

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS DA
UREASE DE *Canavalia ensiformis***

Candidata: Msc. Melissa Postal

Orientadora: Célia R. Carlini

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

Porto Alegre, Junho de 2012

Membros da Banca Examinadora

Dr. Adriano Brandelli

Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Laboratório de Proteínas de Defesa de plantas, Universidade Federal do Ceará

Dr. Leonardo Nimrichter

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Geral, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Livia Kemttsch Rosa e Silva (Revisor e Membro Suplente)

Laboratório de Biologia Molecular de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica – IB e Centro de Biotecnologia, da UFRGS, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini. O trabalho realizado teve suporte financeiro da CAPES, CNPq, FAPERGS e FINEP.

AGRADECIMENTOS

À minha família que me acompanha e apoia sempre, me dando a certeza de ter já ganhado um grande prêmio: uma família maravilhosa;

Ao meu marido, companheiro e amigo Vinicius, parceiro dos momentos bons e ruins, com uma paciência quase infinita;

À Dra Valdirene Gomes e ao pessoal do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos – LFBM pela disponibilidade em me receber, pelos ensinamentos e pela hospitalidade;

Aos colegas do LAPROTOX que ajudaram diretamente a construir o meu caminho na área científica;

À minha orientadora Célia Carlini: fonte de inspiração, uma grande Cientista e uma grande Mulher, a quem tive a honra de trabalhar e conhecer.

Obrigada a todos!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	14
Ureases são proteínas multifuncionais	14
Peptídeos inseticidas derivados de urease	16
Ureases e peptídeos derivados com atividade antifúngica	18
Proteínas e peptídeos de plantas com atividade antifúngica	19
• Defensinas	20
• Quitinases	22
• Proteínas ligadoras de quitina	22
• Proteínas tipo ciclofilinas (imunofilinas, peptidilproli cis-trans isomerasas e proteínas ligadoras de ciclosporina A)	22
• Lectinas	23
• Osmotina e Taumatina	23
• Peroxidases	24
• LTPs	24
Micoses de importância clínica	25
• <i>Candida albicans</i> e outras espécies	26
Agentes antifúngicos	27
OBJETIVOS	30
MATERIAIS E MÉTODOS	31
Urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (JBU)	31
Produção e Purificação do Jaburetox-V5	31
Fungos	32
Hidrólise da JBU	32
Eletroforeses	32
Análises por Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massas	33

Similaridade de ureases com proteínas antifúngicas vegetais	33
Ensaio antifúngico:	34
Leveduras	34
Fungos filamentosos	34
Inibição da acidificação estimulada por glicose	35
Avaliação da permeabilidade celular	35
Avaliação da Produção de espécies reativas de oxigênio	36
Avaliação da viabilidade e atividade metabólica	36
Análises Estatística	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
Atividade da JBU sobre leveduras	38
Homologia de ureases com proteínas antifúngicas vegetais – identificação de prováveis domínios antifúngicos	51
Peptídeos antifúngicos derivados da JBU	53
Análise das frações hidrolisadas	57
Ensaio fungitóxico com o peptídeo Jaburetox –V5	59
Fungos filamentosos	59
Leveduras	62
DISCUSSÃO FINAL	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	68
ANEXO I	86
Curriculum Vitae	87
ANEXO II	91
Artigo publicado durante o doutorado.	91
ANEXO III	100
Manuscrito submetido para publicação	100

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Jaburetox-2Ec, um peptídeo recombinante derivado de urease. (a) diagrama representativo da posição do peptídeo jaburetox-2Ec em relação à sequência primária da isoforma de urease JBURE-IIb da *Canavalia ensiformis*; (b) modelo estrutural do peptídeo jaburetox-2Ec, com a seta indicando o motivo grampo beta, mostrado em maior detalhe em (c). (Retirado de Barros et al, 2009 e Mulinari et al, 2007)..... 17
- Figura 2 Curva de crescimento de *Candida tropicalis* e *K. marxianus* na presença de diferentes concentrações de JBU. Células foram incubadas com as amostras em meio Sabouraud e mantidas a 28 °C por 24 hs, sendo a absorbância da cultura lida a cada 12 hs. Cada ponto representa a média de em triplicatas. 39
- Figura 3. Avaliação das unidades formadoras de colônia após 24 h de incubação com 0,36 µM de JBU ou tampão. (A) *P. membranifaciens*; (B) *C. tropicalis*; (C) *C. albicans*; (D) *K. marxianus* e (E) *C. parapsilosis*. Células foram repicadas em meio livre de JBU, sendo adicionados 10 µL em cada ponto de diluição (fator de diluição 10x). As placas foram mantidas a 28 °C por 24 h. 40
- Figura 4. Curva de crescimento de *P. membranifasciens* na presença de JBU e JBU inibida com p-hidroximercuri-benzoato. As leveduras foram crescidas por 30 h na presença de JBU nativa ou inativada com inibidor específico. Os controles cresceram na presença de tampão. A avaliação do crescimento foi feita por absorbância A620. Cada ponto representa a média de pontos em triplicatas. 41
- Figura 5. Ensaio de permeabilização da membrana em *C. tropicalis* (A-D) e *P. membranifasciens* (E - H). As células foram tratadas com 0,72 µM de JBU por 24 h e incubadas com 0,2 µM de SYTOX green (C, D, G e H). A, B, E e F: controle. A, C, E e G: campo claro; B, D, F e H: fluorescência. Observar a redução do número de células nos painéis C e G. Aumento: Obj. 20x. 44
- Figura 6. Ensaio de permeabilização da membrana de *C. parapsilosis* (A-D) e *K. marxianus* (E - H). As células foram tratadas com 0,72 µM de JBU por 24 h e incubadas com 0,2 µM de SYTOX green (C, D, G e H). A, B, E e F: controle. A, C, E e G: campo claro; B, D, F e H: fluorescência. Observar a redução do número de células nos painéis C e G. Aumento: Obj. 20x. 46
- Figura 7. Alterações na morfologia celular: células de *C. tropicalis* foram crescidas a 28 °C, por 24 h, na presença de Tris 10 mM, pH 7,0 (A), (B e D) 0,36 µM de JBU e (C) 0,1% H₂O₂. (D) SYTOX Green. Aum.: Obj. 40 x. 47
- Figura 8: Efeito da JBU sobre a acidificação do meio induzida por glicose em células de *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Glicose (100 mM) foi adicionada ao meio depois de 30 m de incubação das células com 0,09 µM de JBU. A liberação de H⁺, medida como variação do pH, está indicada como total acumulado após 30 m. As barras representam média de pontos em triplicata. 48
- Figura 9: Ensaio para avaliar a atividade metabólica utilizando uma sonda fluorescente, FUN-1. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas por 2 h a 28 °C, na presença de Tris 10 mM pH 7,0 (A - C), e 0,36 µM de JBU (B - D). Após esse período, foi adicionado 1 µM de FUN-1 e as células mantidas por 1 h a 28 °C. As células foram visualizadas em microscópio equipado com diferentes filtros fluorescentes:(C e D)- Exc. 485 nm e emis. 620 nm; A e B campo claro. Aumento: obj.: 40x. 50
- Figura 10. Representação da urease majoritária de *C. ensiformis* (monômero) e as suas regiões que mostram homologia com proteínas antifúngicas. Na parte superior, estão marcadas as regiões que alinham com taumatinas (A) e faseína/quitinases (B). Na parte inferior da figura estão marcadas as regiões que alinham com peroxidase antifúngica (C) e as defensinas de ervilha(D) (Colaboração de Rodrigo Ligabue-Braun). 51
- Figura 11. Alinhamento das sequências das ureases majoritária e JBURE-II de *C.ensiformis* (monômero), das urease bacterianas de *K. aerogenes*, de *B. pasteurii*, de *H. pylori* e das ureases ubíqua e embrião específica de soja (*G. max*), com as proteínas antifúngicas taumatina, faseína/quitinases, peroxidase antifúngica e a defensina de ervilha. (Colaboração de Rodrigo Ligabue-Braun). 53
- Figura 12. Gel de poliacrilamida a 15% em SDS-Tricina do hidrolisado de JBU com papaína por 2 h, 37 °C, pH 6,5, relação enzima substrato 1:10. Canaleta a= JBU controle; b = Hidrolisado; c = papaína. MM = marcadores de massa molecular. Revelação com Coomassie coloidal..... 54
- Figura 13. Curva de crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *Mucor* sp na presença de hidrolisados da JBU com tripsina e/ou papaína, e com controles: tampão, tripsina, papaína e H₂O₂, como controle positivo. Esporos foram inoculados no meio PDB, incubados por 28 °C, por 16 h, seguido da adição das amostras. A placa de 96 poços, contendo o ensaio, foi incubada a 28 °C e a absorbância lida a cada 24 h. Cada valor representa a média de valores em triplicata. 56
- Figura 14. Crescimento de *C. tropicalis* após 24 h de incubação com JBU, JBU hidrolisada com papaína, papaína e tampão. A placa de 96 poços contendo o ensaio foi incubada a 28 °C e a absorbância lida em 24 h. Cada valor representa a média ± SD dos valores em triplicatas. 57

Figura 15. Localização das sequências dos peptídeos derivados da JBU pela hidrólise com papaína. As sequências sublinhadas correspondem àquelas sequenciadas por espectrometria de massas. A sequência sombreada corresponde ao N-terminal do peptídeo recombinante Jaburetox.	58
Figura 16. Jaburetox-V5. O peptídeo recombinante foi construído com base na sequência da isoforma de urease JBURE-II (Pires-Alves <i>et al.</i> , 2003; Mulinari <i>et al.</i> , 2011), que é 100% idêntica à JBU nessa mesma região.	59
Figura 17. Curva de crescimento dos fungos <i>Mucor</i> sp., <i>R. solani</i> , <i>P. herguei</i> na presença de diferentes concentrações de Jaburetox. A placa de 96 poços foi incubada a 28 °C e a absorbância lida a cada 24 h. Cada valor representa a média dos valores das triplicatas.	61
Figura 18. Crescimento de <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>P. membranifasciens</i> após 18 h de incubação com o peptídeo Jaburetox-V5 e/o tampão. A placa de 96 poços contendo o ensaio foi incubada a 28 °C e a absorbância em 620 nm lida em 18h. Cada valor corresponde a média dos valores das triplicatas.	63
Figura 19. Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>P. membranifasciens</i> e <i>K. marxianus</i> na presença de Jaburetox-V5 (18 µM) ou tampão, a 28° C. O crescimento celular foi avaliado por absorbância em 620 nm, e acompanhado por 48 h. Cada ponto representa a média de pontos em triplicata.	64
Figura 20. Ensaio de permeabilização da membrana de <i>S. cerevisiae</i> (A - E). As células foram tratadas com 0,72 µM de Jaburetox -V5 (B e D) por 24 h e incubadas com 0,2 µM de SYTOX <i>green</i> (C e D). A e C: controle. A, B: campo claro; C, D: fluorescência. Aumento. : Obj. 20x.	65
Figura 21. Alterações na morfologia celular: células de <i>C. tropicalis</i> foram crescidas a 30 °C por 24 h na presença de 0,36 µM de Jaburetox. Aum.: Obj. 40x.	65

Lista de tabelas

Tabela 1 Ensaio entomotóxico com Jaburetox-2Ec:.....	17
Tabela 2: Unidades formadoras de colônias (UFCs): Após 24 h na presença de JBU ou de tampão, as células foram repicadas em meio livre de JBU/tampão. Os valores representam as UFCs da última diluição (10 ⁶) do experimento mostrado na figura 3:	41
Tabela 3: Resultado da espectrometria de massas da JBU hidrolisada com papaína (fração < 10kDa):.....	58

Lista de Abreviaturas

A: absorvância

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência adquirida

ATP: adenosina tri-fosfato

BDA: ágar batata dextrose

CIVS: estruturas vacuolares cilíndricas

CNTX: canatoxina

Cys: cisteínas

DL: dose letal

DNA: ácido desoxirribonucléico

JBU: jackbean (*Canavalia ensiformis*) urease

FUN-1: 2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide

HPLC: cromatografia líquida de alta pressão

HPU: urease de *Helicobacter pylori*

kDa: quilodaltons

LTPs: proteínas transportadoras de lipídeos

OD: optical density

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDB: caldo dextrose batata

RNA: ácido ribonucléico

RPM: rotações por minuto

SBU: soybean urease

SDS: dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE: Gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecil-sulfato de sódio

TFA: ácido trifluoroacético

RESUMO

Ureases (EC 3.5.1.5) são metaloenzimas que hidrolisam uréia para produzir amônia e dióxido de carbono. Essas proteínas têm atividade inseticida e fungicida, efeitos independentes da sua atividade ureolítica. A atividade inseticida de ureases depende, em parte, da liberação de peptídeos internos através da hidrólise por catepsinas digestivas do inseto. Um desses peptídeos foi isolado e um recombinante chamado Jaburetox –V5 foi produzido em *E. coli* a partir da sequência da urease. Outra propriedade relevante de ureases é sua atividade antifúngica, que ocorre em concentrações de 10^{-7} M para certos fungos filamentosos, causando danos à membrana celular, visualizados por microscopia eletrônica de varredura. Moléculas antifúngicas de origem vegetal representam uma alternativa estratégica para o surgimento de espécies resistentes de fungos. Sabendo que a atividade antifúngica das ureases é cerca de 3-4 de magnitude mais ativa do que a maioria das proteínas antifúngicas já descritas, neste trabalho, avaliamos o efeito tóxico da urease de *C. ensiformis* (JBU) sobre diferentes espécies de leveduras. Além disso, buscamos identificar as regiões responsáveis por essa atividade através da fragmentação da JBU por hidrólise enzimática. Os efeitos tóxicos da JBU também ocorrem em espécies de leveduras, indicando que atividade antifúngica não afeta somente fungos filamentosos. Os efeitos da JBU nas leveduras variam conforme o gênero e a espécie, tanto em termos qualitativos como quantitativos, indicando seletividade espécie-específica. Os efeitos fungitóxicos consistem de inibição da multiplicação, indução de alterações morfológicas com formação de pseudo-hifas, alterações do transporte de H^+ e no metabolismo energético, permeabilização de membranas, podendo ocorrer morte celular. Nas condições testadas, não houve produção de espécies reativas de oxigênio associada ao efeito fungitóxico da JBU. A hidrólise da JBU com papaína produziu fragmentos tóxicos com massa molecular ~ 10 kD. Esses hidrolisados foram analisados por espectrometria de massas e um fragmento contendo parte da sequência N-terminal do peptídeo entomotóxico Jaburetox foi encontrado. A atividade fungitóxica do peptídeo recombinante Jaburetox – V5 foi testada, sendo observada atividade tóxica sobre leveduras e fungos filamentosos. A atividade antifúngica do Jaburetox-V5 requer concentrações 2-3 vezes maiores do que aquela observada para a holoproteína JBU, indicando a possibilidade de que outros domínios da proteína estejam envolvidos nessa atividade. A descoberta de novos agentes antifúngicos é urgente e imperativa, devido ao

crescente número de casos de micoses invasivas. Ureases de plantas, como a JBU, e peptídeos derivados, podem representar uma nova alternativa para controle de fungos de importância clínica e fitopatogênicos, principalmente em se considerando a potente atividade, na faixa de 10^{-6} a 10^{-7} M . Estudos estrutura *versus* atividade adicionais, aprofundando a identificação de domínios antifúngicos, e a construção de recombinantes contendo esses domínios, são etapas futuras para avaliar o real potencial fungicida/fungistático das ureases e peptídeos derivados.

ABSTRACT

Ureases (EC 3.5.1.5) are metalloenzymes that hydrolyze urea to produce ammonia and carbon dioxide. These proteins have insecticidal and fungicidal effects not related to their enzyme activity. The insecticidal activity of urease is mostly dependent on the release of internal peptides consequent to hydrolysis of the ingested protein by insect digestive cathepsins. One of these peptides was isolated and its recombinant version, named Jaburetox-V5, was produced in *E. coli*. Another important property of ureases is their antifungal activity, which occurs at concentrations of 10^{-7} M for certain filamentous fungi, causing damage to the cell membranes, as visualized by scanning electron microscopy. Antifungal molecules from plants represent an alternative strategy to the emergence of resistant fungal species. Considering that the antifungal activity of urease is about 3-4 orders of magnitude more potent than most of the antifungal proteins already described, in this study, we evaluated the toxic effect of *Canavalia ensiformis* urease (JBU) on different species of yeast. Furthermore, studies aiming to identify antifungal domain(s) of JBU by enzymatic hydrolysis were carried out. The results showed that JBU exerts toxic effects on yeast species, indicating that antifungal activity is not restricted to filamentous fungi. The effects of JBU in yeast varied according to the genus and species of yeasts, both in qualitative and quantitative terms, indicating a species-specific selectivity. The fungitoxic effects consisted in inhibition of proliferation, induction of morphological alterations with formation of pseudo hyphae, changes in the transport of H^+ and carbohydrate metabolism, permeabilization of membranes, eventually leading to cell death. Under the conditions tested, there was no production of reactive oxygen species associated with the antifungal effect of JBU. Hydrolysis of JBU with papain resulted in fungitoxic fragments with molecular mass ~ 10 kD. These peptides were analyzed by mass spectrometry, revealing the presence of a fragment containing the N-terminal sequence of the entomotoxic peptide Jaburetox. We tested the recombinant peptide Jaburetox-V5 for antifungal effects and observed fungitoxic activity on yeast and filamentous fungi. The antifungal activity of Jaburetox-V5 requires 2-3 times larger concentrations than those observed for the holoprotein JBU, indicating the possibility that other protein domains are involved in this activity. The discovery of new antifungal agents is imperative to face the increasing number of cases of invasive mycoses. Plant ureases, such as JBU, and its derived peptides, may represent a new alternative to control

medically important and phytopathogenic fungi, especially considering their potent activity in the range of 10^{-6} to 10^{-7} M. More studies are necessary to clarify the structure *versus* activity relationships of ureases. Construction of mutants containing urease-derived antifungal domains is one of the necessary steps to assess the real fungicidal/fungistatic potential of ureases and derived peptides.

INTRODUÇÃO

Ureases são proteínas multifuncionais

Ureases (uréia amidohidrolases; EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes, que catalisam a reação de hidrólise da uréia à amônia e carbamato, o qual se decompõe espontaneamente para formar uma segunda molécula de amônia e dióxido de carbono. Apresentam ampla distribuição em plantas, fungos e bactérias, mas não são sintetizadas por animais (Carter *et al.*, 2009; Krajewska, 2009).

Em bactérias, as ureases participam do metabolismo do nitrogênio, podendo ser constitutivas ou induzidas. Essas ureases possuem 2 ou 3 subunidades menores, que se alinham na cadeia polipeptídica única das ureases vegetais, com as quais têm 50-60% de identidade de sequência. A maior parte das ureases bacterianas caracterizadas até o momento são do tipo (ABC)₃, como a urease das bactérias patogênicas *Proteus mirabilis* e *Klebsiella aerogenes*, e das bactérias do solo *Bacillus pasteurii* e *Bradyrhizobium japonicum*. A urease da espiroqueta *Helicobacter pylori*, agente etiológico de gastrite e câncer gástrico, apresenta estrutura (AB)₃. Assim como as ureases vegetais, as enzimas microbianas também são níquel-dependentes (Moblely, *et al.*, 1995; Real-Guerra, *et al.*, 2012).

Em plantas e fungos, as ureases são homopolímeros de cadeias com cerca de 840 resíduos de aminoácidos, formando hexâmeros ou trímeros (Sirko & Brodzik, 2000; Follmer, 2008; Krajewska, 2009). O papel das ureases em plantas é atribuído, principalmente, ao reaproveitamento de nitrogênio a partir da uréia proveniente de algumas rotas metabólicas. Estudos demonstraram que plantas de soja desprovidas de urease apresentam acúmulo de uréia nas folhas e raízes, assim como o comprometimento do emprego da uréia como fonte de nitrogênio (Meyer-Bothling e Polacco, 1987; Polacco *et al.*, 1989; Polacco e Holland, 1993).

Na leguminosa *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco), foi identificada a existência de uma família de genes de urease, sendo estes genes induzidos por ácido abscísico, um fito-hormônio (Pires-Alves *et al.*, 2003), codificando pelo menos 3 isoformas da proteína: a) jbure-I (M65260), a urease clássica JBURE-I, cristalizada por Sumner em 1926 ; b) o gene jbure-IIb (acesso AF468788) com 86% de similaridade com a urease clássica (Mulinari, *et al.*, 2011); c) jbure-III, ou canatoxina (CNTX), um terceiro membro da família, uma proteína neurotóxica (Carlini e Guimarães, 1981).

A CNTX, um dímero de cadeias de 95 kDa ligadas não covalentemente, apresenta alta homologia e ~40% da atividade enzimática (Follmer *et al.*, 2001) da urease majoritária. A CNTX induz convulsões e morte (DL50 2-3 mg/kg) se injetada em ratos e camundongos, mas não é ativa por via oral nestes animais (Carlini & Guimarães, 1981). *In vitro*, a CNTX induz exocitose em plaquetas, neutrófilos, sinaptosomas, ilhotas pancreáticas, mastócitos etc. *In vivo*, a proteína em dose sub-letais induz hipóxia, hipoglicemia e tem atividade pro-inflamatória (Barja-Fidalgo *et al.*, 1992; Benjamin *et al.*, 1992). Estes efeitos são mediados por eicosanóides e por alterações dos níveis intracelulares de cálcio (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a; 1991b; Ghazaleh *et al.*, 1997). Posteriormente, foi demonstrado que a urease majoritária da semente possui as mesmas propriedades biológicas da CNTX, como ativação de plaquetas e ligação a gangliosídeos, exceto a toxicidade via parenteral em camundongos. Ureases também são dotadas de atividade inseticida e antifúngica (Carlini & Polacco, 2008). Esses efeitos não são dependentes da atividade ureolítica das proteínas, pois persistem após tratamento com o inibidor covalente p-hidroxi-mercuro-benzoato, implicando que outros "domínios" protéicos das moléculas estão envolvidos (Follmer *et al.*, 2001; 2004a; 2004b).

Até recentemente, somente estavam disponíveis as estruturas cristalográficas das ureases de *H. pylori*, *K. aerogenes* e *B. pasteurii*. Diversas tentativas de obtenção da estrutura cristalográfica de JBU foram realizadas desde sua primeira cristalização em 1926, no entanto, somente em 2010 a estrutura cristalográfica da JBU foi publicada (Balasubramanian e Ponnuraj, 2010). Com base nestas estruturas, estudos de modelagem e dinâmica molecular estão sendo aplicados às ureases vegetais e peptídeos derivados (Mulinari *et al.*, 2007; Ligabue-Braun, 2010) para auxiliar na identificação dos diferentes domínios dessas moléculas multifuncionais, em particular, das propriedades farmacológicas independentes da atividade ureolítica. Em estudos comparando duas ureases vegetais (*C. ensiformis* e a de soja *Glycine max*) e uma bacteriana (*B. pasteurii*), verificou-se que todas as isoenzimas induzem agregação plaquetária, apesar de diferenças nas doses efetivas, sendo que somente as ureases vegetais apresentam propriedades inseticidas (Follmer *et al.*, 2004a). A agregação plaquetária induzida pelas ureases de *B.pasteurii* (Olivera-Severo *et al.*, 2006) e de *H. pylori* (Wassermann *et al.*, 2010) também é modulada por eicosanóides derivados de lipoxigenases, como descrito para a CNTX (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991b).

Proteínas canatoxina-like e ureases estão presentes em várias plantas e acumulam-se na semente madura, sugerindo papel de defesa (Carlini & Grossi de Sá,

2002), hipótese reforçada pela observação de suas propriedades inseticidas (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-daSilva *et al.*, 2000) e fungicidas (Oliveira *et al.*, 1999). A urease majoritária da *C. ensiformis* e a urease embrião específica da soja mostraram também ter atividade inseticida, atuando em concentrações semelhantes à CNTX, da ordem de 0,05% m/m. Por outro lado, ureases bacterianas parecem ser desprovidas dessa propriedade (Follmer *et al.* 2004a e 2004b).

A CNTX é letal quando ingerida por insetos bruquídeos (ex: *Callosobruchus maculatus*) e percevejos (Hemiptera, ex: *Nezara viridula*, *Dysdercus peruvianus*, *Rhodnius prolixus*) que possuem digestão baseada em enzimas do tipo catepsinas, mas não afeta outros insetos (Lepidoptera, ex: *Manduca sexta*, *Anticarsia gemmatalis*; Orthoptera, ex: *Schistocerca americana*; Díptera, ex: *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*) que possuem enzimas digestivas do tipo serino proteases no seu trato digestório (Carlini *et al.*, 1997; Stanisçuaski *et al.*, 2005; Piovesan *et al.*, 2008). O efeito da CNTX sobre os insetos também varia de acordo com o ciclo de vida: adultos de *R. prolixus*, *D. peruvianus* e *N. viridula* não são sensíveis (Ferreira-da-Silva, *et al.*, 2000; Stanisçuaski *et al.*, 2005). A partir desses resultados surgiu a hipótese que as CNTX/ureases precisariam de uma etapa de “ativação” proteolítica.

Peptídeos inseticidas derivados de urease

Da hidrólise da CNTX com enzimas digestivas obtidas de larvas de *C. maculatus*, foram obtidos peptídeos (10-15 kDa) entomotóxicos com atividade sobre ninfas e adultos de *R. prolixus* (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000). Um desses peptídeos, chamado de Pepcanatox, foi isolado e caracterizado (Carlini, *et al.*, 2000) e, posteriormente, produzido um peptídeo recombinante equivalente, derivado da isoforma JBURE-II de *C.ensiformis*, chamado Jaburetox-2Ec (Figura 1) (Mulinari *et al.*, 2004; Mulinari, *et al.*, 2007). Este peptídeo tem 93 aminoácidos e é tóxico para muitos insetos, incluindo algumas espécies que não são afetadas pela urease nativa, como a lagarta *Spodoptera frugiperda* (Tabela 1) (Stanisçuaski & Carlini, 2012). A formação de peptídeos entomotóxicos a partir da urease de *C. ensiformis* por hidrólise com enzimas digestivas de insetos foi também demonstrada para os percevejos fitófagos *Dysdercus peruvianus* (Piovesan *et al.*, 2008) e *Oncopeltus fasciatus* (Defferrari *et al.*, 2011).

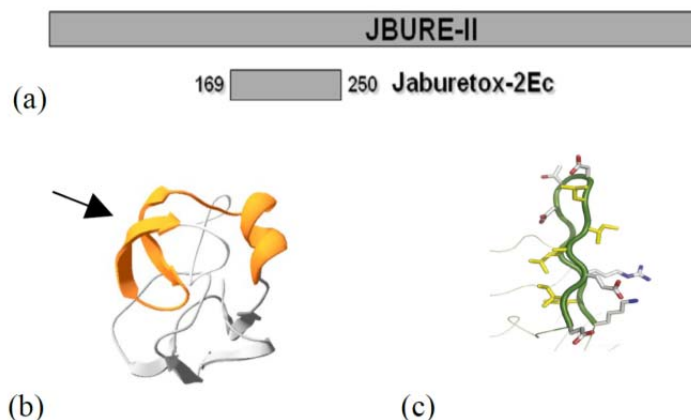


Figura 1. Jaburetox-2Ec, um peptídeo recombinante derivado de urease. (a) diagrama representativo da posição do peptídeo jaburetox-2Ec em relação à sequência primária da isoforma de urease JBURE-IIb da *Canavalia ensiformis*; (b) modelo estrutural do peptídeo jaburetox-2Ec, com a seta indicando o motivo grampo beta, mostrado em maior detalhe em (c). (Retirado de Barros et al, 2009 e Mulinari et al, 2007)

Tabela 1 Efeito entomotóxico do Jaburetox-2Ec

Inseto	Estágio	Administração	Efeito observado
<i>D. peruvianus</i>	3º ínstar	Oral	100% de mortalidade após 11 dias
	Adultos	Oral	Nenhum
<i>S. frugiperda</i>	3º ínstar	Oral	Diminuição do ganho de peso 100% de mortalidade após 8 dias
<i>R. prolixus</i>	4º ínstar	Injeção	100% de mortalidade após 48 hs
<i>T. infestans</i>	5º ínstar	Injeção	100% de mortalidade após 15 hs
	Adultos	Injeção	100% de mortalidade após 20 hs

Adaptado de Stanisçuaski & Carlini, 2012.

O mecanismo de ação inseticida das ureases e peptídeos derivados está sendo estudado. Observações anteriores do efeito da CNTX em *R. prolixus* sugeriram um comprometimento da diurese e balanço de eletrólitos (Carlini *et al.*, 1997). O efeito das ureases de *C.ensiformis* e do Jaburetox-2Ec diretamente sobre túbulos de Malpighi isolados mostram que os polipeptídeos inibem a diurese em doses abaixo do nanomolar, sendo que as rotas de sinalização recrutadas pela urease e pelo peptídeo para produzir o efeito antidiurético são diferenciadas (Stanisçuaski *et al.*, 2009).

Outros resultados sugerem que o Jaburetox-2Ec tem capacidade de inserir-se e alterar a estrutura de membranas, resultando em mudanças de permeabilidade celular (Barros *et al.*, 2009; Moro, 2010). Dados recentes indicam, ainda, que o peptídeo Jaburetox-2Ec, e também a urease intacta, formam “canais iônicos” com aparente seletividade para cloreto quando inseridos em membranas artificiais (Piovesan, 2009).

Alinhamentos de ureases vegetais na região que compreende o peptídeo inseticida mostram menor grau de identidade, quando comparada à molécula toda, sugerindo que a atividade inseticida dessas proteínas possa ter sido “modelada” durante o processo de co-evolução das plantas e insetos fitófagos (Mulinari *et al.*, 2007).

Ureases e peptídeos derivados com atividade antifúngica

Em 1999, Oliveira *et al.* demonstraram que, em testes de difusão radial em ágar, a CNTX produzia inibição do crescimento de fungos filamentosos. Posteriormente, Becker-Ritt *et al.*, 2007, observaram que as ureases embrião-específica de soja, (*Glycine max* - SBU), a urease majoritária de *C. ensiformis* (JBU) e de *H. pylori* (HPU) têm propriedades fungitóxicas em concentrações de 10^{-7} M, afetando os fungos filamentosos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium herguei*, *Curvularia lunata*, e *Aspergillus glaucus*, além de *Trichoderma pseudokoningii* e *Trichoderma viride*. Segundo Becker-Ritt *et al.* (2007), a atividade antifúngica mostra uma certa espécie-especificidade em relação à fonte da proteína e ao tipo de fungo, e é independente da atividade ureolítica, persistindo após o bloqueio do sítio ativo das ureases com p-hidroxi-mercuri-benzoato, um inibidor covalente irreversível da enzima (Follmer *et al.*, 2001). A urease de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*), isolada pela primeira vez no nosso grupo, também apresenta potente atividade antifúngica (Menegassi *et al.*, 2008). O efeito das ureases nos fungos testados mostrou ser fungicida, levando a lesões da parede e/ou membrana celular, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (Becker-Ritt *et al.*, 2007).

Plantas transgênicas de soja com deficiência na expressão da urease ubíqua foram mais susceptíveis a infecção pelos fungos *Rhizotocnia solani*, *Phomopsis sp.*, *P. herguei* e *Plakopsora pachyrhizi*, do que plantas transgênicas controles expressando essa urease (Wiebke-Strohm, *et al.*, 2012). Nesse trabalho, foi demonstrado que plantas com o gene

da urease ubíqua suprimido apresentam mais lesões causadas por *P. pachyrhizi* do que plantas suscetíveis, sugerindo uma infecção mais agressiva do patógeno.

Proteínas e peptídeos de plantas com atividade antifúngica

Doenças infecciosas causadas por fungos (especialmente aspergiloses, candidíase e infecções por fungos filamentosos) são um sério problema mundial, especialmente em países tropicais e subtropicais onde o número de pacientes imunossuprimidos (que frequentemente desenvolvem essas doenças) tem aumentado na última década. As drogas disponíveis para tratar essas micoses possuem baixa potência, pouca solubilidade, e alta toxicidade, causando severos efeitos colaterais. Além desses problemas, o aparecimento de linhagens resistentes aos atuais agentes terapêuticos, tornou fundamental e urgente identificar novos compostos antifúngicos (Rodrigues *et al.*, 2010).

Plantas constituem uma excelente fonte de compostos com atividade antifúngica, uma vez que estão continuamente expostas a uma vasta gama de fungos fitopatogênicos presentes no ambiente. Peptídeos antifúngicos de plantas incluem as defensinas, proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs), quitinases, lectinas, tioninas, peptídeos tipo heveína e “tipo-knottin”, ciclopeptídeos alcalóides, e outros tipos menos comuns (Ng, 2004; DeLucca *et al.*, 2005; Becker-Ritt & Carlini, 2012). Algumas dessas famílias de peptídeos são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR), sendo geneticamente codificadas para serem sintetizadas pela planta em condições específicas de agressão, sendo que nem todas têm propriedades antifúngicas.

Apesar dos inúmeros relatos de ocorrência e de atividade de proteínas e peptídeos antimicrobianos de origem vegetal contra fungos fitopatogênicos, alguns já testados com sucesso como transgenes para conferir resistência a plantas contra fungos e/ou insetos, poucos têm sido avaliados quanto ao potencial terapêutico nas micoses humanas (cf. Ajesh & Sreejith, 2009). A procura de novos compostos antifúngicos de plantas se tornou extremamente oportuna face ao aumento alarmante de micoses invasivas, particularmente em pacientes imunocomprometidos, causadas por fungos fitopatogênicos ou do solo (ex., *Alternaria*, *Curvularia*, e *Rhizopus*), anteriormente considerados como fungos de baixa virulência, e que, atualmente, passaram à condição de patógenos emergentes (De Lucca *et al.*, 2005).

De Lucca e Walsh (1999) classificam os peptídeos antifúngicos em dois grupos de acordo com seu modo de ação: o primeiro grupo atua através da lise celular provocada

por vários mecanismos, enquanto que o segundo grupo interfere com a síntese da parede celular ou com a biossíntese de componentes essenciais para a célula. Abaixo, estão descritos algumas classes de proteínas e peptídeos com atividade antifúngica:

- Defensinas

Defensinas de plantas são proteínas pequenas (45 a 54 aminoácidos), ricas em resíduos de cisteínas (Cys). A estrutura primária é pouco conservada entre as diferentes defensinas, guardando, em comum, 8 resíduos de Cys que formam 4 pontes dissulfeto para estabilizar a sua estrutura (Wong *et al.*, 2010).

As estruturas tridimensionais já determinadas para defensinas de plantas mostram um padrão estrutural composto de uma α -hélice e três fitas β -antiparalelas (Almeida *et al.*, 2000, 2002; Pelegrini *et al.*, 2005), sendo estabilizadas por um motivo típico denominado *cysteine-stabilized α -helix motif*, consistindo de duas pontes dissulfeto ligando a α -hélice com o C-terminal da folha β . Os resíduos não estruturais são variáveis, acompanhando a diversidade biológica das defensinas vegetais, que podem ter efeito antifúngico e bactericida, enquanto que outras não têm atividade antimicrobiana, mas inibem β -amilases e a síntese protéica, que podem também contribuir para a defesa da planta (De Lucca *et al.*, 2005). Apesar da atividade antimicrobiana de algumas defensinas, estas parecem não afetar células humanas ou vegetais *in vitro* (García-Olmedo *et al.*, 1998).

A maioria das defensinas de plantas foi isolada a partir das sementes, embora a expressão em diferentes tecidos vegetais também tenha sido reportada (Carvalho, *et al.* 2009). A expressão é induzida localmente e, em alguns casos, sistemicamente após infecção por fungos, ou por aplicação externa de hormônios envolvidos em vias de transdução de sinais, associadas a interações patógeno-planta (Penninckx *et al.*, 1996).

As defensinas possuem atividade antimicrobiana na faixa de 10^{-3} M e são resistentes a condições adversas de pH e temperatura, oxidação e degradação proteolítica (Broekaert *et al.*, 1997; Thomma *et al.*, 2002).

Defensinas de plantas atuam através de mecanismos diferentes, induzindo a permeabilização da membrana pela interação com sítios de ligação na célula fúngica, especificamente a esfingolipídios e glicosilceramidas (Thevissen, *et al.*, 2004). Elas não formam poros em membranas artificiais, mas atuam sobre certos receptores de membrana, gerando influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^{+} , inibindo, assim, o crescimento

fúngico (Thevissen *et al.*, 1996). Atuam sobre hifas jovens, mas não sobre conídios dormentes, indicando que os receptores para defensinas aparecem nos primeiros estágios de desenvolvimento dos fungos (de Lucca *et al.*, 1999).

Certos esfingolipídeos presentes na membrana plasmática de diferentes fungos interagem seletivamente com defensinas vegetais (Thevissen *et al.*, 2000). A interação da defensina *RsAFP2* de rabanete com glicosilceramidas da membrana de fungos parece ser necessária, mas não suficiente, para a inibição do crescimento de fungos, sugerindo que outros alvos podem estar envolvidos no mecanismo de inibição desta defensina (Thevissen *et al.*, 2004). O mesmo grupo demonstrou que a atividade antifúngica de *RsAFP2* em *Candida albicans* está relacionada com a indução de radicais livres de oxigênio (ROS), um dos marcadores de apoptose em leveduras (Aerts *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que a *RsAFP2* é profilaticamente eficaz no tratamento de candidíase murina, mas é tóxica para células humanas (Tavares *et al.*, 2008).

Almeida *et al.* (2000; 2002) caracterizaram estrutural e funcionalmente duas defensinas, *Psd1* e *Psd2*, de sementes de ervilha. Ambas apresentam alta atividade antifúngica contra diversos fungos fitopatogênicos ou isolados de pacientes imunodeprimidos. Alguns fungos sensíveis à ação das *Psds* apresentam resistência à Anfotericina B e ao Benomil, drogas tradicionalmente usadas no combate de micoses oportunistas em humanos, e no combate à fusariose na agroindústria, respectivamente (Kontoyiannis & Lewis, 2002). A defensina *Psd1* interfere na progressão do ciclo celular, como demonstrado em relação à migração nuclear em neuroblastos de retinas de ratos, provavelmente através do bloqueio das funções da ciclina F na transição da fase S para a fase G2 no ciclo celular (Lobo *et al.*, 2007). Esse grupo verificou aumento temporal no conteúdo de DNA conidial de *Neurospora crassa*, na presença de *Psd1*, sem o término do ciclo de divisão celular.

PvD1, uma defensina isolada de sementes do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, cv. Perola), inibe o crescimento de diferentes leveduras e fungos filamentosos (Games *et al.*, 2008). Essa proteína causa permeabilização da membrana em vários fungos filamentosos e em linhagens de leveduras, na concentração de 100 µg/ml. Análises ultraestruturais de *C. albicans* e *C. guilliermondii* tratadas com essa defensina revelaram alterações em estruturas celulares, como desorganização do núcleo e de outras organelas, perda de algumas estruturas, além da formação de “bolhas” na membrana plasmática. Ela também inibe a acidificação do meio estimulada por glicose pelas células de leveduras e

fungos filamentosos e induz a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em *C. albicans* e *Fusarium oxysporum* (Mello *et al.*, 2011).

NaD1 (*Nicotiana alata* defensin 1) é uma defensina encontrada em altas concentrações nas flores ornamentais de tabaco (*Nicotiana alata*). Causa a permeabilização da membrana plasmática de hifas de *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* levando à morte celular. Essa permeabilização é precedida pela interação específica com a parede celular; a entrada da defensina no citoplasma acelera a morte celular, indicando interação com alvos intracelulares (Weerden *et al.*, 2010).

