

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

**EFEITO INSETICIDA DE PROTEÍNAS INATIVADORAS DE
RIBOSSOMO TIPO 1 E DO JABURETOX-2EC EM LEPIDÓPTEROS**

Lúcia Rosane Bertholdo-Vargas

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

Orientação: Prof. Dr^a Célia Regina Carlini

Porto Alegre
11 de dezembro de 2008

Instituições e fontes financiadoras:

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Controle de Pragas da Universidade de Caxias do Sul, e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

As fontes financiadoras foram o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Banca Examinadora

Dra. Ana Paula Ulian de Araújo
Instituto de Física de São Carlos
Departamento de Física e Informática
Universidade de São Paulo, São Carlos, SP

Dr. Diego Bonatto
Instituto de Biotecnologia - PPGBio
Centro de Ciências Agrárias e Biológicas
Universidade de Caxias do Sul

Dr. Marco Antonio Zachia Ayub
Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos - PPGBCM
Departamento de Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Revisora e Suplente: Dr^a Jenifer Saffi
Universidade Luterana do Brasil

**Dedico ao meu marido Rolando Vargas Vallejos e aos
meus filhos Gabriel e Vanessa**

AGRADECIMENTOS

“... Pessoas entram na nossa vida por uma razão, uma estação ou uma vida inteira. Quando soubermos entender todas elas, saberemos o que fazer por cada pessoa e porque ela está com você, quando alguém está em sua vida por uma razão, é geralmente, para suprir uma necessidade que você demonstrou. Elas vêm auxiliá-lo numa dificuldade, fornecer orientação e apoio, ajudá-lo física, emocional ou espiritualmente. Poderá parecer uma dádiva de Deus, estão lá pela simples razão de que você precisa. Quando pessoas entram em nossas vidas por uma estação é porque chegou sua vez de dividir, crescer e aprender. Elas trazem a experiência da paz da alegria, elas poderão ensiná-lo algo que você nunca fez. Relacionamentos de uma vida inteira ensinam lições para a vida inteira, coisas que você deve construir para ter uma formação emocional sólida. Sua tarefa é aceitar a lição, amar a pessoa e colocar em uso o que aprendeu em todos os outros relacionamentos e áreas de sua vida...” (Autor desconhecido)

Agradeço a Deus a oportunidade e os momentos que passei ao lado de muitas pessoas que fizeram a diferença, por ter convivido com tantos colegas, amigos e professores, esperando que sejam relacionamentos para uma vida inteira...

Agradeço de todo coração aos meus pais, David (*in memoria*) e Maria Anna, por sempre terem considerado a educação dos filhos essencial e, apesar de todas as dificuldades, jamais terem desistido deste objetivo, e aos meus irmãos Leandro, Ana, Lívio (*in memoria*), Lauro, Odete, Maria Helena, Teresinha, Leo e Luiz Celso, por todo carinho dedicado a mim, assim como dos meus cunhados (as) e sobrinhos (as).

Agradeço especialmente ao meu marido Rolando, por seu amor, estímulo e apoio constantes, assim como o amor dos meus filhos Gabriel e Vanessa, que souberam entender os momentos de ausência física e tensão emocional.

Agradeço a minha orientadora Dr^a Célia Regina Carlini por ter aceitado o desafio de me orientar, assim como por sua extrema dedicação ao trabalho, constantes exemplos de profissionalismo, amizade e apoio.

Agradeço a Dr^a Neiva Barros por sua amizade, apoio e constante incentivo para o desenvolvimento desta tese.

Ao Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul pelo incentivo e apoio.

A equipe do Laboratório de Controle de Pragas e aos colegas do Laboratório de Proteínas Tóxicas, por não medirem esforços em colaborar nas atividades necessárias para a finalização deste trabalho.

Ao Dr. Bergmann Ribeiro e Dr^a Sonia Bao, por abrirem seus laboratórios para as atividades desenvolvidas na Universidade de Brasília.

Ao Dr. Augusto Schrank e Dr. João Lucio de Azevedo por fazerem parte da minha comissão de acompanhamento, assim como Dr^a Jenifer Saffi, revisora desta tese, Dr^a Ana Alice Ulian de Araújo, Dr. Diego Bonatto e Dr. Marco Antonio Zachia Ayub, que fazem parte da banca examinadora.

Muito obrigada a todos que contribuíram para que essa fase da minha vida se completasse, fazendo parte da minha vida por alguma razão, uma estação ou pela vida toda...

INDICE

AGRADECIMENTOS	v
INDICE.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 PROTEÍNAS TÓXICAS DE PLANTAS.....	1
1.2 RIPs.....	3
1.3 UREASES VEGETAIS E CNTX.....	12
1.4 INSETOS COMO MODELOS.....	19
1.5 GENOTOXICIDADE.....	22
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO	25
1.7 CÉLULAS DE LEPIDÓPTEROS E CITOTOXICIDADE.....	27
2. OBJETIVOS.....	32
2.1.OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3. RESULTADOS	33
CAPÍTULO 1 - Type 1 ribosome-inactivating proteins – Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) and <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae).....	34
CAPITULO 2 - Estudos sobre o efeito inseticida do Jaburetox-2Ec em <i>Spodoptera frugiperda</i>	43
Justificativa	44
Materiais e Métodos.....	45

a) Produção e purificação de jaburetox-2Ec.....	45
b) Insetos.....	45
c) Células.....	45
d) Bioensaio.....	46
e) Teste cometa.....	46
f) Determinação da concentração dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	47
g) Determinação das proteínas totais.....	48
h) Análise de citotoxicidade.....	48
Resultados e discussão.....	49
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	92
CURRICULUM VITAE.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da atividade RNA <i>N</i> -glicosilase das RIPs em ribossomos de ratos.	5
Figura 2. Transporte da ricina em células de mamíferos.....	8
Figura 3. Representação esquemática da estrutura primária de CNTX e JBURE-II e seus peptídeos entomotóxicos derivados.....	18
Figura 4- Efeito inseticida de jaburetox-2Ec em <i>S. frugiperda</i>	51
Figura 5. Índice de dano ao DNA (teste cometa) em células de <i>S. frugiperda</i> , após ingestão de 20 e 40µg de jaburetox-2Ec.....	54
Figura 6. Análise de níveis de TBARS em tecidos de <i>S. frugiperda</i> tratadas com 20 e 40µg de jaburetox-2Ec, após 24h da ingestão do peptídeo.....	55
Figura 7. Células Tn5B, 4 dias após a inoculação.	56
Figura 8. Células UFL-AG-286, 7 dias após a inoculação.	57
Figura 9. Células Sf21 tratadas com 0,5, 1,0 e 5,0 µg de jaburetox-2Ec	59
Figura 10. Células UFL-AG-286 tratadas com 0,5, 1,0 e 5,0 µg de jaburetox-2Ec	60
Figura 11. Células Sf21 após 8 dias da inoculação do jaburetox-2Ec.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- RIPv1 estudadas nesse trabalho.....	7
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS

AK – adenilato quinase

BSA – albumina de soro bovino

CAT - catalase

CNTX - canatoxina, isoforma de urease de *Canavalia ensiformis*

E-64 - Trans-epoxisuccinil-L-leucilamida-(4-guanidino)-butano

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GNA - lectina de *Galanthus nivalis*

GPx - glutationa-peroxidase

GR - glutationa-redutase

IPTG - Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

JBU - urease majoritária de *C. ensiformis*

kDa- Quilo daltons (1.000 daltons)

LDH – lactato desidrogenase

m/m - relação massa/massa

mM - Milimolar

N-terminal - região amino-terminal de uma proteína

PAP - proteína antiviral *pokeweed* (*Phytolacca americana*)

PBS - tampão fosfato salina

pH- potencial hidrogeniônico

p-OHB - *p*-hidroximercuriobenzoato

RIPs - Proteína Inativadora de Ribossomos

ROS - espécies reativas de oxigênio

SOD - superóxido dismutase

TBARS - ácido tiobarbitúrico

RESUMO

As plantas possuem um arsenal de substâncias utilizadas como defesa contra patógenos e predadores. A possibilidade de utilizar tais substâncias como biopesticidas revolucionou o estudo das proteínas tóxicas. Proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) e as ureases estão entre as proteínas que são abundantes em plantas. RIPs tipo 2 como a ricina, são muito tóxicas, e podem despurinar ribossomos de várias espécies e induzir lesão em DNA, levando à interrupção da síntese protéica e morte de células. Menos tóxicas que a ricina, a maior parte das RIPs conhecidas são do tipo 1 com apenas uma cadeia polipeptídica de 25 - 32 kDa. As ureases (EC 3.5.1.5) são metaloenzimas dependentes de níquel, que catalisam a hidrólise da uréia para formar amônia e dióxido de carbono. A semente do feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis*, é fonte rica de isoformas de urease, entre elas, a canatoxina (CNTX). A proteína CNTX apresenta atividade inseticida contra diferentes espécies de insetos, e sua toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10kDa (pepcanatox), que ocorre por ação das catepsinas do sistema digestivo dos insetos suscetíveis. Um peptídeo equivalente ao pepcanatox foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli* - Jaburetox-2Ec, o qual apresentou atividade tóxica contra *Dysdercus peruvianus*, *Rhodnius prolixus* e *Blatella germanica*.

Nesse trabalho demonstramos a atividade inseticida de cinco RIPs tipo 1 (PAP-S, gelonina, momordina, saporina-S6 e licnina) em *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*. As RIPs mostraram um efeito entomotóxico espécie-específico para as lagartas, sendo que momordina foi a menos tóxica nos bioensaios. Perda de peso mais pronunciada foi observada em *S. frugiperda* no 4º dia após o início dos ensaios e para a *A. gemmatalis*, no 10º dia. A indução da mortalidade (larval e/ou pupal) foi de 57,13% para

os tratamentos em *A. gemmatalis* e 29,45% para *S. frugiperda*. Para investigar o efeito deterrente de RIPs tipo 1 em insetos, verificou-se, através do teste cometa, o nível de danos ao DNA em tecidos de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* que ingeriram um total de 40 µg de RIPs. Os insetos tratados com RIPs mostraram um valor 2 a 3 vezes maior de células com sinais de dano de DNA do que o controle. O dano de DNA poderia ser consequência do estresse oxidativo, assim analisou-se atividade de enzimas antioxidantes CAT e SOD e níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nos extratos celulares dos insetos, mas não houve uma correlação entre dano de DNA e marcadores de estresse oxidativo.

O peptídeo recombinante derivado de urease, jaburetox-2Ec, induziu uma mortalidade de 100% de *S. frugiperda* após ingestão de 47µg do peptídeo. Em contraste com os dados obtidos com as RIPs, o jaburetox-2Ec não causou lesões no DNA ou alterações em marcadores do balanço redox em *S. frugiperda* evidenciando um mecanismo de ação distinto. Em linhagens de células de insetos em cultura (Tn5B e UFL-AG-286), a análise citomorfológica sugeriu a ocorrência de citotoxicidade e lise celular com exposição a 80 e 10 µg do jaburetox-2Ec, após 4 e 7 dias de incubação, respectivamente. Para compreender a ação do peptídeo entomotóxico em células de insetos, realizou-se testes de citotoxicidade utilizando o kit CyTotox-GloTM, incubando-se células UFL-AG-286 e Sf21 com jaburetox-2Ec. Os resultados com esse kit não foram conclusivos, sugerindo que o peptídeo recombinante seria capaz de inibir as proteases intracelulares liberadas na lise celular.

Nossos resultados mostraram que RIPs tipo 1 e o jaburetox-2Ec têm efeito inseticida em lepidópteros por mecanismos distintos, sendo que as RIPs tipo 1 induzem

lesão de DNA em *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, enquanto que jaburetox-2Ec induz alterações ainda não identificadas, que resultam em morte do inseto.

ABSTRACT

The plants have an arsenal of substances used as a defense against pathogens and predators. The possibility of using these substances as biopesticides revolutionized the study of toxic proteins. Ribosomes-inactivating proteins (RIPs) and ureases are among the proteins that are abundant in plants. Type 2 RIPS, such as ricin, are highly toxic and depurinate ribosomes of different species and induce DNA damage, arresting protein synthesis and leading to cell death. Less toxic, most of the known RIPs are type 1, composed of a single polypeptide chain of 25-32 kDa. Ureases (EC 3.5.1.5) are nickel dependent metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide. The seed of jackbean (*Canavalia ensiformis*) is a rich source of ureases isoforms, one of which is canatoxin (CNTX). The protein CNTX presents insecticidal activity and its toxicity relies on an internal ~10 kDa peptide (pepcanatox) released upon hydrolysis of CNTX by digestive cathepsins of susceptible insects. A peptide equivalent to pepcanatox obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* - Jaburetox-2EC, showed insecticidal activity against *Dysdercus peruvianus*, *Rhodnius prolixus* and *Blattella germanica*.

In this study we demonstrated the insecticidal activity of five type 1 RIPs (PAP-S, gelonin, momordin, saporin-S6 and lychnin) in *Spodoptera frugiperda* and *Anticarsia gemmatalis*. The entomotoxic effect of RIPs was species-specific and momordin was shown to be the less toxic in the bioassays. *S. frugiperda* had a more pronounced weight loss on the 4th day of treatment and *A. gemmatalis* on the 10th day. Mortality (larval and/or pupal) rate reached 57.13% for *A. gemmatalis* and 29.45% for *S. frugiperda*. To investigate the deterrent effect of type 1 RIPs in insects, the levels of DNA damage were

evaluated using the comet test in tissues homogenates of *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* fed a total of 40µg of RIPs. The RIPs-treated insects showed 2 to 3 times more cells with DNA damage, as compared to controls. To test whether DNA damage could be consequent to oxidative stress, the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT and levels of lipid peroxidation (TBARS) were assayed in cellular extracts of *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* fed 40 µg RIPs, but no correlations were found between DNA damage and stress markers.

The urease-derived recombinant peptide, jaburetox-2Ec, induced 100% mortality of *S. frugiperda* fed 47 µg peptide. In contrast to the results observed for type 1 RIPs, treatment of *S. frugiperda* with jaburetox-2Ec did not cause damage in DNA nor modifications in redox balance markers, indicating a distinct mechanism of action. Microscopic analysis of lepidopteran insect cells in culture (lines Tn5B and UFL-AG-286) suggested cytotoxicity and cell lysis induced by incubation with 80 and 10 µg jaburetox-2Ec, after 4 and 7 days, respectively. Aiming to understand the mode of action of the entomotoxic peptide in insects cells, the CyTotox-Glo™ kit was used to detect cytotoxicity in UFL-AG-286 and Sf21 cells incubated with jaburetox-2Ec. Unexpectedly, the results were not conclusive since it appears that the recombinant peptide is able to inhibit the intracellular proteases released upon cell lysis, preventing the hydrolysis of fluorogenic substrate used in the kit.

In conclusion, our results demonstrated that type 1 RIPs and jaburetox-2Ec are insecticidal to lepidopterans acting through distinct mechanisms. Thus type 1 RIPs induce DNA damage in *A. gemmatalis* and *S. frugiperda*, while jaburetox-2Ec induce yet to be identified physiological changes that lead to insect death.

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROTEÍNAS TÓXICAS DE PLANTAS

De acordo com os dados do *World Bank*, a população mundial cresce a uma taxa anual de 1,5%. Para manter este crescimento populacional, seria necessário hoje produzir cerca de 230 milhões de toneladas de proteínas por ano. Em países subdesenvolvidos, a fome é uma consequência da explosão populacional, que acontece sem o correspondente incremento na produção de alimentos. Em 1961, a média de terra cultivada per capita era de 0,44 ha, diminuiu hoje para 0,26 ha e, baseado na projeção populacional até o ano de 2050, haverá cerca 0,15 ha de terra cultivada per capita (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Já que não é possível aumentar a disponibilidade de maiores extensões de terras cultiváveis, esforços devem ser feitos para melhorar a eficiência dos métodos de produção de alimentos, em especial de origem vegetal, por serem mais baratos. O controle de insetos praga é, assim, de grande importância social e econômica (NICHOLSON, 2007).

As sementes de leguminosas são ricas em proteínas, que podem corresponder até a 40% do peso seco da semente. A alta produtividade agrícola e o baixo custo de produção das leguminosas, aliados ao alto valor nutritivo, justificam amplamente o crescente uso dessas sementes, tanto na alimentação humana, como animal.

No entanto, por representarem uma forma de perpetuação de suas espécies, com frequência as sementes são tóxicas para animais vertebrados, invertebrados e microrganismos. Em decorrência do processo evolutivo, as plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de defesa, que expressam também em suas sementes, como um

arsenal de substâncias constitutivas e/ou induzidas, responsáveis pela resistência do vegetal à infecção por vírus, bactérias, fungos, nematóides e vários outros organismos predadores.

Embora a toxicidade de certas plantas fosse conhecida há bastante tempo, até o final do século XIX, tal efeito era atribuído à contaminação de sementes por toxinas bacterianas. Em 1888, STILLMARK demonstrou que os extratos de semente de mamona (*Ricinus communis*) continham uma fração protéica altamente tóxica, que foi denominada ricina. A princípio, pensava-se que a ação tóxica de várias destas proteínas estivesse relacionada com as propriedades hemaglutinantes dos extratos brutos das respectivas sementes. Posteriormente, ficou claro que a atividade aglutinante está associada à uma outra classe de proteínas, denominada lectina (OLSNES *et al.*, 1974), que é oralmente inativa, e cuja ação aglutinante de hemácias é observada somente *in vitro*, ou quando administrada intravenosamente (LAMPE, 1991). Assim, descartou-se a hipótese da intoxicação causada pela ricina acontecer por aglutinação de eritrócitos. Por outro lado, essa proteína tóxica possui fraca ou nenhuma atividade hemaglutinante (cf. CARLINI & GUIMARÃES, 1991). Toxinas de plantas semelhantes à ricina foram caracterizadas como Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs – *ribosome inactivating proteins*), que descreveremos no próximo item.

Várias lectinas vegetais têm mostrado efeitos entomotóxicos quando ingeridas por insetos das ordens Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera. Algumas lectinas ligam-se às enzimas presentes na borda em escova das células epiteliais do intestino do inseto, ou à quitina integrante da membrana peritrófica ou perimicrovilar (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Outro efeito tóxico possível das

lectinas é através da ligação a enzimas digestivas glicosiladas. Entretanto, o mecanismo de ação preciso destas lectinas em insetos é ainda desconhecido.

A concanavalina A (SUMNER & HOWELL, 1936), uma lectina manose-específica isolada de sementes do feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (Fabaceae) apresenta atividade entomotóxica. GATEHOUSE *et al.*, 1999 mostraram dietas contendo 2% p/p de concanavalina A induziram mortalidade no lepidóptero *Lacanobia oleracea* e em pulgões (*Myzus persicae*), e os mesmos insetos em bioensaios com batatas transgênicas expressando a lectina tiveram seu desenvolvimento afetado. SAUVION *et al.*, 2004, relataram efeito entomotóxico da concanavalina A também para pulgões da ervilha *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae).

Em monocotiledôneas, a lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) é uma das mais estudadas quanto às suas propriedades entomotóxicas. Plantas transgênicas expressando altos níveis de GNA mostraram efeitos deterrentes contra pulgões em bioensaios e reduções significativas na sobrevivência, desenvolvimento e fecundidade dos insetos alimentados em plantas transgênicas expressando GNA (NAGADHARA *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

1.2 RIPS

A observação de que a ricina, bem como outras proteínas vegetais taxonomicamente não relacionados, são capazes de inativar irreversivelmente (*in vitro*) a síntese de proteínas em ribossomos de animais, levou à origem do termo “proteínas inativadoras de ribossomo” (RIPs). Por ter sido adotado antes de estudos estruturais e enzimáticos mais aprofundados, por muito tempo, esse termo foi aplicado para todas as

proteínas vegetais que apresentassem esse tipo de atividade biológica. Após a elucidação do modo de ação das RIPs sobre ribossomos e a descoberta de que elas possuem uma atividade enzimática tipo RNA *N*-glicosilase, o termo RIP passou a ser associado apenas a essa atividade enzimática (VAN DAMME *et al.*, 2001).

A associação do termo RIP com a atividade RNA *N*-glicosilase é importante para diferenciar essas proteínas de outras, que apesar de também serem capazes de inativar ribossomos (por exemplo, RNases e proteases) não são consideradas RIPs, pois utilizam outros mecanismos de ação. Sabe-se, atualmente, que as RIPs não são somente enzimas com uma atividade catalítica *in vitro* bem definida, mas também são proteínas bioativas com diversas atividades biológicas, tanto em plantas como em células de diversos organismos (VAN DAMME *et al.*, 2001).

O primeiro modelo sobre o mecanismo de ação em ribossomos de mamíferos foi proposto por ENDO *et al.* (1987), os quais descreveram as RIPs como sendo um grupo de enzimas RNA *N*-glicosilases capazes de catalisar a clivagem de uma adenina conservada na subunidade 28S do RNA ribossomal, e conseqüentemente, bloquear a tradução. De acordo com o mecanismo proposto, os resíduos de adenina clivados estão localizados em uma alça de uma região do RNA ribossomal que possui uma seqüência conservada GAGA (nomeada de alça sarcina/ricina), sugerindo então, que as RIPs reconhecem esta estrutura e clivam no sítio específico A₄₃₂₄ (numeração do RNA ribossomal de ratos, Figura 1). O efeito direto das RIPs na estrutura e função da célula promove um dano irreversível ao ribossomo, mais precisamente na subunidade 60S, o qual impossibilita a ligação de fatores de alongamento (EF-1 e EF-2), impedindo a síntese protéica.

Evidências sugerem que as RIPs também são capazes de remover adenina não somente do rRNA, mas também do DNA (RONCUZZI & GASPERI-CAMPANI, 1996; NICOLAS *et al.*, 1998, 2000). Todas as RIPs de plantas e também Shiga toxina são capazes de remover, *in vitro*, resíduos de adenina do DNA (BARBIERI *et al.*, 1997) levando a formação de sítios apurínicos. Ricina e Shiga toxina tem também induzido lesões de DNA em células da veia endotelial umbilical humana (HUVEC) (BRIGOTTI *et al.*, 2002). A natureza do dano do DNA observado em HUVEC é consistente com a atividade enzimática (liberação de adenina).

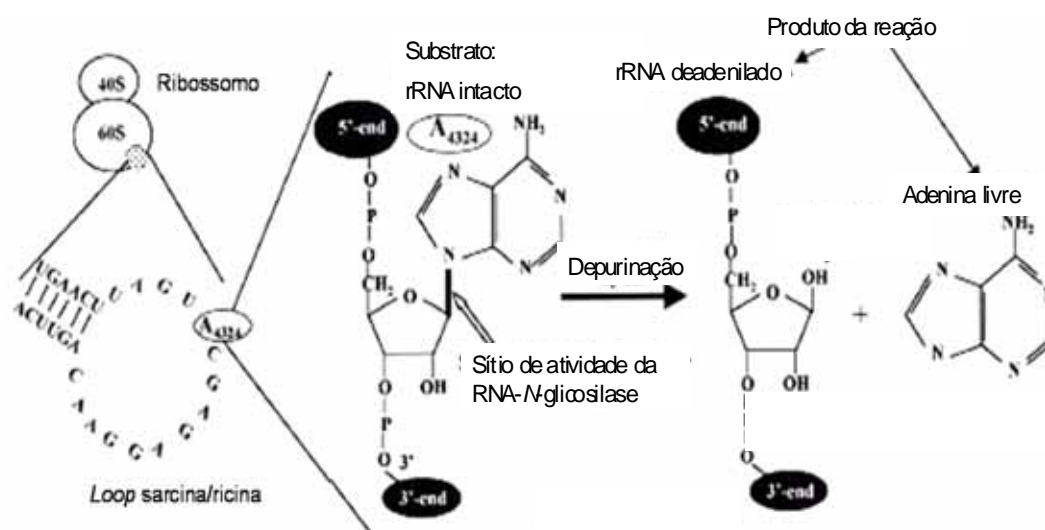


Figura 1. Representação esquemática da atividade RNA N-glicosilase das RIPs em ribossomos de ratos. Proposto por ENDO *et al.*, 1987.

Proteínas RIPs compreendem três sub-grupos, de acordo com suas propriedades físicas e estruturais, segundo MUNDY *et al.* (1994):

- **RIPs tipo 1** possuem massa relativa em torno de 30kDa, sendo formadas por apenas uma única cadeia polipeptídica que apresenta atividade enzimática, sendo “equivalentes” à cadeia A da ricina. Em função da ausência de uma porção lectina, são incapazes de entrar

na célula tão eficientemente como as RIPs do tipo 2. Assim, geralmente as RIPs do tipo 1 são atóxicas ou muito menos tóxicas para células intactas e organismos, apesar de serem igualmente potentes inativando ribossomos eucarióticos *in vitro*, como a cadeia A das RIPs do tipo 2 (STIRPE & BARBIERI, 1986).

As RIPs do tipo 1 são mais abundantes do que as do tipo 2, e ocorrem preferencialmente distribuídas entre as famílias Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, entre outras. Certos tecidos vegetais ricos em RIPs tipo 1, como o gérmen de trigo e o grão de cevada, são largamente consumidos por seres humanos e animais (LORD *et al.*, 1994).

A primeira RIP tipo 1 a ser caracterizada foi a proteína antiviral do *pokeweed* (PAP), isolada de folhas de *Phytolacca americana*, e estudada por apresentar atividade inibitória em viroses de plantas. Numerosas outras RIPs foram, e continuam a ser descritas (BARBIERI *et al.*, 1993, VIVANCO *et al.*, 1999, ZHANG & HALAWEISH, 2007, CASTILHOS *et al.*, 2008, GÜNHAN *et al.*, 2008). Considerando sua atividade abortiva, RIPs tipo 1 podem ser o princípio ativo de certas ervas abortivas conhecidas há séculos na China (BARBIERI *et al.*, 1993).

RIPs similares, mas não idênticas umas as outras (possivelmente isoenzimas), podem existir em partes diferentes da mesma planta, ou até na mesma estrutura anatômica. Por exemplo, mais de uma RIP tipo 1 foram identificadas e purificadas de folhas, raízes e sementes de *Phytolacca americana* (IRVIN, 1975; BARBIERI *et al.*, 1989), *Saponaria officinalis* (FERRERAS *et al.*, 1993) e *Bryonia dioica* (STIRPE *et al.*, 1986).

A tabela 1 mostra RIPs do tipo 1 utilizadas neste trabalho, com suas respectivas famílias, espécies e órgãos onde foram isoladas.

Tabela 1- RIPs tipo 1 estudadas nesse trabalho.

<i>Família de planta</i>	<i>Espécies</i>	<i>Órgão da planta</i>	<i>Nome da proteína</i>
Caryophyllaceae	<i>Lychnis chalconica</i>	Sementes	Licnina (BOLOGNESI <i>et al.</i> , 1990)
	<i>Saponaria officinalis</i>	Sementes	Saporina S-6 (STIRPE <i>et al.</i> , 1983)
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i>	Sementes	Momordina (BARBIERI <i>et al.</i> , 1980)
Euphorbiaceae	<i>Gelonium multiflorum</i>	Sementes	Gelonina (STIRPE <i>et al.</i> , 1980)
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i>	Sementes	PAP-s (BARBIERI <i>et al.</i> , 1982)

- **RIPs tipo 2**, entre as quais se destaca a ricina, foram encontradas somente em sete espécies de plantas, pertencentes a cinco diferentes famílias: Euphorbiaceae, Sambucaceae, Fabaceae, Passifloraceae e Viscaceae. Na família Euphorbiaceae, foram encontradas RIPs do tipo 1 e 2 (GIRBES *et al.*, 2004).

Estruturalmente, consistem de uma cadeia A, com atividade enzimática de RNA *N*-glicosidase, e uma cadeia B tipo lectina, que promove a ligação da RIP a sítios específicos na superfície da célula (STIRPE & BARBIERI, 1986). RIPs tipo 2 ligam-se às células eucarióticas através de interações com galactosídeos da superfície celular e, após entrada no citosol por internalização mediada por receptor, promovem a morte celular por inibição da síntese de proteínas (LORD *et al.*, 1994). São citotoxinas extremamente potentes, e estima-se que apenas uma única molécula internalizada seja suficiente para matar uma célula (STIRPE *et al.*, 1980).

A internalização da ricina em células de mamíferos foi revisada por HARTLEY & LORD (2004). A ricina, uma vez ligada à superfície celular através da cadeia B, é

endocitada. Parte da toxina endocitada volta para a superfície celular, ou segue para o lisossomo, onde é degradada. A rota produtiva da intoxicação ocorre para uma pequena porção da toxina, a qual é transportada por vesículas para o endossomo e para a rede trans-Golgi (TGN) e, via complexo de Golgi, para o lúmen do retículo endoplasmático. Ali as subunidades da ricina são separadas, permitindo que a cadeia A cataliticamente ativa se desloque para o citosol (Figura 2).

