. peruvianus* possesses predominantly cathepsin-like proteases in the midgut. However, this proteolytic apparatus was ineffective at digesting LP even after 8 h of incubation under experimental conditions. This may explain the reduction in weight gain seen for nymphs which was first suggestive of starvation. Although adults *D. peruvianus* have also cathepsin-like proteases in the midgut, we have previously shown adults and nymphs possess different profile of proteolytic activities [16]. The absence of any detrimental effect of LP upon adults of *D. peruvianus* may be related to this fact. It is interesting observe that a cysteine proteinase inhibitor is present in LP. The fact that gut homogenate of *D. peruvianus* had its proteolytic activity towards BANA reduced when pre-incubated with heated LP may explain the effect of LP on mass of nymphs instead of starvation as supposed before.

Although exposed to diets at different percents of LP, all insects were fed on diets containing 1% of LP and then a comparative analysis can be performed. Diets containing 1% of LP did not affect mass or survival of *C. capitata* or *S. frugiperda* individuals under experimental conditions. Caterpillars *A. gemmatalis* and nymphs of *D. peruvianus* fed on diets containing 1% of LP exhibited remarkable reduction on mass. However, survival was only slightly decreased for *D. peruvianus* while survival of caterpillar *A. gemmatalis* was severely reduced. As discussed above toxic effects of LP towards distinct insects may be displayed by distinct proteins including proteinase inhibitor, proteolytic activity or mediated by chitin-binding proteins. This fact stresses the idea that part of the pool of latex proteins represents a complex and multifunctional strategy of the plant to protect against different aggressors. Following this comment LP may constitute an excellent source of defensive proteins useful for biotechnological purposes.

According to our results, proteins from *C. procera* induce deleterious effects against some crop pests. LP exhibited variable defensive potential according to the insect tested, being highly active against *A. gemmatalis*, moderately active against *C. capitata* and *D. peruvianus* and innocuous towards *S. frugiperda*. The presence of chitinases and cysteine proteinase and cysteine proteinase inhibitor in LP could partially explain some of the observed detrimental effects however more detailed investigations should be performed to interpret the data shown here. It should be mentioned that LP may be only a part of the complex defensive system represented by the whole latex. It is likely that secondary metabolites are also implicated in defensive actions. Additional bioassays with other insect models are necessary to expand and confirm the insecticidal potential of LP. Finally, we conclude that LP can be seen as a potential source of new insecticidal proteins potentially useful in protecting plants against specific predators. Further isolation and characterization of such molecules will be necessary.

Acknowledgements

Biochemical, functional and applied studies of the latex from *C. procera* have been supported by grants from FUNCAP, CNPq, CAPES, PADCT, RENORBIO and IFS (M.V.R.).

