

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**DARLENE LOPES RANGEL**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO E AVALIAÇÃO  
DO EFEITO DE UM PEPTÍDEO TÓXICO EM *Drosophila melanogaster***

**São Gabriel  
2017**

**DARLENE LOPES RANGEL**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO E AVALIAÇÃO  
DO EFEITO DE UM PEPTÍDEO TÓXICO EM *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Paulo Marcos Pinto

**São Gabriel  
2017**

R196d Rangel, Darlene Lopes

DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO E  
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM PEPTÍDEO TÓXICO EM *Drosophila*  
*melanogaster* / Darlene Lopes Rangel.

46 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2017.

"Orientação: Paulo Marcos Pinto".

1. Mosca da fruta . 2. Urease. 3. Jaburetox. I. Título.

**DARLENE LOPES RANGEL**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO QUIMICAMENTE DEFINIDO E  
AVALIAÇÃO DO EFEITO DE UM PEPTÍDEO TÓXICO EM *Drosophila  
melanogaster***

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação *Stricto  
Sensu* em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Pampa,  
como requisito parcial para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências  
Biológicas

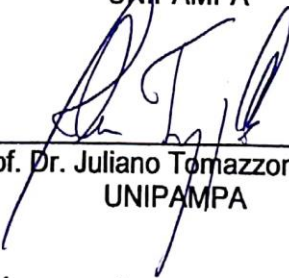
Orientador: Paulo Marcos Pinto

Banca examinadora:



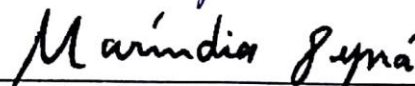
---

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto  
Orientador  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
UNIPAMPA



---

Prof. Dra. Maríndia Deprá  
(UFRGS)

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional e por nunca duvidarem que eu conseguiria.

## AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Sergio e Roselaine, que sempre me apoiaram e me permitirem ser quem eu quisesse ser, que nunca duvidaram que eu conseguiria.

Ao Alesson, pelo imenso companheirismo, todos os shows, todos os discos escutados e todas as sessões extraordinárias da família Rangel as 19h.

Ao professor Paulo, que me deu a oportunidade para todo o meu crescimento acadêmico e por todo o conhecimento passado.

A Evelise, por todas as conversas no laboratório e fora dele e por estar sempre pronta para me ajudar.

A Maria Eduarda, que se mostrou uma ótima amiga, nunca recusando uma festa ou um trago, a pessoa que demonstrou ter a personalidade muito mais parecida com a minha do que eu esperava, que está sempre pronta para tudo, que mesmo perdendo a placa ainda acha que a viagem foi o máximo, esse é o espírito.

A Thalita, por todos os mates no sábado ou domingo à tardinha, por todos os crepes, todas as discussões que nunca enfraqueceram a nossa amizade, a toda a convivência com todas as nossas inúmeras diferenças, as quais aprendemos a respeitar.

A todos que de alguma forma contribuíram para tornar, principalmente esses últimos dias, um pouco mais leves.

As palavras são poucas porque acredito que as palavras são o modo mais supérfluo de agradecer, mas fica aqui registrado a minha gratidão.

Aqui estão os loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os que fogem do padrão. Aqueles que veem as coisas de um jeito diferente. Eles não se adaptam às regras, nem respeitam o status quo. Você pode citá-los ou achá-los desagradáveis, glorificá-los ou desprezá-los. Mas a única coisa que você não pode fazer é ignorá-los. Porque eles mudam as coisas. Eles empurram adiante a raça humana. E enquanto alguns os veem como loucos, nós os vemos como gênios. Porque as pessoas que são loucas o bastante para pensarem que podem mudar o mundo são as únicas que realmente podem fazê-lo”.

Jack Kerouac

## RESUMO

Ureases são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono e estão envolvidas na biodisponibilidade de nitrogênio e em mecanismos de defesa contra predadores e patógenos em plantas. Estão presentes em plantas, fungos e bactérias, mas não são sintetizadas por animais. *Canavalia ensiformis*, uma leguminosa, apresenta três isoformas de ureases: JBURE-I, JBURE-II e CNTX, sendo JBURE-I ou somente JBU (jack bean urease) a mais abundante. A atividade inseticida de JBU depende da liberação de um peptídeo - Jaburetox (JBTX) - cuja quebra é realizada por enzimas catepsinas dos insetos. JBTX apresenta efeitos fungitóxicos, entomotóxicos, neurotóxicos e antimicrobiano. A toxicidade de JBTX foi descrita para insetos das ordens Lepidoptera, Blattodea e Hemiptera, cujo efeito neurotóxico se dá pela ligação do peptídeo a células neuronais, aumentando a atividade de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase e inibindo a óxido nítrico sintase. Também é relatado que JBTX atua sobre os túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, inibindo a diurese por alterações nos níveis de cGMP e no potencial transmembrana. Contudo, investigações acerca da toxicidade em *Drosophila melanogaster* inexistem na literatura. *D. melanogaster*, popularmente conhecida como mosca da fruta, é um organismo modelo por quase um século, apresentando uma gama de vantagens como ciclo de vida curto, baixo custo de manutenção, facilidade de manuseio, além de ter seu genoma sequenciado e suas proteínas anotadas, viabilizando abordagens proteômicas. Neste trabalho objetivamos estabelecer um meio quimicamente definido, bem como eleger qual o melhor aditivo para uma maior taxa de oviposição. Também objetivamos investigar como o JBTX age no sistema nervoso central de larvas de *D. melanogaster*. O meio quimicamente definido que possibilitou o total desenvolvimento das moscas foi o meio composto apenas de ágar, sacarose, fermento e metilparabeno, que nutriu as larvas de *D. melanogaster* até estas atingirem o estágio adulto. O aditivo com a melhor taxa de oviposição foi o etanol (5%), apresentando aproximadamente 700 ovos, diferentemente do controle que apresentou aproximadamente 500 ovos e do ácido propiônico (1%) com aproximadamente 200 ovos, demonstrando assim que um aditivo mais semelhante ao habitat natural de oviposição é mais atrativo. Eletroforese unidimensional foi realizada para a visualização de mudanças significativas no perfil eletroforético do sistema nervoso central de larvas de *D.*