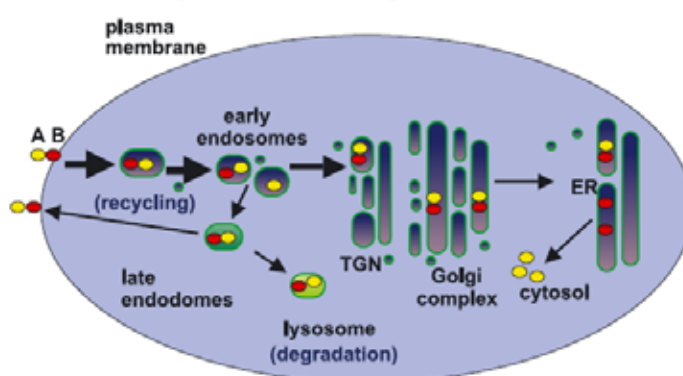


Figura 2. Transporte da ricina em células de mamíferos. Citado por HARTLEY & LORD (2004)

GATEHOUSE *et al.*, (1990) testaram ricina e saporina S-6 incorporadas à dieta de duas espécies de insetos das ordens Coleoptera, os quais foram extremamente suscetíveis ao efeito de ambas as RIPs, em concentrações muito baixas (0,001-0,0001% p/p). No mesmo trabalho, esses autores não observaram efeitos dessas RIPs contra Lepidoptera (*Heliothis virescens* e *Spodoptera littoralis*), concluindo que as RIPs podem ser extremamente tóxicas para insetos, embora os efeitos sejam variáveis em diferentes ordens.

-RIPs tipo 3 são aquelas sintetizadas como precursores inativos (proRIPs), e que requerem um processamento proteolítico para a formação do sítio ativo. Essas RIPs são menos

comuns que os outros dois tipos, sendo que, até o momento, foram caracterizadas somente em milho e cevada (BASS *et al.*, 1992).

DOWD *et al.*, 2003, 2006 demonstraram com sucesso o aumento da resistência das plantas do tabaco expressando uma RIP da semente do milho, isoladamente ou em conjunto com peroxidase aniônica, contra *Heliothis zea* (Boddie), e obtendo proteção menos eficiente contra o besouro *Lasioderma serricorne* (F.) e a lagarta do tabaco *M. sexta* (L.).

As RIPs não estão limitadas às plantas. Foi demonstrada atividade similar às RIPs descritas para células animais também para a toxina 1 de *Shigella dysenteriae* e toxinas *Shiga-like* (SLTI e SLTII) de *Escherichia coli* (REISBIG *et al.*, 1981; OBRIG, 1997). Assim, a distribuição das RIPs na natureza parece mais vasta do que foi originalmente descrito.

As RIPs depurinam também ribossomos de não-mamíferos, como insetos (ZHOU *et al.*, 2000), plantas (IGLESIAS *et al.*, 1993), leveduras (ROBERTS & SELITRENNIKOFF, 1986) e bactérias (GIRBES *et al.*, 1993). Outras propriedades biológicas foram propostas para as RIPs, como atividade antifungo, atividade inseticida, e efeitos no sistema imune (imunogenicidade, alergenicidade e imunossupressivos).

As RIPs podem apresentar seletividade para matar células tumorais quando comparados às células normais da mesma linhagem. O grande interesse nas RIPs é decorrente da potencial aplicação em imunoterapia de câncer, na forma de imunotoxinas. Há muitos estudos relatando que RIPs e imunotoxinas podem provocar a morte celular

induzindo apoptose (BRINKMANN *et al.*, 1997; NARAYANAN *et al.*, 2004; SIKRIWAL *et al.*, 2008, BERGMANN *et al.*, 2008).

Um dos primeiro relatos que RIPs são capazes de induzir a morte celular foi publicado por GRIFFITHS e colaboradores em 1987, os quais mostraram que injeções intramusculares de ricina e abrina em ratos, resultaram na morte celular. Foi observado que a morfologia de célula (linfonodos pára-aortico e placa de Peyer's) em ratos injetados com ricina ou abrina se assemelharam às células em apoptose, caracterizadas pela formação de corpos apoptóticos. Há relatos que o tratamento com abrina e ricina resultou em morfologia apoptótica, além de condensação de heterocromatina e marcadores de DNA, em células endoteliais pulmonares bovinas (HUGHES *et al.*, 1996) e em U937, um tipo de macrófago humano (KOCHI & COLLIER, 1993). Em células HeLa, a ricina induziu mudanças morfológicas de apoptose clássica e também ativação de caspase-3. Ricina também provocou alterações no ciclo celular na fase G2/M, mas nenhum efeito na fase de G0/G1 (GAN *et al.*, 2000). Além de ricina e abrina, várias outras RIPs como saporina e gelonina também foram relatadas como indutoras da apoptose (KOJIO *et al.*, 2000; FUJII *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2000; VERVECKEN *et al.*, 2000; LANGER *et al.*, 1999; VAN-HUYEN *et al.*, 2002).

Poucos estudos tentaram delinear a rota apoptótica e propor um mecanismo de morte celular induzida por estas toxinas. Porém, deve ser lembrado de que estes caminhos necessariamente não precisam ser mutuamente exclusivos e mais estudos nesta área são necessários para determinar a sinalização induzida pelas RIPs, conduzindo à morte da célula (NARAYANAN *et al.*, 2005).

Além das RIPs de plantas, várias toxinas bacterianas, como toxina diftérica (CHANG *et al.*, 1989; MORIMOTO & BONAVIDA, 1992; KOCHI & COLLIER, 1993), toxina de *Pseudomonas* (MORIMOTO & BONAVIDA, 1992; KOMATSU *et al.*, 1998) e Shiga toxina (KOJIO *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2003) também induzem a morte de células por apoptose.

GAYOSO e colaboradores (2005) estudaram o efeito de injeções intravenosas de uma grande quantidade de nigrina b (uma RIP tipo 2 não tóxica) em camundongos. Injeções na veia de nigrina b matou todos os ratos estudados antes de 2 dias (16mg/kg), os quais apresentaram importantes lesões nas células epiteliais do intestino, microvilosidades atrofiadas e morfologia de apoptose e em doses sub-letais (5mg/kg) sinais de dano em tecidos do intestino.

Viscumina (uma RIP tipo 2) induziu apoptose em células Hep3B de hepatocarcinoma humano causando um decréscimo da expressão do anti-apoptótico Mcl-1 e ativação da rota caspase-dependente, acompanhada por significativo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KIM *et al.*, 2004). RIPs tipo 1, ou a cadeia A isolada de toxinas do tipo 2, foram também descritas como capazes de induzir apoptose e estresse oxidativo (BRIGOTTI *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2003, 2007; BARBIERI *et al.*, 2004), como revisado por BATTELLI (2004) e mais tarde por NARAYANAN *et al.* (2005).

O papel fisiológico das RIPs em plantas não está definido até agora, e as hipóteses sugeridas são: (i) um papel de proteção, como atividade inseticida contra alguns tipos de insetos (GATEHOUSE *et al.*, 1990) e atividade antiviral (BARBIERI *et al.*, 1993), e (ii) um papel no processo apoptótico, uma vez que RIPs são expressas em alto nível na senescência ou estresse tecidual (NIELSEN & BOSTON, 2001; PEUMANS *et al.*, 2001).

PEUMANS *et al.*, 2001 concluem que RIPs ocorrem em muitas, mas certamente não em todas as espécies de plantas. Evidência de ausência de RIPs foi obtida somente para *Arabidopsis thaliana*, já que esta planta além de não apresentar atividade detectável de RIP, também não possui uma seqüência nucleotídica identificável como RIP em seu genoma.

Segundo STIRPE (2004), as RIPS são proteínas ubíquas em plantas. Ainda que a atividade de RIP não tenha sido detectada em uma determinada planta, é difícil excluir que uma RIP não possa estar presente, porque (i) sementes foram o órgão vegetal mais freqüentemente examinado quanto à presença de RIPs, mas em certas plantas, outros tecidos são mais ricos nessas proteínas; (ii) em alguns materiais examinados, as RIPs poderiam estar presentes em concentrações abaixo do nível de detecção; e (iii) a busca destas proteínas geralmente é baseada no efeito inibitório da síntese de proteínas em lisados de reticulócitos de coelhos, e não pode ser excluída a existência de RIPs que atuem preferencialmente em outros tipos de ribossomos.

1.3 UREASES VEGETAIS E CNTX

As ureases (uréia amidohidrolases: EC 3.5.1.5) são enzimas níquel-dependente que catalisam a reação de hidrólise da uréia à amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente para formar dióxido de carbono e uma segunda molécula de amônia (WANG & TARR, 1955).

As ureases são amplamente distribuídas, sendo encontradas em bactérias, fungos e plantas. A principal função da urease, em plantas, parece estar relacionada à reciclagem de nitrogênio a partir de uréia, gerada externa ou internamente (ANDREWS *et al.*, 1984;

MOBLEY *et al.*, 1995). Durante a germinação, a uréia endógena é, na sua maioria, produto de degradação da arginina, que é ativamente degradada à uréia e ornitina (GOLDRAIJ & POLACCO, 1999). A urease catalisa a conversão de uréia à amônia, que é assimilada na via de síntese de glutamina (LAM *et al.*, 1996). A urease também tem importante papel na reciclagem de uréia exógena, aplicada como fertilizante (WITTE *et al.*, 2002).

Apesar de intensamente estudadas, o papel fisiológico das ureases em vegetais ainda não foi bem elucidado (POLLACO & HOLLAND, 1993). Em estudos com plantas de tabaco expressando urease de *Helicobacter pylori*, não foram observadas alterações do padrão de crescimento, apesar das plantas transgênicas apresentarem o dobro da atividade ureásica e níveis oito vezes maiores de amônia, em relação às plantas controle (BRODZIK *et al.*, 2000). Em *Glycine max* foram descritas duas isoformas de urease: a urease metabólica ou ubíqua, a qual está presente em todos os tecidos da planta, em concentrações bem menores (0,1 a 1%) em relação à urease denominada embrião específica, sintetizada apenas no embrião em formação e que se acumula na semente madura, onde sua atividade ureásica é 1000 vezes superior à da ubíqua (POLACCO & WINKLER, 1984; TORISKY & POLACCO, 1990). Estudos de mutantes para estas enzimas indicaram que a urease ubíqua está envolvida em processos de reciclagem da uréia, pois mutantes com silenciamento desta isoforma apresentaram anormalidades, como retardamento da germinação, acúmulo de uréia nas folhas e necroses pontuais nas folhas e raízes (STEBBINS *et al.*, 1991).

Mutantes de soja com silenciamento da urease embrião-específica, por sua vez, não demonstraram quaisquer das anormalidades observadas no silenciamento da urease ubíqua. Embora muita uréia seja gerada durante o processo de germinação (POLACCO & HOLLAND, 1993) a perda da urease embrião-específica não causa aumento dos níveis de

uréia da plântula, se comparada ao tipo selvagem. Estudos *in vitro* com cotilédones de ervilha (LEA *et al.*, 1979) e plântulas de soja (STEBBINS & POLACCO, 1995) indicaram que a(s) urease(s) representam pouca ou nenhuma função na nutrição embrionária.

Estes estudos despertaram dúvidas sobre a função desta isoforma de urease na semente, que não estaria envolvida em processos ligados à assimilação de uréia, mas poderia participar de outros processos na planta, como defesa (POLACCO & HOLLAND, 1993).

O feijão-de-porco (*C. ensiformis*) é fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como a urease, a lectina concanavalina A (SUMNER & HOWELL, 1936), inibidores de tripsina (UBATUBA, 1955) e a canatoxina (CNTX) (CARLINI & GUIMARÃES, 1981).

A urease de *C. ensiformis* foi a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER, 1926). Sua unidade estrutural básica constitui-se de uma cadeia polipeptídica com 840 aminoácidos e massa molecular de 90,77 kDa. A forma mínima da enzima ativa é trimérica, com 270 kDa, sendo encontrada na forma nativa como um hexâmero de 540 kDa (ZERNER, 1991).

Em 1981, CARLINI & GUIMARÃES isolaram a CNTX, identificada como uma isoforma da urease (FOLLMER *et al.*, 2001) e estudos posteriores realizados por PIRES-ALVES *et al.* (2003) identificaram a presença de no mínimo três membros da família das ureases, CNTX, JBU e JBURE-II, e mostraram a similaridade na sequência dos aminoácidos das ureases do feijão-de-porco.

Estruturalmente, a CNTX é uma metaloproteína contendo Zn^{2+} e Ni^{2+} , sendo a sua

forma nativa um dímero de cadeias polipeptídicas de 95 kDa, ligadas não covalentemente (FOLLMER *et al.*, 2001, 2002; FOLLMER, 2008). Dados de seqüência parcial da CNTX indicam um alto grau de identidade com a urease da mesma semente.

CNTX quando injetada intraperitonealmente em ratos e camundongos (CARLINI *et al.*, 1984) induz hipotermia, hipóxia, hipoglicemia, convulsões e finalmente morte (DL_{50} 2-3 mg/kg), entretanto, ela é inativa quando administrada por via oral nestes animais, talvez devido a instabilidade a baixos pH (CARLINI & GUIMARÃES, 1991).

Estudos *in vitro* indicaram que a CNTX é um potente indutor de excitose em diferentes modelos celulares, como plaquetas, sinaptosomas, ilhotas pancreáticas, etc. O efeito da CNTX envolve ativação do metabolismo do ácido araquidônico via lipoxigenases e alterações dos fluxos e níveis intracelulares de Ca^{2+} (CARLINI *et al.*, 1985; BARJA-FIDALGO *et al.*, 1991a,b; GHAZALEH *et al.*, 1997). Outra propriedade interessante da CNTX é a sua capacidade de se ligar a resíduos de gangliosídeos e sialoproteínas, que provavelmente constituem os aceptores dessa toxina na superfície celular (CARLINI & GUIMARÃES, 1991).

A CNTX tratada com um inibidor irreversível da atividade ureásica, o p-hidroxi-mercuribenzoato, mantém inalterada sua toxicidade em camundongos ou capacidade de ativar plaquetas, mostrando que outro(s) “domínio(s)” protéico(s) dessas moléculas, distinto(s) do “domínio” catalítico, são responsáveis por essas propriedades biológicas (FOLLMER *et al.*, 2001).

Outros estudos mostraram que proteínas do tipo CNTX estão presentes em várias leguminosas e que se acumula para atingir níveis máximos na semente madura da *C. ensiformis* (BARCELLOS *et al.*, 1993). Estes resultados, somados ao efeito tóxico

observado em insetos e fungos, reforçam a hipótese de que a CNTX possa desempenhar um possível papel de defesa na planta, atuando contra insetos e/ou fitopatógenos.

A CNTX mostrou ser letal quando ingerida por alguns tipos de insetos (*Callosobruchus maculatus*, *Rhodnius prolixus*), mas não afeta outros (*Manduca sexta*, *Schistocerca americana*, *Aedes aegypti*). Demonstrou-se que a CNTX é ativada proteoliticamente no trato digestório de insetos susceptíveis, que apresentam digestão ácida baseada em catepsinas, sendo inócua para insetos com digestão baseada em tripsinas. Assim, a toxina intacta não induz efeito se injetada no *R. prolixus*, ou se seu processamento no trato digestório do barbeiro for retardado pela administração de inibidores de catepsinas, como a pepstatina A ou E-64 (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DA SILVA *et al.*, 2000).

Por outro lado, peptídeos (10-15 kDa) produzidos por digestão da CNTX *in vitro* com enzimas do *C. maculatus* são tóxicos se injetados, ou ingeridos pelos barbeiros (FERREIRA-DA SILVA *et al.*, 2000; CARLINI *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 quando injetado, para adultos de *R. prolixus* (FERREIRA-DA SILVA *et al.*, 2000). Com os dados da seqüência N-terminal do pepcanatox, obtidos por GOMBAROVITZ (1999), foram projetados oligonucleotídeos para obtenção de um fragmento codificante de um peptídeo equivalente, a partir das seqüências dos genes *jbure-II* e *jbure* de *C. ensiformis*. A expressão heteróloga desse cDNA em *Pichia pastoris* resultou em um peptídeo inseticida, denominado Jaburetox 2-Pp (patente INPI-RS 0003334, de 6 de junho de 2000), utilizando como inseto modelo o percevejo manchador

da maçã do algodão, *D. peruvianus*. A administração de Jaburetox-2Pp causou a morte de 40% dos insetos após ingestão de dieta contendo 0,01% m/m do peptídeo (FREITAS-SILVA, 2002). O peptídeo recombinante obtido na mesma região da sequência da urease (Jaburetox-1Pp) também apresentou atividade tóxica contra o mesmo inseto, ainda que menos eficiente. A diferença de aminoácidos entre os dois peptídeos pode explicar esta diferença na atividade (FREITAS-SILVA, 2002). Posteriormente, um peptídeo recombinante diferindo em apenas poucos aminoácidos no N-terminal e no C-terminal, e que se mostrou mais potente como inseticida, foi obtido por expressão em *Escherichia coli* – o jaburetox-2Ec (MULINARI *et al.*, 2004, MULINARI *et al.*, 2007).

A sequência primária do jaburetox-2Ec, a partir de gene *jbure-ii* (PIRES-ALVES *et al.*, 2003), corresponde a mesma região da canatoxina que gera o pepcanatox, obtido pela hidrólise enzimática da CNTX por enzimas do coleóptero *C. maculatus*. Porém, o peptídeo recombinante possui os 93 aminoácidos correspondentes ao peptídeo entomotóxico, mais o epítipo V-5 (sequência viral para facilitar a detecção) e seis histidinas fusionadas no C-terminal, além de uma metionina na posição 1, devido à introdução de um códon de iniciação da tradução, totalizando 125 aminoácidos (Figura 3).

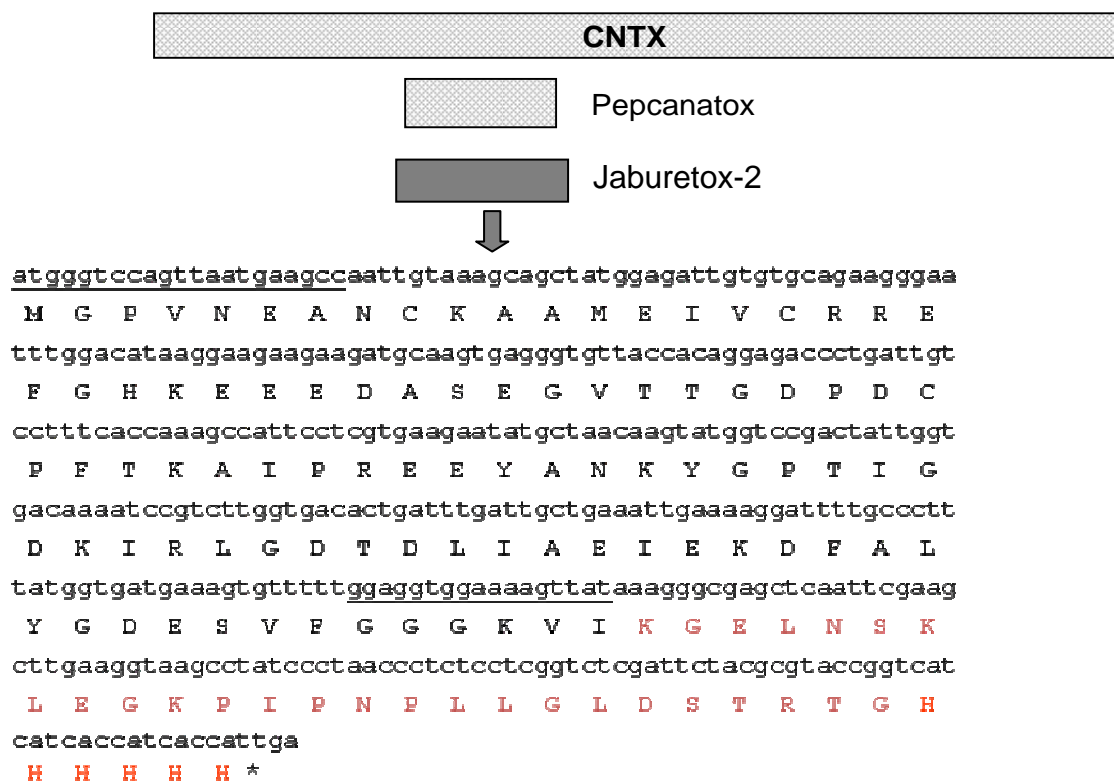


Figura 3. Representação esquemática da estrutura primária da CNTX e seus peptídeos entomotóxicos derivados. Nucleotídeos e seqüência de aminoácidos do jaburetox-2Ec determinada do cDNA.

O escalonamento da produção em biorreator, além de disponibilizar quantidades adequadas de jaburetox-2Ec recombinante, levou a uma diminuição dos custos, pois permitiu a utilização de lactose como indutor da expressão no lugar do IPTG (TOMAZETTO *et al.*, 2007).

O jaburetox-2Ec apresentou toxicidade contra insetos com digestão dependente de enzimas do tipo catepsinas, suscetíveis à CNTX e JBU, como *D. peruvianus*, *R. prolixus* e *Triatoma infestans* (STANISÇUASKI *et al.*, 2005; TOMAZETTO *et al.*, 2007), confirmando que esta região da proteína é responsável, pelo menos em parte, pela atividade inseticida. A modelagem molecular de jaburetox-2Ec sugere uma atividade baseada em neurotoxicidade (MULINARI *et al.*, 2007).

Altas doses de jaburetox-2Ec foram inócuas quando injetado ou ingerido por camundongos ou ratos neonatos, sendo que a falta de toxicidade em mamíferos é um ponto positivo para o uso potencial desta proteína no controle de insetos praga (MULINARI *et al.*, 2007)

Foi verificado por STANISÇUASKI *et al.*, 2008 que ambas as isoformas de urease de *C. ensiformis*, e também o jaburetox-2Ec, atuam sobre os túbulos de Malpighi de *R. prolixus*, diminuindo a secreção de fluidos. Esse efeito pode ser responsável pela diminuição de peso observada *in vivo* em insetos alimentados com a CNTX. Interessantemente, foi demonstrado que JBU e jaburetox-2Ec ativam diferentes rotas de sinalização que levam ao mesmo efeito antidiurético. Jaburetox-2Ec é dependente de cGMP e eicosanóides e íons cálcio estão envolvidos no efeito antidiurese induzido por JBU.

Estudos iniciais de transformação de plantas de tabaco com jaburetox-2 e a toxicidade das plantas transformantes contra larvas de *S. frugiperda* confirmam a atividade deste peptídeo quando expresso em plantas, nas concentrações e condições obtidas por MULINARI- FONTANA (2008).

1.4 INSETOS COMO MODELOS

O número de espécies de insetos descritas é estimado em aproximadamente 1 milhão, das quais cerca de 10% são pragas, prejudicando plantas, animais domésticos e o homem. Segundo o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), cerca de 5 mil novas espécies são coletadas e classificadas anualmente (GALLO *et al.*, 2002).

Os danos causados pelos insetos às plantas são variáveis, podendo ser observados em todos os órgãos vegetais. Em termos mundiais, os prejuízos na agricultura causados por

pragas, doenças e plantas daninhas são elevados (GALLO *et al.*, 2002). As perdas na produção agrícola mundial devido ao ataque de pragas e de doenças têm sido estimadas entre 37% (GATEHOUSE, 1992) e 45% (BANTHI & TANEJA, 2007). Além do dano causado nas plantações devido à alimentação direta dos insetos, estes levam a perdas adicionais, através da transmissão de patógenos causadores de doenças (HAQ, 2004).

As culturas do milho e arroz irrigado apresentam significativa importância sócio-econômica no Rio Grande do Sul (PULVER, 2001). Na cultura do soja, o RS se destaca em segundo lugar no país em área cultivada, considerando-se área cultivada e produtividade, disseminando-se por 331 municípios gaúchos, sendo de extrema importância econômica para o estado e para o Brasil, não somente em termos de divisas (exportações), mas para a alimentação humana e animal. Vários fatores são responsáveis pela queda na produtividade nessas culturas e, dentre eles, as pragas ocupam lugar de destaque.

A ordem Lepidoptera contém cerca de 150.000 espécies conhecidas, embora a divisão nas várias subordens ainda seja motivo de controvérsia entre os especialistas. A subordem Glossata é composta por diversas famílias, entre elas a Noctuidae (GALLO *et al.*, 2002) considerada a maior família dentre a ordem Lepidoptera.

Noctuidae compreende mariposas de corpo, em geral, robusto e asas densamente escamosas e tamanho bastante variável. A família compreende cerca de 20.000 espécies descritas, divididas em várias sub-famílias. Dentre seus representantes destacam-se a *Spodopetra frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*.

A *S. frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera:Noctuidae) é nativa de regiões tropicais e subtropicais das Américas, sendo que sua distribuição abrange desde o sul do

Canadá até a Argentina (LEIDERMAN & SAUER, 1953). Na fase larval se alimenta de plantas de 23 famílias diferentes, sendo seus hospedeiros mais freqüentes as gramíneas, o que caracteriza sua polifagia (CRUZ *et al.*, 1999). Há relatos de ataques por *S. frugiperda* às culturas do milho e arroz, provocando altos índices de desfolhamento (OLIVEIRA, 1987; CRUZ, 1995). Quando ataca a cultura do milho, esse inseto é conhecido vulgarmente por lagarta-do-cartucho, alimentando-se da planta em todas as fases de crescimento da cultura, mas com preferência por cartuchos de plantas jovens. O ataque pode ocorrer desde a fase de plântula até as fases de pendramento e espigamento do milho. As mariposas da lagarta-do-cartucho põem até 2.000 ovos, nas folhas. Após três dias nascem as lagartas, que alimentam-se das folhas mais novas do milho. A duração do período larval é de 12 a 30 dias, no final do período larval as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas, período este que dura 8 dias no verão e 25 dias no inverno.

Reduções na produção de milho causadas por esse inseto atingem 34%, com perdas que podem variar conforme a fase de desenvolvimento da planta atacada, com a cultivar utilizada, local de plantio e mesmo entre áreas adjacentes, segundo as práticas agronômicas adotadas (CRUZ, 1995; GALLO *et al.*, 2002).

Grandes danos à cultura da soja [*G. max* (L.) no Brasil são causados pela lagarta desfolhadora, *A. gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000). Para completar o seu ciclo de desenvolvimento, cada lagarta consome cerca de 90cm² das folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 horas (LEPPLA *et al.*, 1977). No Brasil, pode causar desfolhamentos severos na cultura da soja, desde o Rio Grande do Sul até os estados da região Centro-Oeste (GAZZONI *et al.*, 1988).

A. gemmatalis é uma espécie de clima tropical e subtropical com ampla distribuição, ocorrendo desde os Estados Unidos da América até a Argentina (FORD *et al.*, 1975). O adulto de *A. gemmatalis* é uma mariposa de coloração pardo-acinzentada, com 40mm de envergadura. Os ovos, de coloração verde, são colocados isoladamente na face inferior das folhas e eclodem em cinco dias. As lagartas se alimentam das folhas e podem atingir 30mm de comprimento. A transformação em pupa ocorre no solo, a pouca profundidade, e após uma semana emerge o adulto. (GALLO *et al.*, 2002).

1.5 GENOTOXICIDADE

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para avaliar os possíveis riscos à integridade do DNA, causados por poluentes, agrotóxicos, medicamentos, radiação natural e outros agressores ambientais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HARTMANN *et al.*, 2004; VILLELA *et al.*, 2003). Dentre as técnicas mais rápidas e simples para detecção de dano genotóxico o ensaio cometa ou *single cell gel eletrophoresis* (SCGE) vem sendo proposto como um teste de *screening*. O ensaio cometa é utilizado não para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que podem ser reparadas, e se não reparadas, podem resultar em mutação. Este teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção; embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (CONTIJO & TICE, 2003).

A análise em gel de eletroforese alcalino, conhecido como *comet assay* é um dos ensaios mais sensíveis, rápidos e que exige menos recursos técnicos para avaliação de genotoxicidade (SILVA *et al.*, 2000; TICE *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 1988; FAIRBAIRN *et al.*, 1995; HARTMANN *et al.*, 2003). Além disso, permite uma avaliação quantitativa e

qualitativa de dano do DNA, detectando danos em baixíssimos níveis em qualquer célula eucariótica.

A técnica de microeletroforese foi utilizada para estudar a extensão da fragmentação do DNA em células tumorais AK-5. Células imunes NK foram preparadas de esplenócitos de animais que rejeitaram o tumor AK-5. Os autores GOPALAKRISHNA & KHAR, 1995, estudaram o mecanismo da morte das células tumorais AK-5 induzida pelas células NK por Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCC), sendo possível monitorar o dano do DNA nestas células, verificando que o comprimento da cauda aumentava com o tempo da co-cultura.

Esse método ganhou grande aceitação como um teste de avaliação de genotoxicidade em diferentes campos, como genética toxicológica (ANDERSON *et al.*, 1996; DHAWAN *et al.*, 2002; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2004), em estudos da apoptose (OLIVE *et al.*, 1993; SREEDHAR *et al.*, 1999), para diferenciar apoptose da morte celular necrótica (OLIVE & BANATH, 1992; FAIRBAIRN *et al.*, 1996), para avaliar a eficiência antineoplástica da quimioterapia e radiação (OLIVE & BANATH, 1992; OLIVE *et al.*, 1994, 1996), em estudos epidemiológicos e de biomonitoramento (VAGHEF *et al.*, 1997; BAJPAYEE *et al.*, 2002; MARCZYNSKI *et al.*, 2002), e na avaliação da genotoxicidade de químicos industriais, biocidas, agroquímicos e farmacêuticos.