- Quitinases

Quitinases (EC 3.2.1.14) estão presentes em diferentes espécies de plantas; podem ser constitutivas ou induzidas por fatores bióticos ou abióticos. A ação antifúngica das quitinases se deve à hidrólise da quitina, componente da parede celular de fungos, levando à lise celular (Kawase *et al.*, 2006). Além da hidrólise da quitina, ocorre a formação de oligossacarídeos que são indutores da expressão de outras proteínas de defesa da planta (Becker-Ritt e Carlini, 2012).

- Proteínas ligadoras de quitina

As proteínas ligadoras de quitina possuem domínios de 30-43 aminoácidos, com resíduos de glicina e cisteína em posições conservadas. Esses domínios conferem especificidade de ligação à quitina, embora não restrita (Becker-Ritt e Carlini, 2012). O efeito inibitório sobre os fungos é atribuído à capacidade dessas proteínas de ligarem quitina. A ligação é facilitada durante o crescimento das hifas, durante a montagem da parede celular, quando o polímero da quitina está em processo de alongamento e se acumula nos septos (Koo *et al.* 1998). Essa ligação provoca alterações na morfologia, crescimento anormal e encurtamento das hifas (Nielsen *et al.* 1997).

- Proteínas tipo ciclofilinas (imunofilinas, peptidilproli cis-trans isomerasas e proteínas ligadoras de ciclosporina A)

As ciclofilinas catalizam a isomerização cis-trans das ligações imida em resíduos de prolina de peptídeos e proteínas, e podem estar implicadas no dobramento de proteínas

e na interação entre células (Pliyev and Gurvits, 1999). Ciclofilinas de alta massa molecular ligam e ativam receptores esteroides (Cunningham, 1999; Silverstein *et al.* 1999). As ciclofilinas promovem a montagem de complexos multiprotéicos, que usualmente compreendem uma proteína quinase ou uma fosfatase, ou ambas (Cunningham, 1999). Segundo Marivet *et al.* (1994), essas proteínas são relacionadas à resposta ao estresse.

- Lectinas

Lectinas são proteínas que contêm um domínio não catalítico que liga a carboidratos específicos. A massa molecular é bastante variada: de 11 a 110 kDa. As lectinas de plantas são consideradas proteínas de estoque com propriedades biológicas relacionadas à proteção dos tecidos vegetais contra estresses bióticos e abióticos (Cândido *et al.*, 2011).

Lectinas de plantas não se ligam a gliconjugados das membranas das células fúngicas e tampouco penetram no citoplasma, graças à parede celular. Por isso, elas não inibem diretamente o crescimento dos fungos por alterar a estrutura ou permeabilizar a membrana fúngica. No entanto, podem se ligar a carboidratos da superfície da parede celular afetando a síntese da parede (Van Parijs *et al.* 1991).

As quimerolectinas são lectinas que podem ser descritas como antifúngicas; elas pertencem a classe I das quitinases e a atividade fungicida se deve à sua ação catalítica e não ao domínio de ligação a carboidratos (Wong *et al.*, 2010).

- Osmotina e Taumatina

Outra classe de proteínas de planta com atividade antifúngica inclui a osmotina e proteínas semelhantes à taumatina. A osmotina, uma proteína de 24 kDa pertencente à família 5 das proteínas relacionadas a patogênese (proteínas PR) em plantas, apresenta homologia à proteína taumatina de *Thaumatococcus danelli*. Essas proteínas são expressas em plantas sob condições de estresse e têm atividade antifúngica *in vitro*, enfraquecendo a parede celular do fungo pela formação de poros transmembrana (Lorito *et al.*, 1996). A expressão de taumatina em plantas transgênicas determinou o atraso de desenvolvimento de doenças causadas por vários patógenos, incluindo *Phytophthora infestans*, *Botrytis sp*, *Fusarium sp*, *Rhizoctonia sp* e *Sclerotinia sp* (Punja *et al.*, 2001).

A zeamatina, uma proteína antifúngica tipo taumatina isolada do milho, quando em associação com clotrimazol e nikkomycina Z, foi eficiente em reduzir a infecção por *Candida vaginalis* em um modelo murino (Stevens *et al.*, 2002), sendo ativa também sobre *C. albicans* (Perri *et al.*, 2009).

Vitali *et al.* (2006) descreveram uma proteína tipo taumatina de 23 kDa, isolada de *Cassia didymobotrya*, que exerceu atividade antifúngica contra algumas espécies de *Candida*.

- Peroxidases

Moléculas de lignina formam uma cadeia de estruturas aromáticas com ligações cruzadas na parede celular de plantas, que fornece resistência mecânica para a célula. A peroxidase contribui para a síntese de lignina, catalisando a polimerização dos álcoois cinamil em lignina e utilizando ácidos fenólicos para formar ligações cruzadas entre moléculas de lignina, através de grupos hidroxil. A lignificação catalisada por peroxidase é aumentada em resposta à infecção fúngica (Lagrimini, 1991). Durante a lignificação da parede pela peroxidase são liberadas espécies reativas de oxigênio, que são tóxicos aos patógenos (Thordal-Christensen *et al.* 1997).

- LTPs

Proteínas transferidoras de lipídios (LTPs) são peptídeos antimicrobianos que formam duas famílias multigênicas, de acordo com a massa molecular. A família LTP1 (9 kDa) é composta por peptídeos básicos pequenos, com ponto isoelétrico 8-10, contendo 90 a 94 aminoácidos, organizados em um estrutura tridimensional formada por um arranjo de quatro a cinco α -hélices e uma cavidade hidrofóbica, que pode carregar uma variedade de lipídios ou moléculas hidrofóbicas, com exceção de esteróis (Gomar *et al.*, 1996; Kader 1996; Lin *et al.*, 2005). A família das LTPs2 é formada por peptídeos que tem massa molecular de aproximadamente 7 kDa, possuindo uma média de 70 aminoácidos. Esses peptídeos compartilham outras características com as LTPs1, como: pI elevado, atividade de transferir lipídios e a estrutura 3D (segundo Carvalho e Gomes, 2007).

As LTPs retardam o crescimento de fungos, através de um mecanismo de ação ainda não bem elucidado (Kader, 1996). É possível que as LTPs permeabilizem

membranas pela formação de poros através da inserção nas membranas, o que permitiria o extravasamento de íons intracelulares levando à morte celular (Selitrennikoff, 2001).

O peptídeo mais potente, pertencente a classe das LTPs, com atividade antifúngica foi obtido a partir de sementes de cebola (*Allium cepa*). O peptídeo Ace-AMP₁ foi capaz de inibir 12 fungos testados, além de espécies de bactérias, numa concentração abaixo de 10 µg/mL (Cammue *et al.*, 1995). O fato deste peptídeo não ser capaz de transportar moléculas hidrofóbicas (Cammue *et al.*, 1995) demonstra que a atividade de ligação e transporte de lipídios pode não estar diretamente relacionada com a interação com membranas, e, neste caso, com a atividade antimicrobiológica (Carvalho & Gomes, 2007).

Micoses de importância clínica

As infecções fúngicas podem ser consideradas como alterações no ciclo vital natural de alguns fungos, os quais, na maioria das vezes, necessitam de condições específicas (determinantes de virulência ou de patogenicidade) que possibilitem seu desenvolvimento no hospedeiro (Casadevall & Perfect, 1998). Estas infecções vêm despertando atenção crescente na comunidade científica, devido à grande ineficiência no tratamento das micoses sistêmicas, a forma mais grave das infecções fúngicas. A estreita similaridade funcional entre as células dos fungos e as dos mamíferos limita as alternativas de tratamento, que se baseiam em compostos poliênicos e azólicos, drogas que causam efeitos colaterais importantes e a emergência de resistência microbiana, respectivamente. O estado imunológico do hospedeiro influencia grandemente o desenvolvimento das infecções fúngicas, evidenciado pela associação direta entre imunodeficiência e ocorrência de micoses sistêmicas (Pasqualotto & Denning, 2008).

Estima-se que a diversidade dos fungos compreende aproximadamente 1,5 milhões de espécies, das quais, atualmente, se conhece cerca de 7.400. Apenas algumas centenas de espécies são patogênicas para o homem, sendo que 90% das infecções em humanos são causadas por poucas espécies, entre leveduras, fungos oportunistas e dermatófitos (cf. Ajesh & Sreejith, 2009). Crescem os relatos de fungos oportunistas, que produzem um espectro de condições clínicas, abrangendo desde espécies dos gêneros *Aspergillus* até *Cladosporium*, *Curvularia* e *Bipolaris* (Dixon & Polak-Wyss, 1991; Pasarell *et al.*, 1990; Rinaldi *et al.*, 1987). O crescimento das infecções por fungos oportunistas, incluindo micoses invasivas de alta letalidade, nas últimas décadas, tem sido

atribuído à prevalência da AIDS-HIV, às terapias para câncer e rejeição de transplantes, e a emergência de linhagens resistentes aos agentes antifúngicos terapêuticos atualmente disponíveis (Ellis, 2002; Wingard Jr, 1995; cf. Ajesh & Sreejith, 2009). Por exemplo, a mortalidade associada a aspergilose invasiva cresceu 357% desde 1980, sendo esta a causa mais comum de infecção após transplantes de medula, atingindo cerca de 10 - 20% dos pacientes. Infelizmente, a sobrevivência dos pacientes tratados com anfotericina ou voriconazol é sub-ótima, registrando-se falha do tratamento em 47% dos casos (Zaas, 2008).

No Brasil, as mortes causadas por micoses sistêmicas como candidíase, paracoccidiodomicose, criptococose, histoplasmose, aspergilose, coccidiodomicose e zigomicose atingiram um número de 3.583 casos no período 1996-2006, sendo a paracoccidiodomicose responsável por 51,2% dos casos. Quando se considera AIDS como a causa da morte e a micose como condição associada, a criptococose representa 50,9% dos casos, seguida pela candidíase (30,2%) e histoplasmose (10,1%) (Prado *et al.*, 2009).

- *Candida albicans* e outras espécies

O gênero *Candida* é reconhecido como contendo um grande número (>150) de espécies (Reedy, *et al.*, 2007). Muitas espécies de *Candida* são de relevância médica e representam a causa mais comum de infecções oportunistas em humanos. As principais espécies relacionadas em infecções clínicas incluem *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, que juntas, são responsáveis por mais de 85% das infecções invasivas (Pfaller, *et al.*, 2007). Essas leveduras apresentam resistência às principais drogas antifúngicas do grupo azol (Warnock, 2007).

A levedura *C. albicans* é um patógeno oportunista que causa infecções de mucosas e sistêmicas em indivíduos debilitados (Anane *et al.*, 2007; Borman *et al.*, 2008). Esse organismo coloniza mucosas da pele, genitais e intestinais de 30-70% de indivíduos saudáveis, e em condições normais, não causa nenhuma doença (Periroth *et al.*, 2007). Na ausência de propriedades imunes, e a consequente inabilidade de controlar a colonização das superfícies das mucosas, pode levar a infecções severas (Kirpatrick, 1994).

A presença desta levedura em casos de infecções hematogênicas (ICS) e as altas taxas de mortalidade (Aquino *et al.*, 2005), o maior tempo de internação destes pacientes

e o alto custo médico (Tortorano *et al.*, 2006; Passos *et al.*, 2007) começaram a chamar atenção da área médica. Em alguns hospitais norte-americanos, o custo por paciente é de cerca de US\$ 44.000, devido ao amplo uso de drogas antifúngicas e pela prolongada estadia no hospital, superando 30 dias (Sendid *et al.*, 2006; Zaas, 2008). De maneira global, *Candida* é o 4º isolado mais frequente em ICS, no entanto, nos últimos 5-15 anos, o número de espécies de *Candida* não-*albicans* tem aumentado consideravelmente (Bassetti *et al.*, 2006; Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008), sendo a causa principal deste fato, o uso difundido de antifúngicos do grupo azol (Aquino *et al.*, 2005; Bassetti *et al.*, 2006; Bedini *et al.*, 2006). Estimativas sugerem 9,8 casos de candidíase invasiva para cada 1.000 admissões em unidades de terapia intensiva, com uma mortalidade de 30%. Na população infantil, a incidência de *Candida* é ainda maior, constituindo a segunda causa mais frequente de infecção no sangue (Zaas, 2008).

A gravidade da candidemia é confirmada pela alta taxa de mortalidade. Infecções na corrente sanguínea por *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* parecem ser mais grave, provavelmente pelo fato destas espécies ocorrerem mais em pacientes com condições adjacentes (Tortorano *et al.*, 2006).

C. albicans pode crescer em ambas as formas no hospedeiro: leveduras e formas filamentosas (Romani *et al.*, 2003). Estas alterações morfogênicas estão associadas a mudanças na composição e arquitetura da parede celular, e isto influencia na resposta imune do hospedeiro.

A morfogênese em *Candida* pode ser regulada por vários mecanismos, como:

- sinalização por proteína quinase A, que pode ser estimulada por componentes do soro, CO₂, glicose e aminoácidos;
- mecanismos de sinalização alternativos que podem ser disparados por baixos níveis de nitrogênio, alterações do pH do meio e hipoxia;
- estresse genotóxico, conseqüente a dano ou inibição da replicação do DNA, que pode alterar a progressão do ciclo celular e estimular a produção de formas filamentosas (Gow *et al.*, 2012).

Agentes antifúngicos

Para minimizar a toxicidade sobre o hospedeiro, as drogas antifúngicas devem atuar sobre alvos pouco conservados entre hospedeiros humanos e fungos. A maioria das

drogas antifúngicas, em uso clínico, atuam sobre o ergosterol da membrana da célula fúngica, sobre a biossíntese do ergosterol ou a biossíntese do (1,3)- β -D-glucano, o maior componente da parede celular (Shapiro *et al.* 2011). O ergosterol é um análogo do colesterol de células de mamíferos e sua função é modular a fluidez da membrana, da qual depende as funções de muitas enzimas (White *et al.*, 1998).

Os azóis estão entre os antifúngicos mais utilizados nas últimas duas décadas. Essas moléculas fazem parte de uma classe de compostos heterocíclicos contendo nitrogênio (Cowen & Steinbach, 2008; Ostrosky-Zeichner *et al.* 2010). Os azóis funcionam sobre a enzima lanosterol demetilase (citocromo P450) que é responsável pela síntese de ergosterol. Em muitas espécies de fungos, essas drogas entram na célula por difusão facilitada (Mansfield *et al.*, 2010) e inibem a atividade da enzima (White *et al.* 1998), causando acúmulo de esteróides tóxicos (Lupetti *et al.* 2002). Esses esteróides prejudicam o funcionamento da H⁺-ATPase da membrana vacuolar, levando a alteração da homeostase catiônica intracelular (Zhang *et al.* 2010). Os azóis geralmente atuam de maneira fungistática sobre as leveduras, incluindo espécies de *Candida*, e de maneira fungicida sobre fungos filamentosos, como espécies de *Aspergillus* (Cowen *et al.*, 2008). A natureza fungistática dessas moléculas sobre *Candida* promove a seleção direcional e sobrevivência de parte da população, levando ao desenvolvimento de mecanismos de resistência a essas drogas (Cowen *et al.*, 2008; Anderson, 2005).

Os polienos são um grupo de drogas anfipáticas com atividade fungicida, por se ligarem ao ergosterol. Essa ligação forma complexos de polienos-lipídios, que intercalam na membrana da célula fúngica formando canais (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). Isso promove a saída de íons da célula, destruindo o gradiente de prótons (Gruszecki, *et al.*, 2003; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010). A anfotericina B, um polieno, é efetivo contra doenças fúngicas sistêmicas e tem atividade contra espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *C. neoformans*. A maior limitação no uso dos polienos é a sua toxicidade ao hospedeiro, causando, por exemplo, disfunções renais. Isso se dá pela similaridade entre o ergosterol e o colesterol das células de mamíferos (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2010; Fanos & Cataldi, 2000).

As equinocandinas são uma nova classe de antifúngicos que vem sendo utilizados na clínica. Essas moléculas são grandes lipopeptídeos que atuam inibindo a (1,3)- β -D-glucano sintase, uma enzima envolvida na síntese da parede celular (Denning, 2003), comprometendo a integridade dessa estrutura e causando estresse para a célula fúngica. A atividade das equinocandinas é geralmente oposta a dos azóis, sendo fungicida contra

leveduras e fungistático contra fungos filamentosos. Três drogas desta classe estão sendo avaliadas para o uso clínico: caspofuginas, micafungina e anidulafungina (Shapiro *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

Considerando que a atividade fungitóxica das ureases ocorre na faixa de 10^{-7} M, sendo, portanto, cerca de 3 a 4 ordens de grandeza mais ativa do que a maioria das proteínas antifúngicas já descritas, o objetivo geral dessa tese foi aprofundar o conhecimento sobre as propriedades antifúngicas das ureases, utilizando a urease de *C. ensiformis*, JBU, como modelo.

Outro objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que as propriedades antifúngicas da JBU estariam associadas a sequências peptídicas específicas.

Também buscamos esclarecer aspectos do mecanismo de ação fungitóxica das ureases e peptídeos derivados, através de abordagens moleculares diversas, utilizando diferentes fungos, entre eles fungos de importância médica e fitopatogênicos.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- a) Avaliar a atividade da JBU sobre diferentes espécies de leveduras;
- b) Hidrolisar a urease de *Canavalia ensiformis* utilizando diferentes enzimas;
- c) Avaliar a atividade das frações hidrolisadas sobre diferentes fungos;
- d) Identificar fragmentos resultantes da hidrólise;
- e) Investigar modificações metabólicas e morfológicas produzidas pela JBU e/ou peptídeo(s) sobre os fungos testados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Urease de *Canavalia ensiformis* (JBU)

A urease de “jack bean”, tipo C-III (Sigma Aldrich) foi utilizada neste projeto. A proteína foi solubilizada em tampão Tris 50 mM, pH 7,0, e quantificada por absorvância em 280 nm (1,0 A₂₈₀ equivale a uma solução 0,66 mg proteína/mL). A atividade enzimática da JBU foi inativada por tratamento da proteína com o inibidor covalente p-hidro-mercuribenzoato, como descrito em Follmer *et al.* (2001).

Produção e Purificação do Jaburetox-V5

O peptídeo recombinante utilizado nessa tese foi o Jaburetox-V5, uma versão modificada do peptídeo Jaburetox-2Ec (91 aminoácidos derivados da JBU, o antígeno V5 e seis histidinas no C-terminal) (Mulinari *et al.*, 2007), contendo apenas a sequência derivada de urease e a cauda poliHis para facilitar a purificação (doutorado da Msc. Anne H. Martinelli).

O vetor pET 101-D-TOPO, contendo o Jaburetox-2Ec, foi usado como *template* para o PCR (reação em cadeia da polimerase). Para obter o peptídeo recombinante contendo a cauda de histidina, mas sem o antígeno V5, vários *primers* foram desenhados, o cDNA foi amplificado por PCR, clonado no pET 23-a e expresso em BL21-DE3 RIL. O peptídeo resultante foi chamado de Jaburetox -V5.

As células recombinantes foram suspensas em 50 mL de tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 5 mM, pH 7,5). Foram feitos 10 ciclos de 1 minuto no ultrassom, seguido de centrifugação por 30 m a 14.000 RPM. O sobrenadante foi passado numa coluna de afinidade por metal (Chelating Sepharose), carregada com níquel, equilibrada com tampão de lise. Após retirada de uma fração fracamente adsorvida na resina com Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 50 mM, pH 7,5, o peptídeo com cauda polihistidina foi eluído com 200 mM de Imidazol adicionado ao mesmo tampão. O eluído foi dialisado contra 20 mM NaPB, 1mM EDTA, 5 mM beta-mercaptoetanol (β -ME), pH 7,5 e quantificado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Fungos

As leveduras *Candida parapsilosis* (CE002), *Candida tropicalis* (CE017), *Candida albicans* (CE022), *Kluyveromyces marxianus* (CE025), *Pichia membranifaciens* (CE015), and *Saccharomyces cerevisiae* (1038) e os fungos filamentosos *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. musae*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium laterithium*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Phomopsis sp.*, *Mucor sp.*, *Trichoderma viridae*, *Pythium oligandrum*, *Lasiodiplodia theomobrae*, *Cercospora Chevalier* e *Rizoctonia solani* foram gentilmente cedidos pela Dra. Valdirene Gomes, do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil e pelo Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. As leveduras foram mantidas em meio ágar Sabouraud (1% peptona, 2% glicose e 1,7% agar-agar, (Acumedia). Os fungos filamentosos foram mantidos em meio ágar batata (BDA - Oxoid) à 4 °C.

Hidrólise da JBU

A JBU foi hidrolisada utilizando diferentes enzimas comerciais: tripsina (EC 3.4.21.4 – Sigma), quimotripsina (EC 3.4.21.1 - Sigma), papaína (Merk), pepsina (EC 3.4.23.1 – Sigma). Foram testadas várias condições de pH: 3 – 7,5, tempo de incubação: 10 min a 24 h, relação enzima:substrato: 1:10 e 1:100. Dois protocolos foram testados para parar a reação. No protocolo 1, ao final do período de incubação, as proteínas foram fervidas por 10 min, colocadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas por 10 min à 4 °C. O sobrenadante foi testado nos fungos. No protocolo 2, ao final do período de incubação, as amostras foram centrifugadas em Amicon 10 kDa a 4000 rpm por 10 min, lavadas por 3 vezes com o dobro do volume de reação e as frações retidas (>10 kDa) e filtradas (<10 kDa) foram testadas contra os fungos.

Eletroforeses

As frações hidrolisadas de JBU foram visualizadas por SDS-PAGE e/ou por gel SDS-Tricina (Schagger & Von Jagow, 1987). Os géis foram corados com Coomassie Coloidal ou com nitrato de prata.

Análises por Cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de massas

As frações filtradas (<10 kDa) após hidrólise da JBU foram dessalinizadas em coluna de fase reversa (C-18) em sistema HPLC (Shimadzu). A coluna foi equilibrada com 99,9% de H₂O + 0,1% de TFA (ácido trifluoroacético) e os peptídeos foram eluídos com gradiente (0-100%) de acetonitrila 99,9% + 0,1% TFA. As frações eluídas foram reunidas e liofilizadas.

O material liofilizado foi ressuspensão em 0,1 % ácido fórmico (20 uL). Destes 20 uL, 5 uL foram submetidos à cromatografia de fase reversa no cromatógrafo nanoAcquity UltraPerformance LC® (UPLC®, Waters, Milford, United States); gradiente de 0-60% de acetonitrila em 0.1% TFA em 20 min) e os peptídeos eluídos foram ionizados e analisados por espectrometria de massas. O método de ionização utilizado foi *eletrospray* e a voltagem aplicada no cone para a ionização foi de 35 Volts. Foram selecionados para fragmentação os 3 íons mais intensos na faixa de m/z 200 a 2000 e as cargas aceitas foram +2 e +3. O analisador utilizado foi um quadrupolo com tempo de voo (Q-TOF Micro™, Micromass, Waters, Milford, United States).

Arquivos brutos (RAW) obtidos a partir do espectrômetro de massas foram processados no Mascot Distiller (versão 2.4.2.0) e gerados os formatos .mgf. A procura dos dados foi feita usando os algoritmos do MASCOT (versão 2.4.00), contra o banco de dados do NCBI, restringindo o organismo para a taxonomia “green plants_ taxid 33090”. Não foi selecionada nenhuma enzima de digestão. A tolerância para os íons precursores e fragmentos foi de 1.2 Da. Os resultados obtidos foram manualmente analisados.

Similaridade de ureases com proteínas antifúngicas vegetais

As sequências N-terminais de taumatina-like de vagem, peroxidase antifúngica de vagem, quitinase de feijão (phaseína A), e defensinas de ervilha (PSDs) foram obtidas de Ng (2004). O alinhamento destas sequências individualmente com a urease majoritária de *Canavalia ensiformis* (NCBI gi 167228) foi realizado com o programa ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), empregando a matriz BLOSUM (Henikoff & Henikoff, 1992). As regiões da urease que apresentaram similaridade com as referidas sequências de proteínas antifúngicas foram coloridas manualmente com o visualizador molecular UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Ensaio antifúngicos:

Leveduras

Os ensaios de crescimento foram feitos segundo Ribeiro *et al.* (2007). Células de leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia* foram colocadas para multiplicar em placas de Petri contendo ágar Sabouraud, por 24 ou 48 h, a 28 °C. Para o ensaio, foram retiradas células, com o auxílio de alça de sementeira, e adicionadas a 5 mL de solução salina (0,9 % NaCl) estéril.

As amostras em teste foram adicionadas às células (1×10^4 por mL) e o crescimento foi avaliado por leituras de turbidez no comprimento de onda de 620 nm, por um período de até 48 h. Os ensaios foram feitos em placas de 96 poços, fundo em U, e lidos em leitor de placas (EZ Reader 400 – Biochrom).

As diluições para avaliação das unidades formadoras de colônias (UFCs) foram feitas após a incubação da JBU e/ou tampão com as leveduras por 24 h, nas condições já descritas. As diluições foram feitas em meio Sabouraud livre de JBU/tampão com fator de diluição de 10 vezes. As placas com Sabouraud ágar foram mantidas por 24 h à 28 °C.

Fungos filamentosos

Os fungos foram crescidos por 14 dias em meio BDA, a 30 °C. Para obtenção dos esporos, foram adicionados 5 ml de solução salina estéril em cada placa de Petri e a superfície das colônias lavadas delicadamente com jatos da ponta de uma pipeta e a suspensão resultante coletada em tubo estéril.

Para avaliar o crescimento das hifas, o ensaio foi feito segundo Becker-Ritt *et al.* (2007). A suspensão de esporos (1×10^6 esporos por mL) foi inoculada em placas de 96 poços contendo meio líquido batata dextrose (PDB), incubados a 28 °C por 16 h e, então, as amostras testes (no máximo 80 µL) foram adicionadas. O volume final em cada poço foi de 200 µL. Foram usados como controles o tampão de diluição das amostras e peróxido de hidrogênio 0,1% (H₂O₂), como controle positivo. As placas foram incubadas a 28 °C e a OD acompanhada em leitor de placa por até 96 h. Alternativamente, os esporos foram inoculados junto com as amostras e a germinação, seguida do crescimento, foi monitorada por turbidimetria.

Os ensaios foram feitos em triplicatas, sendo apresentadas médias e o respectivo desvio padrão.

Inibição da acidificação estimulada por glicose

A acidificação estimulada pela glicose resulta na extrusão de H^+ pela célula. A bomba H^+ -ATPase da membrana plasmática é responsável por essa atividade (Gomes *et al.*, 1998). Avaliamos a influencia da JBU e do(s) peptídeo(s) sobre essa atividade metabólica de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, conforme descrito por Ribeiro *et al.*, 2007.

Células das leveduras foram mantidas em meio Sabouraud agar por 48 h, a 30 °C. Cada placa foi lavada com 4 mL de meio de cultura para recolher as células, e 8 µL dessa suspensão foram adicionados a 200 mL do meio líquido. A cultura foi mantida sob agitação constante por 16 h, a 28 °C. As células foram então centrifugadas a 3.000 g, por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 20 mL de água Milli-Q, suspensas e centrifugadas novamente. Esse processo foi repetido 3 vezes para a lavagem das células. Depois disso, as leveduras foram suspensas em 3 mL de água Mili-Q.

Aliquotas com 10^7 células foram pré-incubadas por 30 min, em 800 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 6,0, na presença das proteínas/peptídeos testados ou do tampão de diluição. Depois desse período, foram adicionados 200 µL de glicose 500 mM e o pH foi lido a cada minuto por 30 min. A concentração de H^+ liberado pela célula foi calculada como a diferença entre o pH inicial e o pH final (ΔpH), considerando-se a equação $pH = -\log [H^+]$. Os valores apresentados são médias de triplicatas para cada experimento.

Avaliação da permeabilidade celular

A permeabilização da membrana plasmática foi avaliada pela medida de absorção de SYTOX Green (Invitrogen), como descrito por Mello *et al.* (2011), com algumas modificações. Esse corante tem afinidade por ácidos nucleicos, com os quais forma um complexo fluorescente, somente quando penetra em células com as membranas comprometidas. Os fungos foram incubados na presença das amostras testes em diferentes concentrações por 24 h. Aliquotas de 100 µL da suspensão de células foram incubados com SYTOX Green 0,2 µM, por 30 min a 30 °C. As células foram observadas com microscópio de fluorescência (Axioskop 40 – Zeiss) equipado com um filtro para

detecção de fluoresceína (comprimento de onda de excitação 450-490 nm, e de emissão 500 nm), acoplado a câmera (AxioCam MRc) para aquisição da imagem.

Avaliação da Produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de ROS e NO em leveduras foi avaliada utilizando-se os marcadores fluorescentes: 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína e 3-amino, 4-aminometil-2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (Calbiochem-EMD), respectivamente. A incubação das leveduras com as amostras teste foi feita como descrito para SYTOX Green. Os corantes foram adicionados numa concentração final de 20 μ M. As células foram visualizadas em microscópio (AxioPhoto Zeiss) equipado com um filtro para detecção de fluoresceína (comprimento de onda de excitação 450-490 nm, e de emissão 500 nm) (Mello *et al.*, 2011).

Avaliação da viabilidade e atividade metabólica

Sondas fluorescentes foram usadas avaliar a viabilidade e a atividade metabólica de leveduras na presença das amostras teste.

Dois sondas fluorescentes são disponibilizadas pelo kit (LIVE/DEAD[®] Yeast Viability Kit - Invitrogen): FUN-1, que marca células viáveis e metabolicamente ativas e CalcoFluor White M₂R, que marca a parede celular. FUN-1 [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide] é um corante com afinidade por ácidos nucleicos, permeável à membrana plasmática. Moléculas de FUN-1 livres em solução aquosa não são fluorescentes, porém quando ligadas a proteínas ou a DNA e/ou RNA (e excitadas com luz entre 470 nm e 500 nm), a fluorescência é aumentada de 10-50 vezes e 400 vezes, respectivamente. FUN-1 não marca o núcleo de células ativas em meio de cultura. Células ativas metabolicamente, crescendo em condições aeróbias ou anaeróbias, formam estruturas cilíndricas vacuolares (CIVS), visualizadas por marcação fluorescente vermelha-alaranjada. Esse processo de marcação fluorescente é dependente de ATP e envolve o transporte do corante do citoplasma para os vacúolos, processo que não ocorre em células mortas (Millard, *et al.*, 1997).

O FUN-1 difunde passivamente para dentro das células e, inicialmente, cora o citoplasma com uma fluorescência verde difusa, seguida da formação das CIVS. Esse processo requer integridade das membranas e capacidade metabólica. As células mortas

exibem uma fluorescência verde-amarelada brilhante e difusa. Células com membranas intactas, mas com pouca ou nenhuma atividade metabólica, tem uma fluorescência verde difusa (informações do fabricante).

As células das leveduras foram cultivadas durante à noite (16 h) em meio Sabouraud a 28 °C, na presença de JBU, Jaburetox-V5, tampão de diálise, ou H₂O₂, seguidas de centrifugação (10 min à 3000 RPM) para retirar o meio. As leveduras foram suspensas em tampão GH [2% D-(+) glicose, 10 mM de Na-HEPES, pH 7,2], onde foram adicionados 1 µM de FUN-1 e 12,5 µM de CalcoFluor, e após mais 2 h de incubação a 28 °C, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Axioskop 40 – Zeiss) equipado com filtros para diferentes comprimentos de onda, que permitam visualizar fluoresceína (verde), rodamina (vermelho) e DAPI (azul), acoplado a câmera (AxioCam MRc) para aquisição da imagem.

Alternativamente, as células foram cultivadas durante à noite em meio Sabouraud à 28 °C, na ausência das amostras teste, seguidas de centrifugação para retirar o meio. As leveduras foram suspensas em tampão GH. 100 µL da suspensão de células foram misturados às amostras JBU, Jaburetox-V5, tampão de diálise, ou H₂O₂, e mantidas por 2 h a 28 °C. Em seguida, foram adicionados 1 µM de FUN-1 e 12,5 µM de CalcoFluor e mantidos mais 2 h a 28 °C, para posterior visualização no microscópio Axioskop 40 – Zeiss.

Análises Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Todos os ensaios foram avaliados usando “one-way” ANOVA seguidos pelo teste *t* de Bonferroni e o de Dunnett, considerando-se significativos $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas com software GraphPad Prism (versão 3.0 para Windows).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade da JBU sobre leveduras

A atividade da JBU foi avaliada sobre 6 diferentes espécies de leveduras: *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. membranifaciens* e *K. marxiannus*.

A Figura 2 ilustra dois tipos de comportamentos típicos das leveduras em presença da urease de *C. ensiformis*. A JBU inibe o crescimento medido como aumento da turbidez do meio, de *C. tropicalis* (Figura 2) e *P. membranifaciens* (dados não mostrados), em doses de 0,18 μM . Para as demais leveduras, o efeito fungitóxico da JBU não foi evidenciado por turbidimetria em concentrações de até 0,72 μM da proteína (concentração máxima testada). Em alguns casos, como pode ser visto para *K. marxiannus* na Figura 2, há aumento da turbidez do meio maior do que o observado para o controle, sugerindo maior multiplicação das células e ausência de efeito da JBU. No entanto, se após 24 h de incubação com 0,36 μM da urease, as leveduras forem repicadas em meio livre de JBU, o número de unidades formadoras de colônia obtido é nitidamente menor não só para *C. tropicalis* e *P. membranifaciens*, mas, também, para *C. albicans*, *C. parapsilosis*, e *K. marxiannus* (Figura 3; Tabela 2). Esses resultados mostram que: 1) o efeito da urease sobre as leveduras é fungicida, e 2) o ensaio de turbidimetria não é capaz de evidenciar o efeito fungitóxico no caso de algumas leveduras, podendo sofrer interferências, como por exemplo, alterações morfológicas das células (ver adiante). É provável que dosagem maior, ou ainda, a aplicação repetida de doses da JBU possa promover um aumento do efeito fungitóxico da proteína.

A capacidade de *C. tropicalis*, *P. membranifasciens* e *K. marxiannus* em hidrolisar a JBU foi avaliada nesse estudo (dados não mostrados). Após 24 h de incubação na presença de JBU, as suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE a 15%. Os resultados sugerem que *K. marxiannus* seja capaz de hidrolisar a proteína durante a incubação, visualizado pela diminuição da banda da JBU (dados não mostrados). A análise do sobrenadante da cultura das outras leveduras não apresentou diferença depois de 24 h. A hidrólise da urease por enzimas do trato digestório de insetos é importante para a atividade inseticida, pois libera peptídeos internos da proteína que são entomotóxicos (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000).

Foi evidenciado que as leveduras respondem de forma diferenciada quando em presença da urease. Os resultados da curva de crescimento, acompanhada por turbidimetria, não expressam o número de células viáveis, como pode ser visto pelo número de colônias formadas após 24 h em presença da JBU (Figura 3; Tabela 2). O maior aumento de turbidez do meio, ao invés de indicar maior crescimento celular de leveduras em presença da JBU, como é caso de *K. marxianus*, pode ser consequência de um aumento do volume celular, aglomeração das leveduras e formação de pseudo-hifas e/ou hifas, que causam aumento na absorvância do meio. Ribeiro et al (2012) observaram aumento da densidade ótica durante o crescimento de leveduras na presença de proteínas homólogas a albumina 2S, isoladas a partir de sementes *Passiflora edulis f. flavicarpa* e de *Capsicum annuum*, atribuindo esse efeito à aglomeração das células e formação de pseudo-hifas, visualizadas por microscopia óptica.

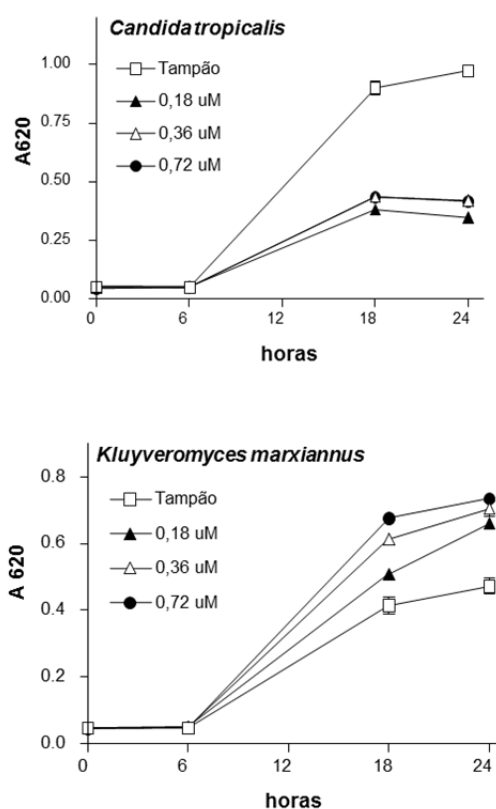


Figura 2 Curva de crescimento de *Candida tropicalis* e *K. marxianus* na presença de diferentes concentrações de JBU. Células foram incubadas com as amostras em meio Sabouraud e mantidas a 28 °C por 24 hs, sendo a absorvância da cultura lida a cada 12 hs. Cada ponto representa a média de em triplicatas.

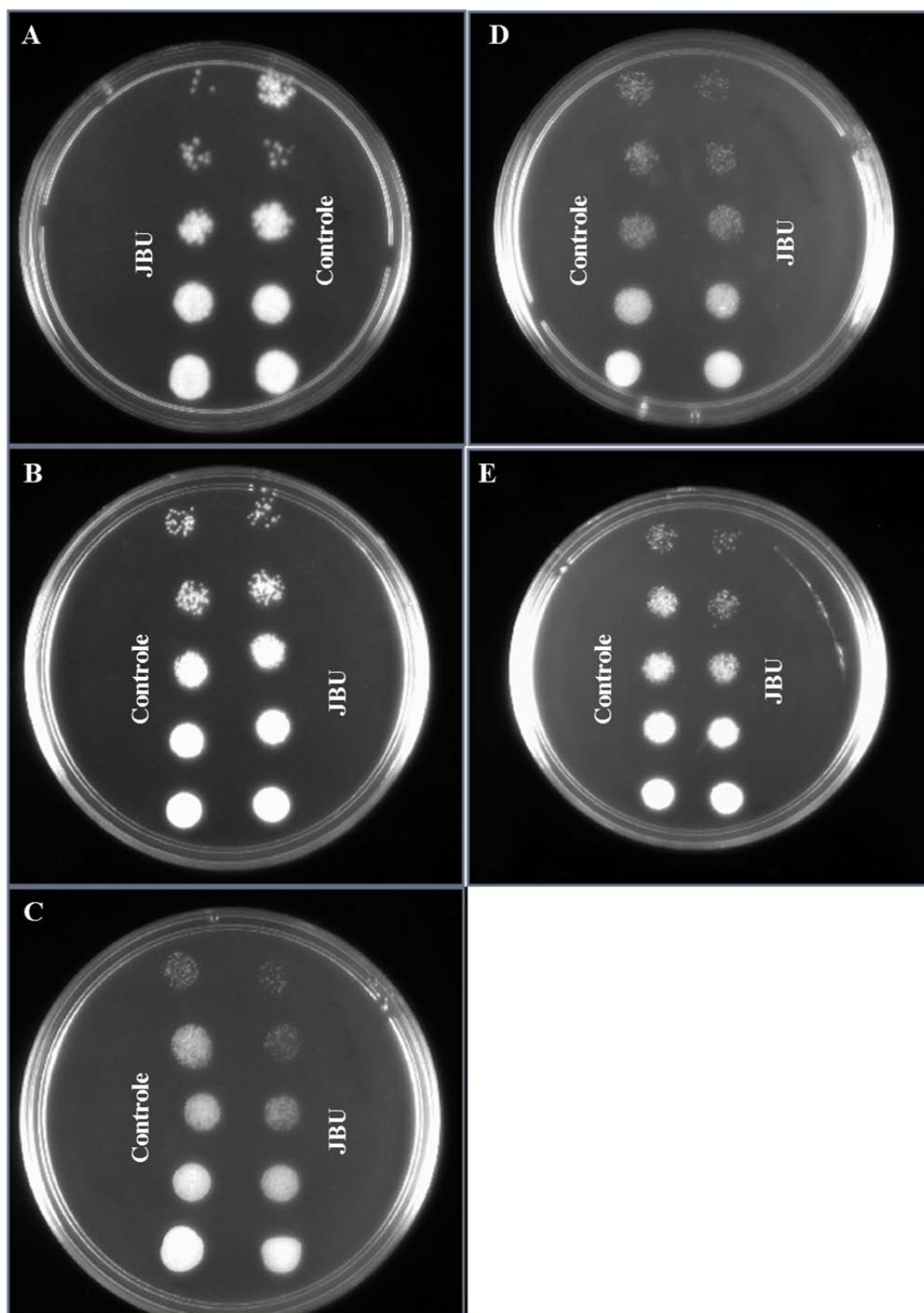


Figura 3. Avaliação das unidades formadoras de colônia após 24 h de incubação com 0,36 μM de JBU ou tampão. (A) *P. membranifaciens*; (B) *C. tropicalis*; (C) *C. albicans*; (D) *K. marxianus* e (E) *C. parapsilosis*. Células foram repicadas em meio livre de JBU, sendo adicionados 10 μL em cada ponto de diluição (fator de diluição 10x). As placas foram mantidas a 28 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

Tabela 2: Unidades formadoras de colônias (UFCs): Após 24 h na presença de JBU ou de tampão, as células foram repicadas em meio livre de JBU/tampão. Os valores representam as UFCs da última diluição (10⁶) do experimento mostrado na figura 3

	Controle	JBU
<i>C. tropicalis</i>	31	21
<i>P. membranifasciens</i>	34	4
<i>C. parapsilosis</i>	54	23
<i>C. albicans</i>	95	48
<i>K. marxianus</i>	91	44

Becker-Ritt *et al.* (2007) demonstraram que o efeito antifúngico da JBU sobre fungos filamentosos era independente da atividade ureolítica das proteínas, utilizando para isso um inibidor irreversível do sítio ativo das ureases, o p-hidroxi-mercuribenzoato. Aqui, usando a JBU modificada com o mesmo composto e, portanto, desprovida de atividade enzimática. Foi observada não haver alteração no efeito inibitório sobre o crescimento de *P. membranifasciens* (Figura 4). Assim, pode-se concluir que a atividade antifúngica da JBU, quer sobre fungos filamentosos ou sobre leveduras, envolve um domínio proteico distinto daquele que contem o seu carácter enzimático.