References

- [1] P.J. Rudall, Laticifers in Euphorbiaceae a conspectus, Bot. J. Linnean Soc. 94 (1987) 143–163.
- [2] R.G.O. Kekwick, Latex and laticifers, in: Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group, 2001, pp. 1–6.
- [3] L.E. Moursy, Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen, J. Egypt Soc. Parasitol. 27 (1997) 505–514.
- [4] I.S. Pereira, V.G. Gomes, K.V.S. Fernandes, M.P. Sales, J. Xavier-Filho, Insecticidal and antifungal proteins of the latex from *Manihot glaziovii* (Muell), Revt. Bras. Bot. 22 (1999) 1–8.
- [5] P.A. Jekel, B.H. Hartmann, J.J. Beintema, The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex, Eur. J. Biochem. 200 (1991) 123–130.
- [6] I.C. Van Loon, E.A. Van Strien, The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, Physiol. Mol. Plant Pathol. 55 (1999) 85–97.
- [7] W. Sritanyarat, G. Pearce, W.F. Siems, C.A. Ryan, R. Witsuwannakul, D. Witsuwannakul, Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*, Phytochemistry 67 (2006) 1644–1649.
- [8] K. Konno, C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori, K. Kohno, Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex, Plant J. 37 (2004) 370–378.
- [9] B.L. Archer, B.G. Audley, Some new aspects of rubber biosynthesis, Bot. J. Linn. Soc. 94 (1987) 181–196.
- [10] M. Singhi, V. Joshi, R.C. Sharma, K. Sharma, Ovipositioning behaviour of *Aedes aegypti* in different concentrations of latex of *Calotropis procera*: studies refractory and its sustenance across gonotrophic cycles, Dengue Bull. 28 (2004) 184–188.
- [11] M.V. Ramos, G.P. Bandeira, C.D.T. Freitas, N.A.P. Nogueira, N.M.N. Alencar, P.A.S. Sousa, A.F.U. Carvalho, Latex constituents from *Calotropis procera* (R.Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.), Mem. Inst. Osw. Cruz. 101 (2006) 503–510.
- [12] O.P. Shukla, C.R.K. Murti, Properties and partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera* (Madar), J. Sci. Ind. Res. 20 (1961) 109–112.
- [13] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [14] C.E.M. Gomes, A.E.A.D. Barbosa, I.I.P. Macedo, J.C.M. Pitanga, F.T. Moura, A.S. Oliveira, R.M. Moura, A.F. Queiroz, F.P. Macedo, L.B. Andrade, M.S. Vidal, M.P. Sales, Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly), Plant Physiol. Biochem. 43 (2005) 1095–1102.
- [15] C.B. Hoffmann-Campo, E.B. Oliveira, F. Moscardi Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*), EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 1985, p. 23.
- [16] F. Stanisquaski, C.T. Ferreira-Dasilva, F. Mulinari, M. Pires-Alves, C.R. Carlini, Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), Toxicon 45 (2005) 753–760.
- [17] J. Xavier-Filho, F. Campos, A.P. Maria, B. Ary, C.P. Silva, M.M.M. Carvalho, M.L.R. Macedo, F.J.A. Lemos, G. Grant, Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*, J. Agric. Food Chem. 37 (1989) 1139–1143.
- [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄, Nature 227 (1970) 680–685.
- [19] H. Blum, H. Beier, H.J. Gross, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, Eletrophoresis 8 (1987) 93–99.
- [20] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets—procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (1979) 435–454.
- [21] J.T. Oliveira, V.M. Melo, M.F. Câmara, I.M. Vasconcelos, L.M. Beltrami, O.L. Machado, V.M. Gomes, E.P. Nunes, S.P. Pereira, C.F. Fernandes, G.G. Capistrano, A.C.M. Moreira, Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*, Phytochemistry 61 (2002) 301–310.
- [22] T. Boller, A. Gehri, F. Mauch, U. Vogeli, Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function, Plants 157 (1983) 22–31.
- [23] J.L. Reissig, J.L. Strominger, L.F. Leloir, A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetyl amino sugars, J. Biol. Chem. 217 (1955) 959–966.
- [24] O.R.S. Gallegos, A.V. Oliveira, L.M. Silveira, E.R. Silveira, Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves, Fitoterapia 73 (2002) 263–265.
- [25] E.V. Quaquebeke, G. Simon, A. Andre, J. Dewelle, M.E. Yazidi, F. Bruyneel, J. Tuti, O. Nacoulma, P. Guissou, C. Decaestecker, J. Braekman, R. Kiss, F. Darro, Identification of a novel cardenolide (2''-oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure–activity relationships analyses, J. Med. Chem. 48 (2005) 849–856.
- [26] V.K. Dubey, M.V. Jagannadham, Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*, Phytochemistry 62 (2003) 1057–1071.
- [27] R. Pahwa, V.C. Chatterjee, The toxicity of Indian *Calotropis procera* RBr latex in the black rat, *Rattus rattus* Linn., Vet. Hum. Toxicol. 30 (1988) 305–308.
- [28] N. Akhtar, A. Malik, S.N. Ali, S.U. Kazmit, Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*, Phytochemistry 32 (1992) 2821–2824.
- [29] S. Kanrar, J.C. Venkateswari, P.B. Kirti, V.L. Chora, Transgenic expression of hevein, the rubber tree lectin, in Indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*, Plant Sci. 162 (2002) 441–448.
- [30] T.A. Morsy, M.A. Rahem, K.A. Allam, Control of *Musca domestica* third instar larvae by the latex of *Calotropis procera* (Family: Asclepiadaceae), J. Egypt. Soc. Parasitol. 31 (2001) 107–110.
- [31] N.J. Liquido, L.A. Shinoda, R.T. Cunningham, Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review, Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, Number 77, 1991, 52 pp.
- [32] F.C. Silva, A. Alcazar, L.L. Macedo, A.S. Oliveira, F.P. Macedo, L.R. Abreu, E.A. Santos, M.P. Sales, Digestive enzymes during development of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets, Insect Biochem. Mol. Biol. 36 (2006) 561–569.
- [33] C.B. Hoffmann-campo, F. Moscardi, B.S. Corrêa-ferreira, L.J. Oliveira, D.R. Sosa-gomez, A.R. Panizzi, I.C. Corso, D.L. Gazzoni, E.B. Oliveira, Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja, 2000, pp. 1–70 (Circular Técnica/Embrapa Soja, ISSN 1516-7860, no. 30).
- [34] M.E. Pereira, F.A. Dorr, N.C. Peixoto, J.F. Lima-Garcia, F. Dorr, G.G. Brito, Perspectives of digestive pest control with proteinases inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepdoptera: Noctuidae), Braz. J. Med. Biol. Res. 38 (2005) 1633–1641.
- [35] P. Luginbill, The fall armyworm, U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. 34 (1928) 91.
- [36] A.N. Sparks, A review of the biology of the fall armyworm, Florida Entomol. 62 (1979) 82–87.
- [37] T. Pechan, L. Ye, Y. Chang, A. Mitra, L. Lin, F.M. Davisb, W.P. Williamsb, D.S. Luthea, A unique 33-kDa cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding in maize genotypes resistant to fall armyworm and other lepidoptera, Plant Cell 12 (2000) 1031–1040.
- [38] F. Holzinger, C. Frick, M. Wink, Molecular basis for the insensitivity of the Monarch (*Danaus plexippus*) to cardiac glycosides, FEBS Lett. 214 (1992) 477–480.