A maior vantagem desta análise inclui a facilidade relativa de aplicação em qualquer tecido de interesse, a detecção de múltiplas classes de danos no DNA e a geração de dados ao nível de uma única célula (HARTMANN *et al.*, 2003). Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alquilábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão (SILVA *et al.*, 2000; SINGH *et al.*,

1988). Este teste apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, uma vez que pode ser utilizado para qualquer tipo de células, desde que individualizadas (em suspensão), sendo necessário apenas um pequeno número das mesmas e de não requerer células em divisão (HARTMANN & SPEIT, 1994).

Apoptose é um processo de morte celular fisiologicamente normal, eliminando as células não desejadas de organismos vivos, durante a embriogênese e desenvolvimento adulto (KAUSALYA *et al.*, 1994). Células apoptóticas são caracterizadas pela fragmentação do DNA nuclear (GOPALAKRISHNA & KHAR, 1995). A citotoxicidade de linfócitos T (ZYCHLINSKY *et al.*, 1991) também induz apoptose em células alvo. Envolvimento de muitos genes de morte e sobrevivência em apoptose tem sido apontado por análise genética (BRIGHT & KHAR, 1994).

Avaliações de genotoxicidade em *Drosophila melanogaster* utilizando quatro agentes alcalinizantes e mutagênicos (metil-metanosulfonato, etil-metanosulfonato, N-etil-N-nitrosureia e ciclofosfamida) mostraram uma relação dose-dependente dos agentes na extensão do dano causado ao DNA, quando comparados com o controle. Em baixas concentrações (0,05 mM) dos agentes, exceto metil-metanosulfonato, houve extenso dano no DNA nas células do trato digestório das larvas expostas (SIDDIQUE *et al.*, 2005).

Após os estudos de GRIFFITHS *et al.* (1987), que mostraram que ricina e abrina induziram apoptose em tecidos linfóides e intestino de ratos, seguiram muitos outros relatos de toxinas bacterianas e de toxinas de plantas induzindo apoptose em células de mamíferos (CHANG *et al.*, 1989; MORIMOTO & BONAVIDA, 1992; KOCHI & COLLIER, 1993; ALLAM *et al.*, 1997; BRINKMANN *et al.*, 1997; NARAYANAN *et al.*, 2004).

1.6 ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais oxidativos são gerados durante processos oxidativos normais na grande maioria das células eucarióticas e fluidos extracelulares. Originam-se principalmente, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, quando o oxigênio consumido sofre processo de redução, e dá origem a intermediários reativos, como os radicais hidroxila e superóxido. A produção em excesso de radicais superóxido, hidroxila e de peróxido de hidrogênio e/ou um déficit de antioxidantes resulta em estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

Nos organismos, os danos causados pelo estresse oxidativo são minimizados pelo sistema de defesa antioxidante não enzimático e/ou sistema de defesa antioxidante enzimático, esse último representado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona-redutase (GR) (BONNEFOY *et al.*, 2002).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o radical mais comum e abundante na célula (BOVERIS, 1998). Seu envolvimento em sistemas biológicos foi descoberto em 1969 e, a partir da descoberta da SOD, enzima que catalisa a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (BABIOR, 1997), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou GPx.

A ação oxidante de hidroperóxidos pode ser neutralizada pela atividade de glutaciona S-transferase (GRUBOR-LAJŠIĆ *et al.*, 1997, AHMAD *et al.*, 1988), ou pela atividade de ascorbato peroxidase, que já foi descrita no lepidóptero *H. zea* (MATTHEWS *et al.*, 1997).

Estudos (MULDOON *et al.*, 1992, 1994) mostraram que ricina induziu estresse oxidativo em camundongos resultando em peroxidação lipídica hepática, quebra do DNA e aumento da excreção urinária de compostos carbonil. MULDOON *et al.*(1994) sugerem que a ativação de macrófagos, seguida da liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), estariam envolvidos na toxicidade de ricina em camundongos. Em 1996, os mesmos autores sugerem que o ferro pode estar envolvido na diminuição da peroxidação lipídica induzida por ricina em camundongos. KUMAR *et al.* (2003, 2007) verificaram que ricina produziu hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e danos oxidativos em camundongos após 24h de tratamento. RAO *et al.* (2005) indicam que a morte celular induzida por ricina em células HeLa foi mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio e subsequente ativação da rota da caspase-3 seguida por acontecimentos que levam a morte das células por apoptose.

Insetos herbívoros estão expostos a ROS derivados de alimentos ricos em pro-oxidantes, gerados durante o processo oxidativo fisiológico. Para proteger-se do estresse oxidativo e modular os efeitos fisiológicos nocivos de ROS, os insetos desenvolveram um sistema de defesa regulado por antioxidantes.

Estudos têm verificado que enzimas antioxidantes estão presentes em várias espécies de larvas de lepidópteros, atividade de CAT , SOD assim como GR (GRUBOR-LAJŠIĆ *et al.*, 1997, AHMAD *et al.*, 1987, 1988). As enzimas antioxidantes, SOD e CAT têm papéis essenciais também em insetos, incluindo os lepidópteros (BARBEHENN *et al.*, 2001; KRISHNAN & KODRIK, 2006). APOX foi encontrado em espécies de lepidópteros (FELTON & DUFFEY, 1991, 1992; KRISHNAN & KODRIK , 2006; MATHEWS *et al.*, 1997; SUMMERS & FELTON, 1993).

Em insetos o peróxido de hidrogênio pode tanto ser metabolizado pela CAT (peróxido de hidrogênio em altas concentrações) ou pelo APOX (peróxido de hidrogênio em baixas concentrações) (FELTON & DUFFEY, 1991; MATHEWS *et al.*, 1997).

Larvas de lepidópteros não mostraram níveis significativos de atividade de glutathione peroxidase contra peróxido de hidrogênio (GRUBOR-LAJŠIĆ *et al.*, 1997, AHMAD & PARDINI, 1990; PRITSOS *et al.*, 1988; AHMAD *et al.*, 1987, 1988).

KRISHNAN & KODRÍK (2006) verificaram que os potenciais danos provenientes de aleloquímicos pro-oxidantes de plantas da dieta de *S. littoralis* são controlados por meio de um sistema de enzimas antioxidantes em resposta ao aumento do estresse oxidativo gerados por aleloquímicos oxidáveis. Estes resultados corroboram com a hipótese que o aumento de antioxidantes é um importante componente de defesa de insetos herbívoros contra radicais oxidativos exógenos e endógenos.

1.7 CÉLULAS DE LEPIDÓPTEROS E CITOTOXICIDADE

Historicamente, o cultivo de células de insetos começou com pesquisadores que se reuniam em intervalos de 3 a 4 anos na Conferência Internacional de Cultura de Tecidos de Invertebrados. A primeira destas ocorreu em Montpellier, França em 1962 que, talvez não por coincidência, foi o ano que a primeira linhagem de cultura de célula de inseto foi descrita na literatura (GRACE, 1962). Nas décadas de 1970 e 1980, W. Frederick Hink preparou compilações sobre linhagens de células de insetos em cultura (HINK, 1972; 1976; 1980; HINK & BEZANSON, 1985; HINK & HALL, 1989).

A disponibilidade de linhagens celulares de lepidópteros tem aumentado regularmente, em cerca de 50 novas linhagens a cada década. Citado por LYNN (2002), cerca de 197 linhagens celulares de lepidópteros foram estabelecidas até o ano de 2000.

A utilização de células de insetos com a finalidade de produção *in vitro* de proteínas recombinantes e de biopesticidas foi intensificada nas últimas décadas. Diante dos avanços tecnológicos tornou-se relativamente fácil o cultivo de várias linhagens de células devido a meios sintéticos, capazes de suprirem as suas necessidades nutricionais (BATISTA *et al.*, 2003).

A maioria das células de inseto pode ser cultivada na faixa de temperatura de 25-30°C, todavia, a temperatura ótima durante o crescimento celular é considerada ao redor de 27-28°C (LYNN, 2002).

Células UFL-AG-286 são amplamente utilizadas em trabalhos envolvendo nucleopolihedrovírus de *A. gemmatalis* - AgMNPV (Da SILVEIRA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2001), por este modelo celular ser bastante permissivo ao processo de infecção. *Baculovirus* também podem induzir apoptose em cultura de células de *A. gemmatalis* (Da SILVEIRA *et al.*, 2005).

A cultura da linhagem celular UFL-AG-286 foi originalmente isolada de células embrionárias de *A. gemmatalis* (SIEBURTH & MARUNIAK, 1988). GIORIA *et al.* (2006) caracterizaram as propriedades tecnológicas da linhagem UFL-AG-286 e sua viabilidade para a produção em larga escala para a produção do nucleopoliedrovírus *A. gemmatalis*.

As células Sf21, derivadas de ovários de *S. frugiperda* (VAUGHN *et al.*, 1977), são altamente suscetíveis à infecção por nucleopolihedrovírus de *Autographa californica* (AcNPV). A falta de produção de subprodutos tóxicos em culturas bem-oxigenadas das linhagens celulares de lepidópteros IPLB-Sf-21 e Sf9 tornou possível desenvolver estratégias nutricionais para manter a produção de células em culturas em densidades muito elevadas (BE'DARD *et al.*, 1997; ELIAS *et al.*, 2000). DIAO *et al.*, 2008 avaliou o crescimento de Sf21 em mini-bioreator.

A linhagem celular Tn-5 exibiu um comportamento metabólico caracterizado pelo acúmulo de lactato e amoníaco (RHIEL *et al.*, 1997) que poderia limitar a aplicabilidade de estratégias para produção em alta densidade destas culturas. Essas diferenças ilustram a diversidade de perfis metabólicos que podem ser encontrados em diferentes linhagens celulares de lepidópteros.

Citotoxicidade é um dos parâmetros biológicos mais comuns medidos após uma manipulação experimental, em grande parte porque apresenta uma dose-dependência. É sabido que muitas drogas têm efeito fisiológico e terapêutico em concentrações mais baixas, enquanto as concentrações tóxicas incluem necrose ou apoptose em concentrações mais elevadas.

Independentemente do mecanismo de morte celular, células de mamíferos interagindo com toxinas podem sofrer uma série de alterações estrutural e morfológica que levam à perda da integridade da membrana (LEIST & JAATTELA, 2001). Este dano irreparável para a arquitetura celular permite a livre circulação das moléculas e de conteúdos enzimáticos anteriormente impedidos de sair de dentro da célula (RISS &

MORAVEC, 2004). Portanto, a medição da atividade de enzima intracelular no ambiente extracelular é a base de vários ensaios de citotoxicidade.

Atualmente, vários ensaios de citotoxicidade estão baseados na determinação da integridade da membrana celular. Testes utilizando vermelho neutro, *trypan blue* e compostos fluorescentes, como iodeto de propídio são os métodos tradicionais para avaliar a viabilidade celular e danos à membrana. A detecção de atividade no meio extracelular da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) é amplamente utilizada em ensaios *in vitro* de estudos toxicológicos.

A integridade da membrana pode ser avaliada por outras enzimas intracelulares liberadas para o meio externo como a adenilato quinase (AK) (OLSSON *et al.*, 1983) ou gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (COREY *et al.*, 1997), que estão presentes em todas as células. Essas enzimas são normalmente compartimentalizadas dentro da célula, mas as suas atividades aumentam significativamente no ambiente extracelular como resultado de morte da célula.

Embora tenham sido desenvolvidos muitos métodos de avaliação de citotoxicidade em formatos que permitem analisar células em menor densidade, são poucos os ensaios validados para uso em estudos de varredura de alto desempenho, *high throughput screenings*, que exigem uma análise menos laboriosa, simples, homogênea, mas com boa sensibilidade.

Recentemente NILES *et al.* (2007) descreveram um novo tipo de biomarcador proteolítico de citotoxicidade que incorpora muitos atributos desejáveis em ensaios biológicos. Um ensaio luminescente foi desenvolvido para medir este biomarcador, que compreende uma formulação contendo um substrato conjugado com aminoluciferina, ATP,

MgSO₄ e uma luciferase recombinante termoestável. Este ensaio mede a atividade de proteases intracelulares liberadas no meio extracelular como resultado da perda da integridade da membrana.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito inseticida e modo de ação de proteína inseticidas de origem vegetal (Jaburetox-2Ec e RIPs tipo 1) em *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de gelonina, PAPs, momordina, licnina e saporina S-6 nos lepidópteros *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, quanto ao desenvolvimento no estágio de lagarta, formação de pupas, emergência e mortalidade;
- Verificar nos insetos modelo a ocorrência de danos no DNA, por meio do teste cometa, ocasionado pelas cinco RIPs tipo 1;
- Avaliar parâmetros indicativos de estresse oxidativo nos insetos modelos alimentados com as cinco RIPs tipo 1;
- Avaliar por meio de bioensaio o efeito de jaburetox-2Ec em *S. frugiperda*;
- Avaliar lesão ao DNA, por meio do teste cometa em *S. frugiperda*, induzido por jaburetox-2Ec;
- Avaliar a geração do estresse oxidativo em *S. frugiperda* induzido por jaburetox-2Ec;
- Verificar o efeito citotóxico de jaburetox-2Ec em cultura de células UFL-AG-286, Tn5B e Sf21.

3. RESULTADOS

A seção de resultados dessa tese está dividida em dois capítulos.

O **CAPÍTULO 1** é composto por artigo aceito para publicação no *Journal of Insect Physiology*, com o título “Type 1 ribosome-inactivating proteins – Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)”. Como tal, contém sua própria introdução, metodologia, resultados, discussão e referências bibliográficas.

O **CAPÍTULO 2** apresenta resultados não publicados sobre os efeitos do peptídeo recombinante jaburetox-2Ec em *S. frugiperda*. Como tal, contém a descrição da metodologia, e uma seção de resultados e discussão combinados.

Ao final da tese são apresentadas as conclusões gerais e a bibliografia completa citada no texto.

CAPÍTULO 1

Journal of Insect Physiology

DOI:10.1016/j.jinsphys.2008.10.004

**Type 1 ribosome-inactivating proteins – Entomotoxic, oxidative and genotoxic action
on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(Lepidoptera:Noctuidae)**

Lúcia R. Bertholdo-Vargas^{1,2}, Juliana Nascimento Martins¹, Diana Bordin¹, Mirian Salvador¹, Alois Eduard Schafer¹, Neiva Monteiro de Barros¹, Luigi Barbieri³, Fiorenzo Stirpe³⁺ and Célia R. Carlini^{4*}

¹ Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil.

² Graduate Program in Molecular and Cellular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Department of Experimental Pathology, University of Bologna, Italy.

⁴ Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, <http://www.ufrgs.br/laprotox>

corresponding author: email ccarlini@ufrgs.br

RESUMO

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) isoladas de plantas inibem a síntese protéica por inativação de ribossomos. RIPs do tipo 2 possuem duas cadeias, e algumas são altamente tóxicas e desempenham um papel de defesa da planta. A menor toxicidade das RIPs de cadeia única (tipo 1) reflete a falta de um domínio protéico capaz de ligar, e translocar a toxina através da membrana plasmática. Estudou-se o efeito das RIPs tipo 1, licnina, momordina, gelonina, PAPs e saporina S-6, em larvas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Depois de ingerir uma dose total de 20 ou 40 microgramas de toxinas, o ganho de peso, taxa de sobrevivência, lesões no DNA e estresse oxidativo (atividade de catalase e superóxido dismutase e peroxidação lipídica) dos insetos tratados com as RIPs foram analisados. Momordina foi a menos tóxica nos bioensaios. Larvas de *S. frugiperda* tiveram uma perda de peso mais pronunciada no 4º dia de tratamento e as de *A. gemmatalis*, no 10º dia. RIPs induziram mortalidade de 57,13% em *A. gemmatalis* e de 29,45% em *S. frugiperda*. Insetos tratados com as RIPs mostraram de 2 a 3 vezes mais lesões no DNA, como verificado pelo teste cometa, mas não houve correlação entre marcadores de estresse e dano no DNA. Concluiu-se que as RIPs tipo 1 são entomotóxicas para insetos lepidópteros causando lesões no DNA.



Type 1 ribosome-inactivating proteins—Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Lúcia R. Bertholdo-Vargas^{a,b}, Juliana Nascimento Martins^a, Diana Bordin^a, Mirian Salvador^a, Alois Eduard Schafer^a, Neiva Monteiro de Barros^a, Luigi Barbieri^c, Fiorenzo Stirpe^{c,1}, Célia R. Carlini^{d,*}

^a Institute of Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP: 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil

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

^c Department of Experimental Pathology, University of Bologna, Italy

^d Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2008

Received in revised form 11 October 2008

Accepted 14 October 2008

Keywords:

Comet assay

DNA lesion

Entomotoxicity

Oxidative stress

Ribosome-inactivating proteins type 1

ABSTRACT

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) from plants inhibit protein synthesis by inactivating ribosomes. Some two-chain (type 2) RIPs are highly toxic and may play a role in plant defense. The lower toxicity of single-chain (type 1) RIPs reflects the lack of a protein domain able to bind to, and translocate the toxin across cell membranes. We studied the effect of single-chain RIPs, lychnin, momordin, gelonin, PAP-S and saporin S-6, in larvae of *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda*. After ingesting a total dose of 20 or 40 µg of the toxins, weight gain, survival rate, lesions in DNA and oxidative status (catalase and superoxide dismutase activities and lipidic peroxidation) of RIP-treated insects were assayed. Momordin was the less toxic in the bioassays. *S. frugiperda* had a more pronounced weight loss on the 4th day of treatment and *A. gemmatalis* on the 10th day. RIP-induced mortality reached 57.13% for *A. gemmatalis* and 29.45% for *S. frugiperda*. RIP-treated insects showed a 2–3-fold increase in DNA lesions as assessed by the comet assay, but there were no correlations between stress markers and DNA damage. We conclude that single-chain RIPs are entomotoxic to lepidopteran insects causing extensive DNA lesions.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plants possess many mechanisms for protection against insects, including different types of insecticidal proteins (Carlini and Grossi-de-Sá, 2002). The ribosome-inactivating proteins (RIPs) from plants damage ribosomes and arrest protein synthesis (Stirpe et al., 1988, 1992; Stirpe and Battelli, 2006). They can be divided into three broad groups, type 1 RIPs, consisting of a single polypeptide chain of approximately 30 kDa; type 2 RIPs with two polypeptide chains, with an enzymatically active A subunit similar to type 1 RIPs, linked to a B subunit chain (Olsnes and Pihl, 1973) with lectin properties (Lord et al., 1994) and type 3 RIPs, synthesized as inactive precursors (ProRIPs), that require proteo-

lytic processing events to form the active RIP (Chaudhry et al., 1994; Peumans et al., 2001). Most, but not all, type 2 RIPs are highly toxic (Stirpe, 2004) and act intracellularly (Gill, 1993; Olsnes et al., 1974). The B-(binding) chain ‘recognizes’ the target cell by interacting with a specific carbohydrate or glycoderivative present on the cell surface. The B-chain of the plant toxic proteins known so far bind to D-galactose or N-acetylgalactosamine residues (Barbieri et al., 1993; Olsnes et al., 1999). The A-(active) subunit is the toxic agent acting as an enzyme. The events that precede the toxic effects of these proteins generally follow the steps: (1) binding of the B-subunit to a receptor on the cell surface triggers receptor-mediated internalization of the holotoxin; (2) once inside the endocytic compartment, the two domains of the toxin are separated, rendering the A-chain enzymatically active; (3) the A subunit reaches the cytoplasm and damages rRNA, inactivating the ribosomes (Montecucco, 1998; Olsnes et al., 1999).

The mechanism of the ribosomal damage was discovered by Endo and coworkers in 1987 (Endo et al., 1987a), who found that ricin A chain cleaves the glycosidic bond of a single adenine (A₄₃₂₄ in case of rat liver 28S rRNA), thus producing a depurinated rRNA. This residue is adjacent to the cleavage site of rRNA by α-sarcin, in

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 7606; fax: +55 51 3308 7606.

E-mail addresses: ccarlini@ufrgs.br, celia.carlini@pq.cnpq.br (C.R. Carlini).

URL: <http://www.ufrgs.br/laprotex>

¹ Present address: Via S. Petronio Vecchio 19, I-40125 Bologna, Italy.

Abbreviations: RIP, ribosome-inactivating proteins; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; ROS, reactive oxygen species; PAP-S, pokeweed antiviral protein isoform S.

the tetranucleotide GA₄₃₂₄GA in a highly conserved loop at the top of a stem, the so-called α -sarcin/ricin loop. This loop is involved in the binding of elongation factors and the modified ribosomes are, therefore, unable to support protein synthesis (Endo et al., 1991). These proteins were classified as rRNA N-glycosidases (rRNA N-glycohydrolases, EC 3.2.2.22). RIPs are also able to remove adenine not only from rRNA, but also from DNA and other polynucleotides (Barbieri et al., 1997, 2004; Nicolas et al., 1998, 2000).

RIPs occur in many, but certainly not all, plant species. Conclusive evidence for the absence of RIPs has been obtained only for *Arabidopsis thaliana*, as this plant does not contain a sequence encoding a putative RIP in its whole genome (Peumans et al., 2001). The highly toxic two-chain RIPs are relatively rare and less than a dozen plant source of type 2 RIPs are known. The vast majority of RIPs purified so far are single-chain proteins (Girbés et al., 2004). The much lower toxicity of single-chain RIPs has been attributed to the lack of a protein chain or domain able to translocate the toxin across membranes into the cytoplasm (Sandvig and Van Deurs, 2005).

Hasegawa et al. (2000) reported that the isolated lectin-like B chain of ricin, although devoid of protein synthesis-inhibiting activity, induced DNA fragmentation and apoptosis in U937 cells, possibly by linking molecules on the cell surface which activate programmed cell death. The type 2 RIP viscumin induced apoptosis by decreasing the expression of the anti-apoptotic Mcl-1 and activating the caspase-dependent pathway, accompanied by significant increase in reactive oxygen species (ROS) levels (Kim et al., 2004). Type 1 RIPs or isolated A-chain from type 2 toxins were also shown to cause apoptosis and oxidative stress as reviewed in Battelli (2004) and more recently in Narayanan et al. (2005).

Ricin A chain-induced apoptosis appeared to be independent of the inhibition of protein synthesis and to be linked to a structural motif in the RIP molecule which is far apart from the catalytic site (Baluna et al., 2000). The studies by Bagga et al. (2003) with mutants of saporin S-6 indicated that its DNA fragmentation property was not related to the N-glycosidase activity. Type 1 RIPs saporin (Bergamaschi et al., 1996), momordin (Kim et al., 2002) and trichosanthin induced apoptosis. For the latter RIP increased production of ROS (Zhang et al., 2001b) and apoptosis via a nitric oxide (NO)-mediated pathway (Li et al., 2005) were reported.

While ribosomes of protozoans and fungi seem to be highly sensitive to RIPs, plant ribosomes are generally less sensitive than mammalian ones and sometimes insensitive to RIPs (Girbés et al., 2004). Cinnamomin, a type 2 RIP isolated from seeds of the camphora tree (*Cinnamomum camphora*), did not inactivate ribosomes from the source plant (Zhang et al., 2001a). Several lines of evidence support the idea that RIPs play a role in plant defense (Nielsen and Boston, 2001; Peumans et al., 2001). Ricin was atoxic to a variety of insects, although it was able to inhibit protein synthesis by insect ribosomes in cell-free preparations (Gatehouse et al., 1990; Maruniak et al., 1990; Turrel and Middlebrook, 1988). These results suggest that insects surviving a diet containing ricin probably inactivate the protein in their digestive tract and/or there is no binding of the toxin to their digestive tissues. On the other hand, ricin and saporin S-6 incorporated into the diets of bruchid beetles produced entomotoxic effects at low concentrations (Gatehouse et al., 1990) and other type 1 RIPs had insecticidal activity (Dowd et al., 1998, 2003). The type 2 RIP from the winter aconite (*Eranthis hyemalis*) and cinnamomin were also shown to be toxic to insects of different orders (Kumar et al., 1993; Zhou et al., 2000). Consistent with a more general defensive role of ribosome-inactivating proteins in plants including also the less toxic type 1 toxins, isoforms of the antiviral proteins (PAP) of the pokeweed *Phytolacca americana*

(Lodge et al., 1993; Stevens et al., 1981) and the RIP-1 from iris bulbs (Desmyter et al., 2003) were shown to inhibit the transmission of tobacco mosaic virus in plants, while other type 1 proteins have fungicidal activity (Ng, 2004; Vivanco et al., 1999).

Here we studied the entomotoxic properties of the type 1 RIPs saporin S-6, PAP-S, gelonin, lychnin and momordin, in two different lepidopteran insects. The soybean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) were chosen because of the serious loss they cause to economically important crops. Besides weight gain and survival rate, we also analyzed the oxidative status and DNA damage in the tissues of RIP-treated caterpillars.

2. Materials and methods

2.1. Proteins

The following RIPs type 1 were studied: Saporin S-6, PAP-S, Gelonin, Lychnin and Momordin. The proteins used in this study were purified from the source plants according to published protocols (Barbieri et al., 1987). The freeze-dried proteins were solubilized in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.7, to give a 1.0 mg dry powder per milliliter and kept at -20°C until the assays. Protein concentration of the solutions was estimated by their absorbance at 280 nm, considering a A_{280} per mg protein (dry weight) ratio of 0.77 for PAP-S and saporin S-6; 0.73 for lychnin; 0.68 for gelonin, and 0.78 for momordin.

2.2. Insects

The insects used were from colonies kept at the Laboratory of Pest Control, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Brazil. The insects were reared on a bean-based diet (Greene et al., 1976), maintained at $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$; $50 \pm 10\%$ relative humidity, and a 14:10 light:dark photoperiod.

2.3. Bioassays

Three groups of six insects (third instars) *A. gemmatilis* or *S. frugiperda* were used for these studies. The larvae were transferred to individual cups and, at days 0 and 2, the insects were fed on *Phaseolus vulgaris* foliar discs (1.0 cm diameter) with an air-dried 20 μl drop of solution containing 10 or 20 μg of either gelonin, momordin, lychnin, PAP-S or saporin S-6 (Mulinari et al., 2007). Control insects fed on foliar discs containing air-dried 20 μl drops of phosphate buffer. Leaf discs were entirely consumed by the insect within 2 days. At the 4th day the insects were transferred to their regular diet. All the insect groups were evaluated every 2 days for weight gain and rates of pupation, mortality (corrected by Abbott, 1925) and emergency of adults.

2.4. Comet assay

Alkaline single-cell gel test (comet assay) was performed according to Singh et al. (1988). Briefly, after being fed foliar discs containing 20 μg of RIPs at days 0 and 2 (total 40 μg of protein), the insects were weighed on the 4th day and then macerated manually in 1.5 mL Eppendorf tubes with a glass rod into ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) to give a 50 mg body weight/mL homogenate (about 2 insects/mL). Control insects, fed only on *Phaseolus* leaves containing an equivalent volume of air-dried phosphate buffer, were submitted to the same procedure. An aliquot (20 μL) of the whole cell suspension was mixed with 80 μL of low-melting agarose and immediately sandwiched

between an agarose-coated slide and a coverslip. After complete gelling of the agarose, the slides were immersed in a lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10, 10% DMSO with 1% Triton X-100) at 4 °C for 1 h. After the lysis, the slides were placed in alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) for 20 min to allow DNA unwinding, and then submitted to electrophoresis for 30 min at 300 mA. After the run, the agarose-fixed cells were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5) and stained with silver nitrate. Slides were viewed at 100× magnification with an optical microscopy. The integrity of cell nuclei was assessed visually and a damage class varying from 0 (no damage) to 4 (maximal “comet”) was attributed to 100 randomly selected cells in two microscope slides for each replicate. The damage index of a sample was calculated as the sum of the number of cells multiplied by their respective damage class, ranging from 0 (completely undamaged: 100 cells × 0) to 400 (maximum damaged: 100 cells × 4) (Collins et al., 1993; Guecheva et al., 2001). Treatments for each RIP were carried out in triplicates (i.e., a total of 600 cells were analyzed for each treatment).

2.5. Cellular extracts for superoxide dismutase and catalase activities assays

Third instar *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* fed at days 0 and 2 on foliar discs containing 0 or 20 µg of RIPs. On the 4th day, three insects of each treatment were homogenized in 1 mL ice-cold 50 mM potassium phosphate pH 7.2 containing 0.5 mM EDTA and 10 µmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (protease inhibitor) (Hermes-Lima and Storey, 1995). The homogenate was centrifuged at 1600 × g, 30 min at 4 °C, and the supernatants were used for the assays of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities.

2.6. Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase activity was determined by measuring the inhibition of adrenochrome formation at 480 nm (Bannister and Calabrese, 1987). Samples were diluted in 50 mM glycine (pH 10.2) to a final volume of 2 mL and then 34 µL of 60 mM adrenaline solution was added. The reaction was conducted at 25 °C for 3 min. The enzyme activity was expressed as SOD units per mg of protein. One SOD unit was defined as the amount of enzyme that inhibits by 50% the rate of adrenochrome formation.