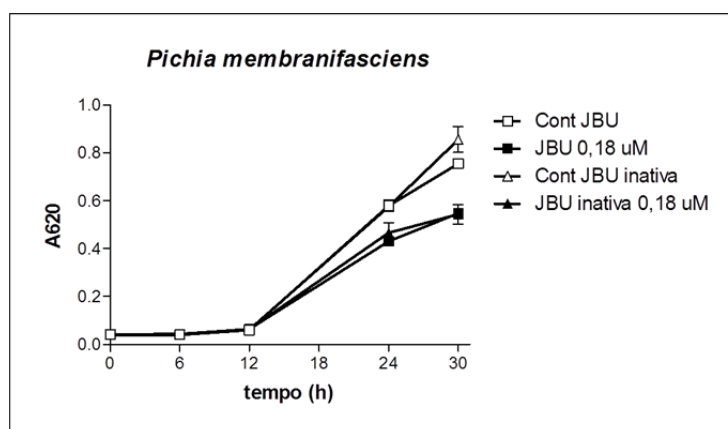


Figura 4. Curva de crescimento de *P. membranifasciens* na presença de JBU e JBU inibida com p-hidroxi-mercuri-benzoato. As leveduras foram crescidas por 30 h na presença de JBU nativa ou inativada com inibidor específico. Os controles cresceram na presença de tampão. A avaliação do crescimento foi feita por absorbância A620. Cada ponto representa a média de pontos em triplicatas.

A capacidade da JBU em permeabilizar a membrana das leveduras foi avaliada através da tomada de SYTOX *green*, um marcador fluorescente com afinidade por ácidos nucleicos. Após incubação das células de *C. tropicalis*, *P. membranifasciens*, *K. marxianus* e *C. parapsilosis* na presença da JBU, o corante foi adicionado à cultura e mantido por 10 m, sob agitação, à temperatura ambiente. Quando observadas em microscópio equipado com filtro para fluoresceína, todas as espécies de leveduras tratadas com JBU apresentaram maior fluorescência quando comparadas com o controle, indicando permeabilização das células, particularmente naquelas nas quais ocorreram alterações morfológicas, com a formação nas pseudo-hifas (Figura 5 e 6).

Várias proteínas e peptídeos de plantas têm a capacidade de permeabilizar membranas, como defensinas, que interferem em canais iônicos (Aerts *et al.*, 2007), LTPs e 2S albuminas (Agizzio *et al.*, 2006; Regente *et al.*; 2005). A NaD1 (defensina 1 de *Nicotiana glauca*) permeabiliza a membrana de hifas e gera ROS (Aerts *et al.*, 2007).

De modo semelhante ao que foi observado para leveduras, Becker-Ritt *et al.* (2007), descreveram que, em fungos filamentosos, a JBU provoca alterações de permeabilidade celular, levando a plasmólise e morte celular, bem como alterações morfológicas, como irregularidades na superfície das hifas, visualizada em *P. herquei* por microscopia de varredura.

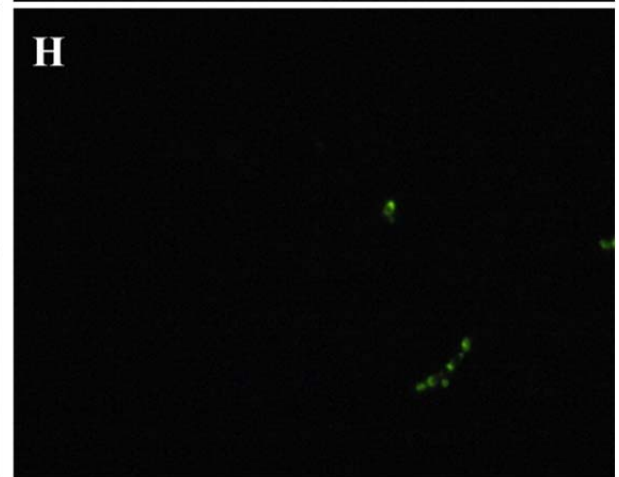
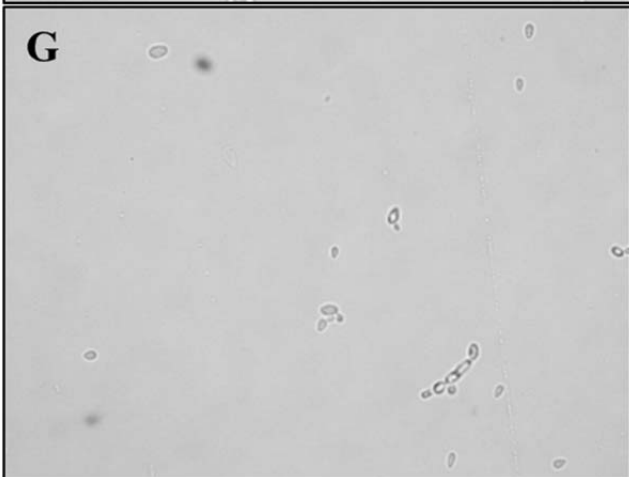
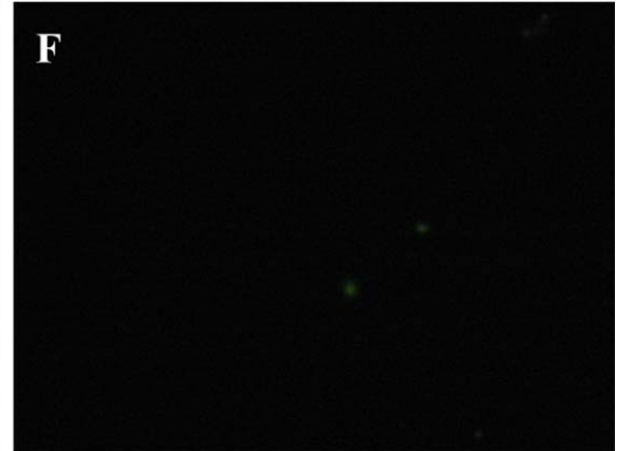
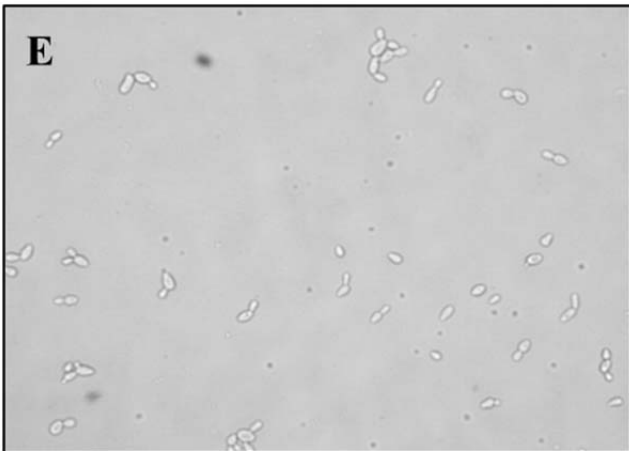
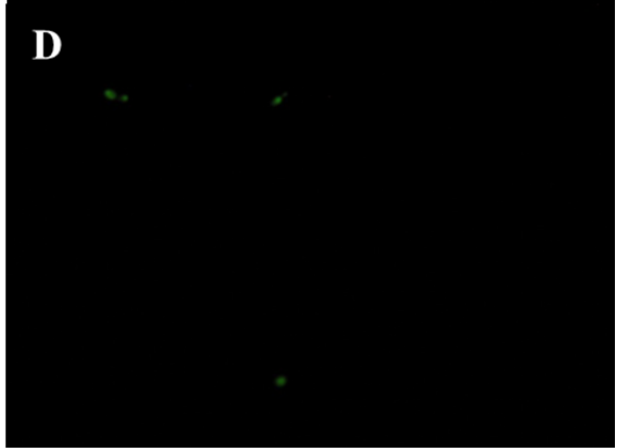
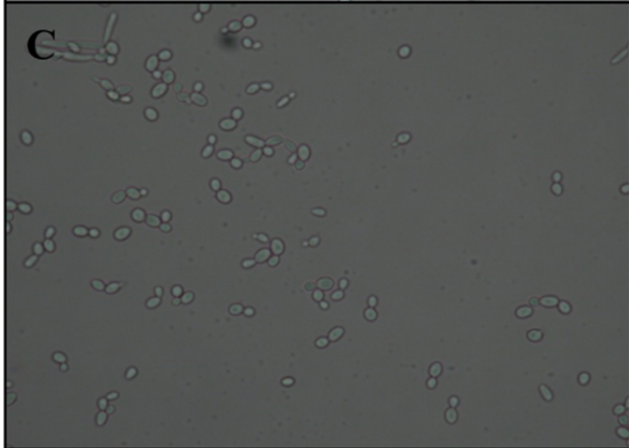
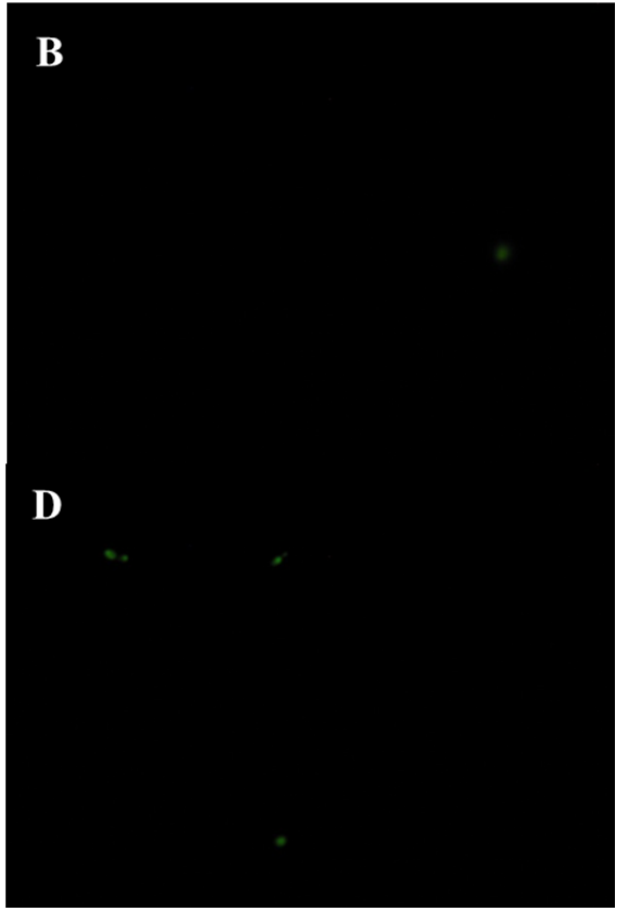
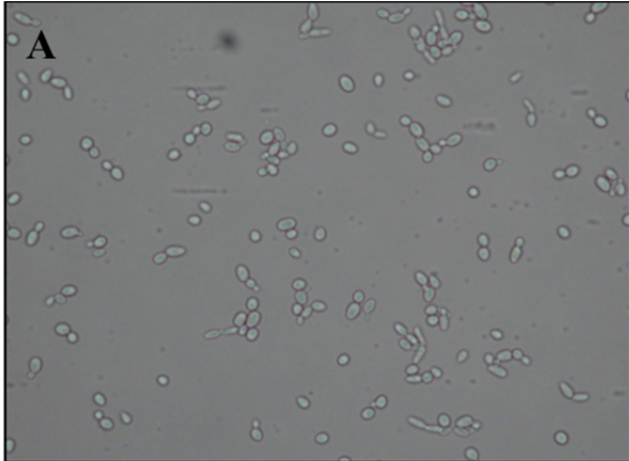


Figura 5. Ensaio de permeabilização da membrana em *C. tropicalis* (A-D) e *P. membranifasciens* (E - H). As células foram tratadas com 0,72 μ M de JBU por 24 h e incubadas com 0,2 μ M de SYTOX green (C, D, G e H). A, B, E e F: controle. A, C, E e G: campo claro; B, D, F e H: fluorescência. Observar a redução do número de células nos painéis C e G. Aumento: Obj. 20x.

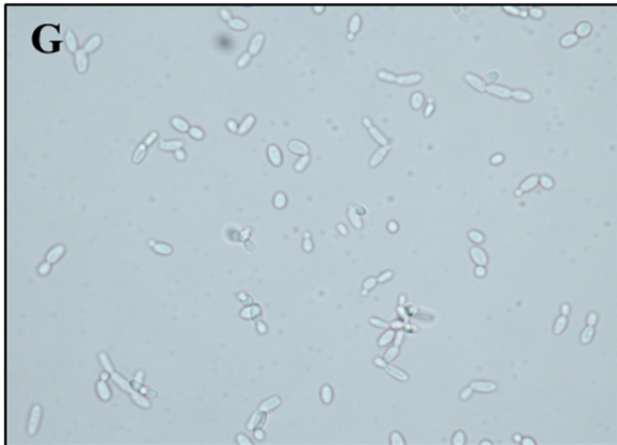
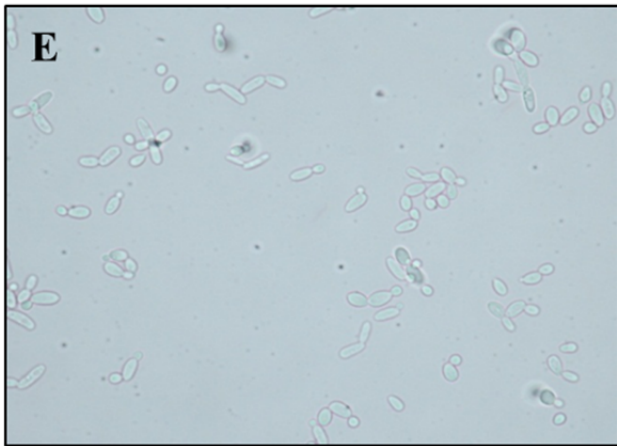
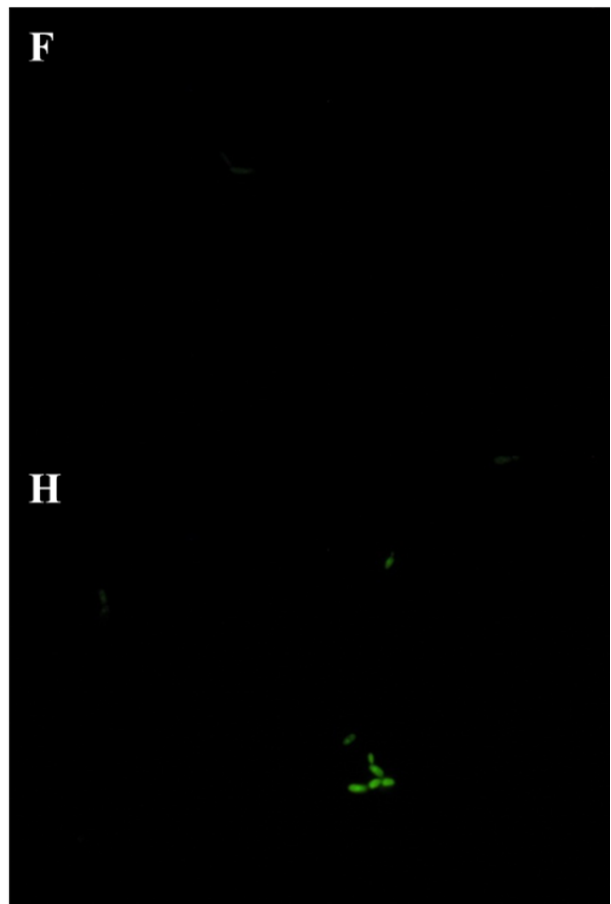
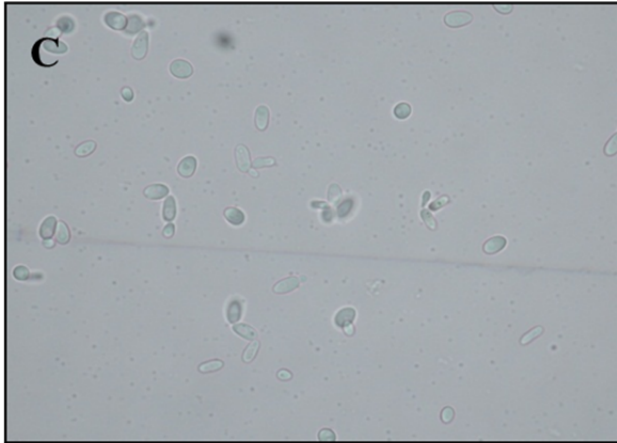
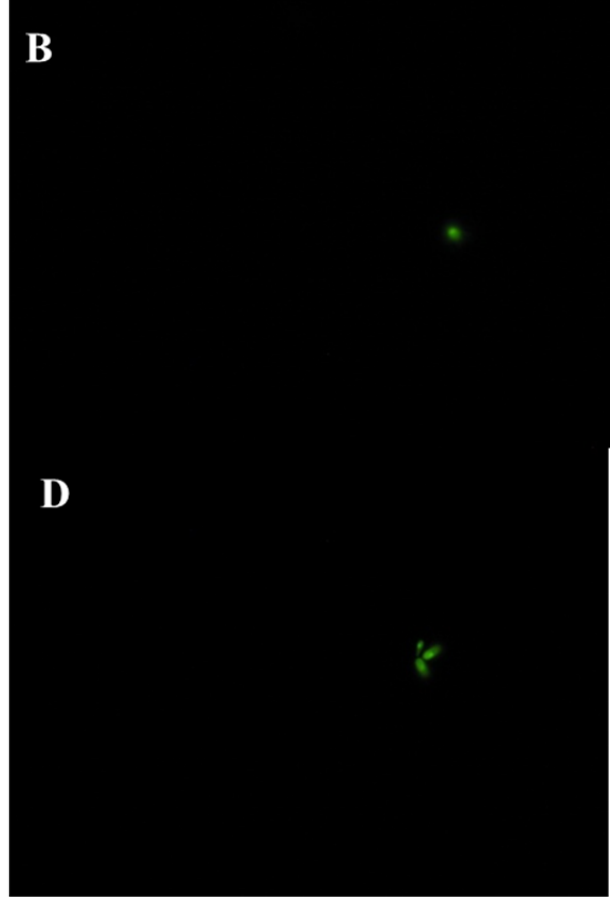
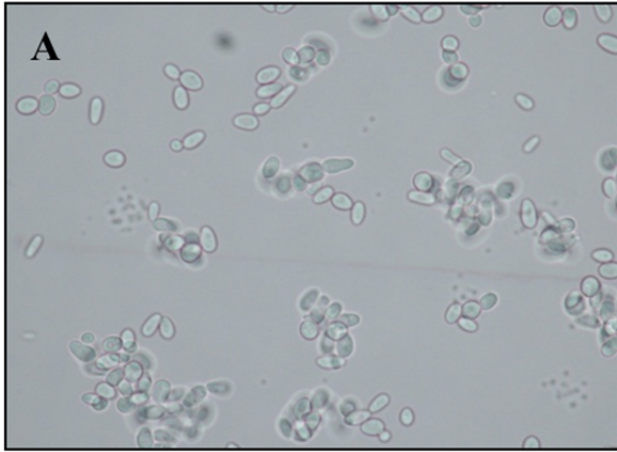


Figura 6. Ensaio de permeabilização da membrana de *C. parapsilosis* (A-D) e *K. marxianus* (E - H). As células foram tratadas com 0,72 μ M de JBU por 24 h e incubadas com 0,2 μ M de SYTOX green (C, D, G e H). A, B, E e F: controle. A, C, E e G: campo claro; B, D, F e H: fluorescência. Observar a redução do número de células nos painéis C e G. Aumento: Obj. 20x.

Em seguida foi avaliada a capacidade da JBU de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (NO) pelas células das leveduras. A indução da produção de ROS por vários antifúngicos, como azóis e polienos, além de algumas defensinas como a *PsD₁* (defensina de *Pisum sativum*) tem sido relatada (Mello *et al.*, 2011). Radicais livres de oxigênio são associados com injúria celular e toxicidade (Lin e Maiese, 2001) e o estresse oxidativo leva à destruição de muitos tipos celulares através de rotas de apoptose (Chong *et al.*, 2006; De Felice, *et al.*, 2007). Utilizamos sondas fluorescentes para marcação das espécies reativas de oxigênio, não foi observada a produção de ROS nas células de *C. parapsilosis*, *K. marxianus*, *P. membranifasciens* e *C. tropicalis* incubadas com 0,72 μ M de JBU por 24 h, a 28 °C. Portanto, nas condições do ensaio, os resultados indicam que o efeito da JBU sobre as leveduras não envolve a produção de espécies reativas de oxigênio.

A JBU induz a formação de pseudohifas em *C. tropicalis* (Figura 7B), *P. membranifasciens* (Figura 5G), *K. marxianus* (Figura 6G). As mudanças morfológicas em leveduras são controladas por fatores intracelulares que regulam a expressão de genes específicos, e são induzidas por diferentes condições do ambiente. Condições que interferem com o ciclo celular, como tratamento com hidróxi-uréia, que depleta ribonucleotídeos e inibe a replicação do DNA, ou o nocodazol, que despolimeriza microtúbulos e bloqueia as células em mitose, tornando as células alongadas e incapazes de se dividir, podem provocar a formação de células tipo-pseudohifas ou tipo-hifas, que eventualmente morrem (Berman, 2006). Além disso, foram observadas alterações no citoplasma das pseudo-hifas, como formação de vacúolos, que podem ser comparadas ao que se observa em células tratadas com H₂O₂ (Figuras 5B e C – setas vermelhas). O aparente aumento no crescimento celular das células tratada com JBU pode ser resultado da formação de pseudohifas e, considerando o aumento da permeabilidade dessas células (Figuras 5H; 6H e 7D), isso pode indicar “fenótipo terminal”.

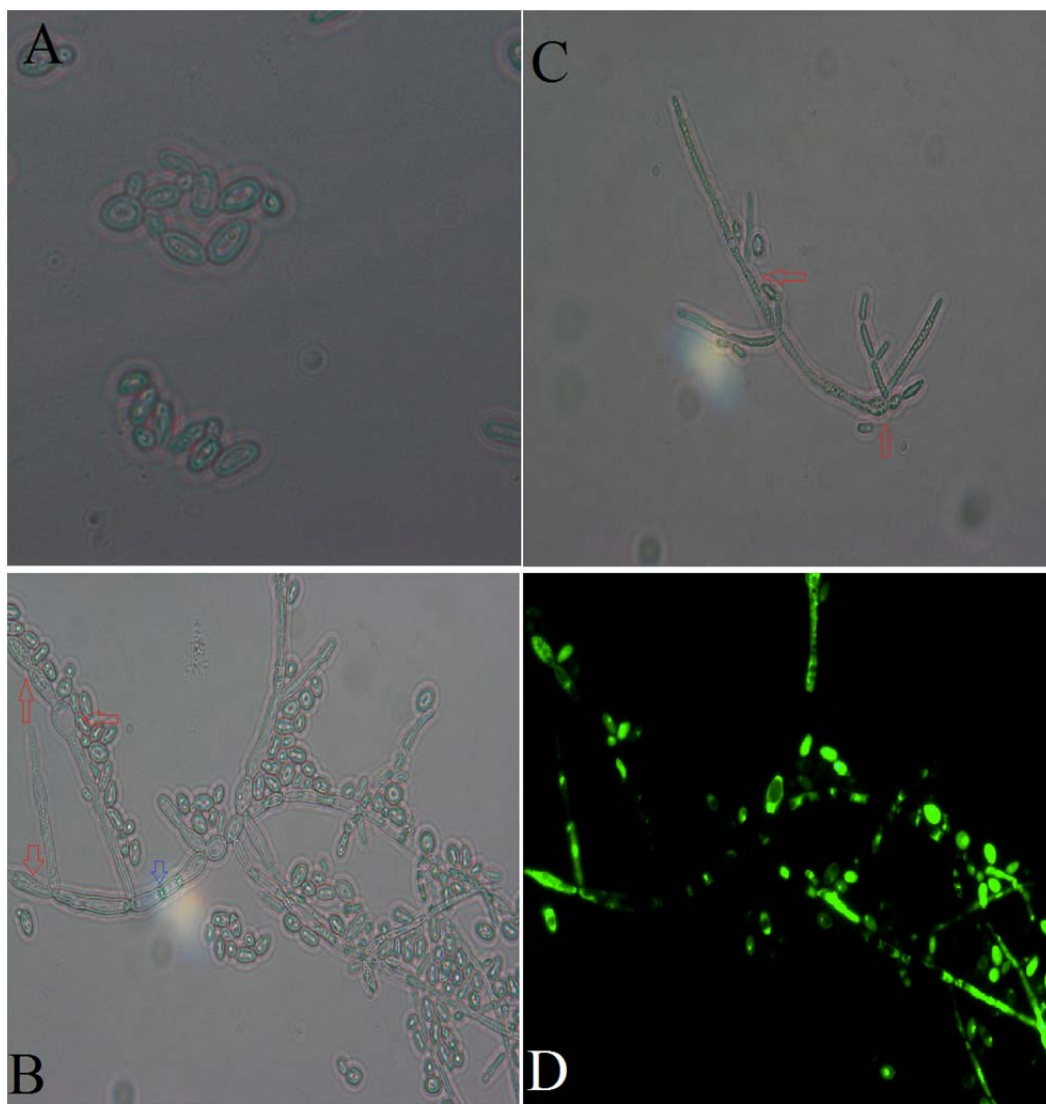


Figura 7. Alterações na morfologia celular: células de *C. tropicalis* foram crescidas a 28 °C, por 24 h, na presença de Tris 10 mM, pH 7,0 (A), (B e D) 0,36 μM de JBU e (C) 0,1% H₂O₂. (D) SYTOX Green. Aum.: Obj. 40 x.

A H⁺-ATPase da membrana plasmática tem um papel essencial na fisiologia da célula fúngica. Interferências na sua função por antagonistas clássicos levam à morte celular (Ribeiro *et al.*, 2007). Nesse trabalho, o efeito da JBU, direto ou indireto, sobre a atividade da H⁺-ATPase foi avaliado monitorando a acidificação do meio estimulada por glicose em *S. cerevisiae* e *C. albicans*. As células foram pré-incubadas em tampão com as amostras por 30 m, sendo adicionado, em seguida, a glicose. O pH foi medido a intervalos de 1 minuto, durante os 30 m seguintes. Na dose de 0,09 μM, a urease inibiu a acidificação estimulada por glicose em 92% para a *S. cerevisiae* e em 95% para *C. albicans* (Figura 8). Interferência do peptídeo derivado da JBU, jaburetox, em uma V-ATPase de túbulos de Malpighi do inseto *Rhodnius prolixus* levando a uma inibição de

diurese foi reportada por Stanisçuaski *et al.* (2009). A CNTX, outra isoforma da urease de *C. ensiformis*, interfere com a atividade de uma $\text{Ca}^{2+}.\text{Mg}^{2+}.\text{ATPase}$ do retículo sarcoplasmático (Alves *et al.*, 1992). Mello *et al.* (2011) demonstraram que a defensina PvD₁, isolada do feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, inibe a acidificação em *S. cerevisiae* e espécies de *Fusarium*, um efeito que os autores atribuíram à ação da proteína sobre a membrana plasmática das células fúngicas.

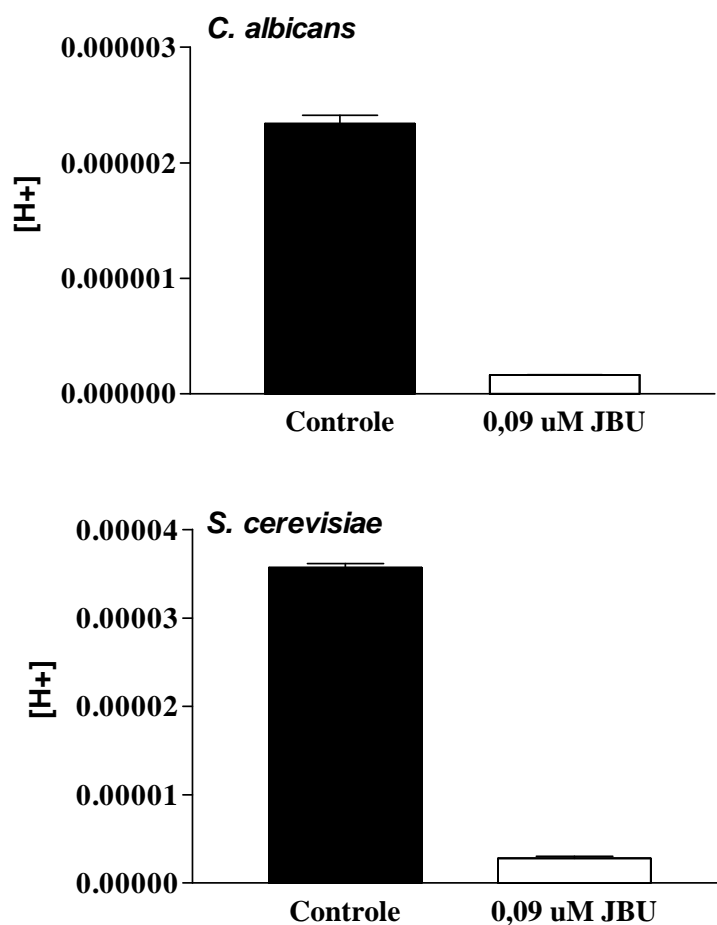


Figura 8: Efeito da JBU sobre a acidificação do meio induzida por glicose em células de *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Glicose (100 mM) foi adicionada ao meio depois de 30 m de incubação das células com 0,09 μM de JBU. A liberação de H^+ , medida como variação do pH, está indicada como total acumulado após 30 m. As barras representam média de pontos em triplicata.

Para avaliar a viabilidade celular em *S. cerevisiae* tratada com JBU foi utilizado o kit LIVE/DEAD (Invitrogen) (Figura 9). Foi utilizado o marcador fluorescente: FUN-1, que marca células viáveis e metabolicamente ativas através da formação de estruturas

vacuolares com fluorescência vermelha. Nas células incubadas com tampão, houve a formação de CIVS (figura 9C – setas azuis), indicando que essas células estão metabolicamente ativas. A formação dessas estruturas envolve o transporte das moléculas de FUN-1 para o vacúolo, esse processo é dependente de ATP e é inibido na presença de azida sódica ou por alterações no gradiente de H^+ através da membrana mitocondrial (Millard. *et al.*, 1997). Nas células tratadas com JBU foi detectada coloração fluorescente difusa (vermelha) na maioria das células (Figura 9D – setas brancas). Segundo informação do fabricante, essa coloração indica células com membranas intactas, porém, com metabolismo comprometido. Não houve alteração na marcação por CalcoFluor White entre células controles e células tratadas com a JBU, indicando não haver comprometimento da integridade da parede celular, após 2 h de tratamento (dados não mostrados).

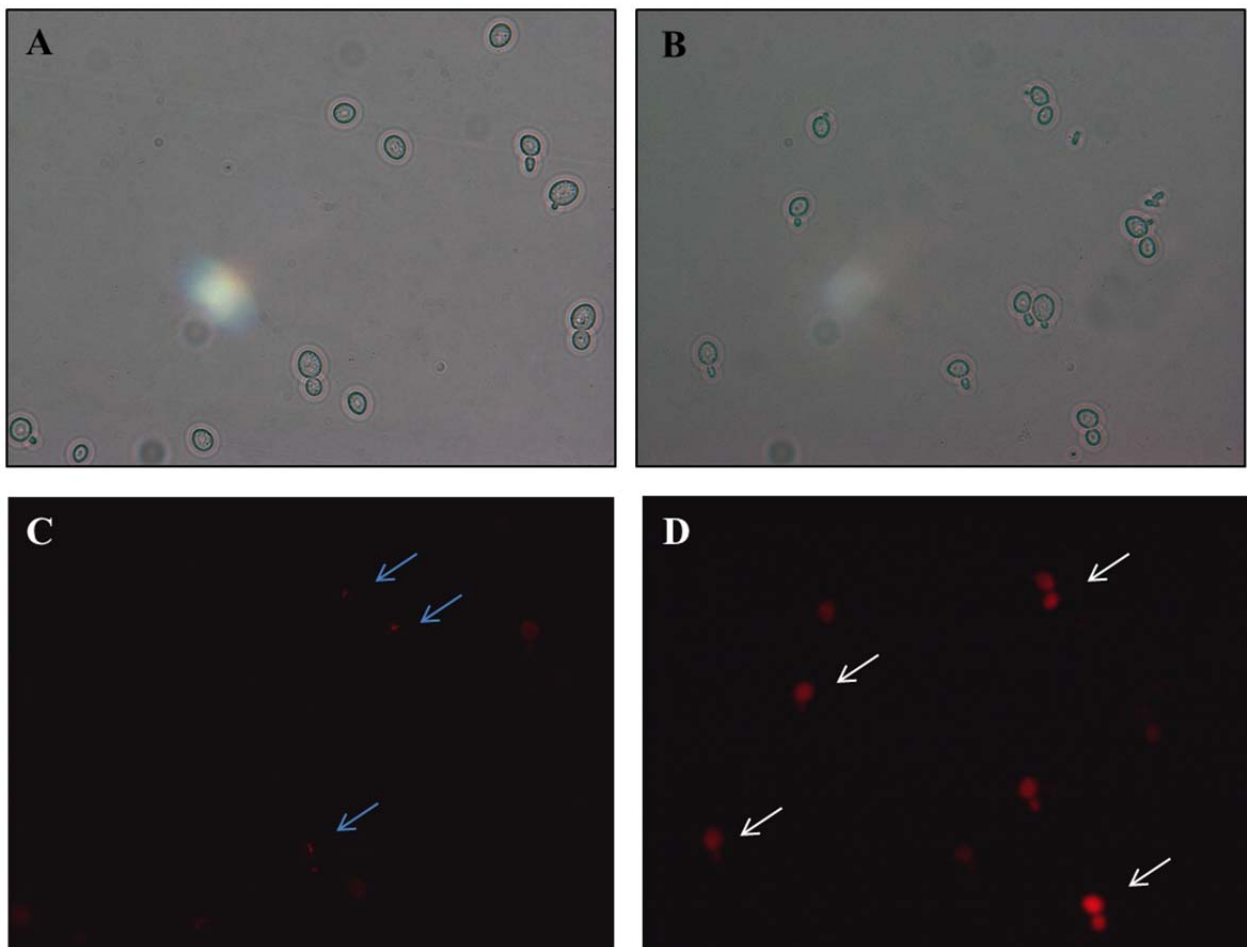


Figura 9: Ensaio para avaliar a atividade metabólica utilizando uma sonda fluorescente, FUN-1. Células de *S. cerevisiae* foram incubadas por 2 h a 28 °C, na presença de Tris 10 mM pH 7,0 (A - C), e 0,36 µM de JBU (B - D). Após esse período, foi adicionado 1 µM de FUN-1 e as células mantidas por 1 h a 28 °C. As células foram visualizadas em microscópio equipado com diferentes filtros fluorescentes:(C e D)- Exc. 485 nm e emis. 620 nm; A e B campo claro. Aumento: obj.: 40x.

A inibição da acidificação pode ser consequente à permeabilização da membrana, levando a dissipação do gradiente de H^+ , como demonstrado por Ribeiro *et al.* (2012) para a proteína albumina 2S de *P. edulis f. flavicarpa* sobre células de *S. cerevisiae* e *C. albicans*. Nossos estudos sugerem que a JBU interfere no metabolismo celular de *S. cerevisiae*, sem alterações visíveis da permeabilidade da membrana, após exposição por 2 h à proteína. O acompanhamento dessas leveduras por um tempo maior é necessário para avaliar a evolução da viabilidade das células, já que a exposição por 24 h de *C. tropicalis*, *P. membranifasciens*, *C. parapsilosis* e *K. marxianus* à proteína JBU provoca permeabilização da membrana. Estudos utilizando a técnica de “Planar Lipid Bilayer” demonstraram que tanto a JBU quanto o Jaburetox-2Ec são capazes de se inserir em membranas lipídicas planares formando canais iônicos, que podem levar a dissipação de gradientes iônicos essenciais para a manutenção da homeostase das células (Piovesan, 2009). Adicionalmente, estudos de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e do potencial zeta, comprovaram a capacidade da JBU de se inserir na bicamada lipídica, afetando parâmetros físico-químicos da membrana de lipossomos miméticos de plaquetas humanas (Micheletto, 2010).

As alterações morfológicas, em particular a indução de pseudo-hifas induzidas pela urease, também merecem atenção, já que inúmeras rotas podem estar envolvidas. A indução de pseudo-hifas é descrita para outras moléculas antifúngicas, com PvD₁ (Mello *et al.* 2011), albumina 2S (Ribeiro *et al.* 2012), e peptídeos de *C. annuunn* L. (pimenta) (Ribeiro *et al.* 2007). Os autores sugerem que alterações no pH causadas pela interferência dessas proteínas no fluxo de H^+ seriam responsáveis pelas variações morfológicas das leveduras. A morfogênese em fungos é determinada pela expressão de diferentes genes induzidos por fatores ambientais. Essa regulação envolve ciclinas específicas para cada isoforma (Berman, 2006). No caso da alcalinização do pH, a rota do Rim101 (um regulador de transcrição) é ativada através de uma cascata “upstream”, que inicia em receptores de membrana (Rim21 e Dg16) (segundo Shapiro, *et al.* 2011).

Homologia de ureases com proteínas antifúngicas vegetais – identificação de prováveis domínios antifúngicos

Alinhamentos das sequências da SBU, JBU e da HPU revelaram a presença de regiões homólogas com proteínas vegetais com comprovada atividade antifúngica, como por exemplo, as defensinas de ervilha, a faseína A (uma quitinase de *Phaseolus vulgaris* cv. pinto), taumatina e peroxidases fúngitoxicas (Ng *et al.*, 2004) (Figura 10 e 11).

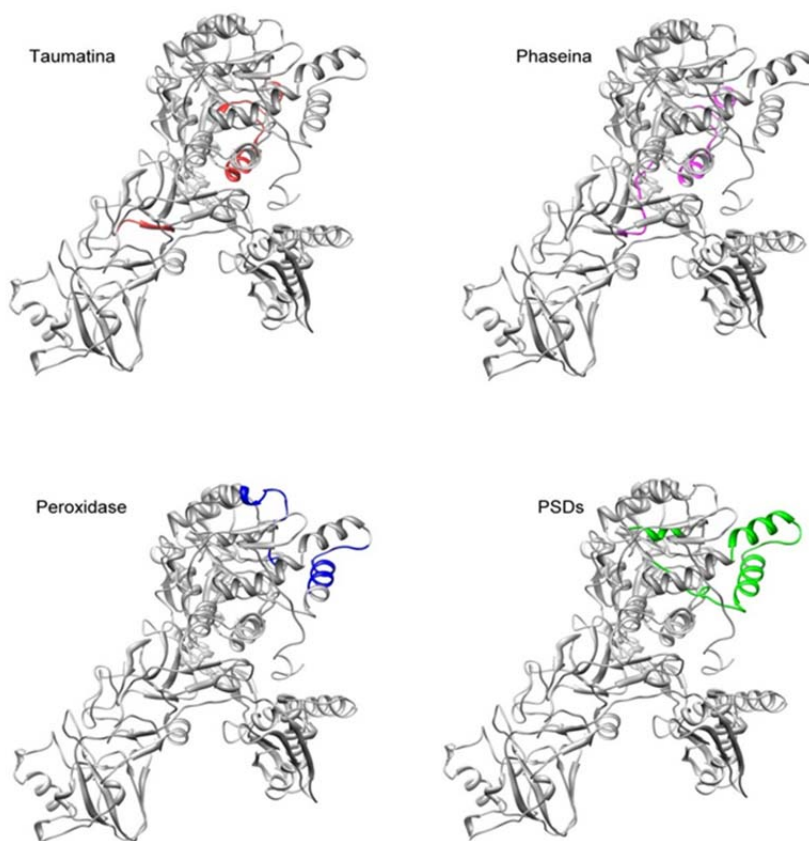


Figura 10. Representação da urease majoritária de *C. ensiformis* (monômero) e as suas regiões que mostram homologia com proteínas antifúngicas. Na parte superior, estão marcadas as regiões que alinham com taumatinas (A) e faseína/quitinases (B). Na parte inferior da figura estão marcadas as regiões que alinham com peroxidase antifúngica (C) e as defensinas de ervilha(D) (Colaboração de Rodrigo Ligabue-Braun).

● Taumatina

```

          10      20      30      40      50
CANENS_1      -ANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEAISSGITTTLVGGGTGPAAG
GLYMAX_EMBR   -ANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVDEAISSGITTTLVGGGTGPTAG
GLYMAX_UBI    -ANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYDAVTSGITTLVGGGTGPDAG
CANENS_JBUREIIB -VNTEVICGEGLIVTAGGIDCHVHYICPQSLDEAISSGITTTLVGGGTGPTDG
Kaerogenes_C  GAATEVIAAEGKIVTAGGIDTHIHWCIPQQAEEALVSGVTTMVGGGTGPAAG
Hpylori_C     -PATEALAGEGLIVTAGGIDTHIHFIISPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPADG
Bpasteurii_C  -TATEVIAAEGKIVTAGGIDTHVHFINPDQVDVALANGITTTLVGGGTGPAEG
Taumatina     -ANFEIVN-----NCPTYVWAASP-----GGRRLRDRG
          * ;          * *          *** *
Prim.cons.    GANTEVIAGEGLIVTAGGIDCHVH2ICPQ2VDEAISSGITTTLVGGGTGPA2G

```

● Peroxidase

```

          10      20      30      40      50      60
CANENS_1      TLNEAGFVEHSIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIKVCGIKNVLPSSSTNPTPLTSNT
GLYMAX_EMBR   TLNEAGFVEHSIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIKVCGMKNVLPSSSTNPTPLTLNT
CANENS_JBUREIIB TVNESGFVEHTIAAFNGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIKVCSMKNVLPSSSTNPTPLTSNT
GLYMAX_UBI    TLNESGFVEHTIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIKVCGEKNVLPSSSTNPTRPYTHNT
Hpylori_C     TLNEAGCVEDTMAAIAGRIMTTFHTEGAGGGHAPDIKVVAGEHNILPASTNPTIPFTVNT
Kaerogenes_C  TLNESGFVEDTLAAIGRTIHTFHTEGAGGGHAPDIITACAHPNILPSSSTNPTLPYTLNT
Bpasteurii_C  TLNEAGFLEDTLRAINGRVIHSPHVEGAGGGHAPDIMAMAGHPNVLPSSSTNPTRPFTVNT
Peroxidase    LDNPAGFKGD-----K-----ANG-----
          * : * .          * *
Prim.cons.    TLNEAGFVE2TIAAFKGRTIHTYHSEGAGGGHAPDIKVCG3KNVLPSSSTNPTPLT3NT

```

```

          70
CANENS_1      IDEHLDMLMVCHHLDR
GLYMAX_EMBR   IDEHLDMLMVCHHLNR
CANENS_JBUREIIB VDEHLDMLMVCHHLNR
GLYMAX_UBI    IDEHLDMLMVCHHLNK
Hpylori_C     EAEHMDMLMVCHHLDK
Kaerogenes_C  IDEHLDMLMVCHHLDP
Bpasteurii_C  IDEHLDMLMVCHHLKQ
Peroxidase    ---MLKMGNLCFLAKA
          : * : * .
Prim.cons.    IDEHLDMLMVCHHL2R

```

● DPSs

```

          10      20      30      40      50
CANENS_JBUREIIB KVCMSKNVLPSSSTNPTPLTSNTVDEHLDMLMVCHHLNREIPEDLAFASSRVR
GLYMAX_EMBR   KVCGMKNVLPSSSTNPTPLTLNTIDEHLDMLMVCHHLNREIPEDLAFACSRIR
CANENS_1      KVCGIKNVLPSSSTNPTPLTSNTIDEHLDMLMVCHHLNREIPEDLAFASRRIR
GLYMAX_UBI    KVCGEKNVLPSSSTNPTRPYTHNTIDEHLDMLMVCHHLNKNIPEDVAFASRRIR
Bpasteurii_C  AMAGHPNVLPSSSTNPTRPFTVNTIDEHLDMLMVCHHLNQNIPEDVAFADSRIR
Kaerogenes_C  TACAHPNILPSSSTNPTLPYTLNTIDEHLDMLMVCHHLNPDIAEDVAFASRRIR
Hpylori_C     KVAGEHNILPASTNPTIPFTVNTAEAEHMDMLMVCHHLNKSIEKEDVQFADSRIR
PSD1xx7      KTCEH--L--ADTYRGVCFTNASCDDHCNKKA--HLISGTCHN-WKCFCTQNC
PSD2xx8      KTCEN--L--SGTFKGPICPDGNCNKHCRNNE--HLLSGRCRDDFRWCNTNRC
          : : * : * *          * : : : : : : : : : :
Prim.cons.    KVCGHKNVLPSSSTNPTRP2T3NTIDEHLDMLMVCHHL2REIPELVAFACSRIR

```

● Faseina

```

          10      20      30      40
Kaerogenes_C  AAEGKIVTAGGIDTHIHWCIPQQAEEALVSGVTTMVGGGTGPAAGTH
Hpylori_C     AGEGLIVTAGGIDTHIHFIISPQQIPTAFASGVTTMIGGGTGPADGTN
Bpasteurii_C  AAEGKIVTAGGIDTHVHFINPDQVDVALANGITTTLFVGGGTGPAEGSK
CANENS_1      AGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEAISSGITTTLVGGGTGPAAGTR
GLYMAX_EMBR   AGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVDEAISSGITTTLVGGGTGPTAGTR
CANENS_JBUREIIB CGEGLIVTAGGIDCHVHYICPQSLDEAISSGITTTLVGGGTGPTDGSR
GLYMAX_UBI    AGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYDAVTSGITTLVGGGTGPAAGTR
Phaseina     CDVGSVISAS-----LFEQQLKHRN-----GPAPARGCR
          . * : : * .          : :          * . * : * .
Prim.cons.    AGEGLIVTAGGIDCHVH2ICPQQVDEAISSGITTTLVGGGTGPA2GTR

```

Figura 11. Alinhamento das sequências das ureases majoritária e JBURE-II de *C.ensiformis* (monômero), das urease bacterianas de *K. aerogenes*, de *B. pasteurii*, de *H. pylori* e das ureases ubíqua e embrião específica de soja (*G. max*), com as proteínas antifúngicas taumatina, faseína/quitinases, peroxidase antifúngica e a defensina de ervilha. (Colaboração de Rodrigo Ligabue-Braun).

Apesar de não haver alto grau de identidade entre as proteínas antifúngicas entre si, ou com a JBU, chama a atenção o fato de que todas essas regiões idênticas estão próximas entre si, estando localizadas no domínio gama da proteína. Essa observação motivou a busca de um provável domínio antifúngico da JBU.

Peptídeos antifúngicos derivados da JBU

Em abordagem similar à que foi utilizada para identificar o domínio inseticida das ureases de *C. ensiformis* (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000), nessa tese diferentes enzimas proteolíticas foram testadas quanto à capacidade de gerar peptídeo(s) antifúngico(s) derivados da JBU, a saber, quimotripsina, pepsina, tripsina, e papaína. A JBU nativa é relativamente resistente à hidrólise proteolítica com as quatro enzimas testadas, nas condições mais usuais (1:100 enzima/substrato, pH ótimo da enzima). Se fervida, a proteína precipita e sai de solução, não sendo essa uma alternativa para desnaturar e facilitar o acesso das enzimas, assim, todos os testes foram feitos com a JBU nativa.

A enzima que teve maior eficiência na hidrólise da JBU foi a papaína, assim foram testadas várias condições para otimizar a hidrólise. A melhor condição para produção de fragmentos tóxicos foi: incubação por 2 h, à 37° C, relação enzima/substrato de 1:10. As amostras foram analisadas por gel de Tricina após esse período de incubação, ficando claro o desaparecimento da banda da JBU (~100 kDa) e a presença de bandas menores, particularmente na região de 10 kDa (Figura 12).

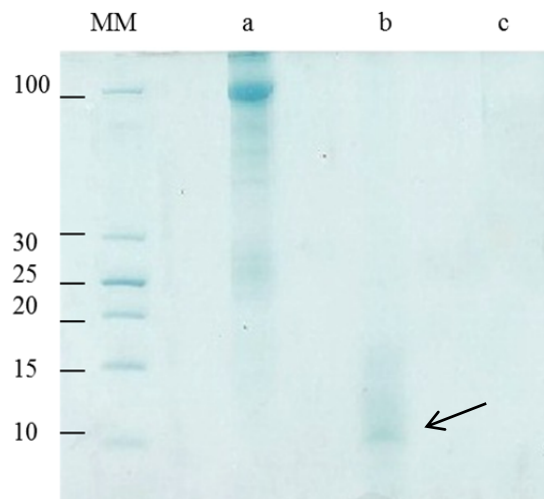


Figura 12. Gel de poliacrilamida a 15% em SDS-Tricina do hidrolisado de JBU com papaína por 2 h, 37 °C, pH 6,5, relação enzima substrato 1:10. Canaleta a= JBU controle; b = Hidrolisado; c = papaína. MM = marcadores de massa molecular. Revelação com Coomassie coloidal.

A hidrólise com papaína também apresentou os melhores resultados na geração de peptídeos com atividade antifúngica sobre *F. oxysporum* e *Mucor sp* (Figura 13). Os hidrolisados apresentaram maior atividade inibitória sobre *Mucor sp* do que a JBU não hidrolisada, indicando que houve a produção de fragmentos mais tóxicos do que a proteína inteira. A hidrólise da JBU com as enzimas quimotripsina (pH 7,5), pepsina (pH 4,0) e tripsina (pH 7,5) na proporção 1:10 não resultou na formação de fragmentos tóxicos para os fungos. Foi avaliada a atividade fungitóxica de peptídeos trípticos da JBU como alternativa ao uso da papaína. No entanto, a tripsina sozinha (ou algum produto de auto-hidrólise) apresenta atividade inibitória para o crescimento de alguns fungos, como demonstrado em *Mucor sp*, sem inibir outros, como *F. oxysporum* (Figura 13).

A hidrólise da JBU com serino proteases parece não ser eficiente para gerar fragmentos fungitóxicos. A mesma observação já foi feita pelo grupo em relação à produção de peptídeos entomotóxicos por hidrólise enzimática. Enquanto que enzimas de insetos pertencentes às classes cisteíno e aspártico proteases produzem peptídeos inseticidas a partir da hidrólise da JBU, serino proteases de insetos clivam extensivamente a proteína sem formar fragmentos tóxicos (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000).

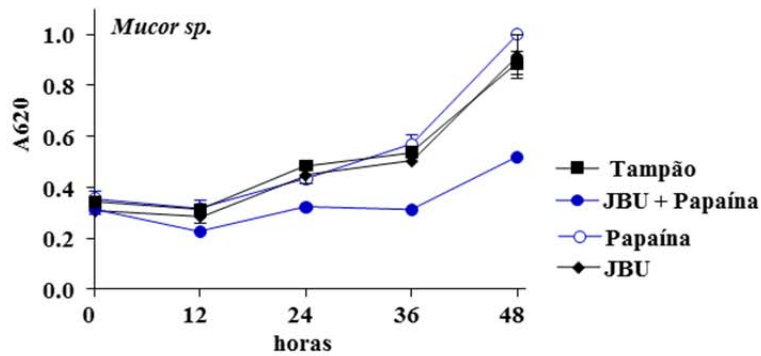
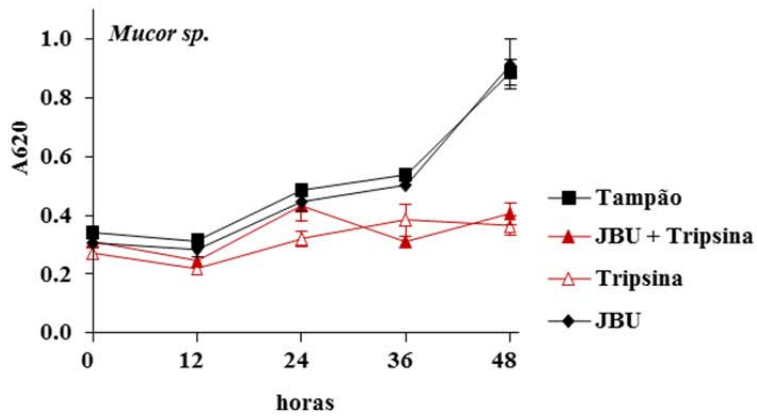
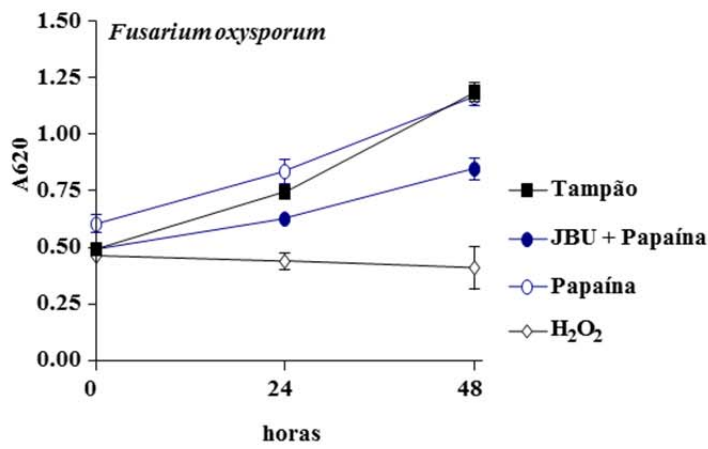
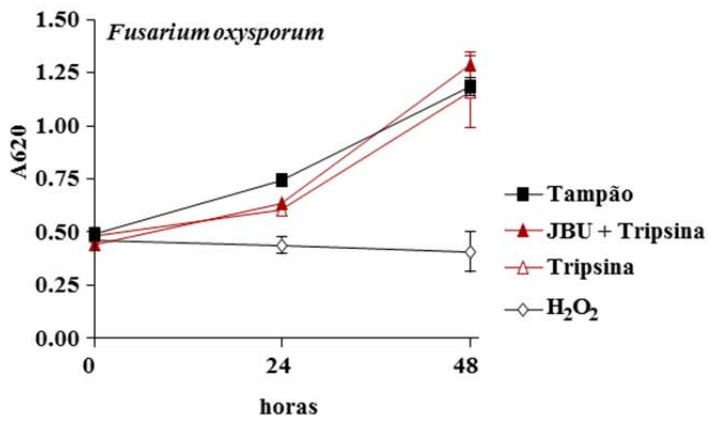
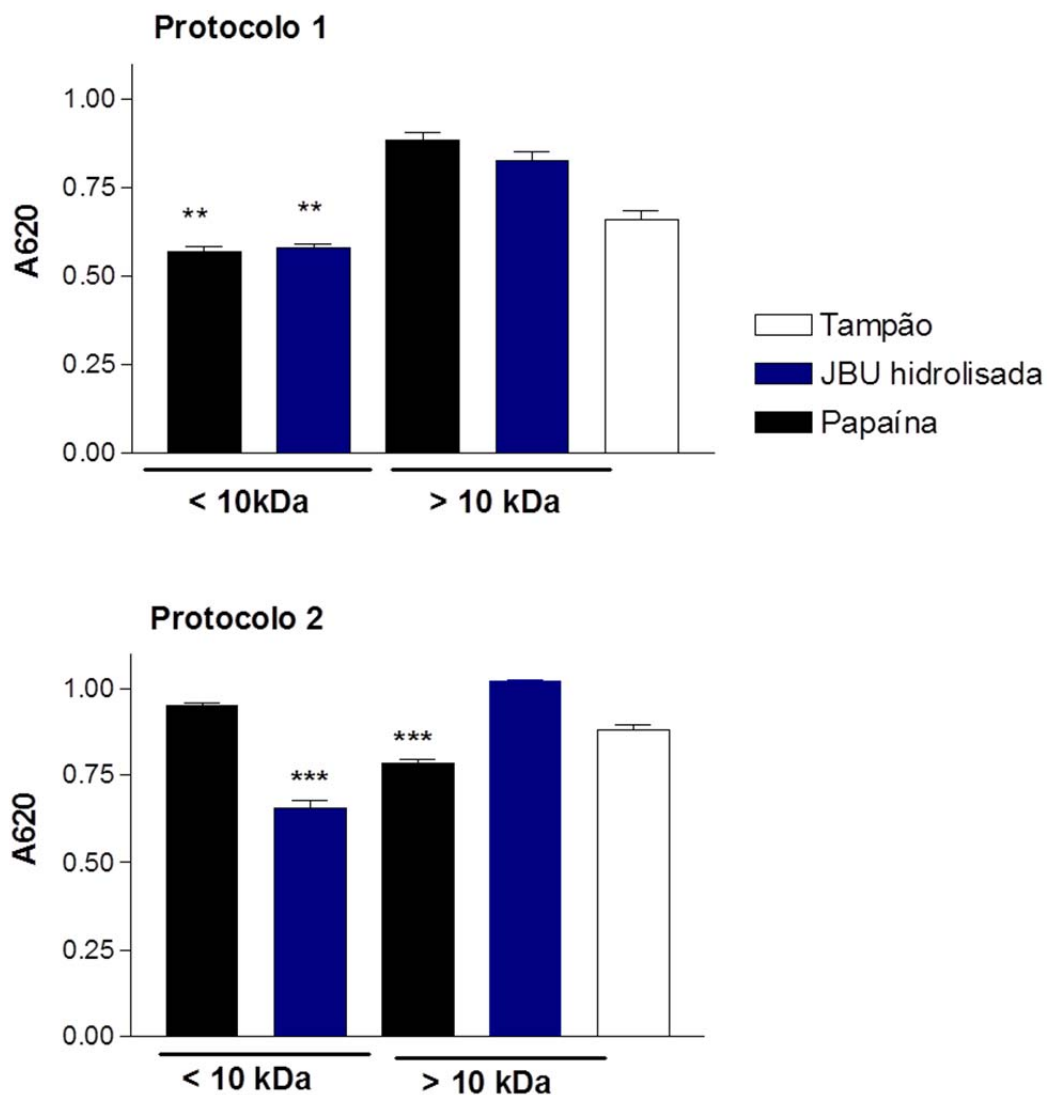


Figura 13. Curva de crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *Mucor* sp na presença de hidrolisados da JBU com tripsina e/ou papaína, e com controles: tampão, tripsina, papaína e H₂O₂, como controle positivo. Esporos foram inoculados no meio PDB, incubados por 28 °C, por 16 h, seguido da adição das amostras. A placa de 96 poços, contendo o ensaio, foi incubada a 28 °C e a absorbância lida a cada 24 h. Cada valor representa a média de valores em triplicata.

Embora a papaína não tenha um efeito pronunciado sobre os fungos, dois protocolos foram testados para parar a reação e evitar que a atividade proteolítica da papaína interferisse no crescimento dos fungos. No protocolo 1, ao final do período de hidrólise, a mistura reacional foi fervida por 10 m, resfriada em banho de gelo, seguido de centrifugação para retirada do precipitado. No protocolo 2, não ocorreu a fervura. O hidrolisado de JBU por ação da papaína foi separado em duas frações por filtração em membrana com corte de 10 kDa. O material não retido, enriquecido com peptídeos da JBU menores que 10 kDa, independente do protocolo, teve um efeito inibitório significativo sobre *C. tropicalis* (Figura 14). Foi observado também que a autohidrólise da papaína, seguida de fervura gera peptídeos com massa abaixo de 10 kDa, mas que não são inibitórios para as leveduras (Figura 14).

A partir desses resultados, o Protocolo 2 foi selecionado para gerar fragmentos fungitóxicos da JBU, por possibilitar a separação da fração tóxica da papaína com massa acima de 10 kDa. Partindo de 1,0 mg de JBU submetida a hidrólise com papaína pelo protocolo 2, a fração contendo fragmentos não retidos no Amicon com corte de 10 kDa, foi concentrada por liofilização e, em seguida, analisada por espectrometria de massas.



*** P < 0,001 em relação ao tampão

** P < 0,05 em relação ao tampão

Figura 14. Crescimento de *C. tropicalis* após 24 h de incubação com JBU, JBU hidrolisada com papaína, papaína e tampão. A placa de 96 poços contendo o ensaio foi incubada a 28 °C e a absorbância lida em 24 h. Cada valor representa a média \pm SD dos valores em triplicatas.

Análise das frações hidrolisadas

As frações hidrolisadas foram dessalinizadas em coluna de fase reversa e analisadas por espectrometria de massas. A análise da fração resultante da hidrólise da

JBU com papaína revelou apenas 5 peptídeos (5 espectros adquiridos) correspondendo a uma cobertura de 7,1% da sequência da JBU (Tabela 3), confirmando a hidrólise.

Tabela 3: Resultado da espectrometria de massas da JBU hidrolisada com papaína (fração < 10kDa)

Condição	Cobertura de sequência	Peptídeos
JBU + PAPAÍN <10 kDa	7.14 %	A-AEDVLNDIGAI-S G-KGSSSKPDELHEIHK-A G-KGSSSKPDELHEIHKAG-A N-IHTDTLNEAGFVE-H <i>S-IEGNKVIRGGNAIADGPVN-E</i>

As sequências encontradas na espectrometria de massas foram alinhadas à JBU, e estão destacadas na figura abaixo (Figura 15).

```
>gi|167228|gb|AAA83831.1| urease [Canavalia ensiformis]
MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGEKTVAQLM
CLGQHLLGRRQVLPVPHLLNAVQVEATFPDGTKLVTVHDPISRENGELQEALFGSLLP
VPSLDKFAETKEDNRIPGEILCEDECLTLNIGRKAVILKVTSKGDRIQVGSYHFIEVNP
YLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCKSVTLVSIEGNKVIRGGNAIADGPVNETNL
EAAMHAVRSKGFGEHEEKDASEGFTKEDPNCPFNTFIHRKEYANKYGPTTGDKIRLGD
TNLLAEIEKDYALYGDECVFGGGKVIRDGMGQSCGHPPAISLDTVITNAVIIDYTGIKADI
GIKDGLIASIGKAGNPDIMNGVFSNMIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEAI
SSGITTLVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMLMLQSTDYLPNFGFTGKGSSSKPDEL
HEIHKAGAMGLKLHEDWGSTPAAIDNCLTIAEHHDIQINIIHTDTLNEAGFVEHSIAAFKGR
TIHTYHSEGAGGGHAPDIKVCGIKNVLPSSNTNPTPLTSNTIDEHLDMVMVCHHLDREIP
EDLAFHRSRIRKKTIAAEDVLNDIGAISISSDSQAMGRVGEVISRTWQTADPMKAQTGP
LKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYVGSVEVGKLADLVMWKPSPFFGTPKEM
VIKGGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKMRPMYGTGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLY
GLNKRVEAVSNVRKLTKLDMKLNLDALPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRNY
FLF
```

Figura 15. Localização das sequências dos peptídeos derivados da JBU pela hidrólise com papaína. As sequências sublinhadas correspondem àquelas sequenciadas por espectrometria de massas. A sequência sombreada corresponde ao N-terminal do peptídeo recombinante Jaburetox.

Nenhuma das sequências encontradas está compreendida nas regiões idênticas a proteínas antifúngicas de plantas, representadas na Figura 10 e, tampouco, apresentam identidade com outras proteínas antifúngicas. Nesse ponto, duas possibilidades existem: esses peptídeos não estão associados com domínio(s) antifúngico(s) da JBU, ou a JBU

apresenta domínio(s) antifúngico(s) único(s), diferente de outras proteínas fungitóxicas já conhecidas.

Dentre os peptídeos identificados, um deles (sequência em itálico) contem parte da sequência do peptídeo entomotóxico Pepcanatox, no seu N-terminal (Carlini *et al.*, 2000). Por outro lado, chamou atenção na análise por SDS-PAGE do hidrolisado de JBU com papaína apresentando na figura 12, a presença de uma banda mais intensa na região de 10 kDa, que coincide com a massa do peptídeo entomotóxico Pepcanatox, liberado da proteína por hidrólise com enzimas digestivas de diferentes insetos (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Piovesan *et al.*, 2008; Defferrari *et al.*, 2011). Com base nesses dados, foi avaliada uma provável atividade antifúngica do peptídeo recombinante Jaburetox, que é equivalente ao Pepcanatox.

Nesses estudos, foi utilizada a versão Jaburetox-V5 do peptídeo recombinante, cuja sequência de 91 aminoácidos derivada da JBU está ilustrada abaixo (Figura 16), e que difere do Jaburetox-2Ec descrito por Mulinari *et al.*, 2007, por não conter o epitopo V5 de origem viral, mantendo a cauda polihistidina (Martinelli, dados não publicados).

MGPVNIENCKAAMEIVCRREFGHKEEEDASEGVTTGDPDCPFTKAIPREEYANKY
GPTIGDKIRLGDTDLIAEIEKDFALYGDES VFGGGKVI-HHHHHH

Figura 16. Jaburetox-V5. O peptídeo recombinante foi construído com base na sequência da isoforma de urease JBURE-II (Pires-Alves *et al.*, 2003; Mulinari *et al.*, 2011), que é 100% idêntica à JBU nessa mesma região.

Ensaio fungitóxicos com o peptídeo Jaburetox –V5

Fungos filamentosos

A atividade do peptídeo recombinante JaburetoxV5 foi avaliada sobre a germinação e o crescimento de *P. herguei*, *Mucor sp.* e *R. solani*, como mostra a Figura 17. *Mucor sp* apresentou a maior susceptibilidade, tendo seu crescimento inibido na menor dose testada (10 µM) já com 48 h. Para o *P. herguei*, as doses de 20 e 40 µM foram inibitórias após 72-96 h. Foi observado, ainda, inibição da produção de pigmento (dados não mostrados), mesmo após o desenvolvimento das hifas. Em contraste, o Jaburetox–V5 não inibiu o crescimento de *R. solani* na maior dose testada, 40 µM, após 96 h (Fig. 17). Assim, o efeito antifúngico do Jabureto-V5 apresentou seletividade

espécie-específica semelhante ao que foi observado para ureases como holoproteínas (Becker-Ritt *et al.*, 2007), cujo efeito fungitóxico foi variável conforme a fonte da enzima e o tipo do fungo.

Becker-Ritt *et al.* (2007) relatou que o peptídeo Jaburetox-2Ec não afetava o crescimento micelar de fungos filamentosos fitopatogênicos, entre esses o *P. herguei*. No referido trabalho, o peptídeo foi adicionado ao meio em menores doses do que foi aqui testado, após 16 h de cultura do fungo, em etapa posterior à germinação dos esporos. Nessa tese, o Jaburetox-V5 foi adicionado juntamente com os esporos, levando à inibição da germinação, retardo no crescimento e desenvolvimento das hifas. Esse resultado indica que o efeito antifúngico do peptídeo ocorre em estágios jovens do desenvolvimento do micélio, etapa também susceptível às ureases, como descrito por Becker-Ritt *et al.*, 2007. A variação na metodologia pode ter influenciado os resultados diferentes obtidos nos dois trabalhos.

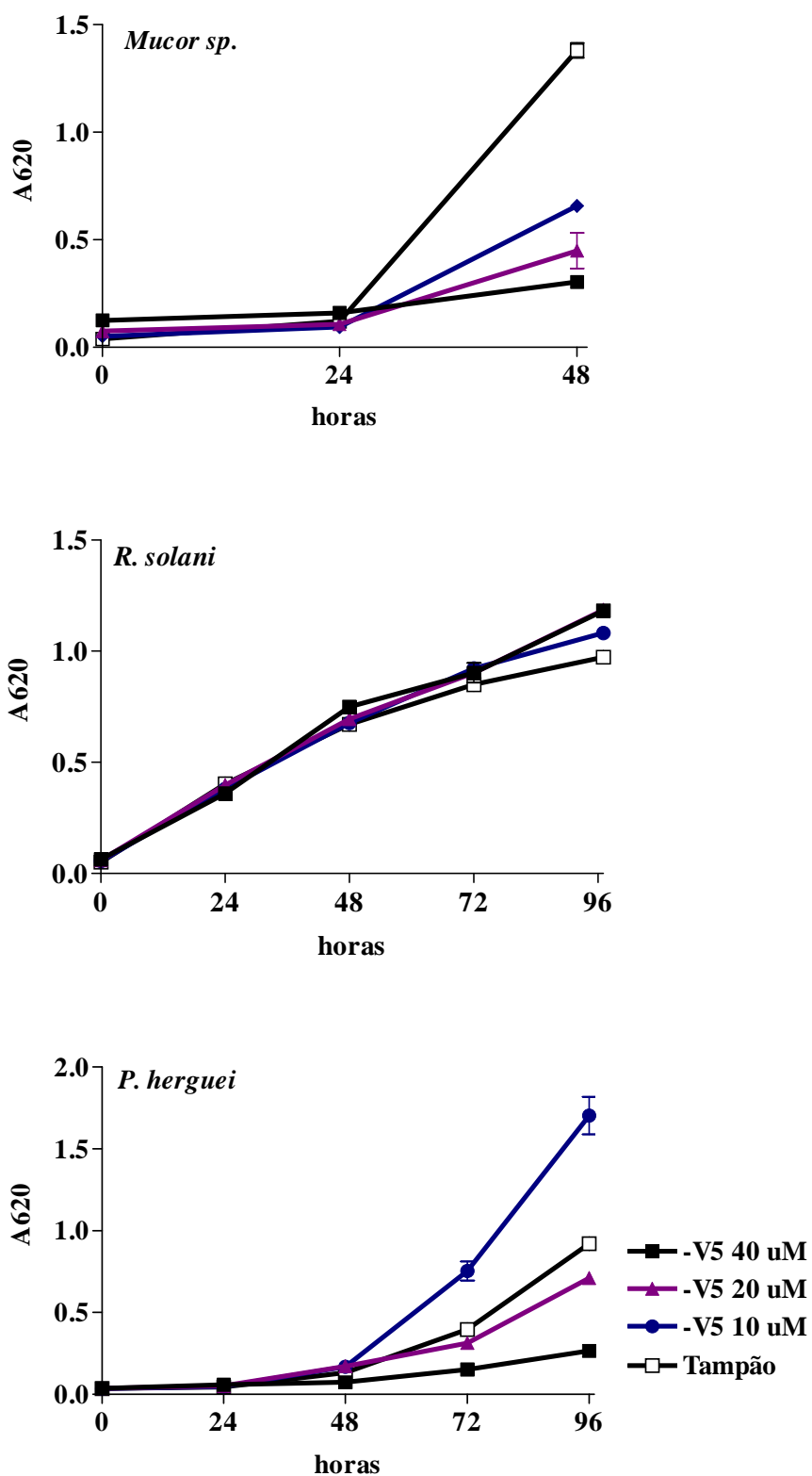


Figura 17. Curva de crescimento dos fungos *Mucor sp.*, *R. solani*, *P. herguei* na presença de diferentes concentrações de Jaburetox. A placa de 96 poços foi incubada a 28 °C e a absorbância lida a cada 24 h. Cada valor representa a média dos valores das triplicatas.

Leveduras

O peptídeo Jaburetox-V5 reduz o crescimento de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. membranifaciens* e *K. marxianus*. *S. cerevisiae*, As espécies *C. parapsilosis*, *P. membranifaciens* e *C. tropicalis* em doses de 9 μ M (Figura 18), e as demais leveduras testadas em doses de 18 μ M (Figura 19). O efeito fungitóxico do Jaburetox-V5 não persiste após lavagem e repique das células tratadas. Para a *P. membranifaciens*, mesmo na presença do peptídeo, observa-se uma retomada do crescimento após 48 h de incubação (Figura 19). Estudos adicionais serão necessários para esclarecer se o efeito é fungistático, se o peptídeo está sendo hidrolisado/inativado, e se a administração repetida do peptídeo levará à morte das leveduras.

O efeito do peptídeo Jaburetox-V5 sobre a permeabilização da membrana plasmática foi avaliado em *S. cerevisiae* verificando-se que as células tratadas (Figura 20B) são mais permeáveis ao SYTOX *green* do que as não tratadas (Figura 20D).

Assim como foi observado para o efeito fungitóxico da JBU, o peptídeo também induz alterações morfológicas em leveduras. A formação de pseudo-hifas (Figura 21) em *C. tropicalis* e a permeabilização da membrana de *S. cerevisiae* ocorrem em doses muito menores do que aquelas que inibem o crescimento (multiplicação) fúngico.

Estudo de espalhamento de luz (Moro *et al.*, 2012) demonstraram a tendência de oligomerização do jaburetox. O tempo de estocagem, a concentração do peptídeo e as condições de armazenamento influenciam fortemente o estado de agregação do peptídeo. A forma nativa do peptídeo em solução concentrada em pH neutro é a de um decâmero, sendo que oligômeros maiores se formam reversivelmente em torno do pH 5,5. Nessa Tese utilizamos para os cálculos de molaridade a massa do monômero (10 kDa) do peptídeo. Assim, considerando a complexidade do comportamento de oligomierização do peptídeo, as concentrações utilizadas nos experimentos com leveduras podem estar subestimadas em até dez vezes.

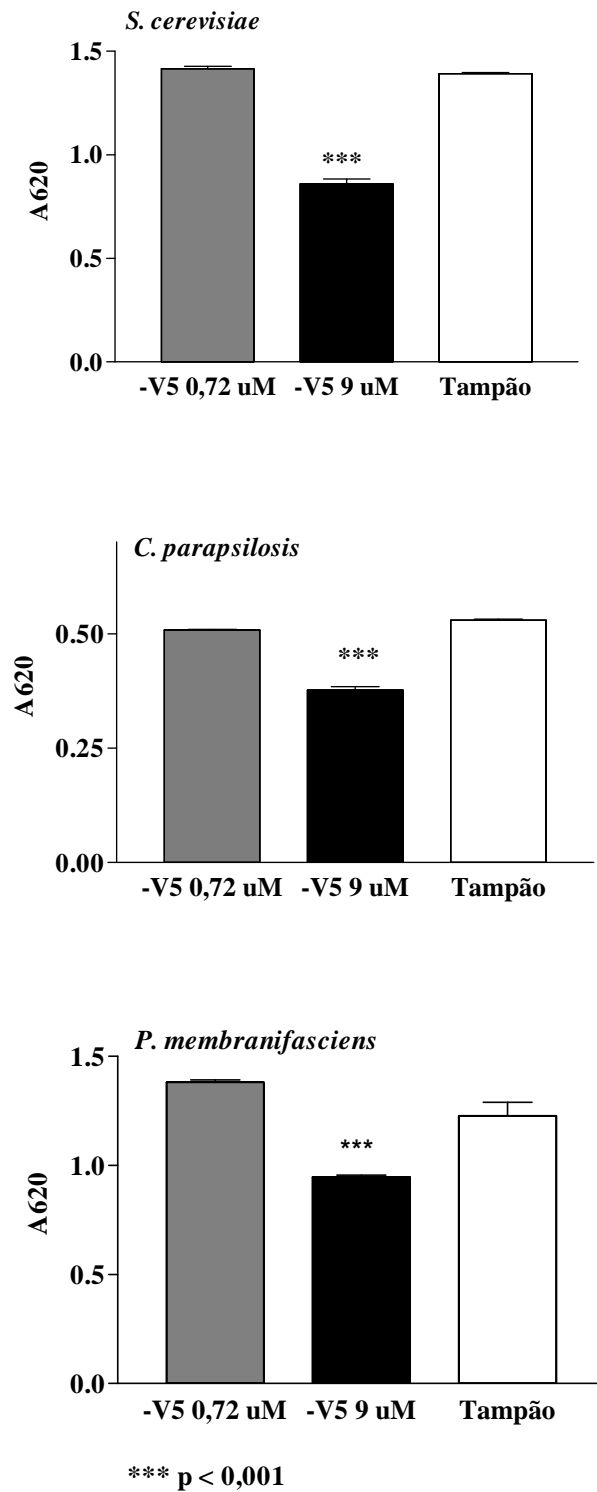


Figura 18. Crescimento de *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *P. membranifasciens* após 18 h de incubação com o peptídeo Jaburetox-V5 e/o tampão. A placa de 96 poços contendo o ensaio foi incubada a 28 °C e a absorbância em 620 nm lida em 18h. Cada valor corresponde a média dos valores das triplicatas.