2.7. Catalase activity

The method used (Aebi, 1984) was based on the determination of the decomposition rate of hydrogen peroxide measured at 240 nm. Aliquots (40 µL) of samples were mixed with 1890 µL of 50 mM potassium phosphate, 0.5 mM EDTA, pH 7.2, and the reaction was started by adding 70 µL hydrogen peroxide (0.3 M) in a final volume of 2 mL. The reaction was conducted at a 25 °C for 1 min. The enzyme activity was expressed as CAT units per mg of protein. One CAT unit was defined as the amount of enzyme that decomposes 1 µmol of H₂O₂ per min at pH 7.2 and 25 °C.

2.8. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

TBARS were determined as described by Hermes-Lima and Storey (1995). Third instar *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* fed at days 0 and 2 on foliar discs containing 0 or 20 µg of RIPs. On the 4th day, larvae of each treatment were homogenized (three insects/1 mL) in ice-cold 50 mM phosphate potassium containing 0.5 mM EDTA, pH 7.2. Aliquots (100 µL) of the homogenates were mixed with 100 µL of the color reagent (thiobarbituric acid 1%, 50 mM

NaOH, 0.1 mM butylated hydroxytoluene) and 50 µL 7% (v/v) phosphoric acid. The mixture was placed in a boiling water bath for 15 min. After cooling, 1.5 mL of n-butanol was added to the mixture followed by centrifugation for 5 min at 1600 × g. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. For the blank, the thiobarbituric acid was substituted by 3 mM HCl. The values of TBARS were expressed in nmol/g of the protein, using the malondialdehyde extinction coefficient of 156 for a 1 mM solution (Hermes-Lima and Storey, 1995).

2.9. Determination of protein content

The determination of the total proteins in insect cellular extracts was accomplished by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

2.10. Statistical analysis

Statistical analysis were made using SPSS 10.0 package; normality tests were made to select procedures for parametric tests (ANOVA, Pearson) or non-parametric tests (Kruskal–Wallis *H*, Spearman, Mann–Whitney *U*).

3. Results

Third instars *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* received a diet of *P. vulgaris* foliar discs containing 10 and 20 µg of the different RIPs on days 0 and 2. After ingestion of a total dose of 20 or 40 µg of RIPs, respectively, the regular diet was offered until the insects reached the pupation stage. Fig. 1 shows average weight gain of *A. gemmatalis* on the 4th (Fig. 1A) and 10th day (Fig. 1B) and for *S. frugiperda* on the 4th (Fig. 1C) and 10th day (Fig. 1D) after the RIPs treatments.

For *A. gemmatalis*, only the insects fed with 40 µg of saporin S-6 had a reduced weight gain on the 4th day. For *S. frugiperda*, decreased weight gain on the 4th day was seen for insects fed 40 µg lychnin, gelonin, PAP-S or saporin S-6. In contrast, *S. frugiperda* fed 20 µg of lychnin, PAP-S or saporin S-6 showed on the 4th day an apparent increase in body weight, the insects presenting a “swollen” state. Although not statistically significant, this same “swollen state” was also seen on the 4th day for *A. gemmatalis* fed 40 µg of gelonin or PAP-S. On the 10th day, 6 days after their last RIP-containing meal, *A. gemmatalis* fed with 40 µg of lychnin, momordin, gelonin or PAP-S still showed lower body weight, while those fed 20 µg seemed recovered. *S. frugiperda* fed with lychnin (20 µg), saporin S-6 (20 µg), gelonin (40 µg) or PAP-S (40 µg) were still underweight on the 10th day, 6 days after their last RIP-containing meal. No correlation (Spearman test) was found between average weight gain and the amount of ingested protein either on the 4th or 10th day. The “swollen” state (suggestive of an impaired electrolyte balance) of RIP-treated insects probably contributed to the fact that no clear relationship of dose-diminished weight gain effect was seen for the two tested doses.

In addition to weight changes RIP-treated insects showed malformation of pupas (data not shown) and increased mortality rate, either in the larval stage or as pupa (no emergency of the adults). Among RIP-treated *A. gemmatalis* mortality (at the larval stage or as pupa) reached 57.1% with PAP-S and 42.8% with lychnin. Mortality in *S. frugiperda* caused by ingesting any of the RIPs reached a maximum of 29.4%. There was no clear dose-related lethal effect for the two tested doses (20 and 40 µg of RIPs).

Aiming to elucidate the deterrent effect of type 1 RIPs in the insects we decided to investigate the level of DNA damage using the comet assay. For that, we analyzed tissues of third instars *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* fed with 40 µg of RIPs, 2 days after

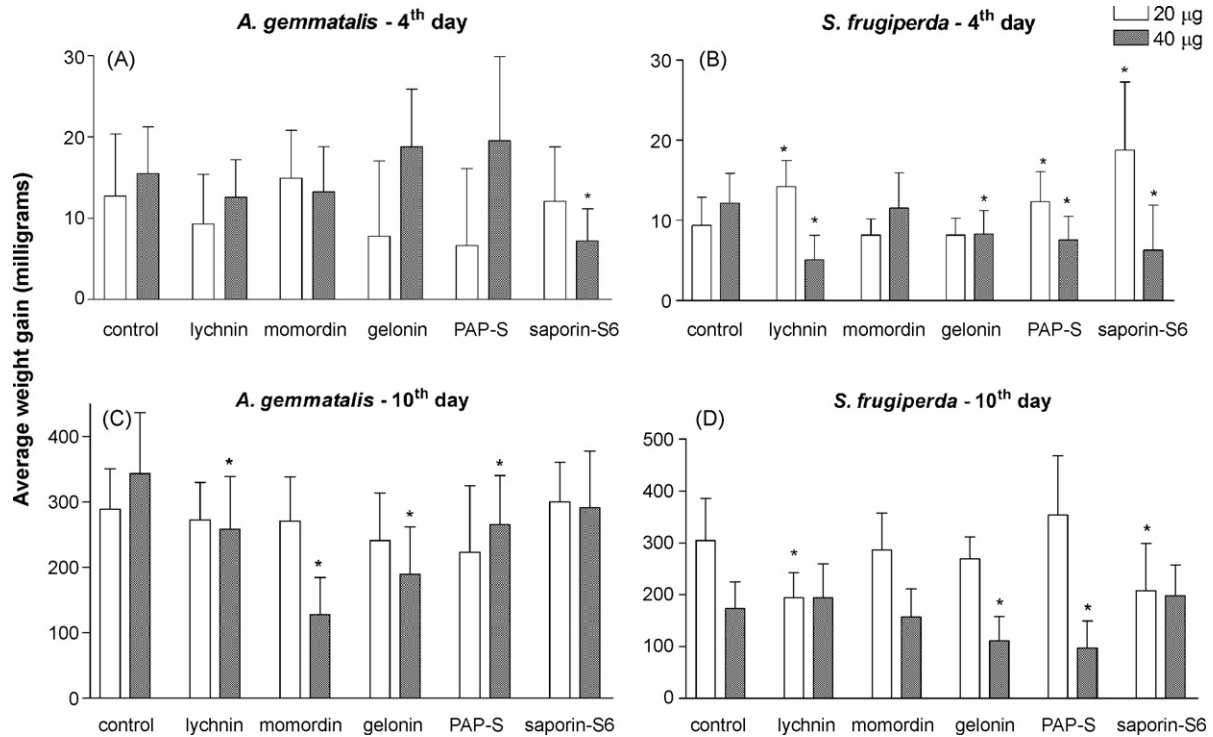


Fig. 1. Average weight gain (mg) of RIP-treated insects. Three groups of six insects (third instars) in individual cups were fed *Phaseolus vulgaris* leaves containing 20 µg of RIPs on days 0 and 2. Control insects fed on leaves containing air-dried buffer, on days 0 and 2. Panels A and B: *A. gemmatalis* average weight gain (relative to day 0) on 4th and 10th day, respectively; Panels C and D: *S. frugiperda* average weight gain on the 4th and 10th day, respectively. The bars represent mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$ vs. control—non-parametric test (Kruskal–Wallis) followed by Mann–Whitney test).

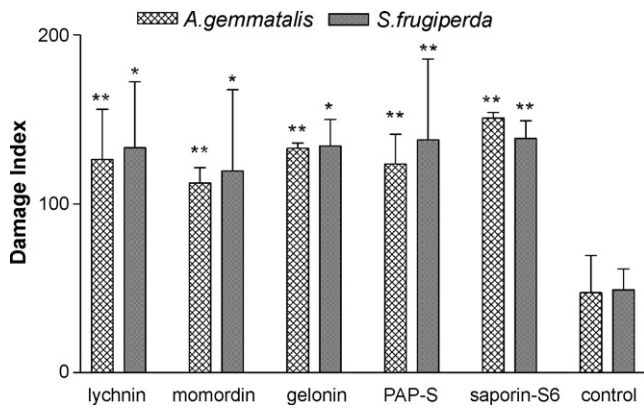


Fig. 2. Damage index in the cells of *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* fed a total dose of 40 µg of RIPs. Control insects fed on *P. vulgaris* leaves containing air-dried buffer. The bars represents mean \pm S.D. of three independent experiments, asterisks indicate level of significance in ANOVA, Tukey pos-test (* $p < 0.05$ and (** $p < 0.01$ vs. control).

their last meal containing RIP. Fig. 2 shows that for the RIP-treated insects an increased number of cells with signs of DNA damage, with values of damage index 2–3-fold higher than those of control groups.

As DNA damage can be consequent to oxidative stress, we investigated next the activity of the antioxidant enzymes CAT and SOD and the levels of lipid peroxidation (TBARS) in cellular extracts of *S. frugiperda* and *A. gemmatalis* fed with 40 µg of RIPs, 2 days after the last meal containing RIP (Table 1).

For *A. gemmatalis*, none of the RIPS produced significant alterations in CAT or SOD activities although a tendency to increased values could be seen. TBARS levels were reduced 30–40% in insects fed on gelonin, PAP-S and lychnin when compared to controls. Momordin treatment showed a tendency to lower TBARS levels, but there was no statistical significance as compared to controls. In contrast, TBARS levels were not altered in the RIP-treated *S. frugiperda*, and SOD activity was drastically reduced in all experimental groups to about 20% of the level found for control insects. CAT activity was increased in PAP-S treatment and

Table 1

Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities and TBARS levels in tissues of *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* fed 40 µg of the RIPs.

	TBARS ^a (nmol/g protein)		SOD ^a (USod/mg protein)		CAT ^a (UCat/mg protein)	
	<i>A.gemmatalis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>A.gemmatalis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>A.gemmatalis</i>	<i>S. frugiperda</i>
Control	22.46 \pm 4.91 ^a	17.71 \pm 0.9 ^a	3.40 \pm 0.74 ^a	8.32 \pm 1.49 ^a	4.60 \pm 0.54 ^a	3.53 \pm 0.65 ^a
Momordin	16.34 \pm 3.67 ^a	17.34 \pm 3.58 ^a	4.27 \pm 2.86 ^a	1.10 \pm 0.52 ^b	5.65 \pm 1.26 ^a	3.32 \pm 1.41 ^a
Gelonin	11.89 \pm 1.32 ^b	21.13 \pm 6.92 ^a	5.71 \pm 4.6 ^a	1.01 \pm 0.49 ^b	4.90 \pm 1.48 ^a	2.39 \pm 0.69 ^a
PAP-S	13.33 \pm 1.43 ^b	19.98 \pm 1.11 ^a	5.42 \pm 2.32 ^a	1.91 \pm 0.3 ^b	4.77 \pm 2.17 ^a	5.26 \pm 0.51 ^a
Lychnin	13.68 \pm 0.98 ^b	19.12 \pm 1.64 ^a	3.78 \pm 1.97 ^a	2.44 \pm 0.43 ^b	6.66 \pm 0.44 ^a	4.30 \pm 1.72 ^a

^a Results are means \pm S.D. of four experiments. Values in the same column followed by different letters are statistically different by ($p < 0.05$ vs. control—non-parametric test (Kruskal–Wallis) followed by Mann–Whitney test).

Table 2
Characteristics of ribosome-inactivating proteins used in these work^a.

Ribosome-inactivating protein	Level in tissue (seeds) (mg/100 g)	Inhibition of protein synthesis		Toxicity to mice LD ₅₀ (mg/kg)
		Cell-free IC ₅₀ (nM)	HeLa cells IC ₅₀ (nM)	
Gelonin	250–300	0.40	>3300	40
Lychnin	160	0.17	>3300	9.3
Momordin	150–180	0.06	>3300	7.4
PAP-S	100–180	0.04	3400	2.6
Saporin S-6	270–400	0.037	610–2340	4.0

^a From Barbieri et al., 1993.

decreased in gelonin treatment, when compared to the controls. There was no correlation (Spearman) between TBARS levels and DNA damage index either for *A. gemmatalis* ($R^2 = 0.354$) or *S. frugiperda* ($R^2 = 0.317$) treated with the type 1 RIPS.

4. Discussion

The ingestion of low doses of type 1 RIPS affected the development and survival rate of *A. gemmatalis* and *S. frugiperda*. Although the five tested RIPS show very similar characteristics (Table 2), the two insects presented distinct sensitivity to these proteins, apparently not correlated to the ability of RIPS to inhibit protein synthesis. For *A. gemmatalis*, the effects of RIPS were more pronounced on the 10th day while for *S. frugiperda*, reduced weight gain was observed on the 4th day and persisted for 6 days after the insects had their last RIP-containing meal. We chose to test doses of RIPS in levels attainable by heterologous expression of proteins in plants. However, there was no clear correlation between weight gain or lethal effect and the amount of ingested RIPS. Probably a more clear dose–effect relationship would require a larger difference (i.e., one order of magnitude) of the tested doses.

In a preliminary trial with the same doses of RIPS added to small pieces of agar-based artificial diets, the insects showed much less effects (data not shown), suggesting that components in the diet may interfere on the availability of, or compete with, RIPS for absorption sites. It is well known that the high amount of nutrients in artificial diets may obscure deterrent effects seen when using natural nutrient levels (Smith et al., 1994). Dowd et al. (2003) reported the entomotoxicity in a leaf assay of recombinant tobacco expressing maize RIP to the corn pests *Lasioderma serricorne* and *Helicoverpa zea* and noted that toxicity was lower when the insect fed on diet-incorporated maize RIP. Gatehouse et al. (1990) showed that ricin and saporin S-6 were largely ineffective against the lepidopterans *S. littoralis* and *Heliothis virescens* but were lethal the bruchids *Callosobruchus maculatus* and *Anthrenus grandis* (Coleoptera) when the RIPS were added to artificial diets at levels of 0.001–0.0001% dry weight. Thus, the form of administration of RIPS to the insects may be an important source of contradictory results regarding the toxicity of these proteins to insects, at least in the case of lepidopterans.

Since type 1 RIPS lack the B lectin-like chain, the toxicity to insects observed in our study raises the question of how these toxins act in vivo. They may be able to bind to specific sites on the cell surfaces, either exerting their toxic action at the membrane level or after uptake and internalization of the toxic polypeptide chain. In mammals some RIPS act promoting gut derangement (Gayoso et al., 2005). Similarly, reduction of nutrients uptake derived from specific actions of RIPS on the enterocytes in the insect gut could cause the observed weight loss. Specific tissue binding and internalization of a whole urease (540 kDa) protein taken up from the host plant by the lepidopteran silk worm *Bombyx mori* has been reported (Kurahashi et al., 2005; Sugimura et al., 2001). Alternatively, RIPS can be carried into cells by linkage to an

appropriate carrier capable of binding to cells (Stirpe, 2004), the first demonstration of which was obtained with gelonin conjugated with concanavalin A, which resulted more toxic to cells than the free RIP (Stirpe et al., 1980).

Aiming to have an insight on the mechanism of action of RIPS in the insects, our first approach was to investigate the fate of the proteins in the intoxicated insects by immunohistochemistry. For that, we raised antibodies in rabbits against saporin S-6 or PAP-S. However, even at a dilution of 1:60,000, both antibodies reacted with the insects' bean-based artificial diet (Greene et al., 1976) and extracts of bean leaves, and also with different tissues (extracts of heart, midgut, cuticle, feces or hemolymph) of the control *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* (results not shown). Thus we decided to investigate if the insects were subjected to an oxidative stress and if there was any evidence of damage to their DNA, since these effects of both types of RIPS have been reported for a number of models (Brigotti et al., 2002; Kumar et al., 2003, 2007; Narayanan et al., 2004; Barbieri et al., 2004).

The single-cell gel electrophoresis or comet assay is one of the most popular techniques for genotoxicity assessment. Moreover, it permits both qualitative and quantitative assessment of DNA damage at very low levels in any eukaryotic cell (Fairbairn et al., 1995; Hartmann et al., 2003). All the five RIPS studied were able to induce DNA damage, both in *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* (Fig. 2). For almost two decades it has been largely assumed that RIPS act only on 28S rRNA within ribosome (Endo and Tsurugi, 1987b; Endo et al., 1988). However, all plant RIPS and also Shiga toxin have been shown to be able to remove, in vitro, adenine residues from DNA (Barbieri et al., 1997) leading to the formation of apurinic sites. Ricin and Shiga toxin have also be found to induce DNA lesions in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Brigotti et al., 2002). The nature of nuclear DNA injury observed in HUVEC is consistent with the enzymatic activity (adenine release) of the toxins on nucleic acids in vitro, involving mainly the formation of apurinic sites. Structural studies of MAP30, a type 1 RIP from seeds of the bitter melon (*Momordica charantia*), have been used to support the idea that RIPS are DNA glycosylase/AP lyases (Wang et al., 1999).

Although many reports (for review see Narayanan et al., 2005) are available on cell damage induced by RIPS, the mechanism involved is not completely known. Ricin has been shown to induce oxidative stress in mice (Kumar et al., 2003, 2007; Muldoon et al., 1992) and trichosanthin, a type 1 RIP, is able to generate high levels of ROS in human chorio-carcinoma cells (Zhang et al., 2001b). On the other side, momordin appears to contribute to alleviate the adverse effects of CCl₄ treatment by enhancing the hepatic antioxidant defense system of rats (Kim et al., 2005).

Herbivorous insects are exposed to ROS derived from prooxidant-rich foods generated during normal oxidative processes in cells and extracellular fluids. To protect themselves from oxidative stress and to modulate physiological effects of ROS, these insects have developed an intricately regulated antioxidant defense system. Among the antioxidant enzymes, SOD and CAT play

essential roles also in insects, including lepidopterans (Barbehenn et al., 2001; Krishnan and Kodrik, 2006). SOD metabolizes the superoxide anion into hydrogen peroxide and CAT catalyses the decomposition of H₂O₂ in water and O₂. An imbalance between the generation/exposition to ROS and the antioxidant system in favor to the former leads to lipid peroxidation, which can be measured by as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), one of the most frequently used test for measuring the peroxidation of fatty acids and membranes (Halliwell and Gutteridge, 1999). Antioxidant enzymes are the first line of defense against prooxidant conditions, but non-enzymatic antioxidants, such as α -tocopherol and ascorbic acid, could also contribute with the intricate antioxidant system of insects.

A. gemmatalis and *S. frugiperda* showed different SOD and CAT modulation after RIPs treatments. *A. gemmatalis* did not show statistically significant alterations in SOD and CAT activities, while *S. frugiperda* presented a significant decrease in SOD activity after all RIPs treatments (Table 1). Decreased SOD activity was also reported in liver and kidney of mice treated with ricin (Kumar et al., 2003). Although other studies are necessary, it is possible that RIPs treatments produce the radical superoxide in *S. frugiperda*, as described for ricin-treated mice (Muldoon et al., 1992). Superoxide is the substrate for SOD enzyme, resulting in hydrogen peroxide production. In insects, this non-radical specie can be scavenged both by catalase (under high hydrogen peroxide concentrations) or by ascorbate peroxidase (under low hydrogen peroxide concentrations) (Felton and Duffey, 1991; Mathews et al., 1997). CAT activity did not follow the same profile as SOD (Table 1), and although ascorbate peroxidase (APOX) was not measured in this study, one possibility to explore is a collaboration between CAT and APOX, in order to scavenge hydrogen peroxide. Until now, APOX was not identified in *S. frugiperda* or in *A. gemmatalis*, but it was already found in fluids of other lepidopteran species (Felton and Duffey, 1991, 1992; Krishnan and Kodrik, 2006; Mathews et al., 1997; Summers and Felton, 1993).

Interestingly, gelonin, PAP-S and lychnin treatments were able to diminished lipid oxidative damages in *A. gemmatalis* (but not in *S. frugiperda*). The decrease of TBARS to levels below the controls can be due to a compensatory effect toward the stress conditions, as already reported in fishes treated with herbicides (Crestani et al., 2007; Gluszczak et al., 2007). Momordin treatment, which was reported to alleviate the adverse effects of CCl₄ (Kim et al., 2005), showed a tendency to lower TBARS level in *A. gemmatalis* (Table 1).

Our data show a species-specific response to RIPs according to the insect tested, rather than differences among RIPs, when considering oxidative stress. The apparent lack of correlation and paradoxical variation of stress markers observed for *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* treated with RIPs may be related to the difference in alimentary habits of these insects. While *A. gemmatalis* feeds on a limited number of host plants in addition to soybean *Glycine max* (Gregory, 1986), the polyphagous behavior of *S. frugiperda* probably endowed this insect with the ability to evade the various classes of defensive compounds of different host plants. In our experiments the analysis were done 2 days after the last RIP meal, thus it is possible that the insects were already partially recovered from a more serious oxidative injury. A more detailed information on the oxidative status of the RIPs-treated insects would require measuring the antioxidant enzymes and lipid peroxidation at other time intervals and different dosage schemes, which is presently beyond the scope of this work.

The major challenge in the study of RIPs remains to understand the role of these proteins in the source plant. There is a common sense in the literature that RIPs may play an important role such as defense, which would explain their conservation through out evolution. In agreement with this view, in this paper we

demonstrated the entomotoxic effect of five RIPs fed to two different lepidopteran pests. Although the exact mechanism of the entomotoxic action of RIPs is presently not known, our results clearly indicated high levels of DNA damage in both insects, consistent with the enzymatic activity of these proteins. The doses of RIPs tested in our study are within the levels attainable by heterologous expression in plants (Gould, 2004). Using this approach, Dowd et al. (2003, 2006), successfully demonstrated the enhanced resistance of tobacco plants expressing a maize seed RIP, alone or together with an anionic peroxidase, against *Helicoverpa zea* (Boddie), and less efficiently against the cigarette beetle *Lasioderma serricorne* (F.) and the tobacco hornworm *Manduca sexta* (L.). In conclusion, our data support a possible utilization of type 1 RIPs to transform plants for enhanced resistance against lepidopteran pests.

Acknowledgements

We express our thanks to the referees for the extensive review and contributions made to improve our manuscript. This project was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul), by the Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica, Rome (PRIN 2005) and by the University of Bologna funds for selected research topics.

References

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265–266.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105, 121–126.
- Bagga, S., Seth, D., Batra, J.K., 2003. The cytotoxic activity of ribosome-inactivating protein saporin-6 is attributed to its rRNA N-glycosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities. *Journal of Biological Chemistry* 278, 4813–4820.
- Baluna, R., Coleman, E., Jones, C., Ghetie, V., Vitetta, E.S., 2000. The effect of a monoclonal antibody coupled to ricin A chain-derived peptides on endothelial cells in vitro: insights into toxin-mediated vascular damage. *Experimental Cell Research* 258, 417–424.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochemical Analysis* 32, 279–312.
- Barbehenn, R.V., Bumgarner, S.L., Roosen, E.F., Martin, M.M., 2001. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *Journal of Insect Physiology* 47, 349–357.
- Barbieri, L., Battelli, M.G., Stirpe, F., 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica Biophysica Acta* 1154, 237–282.
- Barbieri, L., Stoppa, C., Bolognesi, A., 1987. Large scale chromatographic purification of ribosome-in-activating proteins. *Journal of Chromatography A* 408, 235–243.
- Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora, E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe, F., 1997. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Research* 25, 518–522.
- Barbieri, L., Ciani, M., Girbes, T., Liu, W.Y., Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Stirpe, F., 2004. Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Letters* 563, 219–222.
- Battelli, M.G., 2004. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini Reviews in Medical Chemistry* 4, 513–521.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Bergamaschi, G., Perfetti, V., Toton, L., Novella, A., Lucotti, C., Danova, M., Glennie, M.J., Merlini, G., Cazzola, M., 1996. Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis. *British Journal of Haematology* 93, 789–794.
- Brigotti, M., Alfieri, R., Sestili, P., Bonelli, M., Petronini, P.G., Guidarelli, A., Barbieri, L., Stirpe, F., Sperti, S., 2002. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB Journal* 16, 365–372.
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicol* 40, 1515–1539.
- Chaudhry, B., Mulleruri, F., Cameronmills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K., Mundy, J., 1994. The barley 60-kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant Journal* 6, 815–824.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733–1735.

- Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., dos Santos, M.D., Spanevello, R., Silveira, A., Goncalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67, 2305–2311.
- Desmyter, S., Vandenbussche, F., Hao, Q., Proost, P., Peumans, W.J., Van Damme, E.J., 2003. Type-1 ribosome-inactivating protein from iris bulbs: a useful agronomic tool to engineer virus resistance? *Plant Molecular Biology* 51, 567–576.
- Dowd, P.F., Metha, A.D., Boston, R.S., 1998. Relative toxicity of the maize endoperoxide ribosome-inactivating protein to insects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46, 3775–3779.
- Dowd, P.F., Zuo, W.N., Gillikin, J.W., Johnson, E.T., Boston, R.S., 2003. Enhanced resistance to *Helicoverpa zea* in tobacco expressing an activated form of maize ribosome-inactivating protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 3568–3574.
- Dowd, P.F., Holmes, R.A., Pinkerton, T.S., Johnson, E.T., Lagrimini, L.M., Boston, R.S., 2006. Relative activity of a tobacco hybrid expressing high levels of a tobacco anionic peroxidase and maize ribosome-inactivating protein against *Helicoverpa zea* and *Lasioderma serricornis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2629–2634.
- Endo, Y., Gluck, A., Wool, I.G., 1991. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 266, 193–207.
- Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M., Tsurugi, K., 1987a. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *Journal of Biological Chemistry* 262, 5908–5912.
- Endo, Y., Tsurugi, K., 1987b. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* 262, 8128–8130.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Lambert, J.M., 1988. The site of action of six different ribosome-inactivating proteins from plants on eukaryotic ribosomes: the RNA N-glycosidase activity of the proteins. *Biochemical Biophysical Research Communication* 150, 1032–1036.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339, 37–59.
- Felton, G.W., Duffey, S.S., 1991. Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 17, 1715–1732.
- Felton, G.W., Duffey, S.S., 1992. Ascorbate oxidation reduction in *Helicoverpa zea* as a scavenging system against dietary oxidants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 19, 27–37.
- Gatehouse, A.M.R., Barbieri, L., Stirpe, F., Croy, R.R.D., 1990. Effects of ribosome inactivating proteins on insect development—differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 54, 43–51.
- Gayoso, M.J., Munoz, R., Arias, Y., Villar, R., Rojo, M.A., Jimenez, P., Ferreras, J.M., Aranguiz, I., Girbes, T., 2005. Specific dose-dependent damage of *Lieberkuhn* crypts promoted by large doses of type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b intravenous injection to mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 138–146.
- Gill, D.M., 1993. Seven toxic peptides that cross membrane. In: Jeljaszewicz, J., Wadstrom, T. (Eds.), *Bacterial Toxins and Cell Membrane*. Academic Press, New York, pp. 291–332.
- Girbés, T., Ferreras, J.M., Arias, F.J., Stirpe, F., 2004. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini Reviews in Medical Chemistry* 4, 461–476.
- Glusczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simoes, R.R., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology C. Toxicology and Pharmacology* 146, 519–524.
- Gould, F., 2004. Potential and problems with high-dose strategies for pest control in engineered crops. *Biocontrol Science Technology* 4, 451–461.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., Dickerson, W.A., 1976. Velvetbeans caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69, 487–488.
- Gregory, B.M., Jr., 1986. A model of adult and egg populations of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean. Thesis. University of Florida, Gainesville.
- Guecheva, T., Henriques, J.A., Erdtmann, B., 2001. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutation Research* 497, 19–27.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Eds.), 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, New York.
- Hartmann, A., Plappert, U., Poetter, F., Suter, W., 2003. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research* 536, 27–38.
- Hasegawa, N., Kimura, Y., Oda, T., Komatsu, N., Muramatsu, T., 2000. Isolated ricin B-chain-mediated apoptosis in U937 cells. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 64, 1422–1429.
- Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *American Journal of Physiology* 268, R1386–R1393.
- Kim, J.H., Ju, E.M., Lee, D.K., Hwang, H.J., 2002. Induction of apoptosis by momordin I in promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Anticancer Research* 22, 1885–1889.
- Kim, N.Y., Lee, M.K., Park, M.J., Kim, S.J., Park, H.J., Choi, J.W., Kim, S.H., Cho, S.Y., Lee, J.S., 2005. Momordin Ic and oleanolic acid from *Kochia fructus* reduce carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Medicine and Food* 8, 177–183.
- Kim, W.H., Park, W.B., Gao, B., Jung, M.H., 2004. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Molecular Pharmacology* 66, 1383–1396.
- Krishnan, N., Kodrik, D., 2006. Antioxidant enzymes in Spodoptera littoralis (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *Journal of Insect Physiology* 52, 11–20.
- Kumar, M.A., Timm, D.E., Neet, K.E., Owen, W.G., Peumans, W.J., Rao, A.G., 1993. Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 268, 25176–25183.
- Kumar, O., Lakshmana Rao, P.V., Pradhan, S., Jayaraj, R., Bhaskar, A.S., Nashikkar, A.B., Vijayaraghavan, R., 2007. Dose dependent effect of ricin on DNA damage and antioxidant enzymes in mice. *Cell Molecular Biology* 53, 92–102.
- Kumar, O., Sugendran, K., Vijayaraghavan, R., 2003. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. *Toxicol* 41, 333–338.
- Kurahashi, H., Atiwetin, P., Nagaoka, S., 2005. Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 51, 1055–1061.
- Li, F., Mei, Y.H., Wang, Y., Chen, C.H., Tu, J.L., Xiao, B.G., Xu, L.Y., 2005. Trichosanthin inhibits antigen-specific T cell expansion through nitric oxide-mediated apoptosis pathway. *Cellular Immunology* 234, 23–30.
- Lodge, J.K., Kaniewski, W.K., Tumer, N.E., 1993. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 90, 7089–7093.
- Lord, J.M., Roberts, L.M., Robertus, J.D., 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB Journal* 8, 201–208.
- Maruniak, J.E., Fiesler, S.E., McGuire, P.M., 1990. Susceptibility of insect cells and ribosomes to ricin. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 96, 543–548.
- Mathews, M.C., Summers, C.B., Felton, G.W., 1997. Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 4, 57–68.
- Montecucco, C., 1998. Protein toxins and membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology* 10, 530–536.
- Muldoon, D.F., Hassoun, E.A., Stohs, S.J., 1992. Ricin-induced hepatic lipid peroxidation, glutathione depletion, and DNA single-strand breaks in mice. *Toxicol* 30, 977–984.
- Mulinari, F., Staniscuasi, F., Bertholdo-Vargas, L.R., Postal, M., Oliveira-Neto, O.B., Rigden, D.J., Grossi-de-Sa, 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.
- Narayanan, S., Surendranath, K., Bora, N., Surolia, A., Karande, A.A., 2005. Ribosome inactivating protein and apoptosis. *FEBS Letters* 579, 1324–1331.
- Narayanan, S., Surolia, A., Karande, A.A., 2004. Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. *Biochemical Journal* 377, 233–240.
- Ng, T.B., 2004. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides* 25, 1215–1222.
- Nicolas, E., Beggs, J.M., Haltiwanger, B.M., Taraschi, T.F., 1998. A new class of DNA glycosylase/apurinic/aprimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry* 273, 17216–17220.
- Nicolas, E., Beggs, J.M., Taraschi, T.F., 2000. Gelonin is an unusual DNA glycosylase that removes adenine from single-stranded DNA, normal base pairs and mismatches. *Journal of Biological Chemistry* 275, 31399–31406.
- Nielsen, K., Boston, R.S., 2001. Ribosome-inactivating proteins: a plant perspective. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 785–816.
- Olsnes, S., Pihl, A., 1973. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry* 12, 3121–3126.
- Olsnes, S., Refsnæs, K., Pihl, A., 1974. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* 249, 627–631.
- Olsnes, S., Wesche, J., Falnes, P., 1999. Binding, uptake routing and translocation of toxins with intracellular site of action. In: Alouf, J.E., Freer, J.H. (Eds.), *The Comprehensive Sourcebook Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, London, pp. 73–93.
- Peumans, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J., 2001. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB Journal* 15, 1493–1506.
- Sandvig, K., Van Deurs, B., 2005. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Therapy* 12, 865–872.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184–191.
- Smith, C.M., Kahn, Z.R., Pathak, M.D. (Eds.), 1994. Use of tissue culture and artificial diets for evaluating insect resistance. *Techniques for Evaluating Insect Resistance in Crop Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 291–305.
- Stevens, W.A., Spurdon, C., Onyon, L.J., Stirpe, F., 1981. Effect of inhibitors of protein synthesis from plants on tobacco mosaic virus infection. *Experientia* 37, 257–259.
- Stirpe, F., 2004. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicol* 44, 371–383.
- Stirpe, F., Bailey, S., Miller, S.P., Bodley, J.W., 1988. Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Research* 16, 1349–1357.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M., Lappi, D.A., 1992. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10, 405–412.
- Stirpe, F., Battelli, M.G., 2006. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell Molecular Life Science* 63, 1850–1866.

- Stirpe, F., Olsnes, S., Pihl, A., 1980. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry* 255, 6947–6953.
- Sugimura, M., Hirayama, C., Nakamura, M., 2001. Selective transport of the mulberry leaf urease from the midgut into the larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 47, 1133–1138.
- Summers, C.B., Felton, G.W., 1993. Antioxidant role of dehydroascorbic acid reductase in insects. *Biochimica Biophysica Acta* 1156, 235–238.
- Turrel, M.J., Middlebrook, J.L., 1988. Mosquito inoculation—an alternative bioassay for toxins. *Toxicon* 26, 1089–1094.
- Vivanco, J.M., Savary, B.J., Flores, H.E., 1999. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiology* 119, 1447–1456.
- Wang, Y.X., Neamati, N., Jacob, J., Palmer, I., Stahl, S.J., Kaufman, J.D., Huang, P.L., Huang, P.L., Winslow, H.E., Pommier, Y., Wingfield, P.T., Lee-Huang, S., Bax, A., Torchia, D.A., 1999. Solution structure of anti-HIV-1 and anti-tumor protein MAP30: structural insights into its multiple functions. *Cell* 99, 433–442.
- Zhang, A.H., Tang, S., Liu, W.Y., 2001a. Substrate-structure dependence of ribotoxins on cleaving RNA in *C. camphora* ribosome. *Journal of Natural Toxins* 10, 119–125.
- Zhang, C., Gong, Y., Ma, H., An, C., Chen, D., Chen, Z.L., 2001b. Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells. *Biochemical Journal* 355, 653–661.
- Zhou, X., Li, X.D., Yuan, J.Z., Tang, Z.H., Liu, W.Y., 2000. Toxicity of cinnamomin—a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 259–264.

CAPITULO 2

Estudos sobre o efeito inseticida do Jaburetox-2Ec em *Spodoptera frugiperda*

JUSTIFICATIVA

Insetos cujo processo digestório depende basicamente de enzimas tipo catepsinas são sensíveis à toxina de CNTX, enquanto que insetos com digestão baseada em tripsinas não foram afetados quando ingerem essa toxina (CARLINI *et al.*, 1997). Por outro lado, o peptídeo recombinante jaburetox-2Ec mostrou atividade entomotóxica em *D. peruvianus*, *R. prolixus*, *T. infestans* (STANISÇUASKI *et al.*, 2005; TOMAZETTO *et al.*, 2007), que possuem catepsinas digestivas e, também na barata alemã *B. germanica*, cuja digestão é baseada em tripsinas (MULINARI *et al.*, 2004). Assim, considerou-se que lepidópteros, como *S. frugiperda*, insetos que possuem um sistema digestório alcalino e dependem de enzimas digestivas do tipo serino proteinases, são bons modelos para estudos visando entender o efeito inseticida e o modo de ação do jaburetox-2Ec. Alternativamente, células de inseto lepidópteros em culturas também constituem modelos interessantes para se investigar aspectos do mecanismo de ação do peptídeo.

MATERIAIS E MÉTODOS

a) Produção e purificação de jaburetox-2Ec.

O cultivo das células recombinantes e a purificação do peptídeo foram conduzidos conforme MULINARI *et al.*, 2007 e TOMAZETTO *et al.*, 2007. Para os ensaios, foram utilizadas soluções do jaburetox-2EC em tampão fosfato 20mM.

b) Insetos

Para os ensaios, utilizou-se larvas de 3º instar de *S. frugiperda* provenientes da colônia mantida no Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, mantidas em dieta artificial baseada em feijão (GREENE *et al.*, 1976) em sala climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $50 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h.

c) Células

Células Tn5B, isoladas originalmente de ovos de *Trichoplusia ni* (GRANADOS *et al.*, 1994) e UFL-AG-286, isoladas de embrião de *A. gemmatalis* (SIEBURTH & MARUNIAK, 1988) e Sf21, isoladas de ovário pupal de *S. frugiperda* (VAUGHN *et al.*, 1977) foram crescidas em meio de cultura TC-100 (GIBCO-BRL Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 27°C e, mantidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília.

d) Bioensaio

Três grupos de seis lagartas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* foram alimentadas com discos de folhas de *Phaseolus vulgaris*. Os insetos foram mantidos em copos plásticos individualizados, em sala climatizada com uma temperatura de 26°C, 85% de umidade e um fotoperíodo de 14:10. Nos dias 0, 2 e 4, 20 µl de uma solução de tampão fosfato contendo 16,3 µg jaburetox-2EC foram colocadas sobre a superfície dos discos foliares (30,5mm²) e alimentadas as lagartas. Insetos controles receberam discos foliares contendo 20µl de tampão da diálise. A mortalidade no grupo e o ganho de peso individual foram avaliados diariamente.

e) Teste cometa

O ensaio cometa (EC) ou *Single Cell Gel Eletrophoresis* (SCGE) em pH alcalino (pH >13) foi realizado conforme metodologia descrita por SINGH *et al.* (1988) com algumas modificações.

S. frugiperda de terceiro ínstar foram alimentadas com discos de folhas de feijão contendo 20 e 40µg de jaburetox-2Ec e 48h após a ingestão do peptídeo foram macerados manualmente numa concentração de 50mg de peso corporal/mL de tampão PBS(1x) em *Eppendorf* de 1,5mL com um bastão de vidro. Insetos controle foram alimentados somente com discos foliares contendo tampão PBS (1x) e submetidos ao mesmo procedimento. Uma alíquota de 20µl do macerado do inseto foi misturada com 80µl de agarose *low melting*, a qual foi colocada sobre lâminas pré-cobertas com agarose 1,5% e sobre as células uma lamínula. As lâminas foram refrigeradas por 5 min, retirando-se as lamínulas e colocando-se na solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris pH 10, 10% DMSO com 1% de Triton X-100) a 4°C por 1 h. Após este período as lâminas foram

colocadas em uma solução alcalina (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH 13) por 20 min, em seguida submetido a eletroforese por 30 min a 300mA e 25V. Após a eletroforese, as células fixadas em agarose foram neutralizadas com Tris 0,4M (pH 7,5) e coradas com nitrato de prata. Para avaliação da intensidade do cometa foi utilizado microscópio óptico. A integridade do núcleo celular foi analisada visualmente e a classe de dano variou de 0 (sem dano) para 4 (máximo dano) atribuído para 100 células selecionadas ao acaso em duas lâminas para cada replicata. O índice de dano de uma amostra foi calculado como a soma do número de células multiplicado por sua respectiva classe de dano, variando de 0 (completamente sem dano: 100 células x 0) a 400 (dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS *et al.*, 1993; GUECHEVA *et al.*, 2001).

f) Determinação da concentração dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

TBARS foi determinado como descrito por HERMES-LIMA & STOREY (1995). Lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda* foram alimentadas com discos de folhas de feijão nos dias 0 e 2 contendo 20 e 40 µg do peptídeo. Após 24 ou 48h da última refeição as lagartas foram homogeneizadas (três insetos/mL) em uma superfície gelada em fosfato de potássio 50 mM contendo EDTA 0,5 mM, pH 7,2. Aliquotas (100µL) do homogenado foram misturados com 100 µl do reagente de cor (ácido tiobarbitúrico 1%, 50 mM de NaOH, 0,1 mM BHT (butil hidroxi tolueno) e 50µl de ácido fosfórico 7%).

A mistura foi colocada em banho-maria (98°C) por 15 min e após as amostras resfriarem em temperatura ambiente, 1,5mL de n-butanol foi adicionado à mistura e centrifugadas por 5 min a 1600g. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm. Para o branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo o reagente de cor por uma

solução de ácido clorídrico 3mM. Os valores de TBARS foram expressos em nmol/g de proteína utilizando malondialdeído como padrão.

g) Determinação das proteínas totais

A determinação das proteínas totais nos extratos celulares dos insetos foi realizada pelo método de BRADFORD (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

h) Análise de citotoxicidade

Para verificar a citotoxicidade de jaburetox-2Ec utilizou-se kit da Promega Corporation (Madison, WI, USA) - CytoTox-Glo™, que permite determinar o número de células mortas em uma população celular. O kit consta de um substrato peptídico luminogênico - (AAF-Glo™ - alanil-alanil-fenilalanil-aminoluciferina) e um reagente de lise celular (digitonina). Amostras foram lidas em luminômetro TD- 20/20, regulada para os seguintes parâmetros: tempo de espera - 5 seg, tempo de integração - 25 seg, sensibilidade 50%. Leituras foram expressas em unidades luminosas (RLU- *relative light units*). Células UFL-AG-286 e Sf21, na concentração de 10^4 células em 200 µl de meio de cultura (TC-100 - Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) foram distribuídas em 96 poços (TPP) incubadas a 27°C com 0,5, 1,0 e 5,0µg de jaburetox-2Ec. As avaliações da citotoxicidade foram realizadas em intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 h após adição do jaburetox-2Ec, seguindo as instruções do fabricante do kit CytoTox-Glo™.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Proteínas com ação inseticida precisam ser ingeridas pelo inseto para que seus efeitos aconteçam, uma vez que o exoesqueleto dos insetos oferece proteção contra agentes hidrofílicos e macromoléculas, como é o caso das proteínas. Como consequência disso, o mecanismo de ação da maioria das proteínas inseticidas envolve interferências com o processo digestivo (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). O mecanismo de ação da CNTX e das ureases vegetais parece ser diferente de outras proteínas inseticidas vegetais, não há evidências de efeito inibidor sobre as enzimas digestivas do inseto ou uma ação tipo lectina.

A CNTX precisa ser ativada, ocorrendo ativação proteolítica da proteína pela ação de enzimas digestivas acídicas, tipo catepsina, presentes no intestino de hemípteros (percevejos, pulgões) e coleópteros bruquídeos (carunchos), clivando-a para liberar um fragmento de ~10 kDa, um peptídeo interno da CNTX, que é o agente tóxico em si (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DA SILVA *et al.*, 2000).

O fato do espectro de ação do peptídeo recombinante ser mais amplo do que o da(s) urease(s) do qual este é derivado, atuando também nas formas adultas dos hemípteros e na barata *B. germanica* (nos quais o processamento proteolítico da urease no sistema digestório não resulta na formação do peptídeo) (TOMAZETTO *et al.*, 2007; MULINARI *et al.*, 2004), mostrou a necessidade de ampliarmos os estudos do mecanismo de ação inseticida das ureases e peptídeos derivados também nesses modelos de insetos.

Assim, neste capítulo da tese foi estudada a atividade inseticida de jaburetox-2Ec no inseto praga *S. frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) que, como os lepidópteros em geral,

possuem um processo digestivo baseado em enzimas tipo tripsina e um trato digestório alcalino (SILVA & TERRA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1994).

Uma metodologia de administração de proteínas para lagartas foi desenvolvida que permitisse conhecer exatamente a dose da proteína administrada a cada inseto, visto que a forma “tradicional” de realização do bioensaio, adição da substância teste à dieta artificial pastosa, dificulta a avaliação do material ingerido pelas lagartas e ainda pode haver termolabilidade do material-teste, se adicionado à dieta durante o seu preparo. Para contornar essas dificuldades foi desenvolvido um protocolo de bioensaio adicionando-se o peptídeo recombinante na superfície de discos foliares de feijão (*P. vulgaris*), oferecidos às lagartas individualmente.

Para a avaliação da atividade inseticida do jaburetox-2Ec em lagartas de *S. frugiperda*, três grupos de seis insetos receberam 16,3 µg de jaburetox-2Ec, em discos foliares servidos como alimento, nos dias 0, 2 e 4. Os insetos, mantidos em frascos individualizados, eram pesados a cada dois dias. Observou-se que no segundo dia, a média do ganho de peso das lagartas alimentadas com o peptídeo foi aproximadamente 30% menor do que o controle (Figura 4A), e no oitavo dia, tendo consumido 47µg de jaburetox-2Ec até o dia 4, todas as lagartas estavam mortas (Figura 4B).

Este resultado confirmou, em um segundo modelo de inseto com enzimas digestivas tipo tripsina, a atividade entomotóxica do peptídeo recombinante, contrastando com a ausência de efeito da urease nativa, que não afetou *S. frugiperda* com a ingestão de 5, 10 e 50 µg de urease de soja embrião-específica (dados não mostrados).

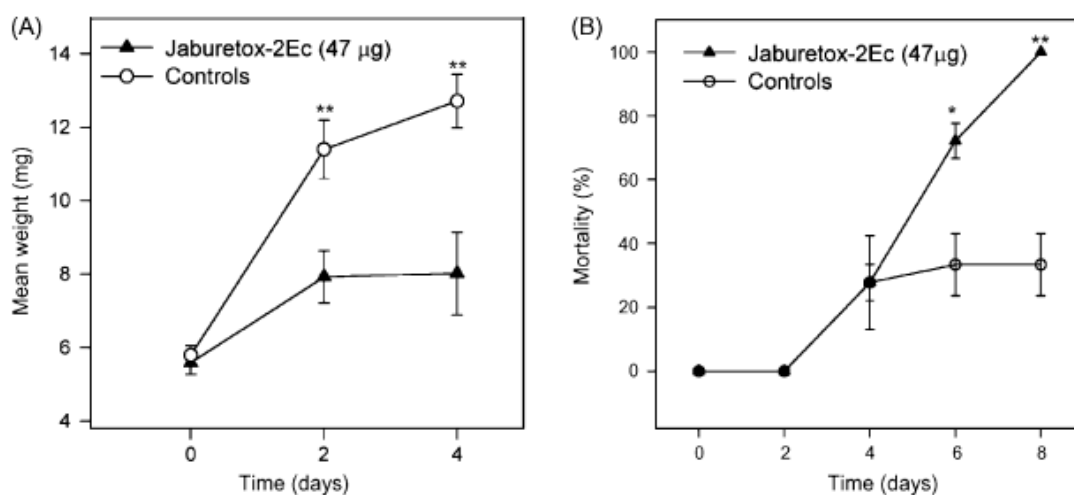


Figura 4- Efeito inseticida de jaburetox-2Ec em *S. frugiperda*. Três grupos de 6 lagartas de terceiro ínstar receberam, no dia 0, 2 e 4 discos de folhas de *Phaseolus vulgaris* contendo 16,3µg de jaburetox-2Ec. (A) ganho de peso de insetos individualizados nos dias 0, 2 e 4. (B) Mortalidade (%) de larvas registradas nos dias 0, 2, 4, 6 e 8. Dados estão expressos em médias e desvio padrão de três repetições. Asteriscos indicam nível de significância pelo teste t (* p< 0,05; ** p<0,005) comparativamente com o controle .

O peptídeo jaburetox-2Ec foi altamente tóxico para ninfas de terceiro ínstar de *D. peruvianus* na dose de 0,01% p/p de dieta (STANISÇUASKI *et al.*, 2005). Na dose de 0,03µg/mg de peso do inseto, injetado na hemocele de ninfas de 4º ínstar de *R. prolixus*, 100% dos insetos morreram após 48h, e injetado na dose de 0,1 µg/mg, causou 100% de letalidade em ninfas de 5º ínstar e adultos de *T. infestans*, após 15 e 20h respectivamente (TOMAZETTO *et al.*, 2007). Por via oral, as ureases (JBU e CNTX) não afetam hemípteros adultos, *R. prolixus* (FERREIRA-DaSILVA *et al.*, 2000) e *D. peruvianus*, (STANISÇUASKI *et al.*, 2005), provavelmente porque os insetos adultos não formam o peptídeo entomotóxico ou o degradam rapidamente (PIOVESAN *et al.*, 2008), ou ainda

porque o peptídeo formado não alcança a hemolinfa. Postula-se que o peptídeo inseticida liberado da urease no trato digestório seja transportado para a hemolinfa dos insetos, e de lá, para outros tecidos, onde exerceria sua atividade tóxica (FERREIRA-DeSILVA *et al.*, 2000).

Em estudos anteriores, havia sido demonstrado que a CNTX era inócua para lagartas de *M. sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), observando-se hidrólise completa *in vitro* da CNTX com homogenados do intestino da lagarta e inexistência de fragmentos da proteína nas fezes das lagartas tratadas, o que sugeriu que a ausência de efeito entomotóxico era devido a não formação do peptídeo inseticida (CARLINI *et al.*, 1997).

A letalidade causada pela administração do peptídeo recombinante diretamente na hemolinfa dos hemípteros adultos, ou ingerido pela barata *B. germanica*, ou ainda por lagartas de *S. frugiperda* (nesse trabalho) sugere fortemente que o(s) alvo(s) moleculares finais que determinam o efeito entomotóxico das ureases, via liberação do peptídeo inseticida, existiriam também nesses insetos, e que a ausência do efeito observada seria somente conseqüente à falta do adequado processamento da proteína no trato digestório. No entanto, também é possível que as ureases tenham efeito deterrente para os insetos. STANISÇUASKI *et al.* (2008), demonstraram que as proteínas JBU e CNTX, e o peptídeo jaburetox-2Ec atuam diretamente sobre túbulos de Malpighi de *R. prolixus*, diminuindo a secreção de fluidos em doses abaixo do nanomolar. Curiosamente, JBU e jaburetox-2Ec ativam diferentes rotas de sinalização que levam ao mesmo efeito final de antidiurese.

Várias plantas da família Rubiaceae e Violaceae produzem uma série de ciclotídeos ou peptídeos macrocíclicos de 27-37 aminoácidos, que são expressos em alto nível nas folhas, caules e raízes (CRAIK *et al.*, 1999, 2006). TAM *et al.*, 1999 demonstrou atividade

antimicrobiana dos ciclotídeos, mas a atividade predominante desses peptídeos nas plantas parece ser inseticida (JENNINGS *et al.*, 2001, 2005).

O ciclotídeo kalata B1 quando acrescentado na dieta artificial, prejudicou o desenvolvimento da lagarta *Helicoverpa punctigera* (JENNINGS *et al.*, 2001). A ingestão dos ciclotídeos kalata B1, B2 e B5 retardou o desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* (JENNINGS *et al.*, 2005; BARBETA *et al.*, 2008). BARBETA *et al.* (2008) demonstraram redução do consumo de dieta por *H. armigera* quando acrescida do ciclotídeo kalata B1 (0,24% peso/volume). As lagartas apresentavam dano nas células epiteliais do mesêntero, com células inchadas e lise celular, semelhante aos danos induzidos por outras proteínas inseticidas, com as δ -endotoxinas (SPIES & SPENCE, 1985) e Vip3A (YU *et al.*, 1997) produzidas por *B. thuringiensis*, ou como toxinas Tc de *Photobacterium luminescens* (BLACKBURN *et al.*, 1998). O gene *vip3A* codifica uma proteína de 88 kDa que é secretada no sobrenadante de culturas de *B. thuringiensis*, e possui atividade inseticida em lepidópteros: *Agrotis ipsilon*, *S. frugiperda*, *S. exigua* (ESTRUCH *et al.*, 1996).

Outro peptídeo de plantas letal para várias pragas, dentre estas a principal praga dos cereais, *Sitophilus* sp., é o PA1b - *Pea albumin 1*, subunidade b da albumina de *Pisum sativum* (DELOBEL *et al.*, 1999; LOUIS *et al.*, 2004). Vários insetos das ordens Coleoptera, Diptera e Hemiptera mostraram suscetibilidade à toxina PA1b (DELOBEL *et al.*, 1999).

Para verificar se a letalidade causada pelo jaburetox-2Ec em *S. frugiperda* teria alguma semelhança com o mecanismo de ação das RIPs estudadas no capítulo 1 dessa tese, investigamos a ocorrência de estresse oxidativo e de lesões no DNA nas lagartas alimentadas com o peptídeo recombinante.

O teste cometa é uma das técnicas mais utilizada para avaliação de genotoxicidade, permitindo uma análise quantitativa e qualitativa do dano ao DNA em níveis muito baixos, em qualquer célula eucarionte (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; HARTMANN *et al.*, 2003).

A figura 5 mostra que, apesar de uma tendência de aumento, não houve diferenças estatísticas no nível de danos ao DNA das lagartas *S. frugiperda*, medido 48 h após a ingestão de 20 ou 40µg do peptídeo.

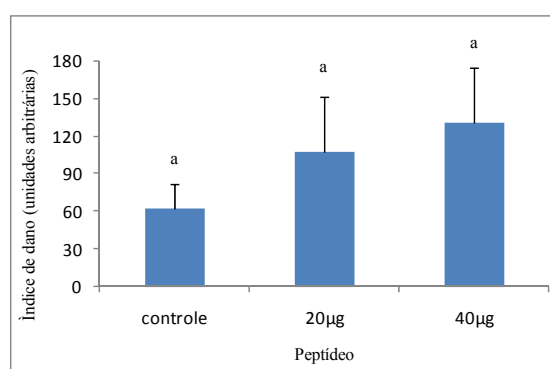


Figura 5. Índice de dano ao DNA (teste cometa) em células de *S. frugiperda*, após ingestão de 20 e 40µg de jaburetox-2Ec. Insetos controle foram alimentados com discos de folhas de *P. vulgaris* contendo tampão fosfato. As barras representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. Mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste t ($p < 0,05$).

Portanto, ao contrário do que observamos para o efeito entomotóxico das RIPs em *S. frugiperda*, com índices de dano 4 a 5 vezes maiores nos insetos tratados em relação aos controles (capítulo 1), o efeito inseticida do jaburetox-2Ec parece não ser consequência de lesões ao DNA nos insetos tratados.

Um excesso de oxidantes (tais como radical superóxido e peróxido de hidrogênio) e/ou um déficit de antioxidantes resulta em estresse oxidativo, ocasionando danos como peroxidação lipídica e oxidação protéica, podendo levar células até mesmo à morte por necrose ou apoptose. Insetos herbívoros estão expostos a ROS (*reactive oxygen species*)

derivado de alimentos ricos em pro-oxidantes, gerados durante o processo oxidativo normal em células e fluidos extracelulares (FELTON & SUMMERS, 1995). Para proteger-se do estresse oxidativo e para modular os efeitos fisiológicos de ROS, insetos desenvolveram um intrincado sistema de defesa regulado por antioxidantes.

Para elucidar o mecanismo de ação do peptídeo recombinante em lepidópteros, avaliamos em seguida o nível de estresse oxidativo em lagartas de *S. frugiperda*.

Análise da geração do estresse oxidativo foi realizada pelo método TBARS, o qual quantifica os produtos resultantes da peroxidação lipídica capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico. A figura 6 mostra os níveis de TBARS em *S. frugiperda* medido 24h depois da ingestão de duas doses do peptídeo jaburetox-2Ec.

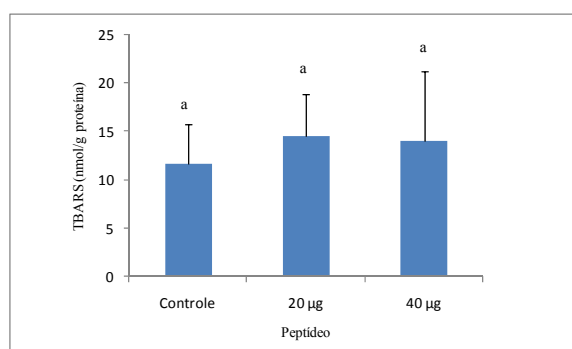


Figura 6. Análise de níveis de TBARS em tecidos de *S. frugiperda* tratadas com 20 e 40µg de jaburetox-2Ec, após 24h da ingestão do peptídeo. Os dados são a média e o desvio padrão de três repetições independentes. Cada repetição foi composta por três insetos. Mesma letra não difere estatisticamente pelo teste ANOVA-Tukey ($p < 0,05$).

Os mesmos resultados negativos foram obtidos para os níveis de TBARS medidos nos tecidos de *S. frugiperda* com 48h após a ingestão da maior dose do peptídeo (dados não mostrados).

A partir destes resultados foi possível concluir que o modo de ação inseticida do jaburetox-2Ec em *S. frugiperda* é diferente daquele verificado para as RIPs (capítulo 1), não ocorrendo evidência de lesões significativas ao DNA ou de estresse oxidativo, evidenciado por ausência de peroxidação lipídica.

Visando esclarecer o modo de ação de jaburetox-2Ec, nossa próxima abordagem foi testar o efeito do peptídeo sobre células de insetos lepidópteros em cultura, como as linhagens Tn5B de *T. ni* e UFL-AG-286 de *A. gemmatalis*. Em um ensaio preliminar, verificou-se uma diminuição acentuada do número de células presentes na cultura decorrido o tempo de observação de sete dias, bem como alterações morfológicas celulares, nos dois tipos celulares quando em presença do peptídeo inseticida.

A figura 7 mostra o aspecto de células Tn5B incubadas com 80 µg (de jaburetox-2Ec por quatro dias. A figura 8 mostra o aspecto de células UFL-AG-286 após sete dias de incubação com 10 µg do peptídeo. É evidente que em doses micromolares, o peptídeo não é inócuo as células de lepidópteros, o que poderia justificar a perda de peso, e posteriormente a morte de *S. frugiperda* quando alimentadas com o peptídeo.