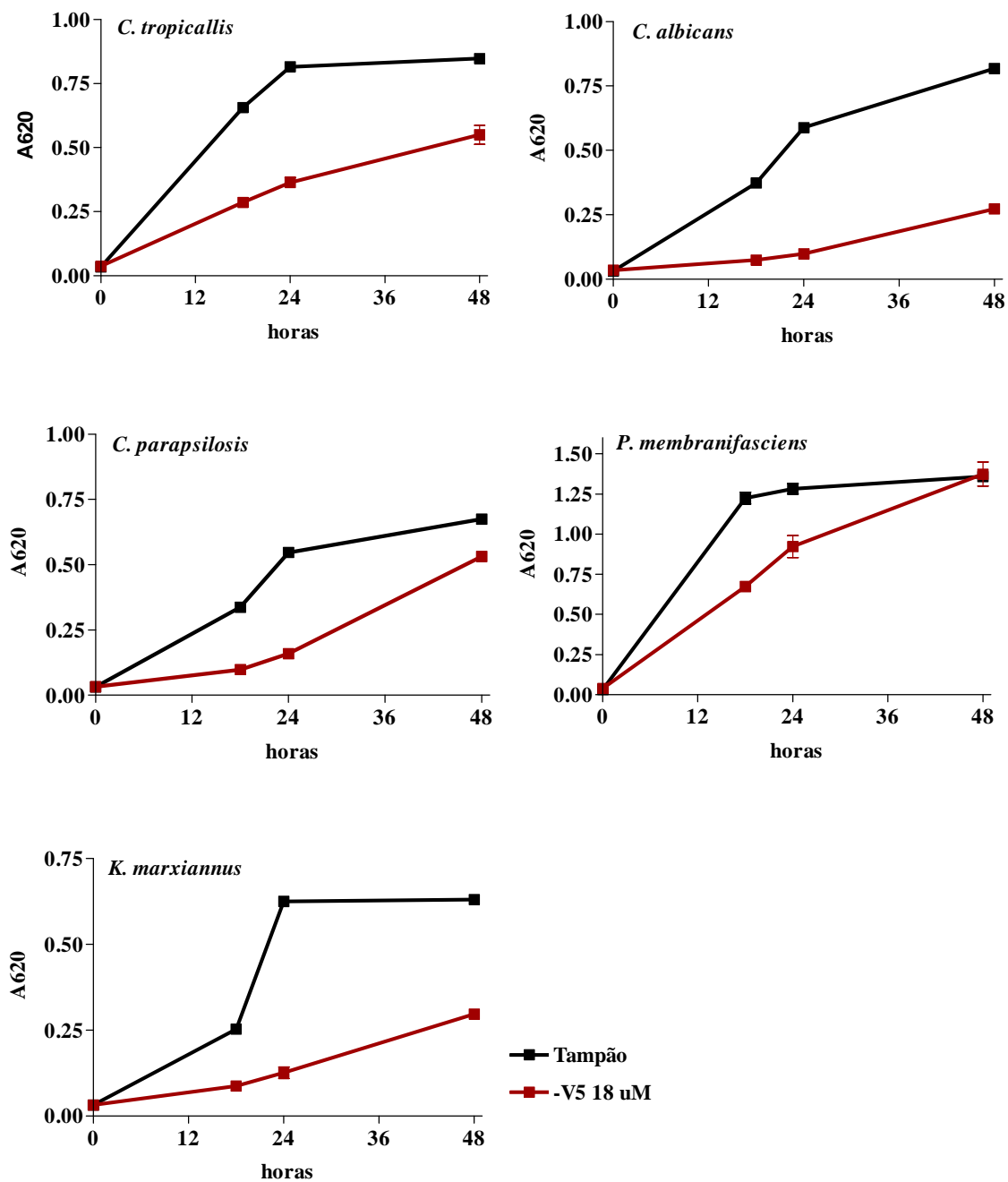


Figura 19. Curva de crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. membranifasciens* e *K. marxianus* na presença de Jaburetox-V5 (18 µM) ou tampão, a 28° C. O crescimento celular foi avaliado por absorbância em 620 nm, e acompanhado por 48 h. Cada ponto representa a média de pontos em triplicata.

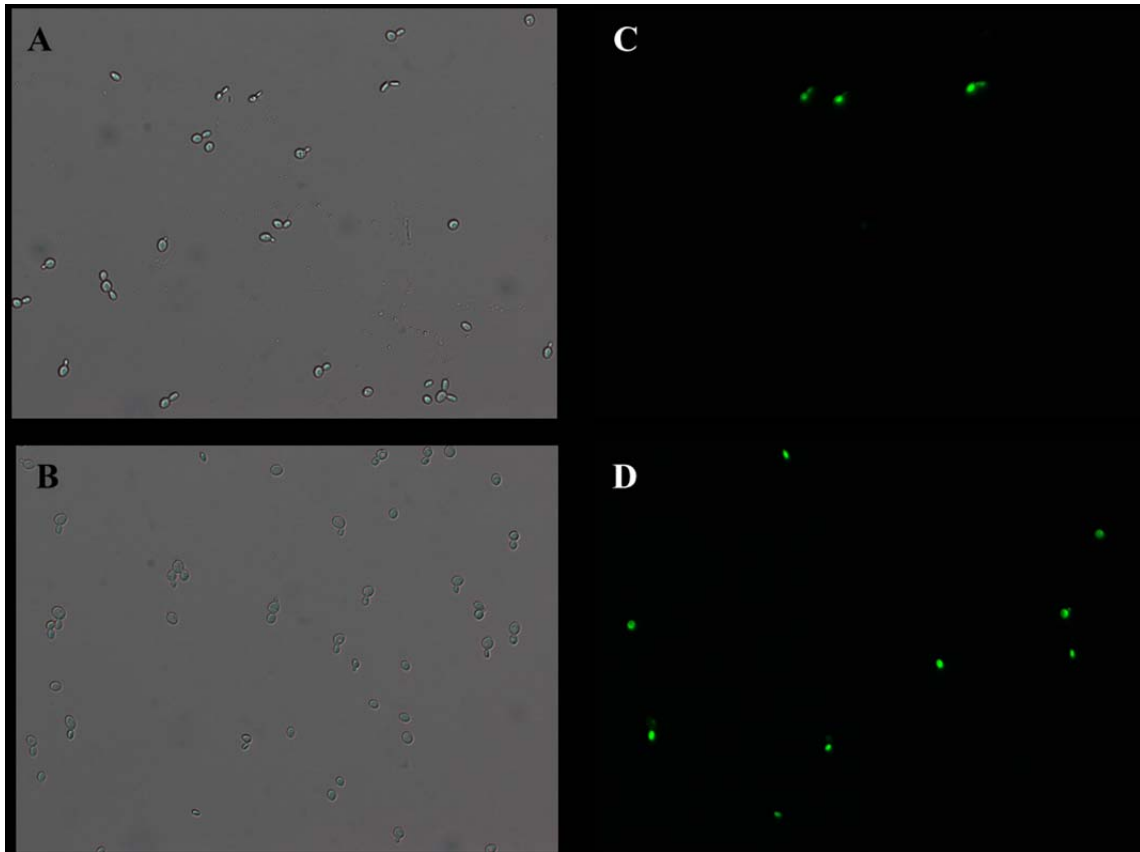


Figura 20. Ensaio de permeabilização da membrana de *S. cerevisiae* (A - E). As células foram tratadas com $0,72 \mu\text{M}$ de Jaburetox -V5 (B e D) por 24 h e incubadas com $0,2 \mu\text{M}$ de SYTOX *green* (C e D). A e C: controle. A, B: campo claro; C, D: fluorescência. Aumento. : Obj. 20x.



Figura 21. Alterações na morfologia celular: células de *C. tropicalis* foram crescidas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h na presença de $0,36 \mu\text{M}$ de Jaburetox. Aum.: Obj. 40x.

DISCUSSÃO FINAL

Os resultados dessa tese demonstraram efeitos tóxicos da JBU sobre diferentes espécies de leveduras, indicando que sua atividade antifúngica não afeta somente fungos filamentosos. Os efeitos fungitóxicos consistem de inibição da multiplicação, indução de alterações morfológicas com formação de pseudo-hifas, alterações do transporte de H⁺ e no metabolismo energético, permeabilização de membranas, podendo ocorrer morte celular. Não houve produção de espécies reativas de oxigênio associada ao efeito fungitóxico da JBU.

Becker-Ritt *et al.* (2007), descreveram que o efeito antifúngico das ureases independe do seu sítio catalítico, uma vez que ureases inativadas pelo inibidor covalente p-hidroxi-mercuribenzoato mantêm suas propriedades fungitóxicas. Nesse trabalho, observamos que a atividade ureolítica da JBU não é importante para o seu efeito fungitóxico sobre leveduras. Observamos, ainda, que hidrolisados de JBU com a enzima papaína retém atividade antifúngica associada a fragmentos com massa menor que 10 kDa, evidenciando mais uma vez, a independência desse efeito em relação à sua propriedade catalítica. Análises de similaridade indicam prováveis domínios antifúngicos na JBU. No entanto, sequências peptídicas correspondentes a essas regiões não foram encontradas entre os peptídeos identificados por sequenciamento *de novo* presentes no hidrolisado de JBU com papaína. Entre esses peptídeos, um apresentou sequência contendo o N-terminal do Jaburetox-V5. Em relação aos outros peptídeos encontrados, não foi possível avaliar, nessa tese, se estes são dotados de propriedades antifúngicas.

O peptídeo entomotóxico Jaburetox-V5 apresentou efeito fungitóxico sobre diferentes espécies de fungos filamentosos e leveduras. A atividade antifúngica do Jaburetox-V5 requer concentrações 2-3 vezes maiores do que observado para a holoproteína JBU, indicando a possibilidade de que outros domínios da proteína estejam envolvidos nessa atividade. O curso temporal semelhante e os mesmos efeitos antifúngicos sugerem mecanismos de ação semelhante para a holoproteína JBU e o peptídeo derivado Jaburetox-V5, provavelmente baseados na capacidade desses polipeptídeos de se inserirem em membranas, alterando a permeabilidade celular.

A descoberta de novos agentes antifúngicos se faz cada vez mais importante, devido ao crescente número de casos de micoses invasivas. A JBU, uma proteína com múltiplas funções, e peptídeos derivados dessa, podem representar uma nova alternativa para controle de fungos de importância clínica e fitopatogênicos, principalmente em se

considerando a potente atividade, na faixa de 10^{-6} a 10^{-7} M . Estudos adicionais sobre estrutura *versus* atividade aprofundando a identificação de domínios proteicos biologicamente ativos e a construção de recombinantes contendo esses domínios são etapas futuras para avaliar o real potencial fungicida/fungistático das ureases e peptídeos derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aerts, A. M.; François, I. E.; Meert, E. M.; Li, Q.-T.; Cammue, B. P. and Thevissen, K. (2007). The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** 13: 243–247.

Agizzio, A. P.; Da Cunha, M.; Carvalho, A. O.; Oliveira, M. A.; Ribeiro, S. F. F.; Gomes, V. M. (2006) The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. **Plant Sci.** 171:515-522.

Ajesh, K. & Sreejith, K. (2009). Peptide antibiotics: An alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. **Peptides.** 30: 999-1006.

Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Kurtenbach, E.; Almeida, F. C. L.; Valente, A. P. (2002) Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: Plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. **J. Mol. Biol.** 315: 749-757.

Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Zingali, R. B. and Kurtenbach, E. (2000). Characterization of Two Novel Defense Peptides from Pea (*Pisum sativum*) Seeds. **Arch. Biochem. Biophys.** 378: 278-86.

Alves, E. W.; Ferreira-DaSilva, A. T.; Ferreira-DaSilva, C. T.; Carlini, C. R. (1992) Effects of Canatoxin on the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum membranes. **Toxicon.** 30:1411-1418.

Anane, S.; Kallel, K.; Kaouech, E.; Belhaj, S.; Chaker, F. (2007). *Candida dubliniensis*: a novel emerging species. **Ann Biol Clin.** 65:13–9.

Anderson, J. B. (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: mechanism and pathogens fitness. **Nat. Rev. Microbiol.** 3:547-556.

Aquino, V. R.; Lunardi, L. W.; Goldani, L. Z.; Barth, A. L. (2005). Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidaemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, 9:411-418.

Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K. (2010) Crystal structure of the first plant urease from jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. **Journal of Molecular Biology**. 400:274-283.

Barja-Fidalgo, C.; Carlini, C. R.; Guimarães, J. A.; Cunha, F. Q.; Flores, C. A.; Ferreira, S. H. (1992) Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. **Inflammation** 16:1-12.

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

Barja-Fidalgo, T. C.; Guimarães, J. A.; Carlini, C. R. (1991b). Lipoygenase-Mediated Secretory Effect of Canatoxin, the Toxic Protein from *Canavalia Ensiformis* Seeds. **Toxicon** 29, 453-459,.

Barros, P. R.; Stassen, H.; Freitas, M. S.; Carlini, C. R.; Nascimento, M. C.; Follmer, C. (2009) Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. **Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics**, 1794(12):1848-54.

Basseti, M.; Righi, E.; Costa, A.; Fasce, R.; Molinari, M. P.; Rosso, R.; Pallavicini, F.B.; Viscoli, C. (2006). Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BCM Infectious Diseases**, 6: 21.

Becker-Ritt, A. B. & Carlini, C. R. (2012). Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. **Biopolymers: Peptide Science**.

Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H. S.; Mitidieri, S.; Feder, V.; Wassermann, G. E.; Santi, L.; Vainstein, M. H.; Oliveira, J. T. A.; Fiuza, L. M.; Pasquali, G.; Carlini, C. R. (2007). Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon** 50:971-983.

Bedini, A.; Venturelli, C.; Mussini, C.; Guaraldi, G.; Codeluppi, V.; Borghi, V.; Rumpianesi, F.; Barchiest, F.; Esposito, R. (2006). Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in a Italian tertiary-care hospital. **Clin. Infect. Dis.** 12: 75-80.

Benjamin C. F.; Carlini C. R.; Barja-Fidalgo C. (1992). Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. **Toxicon** 30, 879-885.

Berman, J. (2006) Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology.** 9:595-601.

Borman, A. M.; Petch, R.; Linton, C. J.; Palmer, M. D.; Bridge, P. D.; Johnson, E. M. (2008). *Candida nivariensis* an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. **J Clin Microbiol** 46:933–8.

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.

Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. A.; De Bolle, M. F. C.; Thevissen, K.; De Samblanx, G. W. & Osborn, R. W. (1997). Antimicrobial peptides from plants. **Cri. Rev. Plant Sci.** 16:297-323.

Cammue, B. P. A.; Thevissen, K.; Hendriks, M.; Eggermont, K.; Coderis, I. J.; Proost, P., Van Damme. J.; Osborn, R. W.; Guerbette, F.; Kader, J. C.; Broekaert, W. F. (1995) A potente antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. **Plant Physiol.** 109:445-455.

Cândido, E. S.; Pinto, M. F. S.; Pelegrini, P. B.; Lima, T. B.; Silva, O. N.; Pogue, R.; Grossi-de-Sá, M. F.; Franco, O. L. (2011) Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. **The FASEB Journal** 11:1-16

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

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

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

Carlini, C. R.; Ferreira-Dasilva, C. T.; Gombarovits, M. E. C. (2000) Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina: Processo de Produção. Patente de invenção: PI0003334-0, DEINPI/RS data: 06/06/2000

Carlini, C. R. and Polacco, J. C. (2008). Toxic properties of ureases. **Crop Science** 48, 1665-1672.

Carvalho, A. O. & Gomes, V. M. (2009). Plant defensins – Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides** 30:1007-20.

Carvalho, A. O. & Gomes, V. M. (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. **Peptides** 28:1144-1153.

Carter, E. L.; Flugga, N.; Boer, J. L.; Mulrooney, S. M.; Hausinger, R. P. (2009) Interplay of metal ions and urease. **Metallomics**. 1:207-221.

Casadevall, A. & Perfect, J. R. (1998). *Cryptococcus neoformans*. Library of Congress.

Chong, Z. Z.; Li, F.; Maiese, K. (2006) Attempted cell cycle induction in post-mitotic neurons occurs in early and late apoptotic programs through Rb, E2F1, and caspase 3. **Curr Neurovasc Res**. 3: 25-39.

Cortez, K. J.; Roilides, E.; Quiroz-Teles, F.; Meletiadiis, J.; Antachopoulos, C.; Knudsen, T.; Buchanan, W.; Milanovich, J.; Sutton, D. A.; Fothergill, A.; Rinaldi, M. G.; Shea, Y. R.; Zaoutis, T.; Kottlil, S.; Walsh, T. J. (2008). **Clin.Microbiol.Rev.**, 21: 157-197

Cowen, L. E. and Steinbach, W. J. (2008) Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukariot. Cell** 7:747-764.

Cunningham, E. B. (1999) An inositol phosphate-binding immunophilin, IPBP12. **Blood**. 94:2778-2789.

De Felice, F. G.; Velasco, P. T.; Lambert, M. P.; Viola, K.; Fernandez, S. J.; Ferreira, S. T.; Klein, W. L. (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. **J Biol Chem**. 282(15):11590-601.

De Lucca, A. J.; Cleveland, T. E.; Wedge, D.E. (2005). Plant-derived antifungal proteins and peptides. **Can. J. Microbiol**. 51:1001-1014.

De Lucca, A. J. & Walsh, T. J. (1999) Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 43: 1-11.

Defferrari, M. S.; Demartini, D. R.; Marcelino, T. B.; Pinto, P. M.; Carlini, C. R. (2011) Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 41:388-399.

Dixon, D.M. & Polak-Wyss, A. (1991). The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses** 34: 1–18.

Ellis, M. (2002). Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. **Mol Immunol** 38:947–57.

Fanos, V. & Cataldi, L. (2000) Amphotericin B-induced nephrotoxicity: a review. **J. Chemother.** 12:463-470.

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

Follmer, C. (2008). Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochem.** 69, 18-28.

Follmer, C.; Barcellos, G. B. S.; Zingali, R. B.; Machado, O. L. T.; Alves, E. W.; Barja-Fidalgo, C.; Guimarães, J. A.; Carlini, C. R. (2001). Canatoxin, a toxic protein of 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.; Real-Guerra, R.; Wassermann, G. E.; Olivera-Severo, D.; Carlini, C. R. (2004a). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. **Eur. J. Biochem.** 271:1357-1363.

Follmer, C.; Wassermann, G. E.; Carlini, C. R. (2004b). Separation of Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) Urease Isoforms by Immobilized Metal Affinity Chromatography and Characterization of Insecticidal Properties Unrelated to Ureolytic Activity. **Plant Sci.** 167, 241-246.

Games, P. D.; Santos, I. S.; Mello, E. O.; Diz, M. S. S.; Carvalho, A. O.; Souza-Filho, G. A.; Da Cunha, M.; Vasconcelos, I. M.; Ferreira, B. S.; Gomes, V. M. (2008) Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**. 29:2090-2100.

Garcia-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M. & Rodríguez-Palenzuela P. (1998). Plant defense peptides. **Biopolymers (Peptide Science)** 47:479-491.

Ghazaleh, F. A.; Francischetti, I. M.; Gombarovits, M. E.; 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.

Gomar, J.; Petit, M. C.; Sodano, P.; Sy, D.; Marion, D.; Kader, J. C.; Vovelle, F.; Ptak, M. (1996) Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. **Protein Sci.** 5:565-577.

Gomes, V. M.; Okorokov, L. A.; Rose, T. A.; Fernandes, K. V.S.; Xavier-Filho, J. (1998) Legume vicilins (7S storage globulins) inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by yeast cells. **Biochim Biophys Acta** 1379:207-216.

Gow, N. A. R.; Veerdonk, F. L.; Brown, A. J. P.; Netea, M. G. (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature** 10: 112-122.

Gruszecki, W. I.; Gagos, M.; Herec, M.; Kernen, P. (2003) Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 8:161-170

Guarro, J.; Kantarcioglu, A. S.; Horr , R.; Rodriguez-Tudela, J. L.; Cuenca-Estrella, M.; Berenguer, J.; de Hoog, S. (2006). **Med. Mycol.**,44: 295-327

Henikoff, S.; Henikoff, J.G. (1992). "Amino Acid Substitution Matrices from

Protein Blocks". **PNAS** 89 (22): 10915–10919.

Jabri, E.; Carr, M. B.; Hausinger, R. P.; Karplus, P. A. (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science**. 268:998-1004.

Kader, J. C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 627-654

Kawase, T.; Yokokawa, S.; Saito, A.; Fujii, T.; Nicaidou, N.; Miyaschta, K.; Watanabe, T. (2006) Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). **Biosci Biotechnol Biochem** 70:988-998

Kirpatrick, C. H. (1994) Chronic mucocutaneous candidiasis. **J. Am. Acad. Dermat.** 31:s14-s17.

Kontoyannis, D. P. & Lewis, R. E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet** 359:1135-1144.

Koo, J. C.; Lee, S. Y.; Chun, H. J.; Cheong, Y. H.; Choi, J. S.; Kawabata, S.; Miyagi, M.; Tsunasawa, S.; Ha, K. S.; Bae, D. W.; Han, C. D.; Lee, B. L.; Cho, M. J. (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. **Biochim Biophys Acta** 1382:80-90.

Krajewska B (2009) Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **J. Mol. Catal. B-Enz.** 59: 9-21

Kristensen, B. K.; Block, H.; Rasmussen, S. K.(1999) Barley coleoptile peroxidases. Purification molecular cloning and induction by pathogens. **Plant Physiol.** 120:501-512.

Lagrimini, L. M. (1991) Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. **Plant Physiol** 96:577-583.

Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.;

Gibson, T. J. and Higgins D. G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics** 23(21): 2947-2948.

Ligabue-Braun, R. (2010) Comportamento conformacional da urease de *Canavalia ensiformis*. Dissertação de Mestrado. PPGBCM – UFRGS.

Lin, K. F.; Liu, Y. N.; Hsu, S. T.; Samuel, D.; Cheng, C. S.; Bonvin, A. M.; Lyu, P. C. (2005). Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. **Biochemistry**. 44:5703-5712.

Lin, S. H. & Maiese, K. (2001) The metabotropic glutamate receptor system protects against ischemic free radical programmed cell death in rat brain endothelial cells. **J Cereb Blood Flow Metab.** ;21:262–275.

Lorito, M.; Sheridan, L. W.; Fernandez, I. G.; Colucci, G.; Harman, G. E.; Pintor-Toro, J. A.; Filippone, E.; Muccifora, S.; Lawrence, C. B.; Zoina, A.; Tuzun, S.; Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proc. Natl Acad. Sci USA**, 95:7860-7865

Lobo, D. S.; Pereira, I. B.; Fragel-Madeira, L.; Medeiros, L. N.; Cabral, L. M.; Faria, J.; Bellio, M.; Campos, R. C.; Linden, R.; Kurtenbach, E. (2007). Antifungal *Pisum sativum* Defensin 1 Interacts with *Neurospora crassa* Cyclin F Related to the Cell Cycle. **Biochemistry** 46: 987-996.

Lupetti, A.; Danesi, M.; Campa, M.; Del Tacca, M.; Kelly, S. (2002) Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol. Med.** 8:76-81.

Mansfield, B. E.; Oltean, H. N.; Oliver, B. G.; Hoot, S. J.; Leyde, S. E.; Hedstrom, L.; White, T. (2010) Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. **PLoS Pathog.** 6(9): e1001126.

Marivet, J.; Margis-Pinheiro, M.; Frendo, P.; Burkard, G. (1994) Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. **Plant Mol Biol.** 26:1181-1189.

Mello, E. O.; Ribeiro, S. F. F.; Carvalho, A. O.; Santos, I. S.; Da Cunha, M.; Santa-Catarina, C.; Gomes, V. M. (2011) Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Curr Microbiol.** 62:1209-1217.

Menegassi, A.; Wassermann, G. E.; Olivera-Severo, D.; Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H. S.; Feder, V.; Carlini, C. R. (2008). Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physico-chemical characterization and antifungal properties of the protein. **J. Agric. Food Chem.** 56:4399-4405.

Meyer-Bothling, L. E.; Polacco, J. C. (1987). Mutational analysis of the embryo-specific urease locus of soybean. **Molecular and General Genetics** 209:439-444.

Micheletto, Y. S. (2010) Estudo físico-químico da interação da urease de jack bean com lipossomas miméticos de plaquetas humanas. Dissertação (PPGQ/UFRGS) - Instituto de Química.

Millard, P. J.; Roth, B. L.; Thi, H. P.; Yue, S. T.; Haugland, R. P. (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. **Appl. Environ. Microbio.** 63(7):2897

Mobley, H. L., Island, M. D., Hausinger, R. P., (1995). Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol. Rev.** 59, 451-480.

Moro, F. C. (2010) Estudo do efeito de variáveis físico-químicas no comportamento do peptídeo recombinante Jaburetox, derivado da urease de *Canavalia ensiformis*. Dissertação (Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Moro, F. C.; Micheletto, Y. M. S; Carlini, C. R.; Silveira, N. P. (2012) Behavior of the entomotoxic peptide Jaburetox-2Ec in solution and its interaction with human platelet-like liposomes. **BBA.** Aceito com modificações.

Mulinari, F.; Becker-Ritt, A.B.; Demartini, D.R.; Ligabue-Braun, R.; Stanisçuaski, F.; Verli, H.; Frago, R.R.; Shoroeder, E.K.; Carlini, C.R.; Grossi-de-Sá, M.F. (2011) Characterization of JBURE-IIb Isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC Urease. **Biochim Biophys Acta (BBA) – Proteins and Proteomics** 1814:1758-1768.

Mulinari, F.; Freitas-Silva, M. A.; Grossi-De-Sá, M.F.; Moraes, M. G.; Kurtenbach, E.; Carlini, C. R. (2004). Toxina Praguicida, Construção Gênica e Método de Controle de Pragas. Patente: depósito em 08/04/2004, no INPI-RS, como Privilégio de Inovação n.PI0403435-0A.

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

Ng T. B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides** 25 :1215-1222.

Nielsen, K. K.; Nielsen, J. E.; Madrid, S. M.; Mikkelsen, J. D. (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. **Plant Physiol** 13:83-91.

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

Olivera-Severo, D.; Wassermann, G. E.; Carlini, C. R. (2006). *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. **Arch. Biochem. Biophys.** 452:149-155.

Ostrosky-Zeichner, L.; Casadevall, J. N.; Galgiani, F. C.; Rex, J. H. (2010) An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nat. Ver. Drug Discov.** 9:719-727.

Pasarell, L.; Mc Ginnis, M. R.; Standard, P. G. (1990). Differentiation of medically important isolates of *Bipolaris* and *Exserohilum* with exoantigens. **J Clin Microbiol** 28: 1655-7.

Pasqualotto, A. C. & Denning, D.W. (2008). New and emerging treatments for fungal infections. **J Antimicrob Chemother** 61:Suppl 1: i19-30.

Passos, X. S.; Costa, C. R.; Araújo, C. R.; Nascimento, E. S.; Souza, L. K. H.; Fernandes, O. F. L.; Sales, W. S.; Silva, M. R. R. (2007). Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Myopathologia**, 163:145-151.

Pelegri, P. B.; Franco, O. L. (2005) Plant gamma-thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **Int J Biochem Cell Biol.** 37:2239-53.

Penninckx, I. A. M. A.; Eggermont, K.; Terras, F. R. G.; Thomma, B. P. H. J.; DeSamblanx, G. W.; Buchala, A.; Mettraux, J. P.; Manners, J. M.; Broekaert, W. F. (1996). Pathogen induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. **Plant Cell** 8:2309-2323.

Periroth, J.; Choi, B. e Spellberg, B. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med. Mycol.** 45:321-346.

Perri, F.; Della Penna, S.; Rufini, F.; Patamia, M.; Bonito, M.; Angiolella, L.; Vitali, A. (2009). Antifungal-protein production in maize (*Zea mays*) suspension cultures. **Biotech. Appl.Biochem.** 52: 273-281

Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** Oct;25(13):1605-12.

Pfaller, M. A. & Diekema, K. J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: A persistente public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.** 20:133-163.

Piovesan, A. R. (2009). Urease de *Canavalia ensiformis*: processamento diferencial por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus* e formação de canal *in vitro*. Dissertação (Biologia Celular e Molecular), Univ. Fed. Rio Grande do Sul.

Piovesan, A. R.; Stanisçuaski, F.; Marco-Salvadori, J.; Real-Guerra, R.; Defferrari, M. S.; 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. Mol. Biol.** 38:1023-1032.

Pires-Alves, M.; Grossi-De-Sá, M.F.; Barcellos, G. B. S.; Carlini, C. R.; Moraes, M. G. (2003). Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant Cell Physiol.** 44, 139-145.

Pliyev, B. K. and Gurvits, B. Y. (1999) Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases: structure and function. **Biochemistry (Mosc)** 64:738-751.

Polacco, J. C.; Holland, M.A. (1993). Roles of urease in plant cells. **International Review of Cytology** 145:65-103.

Polacco, J. C.; Judd, A.K.; Dybing, J.K.; Cianzio, S.R. (1989) A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots. **Molecular General Genetics.** 217:257-262.

Prado, M.; Da Silva, M. B.; Laurenti, R.; Travassos, L. R.; Taborda, C. P. (2009). Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 104: 513-21.

Punja, Z. K. (2001). Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects. **Can. J. Plant Pathol.** 23:216-235

Real-Guerra, R.; Stanisçuaski, F.; Zambelli, B.; Musiani, F.; Ciurli, S.; Carlini, C.R. (2012) Biochemical and Structural Studies on Native and Recombinant *Glycine*

max UreG: A Detailed Characterization of a Plant Urease Accessory Protein. **Plant Molecular Biology**. 78:461-475.

Reedy, J. L. & Heitman, J. (2007) Evolution of MAT in the *Candida* species complex: sex, ploidy, and complete sexual cycles in *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, and *C. krusei*. **Sex in fungi**, ed Heitman J (Am Soc Microbiol, Washington), pp 235-245.

Regente, M. C.; Giudici, A. M.; Villalaín, J.; de la Canal, L. (2005) The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. **Lett Appl Microbiol**. 40:193-189.

Ribeiro, S. F. F.; Carvalho, A. O.; Da-Cunha, M.; Rodrigues, R; Cruz, L. P.; Melo, V. M. M.; Vasconcelos, I. M.; Melo, E. J. T.; Gomes, V. M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**. 50:600-611.

Ribeiro, S. F. F.; Taveira, G. B.; Carvalho, A. O.; Dias, G. B.; Cunha, M.; Santacatarina, C.; Rodrigues, R.; Gomes, V. M. (2012) Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. **Protein J**. 31:59-67.

Rinaldi, M. G.; Phillips, P.; Schwartz, J. G.; Win, R. E.; Holt, G. R.; Shagets, F. W.; Elrod, J.; Nishioka, G.; Aufdemorte, T. B. (1987). Human *Curvularia* infections. Report of five cases and review of the literature. **Diagn Microbiol Infect Dis** 6: 27–39.

Rodrigues, A. M. S.; Theodoro, P. N. E. T.; Eparvier, V.; Basset, C.; Silva, M. R. R.; Beauchene, J.; Espíndola, L. S.; Stien, D. (2010) Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. **J. Nat. Prod.**, 73: 1706 -1707.

Romani, L.; Bistoni, F.; Puccetti, P. (2003) Adaptation of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. **Curr. Opin. Microbiol**. 6:338-343.

Schägger, H. & Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.** 166:368-379.

Selitrennikoff, C. P (2001) Antifungal proteins. **Appl. Environ. Microbiol.** 67:2883-2894.

Sendid, B.; Cotteau, A.; Fraçois, N.; Haveloose, A.; Standaert, A.; Camus, D.; Poulain, D. (2006) Candidaemia and antifungal therapy in a French University hospital: rough trends over a decade and possible links. **BCM Infect Dis**, 6: 80.

Shapiro, R. S.; Robbins, N.; Cowen, L. (2011) Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 75(2):213:267.

Silverstein, A. M.; Galigniana, M. D.; Kanelakis, K. C.; Radanyi, C.; Renoir, J. M.; Pratt, W. B. (1999) Different regions of the immunophilin FKBP52 determine its association with the glucocorticoid receptor, hsp90, and cytoplasmic dynein. **J. Biol. Chem.** 274:36980-36986.

Sirko, A., Brodzik, R., (2000). Plant ureases: Roles and regulation. **Acta Biochim Pol** 47, 1189-1195.

Stanisçuaski, F. and Carlini, C. R. (2012). Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. **Toxins** 4, 55-67.

Stanisçuaski, F.; Ferreira-Dasilva, C. T.; Mulinari, F.; Pires-Alves, M.; 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.; Orchard, I. (2009). In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec in *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **J. Insect Physiol.** 55:255-263

Stevens, D. A.; Calderon, L.; Martinez, M.; Clemons, K. V.; Wilson, S. J.; Selitrennikoff, C. P. (2002) Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida vaginitis* model. **J. Antimicrob. Ther.** 50:361-364.

Sumner, J. B. (1926) The isolation and crystallization of the enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry.** 69:435-441.

Tavares, P. M.; Thevissen, K.; Cammue, B. P.; François, I. E.; Barreto-Bergter, E.; Taborda, C. P.; Marques, A. F.; Rodrigues, M. L. and Nimrichter, L. (2008). In vitro activity of the antifungal plant defensin RsAFP2 against *Candida* isolates and its in vivo efficacy in prophylactic murine models of candidiasis. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52:4522–4525.

Thevissen, K.; Cammue, B. P.; Lemaire, K.; Winderickx, J.; Dickson, R. C.; Lester, R. L.; Ferket, K. K.; Van Even, F.; Parret, A. H.; Broekaert, W. F. (2000) A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 97:9531-9536.

Thevissen, K.; Ghazi, A.; De Samblanx, G. W.; Brownlee, C.; Osborn, R. W.; Broekaert, W. F. (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. **J. Biol Chem.** 271:15018-15025.

Thevissen, K.; Warnecke, D. C.; Francois, I. E.; Leipelt, M.; Heinz, E.; Ott, C.; Zahringer, U.; Thomma, B. P.; Ferket, K. K.; Cammue, B. P. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. **J. Biol. Chem.** 279: 3900-3905.

Thomma, B. P. H. J.; Cammue, B. P. A.; Thevissen, K. (2002). Plant defensins. **Planta** 216:193-202.

Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y.; Collinge, D. B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. **Plant J** 11:1187-1194.

Tortorano, A. M.; Kibbler, C. C.; Peman, J.; Bernhardt, H.; Klingspor, L.; Grillot, R. (2006) Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **Int. J. Antimicrobial Agents**, 27:359-366.

Van Parijs, J.; Broekaert, W. F.; Goldstein, I. J.; Peumans, W. J. (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta** 183:258-264.

Vitali, A.; Pacini, L.; Bordi, E.; De Mori, P.; Pucillo, L.; Maras, B.; Botta, B.; Brancaccio, A.; Giardina, B. (2006). Purification and characterization of an antifungal thaumatin-like protein from *Cassia didymobotrya* cell culture. **Plant Physiol. Biochem.** 44:604-610.

Warnock, D. W. (2007) Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Jap. J. Med. Mycol**, 48:1-12.

Wassermann, G. E.; Olivera-Severo, D.; Uberti, A. F.; Carlini, C. R. (2010). *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. **J. Cell. Mol. Med.** 14:2025-2034.

Weerden, N. L. V.; Hancock, R. E. W.; Anderson, M. A. (2010) Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. **The Journal of Biological Chemistry**, 285:37513-37520.

White, S. J.; Marr, K. A.; Bowden, R. A. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** 11:382-402.

Wiebke-Strohm, B.; Pasquali, G.; Margis-Pinheiro, M.; Bencke, M.; Bucker-Neto, L.; Becker-Ritt, A. B.; Martinelli, A. H. S.; Rechenmacher, C.; Polacco, J.; Stolf, R.; Marcelino, F. C.; Abdelnoor, R.V.; Homrich, M. S.; Del Ponte, E. M.; Carlini, C. E.; De Carvalho, M. C. C. G.; Bodanese-Zanettini, M. H. (2012) Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. **Plan. Mol. Biol.** 79:75-87.

Wingard, J. R. (1995) Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clin Infect Dis.** 20:115–25

Wong, J. H.; Ng, T. B.; Cheung, R. C. F.; Ye, X. J.; Wang, H. X.; Lam, S. K.; Lin, P.; Chan, Y. S.; Fang, E. F.; Ngai, P. H. K.; Xia, L. X.; Ye, X. Y.; Jiang, Y.; Liu, F. (2010) Protein with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 87:1221-1235.

Ye, X. Y. & Ng, T. B. (2001) Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursors exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. **Biochem Biophys Res Commun.** 285:424-429.

Ye, X. Y.; Wang, H. X.; Ng, T. B. (2000). Sativin, a novel antifungal miraculin-like protein isolated from the legumes of the sugar snap *Pisum sativum var. macrocarpon*. **Lifes Sci.** 67:775-781.

Ye, X. Y.; Wang, H. X.; Ng, T. B. (1999) First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. **Biochem Biophys Res Commun.** 263:130-134.

Zaas, A. K. (2008). Echinocandins: a wealth of choice—how clinically different are they? **Curr Opin Infect Dis** 21:426–32.

Zhang, Y. Q.; Gamarra, S.; Garcia-Effron, G.; Park, S.; Perlin, D. S.; Rao, R. (2010) Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. **PLoS Pathog.** 6:e1000939

Anexo I
Curriculum vitae

Melissa Postal

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Melissa Postal
Nome em citações Postal, M.
Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociência, Departamento de Biofísica, Avenida Bento Gonçalves, 9500 Agronomia – Porto Alegre 91501-970, RS – Brasil
Telefone: 51 3308-7606
www.ufrgs.br/laprotox
Endereço eletrônico lisapostal@cbiot.ufrgs.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008** Doutorado em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
“Atividade antifúngica da urease de *Canavalia ensiformis* e peptídeo derivado.”
Orientador: Célia Regina Ribeiro Carlini
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
- 2005 - 2008** Mestrado em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
“Anticorpos Monoclonais Contra as Diferentes Isoformas de Urease de *Canavalia ensiformis*: Imunolocalização de Tecidos Alvos da Toxina em Insetos Suscetíveis”
Orientador: Célia R. R. Carlini
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2000 - 2004** Graduação em Biologia, Licenciatura
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
“Identificação de tecidos alvos do efeito inseticida de ureases no percevejo *Dysdercus peruvianus*”
Orientador: Célia R. Carlini
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
-

Formação complementar

2006 - 2006 Curso de curta duração em Produção e Purificação de MABs.
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Settembrini, B. P., de Pasquale, D., Postal, M., Pinto, P. M., Carlini, C. R., Villar, M. J. Distribution and characterization of Corazonin in the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). *Peptides* (New York, N.Y. 1980). , p.1 - 8, 2010.
2. Mulinari, F, Stanicuaski, F., Bertholdo-Vargas L.R., Postal, M., Oliveira-Neto, O.B., Rigden, D.J., Grossi-de-Sá, M.F., Carlini, C. R. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* (New York). , 2042 -2050, 2007.

Capítulos de livros publicados

1. Veitheimer-Mendes, I. L., Postal, M.
Os Moluscos In: Análise ambiental da bacia hidrográfica do Arroio Itapuã: Caderno para Educação Ambiental.1 ed. Porto Alegre : Gráfica da UFRGS, 2002, v.1, p. 1-104.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Muller, D., Postal, M., Lopes, F, Carlini, C. R.
Mecanismo de ação fungitóxica da urease de *Canavalia ensiformis* e identificação das regiões da proteína responsáveis por essa atividade. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia – CBM 2011, 2011, Foz do Iguaçu, Brasil.
2. Silva, L. N., Postal, M., Demartini, D. R., Carlini, C. R.
Characterization and purification of acidic endopeptidases during seed growth in *Canavalia ensiformis*. In: XXXIX Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2010, Foz do Iguaçu, Brazil.
3. Postal, M., Silva, L. N., Demartini, D. R., Carlini, C. R.
Endopeptidases acídicas presente em sementes de *Canavalia ensiformis* ao longo da germinação. In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia, 2009, Porto Alegre.
4. Silva, L. N., Postal, M., Demartini, D. R., Carlini, C. R.
Purificação de proteases acídicas de sementes de *Canavalia ensiformis*. In: XI Reunião

Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

5. Silva, L. N., Postal, M., Demartini, D. R., Carlini, C. R.
Purificação e caracterização de endopeptidases ácidas de sementes *Canavalia ensiformis*. In: XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

6. Setembrini, B., Nowicki S, Nuñez L., Stanicuaski, F., Postal, M., Carlini, C. R.
Ureasas vegetales y péptidos asociados. Efectos biológicos. In: XII Simposio Internacional sobre Control epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por vectores., 2009, Buenos Aires.

7. Postal, M., Demartini, D. R., Carlini, C. R.
Endopeptidase ácida sensível à tirostatina presente em sementes de *Canavalia ensiformis*. In: Reunião Anual do PPGBCM, 2008, Porto Alegre.

8. Postal, M., Stanicuaski, F., Setembrini, B., Kreutz, F., Carlini, C. R.
Produção de anticorpos monoclonais contra as diferentes isoformas de ureases de *Canavalia ensiformis* e Imunolocalização de tecidos alvos da toxina em insetos suscetíveis In: VIII Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2006, Porto Alegre.

9. Postal, M., Carlini, C. R.
Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra as diferentes isoformas de urease de *Canavalia ensiformis*. In: VII reunião anual do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do centro de biotecnologia da UFRGS, 2005, porto alegre.

10. Stanicuaski, F., Postal, M., Carlini, C. R.
Proteolysis of Canatoxin: Characterization of *Callosobruchus maculatus* Digestive Enzymes Involved in the Process. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Aguas de Lindóia.

11. Postal, M., Stanicuaski, F., Blochtein, B., Carlini, C. R.
Identificação de tecidos alvos de ureases no percevejo *Dysdercus peruvianus*. In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

12. Stanicuaski, F., Postal, M., Salvadori, J., Carlini, C. R.
Isolamento e Caracterização das Enzimas Digestivas de *C. maculatus* Responsáveis pelo Processamento da CNTX. In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado.

13. Postal, M., Stanicuaski, F., Carlini, C. R., Blochtein, B.
Histological Analyses of Canatoxin Effects on the Digestive Tract of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pirrhocoridae) Nymphs. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu.

14. Stanicuaski, F., Postal, M., Ferreira-da-Silva, C, Carlini, C. R.
Insecticidal Effect of Canatoxin in *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) dependent on the life cycle stage. Partial Characterization of Digestive Enzymes of nymphs and adults. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Biologia molecular - SBBq, 2003, Caxambu.
15. Stanicuaski, F., Postal, M., Salvadori, J., Carlini, C. R.
Isolamento e caracterização das enzimas digestivas de insetos envolvidas pelo processamento da CNTX. In: V Reunião anual do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do centro de biotecnologia da UFRGS, 2003, Porto Alegre.
16. Postal, M., Stanicuaski, F., Carlini, C. R., Blochtein, B.
Microanatomia do trato digestivo de formas jovens de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pyrrhocoridae) In: V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2003, Porto Alegre.
17. Stanicuaski, F., Postal, M., Ferreira-da-Silva, C, Carlini, C. R.
Efeito inseticida da canatoxina em diferentes estágios de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). Caracterização das enzimas envolvidas In: XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre.
18. Postal, M., Stanicuaski, F., Ferreira-da-Silva, C, Carlini, C. R., Blochtein, B.
Microanatomia do trato digestivo de formas jovens de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera; Pyrrhocoridae). In: XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre.
19. Mendes, I. L. V., Postal, M.
Análise ambiental da bacia hidrográfica do arroio Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul: Moluscos. In: XXIV Congresso Brasileiro de Zoologia, 2002, Itajaí.

Anexo II

Artigo publicado durante o doutorado.



Distribution and characterization of Corazonin in the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera)

Beatriz P. Settembrini^{a,b,*}, Daniela de Pasquale^b, Melissa Postal^c, Paulo M. Pinto^d,
Célia R. Carlini^{c,e}, Marcelo J. Villar^a

^a Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Presidente Perón 1500, B1629AHJ, Pilar, Provincia de Buenos Aires, Argentina

^b Museo Argentino de Ciencias Naturales, Avenida Ángel Gallardo 470, C1405DJR, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

^c Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

^e Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43.422, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2010

Received in revised form 15 October 2010

Accepted 18 October 2010

Available online 26 October 2010

Keywords:

Corazonin

Insect central nervous system

Chagasi disease

Mass spectrometry

Immunohistochemistry

ABSTRACT

The distribution of corazonin in the central nervous system of the heteropteran insect *Triatoma infestans* was studied by immunohistochemistry. The presence of corazonin isoforms was investigated using MALDI-TOF mass spectrometry in samples containing the brain, the subesophageal ganglion, the corpora cardiaca–corpus allatum complex and the anterior part of the aorta. Several groups of immunopositive perikarya were detected in the brain, the subesophageal ganglion and the thoracic ganglia. Regarding the brain, three clusters were observed in the protocerebrum. One of these clusters was formed by somata located near the entrance of the ocellar nerves whose fibers supplied the aorta and the corpora cardiaca. The remaining groups of the protocerebrum were located in the lateral soma cortex and at the boundary of the protocerebrum with the optic lobe. The optic lobe housed immunoreactive somata in the medial soma layer of the lobula and at the level of the first optic chiasma. The neuropils of the deutocerebrum and the tritocerebrum were immunostained, but no immunoreactive perikarya were detected. In the subesophageal ganglion, immunostained somata were found in the soma layers of the mandibular and labial neuromeres, whereas in the mesothoracic ganglionic mass, they were observed in the mesothoracic, metathoracic and abdominal neuromeres. Immunostained neurites were also found in the esophageal wall. The distribution pattern of corazonin like immunoreactivity in the central nervous system of this species suggests that corazonin may act as a neurohormone. Mass spectrometric analysis revealed that [Arg⁷]-corazonin was the only isoform of the neuropeptide present in *T. infestans* tissue samples.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas' disease is endemic in Latin America. The prevalence of the infection caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* is 16–18 million cases, and the World Health Organization [45] estimated that 120 million people are at risk of developing this disease. *Triatoma infestans*, a blood feeding heteropteran, is the main vector of Chagas' disease in Argentina and neighboring countries. Despite the epidemiological importance of this species, knowledge on the structure and function of its nervous system is still limited. Morphological studies on the central nervous system (CNS, [1,12,13])

were followed by descriptions of the distribution of a number of neuropeptides and neurotransmitters [26–30]. Strategies aimed at combatting this vector insect are challenged by the appearance of resistance to current chemical agents in certain populations [19,38]. Knowledge on the presence of neuropeptides and their receptors may contribute to the design of new drugs to control this disease-vector insect and related species, which cause infections to humans and cattle.

Neuropeptide corazonin (CRZ, [pGlu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Ser-Arg-Gly-Trp-Thr-Asn-amide]) was first isolated from the corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana* [39]. Corazonin production has been localized in lateral brain neurosecretory cells, which project to the corpora cardiaca–corpora allata complex, and in ventral nerve cord neurons [24,43]. Six CRZ isoforms are known to occur in insect species from different orders [2,22]. The [Arg⁷]-CRZ isoform has been isolated from the cockroaches *P. americana* and *Nauphoeta cinerea*, the sphinx moth *Manduca sexta*, the silkworm *Bombyx mori* and the cricket *Gryllus bimaculatus*.

* Corresponding author at: Museo Argentino de Ciencias Naturales, Avenida Ángel Gallardo 470, C1405DJR, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Tel.: +54 114 982 8370x166; fax: +54 114 982 5243 4494.

E-mail addresses: settembrini@macn.gov.ar, bsettembri@cas.austral.edu.ar (B.P. Settembrini).

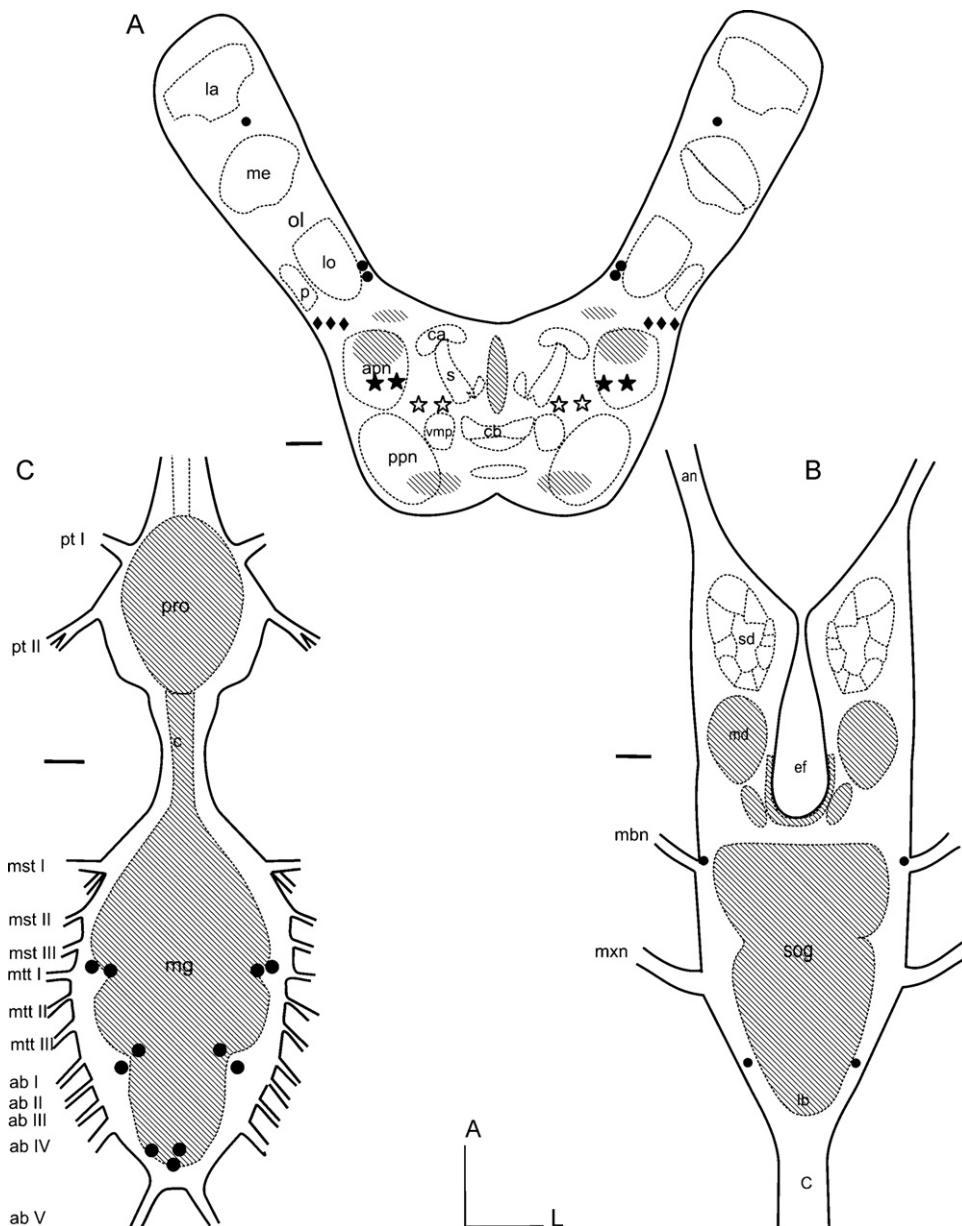


Fig. 1. Schematic drawings of dorsal views of *Triatoma infestans* protocerebrum with optic lobes (A), deutocerebrum (upper part of B), subesophageal ganglion (lower part of B) and thoracic ganglia (C) showing CLI. In A, immunoreactive somata of the A1, A2 and A3 groups are marked by ☆, ★, ◆ respectively. Circles represent immunoreactive somata other than those of the A1–A3 clusters; shadowings in neuropils indicate the location of immunolabeled processes. **Abbreviations:** ab I–V (abdominal nerves I–V), an (antennal nerve), apn (anterolateral protocerebral neuropil), ca (calyx of mushroom body), c (connectives), cb (central body), ef (esophageal foramen), la (lamina ganglionaris), lb (labial neuromere), lo (lobula complex), md (mechanosensory and motor deutocerebrum), mdn–mxn (mandibular, maxillary nerves), me (medulla), mst I–III (mesothoracic nerves I–III), msta I–III (metathoracic nerves I–III), ol (optic lobe), p (lobula plate), ppn (posterolateral protocerebral neuropil), pro (prothoracic ganglion), mg (mesothoracic ganglionic mass), pt I–II (prothoracic nerves I–II), sd (sensory deutocerebral glomeruli), sog (subesophageal ganglion), s (stalk), vmp (lateromedial protocerebral neuropil). Anterior (A), lateral (L). Bars: 100 μ m.

latus [11,39,40]. Moreover, in the fruitfly *Drosophila melanogaster* and in the waxmoth *Galleria mellonella* [Arg⁷]-CRZ pre-prohormone has been cloned [8,41]. The widespread distribution of this isoform in insects, suggested that it appeared early during the evolution of insects [22].

[His⁷]-CRZ has been found in the corpora cardiaca of the locusts *Schistocerca americana* [39], *S. gregaria* and *Locusta migratoria* [37] as well as in the retrocerebral complex of the stick insect *Carausius morosus* [22]. It was also found that in *Apis mellifera* [His⁷]-CRZ, the glutamine⁴ residue was substituted by a threonine, a fact which suggested the possible existence of further variations in the sequence of this neuropeptide [44]. Indeed, other sequence modifications of CRZ were recently reported in species of the insect orders Diptera, Hymenoptera and Mantophasmatodea [22].

Physiological experiments have shown different roles for CRZ. In *P. americana*, application of the neuropeptide increased the heart beat rate [20,32,39] and elicited the contractions of the hyperneural muscle and the antennal heart [20]. It was also found that in locusts, CRZ produced changes in body coloration [35,37]. Other functions ascribed to CRZ were the reduction of the rate of silk spinning in the larval–pupal transition of *B. mori* [36] and the induction of the release of pre-ecdysis triggering hormones in *M. sexta* [14]. From the available experimental data, it appears that no common function may be attributed to CRZ [2,42].

In this context, studies on the distribution of CRZ in insect species with different behaviors become relevant. In view of the fact that the presence of CRZ is unknown in *T. infestans*, as well as in other hematophagous insect vectors, we investi-

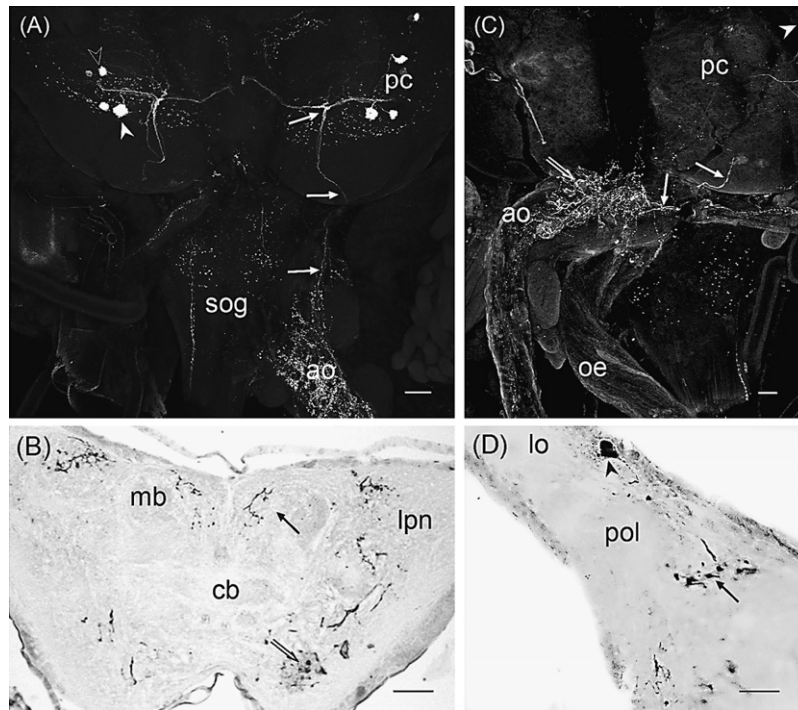


Fig. 2. Confocal immunofluorescence (A and C) and bright field micrographs showing CLI in the protocerebrum (b) and optic lobe (d). (A) Immunoreactive perikarya (arrowheads) and neurites in the protocerebral (pc) lobes. Filled arrowhead marks a perikaryon of the A1 cluster while open arrowhead points to a soma of the A2 group. Arrows point to fibers with origin in pc somata traveling to the aorta (ao), sog, subesophageal ganglion. (B) Immunostained neurites in the protocerebrum. Arrow points to positive neurites close to the median line while open arrow marks neurites in the posterior protocerebrum. cb, central body; lpn, lateral protocerebral neuropil; mb, mushroom bodies. (C) CLI in the protocerebrum and retrocerebral complex (lateral view). Arrowhead points to an immunostained perikaryon of the A2 cluster. Filled arrows mark the course of an immunostained axon from the protocerebral (pc) lobes to the corpora cardiaca–corpus allatum complex. An open arrow points to neurites in the aorta (ao), oe, esophagus. (D) An immunopositive soma (arrowhead) and its emerging neurite in the medial soma rind of the optic lobe. Arrow marks positive neurites in the proximal optic lobe (pol), lo, optic lobula. Anterior is to the top of each figure. Bars: 50 μ m.

gated the distribution of CRZ-like immunoreactivity (CLI) with immunohistochemistry. Recent advances in mass spectrometry allow the identification of neuropeptides in the insect nervous system, providing information for physiological investigations and phylogenetic analyzes [6,21,23]. With this tool, several neuropeptides have been characterized in species of the order Heteroptera [17,23]. Information about the distribution pattern and amino-acid sequence is required to advance into the study of the function of CRZ in triatomine bugs.

In the present study, we describe the distribution pattern of CLI in the CNS of *T. infestans* and identify [Arg⁷]-CRZ as the isoform of the neuropeptide present in this species.

2. Materials and methods

2.1. Insects

Male adults of *T. infestans* were used in this study. The insects, free of *T. cruzi* and *Blastocrithidia triatomae*, were provided by the Center for the Control of Chagas disease (Santa María, Córdoba, Argentina). They were housed under controlled conditions of light (L:D = 12:12, lights on at 6.00 a.m.), temperature (27 ± 1 °C) and relative humidity (70–80%) [25].

2.2. Dissection and fixation

The insects ($n = 70$) were processed for immunohistochemistry two weeks after last feeding. The dorsal cuticle of the head and thorax was quickly removed and the tissues were immediately flushed with ice-cold fixative, a mixture of formalin and picric acid (4% paraformaldehyde and 0.4% picric acid; [46]) in 0.16 M sodium

phosphate buffer (PB), pH 6.9. Dissection of the brain and ganglia proceeded with the tissues bathed in the cold fixative. Samples remained in the same fixative overnight, at 4 °C. After that, they were rinsed several times in 0.01 M PB saline (0.13 M NaCl in PB at pH 7.4, PBS).

2.3. Immunohistochemistry

Whole-mount preparations ($n = 10$) of the brain, subesophageal (SOG) and thoracic ganglia were transferred to PBS containing 1% Triton X100 (PBST) for at least 48 h. After that, they were immersed in PBS containing 10% normal donkey serum for 1 h in order to diminish non-specific binding. The same solution was also used to dilute the primary and secondary antisera. The samples were incubated overnight at room temperature (RT) with anti-CRZ antibodies (a gift from Dr. J Veenstra, Université Bordeaux I, Talence, France) diluted 1:1500. The polyclonal antiserum was obtained by injecting rabbits with a conjugate prepared by coupling corazonin via its tyrosine residue to bovine serum albumin with 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene [43].

After the incubation of the whole mounts with the primary antiserum, they were rinsed in PBST and subsequently incubated overnight at RT with tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (TRITC)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:200, Jackson ImmunoResearch Labs, PA, USA). Brains and ganglia were passed through solutions from 20% to 80% glycerol in 0.05 M sodium carbonate–bicarbonate buffer, pH 7.0. The samples were observed with a Nikon PCM 2000 laser-scanning confocal microscope, mounted on an E800 microscope equipped with green He/Ne (543 nm), red He/Ne (633 nm) and argon (488 nm) lasers and the appropriate filters. Stacks of digitized images were merged and

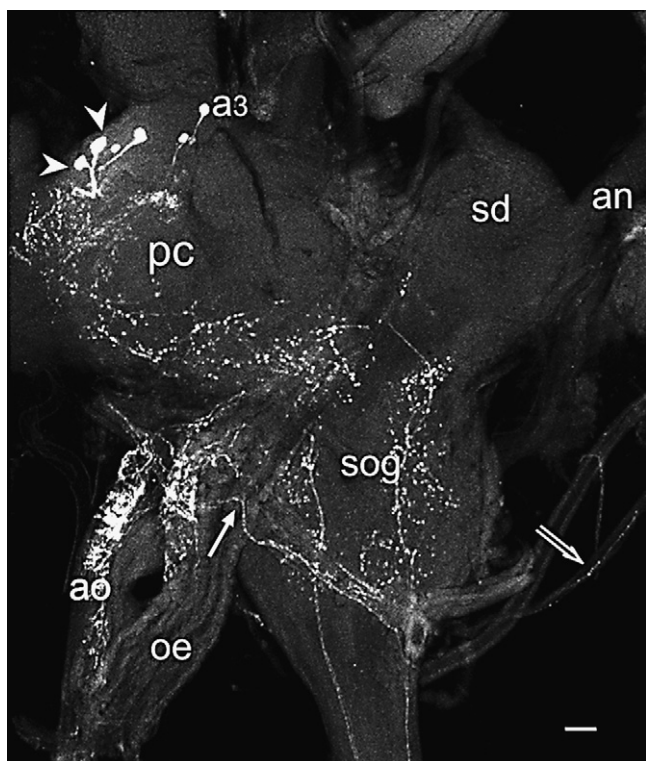


Fig. 3. Confocal immunofluorescence micrograph showing CLI in the protocerebrum (pc), deutocerebrum and subesophageal ganglion (sog). Note the location of the A3 (a3) cell-body cluster in this lateral view of a pc hemisphere. Arrowheads point to somata belonging to the A1 group. A filled arrow marks the course of an immunopositive neurite which after traversing the esophagus (oe), enters the subesophageal ganglion (sog). The antennal lobe (sd) and the antennal nerve (an) show no CLI. Note the high density of immunoreactive neurites in the aorta (ao). An open arrow marks the peripheral course of a positive neurite. Bar: 50 μm .

processed using Simple PCI 3.2 software (Compix Inc., Cranberry Township, PA, USA) as image acquisition software. If required, images were modified only to enhance contrast (Adobe Photoshop, Adobe Systems Inc., San José, CA, USA).

Serial horizontal cryostat sections (Microm, Waldorf, Germany) from 60 insects were processed according to the avidin–biotin immunoperoxidase protocol (ABC, [10]). Before sectioning, the tissues were passed through increasing concentrations of sucrose (5–30%) in PBS containing 0.02% bacitracin (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.01% sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany) [26] for cryoprotection. The sections (16 μm) were incubated overnight with CRZ antiserum diluted 1:2000. After that, the slides were rinsed in PBS, incubated at RT for 30 min in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), rinsed again in PBS and further incubated for 1 h in ABC reagent (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). Peroxidase activity was revealed by reaction with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma–Aldrich) using hydrogen peroxide (0.005%) and nickel salts for enhancement of the reaction product [31]. The sections were dehydrated and mounted with Permount medium (Sigma–Aldrich) and photographed using a Nikon E800 microscope equipped with a Nikon DN100 digital-net camera. Images were modified only to enhance contrast (Adobe Photoshop, Adobe Systems Inc.).

2.4. Controls

The specificity of the CRZ antiserum was tested by overnight preincubation of synthetic corazonin (pGlu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Ser-Arg-Gly-Trp-Thr-Asn-NH₂, Sigma–Aldrich) at a concentration of

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the antiserum diluted 1:2000. After the incubation of the sections with the preabsorbed antiserum, they were processed following the ABC method as stated above. Other controls were performed by incubating the sections without either the primary or the secondary antisera.

2.5. Mass spectrometry

2.5.1. Sample preparation

The brains and the SOGs of adult insects ($n = 30$) were quickly dissected out from surrounding tissues. Groups of 5 brains together with SOGs were placed in sterile tubes containing 50 μl of 0.01 M PBS plus a protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich, P2714). Samples were stored at -70°C until assayed. Special care was taken to include in each of the samples the corpora cardiaca–corpus allatum complex (CC–CA) together with the adjoining cephalic portion of the aorta.

2.5.2. MALDI-TOF mass spectrometry analysis

Samples were extracted in the solution they were stored using a glass microhomogenizer and the protein concentration was determined [3]. 1 μl protein sample was mixed with 1.0 μl of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/ml in 0.1% TFA in 1:1 acetonitrile/methanol), delivered to the target plate and dried at room temperature. MALDI-TOF mass spectra were acquired in a positive-ion mode first on a MALDI micro MX (Waters, Milford, USA), equipped with a pulsed nitrogen laser emitting at 337 nm. Samples were analyzed in the reflectron mode using a delayed extraction time of 150 ns, 75% grid voltage, 0.06% guide wire voltage and an accelerating voltage of 20 kV. Mass spectrometry analysis was performed at the UNIPROTE-MS facility, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

In order to compare to the native CRZ present in the samples of adult insects, standard synthetic CRZ (pGlu-Thr-Phe-Gln-Tyr-Ser-Arg-Gly-Trp-Thr-Asn-NH₂, MW 1369.44, Sigma–Aldrich) was analyzed by mass spectrometry under the same conditions. For the external calibration, a polyethylene glycol mix (PEG, 400, 1000 and 2000) was used. Due to the nature of the samples, all acquisitions were taken in manual mode and each spectrum was produced by accumulating data from 100 consecutive laser shots.

3. Results

The central nervous system of *T. infestans* is composed of the brain, the subesophageal ganglion (SOG) and two thoracic ganglia. The head of this triatomine insect is tubular and compressed laterally. Due to the huge development of the pharyngeal pump muscles, the brain and the SOG lie posteriorly in the postocular region of the cephalic capsule. Upon removal of the cuticle of the frons, the protocerebral hemispheres and the optic lobes can be observed (Fig. 1A). Each optic lobe extends anterolaterally, beyond the anterior margin of the protocerebrum (PC), to reach the ipsilateral compound eye. In this dorsal view, the deutocerebrum (DC, Fig. 1B), the tritocerebrum (TC) and the anterior third of the SOG are not visible, as they are concealed by the dome-shaped protocerebral lobes.

The thoracic ganglia comprise the prothoracic ganglion (PRO) and the mesothoracic ganglionic mass (MG), situated near the prosternum and the mesosternum respectively (Fig. 1C). The MG represents the fused mesothoracic, metathoracic and abdominal ganglia.

3.1. Corazonin-like immunoreactivity in the brain

The distribution of CLI in cell bodies and fibers is depicted in Fig. 1A and B. Few immunoreactive somata were detected in

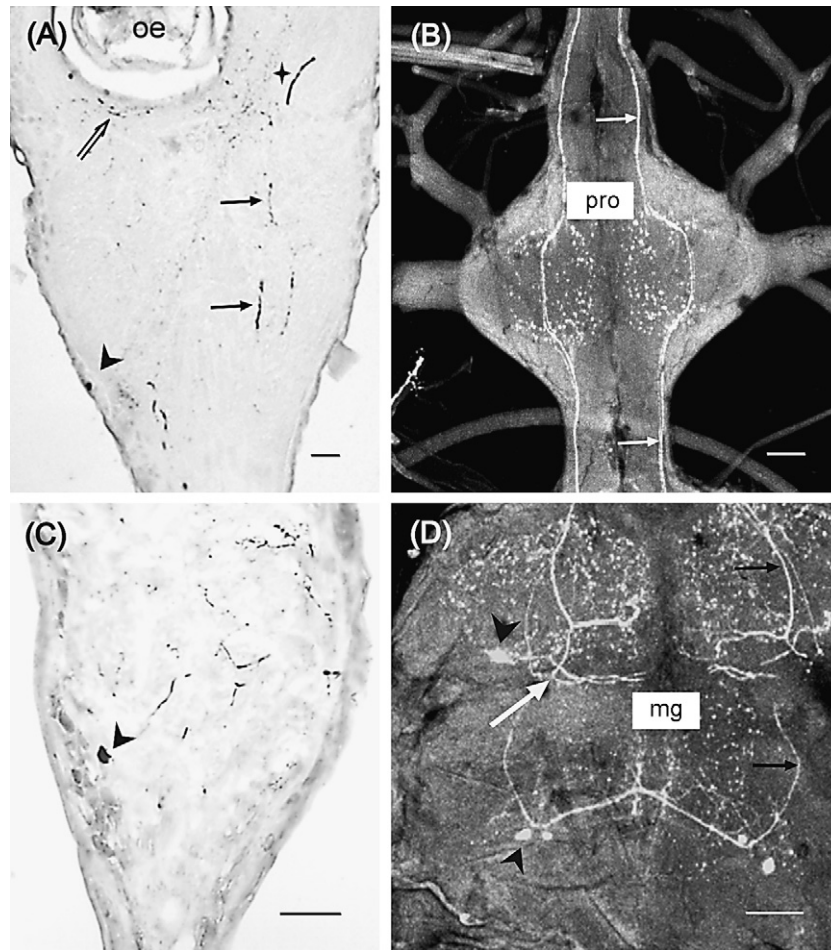


Fig. 4. Bright field (A and C) and confocal immunofluorescence micrographs (B and D) showing CLI in the subesophageal ganglion (sog, A) and thoracic ganglia (B–D). (A) Immunoreactive neurites bordering the esophageal foramen (open arrow) and in the neuropil of the sog (arrows). A star marks an immunoreactive neurite in the deutocerebral neuropil. (B) Immunostained neurites in the neuropil of the prothoracic ganglion (pro) and fiber tracts connecting the cephalic and posterior connectives (arrows). (C) Parasagittal section of the mesothoracic ganglionic mass showing an immunoreactive soma in the dorsal soma rind (arrowhead) and positive neurites in the neuropil. (D) Immunostained somata (black arrowheads) in the mesothoracic and metathoracic neuromeres of the mesothoracic ganglionic mass (mg). Black arrows mark the course of a bilateral immunopositive neurite while a white arrow points to an immunostained commissure. Anterior is to the top of figures. Dorsal side is to the left of plate. (C) Bars: 50 μ m.

the brain. Three groups of somata showing CLI were observed in the protocerebrum which were termed A1, A2 and A3. The A1 cluster was formed by two intensively immunostained perikarya (Figs. 1A and 2A), which were located in a dorsomedial position near the entrance of the ocellar nerves. One soma of the A1 cluster was large (about 25 μ m) and showed granular deposits of the immunoreactive material. Perikarya of this cluster originated two branches. One of them was observed running dorsally to the central body toward the median line where it ended close to the contralateral partner. The other branch was seen traveling posteriorly, and after leaving the brain it ramified in the cephalic aorta and in the corpora cardiaca (Fig. 2A and C).

The A1 cluster gave also origin to an immunopositive branch which spread into varicose fibers in the lateral protocerebrum and in the SOG (Figs. 2A, C and 3). The neuropils of both the mechanosensory-motor deutocerebrum and the tritocerebrum housed immunostained neurites (Figs. 3 and 4A).

The A2 cluster was formed by two immunolabeled somata located in an anterolateral position to the A1 group (Figs. 1A and 2A, C). Their neurites arborized in the lateromedial protocerebral neuropil. An immunopositive fiber originated in one of these cell bodies was observed running toward the A1 cluster (Fig. 2A). The A3 group was formed by three medium-sized immunostained somata (10–15 μ m). They were detected in the

dorsolateral cell-body layer, at the boundary of the protocerebrum with the optic lobe (Figs. 1A and 3).

The optic lobe housed three immunoreactive cell bodies (Fig. 1A). One of them was found at the level of the first optic chiasma. The remaining perikarya were observed in the medial cell-body layer close to the base of the lobula. An immunopositive fiber from one of these somata was seen running toward the PC neuropil (Fig. 2D).

Immunostained varicosities were observed along the median line of the protocerebrum (Fig. 2A and B), the anterolateral and posterolateral protocerebral neuropils and in the proximal optic lobe (Figs. 1A and 2B, D). The central body complex and the mushroom bodies showed no immunostaining (Fig. 2B).

No immunopositive perikarya were observed in cortical regions of the deutocerebrum and tritocerebrum (Figs. 1B and 3A).

3.2. Corazonin-like immunoreactivity in the subesophageal and thoracic ganglia

In the SOG, immunoreactive somata were observed in the lateral soma cortices of the mandibular and labial neuromeres (Figs. 1B and 4A). Immunolabeled fibers were seen bordering the esophageal foramen (Figs. 3 and 4A).

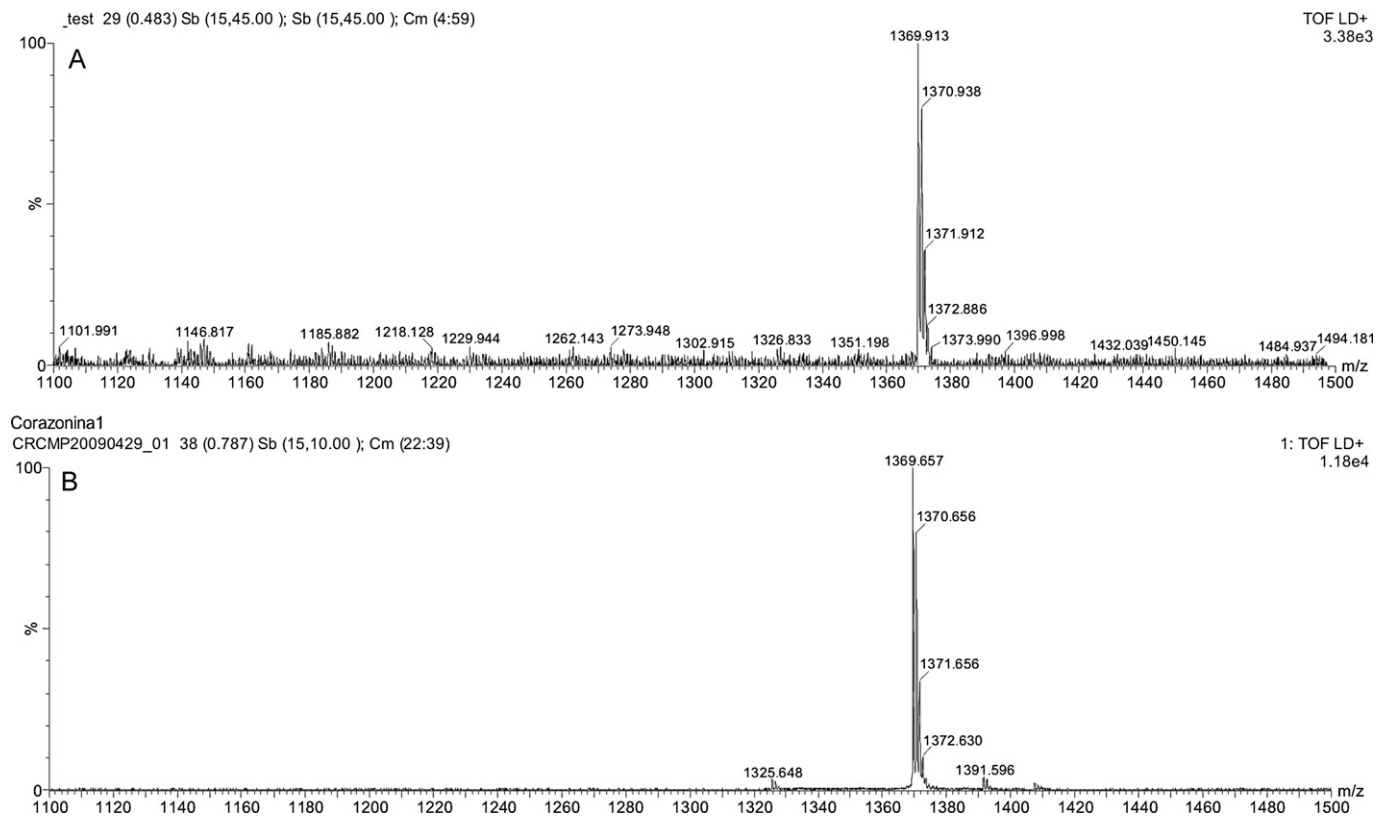


Fig. 5. (A) MALDI-TOF mass spectrum from a preparation containing tissues from the brain, subesophageal ganglion, corpora cardiaca–corpus allatum complex and adjoining cephalic portion of the aorta. A single peak signal at m/z 1369.913 nearly identical to the mass of $[\text{Arg}^7]$ -CRZ is shown in (B). (B) Pattern obtained for standard $[\text{Arg}^7]$ -CRZ analyzed under the same conditions, showing a peak signal at 1369.657.

Bilateral immunostained fibers were observed along the SOG, they gave rise to varicose branches in each hemineuromere (Figs. 2A, C and 3). After traveling through the cephalic connectives they entered the PRO. These bilateral tracts could be traced backwards to the A1 cluster (Fig. 3).

No immunolabeled somata were detected in the PRO. Bilateral fibers arborized in the neuropil before entering the posterior connectives (Figs. 1C and 4B). Paired somata showing CLI were observed in the infoldings of soma layer between the neuromeres of the MG (Figs. 1C and 4C, D). Unpaired immunostained perikarya were only present in the abdominal neuromeres. The neuropil of this ganglionic mass contained a high density of immunoreactive varicose neurites. Bilateral immunopositive axons were observed running along the entire MG while commissures connected the mesothoracic and metathoracic hemineuromeres (Fig. 4D).

3.3. Other corazonin-like immunoreactive elements

The esophageal wall received immunoreactive axons from somata of the A1 group. Immunostained neurites were traced from the esophagus to supply both the dorsal and the ventral esophagus dilator muscles. The wall of the anterior third of the aorta housed a high density of varicose neurites (Fig. 3). Also, immunopositive fibers linked the aorta and the esophagus (Fig. 3).

3.4. Controls

No immunostained perikarya or neurites were found when the sections were incubated with the CRZ antiserum preabsorbed with the synthetic neuropeptide. Immunostaining of the tissues was abolished when the primary or the secondary antibodies were omitted in the corresponding solutions.

3.5. Mass spectrometry analysis of CRZ isoforms

Fig. 5A shows the MALDI-TOF spectra of sample homogenates containing the brain, SOG, CC–CA complex and the adjoining portion of the aorta. Fig. 5B displays the pattern obtained for standard $[\text{Arg}^7]$ -CRZ (MW 1369.44) analyzed under the same conditions. Comparison of both spectra indicates a positive identification of $[\text{Arg}^7]$ -CRZ in the sample. The four peaks shown in Fig. 5A represent the isotopic pattern of $[\text{Arg}^7]$ -CRZ.

4. Discussion

Since the first description of CLI in *P. americana* by Veenstra and Davis [43], various studies have contributed to increase our knowledge on the distribution pattern of this neuropeptide in insects [4,7,24,40,47].

In the disease vector insect *T. infestans*, CLI is present in the retrocerebral neuroendocrine system and in interneurons. In these triatomine bugs, the finding of immunoreactive somata of the lateral PC with ipsilateral projections to the retrocerebral complex is in agreement with previous reports in species from five insect orders [24]. It also provides additional evidence for the hypothesis that the pattern of CLI in the retrocerebral complex is highly conserved in insects.

Instead, in other regions of the brain and in the mesothoracic ganglionic mass differences in the pattern of CLI were found between the phytophagous bug *Pyrrhocoris apterus* and *T. infestans*. These differences suggest the possibility of a species-specific pattern of CLI in the aforementioned regions within the heteropterans. However, as different immunohistochemistry protocols have been used in our study and in that by Roller et al. [24], it is possible that at least some differences in the

immunostainings may be the result of employing different methodologies.

Corazonin immunoreactive somata of the blowfly pars laterals have been classified according to their projection fields and colocalizations with other neuropeptides [7]. The pattern of projections shown by cells of the A1 cluster in *T. infestans*, resembles that of the blowfly PL-i cells. Comparison of the morphology and immunoreactivities of the A1 cells in both species, renders unlikely that in *T. infestans* these cells co-express CRZ-, <beta>-pigment-dispersing hormone and cholecystokinin-like immunoreactivities [29,30] as it occurs in the blowfly.