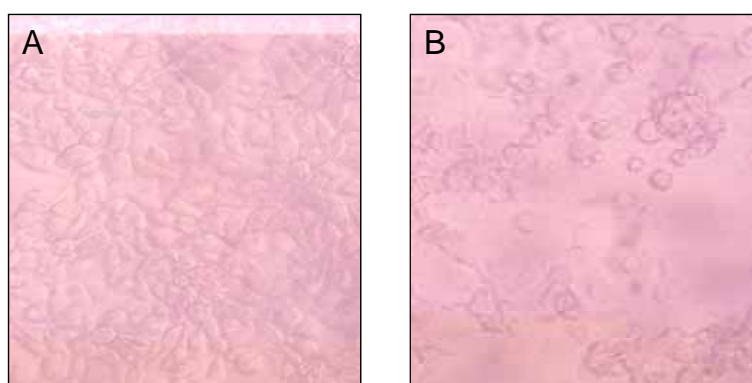


Figura 7. Células Tn5B, 4 dias após a inoculação. A- células controle tratadas com o tampão da diálise; B- células tratadas com 80µg do jaburetox-2Ec.

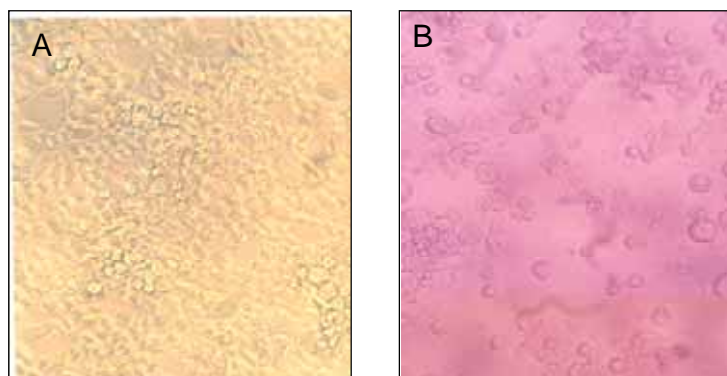


Figura 8. Células UFL-AG-286, 7 dias pós-inoculação. A- células controle tratadas com o tampão de diálise; B- células tratadas com 10µg do jaburetox-2Ec.

Efeito lítico e de formação de poros em membranas foi proposto por KNOWLES (1994) para o mecanismo de ação das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Estudos mostram que *in vitro* essas toxinas se ligam a receptores das células do trato digestório médio das larvas, inserindo-se na membrana celular e formando um canal iônico. Estes canais são seletivos a cátions levando a perda do potencial transmembrana, seguido de lise e morte celular (SOBERON *et al.*, 2007; BRAVO *et al.*, 2007)

Uma possível atividade de porina foi prevista para o jaburetox-2Ec como base na modelagem molecular *ab initio* do peptídeo recombinante, que apresentaria um domínio proeminente de grampo beta, uma estrutura presente em classe de toxinas formadoras de poros (MULINARI *et al.*, 2007).

A medida da atividade de enzimas intracelulares extravasadas para o meio extracelular após perda da integridade da membrana celular é a base de vários métodos de análise de citotoxicidade. Nessa trabalho, procuramos avaliar a aparente citotoxicidade induzida pelo peptídeo em células de lepidópteros com a utilização do kit CytoTox-Glo™,

que detecta a liberação no meio extra-celular de proteases tipo subtilisina chamadas *dead cell*, que ocorrem somente após a lise celular (NILES *et al.*, 2007).

Células Sf21 e UFL-AG- 286 foram incubadas com jaburetox-2Ec (Figura 9 e 10) em diferentes intervalos visando quantificar a atividade de proteases liberadas pelas células que perderam a integridade da membrana, como sugerem os resultados mostrados nas figuras 7 e 8.

As figuras mostram que em presença de jaburetox-2Ec não é possível registrar a luminescência produzida pela atividade de proteases liberadas pelas células que eventualmente tenham perdido a integridade da membrana. De fato, na maior concentração testada de jaburetox-2Ec, a luminescência medida foi inferior àquela registrada para o controle negativo, que mede a “morte natural” das células em cultura na presença apenas do meio.

Como tanto o controle positivo (lise total com digitonina) como o negativo (células somente na presença do meio de cultura) estavam dentro dos valores esperados, levantou-se a hipótese de que o jaburetox-2Ec estivesse inibindo a atividade, ou liberação da *dead-cell* protease, como proposto por NILES *et al.*, 2007, e na qual se baseia o funcionamento do kit CytoTox-GloTM utilizado. Esta hipótese foi testada acrescentando-se digitonina nas células incubadas por 90h com 1 e 10 μ g de jaburetox-2Ec. Para as células incubadas com 1 μ g do peptídeo observou-se um aumento significativo do sinal luminescente, sugerindo haver células não lisadas na cultura, porém para células incubadas com a maior concentração de jaburetox-2Ec, a lise total das células não produziu aumento do sinal luminescente, permanecendo os valores de luminescência abaixo do controle negativo (dados não mostrados).

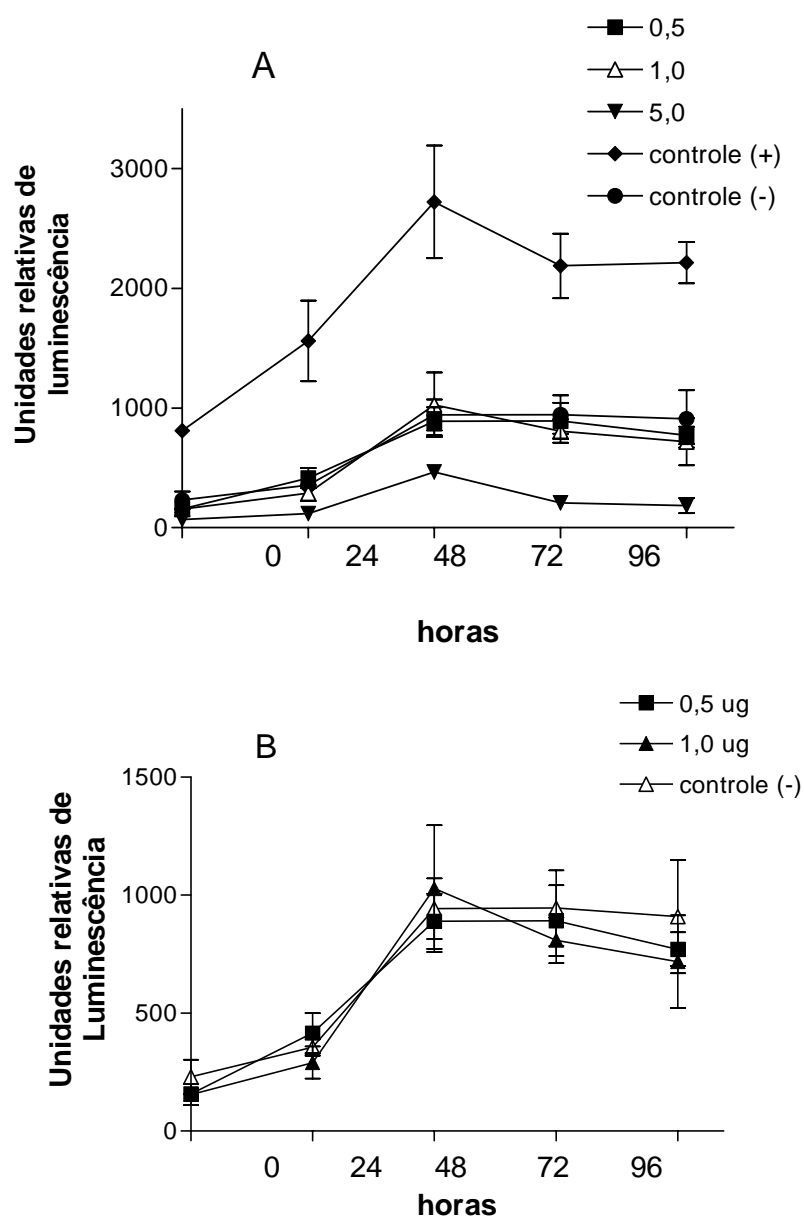


Figura 9. Células Sf21 tratadas com 0,5, 1,0 e 5,0 μg de jaburetox-2Ec (A). Em (B), os tratamentos com 0,5 e 1,0 μg de jaburetox-2Ec e o controle negativo (viabilidade das células apenas no meio de cultura). O controle positivo representa células lisadas com digitonina. Dados referem-se a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

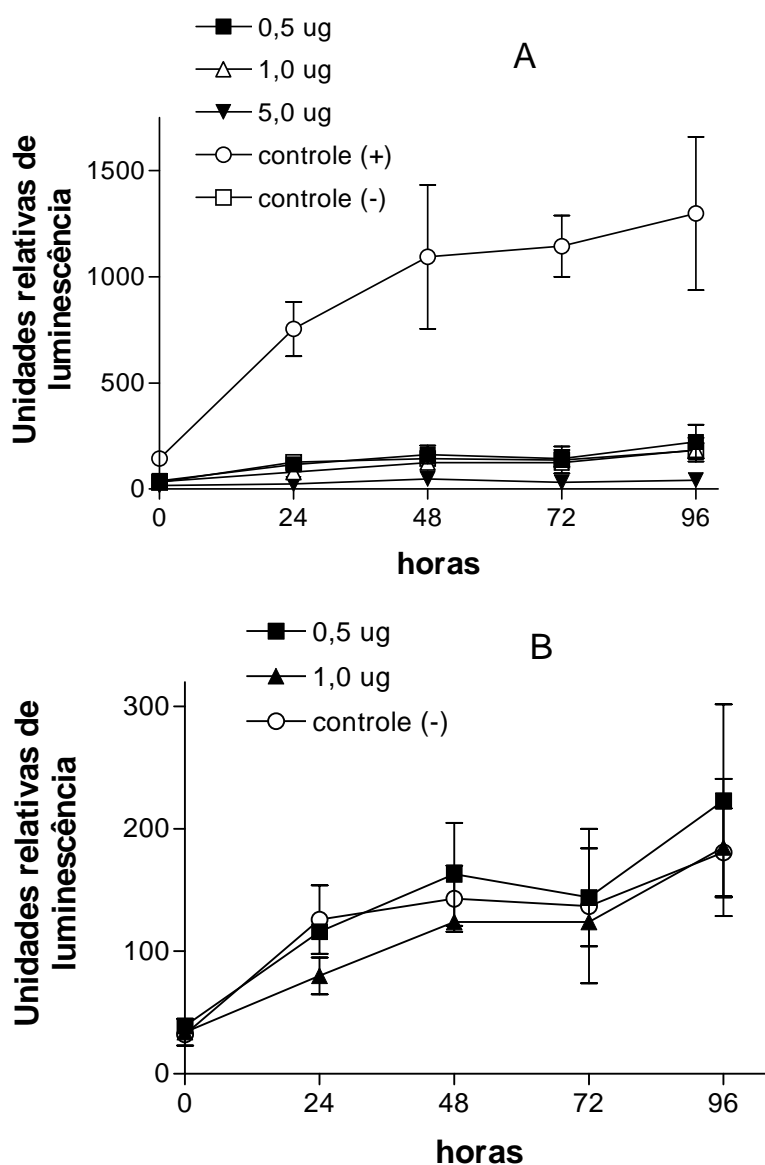


Figura 10. Células UFL-AG-286 tratadas com 0,5, 1,0 e 5,0 μg de jaburetox-2Ec (A). Em (B), estão mostrados apenas os tratamentos com 0,5 e 1,0 μg de jaburetox-2Ec e o controle negativo (viabilidade das células apenas no meio de cultura). O controle positivo representa células lisadas com digitonina. Dados referem-se a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Ainda que não tenha sido possível quantificar a lise induzida pelo jaburetox-2Ec em células de lepidópteros em cultura utilizando o kit CytoTox-Glo™, a baixa densidade celular e a aparência das células após alguns dias de exposição ao peptídeo, como mostra as figuras 7 e 8, não deixa dúvidas quanto ao seu efeito citotóxico. A figura 11 mostra as mesmas alterações morfológicas e redução da densidade das células Sf21 em cultura, induzida pela presença do peptídeo por 8 dias.



Figura 11. Células Sf21 após 8 dias da inoculação do jaburetox-2Ec. Em A- células controle; B-células inoculadas com 1µg de jaburetox-2Ec; C-células inoculadas com 10µg de jaburetox-2Ec. Aumento de 200x

Assim, o jaburetox-2Ec mostrou citotoxicidade, em doses micromolares, para as três linhagens de células de lepidópteros (Tn5B, UFL-AG-286 e Sf21) testadas, com visível alterações na forma da célula, como arredondamento celular e aparente perda de material celular observado em células Tn5B e UFL-AG-286 após 4 e 7 dias de incubação com 80µg e 10µg do peptídeo respectivamente (Figura 7B e 8B). Para as células Sf21 poucas alterações morfológicas foram detectadas com a incubação com o peptídeo após 8 dias (Figura 11).

Importante observar que o efeito citotóxico do peptídeo não é inespecífico, pois STANISÇUASKI *et al.*(2008), não observaram efeito lítico do jaburetox-2Ec sobre túbulos

de Malpighi isolados de *R. prolixus*. Nesse modelo, doses muito baixas (de 10^{-18} a 10^{-15} M) do peptídeo causam redução acentuada do efeito diurético induzido por serotonina, com conseqüente antidiurese, acompanhado de alterações do potencial transepitelial das células do túbulo e dos níveis de cGMP. A maior dose de jaburetox-2Ec testada no ensaio de diurese, 10^{-8} M, não comprometeu a viabilidade celular.

Para comprovar esse efeito pretendemos, no futuro, testar o efeito do peptídeo sobre outros tipos celulares em cultura, de insetos e também de mamíferos, bem como quantificar a lise celular utilizando outros marcadores de extravasamento citoplasmático, como, por exemplo, lactato desidrogenase, exclusão de corantes vitais, etc.

O fato do peptídeo jaburetox-2c ter aparentemente inibido o ensaio enzimático que é a base do kit CytoTox-Glo™ é muito intrigante. Esse kit, patenteado pela Promega Corporation e lançado no início de 2008, teve como base o trabalho desenvolvido por NILES *et al.*, 2007. Esses autores caracterizaram o perfil das atividades proteolíticas de células de mamíferos, buscando proteases marcadoras de células viáveis com o uso de substrato permeáveis à membrana, e de proteases marcadoras de células não viáveis (com alterações de permeabilidade celular), utilizando substratos impermeáveis à membrana. Os autores mostraram que atividade da protease *dead-cell* sobre o substrato Ala-Ala-Phe-aminoluciferina, um marcador de citotoxicidade, foi sensível a alguns inibidores de serino proteases, mas não aqueles com seletividade para tripsina ou quimiotripsina. O tratamento com inibidores de cisteíno protease não mostrou uma exigência de tióis para manter a atividade da protease marcadora das células mortas. Tratamento com inibidores específicos de aspártico e metalo-proteases também não reduziram a atividade. Os inibidores mais efetivos dessa atividade foram: AEBSF (fluoreto de (4-(2-Aminoetil) benzenosulfonila,

PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), FPR-CMK (fenil-prolil-arginil-clormetilcetona), e 3-4 diisocumarina (NILES *et al.*, 2007). Este perfil de atividade foi consistente com a tripeptidil peptidase, uma protease citosólica majoritária e bastante conservada (BALOW *et al.*, 1986). Embora a identidade precisa dessa(s) protease(s) seja desconhecida, essa atividade proteolítica tipo serino/cisteína é abundante, constitutiva, e consistentemente mensurável em células de mamíferos (NILES *et al.*, 2007).

Por ter sido recentemente lançado como produto, ainda não há muitos relatos na literatura sobre o uso do kit CytoTox-Glo™. CHO *et al.*, 2008 propuseram o uso desse kit como plataforma de avaliação (*high throughput screening*) de citotoxicidade, testando uma biblioteca de compostos do *National Toxicology Program* do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, utilizando células HEK 293 (rim de embriões humanos) e células mesangiais de rim humano. FILLIPOVA *et al.* (2008), utilizaram o kit com sucesso em estudos do vírus do papiloma humano em células U2OS e apoptose induzida por TNF.

Inibidores de proteinases do tipo serina e cisteína frequentemente têm efeito deletério quando administrados, na alimentação, para lepidópteros e coleópteros, com redução da fecundidade, diminuição do peso, aumento de mortalidade e malformações (MURDOCK *et al.*, 1988; KURODA *et al.*, 1996; GRUDEN *et al.*, 1998; ELDEN *et al.*, 2000). O potencial inseticida destes inibidores tem sido demonstrado pela incorporação na dieta ou por estudos de inibição *in vitro* de proteinases digestivas para diferentes insetos alvos (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Dados prévios do grupo (CARLINI *et al.*, 1997; GOMBAROVITS, 1999; FERREIRA-DA SILVA *et al.*, 2000), mostraram que a CNTX, e também o peptídeo inseticida pepcanatox, não tinham qualquer atividade inibitória sobre as atividades

proteolíticas e amilásicas de homogenados de intestinos de *R. prolixus* ou de *C. maculatus*. O peptídeo pepcanatox, liberado por hidrólise da CNTX por catepsinas de *C. maculatus*, serviu de modelo para a construção do jaburetox-2Ec, sendo esse a seqüência homóloga codificada pelo gene *jbureII*, uma outra isoforma urease da *C. ensiformis* (PIRES-ALVES *et al.*, 2003; MULINARI *et al.*, 2007). No entanto, como as seqüências primárias do pepcanatox e do jaburetox-2Ec não são idênticas, não podemos descartar *a priori* que o jaburetox 2-Ec tenha efeito inibitório sobre proteinases de mamíferos, como sugerido nos ensaios com o CytoTox-Glo™ ou mesmo, de insetos.

Em resumo, nesse 2º capítulo da tese demonstramos que a ingestão de microgramas do peptídeo jaburetox-2Ec resulta em potente efeito inseticida em larvas de *S. frugiperda*, precedida de atrasos no desenvolvimento e diminuição no ganho de peso. Ensaio com células de insetos lepidópteros em cultura evidenciaram uma ação citotóxica do peptídeo em concentrações micromolares, com diminuição na densidade celular e alterações morfológicas das células. Não foi possível avaliar se o jaburetox-2Ec causa morte celular em células de lepidópteros. É provável que o peptídeo tenha atividade inibitória sobre uma proteinase citoplasmática tipo tripeptidil peptidase.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Gelonina, PAPs, momordina, licnina e saporina S-6 nas concentrações de 20 e 40 μg apresentam efeitos entomotóxicos nos lepidópteros *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* afetando a evolução ponderal, desenvolvimento dos estágios larvais, formação de pupas, emergência, e causando mortalidade;
- Dentre as RIPs tipo 1 avaliadas, momordina foi a menos tóxica aos insetos testados;
- Em *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* observou-se danos ao DNA, verificado no teste cometa, ocasionado por ingestão de 40 μg das cinco RIPs tipo 1;
- Em *A. gemmatalis*, nenhuma das RIPs produziu alterações significativas nas atividades de CAT e SOD. Já os níveis de TBARS foram reduzidos em cerca de 30–40% em insetos alimentados com gelonina, PAP-S e licnina quando comparado ao controle;
- Em *S. frugiperda*, nenhuma das RIPs produziu alterações significativas na atividade de CAT e níveis de TBARS. A atividade de SOD foi reduzida (80%) nos insetos tratados com qualquer uma das cinco RIPs;
- Não houve correlação entre níveis de dano no DNA e marcadores de estresse oxidativo nos insetos modelos e nestas condições de análise;

- O peptídeo recombinante jaburetox-2Ec é tóxico e letal quando microgramas da molécula são ingeridas por larvas de *S.frugiperda*
- Não houve indicação de genotoxicidade (danos ao DNA) ou indução de estresse oxidativo (nível de TBARS) em larvas de *S.frugiperda* tratadas com doses letais do jaburetox-2Ec;
- A avaliação por microscopia de culturas de células dos lepidópteros *T.nu* (Tn5B), de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) e de *S. frugiperda* (Sf21) mantidas em presença de concentrações micromolares do jaburetox-2Ec mostrou um efeito citotóxico, evidenciado como redução da densidade celular e alterações morfológicas após alguns dias, para os três tipos celulares;
- O peptídeo jaburetox-2Ec parece ter inibido protease(s) intracelular(es) do tipo serino/cisteína extravasadas de células de lepidópteros em cultura, uma vez que não foi possível medir a hidrólise do substrato luminogênico específico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad,S. and Pardini,R.S. 1990. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radic. Biol. Med.* 8: 401-413.
- Ahmad,S., Pritsos,C.A., Bowen,S.M., Heisler,C.R., Blomquist,G.J., and Pardini,R.S. 1988. Antioxidant enzymes of larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*: subcellular distribution and activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase. *Free Radic. Res. Commun.* 4: 403-408.
- Ahmad,S., Pritsos,C.A., Bowen,S.M., Kirkland,K.F., Blomquist,G.J., and Pardini,R.S. 1987. Activities of enzymes that detoxify superoxide anion and related toxic oxyradicals in *Trichoplusia ni*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 6: 85-96.
- Allam,M., Bertrand,R., Zhang-Sun,G., Pappas,J., and Viallet,J. 1997. Cholera toxin triggers apoptosis in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 57: 2615-2618.
- Anderson,D., Dhawan,A., Yu,T.W. and Plewa,M.J. 1996. An investigation of bone marrow and testicular cells in vivo using the comet assay. *Mutat. Res.* 370: 159-174.
- Andrews,R.K., Blakeley,R.L. and Zerner,B. 1984. Urea and urease. *Adv. Inorg. Biochem.* 6: 245-283.
- Babior,B.M. 1997. Superoxide: a two-edged sword. *Braz. J Med. Biol. Res.* 30: 141-155.
- Bajpayee,M., Dhawan,A., Parmar,D., Pandey,A.K., Mathur,N., and Seth,P.K. 2002. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutat. Res.* 520: 83-91.
- Balow,R.M., Tomkinson,B., Ragnarsson,U., and Zetterqvist,O. 1986. Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *J Biol. Chem.* 261: 2409-2417.
- Bhanti, M and Taneja, A, 2007. Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. *Chemosphere*, 69:163-168.

Barbehenn,R.V., Bumgarner,S.L., Roosen,E.F., and Martin,M.M. 2001. Antioxidant defenses in caterpillars: role of the ascorbate-recycling system in the midgut lumen. *J. Insect Physiol.* 47: 349-357.

Barbeta,B.L., Marshall,A.T., Gillon,A.D., Craik,D.J. and Anderson,M.A. 2008. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105: 1221-1225.

Barbieri,L., Aron,G.M., Irvin,J.D., and Stirpe,F. 1982. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed). *Biochem. J.* 203: 55-59.

Barbieri,L., Battelli,M.G., and Stirpe,F. 1993. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154: 237-282.

Barbieri,L., Bolognesi,A., Cenini,P., Falasca,A.I., Minghetti,A., Garofano,L., Guicciardi,A., Lappi,D., Miller,S.P. and Stirpe,F. 1989. Ribosome-inactivating proteins from plant cells in culture. *Biochem. J.* 257: 801-807.

Barbieri,L., Ciani,M., Girbes,T., Liu,W.Y., Van Damme,E.J., Peumans,W.J., and Stirpe,F. 2004. Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Lett.* 563: 219-222.

Barbieri,L., Valbonesi,P., Bonora,E., Gorini,P., Bolognesi,A., and Stirpe,F. 1997. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res.* 25: 518-522.

Barbieri,L., Zamboni,M., Lorenzoni,E., Montanaro,L., Sperti,S. and Stirpe,F. 1980. Inhibition of protein synthesis in vitro by proteins from the seeds of *Momordica charantia* (bitter pear melon). *Biochem. J.* 186: 443-452.

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

Barja-Fidalgo,C., Guimaraes,J.A. and Carlini,C.R. 1991a. Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 128: 675-679.

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

Bass,H.W., Webster,C., O'Brian,G.R., Roberts,J.K.M. and Boston,R.S. 1992. A maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2. *Plant Cell* 4: 225-234.

Batista, F. R. X., Pereira, C. A., Mendonça, R. Z. e Morães, A. M. 2003. Avaliação de suplementos de meios de cultura para células de inseto visando à substituição do soro fetal bovino. Simpósio Nacional de Bioprocessos, 146. Florianópolis/SC, Brasil.

Battelli,M.G. 2004. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. *Mini. Rev. Med. Chem.* 4: 513-521.

Be'dard, C., Perret, S. and Kamen,A.A. 1997. Fed-batch culture of Sf-9 cells supports 3×10^7 cells per ml and improves baculovirus-expressed recombinant protein yields. *Biotechnol Lett* 19:629–632.

Bergmann,L., Aamdal,S., Marraud,S., Lacombe,D., Herold,M., Yamaguchi,T., Wilhelm-Ogunbiyi,K., Lentzen,H., and Zwierzina,H. 2008. Phase I trial of r viscumine (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001). *Eur. J Cancer* 44: 1657-1662.

Blackburn,M., Golubeva,E., Bowen,D., and French-Constant,R.H. 1998. A novel insecticidal toxin from *Photobacterium luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3036-3041.

Bolognesi,A., Barbieri,L., Abbondanza,A., Falasca,A.I., Carnicelli,D., Battelli,M.G. and Stirpe,F. 1990. Purification and properties of new ribosome-inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1087: 293-302.

Bonnefoy,M., Draï,J. and Kostka,T. 2002. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Med.* 31: 1174-1184.

Boveris,A. 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 58: 350-356.

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

Bravo,A., Gill,S.S., and Soberon,M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.

Bright,J. and Khar,A. 1994. Apoptosis: programmed cell death in health and disease. *Biosci. Rep.* 14: 67-81.

Brigotti,M., Alfieri,R., Sestili,P., Bonelli,M., Petronini,P.G., Guidarelli,A., Barbieri,L., Stirpe,F. and Sperti,S. 2002. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB J.* 16: 365-372.

Brinkmann,U., Mansfield,E. and Pastan,I. 1997. Effects of BCL-2 overexpression on the sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to ricin, diphtheria and Pseudomonas toxin and immunotoxins. *Apoptosis.* 2: 192-198.

Brodzik,R., Koprowski,H., Yusibov,V. and Sirko,A. 2000. Production of urease from *Helicobacter pylori* in transgenic tobacco plants. *Cell. Mol. Biol. Letters* 5: 357-366.

Carlini, C. R., Ferreira-Dasilva, C. T. and Gombarovits, M. C. 2000. Peptídeo entomotóxico da Canatoxina: Processo de produção. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Patente nº 0003334-0. Rio de Janeiro, Brasil.

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

Carlini,C.R. and Grossi-de-Sa,M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539.

Carlini,C.R. and Guimarães,J.A. 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19: 667-675.

Carlini,C.R. and Guimarães,J.A. 1991. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. *Toxicon* 29: 791-806.

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

Carlini,C.R., Oliveira,A.E., Azambuja,P., Xavier-Filho,J. and 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.

Castilhos.P., Goto,L., Roberts,L. and Araújo,A.P. 2008. Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. *FEBS J.* 275 : 948-959.

Chang,M.P., Bramhall,J., Graves,S., Bonavida,B., and Wisnieski,B.J. 1989. Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheria toxin-induced cytolysis. Evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. *J. Biol. Chem.* 264: 15261-15267.

Cho,M.H., Niles,A., Huang,R., Inglese,J., Austin,C.P., Riss,T. and Xia,M. 2008. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. *Toxicol. In Vitro* 22: 1099-1106.

Chrispeels,M.J. and Raikhel,N.V. 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* 3: 1-9.

Contijo,A.M.M. e Tice,R. 2003. Teste cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. *In* Mutagênese Ambiental. Edited by Ribeiro,L.R., Salvadori,D.M.F., Marques,E.K.. ULBRA, Canoas/RS.

Corey,M.J., Kinders,R.J., Brown,L.G.and Vessella,R.L. 1997. A very sensitive coupled luminescent assay for cytotoxicity and complement-mediated lysis. *J. Immunol. Methods* 207: 43-51.

Craik,D.J., Cemazar,M., Wang,C.K., and Daly,N.L. 2006. The cyclotide family of circular miniproteins: nature's combinatorial peptide template. *Biopolymers* 84: 250-266.

Craik,D.J., Daly,N.L., Bond,T., and Waine,C. 1999. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J. Mol. Biol.* 294: 1327-1336.

Cruz, I. 1995. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas:Embrapa, CNPMS: Circular Técnica, 21 , 45p.

Cruz, I. Figueiredo, M.L.C., Matoso, M.J. 1999. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas: Embrapa, CNPMS: Circular Técnica, 30 , 5-40.

Da Silveira,E.B., Cordeiro,B.A., Ribeiro,B.M. and Bao,S.N. 2005. In vivo apoptosis induction and reduction of infectivity by an *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus p35(-) recombinant in hemocytes from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Res. Microbiol.* 156: 1014-1025.

Da Silveira,E.B., Cordeiro,B.A., Ribeiro,B.M., de Castro,M.E., Soares,E.F. and Bao,S.N. 2007. An *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus mutant, vApAg, induces hemocytes apoptosis in vivo and displays reduced infectivity in larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Virus Res.* 130: 182-192.

Delobel, B, Grenier, A., Gueguen, J., Ferrasson, E. and Mbaiguinam, M. Utilisation d'un polypeptide derive d'une albumine PA1b de legumineuse comme insecticide. European Patent Office. [EP 1 078 085 B1], 1-25. 1999. France.

Dhawan,A., Anderson,D., Pascual-Teresa,S., Santos-Buelga,C., Clifford,M.N. and Ioannides,C. 2002. Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay. *Mutat. Res.* 515: 39-56.

Diao, J.P.,Young, L., Zhou, P. and Shuler, M.L.2008. An actively mixed mini-bioreactor for protein production from suspended animal cells. *Biotechnol. Bioeng.* 100:72:82

Dowd,P.F., Zuo,W.N., Gillikin,J.W., Johnson,E.T. and Boston,R.S. 2003. Enhanced resistance to *Helicoverpa zea* in tobacco expressing an activated form of maize ribosome-inactivating protein. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3568-3574.

Dowd,P.F., Holmes,R.A., Pinkerton,T.S., Johnson,E.T., Lagrimini,L.M., and Boston,R.S. 2006. Relative activity of a tobacco hybrid expressing high levels of a tobacco anionic peroxidase and maize ribosome-inactivating protein against *Helicoverpa zea* and *Lasioderma serricorne*. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2629-2634.

Elden, T.C. 2000. Influence of a cysteine proteinase inhibitor on alfalfa weevil (Coleoptera:Curculionidae) growth and development over successive generations. *J. Entomol. Sci.* 35, 70-76.

Elias, C.B., Zeiser, A., Be'dard, C. and Kamen, A.A. 2000. Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of 5.2×10^7 cells per ml and production of β -galactosidase at high cell density by fed-batch culture. *Biotechnol Bioeng* 68:381–388.

Endo,Y., Mitsui,K., Motizuki,M. and Tsurugi,K. 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* 262: 5908-5912.

Estruch,J.J., Warren,G.W., Mullins,M.A., Nye,G.J., Craig,J.A., and Koziel,M.G. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 5389-5394.

Fairbairn,D.W., Olive,P.L. and O'Neill,K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.

Fairbairn,D.W., Walburger,D.K., Fairbairn,J.J. and O'Neill,K.L. 1996. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 18: 407-416.

Felton,G.W. and Duffey,S.S. 1991. Protective action of midgut catalase in lepidopteran larvae against oxidative plant defenses. *J Chem Ecol* 17: 1715-1732.

Felton,G.W. and Duffey,S.S. 1992. Ascorbate oxidation reduction in *Helicoverpa zea* as a scavenging system against dietary oxidants. *Arch. Insect. Biochem.* 19: 27-37.

Felton,G.W. and Summers,C.B. 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 29: 187-197.

Ferreira, C., Capella, A.N., Sitnik, R. and Terra, W.R. 1994. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp Biochem Physiol*;107A:631–641.

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

Ferreras,J.M., Barbieri,L., Girbes,T., Battelli,M.G., Rojo,M.A., Arias,F.J., Rocher,M.A., Soriano,F., Mendez,E. and Stirpe,F. 1993. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochim. Biophys. Acta* 1216: 31-42.

Filippova M., Filippov V. A., Kagoda M., Garnett T., Fodor N., Duerksen-Hughes P. J. 2008. Complexes of Human Papillomavirus 16 E6 Proteins Form Pseudo-DISC Structures During TNF-mediated Apoptosis. *J. Virol.* No prelo (doi:10.1128/JVI.01365-08)

Follmer,C. 2008. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 69: 18-28.

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

Follmer,C., Barcellos,G.B., Zingali,R.B., Machado,O.L., Alves,E.W., Barja-Fidalgo,C., Guimaraes,J.A. and 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.* 360: 217-224.

Follmer,C., Carlini,C.R., Yoneama,M.L. and Dias,J.F. 2002. Analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res.* 189: 482-486.

Ford,B.J.; Strayer,J.R.; Reid,J., Blount, V.N.; Riddle,T.C. 1975. The literature of arthropods associated with soybean, a bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Urbana: Illinois National History Survey, 15p.

Freitas-Silva,M. 2002. Genes de urease na *Canavalia ensiformis*: Caracterização de um novo membro, JBURE-II. Potencial como bioinseticida. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Fujii,J., Matsui,T., Heatherly,D.P., Schlegel,K.H., Lobo,P.I., Yutsudo,T., Ciruolo,G.M., Morris,R.E. and Obrig,T. 2003. Rapid apoptosis induced by Shiga toxin in HeLa cells. *Infect. Immun.* 71: 2724-2735.

Gallo, D., Nakano, O. Neto, S.S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Filho, E.B., Parra, J.R.P., Zicchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.P., Omoto, C. 2002. Importância das Pragas das Plantas. *In Entomologia Agrícola*. Edited by Gallo *et al.* Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz- FEALQ, Piracicaba/SP. pp. 5-9.

Gan,Y.H., Peng,S.Q., and Liu,H.Y. 2000. Molecular mechanism of apoptosis induced by ricin in HeLa cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 21: 243-248.

Gatehouse,A.M.R., Barbieri,L., Stirpe,F. and Croy,R.R.D. 1990. Effects of ribosome inactivating proteins on insect development - differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 43-51.

Gatehouse, A.M.R., Boutler, D. and Hilder, V.A. 1992. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crop for insect resistance. In: *Biotechnology in Agriculture, Plant Gen Man Crop Protect*, CAB International, 7:155-181.

Gatehouse AMR, Davison GM, Stewart JN, Galehouse LN, Kumar A, Geoghegan IE, Birch ANE, Gatehouse JA. 1999. Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. Source: *Mol Breeding*. 5: 153-165.

Gayoso, M.J., Muñoz, R., Arias, Y., Villar, R., Rojo, M.A., Jimenez, P., Ferreras, J.M., Aranguez, I. and Girbes, T. 2005. Specific dose-dependent damage of Lieberkuhn crypts promoted by large doses of type 2 ribosome-inactivating protein nigrin b intravenous injection to mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207: 138-146.

Gazzoni, D.L.; Oliveira, E.B; Corso, I.C.; Ferreira, B.S.C.; Villas Boas, G.L.; Moscardi, F.; Panizzi, A. R. 1988. Manejo de pragas da soja. Londrina: EMBRAPA, CNPSo, 44p. (Circular Técnica).

Ghazaleh, F.A., Francischetti, I.M., Gombarovits, M.E. and Carlini, C.R. 1997. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Arch. Biochem. Biophys.* 339: 362-367.

Gioria, V.V., Jager, V. and Claus, J.D. 2006. Growth, metabolism and baculovirus production in suspension cultures of an *Anticarsia gemmatalis* cell line. *Cytotechnology*. 52:113-124.

Girbes, T., Barbieri, L., Ferreras, M., Arias, F.J., Rojo, M.A., Iglesias, R., Alegre, C., Escarmis, C. and Stirpe, F. 1993. Effects of ribosome-inactivating proteins on *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens* translation systems. *J. Bacteriol.* 175: 6721-6724.

Girbes, T., Ferreras, J.M., Arias, F.J. and Stirpe, F. 2004. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini. Rev. Med. Chem.* 4: 461-476.

Goldraij, A. and Polacco, J.C. 1999. Arginase is inoperative in developing soybean embryos. *Plant Physiol.* 119: 297-304.

Gombarovits, M.C. 1999. Peptídeos entomotóxicos gerados a partir de CNTX: obtenção, isolamento, propriedades biológicas e caracterização físico-química. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Gopalakrishna, P. and Khar, A. 1995. Comet assay to measure DNA damage in apoptotic cells. *J. Biochem. Biophys. Methods* 30: 69-73.

Grace, T.D. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* 195: 788-789.

Granados, R.R., Guoxun, L., Dersksen, A.C. and McKenna, K.A. 1994. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 260-266.

Greene, G.L., Leppla, N.C. and Dickerson, W.A. 1976. Velvetbeans caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69: 487-488.

Griffiths, G.D., Leek, M.D. and Gee, D.J. 1987. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *J. Pathol.* 151: 221-229.

Grubor-Lajsic, G., Block, W., Telesmanic, M., Jovanovic, A., Stevanovic, D., and Baca, F. 1997. Effect of cold acclimation on the antioxidant defense system of two larval Lepidoptera (Noctuidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 36: 1-10.

Gruden, K., Strukelj, B., Popovic, T., Lenarcic, B., Bevec, T., Brzin, J., Kregar, I., Herzog-Velikonja, J., Stiekema, W.J., Bosch, D., and Jongsma, M.A. 1998. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochem Mol. Biol.* 28: 549-560.

Günhan, E., Swe, M., Palazoglu, M., Voss, J. and Chalupa, L. 2008. Expression and purification of cysteine introduced recombinant saporin. *Protein Express. Purif.* 58: 203-209.

Halliwell,B. and Gutteridge, J.C. 2000. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ed. Oxford, New York.

Haq, S.K. Atif, S.M. and Khan, R.H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Arch. Biochem. Biophys. 431:145-159.

Hartley,M.R. and Lord,J.M. 2004. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. Biochem. Biophys. Acta 1701: 1-14.

Hartmann,A., Plappert,U., Poetter,F. and Suter,W. 2003. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. Mutat. Res. 536: 27-38.

Hartmann,A., Schumacher,M., Plappert-Helbig,U., Lowe,P., Suter,W. and Mueller,L. 2004. Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. Mutagenesis 19: 51-59.

Hartmann,A. and Speit,G. 1994. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cells gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. Environ. Mol. Mutagen. 23: 299-305.

Hermes-Lima,M. and Storey,K.B. 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. Am. J. Physiol 268: R1386-R1393.

Hink,W.F. 1972. A catalog of invertebrate cell lines. *In* Invertebrate Tissue Culture. *Edited by* C.Vago. Academic Press, New York. pp. 363-387.

Hink,W.F. 1976. The second compilation of insect cell lines and culture media. *In* Invertebrate Tissue Culture Research Applications. *Edited by* K.Maramorosch. Academic Press, New York. pp. 319-369.

Hink,W.F. 1980. The 1979 compilation of invertebrate cell lines and culture media. *In* Invertebrate Systems In Vitro. *Edited by* E.Kurstak, K.Maramorosch, and A.Dubendorfer. Elsevier, Amsterdam - Netherlands. pp. 533-578.

Hink,W.F. and Bezanson,D.R. 1985. Invertebrate cell culture media and cell lines. *In* Techniques in the Life Science. *Edited by* E.Kurstak. Elsevier Scientific Publishers Ireland, County Clare, Ireland . pp. 1-30.

Hink,W.F. and Hall,R.L. 1989. Recently established invertebrate cell lines, in. *In* Invertebrate Cell System Applications. *Edited by* J.Mitsubishi. CRC Press, BocaRaton, FL pp. 269-293 .

Hoffmann-Campo, C. B., Moscardi, F., Corrêa-Ferreira, B. S., Oliveira, L. J., Sosa-Gomez, D. R., Panizzi, A. R., Corso, L. C., Gazzoni, D. L. e Oliveira, E. B. 2000. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Embrapa Soja (Circular Técnica, 30) , 70p. Londrina/PR.

Hughes,J.N., Lindsay,C.D. and Griffiths,G.D. 1996. Morphology of ricin and abrin exposed endothelial cells is consistent with apoptotic cell death. *Hum. Exp. Toxicol.* 15: 443-451.

Iglesias,R., Arias,F.J., Rojo,M.A., Escarmis,C., Ferreras,J.M. and Girbes,T. 1993. Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Lett.* 325: 291-294.

Irvin,J.D. 1975. Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 169: 522-528.

Jennings,C., West,J., Waine,C., Craik,D. and Anderson,M. 2001. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98: 10614-10619.

Jennings,C.V., Rosengren,K.J., Daly,N.L., Plan,M., Stevens,J., Scanlon,M.J., Waine,C., Norman,D.G., Anderson,M.A. and Craik,D.J. 2005. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do *Mobius strips* exist in nature? *Biochemistry* 44: 851-860.

Jones,N.L., Islur,A., Haq,R., Mascarenhas,M., Karmali,M.A., Perdue,M.H., Zanke,B.W. and Sherman,P.M. 2000. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells

that is regulated by the Bcl-2 family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278: G811-G819.

Kausalya,S., Hegde,S.P., Bright,J.J. and Khar,A. 1994. Mechanism of antibody-dependent natural killer cell-mediated AK-5 tumor cell death. *Exp. Cell Res.* 212: 285-290.

Kim,W.H., Park,W.B., Gao,B., and Jung,M.H. 2004. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 66: 1383-1396.

Knowles,B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advances Insect Physiol.* 24: 275-308.

Kochi,S.K. and Collier,R.J. 1993. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp. Cell Res.* 208: 296-302.

Kojio,S., Zhang,H., Ohmura,M., Gondaira,F., Kobayashi,N. and Yamamoto,T. 2000. Caspase-3 activation and apoptosis induction coupled with the retrograde transport of shiga toxin: inhibition by brefeldin A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 29: 275-281.

Komatsu,N., Oda,T. and Muramatsu,T. 1998. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and pseudomonas toxin. *J. Biochem. (Tokyo)* 124: 1038-1044.

Krishnan,N. and Kodrik,D. 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): Are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J. Insect Physiol.* 52: 11-20.

Kumar,O., Lakshmana Rao,P.V., Pradhan,S., Jayaraj,R., Bhaskar,A.S., Nashikkar,A.B., and Vijayaraghavan,R. 2007. Dose dependent effect of ricin on DNA damage and antioxidant enzymes in mice. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 53: 92-102.

Kumar,O., Sugendran,K., and Vijayaraghavan,R. 2003. Oxidative stress associated hepatic and renal toxicity induced by ricin in mice. *Toxicon* 41: 333-338.

- Kuroda, M., Ishimoto, M., Suzuki, K., Kondo, H., Abe, K., Kitamura, K., Arai, S., 1996. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insect pests *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 209-212.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G.M. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation in to amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.
- Lampe, K.F. 1991. Toxic effects of plant toxins. *In Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. Edited by M.O.Amdur, J.Doull and C.D.Klaassen.* Pergamon Press, New York.
- Langer, M., Mockel, B., Eck, J., Zinke, H. and Lentzen, H. 1999. Site-specific mutagenesis of mistletoe lectin: the role of RIP activity in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 944-948.
- Lea, P.J., Hughes, J.S. and Miflin, B.J. 1979. Glutamine-dependent and asparagine-dependent protein synthesis in maturing legume cotyledons cultured *in vitro*. *J Exp. Bot.* 30: 437-529.
- Leiderman, L.M. and Sauer, H.F.G. 1953. A lagarta dos milharais. *O Biológico.* 19:105-113.
- Leist, M. and Jaattela, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 589-598.
- Leppla, N.C., Ashley, T.R., Guy, R.H. and Butler, G.D. 1977. Laboratory life history of the velvetbean caterpillar. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70: 217-220.
- Liang, H., Zhu, Y.F., Zhu, Z., Sun, D.F., and Jia, X. 2004. Obtainment of transgenic wheat with the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) gene and analysis of resistance to aphid. *Yi. Chuan Xue. Bao.* 31: 189-194.
- Lord, J.M., Roberts, L.M. and Robertus, J.D. 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* 8: 201-208.

- Louis,S., Delobel,B., Gressent,F., Rahioui,I., Quillien,L., Vallier,A. and Rhabe,Y. 2004. Molecular and biological screening for insect-toxic seed albumins from four legume species. *Plant Science* 167: 705-714.
- Lynn,D.E. 2002. Available lepidopteran insect cell lines. *In Methods in Molecular Biology : Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. Edited by D.W.Murhammer. Humana Press Inc., Totowa, NJ.*
- Marczynski,B., Rihs,H.P., Rossbach,B., Holzer,J., Angerer,J., Scherenberg,M., Hoffmann,G., Bruning,T.and Wilhelm,M. 2002. Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and DNA strand breaks in white blood cells of occupationally exposed workers: comparison with ambient monitoring, urinary metabolites and enzyme polymorphisms. *Carcinogenesis* 23: 273-281.
- Mathews,M.C., Summers,C.B. and Felton,G.W. 1997. Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem.* 4: 57-68.
- Mobley,H.L., Island,M.D. and Hausinger,R.P. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451-480.
- Morimoto,H. and Bonavida,B. 1992. Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 149: 2089-2094.
- Mukhopadhyay,I., Chowdhuri,D.K., Bajpayee,M. and Dhawan,A. 2004. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 19: 85-90.
- Muldoon,D.F., Bagchi,D., Hassoun,E.A. and Stohs,S.J. 1994. The modulating effects of tumor necrosis factor alpha antibody on ricin-induced oxidative stress in mice. *J. Biochem. Toxicol.* 9: 311-318.
- Muldoon,D.F., Hassoun,E.A. and Stohs,S.J. 1992. Ricin-induced hepatic lipid peroxidation, glutathione depletion, and DNA single-strand breaks in mice. *Toxicol* 30: 977-984.

Muldoon,D.F., Hassoun,E.A. and Stohs,S.J.1996. Role of iron in ricin-induced lipid peroxidation and superoxide production. Res. Commun. Mol. Path. 92:107-118.

Mulinari, F.; Freitas-Silva, M. A.; Grossi-De-Sá, M.F.; Moraes, M. G.; Kurtenbach, E.; Carlini, C. R. Toxina praguicida, construção gênica e método de controle de pragas. 2004. Patente: depósito em 08/04/2004, no INPI-RS, com o número provisório 001120/RS.

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

Mulinari-Fontana,F. 2008. Ureases de *Canavalia ensiformis* e peptídeo inseticida derivado. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

Mundy,J., Leah,R., Boston,R., Endo,Y. and Stirpe,F. 1994. Genes encoding ribosome-inactivating proteins. Plant Mol. Biol. Rep. 12: 60-62.

Murdock, L.L.Shade, R.E., Promeroy, M.A., 1988. Effects of E-64, a cysteine proteinase-inhibitor, on cowpea weevil growth, development, and fecundity. Environ. Entomol. 17, 467-469.

Nagadhara,D., Ramesh,S., Pasalu,I.C., Rao,Y.K., Sarma,N.P., Reddy,V.D., and Rao,K.V. 2004. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (gna) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). Theor. Appl. Genet. 109: 1399-1405.

Narayanan,S., Surendranath,K., Bora,N., Surolia,A. and Karande,A.A. 2005. Ribosome inactivating protein and apoptosis. FEBS Lett. 579: 1324-1331.

Narayanan,S., Surolia,A., and Karande,A.A. 2004. Ribosome-inactivating protein and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells. Biochem. J. 377: 233-240.

Nicolas,E., Beggs,J.M., Haltiwanger,B.M. and Taraschi,T.F. 1998. A new class of DNA glycosylase/apurinic/apyrimidinic lyases that act on specific adenines in single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* 273: 17216-17220.

Nicolas,E., Beggs,J.M. and Taraschi,T.F. 2000. Gelonin is an unusual DNA glycosylase that removes adenine from single-stranded DNA, normal base pairs and mismatches. *J. Biol. Chem.* 275: 31399-31406.

Nicholson,G.M. 2007. Fighting the global pest problem: preface to the special Toxicon issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon* **49**: 413-422.

Nielsen,K. and Boston,R.S. 2001. Ribosome-inactivating proteins: A Plant Perspective. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 785-816.

Niles,A.L., Moravec,R.A., Eric,H.P., Scurria,M.A., Daily,W.J. and Riss,T.L. 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* 366: 197-206.

Obrig,T.G. 1997. Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease. *Front Biosci.* 2: d635-d642.

Olive,P.L. and Banath,J.P. 1992. Growth fraction measured using the comet assay. *Cell Prolif.* 25: 447-457.

Olive,P.L., Banath,J.P. and MacPhail,H.S. 1994. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res.* 54: 3939-3946.

Olive,P.L., Frazer,G., and Banath,J.P. 1993. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat. Res.* 136: 130-136.

Olive,P.L., Vikse,C.M., and Banath,J.P. 1996. Use of the comet assay to identify cells sensitive to tirapazamine in multicell spheroids and tumors in mice. *Cancer Res.* 56: 4460-4463.

- Oliveira, J. V. 1987. Caracterização e controle dos principais insetos do arroz irrigado. *Lavoura arrozeira* 40[374], 17-24.
- Olsnes,S., Refsnes,K. and Pihl,A. 1974. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature* 249: 627-631.
- Olsson,T., Gulliksson,H., Palmeborn,M., Bergstrom,K. and Thore,A. 1983. Leakage of adenylate kinase from stored blood cells. *J. Appl. Biochem* 5: 437-445.
- Peumans,W.J., Hao,Q. and Van Damme,E.J. 2001. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.* 15: 1493-1506.
- Peumans,W.J. and Van Damme,E.J. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352.
- Piovesan, A. R. ; Stanisçuaski, F. ; Marco-Salvadori, J. ; Real-Guerra, R. ; Defferrari, M. S. and Carlini, C. R.2008. Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect Biochem Molec.*38: 1023-1032.
- Pires-Alves,M., Grossi-de-Sa,M.F., Barcellos,G.B., Carlini,C.R. and Moraes,M.G. 2003. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean (*Canavalia ensiformis* (L.)). *Plant Cell Physiol.* 44: 139-145.
- Polacco,J.C. and Holland,M.A. 1993. Roles of urease in plant cells. *Internat. Rev. Cytol.* 145: 65-103.
- Polacco,J.C. and Winkler,R.G. 1984. Soybean Leaf Urease: A Seed Enzyme? *Plant Physiol.* 74: 800-803.
- Pritsos,C.A., Pardini,L.L., Elliott,A.J. and Pardini,R.S. 1988. Relationship between the antioxidant enzyme DT-diaphorase and tumor response to mitomycin C treatment. *Basic Life Sci.* 49: 713-716.
- Pulver,E.L. 2001. Brecha de rendimento de arroz en America Latina y la region del caribe. IRGA, Porto Alegre/RS.

Rao PVL, Jayaraj R, Bhaskar ASB, Kumar O, Bhattacharya R, Saxena P, Dash PK and Vijayaraghavan R. 2005. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. 69:855-865.

Reisbig,R., Olsnes,S. and Eiklid,K. 1981. The cytotoxic activity of Shigella toxin. Evidence for catalytic inactivation of the 60 S ribosomal subunit. J. Biol. Chem. 256: 8739-8744.

Rhiel, M., Mitchell-Logean, C.N. and Murhammer,D.W. 1997. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. Biotechnol Bioeng 55:909–920

Ribeiro,B.M., Gatti,C.D., Costa,M.H., Moscardi,F., Maruniak,J.E., Possee,R.D. and Zanotto,P.M. 2001. Construction of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV-2D) harbouring the beta-galactosidase gene. Arch. Virol. 146: 1355-1367.

Riss,T.L. and Moravec,R.A. 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. Assay. Drug Dev. Technol. 2: 51-62.

Roberts,W.K. and Selitrennikoff,C.P. 1986. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley. Biochim. Biophys. Acta 880: 161-170.

Roncuzzi,L. and Gasperi-Campani,A. 1996. DNA-nuclease activity of the single-chain ribosome-inactivating proteins dianthin 30, saporin 6 and gelonin. FEBS Lett. 392: 16-20.

Sauvion N, Charles H, Febvay G, Rahbe Y. 2004. Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Entomol Exp Appl. 110:31-44.

Siddique,H.R., Chowdhuri,D.K., Saxena,D.K., and Dhawan,A. 2005. Validation of *Drosophila melanogaster* as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. Mutagenesis 20: 285-290.

Sieburth,P.J. and Maruniak,J.E. 1988. Growth characteristic of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 24: 195-198.

Sikriwal,D., Ghosh,P., and Batra,J.K. 2008. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. Int. J Biochem Cell Biol. 40: 2880-2888.

Silva,J., Freitas,T.R.O., Marinho,J.R. and Erdtmann,B. 2000. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet Assay) to environmental in vivo biomonitoring with native rodents. Genet. Mol. Biol. 23: 241-245.

Silva,C.P. and 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.

Singh,N.P., Mccoy,M.T., Tice,R.R. and Schneider,E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 184-191.

Smith,W.E., Kane,A.V., Campbell,S.T., Acheson,D.W., Cochran,B.H., and Thorpe,C.M. 2003. Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 71: 1497-1504.

Soberón,M., Fernández,L.E., Pérez,C., Gill,S.S. and Bravo, A. 2007. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. Toxicon. 49:597-600.

Spies,A.G. and Spence,K.D. 1985. Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, *Manduca*: SEM study. Tissue Cell 17: 379-394.

Sreedhar,A.S., Pardhasaradhi,B.V., Begum,Z., Khar,A. and Srinivas,U.K. 1999. Lack of heat shock response triggers programmed cell death in a rat histiocytic cell line. FEBS Lett. 456: 339-342.

Stanisçuaski, F., Ferreira-Dasilva, C.T., Mulinari, F., Pires-Alves, M. and Carlini, C.R. 2005. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45: 753-760.

Stanisçuaski, F., Te Brugge, V., Carlini, C.R. and Orchard, I. 2008. *In vitro* effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec in *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J. Insect Physiol.*, no prelo

Stebbins, N., Holland, M.A., Cianzio, S.R. and Polacco, J.C. 1991. Genetic Tests of the Roles of the Embryonic Ureases of Soybean. *Plant Physiol.* 97: 1004-1010.

Stebbins, N.E. and Polacco, J.C. 1995. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol.* 109: 169-175.

Stillmark, H. 1888. Über Ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Tese de doutorado, Universidade de Dorpad, Dorpad (Tartu), 1988 apud Liener, I.J.; Sharon, N.; Goldstein, I.J. The lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine. New York, Academic Press Inc, 600pp.

Stirpe, F. 2004. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44: 371-383.

Stirpe, F. and Barbieri, L. 1986. Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett.* 195: 1-8.

Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Falasca, A.I., Abbondanza, A., Lorenzoni, E. and Stevens, W.A. 1986. Bryodin, a ribosome-inactivating protein from the roots of *Bryonia dioica* L. (white bryony). *Biochem. J.* 240: 659-665.

Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A. and Stevens, W.A. 1983. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochem. J.* 216: 617-625.

- Stirpe,F., Olsnes,S., and Pihl,A. 1980. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 255: 6947-6953.
- Summers,C.B. and Felton,G.W. 1993. Antioxidant role of dehydroascorbic acid reductase in insects. *Biochim. Biophys. Acta* 1156: 235-238.
- Sumner,J.B. 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69: 435-441.
- Sumner,J.B. and Howell,S.F. 1936. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32: 227-237.
- Tam,J.P., Lu,Y.A., Yang,J.L. and Chiu,K.W. 1999. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 8913-8918.
- Tice,R.R., Agurell,E., Anderson,D., Burlinson,B., Hartmann,A., Kobayashi,H., Miyamae,Y., Rojas,E., Ryu,J.C. and Sasaki,Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35: 206-221.
- Tomazetto,G., Mulinari,F., Stanisçuaski,F., Settembrini,B., Carlini,C.R. and Ayub,M.A.Z. 2007. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enz. Microbiol Technol.* 41: 821-827.
- Torisky,R.S. and Polacco,J.C. 1990. Soybean roots retain the seed urease isozyme synthesized during embryo development. *Plant Physiol.* 94: 681-689.
- Ubatuba,F.B. 1955. Ocurrence of a trypsin inhibiting factor in the seeds of *Canavalia ensiformis*. *Rev. Bras. Biol.* 15: 1.
- Vaghef,H., Nygren,P., Edling,C., Berg,J. and Hellman,B. 1997. Alkaline single cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 395: 127-138.

- Van Damme,E.J.M., Hao,Q., Chen,Y., Barre,A., Vandebussche,F., Desmyter,S., Rouge,P. and Peumans,W.J. 2001. Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivating ribosomes. *Crit. Rev. Plant Science* 20: 395-465.
- Van Huyen,J.P., Bayry,J., Delignat,S., Gaston,A.T., Michel,O., Bruneval,P., Kazatchkine,M.D., Nicoletti,A. and Kaveri,S.V. 2002. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. *Mol. Med.* 8: 600-606.
- Vaughn,J.L., Goodwin,R.H., Tompkins,G.J. and McCawley,P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13: 213-217.
- Vervecken,W., Kleff,S., Pfuller,U. and Bussing,A. 2000. Induction of apoptosis by mistletoe lectin I and its subunits. No evidence for cytotoxic effects caused by isolated A- and B-chains. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 317-326.
- Villela,I.V., Lau,A., Silveira,J., Prá,D., Rolla,H.C. and Silveira,J. 2003. Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. *In Genética Toxicológica. Edited by J.Silva, Erdtmann, B., and J.A.P.Henriques.* Alcance, Porto Alegre/RS, Brasil.
- Vivanco,J.M., Savary,B.J. and Flores,H.E. 1999. Characterization of two novel type I ribosome-inactivating proteins from the storage roots of the andean crop *Mirabilis expansa*. *Plant Physiol.* 119: 1447-1456.
- Wang,J.R. and Tarr,D.A. 1955. On the mechanism of the urease action. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 6205-6206.
- Wang Z, Zhang K, Sun X, Tang K, Zhang J. 2005. Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene gna into maize plants. *J Biosci.* 30(5):627-38.
- Witte,C.P., Tiller,S.A., Taylor,M.A. and Davies,H.V. 2002. Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of (15)N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* 128: 1129-1136.