In the optic lobe of *T. infestans*, CLI was represented by somata at the level of the first optic chiasma and at the base of the lobula. These immunoreactive cell bodies bear no resemblance to those in which circadian-clock related proteins have been immunolocalized [29]. Optic lobe neuropils were devoid of immunostaining, only immunoreactive fibers from lobula perikarya were seen running toward the PC lobes. In other insect species, immunoreactive fibers were detected in relationship to the accessory medulla [18], suggesting that lobula somata showing CLI might play a role in the regulation of circadian rhythmicity. Although our observations do not provide support to a role of CRZ in the circadian periodicity, the possible coexistence of CLI with known clock proteins is an important matter to be investigated in *T. infestans*, particularly because some activity patterns have been well documented [15,25].

The localization by immunocytochemistry of a neuropeptide can give clues about its function. The mushroom bodies and the central complex of this triatomine species displayed no CLI. Neuroanatomical studies in insects have shown that these neuropils are related to the integration of information from different sensory modalities and the subsequent elaboration of the appropriate behavioral responses [9,16,33,34]. The antennal lobe of *T. infestans* lacked immunolabeled perikarya and only a few cell bodies were present in the optic lobe, which also showed unstained neuropils. Thus, it appears that CRZ is not involved in the processing of visual and olfactory information by integration centers of the protocerebrum. On the other hand, projections from somata of the A1 cluster supplied the cephalic aorta with numerous branches. The aorta is considered an important site of release of brain products. It is possible that in this region, CRZ is released into the hemolymph and may act as a neurohormone.

It was found that branches from a dorsal unpaired median neuron in the SOG are the source of CLI the antennal lobe and the tritocerebrum [43]. The antennal lobe of *T. infestans* was devoid of immunoreactive perikarya and fibers. Instead, the neuropils of both the antennal mechanosensory-motor center and the tritocerebrum contained immunolabeled fibers. Due to the fact that a similar immunoreactive SOG neuron was not detected in *T. infestans*, it appears that the A1 cluster is the only source of CLI in the deutocerebral and tritocerebral neuropils.

The presence of CRZ immunoreactive somata in the SOG has been reported in *P. americana* [43], *Ctenolepisma lineata*, *P. apterus* [24] and some termites [47]. The detection of immunostained fibers extending from the SOG to the tritocerebrum served to propose a link between both neural areas in *Neotermes castaneus* [47] and *P. americana* [43]. In our triatomine bugs, the SOG and the tritocerebrum receive immunoreactive neurites from somata of the A1 cluster. A local link between both neural regions seems unlikely as ascending immunolabeled neurites from the SOG to the tritocerebrum were not detected.

Bilateral CRZ immunoreactive longitudinal tracts and bilateral serially distributed interneurons have been reported in the ventral nerve cords of different insect species [4,5,43]. In *T. infestans*, bilateral axons having CLI were observed along the neuropils of both thoracic ganglia; immunoreactive perikarya were found only in the MG. CRZ immunoreactive somata of the ventral nerve cord

disappear during the metamorphosis of blowflies and fruitflies [4,5]. Instead, these ventral nerve cord perikarya persist in most of the reported species, a fact which suggests the conservation of these immunostainings among different insect orders. Regarding the immunolabelings in neuropils and tracts, CRZ immunoreactive ascending projections from ventral cord neurons have been considered as a way of interaction between the latter and the protocerebral neurons. Conversely, in our specimens, ascending neurites were observed only in somata of the metathoracic neuromere and they could not be traced to the brain.

Structural conservation of CRZ in various insects suggests that this neuropeptide may be also present in hematophagous heteropterans. Here, MALDI-TOF mass spectrometric analysis from samples of adult *T. infestans* which included the brain, SOG, corpora cardiaca–corpus allatum complex and the cephalic portion of the aorta revealed (by mass-match) the presence of the [Arg⁷]-CRZ isoform in this species. Mass spectrometric analysis of *Rhodnius prolixus* nymphal brains, without the corpora cardiaca–corpus allatum complexes, provided the sequence pQTFQYSRGWLN-NH₂ (*m/z* 1369.64) which also corresponds to [Arg⁷]-CRZ [17]. Since the antiserum used in this study [43] was raised against the most abundant peptide of the corpora cardiaca of *P. americana* [Arg⁷]-CRZ, the pattern of CLI observed in the brain, SOG and retrocerebral complex of *T. infestans* correlates with the presence of the isoform detected by mass spectrometry. [Arg⁷]-CRZ isoform is present in species from different genera of the subfamily Triatominae as well as in four members of the Pentatomidae [23]. Thus, these species may be appropriate experimental models to develop functional studies.

In conclusion, the presence of CLI in specific areas of the CNS of *T. infestans*, together with the pattern of some projections of immunoreactive somata suggest mainly a neurohormonal role for [Arg⁷]-CRZ.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. J.A. Veenstra (Université Bordeaux I, Talence, France) and Dr. N.T. Davis (Arizona Research Laboratories, Division of Neurobiology, University of Arizona) for their generous gifts of the Corazonin antiserum. The invaluable suggestions and encouragement from N.T. Davis during the course of this study are deeply acknowledged. Part of this work was performed at the Division of Neurobiology, Arizona Research Laboratories (Tucson, Arizona) with the support of a Fulbright Research Award to B.P.S.

The authors thank Dr. Arturo H. Roig-Alsina for critical reading of the manuscript, Dr. D. Canale and Dr. R. Stariolo (Center for the Control of Chagas disease) for providing the insects, and G. Ruffolo and S. Ruffolo for technical assistance in the laboratory.

This study was supported by Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral and the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). PMP and MP are recipients of fellowships from CNPq and CAPES, respectively.

References

- [1] Barth R. Estudos anatomicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Cerebro e seus nervos de *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1975;74:153–76.
- [2] Boerjan B, Verleyen P, Huybrechts J, Schoofs L, De Loof A. In search for a common denominator for the diverse functions of arthropod corazonin: a role in the physiology of stress? Gen Comp Endocrinol 2010;166:222–33.
- [3] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54.
- [4] Cantera R, Veenstra JA, Nässel DR. Postembryonic development of corazonin-containing neurons and neurosecretory cells in the blowfly *Phormia terraenovae*. J Comp Neurol 1994;350:559–72.

- [5] Choi YJ, Lee G, Hall JC, Park JH. Comparative analysis of Corazonin-encoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. *J Comp Neurol* 2005;482:372–85.
- [6] Clynen E, Schoofs L. Peptidomic survey of the locust neuroendocrine system. *Insect Biochem Mol Biol* 2009;39:491–507.
- [7] Hamanaka Y, Tanaka Y, Numata H, Shiga S. Peptide immunocytochemistry of neurons projecting to the retrocerebral complex in the blowfly *Protophormia terraenovae*. *Cell Tissue Res* 2007;329:581–93.
- [8] Hansen IA, Sehnal F, Meyer SR, Scheller K. Corazonin gene expression in the waxmoth *Galleria mellonella*. *Insect Mol Biol* 2001;10:341–6.
- [9] Homberg U. Evolution of the central complex in the arthropod brain with respect to the visual system. *Arthropod Struct Dev* 2008;37:347–62.
- [10] Hsu SM, Raind O, Fanger H. Use of avidin biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577–80.
- [11] Hua Y, Ishibashi J, Saito H, Tawfik AI, Sakakibara M, Tanaka Y, et al. Identification of [Arg⁷] corazonin in the silkworm, *Bombyx mori* and the cricket, *Gryllus bimaculatus*, as a factor inducing dark color in an albino strain of the locust, *Locusta migratoria*. *J Insect Physiol* 2000;46:853–60.
- [12] Insausti TC. Nervous system of *Triatoma infestans*. *J Morphol* 1994;221:341–9.
- [13] Insausti TC. Central projections of first order ocellar interneurons in the bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Morphol* 1996;229:161–9.
- [14] Kim YJ, Spalovská-Valachová I, Cho KH, Zitnanova I, Park Y, Adams ME, et al. Corazonin receptor signaling in ecdysis initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;2101:6704–9.
- [15] Lazzari CR. Circadian organisation of locomotor activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 1992;38:895–903.
- [16] Nässel DR, Homberg U. Neuropeptides in interneurons of the insect brain. *Cell Tissue Res* 2006;326:1–24.
- [17] Ons S, Richter F, Urlaub H, Rivera Pomar R. The neuropeptidome of *Rhodnius prolixus* brain. *Proteomics* 2009;9:788–92.
- [18] Petri B, Stengl M, Würden S, Homberg U. Immunocytochemical characterization of the accessory medulla in the cockroach *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res* 1995;282:3–19.
- [19] Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol* 2005;42:637–42.
- [20] Predel R, Agrícola H, Linde D, Wollweber L, Veenstra JA, Penzlin H. The insect neuropeptide corazonin: physiological and immunocytochemical studies in Blattariae. *Zoology* 1994;98:35–49.
- [21] Predel R. Peptidergic neurohemal system of an insect: mass spectrometric morphology. *J Comp Neurol* 2001;436:363–75.
- [22] Predel R, Neupert S, Russell WK, Scheibner O, Nachman RJ. Corazonin in insects. *Peptides* 2007;28:3–10.
- [23] Predel R, Russel WK, Russell DH, Lopez J, Esquivel J, Nachman RJ. Comparative peptidomics of four related hemipteran species: pyrokinins, myosuppressin, corazonin, adipokinetic hormone, sNPF, and periviscerokinins. *Peptides* 2008;29:162–7.
- [24] Roller L, Tanaka Y, Tanaka S. Corazonin and corazonin-like substances in the central nervous system of the Pterygota and Apterygota insects. *Cell Tissue Res* 2003;312:393–406.
- [25] Settembrini BP. Circadian rhythms of locomotor activity in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 1984;21:204–12.
- [26] Settembrini BP, Villar MJ. Proctolin in the brain and ganglia of *Triatoma infestans*. *J Morphol* 1999;240:39–46.
- [27] Settembrini BP, Nowicki S, Hökfelt T, Villar MJ. Distribution of NPY and NPY-Y1 receptor-like immunoreactivity in the central nervous system of *Triatoma infestans*. *J Comp Neurol* 2003;460:141–54.
- [28] Settembrini BP, Villar MJ. Distribution of serotonin in the central nervous system of the blood feeding heteropteran *Triatoma infestans*. *J Morphol* 2004;260:21–32.
- [29] Settembrini BP, Villar MJ. FMRFamide-like immunocytochemistry in the brain and subesophageal ganglion of *Triatoma infestans* (Insecta:Heteroptera) Coexpression with β -pigment-dispersing hormone and small cardioactive peptide B. *Cell Tissue Res* 2005;321:299–310.
- [30] Settembrini BP, Galvani G, Villar MJ. Localization of cholecystokinin-like immunoreactivity in the central nervous system of *Triatoma infestans*. *Tissue Cell* 2008;40:51–60.
- [31] Shu S, Ju G, Fan I. The glucose oxidase method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 1988;85:169–71.
- [32] Sláma K, Sakai T, Takeda M. Effect of corazonin and crustacean cardioactive peptide on heartbeat in the adult American cockroach (*Periplaneta americana*). *Arch Insect Biochem Physiol* 2006;62:91–103.
- [33] Strausfeld NJ, Sinakevitch I, Brown SM, Farris SM. Ground plan of the insect mushroom body: functional and evolutionary implications. *J Comp Neurol* 2009;513:265–91.
- [34] Strauss R, Heisenberg M. A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* 1993;13:1852–91.
- [35] Tanaka S. The role of [His⁷]-corazonin in the control of body-color polymorphism in the migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *J Insect Physiol* 2000;46:1169–76.
- [36] Tanaka Y, Hua Y, Roller L, Tanaka S. Corazonin reduces the spinning rate in the silkworm *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* 2002;48:707–14.
- [37] Tawfik AI, Tanaka S, De Loof A, Schoofs L, Baggerman G, Waelkens E, et al. Identification of the gregarization-associated dark-pigmentotropin in locusts through an albino mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7083–7.
- [38] Toloza AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E, Picollo MI. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 2008;45:421–6.
- [39] Veenstra JA. Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the American cockroach. *FEBS Lett* 1989;250:231–4.
- [40] Veenstra JA. Presence of corazonin in three insect species and isolation and identification of [His⁷]-corazonin from *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 1991;12:1285–9.
- [41] Veenstra JA. Isolation and structure of the *Drosophila corazonin* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;204:292–6.
- [42] Veenstra JA. Does corazonin signal nutritional stress in insects? *Insect Biochem Mol Biol* 2009;39:755–62.
- [43] Veenstra JA, Davis NT. Localization of corazonin in the nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res* 1993;274:57–64.
- [44] Verleyen P, Baggerman G, Mertens I, Vandersmissen T, Huybrechts J, Van Lommel A, et al. Cloning and characterization of a third isoform of corazonin in the honey bee *Apis mellifera*. *Peptides* 2006;27:493–9.
- [45] WHO. Report of the Scientific Working Group on Chagasí disease, Buenos Aires, Argentina; 2005. p. 1–4.
- [46] Zamboni L, De Martino C. Buffered picric acid formaldehyde – a new rapid fixation for electron microscopy. *J Cell Biol* 1967;35:148A.
- [47] Závodská R, Wen CJ, Sehnal F, Hrdý I, Lee HJ, Sauman I. Corazonin- and PDF-immunoreactivities in the cephalic ganglia of termites. *J Insect Physiol* 2009;55:441–9.

Anexo III

Manuscrito submetido para publicação



Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides

Melissa Postal^a, Anne H.S. Martinelli^{a,b}, Arlete B. Becker-Ritt^{a,1}, Rodrigo Ligabue-Braun^a,
Diogo R. Demartini^a, Suzanna F.F. Ribeiro^c, Giancarlo Pasquali^d, Valdirene M. Gomes^c, Celia R. Carlini^{a,b,*}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

^b Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

^c Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, 28015-602 RJ, Brazil

^d Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2012

Received in revised form 12 August 2012

Accepted 13 August 2012

Available online 24 August 2012

Keywords:

Jaburetox

Pseudohyphae

Yeast

Glucose-induced acidification

Membrane permeabilization

Growth inhibition

ABSTRACT

Ureases (EC 3.5.1.5) are metalloenzymes that hydrolyze urea into ammonia and CO₂. These proteins have insecticidal and fungicidal effects not related to their enzymatic activity. The insecticidal activity of urease is mostly dependent on the release of internal peptides after hydrolysis by insect digestive cathepsins. Jaburetox is a recombinant version of one of these peptides, expressed in *Escherichia coli*. The antifungal activity of ureases in filamentous fungi occurs at submicromolar doses, with damage to the cell membranes. Here we evaluated the toxic effect of *Canavalia ensiformis* urease (JBU) on different yeast species and carried out studies aiming to identify antifungal domain(s) of JBU. Data showed that toxicity of JBU varied according to the genus and species of yeasts, causing inhibition of proliferation, induction of morphological alterations with formation of pseudohyphae, changes in the transport of H⁺ and carbohydrate metabolism, and permeabilization of membranes, which eventually lead to cell death. Hydrolysis of JBU with papain resulted in fungitoxic peptides (~10 kDa), which analyzed by mass spectrometry, revealed the presence of a fragment containing the N-terminal sequence of the entomotoxic peptide Jaburetox. Tests with Jaburetox on yeasts and filamentous fungi indicated a fungitoxic activity similar to ureases. Plant ureases, such as JBU, and its derived peptides, may represent a new alternative to control medically important mycoses as well as phytopathogenic fungi, especially considering their potent activity in the range of 10⁻⁶–10⁻⁷ M.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Ureases (EC 3.5.1.5) are nickel-dependent enzymes that catalyze urea hydrolysis into ammonia and carbon dioxide, and are synthesized by plants, fungi and bacteria [13,20]. Urease of jackbean (*Canavalia ensiformis*) seeds was the first enzyme ever to be crystallized [41], consisting of a hexamer of a single chain of 840 amino acid residues, with a molecular mass of 97 kDa [16,20,38]. It has been postulated that in plants these proteins contribute to the bioavailability of nitrogen and participate in defense mechanisms [12,16].

C. ensiformis produces several urease isoforms: the more abundant jackbean urease (JBURE-I), and two less abundant proteins,

canatoxin (CNTX) [17] and JBURE-II [26]. CNTX-like proteins and urease accumulate in the mature seed, consistent with the proposed defense role associated with both insecticidal [40] and fungicidal properties [7,26].

Insecticidal activity of Jackbean urease depends mostly on the release of an entomotoxic peptide formed by proteolytic enzymes upon ingestion by the insect [15]. This peptide, Pepcanatox, was characterized and based on its sequence, a recombinant peptide named Jaburetox-2EC was produced using the corresponding sequence of the urease isoform JBURE-II as template [27]. This peptide has 93 amino acids and its toxicity to several insects, including some species that were not affected by the native urease, has been demonstrated [40].

CNTX was the first urease shown to inhibit the radial growth of several filamentous fungi [29]. In 2007, Becker-Ritt et al. [7] reported the fungicidal activity of the embryo specific urease from *Glycine max* (soybean), the major urease from *C. ensiformis* and of a bacterial urease from *Helicobacter pylori*, regardless of their ureolytic activity, toward different phytopathogenic fungi. Urease from other sources also display fungicidal activity, such as the cotton (*Gossypium hirsutum*) seed urease [23] and the

* Corresponding author at: Department of Biophysics & Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43.431, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil. Tel.: +55 51 3308 7606; fax: +55 51 3308 7003.

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

¹ Graduate Program in Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Genetics Applied Toxicology, Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, Canoas, RS, Brazil.

recombinant JBURE-IIb apourease from *C. ensiformis* [26]. Recently, it was demonstrated that soybean plants lacking urease due to gene silencing were more susceptible to fungal infection, reinforcing the hypothesis of participation of these proteins in plant defense [44]. The fungitoxic activity of ureases occurs at submicromolar doses, making these proteins 2–3 orders of magnitude more potent than any other known antifungal proteins of plant origin, producing injuries to the cell wall and/or cell membrane and plasmolysis [6,7].

Infectious diseases, mainly candidiasis and aspergillosis, caused by yeasts and filamentous fungi are a serious problem worldwide, especially in tropical and subtropical countries where the number of immunosuppressed patients (who often develop these diseases), has increased over the last decade. The drugs available for treating these mycoses have low efficiency, low solubility and high toxicity, causing severe collateral effects. Besides these problems, the emergence of strains resistant to current therapeutic agents makes essential and urgent the identification of new antifungal compounds [35]. Despite numerous reports on the occurrence and activity of proteins and antimicrobial peptides originated from plant, some have already been successfully tested as transgenes to confer resistance to plants against fungi and/or insects [6], only a few have been evaluated for therapeutic potential in human mycoses [3]. The search for new antifungal compounds from plants became extremely urgent considering the spread of invasive mycoses, particularly in immunocompromised patients, caused by pathogenic fungi or in plants by soil fungi (e.g., *Alternaria*, *Curvularia* and *Rhizopus*), before considered as fungi of low virulence, and which are currently being considered as emerging pathogens [14].

Plants are an excellent source of compounds having antifungal activity, since they are continuously exposed to a broad range of phytopathogenic fungi in the environment. Plant antifungal peptides include defensins, lipid transport proteins, chitinases, lectins, thionins, cyclopeptide alkaloids and other less common types [6,14,28].

In this work we describe the toxic activity of JBU and of Jaburetox in pathogenic yeast. Studies on the mechanisms of their antifungal action have shown interference on energy metabolism and proton transport, morphological changes and permeabilization of the fungal membrane. Fungitoxic urease-derived peptides were obtained by enzymatic hydrolysis and provided clues to the location of antifungal domain(s) of the protein.

2. Materials and methods

2.1. *C. ensiformis* urease (JBU)

Urease type C-III from Jack bean (Sigma Aldrich) was used in all experiments. The protein (hexameric form, Mr 540 kDa) was solubilized in 50 mM Tris buffer, pH 7.0, and quantified by absorbance at 280 nm (0.604 A280 was considered equivalent to a 1.0 mg/mL protein solution). Enzyme-inactivated JBU was obtained by treating the protein with the active site inhibitor p-hydroxy-mercurybenzoate (Sigma Aldrich) as described in [17]. Excess of the inhibitor was removed by extensive dialysis against Tris buffer.

2.2. PCR amplification and cloning of Jaburetox

Jaburetox-2Ec, the recombinant peptide obtained by Mulinari et al., 2007 [27], contained 93 urease-derived amino acids, plus a V5 antigen and a C-terminal His-tag. The vector pET 101-D-TOPO containing Jaburetox-2Ec coding sequence was used as template in a polymerase chain reaction. In order to obtain a recombinant peptide containing the His-tag and lacking the V5 antigen, a set of primers were designed, the cDNA was amplified by PCR, cloned

into pET 23-a vector and expressed in BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Stratagene). This new peptide was called Jaburetox.

The forward primer sequence was Jaburetox 5' CCAACATATGGGTCCAGTTAA TGAAGCCAAT 3' (the underline shows the NdeI site) and the reverse primer sequence was Jaburetox 5' CCCCTCGAGTATAACTTTCCACTCCAAAACA 3' (the underline shows the XhoI site). The PCR reaction was carried out in the following conditions: denaturation at 95 °C for 3 min, annealing at 55 °C for 30 s and elongation at 72 °C for 2 min. A total of 35 cycles were used and the final product was then digested with NdeI (Fermentas, Eugene, OR, USA) and XhoI (Fermentas, Eugene, OR, USA), dephosphorylated with thermosensitive alkaline phosphatase (Promega, Madison, WI, USA). The plasmid pET 23a::Jaburetox was sequenced using a ABI PRISM 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster city, CA).

2.3. Expression and purification of recombinant Jaburetox

For isolation and purification of Jaburetox, 200 mL of Luria broth medium containing 100 µg/mL ampicillin and 40 µg/mL chloramphenicol were inoculated with 2 mL of the overnight culture. The cells were grown 2 h at 37 °C under shaking (OD600 = 0.7) and then 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added. After 3 h, the cells were harvested by centrifugation and suspended in 10 mL of lysis buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole), sonicated, centrifuged (14,000 × g, 30 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, Hilden, Germany), which was previously equilibrated with the equilibration buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole). After 30 min, the column was washed with 20 mL of the same buffer, containing 50 mM imidazole. The recombinant peptide was eluted with the equilibration buffer containing 200 mM imidazole and quantified by the Bradford method [9]. The samples were dialyzed against the 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoethanol. A molecular mass of 10,128.2 Da (ExPASy ProtParam tool) was considered for Jaburetox.

2.4. Fungi and yeast

The yeasts *Candida parapsilosis* (CE002), *Candida tropicalis* (CE017), *Candida albicans* (CE022), *Kluyveromyces marxianus* (CE025), *Pichia membranifaciens* (CE015), and *Saccharomyces cerevisiae* (1038) and filamentous fungi *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium laterithium*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma viridae*, *Pythium oligandrum*, *Lasioidiplodia theobromae*, *Cercospora chevalier* and *Rhizoctonia solani* were kindly provided by Dr. Valdirene Gomes from the Laboratory of Physiology and Biochemistry of Microorganisms, Center of Bioscience and Biotechnology, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil or by Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira from the Department of Biochemistry, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil. The yeasts were maintained on Sabouraud agar (1% peptone, 2% glucose and 1.7% agar). The fungi were maintained on potato agar (PDA) at 4 °C.

2.5. Hydrolysis of JBU

JBU was hydrolyzed using different commercial enzyme: trypsin (EC 3.4.21.4 – Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), chymotrypsin (EC 3.4.21.1 – Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) papain (Merck, Darmstadt, Alemanha), pepsin (EC 3.4.23.1 – Sigma, St. Louis, MO, USA). Different conditions of hydrolysis were tested, varying pH, incubation time and enzyme:substrate ratio. The reaction mixture after

hydrolysis with papain was submitted to ultrafiltration (4000 × g, 10 min) using 10,000 mw cut-off Amicon cartridges (Millipore, Billerica, MA, USA) to separate a pass-through filtered fraction containing peptides with Mr below 10,000 d and a retained fraction, with molecules bigger than 10,000 d.

2.6. Electrophoresis

The hydrolyzed fractions of JBU were visualized in SDS-Tricine gels [36]. The gels were stained with Colloidal Coomassie.

2.7. Analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry

The filtered fractions (<10 kDa) after hydrolysis of JBU were desalted on reverse-phase column (C-18) in a HPLC system (Shimadzu). The column was equilibrated with 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) and the retained fraction were eluted with a gradient (0–100%) of 99.9% acetonitrile in 0.1% TFA. The eluted peptides were pooled and lyophilized.

The lyophilized material was suspended in 0.1% formic acid (20 µL) and 5 µL were subjected to reversed phase chromatography (NanoAcquity UltraPerformance LC®-UPLC®, Waters, Milford, United States chromatograph) using a Nanoease C18, 75 µm ID at 35 °C. The column was equilibrated with 0.1% TFA and the peptides were eluted in 20 min gradient, ramping from 0 to 60% acetonitrile in 0.1% TFA at 0.6 nL/min constant flow. Eluted peptides were subjected to electro spray ionization and analyzed by mass spectrometry using a Q-TOF Micro™ spectrometer (Micromass, Waters, Milford, United States). The voltage applied to the cone for the ionization was 35 V. The three most intense ions in the range of m/z 200–2000 and +2 or +3 charges were selected for fragmentation.

The acquired MS/MS spectra were processed using Proteinlynx v.2.0 software (Waters, Milford, US) and the generated .mgf files were used to perform database searches using the MASCOT software (version 2.4.00) (Matrix Science, London, UK) against the NCBI database, restricting the organism to taxonomy “green plants.taxid 33,090.” No digestion enzyme was selected. Search parameters allowed a maximum of one missed cleavage, the carbamidomethylation of cysteine, the possible oxidation of methionine, peptide tolerance of 1.2 Da, and MS/MS tolerance of 1.2 Da. The significance threshold was set at $p < 0.05$, and identification required that each protein contained at least one peptide with an expected value <0.05. Data was manually checked for validation.

2.8. Homology of urease with plant antifungal proteins

The N-terminal sequences of French bean thaumatin-like protein, French bean antifungal peroxidase, pinto bean chitinase (phasein A), and pea defensins (PSDs) were taken from [28]. The alignment of these sequences with the major urease of *C. ensiformis* (NCBI gi 167228) was performed with the ClustalW program [21], using the BLOSUM matrix [19]. The regions of urease which are similar to these antifungal proteins were colored manually with the UCSF Chimera molecular viewer [30].

2.9. Antifungal assays

2.9.1. Yeasts

The growth assays were performed according to [34]. Yeast cells of *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* and *Pichia membranifaciens* were set to multiply in Petri dishes containing Sabouraud agar for 24 or 48 h at 30 °C. For the assay, cells were removed with the aid of a sowing handle, and added to 10 mL of Sabouraud culture medium. The test samples were added to cells (1×10^4 per mL) and growth was evaluated by turbidity readings at

a wavelength of 620 nm for a period of 24–48 h. The tests were performed in 96 well plates, U-bottom and read in a plate reader (Reader 400 EZ – Biochrom).

To evaluate the reversibility of the antifungal effect and discriminate fungistatic versus fungicidal activity, yeasts (10^4) were incubated with 0.36 µM JBU or buffer for 24 h at 28 °C. Then 10-fold serial dilutions of the incubated yeasts were made in fresh Sabouraud medium and plated in Sabouraud agar. The number of CFU in the 10^6 -fold dilution after 24 h at 28 °C was determined under a microscope.

2.9.2. Filamentous fungi

The fungi were grown for 14 d on PDA at 28 °C. To obtain the spores, 5 mL of sterile saline were added to each Petri dish and the colonies gently washed with the tip of a pipette. To evaluate the hyphal growth, the experiment was made according to [7]. The spore suspension (1×10^6 spores per mL) was inoculated into 96 well plates containing potato dextrose broth (PDB), incubated at 28 °C for 16 h, and then the test samples (up to 80 µL) were added. The final volume in each well was 200 µL. The dialysis buffer (Tris 10 mM pH 6.5) was used as negative control and 0.1% hydrogen peroxide (H_2O_2), as a positive control. The plates were incubated at 28 °C and monitored turbidimetrically at 620 nm at 12 h intervals for 96 h. Alternatively, spores were incubated with the samples for 96 h at 28 °C and then germination was monitored by turbidity.

The tests were performed in triplicate and data presented as means and standard deviations.

2.9.3. Inhibition of glucose-stimulated acidification

Glucose-stimulated acidification of the medium results from extrusion of H^+ by the cells, through a H^+ -ATPase pump in the plasma membrane [18]. We evaluated the effects of JBU and peptide(s) on this metabolic activity of *S. cerevisiae* and *C. albicans*, as described in [34]. Yeast cells were grown in Sabouraud agar medium for 48 h at 30 °C and then each plate was washed with 4 mL of Sabouraud medium to collect the cells. 8 µL of this suspension was added to 200 mL of liquid medium and incubated in a shaker (200 rpm) bath for 16 h at 30 °C. The culture was then centrifuged at 3000 ×g for 5 min at 4 °C, the supernatant was discarded and 20 mL of Milli-Q water was added to the pelleted cells, which were suspended and centrifuged again. This process was repeated three times. Finally the yeast cells were resuspended in 3 mL of Milli-Q water.

Aliquots of 10^7 cells were pre-incubated for 30 min in 800 µL of protein or peptide samples in 10 mM Tris-HCl, pH 6.0 or the dilution buffer alone. After pre-incubation, 200 µL of 500 mM glucose was added to the cells and the medium pH was measured every minute for 30 min. The amount of H^+ released by the cell was calculated as the difference between the initial pH and the final pH (ΔpH), considering the equation $pH = -\log[H^+]$. The values are averages of triplicates for each experiment.

2.9.4. Evaluation of cell permeability

The permeabilization of the plasma membrane was assessed by measuring absorption of SYTOX Green (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) as described by [22]. This dye forms a fluorescent complex with nucleic acids, entering cells when the integrity of their plasma membrane is compromised. Fungal cells were incubated with different concentrations of the test samples for 24 h and then exposed to 0.2 µM SYTOX Green for 30 min at room temperature. The cells were observed under a microscope (Axioskop 40 – Zeiss) equipped with a filter for fluorescein detection (excitation wavelength 450–490 nm and emission 500 nm).

2.9.5. Viability and metabolic activity

Fluorescent probes (LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit – Invitrogen, Grand Island, NY, USA) were used to evaluate the viability and metabolic activity of yeasts in the presence of test samples. The yeast cells were grown overnight (16 h) in Sabouraud medium at 28 °C in the presence of either JBU, Jaburetox, dialysis buffer, or H₂O₂, and then centrifuged (3000 × g, 10 min) to remove the medium. Yeasts were suspended in buffer GH (2% D-(+) glucose, 10 mM Na-HEPES, pH 7.2) and then 1 μM of FUN-1 and 12.5 μM of calcofluor were added. After more 2 h of incubation at 28 °C, the cells were viewed under a fluorescence microscope (Axioskop 40 – Zeiss) equipped with filters for different wavelengths to allow visualization of fluorescein (green), rhodamine (red) and DAPI (blue).

Alternatively, cells were grown overnight in Sabouraud medium at 28 °C in the absence of test samples, followed by centrifugation to remove the medium. Yeasts were suspended in buffer GH (2% D-(+) glucose, 10 mM Na⁺-HEPES, pH 7.2). 100 μL of cell suspension were mixed with the samples JBU, Jaburetox, dialysis buffer, or H₂O₂, and maintained for 2 h at 28 °C. Then, 1 μM of FUN-1 and 12.5 μM of calcofluor were added and after 2 h at 28 °C, the cells were viewed under the microscope Axioskop 40 – Zeiss with different filters, as described above.

2.9.6. Statistical analysis

All experiments were run in triplicates. Data were evaluated using “one-way” ANOVA followed by the *t* test of Bonferroni or Dunnett. A *p* < 0.05 was considered statistically significant. All analyzes were performed using GraphPad Prism software (version 3.0 for Windows).

3. Results

3.1. Antifungal activity of JBU against yeast

The activity of JBU was evaluated on six different species of yeasts: *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *P. membranifaciens* and *K. marxianus* (Fig. 1).

JBU inhibited the growth of *C. tropicalis* (Fig. 1A) and of *P. membranifaciens* (Fig. 1C) at the lower dose tested – 0.18 μM. For the other yeasts, such as *K. marxianus* (Fig. 1B), the cell culture became more turbid than the control culture in the presence of JBU up to 0.72 μM, suggesting increased growth and lack of effect antifungal effect. In contrast, the determination of colony forming units of the treated yeasts indicated a fungicidal effect upon all species after 24 h of exposure to 0.36 μM JBU (Fig. 2).

Enzyme-inactivated JBU (after treatment with the irreversible active site inhibitor p-hydroxy-mercurybenzoate) retained its fungitoxic effect on *P. membranifaciens* (Fig. 1C), demonstrating that the antifungal effect of JBU on yeasts is independent of its enzymatic activity. Similarly, we have previously reported that the antifungal effect of JBU on filamentous fungi is not dependent on its enzymatic activity [7].

The ability of the JBU to permeabilize yeast membranes was studied with SYTOX Green, a fluorescent label with affinity for nucleic acids. After incubation of *C. tropicalis*, *P. membranifaciens*, *K. marxianus* and *C. parapsilosis* cells with JBU, the dye was added to the culture and maintained for 10 min under shaking at room temperature. All JBU-treated yeasts showed higher fluorescence when compared to controls, indicating permeabilization of cells, particularly associated to the formation of pseudohyphae in *C. tropicalis* (Fig. 3, panels B and C), *P. membranifaciens* and *K. marxianus*. Cell viability of JBU-treated *S. cerevisiae* was assessed using the LIVE/DEAD kit (Invitrogen) (Fig. 4). The fluorescent label FUN-1 indicates viable and metabolically active cells by formation of red fluorescent cylindrical intravacuolar structures (CIVs). Cells were

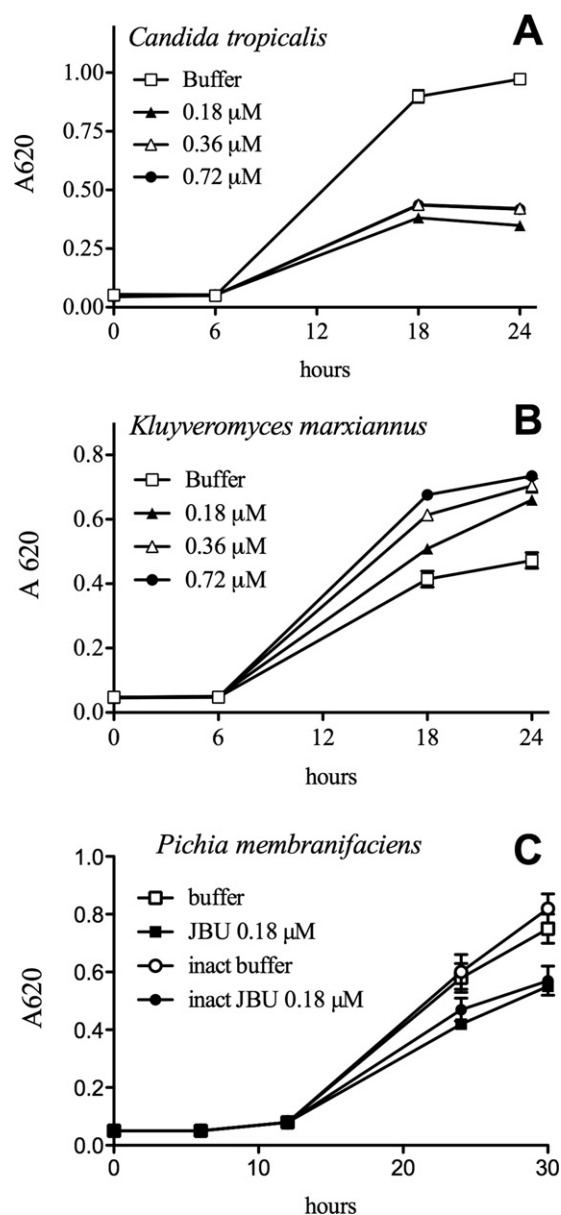


Fig. 1. Turbidimetric assay of *C. tropicalis* (panel A) and *K. marxianus* (panel B) cells grown in the presence of different concentrations of JBU. In panel C, *P. membranifaciens* cells were exposed to native JBU or enzyme-inactivated JBU (inact JBU), after treatment with p-hydroxy-mercurybenzoate. Cells (10^4) in Sabouraud medium were incubated with the samples at 30 °C for 30 h and the absorbance of the culture was measured every 6 h. Each point represents the mean \pm sd of triplicated points.

incubated with JBU and/or buffer for 2 h at 28 °C and then incubated with the fluorescent probes for 1 h. Control viable cells formed CIVs (Fig. 4, panels F and H), indicative of active metabolism. On the other hand, most cells treated with JBU showed a diffuse red/green fluorescence indicating lack of metabolic activity (Fig. 4, panel B and C), although cell walls are preserved (Fig. 4, panel D).

H⁺-ATPase plasma membrane plays an essential role in the physiology of fungal cell. Interference in its function by classical antagonists leads to cell death [18,42]. Here, the effect (direct or indirect) of JBU on the activity of H⁺-ATPase was evaluated by monitoring the glucose-stimulated medium acidification by *S. cerevisiae* and *C. albicans*. Cells were pre-incubated in buffer with samples for 30 min, then glucose was added and the pH was measured at 1 min intervals during 30 min. As shown in Fig. 5, JBU (0.09 μM) inhibited

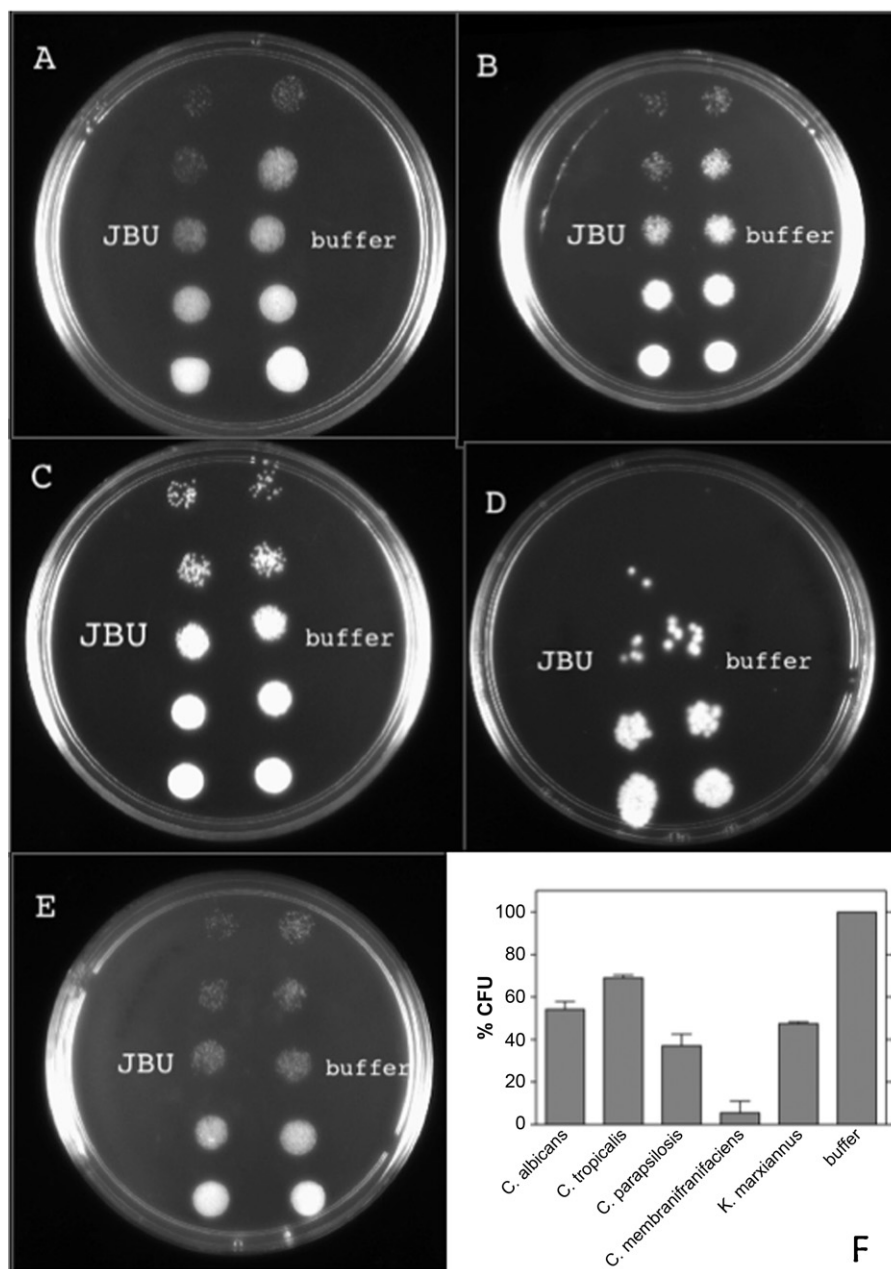


Fig. 2. Colony forming unit assay of yeasts after 24 h exposition to 0.36 μ M JBU or buffer. Treated cells were 10-fold serial diluted in fresh Sabouraud medium and 10 μ L of each dilution was plated and CFUs were counted after 24 h at 28 °C. Panels: (A) *C. albicans*; (B) *C. parapsilosis*; (C) *C. tropicalis*; (D) *P. membranifaciens*; (E) *K. marxianus*. Typical results are shown. In panel D, colony forming units of the yeasts were counted in the 10⁶-fold dilution. The number of CFUs of control cells (buffer) was taken as 100%. Mean of two experiments.

the acidification produced by *S. cerevisiae* and *C. albicans* cells by 92% and 95%, respectively.