Yu,C.G., Mullins,M.A., Warren,G.W., Koziel,M.G. and Estruch,J.J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl. Environ. Microbiol. 63: 532-536.

Zerner,B. 1991. Recent advances in the chemistry of an old enzyme: urease. Bioorg. Chem. 19: 116-131.

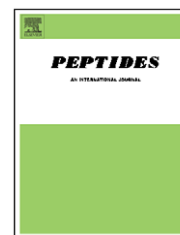
Zhang,D. and Halaweish,F.T. 2007. Isolation and characterization of ribosome-inactivating proteins from Cucurbitaceae. Chem. Biodivers. 4: 431-442.

Zhou,X., Li,X.D., Yuan,J.Z., Tang,Z.H. and Liu,W.Y. 2000. Toxicity of cinnamomin--a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 259-264.

Zychlinsky,A., Zheng,L.M., Liu,C.C. and Young,J.D. 1991. Cytolytic lymphocytes induce both apoptosis and necrosis in target cells. J. Immunol. 146: 393-400.

ANEXOS

Consta uma publicação envolvendo os ensaios biológicos citados no capítulo dois desta tese.

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/laprotoc>

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*

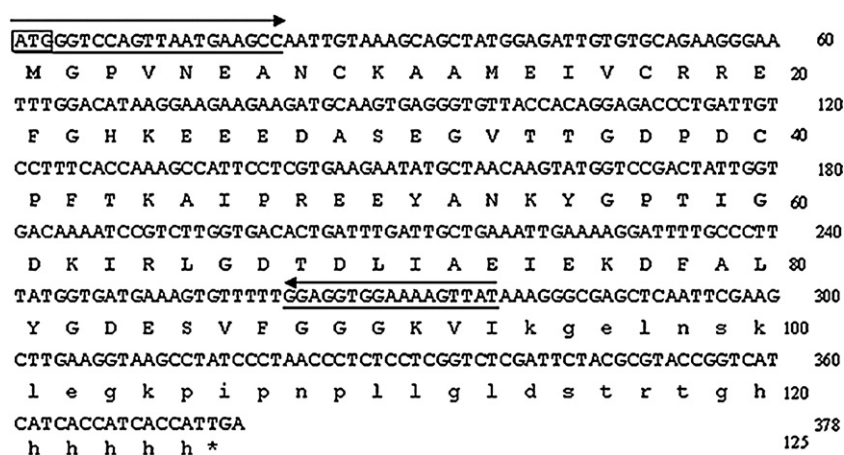


Fig. 1 – Nucleotide and its deduced amino acid sequence of a cDNA for the *Jaburetox-2Ec*. The deduced amino acid sequence is shown below their respective codons. Nucleotide and amino acid numbers of *Jaburetox* sequence are indicated on the right side. The box indicates an additional start codon. The 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-

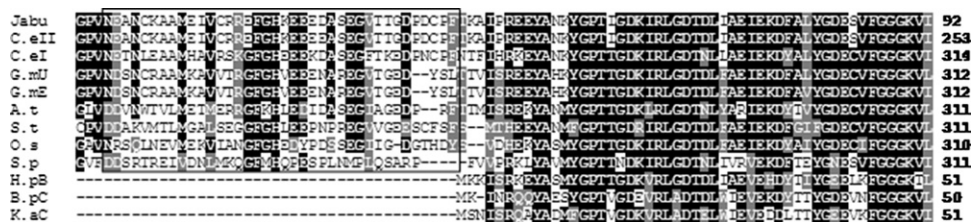


Fig. 2 – Alignment of Jaburetox-2Ec with other ureases. Alignment of Jaburetox-2Ec with plant, fungal and bacterial ureases using CLUSTAL W. The sequences are from *Canavalia ensiformis* JBURE-I (GenBank Accession no. AAA83831) C.eI, *Canavalia ensiformis* JBURE-II (AAN08919) C.eII, *Glycine max* embryo-specific (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-

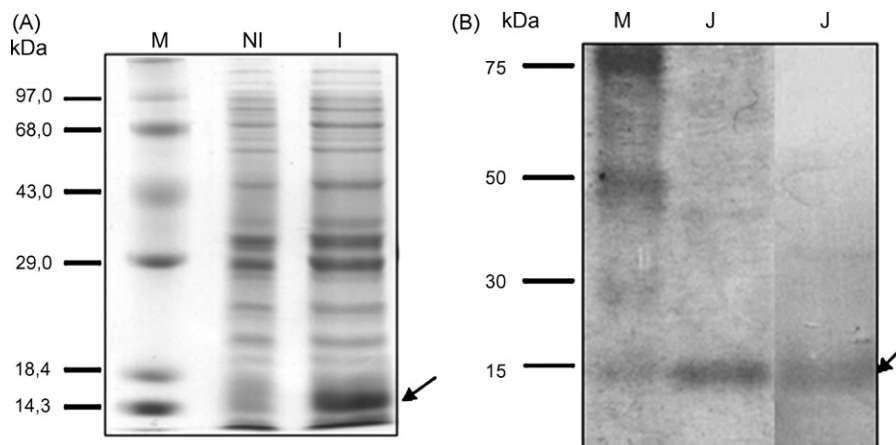


Fig. 3 – Production of recombinant Jaburetox-2Ec. (A) SDS-PAGE analysis of the recombinant Jaburetox-2Ec in cell lysates. Lane NI, without induction. Lane I, 1-h induction with 0.75 mM IPTG. (B) SDS-PAGE analysis of purified Jaburetox-2Ec. Lane J: 10 µg protein eluted from the Ni²⁺ affinity column chromatography. 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.

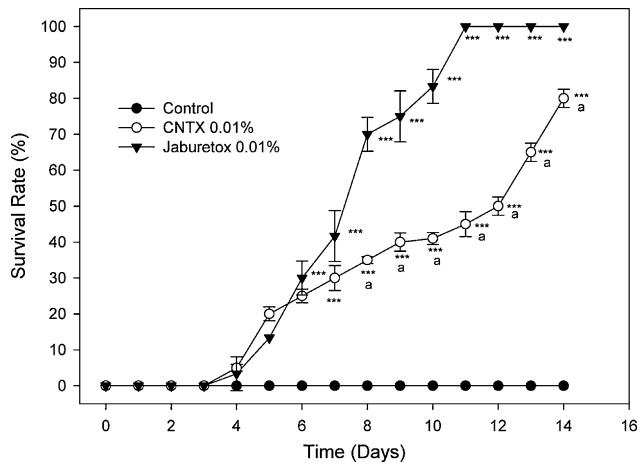


Fig. 4 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec on *D. peruvianus*. Third instar nymphs fed on artificial seeds containing 0.01% (w/w) Jaburetox-2Ec. Surviving insects were counted daily. Results are expressed as mean mortality and S.E.M. of three independent experiments in triplicates. Level of significance 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

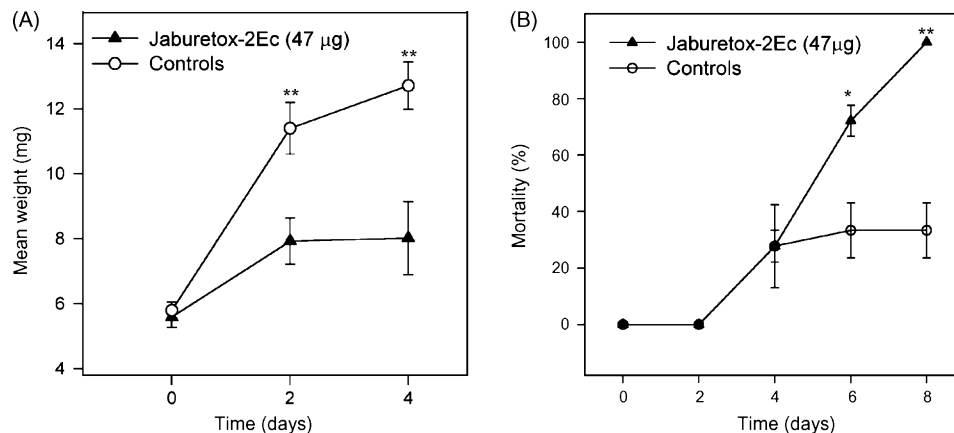


Fig. 5 – Insecticidal effect of Jaburetox-2Ec in *S. frugiperda*. Three groups of six third instars *S. frugiperda* received at days 0, 2 and 4, a foliar (*P. vulgaris*) disc containing 16.3 μg air-dried Jaburetox-2Ec. (A) Weight gain of individual insects at days 0, 2 and 4. (B) Mortality (%) of larvae 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

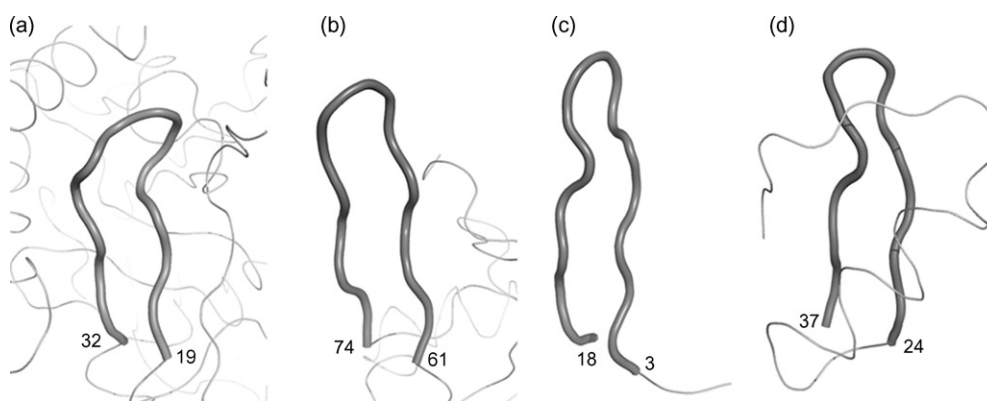


Fig. 6 – Ab Initio modeling of Jaburetox-2Ec and comparison to other β -hairpin motifs. β -Hairpin motifs (shown as cartoon representation in darker color) in (a) the intact *H. pylori* urease [24] (PDB code 1e9y), (b) one of the top 10 *ab initio* models of Jaburetox-2Ec, (c) protegrin [1] (PDB code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

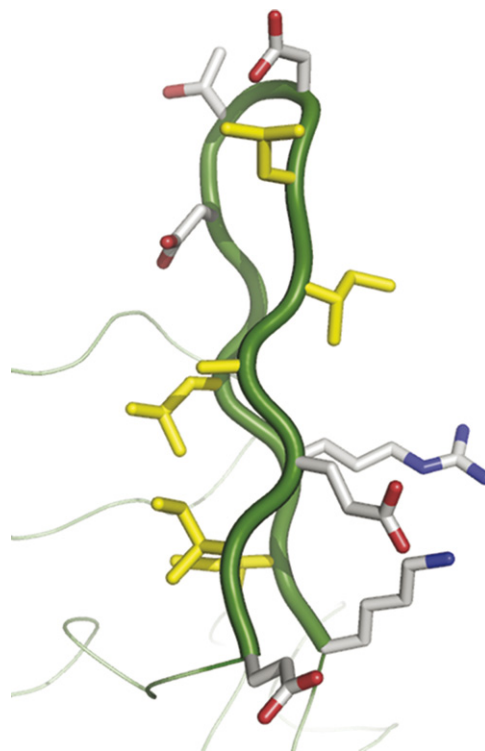


Fig. 7 – The amphiphilic character of the β -hairpin motif in one of the top 10 *ab initio* models of Jaburetox-2Ec. Hydrophobic residues (yellow carbon) predominate on the left face while hydrophilic residues (white carbon) form the majority of the other face. (For interpretation of the references to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

CURRICULUM VITAE

1.Dados Pessoais

Nome: Lúcia Rosane Bertholdo Vargas

Nome em publicações: Vargas, L.R.B.; Bertholdo-Vargas, L.R.

Filiação: David Ricieri Bertholdo e Maria Anna Cassol Bertholdo

Nascimento: Três de Maio/RS

e-mail: lrbvarga@ucs.br; lrbvarga@hotmail.com

Endereço Profissional: Laboratório de Controle de Pragas - LCPr
Instituto de Biotecnologia
Universidade de Caxias do Sul
Rua Francisco Getulio Vargas, 1130
Bairro Petropolis – CEP:95070-560
Fone (fax) – 54- 3218-2100 (Ramal:2663)
Caxias do Sul/RS

Laboratório de Proteínas Tóxicas- LAPROTOX
Departamento de Biofísica, IB
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Bento Gonçalves, 9500
Predio 43422, sala 204 – CEP:91501-970
Fone – 51-3308-7600
Porto Alegre/ RS

2. Formação Acadêmica/ Titulação

2.1. Graduação:

1984 – 1987: Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS/Brasil.

2.2. Pós-Graduação:

2.2.1. Mestrado:

1998-2000: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Instituto de Biotecnologia/ Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul/RS

Título: Caracterização do fungo *Nomuraea rileyi*

Orientadora: Dr^a. Neiva Monteiro de Barros – UCS

Co-orientador: Dr. Marcelo Rossato – UCS

3. Artigos Científicos Publicados

BERTHOLDO-VARGAS, L. R. ; ROSSATO, M. ; RIBEIRO, R. T. S. ; BARROS, Neiva Monteiro de . Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. Brazilian Archives of Biology and Technology, Brasil, v. 46, n. 1, p. 13-18, 2003.

MULINARI, F. ; STANISÇUASKI, F. ; BERTHOLDO-VARGAS, L. R. ; POSTAL, M. ; OLIVEIRA-NETO, O.B.; RIDGEN, D.J. ; GROSSI-DE-SA, M.F. ; CARLINI, C. R. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. Peptides (New York), v. 28, p. 2042-2050, 2007.

4. Artigo científico *in press*

BERTHOLDO-VARGAS, L. R. ; MARTINS, J. N.; BORDIN, D. ; SALVADOR, M. ; SCHAFFER, A. ; BARROS, N. M. ; BARBIERI, L.; STIRPE, F.; CARLINI, C. R. Type 1 ribosome-inactivating proteins entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). Journal of Insect Physiology (2008), doi:10.1016/j.jinsphys.2008.10.004

5. Capítulo de livros publicados

ONOFRE, S. B. ; BERTHOLDO-VARGAS, L. R. ; ROSSATO, M. ; SILVA, M. A. ; BOLDO, J. T. ; NUNES, A. R. F. ; AZEVEDO, J. L. Controle biológico de pragas na agropecuária por meio de fungos entomopatogênicos. In: Luciana Atti Serafini; Neiva Monteiro de Barros; João Lúcio de Azevedo. (Org.). Biotecnologia: avanços na agropecuária e na agroindústria. 1º ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2002, p. 295-317.

6. Publicação de Resumos e trabalhos apresentados em congressos

Poletto, G. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Benedetti, A. J. ; Barros, Neiva Monteiro de ; Specht, A. . *Aucula magnifica* (Lepidoptera:Noctuidae:Agaristinae) - Morfologia das fases de ovo e de larva. In: XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia, 2008, Curitiba. Livro de resumos, 2008.

Giani, Stefani Garcia; **Bertholdo-Vargas, L. R.**; Barros, Neiva Monteiro de . Atividade de proteases extracelulares do fungo *Nomuraea rileyi* sobre substrato cuticular de *Spodoptera frugiperda*. In: XVI Encontro de Jovens pesquisadores da UCS, 2008, Caxias do Sul. Anais do XVI Encontro de jovens pesquisadores da UCS, 2008.

Piaz, C. D. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Efeito da alimentação e do fungo *Nomuraea rileyi* no estresse oxidativo de *Anticarsia gemmatalis*. In: XVI

Encontro de jovens pesquisadores da UCS, 2008, Caxias do Sul. Anais do XVI Encontro de Jovens pesquisadores da UCS, 2008.

Bertholdo-Vargas, L. R. ; Martins, Juliana Nascimento ; Stirpe, Fiorenzo ; Barros, Neiva Monteiro de ; Carlini, Célia Regina . Avaliação da atividade inseticida e lesões de DNA induzidas em *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae)por RIPs tipo 1. In: X Simpósio de Controle Biológico, 2007, Brasília. X Simpósio de Controle Biológico, 2007.

Almeida, Márcio Ozelame de ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Serafini, Luciana Atti ; Barros, Neiva Monteiro de ; Rech, Juarez ; Gower, Adriana Escalona. Estudo da composição química da espécie *Podocarpus lambertii* e avaliação de sua ação sobre o carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: XIV Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2006, Caxias do Sul. Resumo dos trabalhos: XIV Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2006.

Pons, Emilia da Silva ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Serafini, Luciana Atti ; Barros, Neiva Monteiro de ; Rech, Juarez ; Gower, Adriana Escalona . Estudo da composição química da espécie *Araucaria angustifolia* e avaliação de sua ação sobre o carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: XIV Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2006, Caxias do Sul, 2006.

Marchetto, Eloisa ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Patogenicidade e virulência do fungo *Nomuraea rileyi* sobre noctuídeos praga. In: XIV Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2006, Caxias do Sul/RS, 2006.

Martins, Juliana Nascimento ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Nunes, Ana Rita Fonseca ; Barros, Neiva Monteiro de . Atividade de proteases extracelulares das linhagens E6, E6S1 e MFRp-gre do fungo *Metharizium* em presença e ausência de substrato cuticular. In: XIV Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2006, Caxias do Sul/RS, 2006.

Bertholdo-Vargas, L. R. ; Martins, Juliana Nascimento ; Stirpe, Fiorenzo ; Barros, Neiva Monteiro de ; Carlini, Célia Regina . Efeito inseticida de RIPss tipo 1 e de peptídeos derivados de ureases em lepidópteros. In: VIII Reunião anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre. Livro de resumos PPGBCM. Porto Alegre, 2006. p. 126.

Marchetto, Eloisa ; Barros, Neiva Monteiro de ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Rotta, Luciana Duarte ; Ribeiro, R. T. S. ; Pauletti, Gabriel . Produção de morangos usando controle microbiano de pragas em cultivo tradicional e hidroponia. In: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2005, Caxias do Sul. Resumo dos trabalhos: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. Caxias do Sul : Universidade de Caxias do Sul, 2005. p. 234.

Pons, Emília da Silva ; Gower, Adriana Escalona ; Serafini, Luciana Atti ; Barros, Neiva Monteiro de ; Rech, Juarez ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** . Estudo da composição química das espécies de *Araucaria angustifolia*, *Podocarpus lambertii* e *Pinus elliottii* e avaliação de sua ação sobre o carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2005, Caxias do Sul. Resumo dos trabalhos: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. Caxias do Sul : Universidade de Caxias do Sul, 2005. p. 235.

Martins, Juliana Nascimento ; Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Atividade proteolítica da linhagem E6 de *Metarhizium anisopliae* em presença e ausência de substrato cuticular. In: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2005, Caxias do Sul. Resumo dos Trabalhos: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. Caxias do Sul : Universidade de Caxias do Sul, 2005. p. 256.

Almeida, M. L. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Avaliação do crescimento do fungo *Nomuraea rileyi* FARLOW (SAMSON) em meio líquido. In: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2005, Caxias do Sul. Resumo dos trabalhos:

XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. Caxias do Sul : Universidade de Caxias do Sul, 2005. p. 266.

Frassini, Rafaela ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Efeitos de i.a. Deltametrina e i.a. Cyfluthrin Coumaphós sobre o crescimento do fungo *Beauveria* spp. In: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2005, Caxias do Sul. Resumo dos trabalhos: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. Caxias do Sul : Universidade de Caxias do Sul, 2005.

Bertholdo-Vargas, L. R. ; Stirpe, Fiorenzo ; Barros, Neiva Monteiro de ; Carlini, Célia Regina . Efeito Inseticidas de Rip's do tipo 1 e de peptídeos derivados de ureases em lepidópteros. In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2005, Porto Alegre/RS. Livro de resumos da VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre/RS : UFRGS, 2005. p. 106.

Specht, A. ; Gobatto, V. ; Silva, A. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de. Criação de ***Culex quinquefasciatus*** (Say, 1823) para bioensaios visando avaliar a eficiência de produtos a base de Bti. In: XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2004, Brasília. Livro de resumos do XXV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2004. p. 110.

Nunes, Ana Rita Fonseca ; Martins, Juliana Nascimento ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Condições de cultivo do fungo *Nomuraea rileyi*. In: XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado. Anais da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, 2004. p. 70.

Stumpp, Eugen ; Rech, Vânia ; Soares, Rosadília Araújo ; Tausendfreund, Luiz H ; Girardello, Francine ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de ; Sattler, Miguel Aloisio . Avaliação da sustentabilidade e eficiência de tratamentos alternativos para preservação de madeira de florestas plantadas no RS: *Araucaria angustifolia*, *Pinus* spp,

Eucalyptus grandis para o controle de cupins *Cryptotermes brevis*. In: 56° Reunião Anual da SBPC, 2004, Cuiabá/MT. Livro de Resumos, 2004.

Rech, Vânia ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Ação de Resíduos de Indústria cítrica sobre cupins de madeira seca. In: V Simpósio de Ciência e Tecnologia da UCS, 2004, Caxias do Sul/RS. Livro de resumos, 2004.

Martins, Juliana Nascimento ; Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Análise da atividade proteolítica de linhagens selvagens e mutante do fungo *Metarhizium* spp., visando o controle do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado/RS. Livro de Resumos, 2004. p. 264.

Rech, Vânia ; Casiraghi, L. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Compatibilidade do fungo *Beauveria* spp com acaricidas químicos. In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado/RS. Livro de resumos, 2004.

Barros, Neiva Monteiro de ; Heinzen, Horácio ; Cesio, Maria Verônica ; Acosta, Silvana ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Rech, Vânia ; Frizzo, Caren Desire . Avaliação da atividade biológica de ceras de laranja e lima sobre *Cryptotermes brevis*. In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado /RS. Livro de resumos, 2004.

Bertholdo-Vargas, L. R. ; Stanisçuaski, Fernanda ; Stirpe, Fiorenzo ; Barros, Neiva Monteiro de ; Carlini, Célia Regina . Ação entomotóxica de proteínas Inativadoras de ribossomos (RIP's) tipo I em *Anticarsia gemmatilis*. In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado /RS. Livro de resumos, 2004.

Martins, Juliana Nascimento ; Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Atividade proteolítica de linhagens selvagens e mutantes de *Metarhizium* spp. In: XII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2004, Caxias do Sul/RS. Resumo dos trabalhos, 2004. p. 166.

Rech, Vânia ; Casiraghi, L. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Compatibilidade do Fungo *Beauveria* spp com acaricidas químicos. In: XII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2004, Caxias do Sul/RS. Resumo dos trabalhos, 2004. p. 182.

Almeida, M. L. ; Albrecht, F. ; Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Compatibilidade do fungo *Nomuraea rileyi* com inseticidas químicos utilizados na cultura da soja. In: XII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2004, Caxias do Sul/RS. Resumo dos trabalhos, 2004. p. 176.

Onofre, S. B. ; Boldo, J. T. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Azevedo, J. L. ; Barros, Neiva Monteiro de . Patogenicidade de híbridos por fusão celular entre os entomopatogênicos *Metarhizium flavoviride* e *Metarhizium anisopliae* no controle biológico do carrapato do gado *Boophilus microplus*. In: Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2004, Caxias do Sul. Resumos do V Simpósio de Ciência e Tecnologia. Caxias do Sul : EDUCS, 2004. p. 123.

Barros, Neiva Monteiro de ; Cesio, Maria Verônica ; Acosta, Silvana ; Rech, Vânia ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Frizzo, Caren Desire . Ação de resíduos de indústria cítrica sobre cupins de madeira seca. In: Simpósio de Ciência e Tecnologia, 2004, Caxias do Sul/RS. Resumos do V Simpósio de Ciência e Tecnologia. Caxias do Sul/RS: EDUCS, 2004. p. 125.

Bertholdo-Vargas, L. R. ; Stanisçuaski, Fernanda ; Stirpe, Fiorenzo ; Barros, Neiva Monteiro de ; Carlini, Célia Regina . Ação entomotóxica de proteínas inativadoras de ribossomos (RIP's) em *Anticarsia gemmatalis*. In: VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2004, Porto Alegre. Livro de resumos da VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. Porto Alegre : UFRGS, 2004. p. 95.

Boldo, J. T. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Caracterização enzimática, avaliação de virulência e patogenicidade de linhagens do fungo entomopatogênico *Metarhizium* spp e compatibilidade com acaricidas químicos. In: XI Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2003, Caxias do Sul / RS. Livro de resumo do XI Encontro de Jovens Pesquisadores. Caxias do Sul/RS, 2003. p. 156.

Sartor, I. T. S. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Ribeiro, R. T. S. Controle biológico de fungos fitopatogênicos e insetos-praga, em cultura de tomate e manjerição no Centro de Repasse Tecnológico em Horti-fruti-aromáticos de Campestre da Serra/RS. In: XI Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2003, Caxias do Sul. Resumos do XI Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul/RS, 2003. p. 180.

Nunes, Ana Rita Fonseca ; Martins, Juliana Nascimento ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Efeitos de Fontes de Nitrogênio sobre o crescimento e a esporulação do fungo *Nomuraea rileyi*. In: XI Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2003, Caxias do Sul/RS. Resumos do XI Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. Caxias do Sul /RS, 2003. p. 178.

Boldo, J. T. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Compatibilidade de *Metarhizium* spp com acaricidas químicos utilizados no controle do carrapato do gado *Boophilus microplus* (CAN.1887). In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia 2003, 2003, Florianópolis/SC, 2003.

Bertholdo-Vargas, L. R. ; Rossato, M. ; Ribeiro, R. T. S. ; Barros, Neiva Monteiro de . RAPD, Virulência e atividade enzimática de linhagens do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*. In: 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, 2002, Manaus/AM. Livro de Resumos do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, 2002. p. 69.

Boldo, J. T. ; Onofre, S. B. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Dalfovo, V. ; Campos, R. A. ; Ries, J. ; Luz, J. ; Azevedo, J. L. ; Barros, Neiva Monteiro de . Avaliações preliminares da ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato bovino em condições de campo.

In: 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, 2002, Manaus/AM. Livro de Resumos do 19º Congresso Brasileiro de Entomologia, 2002. p. 247.

Boldo, J. T. ; Onofre, S. B. ; Azevedo, J. L. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Atividade proteásica e quitinásica do fungo entomopatogênico *Metarhizium* sp e sua virulência sobre o carrapato bovino *Boophilus microplus*. In: 6º Encontro de Biólogos da Região Sul, 2002, Porto Alegre. Livro de resumos do 6º Encontro de Biólogos da Região Sul, 2002. p. 20.

Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Avaliação da produção de quitinases pelo fungo *Nomuraea rileyi*. In: 6º Encontro de Biólogos da Região Sul, 2002, Porto Alegre. Livro de resumo do 6º Encontro de Biólogos da Região Sul, 2002. p. 18.

Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Boldo, J. T. ; Barros, Neiva Monteiro de . Utilização do fungo *Nomuraea rileyi* como alternativa de controle microbiológico da lagarta da soja. In: V Congresso Nacional de Ecologia, 2001, Porto Alegre. Livro de resumos do V Congresso Nacional de Ecologia, 2001. p. 448.

Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Barros, Neiva Monteiro de . Produção de proteases e quitinases pelo fungo *Nomuraea rileyi*. In: IX Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2001, Caxias do Sul. Livro de resumo do IX Encontro de Jovens Pesquisadores da Universidade de Caxias do Sul, 2001. p. 94.

Brandalise, R. ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Silva, M. A. . Por um ambiente melhor. In: 52 Reunião Anual da SBPC, 2000, Brasília. Resumos da 52º Reunião Anual da SBPC, 2000.

Nunes, Ana Rita Fonseca ; **Bertholdo-Vargas, L. R.** ; Dalfovo, V. ; Barros, Neiva Monteiro de . Virulência de *Nomuraea rileyi* à lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). In: 45º Congresso Nacional de Genética, 1999, Gramado/RS. Livro de resumos do 45º Congresso Nacional de Genética, 1999. v. 22. p. 799.

5.0. Participação de Banca examinadora de Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação

Albrecht, Francine., 2006. Efeito do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson sobre o desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818) (Lepidoptera:Noctuidae). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade de Caxias do Sul.

Colombi, Evandro. , 2007. Biologia de último instar de *Darphi araucariae*, *D. muscosa*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade de Caxias do Sul.

Cainelli, Vânia Rech., 2007. Parâmetros biológicos das fases larval e pupal de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera:Noctuidae:Heliothinae), em condições controladas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade de Caxias do Sul.

6.0. Supervisões e co-orientações concluídas:

Co-orientação de monografia: Boldo, J.T. Fatores envolvidos na patogenicidade e no controle integrado de *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) por *Metarhizium* spp. (Deuteromicete:Moniliaceae) 2003. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade de Caxias do Sul.

Co-orientação de monografia: Nunes, A. R. F. Produção do fungo *Nomuraea rileyi* em fermentação semi-sólida e avaliação da atividade proteolítica. 2003. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade de Caxias do Sul.