3.2. Homology of urease with antifungal plant proteins – identification of putative antifungal domains

Alignments of the sequences of ureases revealed the presence of homologous regions with plant antifungal proteins, such as pea defensins, phasein A (a chitinase of *Phaseolus vulgaris* cv. *chick*), thaumatin and antifungal peroxidases [28] (Supplemental Figs. 1 and 2).

Although the degree of homology of ureases with these antifungal proteins is not high, it is noteworthy the fact that most of the homologous regions are close to each other, located in the alpha

domain of JBU. This observation motivated the search of a putative antifungal domain in JBU.

3.3. Antifungal peptides derived from JBU

In a similar approach previously used to identify the insecticidal domain of *C. ensiformis* ureases [11,15,40], we tested different proteolytic enzymes (chymotrypsin, pepsin, trypsin and papain) for their ability to hydrolyze JBU producing antifungal peptide(s). Among the enzymes tested, papain hydrolyzed JBU generating fungitoxic fragment(s) after 2 h at 37 °C, pH 6.5, at an 1:10 enzyme/substrate ratio. Besides yeasts, JBU-derived peptides obtained by papain hydrolysis were also active against *Mucor* sp. and *F. oxysporum*, being more potent than the native protein (Fig. 6, panels A–D). Tryptic peptides derived from JBU were also

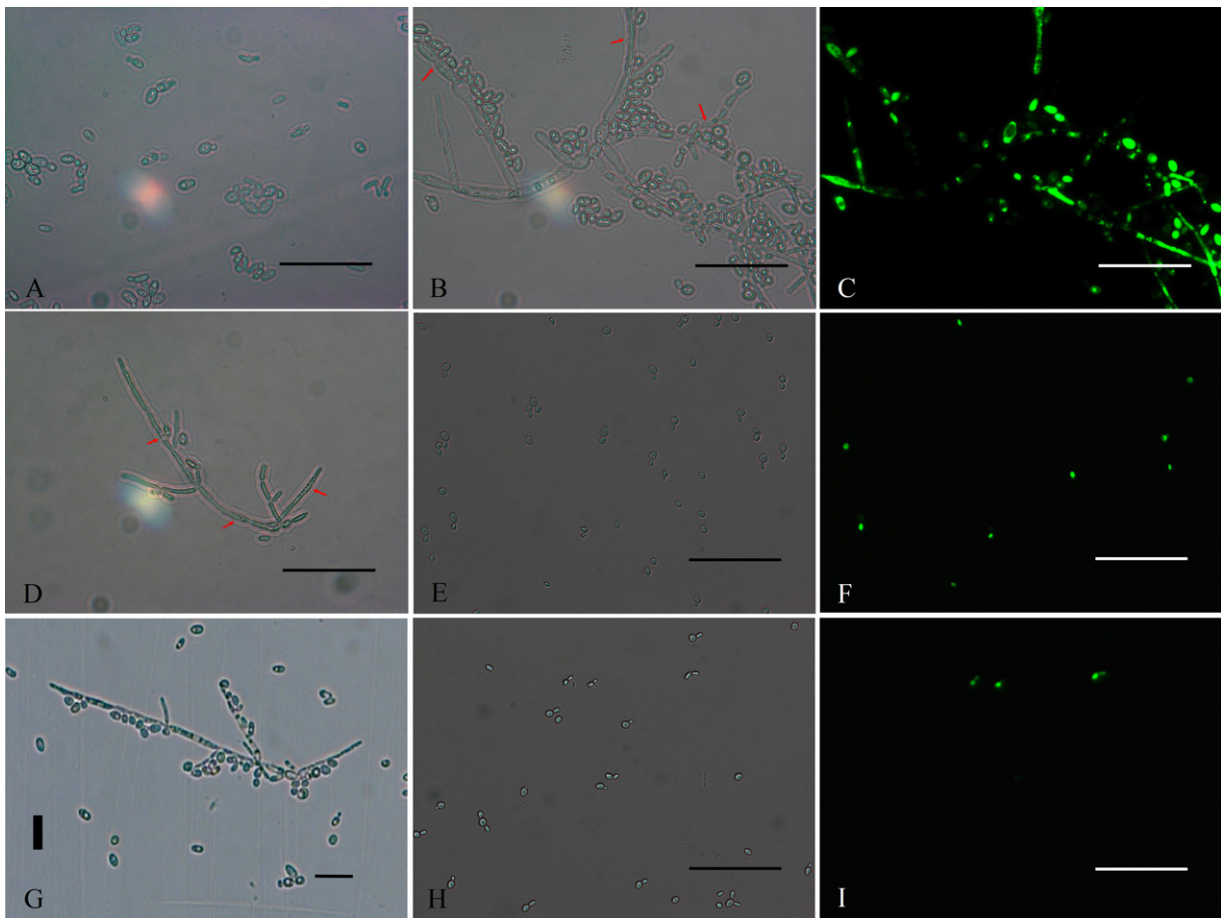


Fig. 3. (Panel A–D) JBU disrupts cell permeability and alters morphology in yeasts. *C. tropicalis* cells were grown at 28 °C for 24 h in the presence of 10 mM Tris pH 7.0 (A), 0.36 μM of JBU (B and C) and 0.1% H₂O₂ (D). SYTOX Green (C). Vacuoles (red arrows) can be seen within pseudohyphae cells in (B) and (D). (Panels E–I) Membrane permeabilization and change in morphology induced by Jaburetox in yeasts. *S. cerevisiae* cells were treated with 0.72 μM of Jaburetox (E and F) or buffer (H and I) for 24 h and the incubated with 0.2 μM of SYTOX Green (F and I). (E and H): bright field, (F and I): fluorescence. (Panel G) *C. tropicalis* cells were grown in the presence of 0.36 μM of Jaburetox at 28 °C for 24 h. Bars correspond to 50 μm in the panels A–D; 100 μm in the panels E, F, H and I; 20 μm in the panel G. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

fungitoxic, however trypsin alone or products of its auto hydrolysis also presented inhibitory activity to some fungi, such as *Mucor* sp. without inhibiting others, like *F. oxysporum*.

3.4. Analysis of JBU fractions hydrolyzed with papain

JBU samples hydrolyzed by papain were analyzed by SDS-PAGE in Tricine buffer, showing the disappearance of the JBU (~100 kDa) band and the presence of smaller bands, particularly in the 10 kDa region (Fig. 6, panel E).

Starting from 1 mg of JBU, the papain-hydrolyzed fraction containing peptides smaller than 10 kDa was desalted, lyophilized and analyzed to liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Five peptides, corresponding to 7.1% sequence coverage of JBU (Table 1), were identified. The sequences of these peptides within JBU are highlighted in Supplemental Fig. 3. Interestingly, none of the peptides found matched any of the JBU regions that are homologous to the plant antifungal proteins shown in Supplemental Fig. 2, or showed homology to any other known antifungal proteins. No results were found searching these peptides against the Antimicrobial Peptide Database (APD2) [43]. Among the peptides identified, one (sequence in italics in Table 1) contained a partial sequence of the entomotoxic peptide Pepcanatox [29], which displays 10 kDa, similar to the most abundant peptides resulting from JBU hydrolysis by papain (Fig. 6, panel E).

Based on these data, a possible antifungal activity of a recombinant peptide equivalent to Pepcanatox [10] was evaluated. The peptide used in this study, named Jaburetox, contains the same 93 amino acids sequence derived from JBU (shown in Supplemental Fig. 3, panel B) present in Jaburetox-2Ec [27], and a poly-histidine tail, but lacking the V5 epitope of viral origin (A. H. S. Martinelli, PhD thesis).

3.5. Fungitoxic tests with Jaburetox

3.5.1. Filamentous fungi

The fungitoxic activity of Jaburetox was evaluated on germination and growth of *Penicillium herguei*, *Mucor* sp. and *R solani*, as shown in Fig. 6, panels F–H. *Mucor* sp. showed the highest

Table 1

Identification by mass spectrometry of peptides (fraction <10 kDa) obtained by hydrolyzing JBU with papain.

Condition	Coverage sequence	Peptide
JBU + PAPAINE <10 kDa	7.14%	A-AEDVLNDIGAI-S G-KGSSSKPDELHEIHK-A G-KGSSSKPDELHEIHKAG-A N-IHTDTLNEAGFVE-H <i>S-IEGNKVIIRGNAIADGPVN-E^a</i>

^a The five last amino acids corresponds to the N-terminal of Jaburetox-2Ec [27].

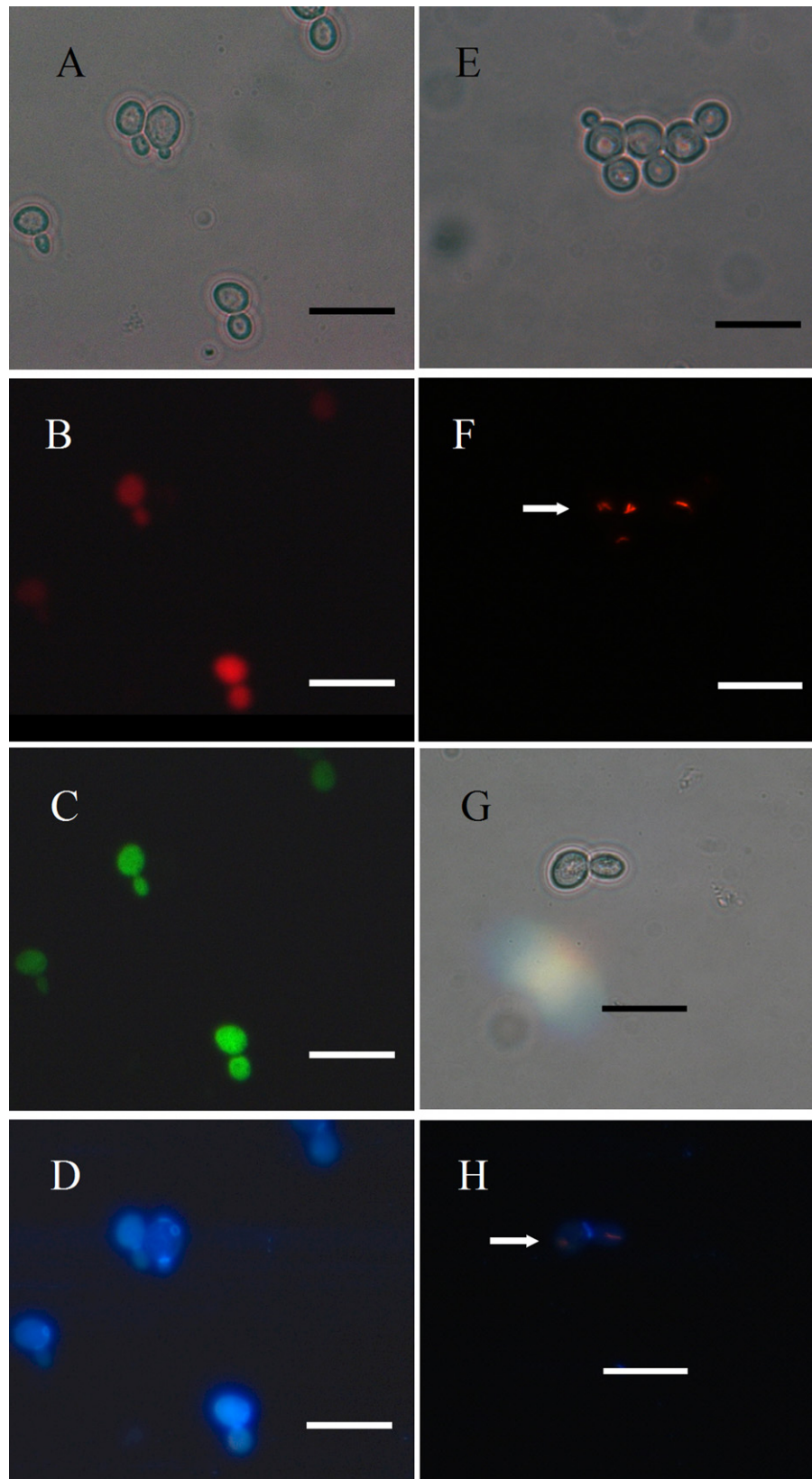


Fig. 4. Metabolic activity assay using the fluorescent probes, FUN-1 and CalcoFluorWhite. *S. cerevisiae* cells were incubated for 2 h at 28 °C in the presence of 10 mM Tris pH 7.0 (E–H), or 0.36 μ M of JBU (A–D). After this period 1 μ M of FUN-1 and 12.5 μ M de CalcoFluorWhite were added and maintained for 1 h at 28 °C. Cells were then visualized under a fluorescence microscope. Panel A is the bright field of panels B–D; E is the bright field of F, and G is the bright field of H. Arrows in F and H point to CIVs (cylindric intracellular vesicles) which are formed by metabolic active cells, while the diffuse red (panel B) or green (panel C) fluorescence indicate lack of metabolic activity. Blue fluorescence shows that cell walls are preserved in JBU-treated cells. Bars correspond to 20 μ m.

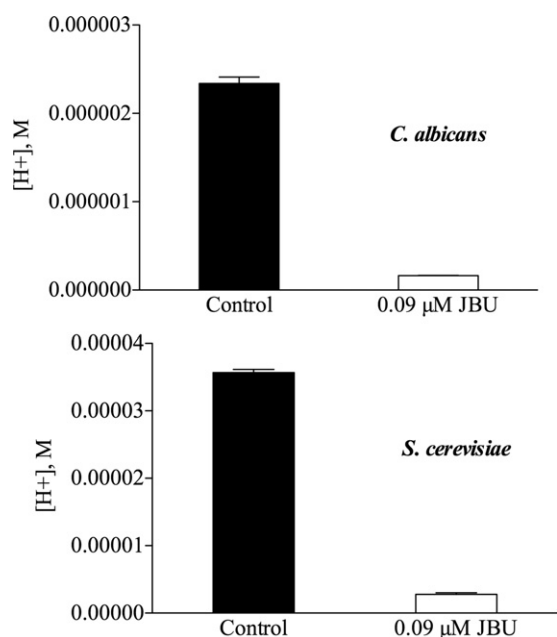


Fig. 5. Effect of JBU on the glucose-stimulated acidification of the medium by *S. cerevisiae* and *C. albicans*. Glucose (100 mM final concentration) was added to the medium 30 min after cells were exposed to 0.09 μM of JBU. The release of H⁺ was measured as variation in the pH during 30 min. The bars represent the average ± sd of triplicated points.

susceptibility, its growth at 48 h being inhibited at the lowest tested dose (10 μM). For *P. herguei*, doses of 20 and 40 μM were inhibitory after 72–96 h, affecting also the production of pigments (data not shown) after hyphae development. In contrast, growth of *R. solani* was not affected at the highest dose of Jaburetox, 40 μM (Fig. 6, panel H).

3.5.2. Yeasts

Jaburetox at 9 μM inhibited the growth of *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *P. membranifaciens* (Fig. 7). The other tested yeasts, *C. tropicalis*, *K. marxianus* and *C. albicans*, were inhibited with 18 μM Jaburetox (not shown). The antifungal effect of Jaburetox did not persist after washing of the treated cells. Additional studies are needed to clarify whether the effect is fungistatic, if the peptide is being hydrolyzed/inactivated, or if the repeated administration of the peptide could lead to the death of the yeasts.

Permeabilization of the plasma membrane by Jaburetox was evaluated in *S. cerevisiae* showing that the treated cells are more permeable to SYTOX Green than controls (Fig. 3, panels E–F and H–I). As observed for the JBU, the peptide also induces morphological changes in yeasts (Fig. 3, panel G). The induction of pseudohyphae in *C. tropicalis* and the membrane permeabilization effect in *S. cerevisiae* occurred at much lower doses (0.36–0.72 μM) than those required to arrest fungi propagation.

4. Discussion

In this work we have shown that, besides filamentous fungi, JBU is also toxic against yeasts. The fungitoxic effects consisted in inhibition of proliferation, induction of morphological alterations with formation of pseudohyphae, changes in transport of H⁺ and in energy metabolism, permeabilization of membranes, eventually leading to cell death.

The antifungal effect of the JBU in yeasts or filamentous fungi [7] is independent of its catalytic activity, since the enzymatically inactivated protein, after treatment with the covalent inhibitor p-hydroxy-mercurybenzoate, maintained its fungitoxic properties.

The generation of antifungal peptides upon proteolysis of urease further reinforce this fact. On the other hand, the presence of intact urease in the supernatant of cultures after 24 h was observed for most yeasts except for *K. marxianus*, which extensively degraded JBU (data not shown). Thus at this point, it is not clear to us whether hydrolysis of JBU by the yeasts is required for expression of its fungicidal effect.

Similar to our observation in filamentous fungi [7], the fungicidal activity of JBU in yeasts is also specie-specific, affecting differently in terms of effective dose and type of toxic effects the six yeast species under study. The antifungal activity of ureases from other sources, such as the soybean urease and *H. pylori* urease, on yeasts should be assessed to give a more comprehensive idea of the antifungal property of ureases in general.

Turbidimetric evaluation of growth curves was not a reliable method to detect the antifungal effect of JBU as in some cases treated cultures became more turbid than controls not exposed to the toxic protein. The fungicidal activity of JBU was demonstrated for all the yeast species by counting colony forming units after incubation with the toxic protein. The lack of correlation between the increase in turbidity of cell cultures and the antifungal effect of JBU is probably consequent to morphological alterations of the treated yeasts, such as increased cell volume, aggregation, formation of hyphae and pseudohyphae, as shown in Fig. 3, panels B and C. Ribeiro et al. [33] reported increased turbidity of yeast cultures in the presence of antifungal proteins homologous to 2S albumins isolated from seeds of *Passiflora edulis f. flavicarpa* and *Capsicum annuum*, and associated this effect to cell agglomeration and formation of pseudohyphae, as visualized by microscopy.

At least part of the antifungal effect is due to permeabilization of membrane cells by JBU and derived peptides. Several plant proteins and peptides have the ability to permeabilize membranes, such as 2S albumins and LTPs [2,32], and defensins, which interfere on ion channels [1]. It has been reported that NaD1, a defensin from *Nicotiana glauca*, permeates the membrane of hyphae and generates ROS [1]. Similarly, JBU also causes changes of cellular permeability in filamentous fungi accompanied by morphological changes, visualized in *P. herguei* by scanning electron microscopy, leading to plasmolysis and cell death [7].

Other studies have shown that both JBU and Jaburetox are capable of inserting themselves into lipid membranes making liposomes leaky and forming ion channels, which can lead to dissipation of ionic gradients essential for maintaining cell homeostasis [5,31]. Additionally, small angle X-ray scattering (SAXS) studies have demonstrated the insertion of JBU into the lipid bilayer of liposome membranes, affecting several physical parameters of the membranes [24].

Exposition to JBU induced the formation of pseudohyphae in *C. tropicalis* (Fig. 3, panel B), *P. membranifaciens* and *K. marxianus* (not shown). In addition, JBU induced alterations in the cytoplasm of pseudohyphae, with the appearance of vacuoles similar to that seen in cells treated with H₂O₂ (Fig. 3, panels B–D – red arrows). Morphogenesis in fungi is determined by the expression of different genes induced by environmental factors. This regulation involves a cyclin specific isoform [8]. In the case of alkaline pH, the route of Rim101 (a transcription regulator) is activated through an “upstream” cascade, which starts at membrane receptors (Rim21 and DG16) [37]. Conditions that affect the cell cycle, such as treatment with hydroxy-urea, which by depleting ribonucleotides inhibits DNA replication, or nocodazol, that disrupts microtubules and blocks mitosis, make the elongated cells unable to divide and may cause the formation of pseudohyphae or hyphae-like cells, which eventually die [8]. Induction of pseudohyphae is described for other antifungal molecules such as PvD1 [22], 2S albumin [33], and peptides of *C. annuunn* [34]. These authors suggest that changes in pH caused by interference of these proteins in the H⁺ flow could be

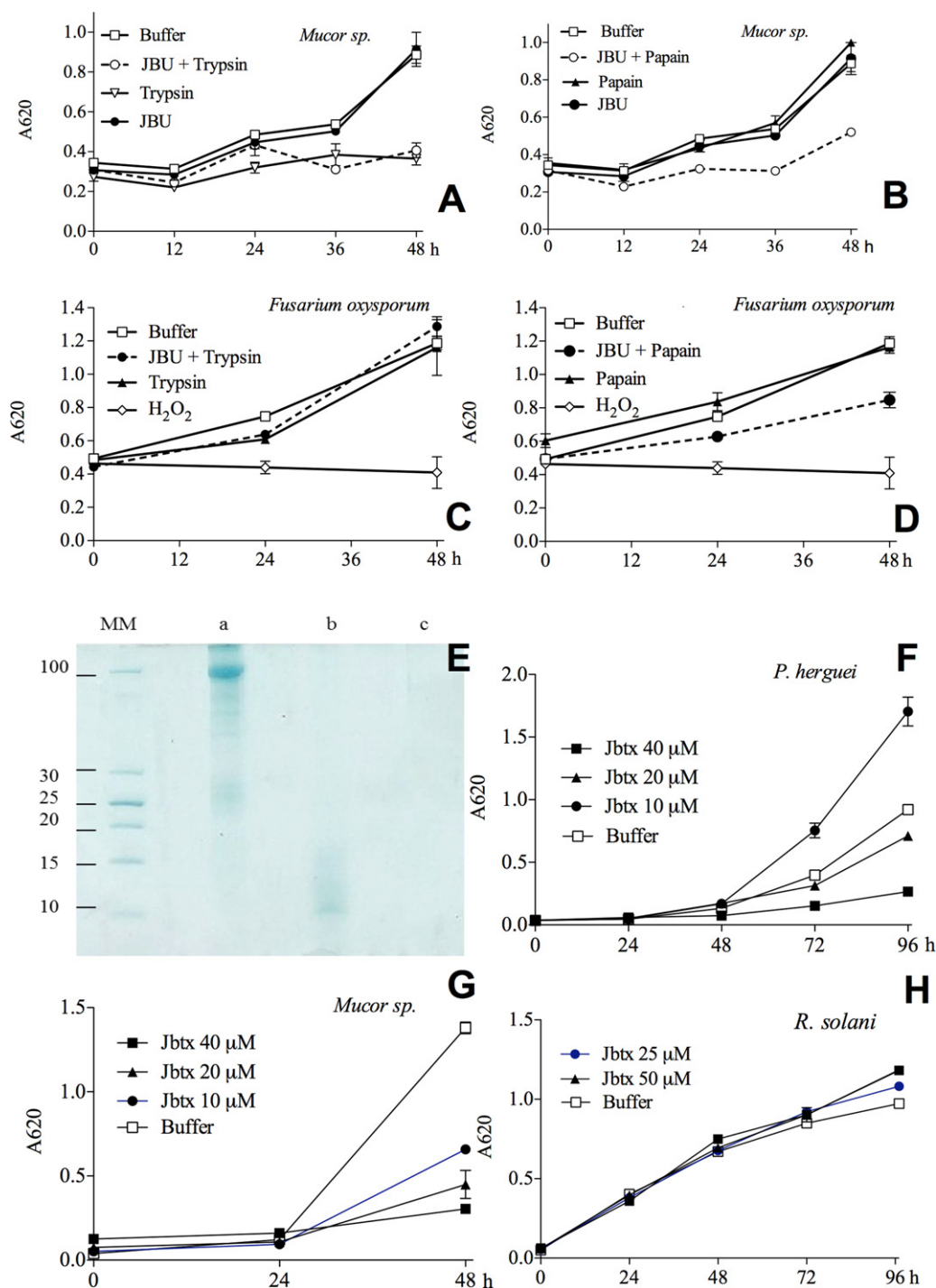


Fig. 6. Effect of urease-derived peptides on the growth of filamentous fungi. (Panels A–D) Growth curves of *Mucor sp.* (A and B) and *F. oxysporum* (C and D) in the presence of native JBU, hydrolyzed JBU, buffer, trypsin, papain and H₂O₂ (positive control). Spores were inoculated into PDB medium in a 96 well plate, incubated at 28 °C for 16 h, and then test samples were added. The plate was incubated at 28 °C and absorbance was read every 24 h. Each point represents mean ± sd of triplicated points. (Panel E) SDS-Tricine PAGE of papain-hydrolyzed JBU. Lanes: (a) = JBU, (b) = JBU hydrolyzed of papain for 2 h, 37 °C, pH 6.5, enzyme: substrate ratio 1:10, (c) = papain. MW = molecular mass markers. The gel was stained with colloidal Coomassie. (Panels F–H) Growth curves of *P. herguei*, *Mucor sp.* and *R. solani* in the presence of different concentrations of the recombinant peptide Jaburetoxin (Jbtx). The 96-well plate was incubated at 28 °C and absorbance at 620 nm was read every 24 h. Each point represents the mean ± sd of triplicated points.

responsible for the morphological variations seen in yeasts. The apparent increased size of yeast cells treated with JBU may reflect the formation of pseudohyphae and considering the increased permeability of these cells (Fig. 3, panels B and C), it may indicate a “terminal phenotype”.

Here we showed that JBU at 0.09 μM affected the carbohydrate metabolism and inhibited by 92% and 95% the glucose-stimulated

medium acidification in *S. cerevisiae* and *C. albicans*, respectively. Inhibition of acidification may be consequent to the membrane permeabilization, leading to dissipation of the H⁺ gradient, as demonstrated for the 2S albumin protein of *P. edulis f. flavicarpa* on cells of *S. cerevisiae* and *C. albicans* [33]. Mello et al. [40], showed that PvD1, a defensin from common bean *Phaseolus vulgaris*, inhibited acidification in *S. cerevisiae* and *Fusarium* species, and ascribed

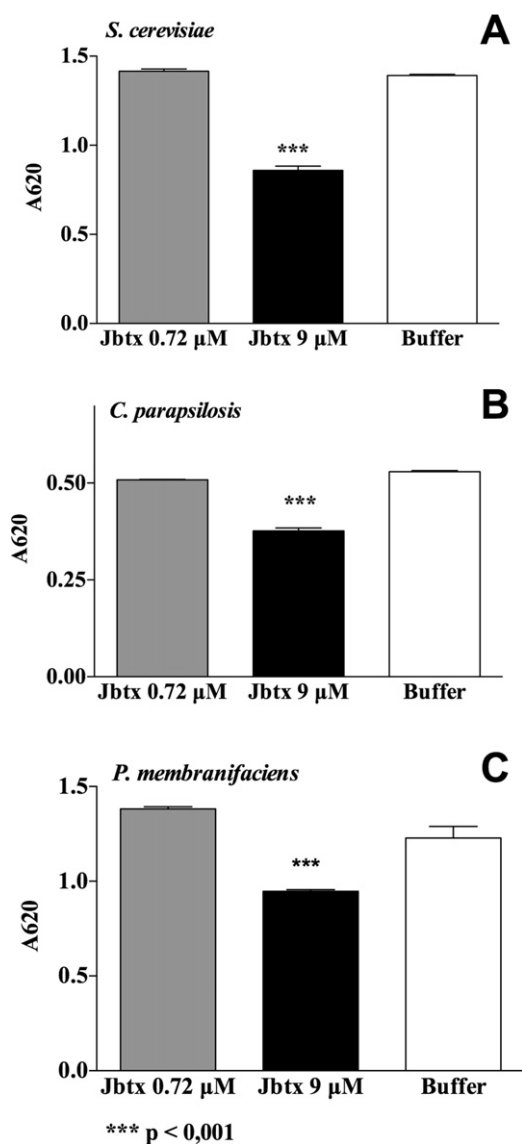


Fig. 7. Growth of *S. cerevisiae*, *C. parapsilosis*, *P. membranifaciens* in the presence of the urease-derived peptide Jaburetox or buffer. The 96 well plate containing the cells was incubated at 28 °C and the absorbance at 620 nm was read after 18 h. Each point represents mean \pm sd of points in triplicates.

this effect to disturbances caused by the protein on the plasma membrane of fungal cells. The plasma membrane H^+ -ATPase has a central role in the physiology of fungi cells and interference on its function by a number of antagonists can lead to cell death [42].

Interference caused by *C. ensiformis* urease isoforms on the activity of ATPases has been previously described. CNTX was shown to uncouple Ca^{2+} transport by the Ca^{2+} Mg^{2+} ATPase in sarcoplasmic reticulum vesicles [4]. Inhibition of a V-type H^+ ATPase in the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* by the JBU-derived peptide Jaburetox-2Ec was reported [39].

JBU-treated *S. cerevisiae* cells failed to form cylindrical intravacuolar structures (CIVs) in the presence of the FUN-1 fluorescent probe (Fig. 4, panels B and C). The formation of CIVs involves the transport of FUN-1 ([2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-iodide-phenylquinolinium]) molecules to the vacuole, an ATP dependent process which is inhibited by sodium azide or when the H^+ gradient across the mitochondrial membrane is disrupted [25]. Metabolically active cells, growing in aerobic or anaerobic conditions, form CIVs,

visualized as red-orange fluorescent cylinders inside the cells. Cells treated with JBU showed a diffuse fluorescence in cytosol. According to the manufacturer, this staining pattern indicates cells with intact membranes, but metabolically compromised. There was no change in the staining of Calcofluor White M2R (which labels the cell wall) in cells treated with JBU as compared to controls, indicating the integrity of cell walls after a 2 h treatment (Fig. 4, panel D). These data show that 2 h exposure of *S. cerevisiae* to JBU interferes on the energy metabolism of the cells, with no visible changes in membrane permeability. As the exposure of *C. tropicalis* (Fig. 3, panel C), *P. membranifaciens*, *C. parapsilosis* and *K. marxianus* cells to JBU for 24 h caused membrane permeabilization, monitoring of JBU-treated *S. cerevisiae* for a longer time is required to evaluate if progression of antifungal effect would eventually lead to cell death.

Hydrolysis of JBU with papain produced fungitoxic peptides smaller than 10 kDa. Five of these peptides were identified by mass spectrometry and none of them match putative antifungal domains of JBU homologous to other plant antifungal proteins. At this point, two possibilities should be considered: these peptides are not associated with antifungal(s) domain(s) of JBU, or the JBU antifungal(s) domain(s) are unlike any other fungitoxic proteins already known.

One of these peptides contained part of the N-terminal sequence of the insecticidal peptide Jaburetox-2Ec. Becker-Ritt et al. [7], reported that Jaburetox-2Ec did not affect the micellar growth of phytopathogenic fungi, including that *P. hergueli*. In that study, the peptide was added to the medium at a lower dose (0.57 μM), after 16 h of culture, at a later stage of germination of the spores. Here, Jaburetox was added simultaneously with the spores, leading to inhibition of germination and growth, and delaying development of hyphae. This result indicates that besides its insecticidal activity, this internal peptide of *C. ensiformis* urease is also antifungal, affecting the early stages of development of the mycelium, a step also susceptible to ureases [7]. The variations in methodology used in the two studies may have influenced the different results obtained. The time course and characteristics of the fungitoxic effects indicated similar antifungal mechanisms for JBU and Jaburetox, probably based on the ability of these polypeptides to insert in membranes, altering the cell permeability.

The antifungal activity of Jaburetox on yeasts required 2–3 times larger doses as compared to the holoprotein JBU, indicating the possibility that other protein domains are involved in this activity. Becker-Ritt et al. reported the antifungal activity of the two-chained urease from *H. pylori*. Bacterial ureases lack part of the amino acid sequence (the N-terminal half) of Jaburetox, which in single-chained plant ureases corresponds to a linker region between bacterial subunits. This fact strongly suggests that other antifungal domain(s) besides the region corresponding to the entomotoxic domain are present in ureases.

The discovery of new antifungal agents becomes increasingly important due to the increasing number of cases of invasive mycoses. JBU, a protein with multiple functions and peptides derivatives may represent a new alternative to control clinically important and phytopathogenic fungi, especially considering their potent activity in the 10^{-6} – 10^{-7} M range. Structure versus activity studies deepening the identification of protein domains and the construction of biologically active recombinant peptides containing these domains are some of steps toward unraveling the real fungicidal/fungistatic potential of ureases and derived peptides.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Financiadora de Estudos e Projetos–FINEP.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010>.

References

- [1] Aerts AM, Francois IE, Meert EM, Li QT, Cammue BP, Thevissen K. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007;13:243–7.
- [2] Agizzio AP, Carvalho AO, Ribeiro Sde F, Machado OL, Alves EW, Okorokov LA, et al. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Arch Biochem Biophys* 2003;416:188–95.
- [3] Ajesh K, Sreejith K. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections. *Peptides* 2009;30:999–1006.
- [4] Alves EW, Ferreira AT, Ferreira CT, Carlini CR. Effects of canatoxin on the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum membranes. *Toxicol* 1992;30:1411–8.
- [5] Barros PR, Stassen H, Freitas MS, Carlini CR, Nascimento MAC, Follmer C. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. *Biochim Biophys Acta-Proteins Proteomics* 2009;1794:1848–54.
- [6] Becker-Ritt AB, Carlini CR. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. *Biopolymers (Pept Sci)* 2012;98:367–84.
- [7] Becker-Ritt AB, Martinelli AH, Mitidieri S, Feder V, Wassermann GE, Santi L, et al. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicol* 2007;50:971–83.
- [8] Berman J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:595–601.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [10] Carlini CR, Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits ME. Peptídeo Entomotóxico da Canatoxina: Processo de Produção. Patent: DEINPI-RS; 2000.
- [11] 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 cathepsinlike enzymes. *J Econ Entomol* 1997;90:340–8.
- [12] Carlini CR, Polacco JC. Toxic properties of urease. *Crop Sci* 2008;48:1665–72.
- [13] Carter EL, Flugga N, Boer JL, Mulrooney SB, Hausinger RP. Interplay of metal ions and urease. *Metallomics* 2009;1:207–21.
- [14] De Lucca AJ, Cleveland TE, Wedge DE. Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Can J Microbiol* 2005;51:1001–14.
- [15] Ferreira-DaSilva CT, Gombarovits ME, Masuda H, Oliveira CM, Carlini CR. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol* 2000;44:162–71.
- [16] Follmer C. Insights into the role and structure of plant ureases. *Phytochemistry* 2008;69:18–28.
- [17] Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja-Fidalgo C, et al. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J* 2001;360:217–24.
- [18] Gomes VM, Okorokov LA, Sales MP, Fernandes KVS, Rose TL, Xavier J. Vicilin storage proteins inhibit yeast growth and glucose stimulated acidification of the medium by cells. *Folia Microbiol* 1997;42:224.
- [19] Henikoff S, Henikoff JG. Amino-acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10915–9.
- [20] Krajewska B, Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. *J Mol Catal B-Enzym* 2009;59:9–21.
- [21] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947–8.
- [22] Mello EO, Ribeiro SFF, Carvalho AO, Santos IS, Da Cunha M, Santa-Catarina C, et al. Antifungal activity of PvD1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. *Curr Microbiol* 2011;62:1209–17.
- [23] Menegassi A, Wassermann GE, Oliveira-Severo D, Becker-Ritt AB, Martinelli AH, Feder V, et al. Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. *J Agric Food Chem* 2008;56:4399–405.
- [24] Micheletto YS. Estudo físico-químico da interação da urease de jack bean com lipossomas miméticos de plaquetas humanas. M.Sc. dissertation. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
- [25] Millard PJ, Roth BL, Thi HP, Yue ST, Haugland RP. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:2897–905.
- [26] Mulinari F, Becker-Ritt AB, Demartini DR, Ligabue-Braun R, Staniscuaski F, Verli H, et al. Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. *Biochim Biophys Acta* 2011;1814:1758–68.
- [27] Mulinari F, Staniscuaski F, Bertholdo-Vargas LR, Postal M, Oliveira-Neto OB, Rigden DJ, et al. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 2007;28:2042–50.
- [28] Ng TB. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides* 2004;25:1215–22.
- [29] Oliveira AEA, Gomes VM, Sales MP, Fernandes KVS, Carlini CR, Xavier-Filho J. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC.] canatoxin to plant pathogenic fungi. *Rev Bras Biol* 1999;59:59–62.
- [30] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605–12.
- [31] Piovesan AR. Urease de *Canavalia ensiformis*: processamento diferencial por ninfas e adultos de *Dysdercus peruvianus* e formação de canal in vitro. M.Sc. dissertation. Porto Alegre, RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
- [32] Regente MC, Giudici AM, Villalain J, de la Canal L. The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Lett Appl Microbiol* 2005;40:183–9.
- [33] Ribeiro SF, Taveira GB, Carvalho AO, Dias GB, Da Cunha M, Santa-Catarina C, et al. Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi. *Protein J* 2012;31:59–67.
- [34] Ribeiro SFF, Carvalho AO, Da Cunha M, Rodrigues R, Cruz LP, Melo VMM, et al. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicol* 2007;50:600–11.
- [35] Rodrigues AM, Theodoro PN, Eparvier V, Basset C, Silva MR, Beauchene J, et al. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. *J Nat Prod* 2010;73:1706–7.
- [36] Schagger H, Vonjagow G. Tricine sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-kDa to 100-kDa. *Anal Biochem* 1987;166:368–79.
- [37] Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75:213–67.
- [38] Sirko A, Brodzik R. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol* 2000;47:1189–95.
- [39] Staniscuaski F, Brugge VT, Carlini CR, Orchard I. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J Insect Physiol* 2009;55:255–63.
- [40] Staniscuaski F, Carlini CR. Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. *Toxins* 2012;4:55–67.
- [41] Sumner JB. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J Biol Chem* 1926;69:435–41.
- [42] Toulmay A, Schneider R. Lipid-dependent surface transport of the proton pumping ATPase: a model to study plasma membrane biogenesis in yeast. *Biochimie* 2007;89:249–54.
- [43] Wang G, Li X, Wang Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D933–7.
- [44] Wiebke-Strohm B, Pasquali G, Margis-Pinheiro M, Bencke M, Bucker-Neto L, Becker-Ritt AB, et al. Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi. *Plant Mol Biol* 2012;79:75–87.