*melanogaster* sobre a ação do JBTX, porém devido a uma eletroforese aberrante, não foram possíveis análises quantitativas ou qualitativa das proteínas, porém foi possível a visualizar a presença de proteínas no gel.

Palavras chave: Eletroforese, mosca da fruta, ureases, Jaburetox

## ABSTRACT

Ureases are nickel-dependent enzymes that catalyze the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide and are involved in the bioavailability of nitrogen and in defense mechanisms against predators and pathogens in plants. They are present in plant, fungi and bacteria, but are not synthesized by animals. *Canavalia ensiformis*, a leguminous plant, have three urease isoforms: JBURE-I, JBURE-II and CNTX, being JBURE-I or just JBU the most abundant. The insecticidal activity of JBU depends on the release of a peptide – Jaburetox (JBTX) – that is cleaved by the insects cathepsins enzymes. JBTX have fungitoxic, entomotoxic, neurotoxic and antimicrobial effects. The toxicity of JBTX was described for insects of the order Lepidoptera, Blattodea e Hemiptera with the neurotoxic effect is due to the binding of the peptide to neuronal cells, increasing UDP-N-acetylglucosamine activity and inhibiting nitric oxide synthase. It was also related that JBTX acts on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*, inhibiting diuresis by altering the cGMP levels and acting in the transmembrane potential. However, there are no investigations about the toxicity in *Drosophila melanogaster* in the literature. *D. melanogaster* has been a model organism for almost a century, showing a range of advantages such as short life cycle, low maintaining costs, easy to handle, besides having its genome sequenced e its proteins annotated, which makes proteomics approaches viable. In this work, we aimed to establish a chemically defined medium, as well as elect the best additive for a better rate of oviposition. Also, we wanted to investigate how JBTX acts on the central nervous system of *D. melanogaster* larvae. The chemically defined medium that allowed the full development of the flies was the medium composed only of agar, sucrose, yeast and methyl paraben, which fed the larvae of *D. melanogaster* until they reached the adult stage. The additive with the best oviposition rate was ethanol (5%), presenting approximately 700 eggs, unlike the control that presented approximately 500 eggs and propionic acid (1%) with approximately 200 eggs, thus demonstrating that an additive more similar to natural habitat of oviposition is more attractive. One-dimensional electrophoresis was performed to visualize significant changes in the electrophoretic profile of the central nervous system of *D. melanogaster* larvae on the action of JBTX. However, due to an aberrant electrophoresis, no quantitative or qualitative analysis of the proteins was possible. to visualize the presence of proteins in the gel.

Keywords: Electrophoresis, fruit fly, urease, Jaburetox.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das ureases.....	15
Figura 2. <i>C. ensiformis</i> , leguminosa com sementes ricas em urease.....	16
Figura 3. Sobreposição da estrutura da JBU determinada por difração de raios-X e o modelo molecular da JBURE-IIb.....	18
Figura 4. Ilustração da quebra da urease em insetos.....	19
Figura 5. Jaburetox-2Ec, um peptídeo recombinante derivado de urease.....	20
Figura 6. Ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> .....	23
Figura 7. Vista ventral do sistema nervoso central de larval de <i>D. melanogaster</i> em terceiro ínstar de desenvolvimento.....	25
Figura 8. Procedimento de preparação para teste do meio quimicamente definido.....	28
Figura 9. Desenvolvimento de <i>D. melanogaster</i> .....	32
Figura 10. Ovos de <i>D. melanogaster</i> em meios com diferentes químicos.....	33
Figura 11. Produção de Jaburetox-2Ec recombinante.....	35
Figura 12. Perfil eletroforético do sistema nervoso central de <i>D. melanogaster</i> sobre o efeito de Jbtx.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

JBU – *Jack Bean Urease*

SBU – *Soy Bean Urease*

kDa – Quilodalton

JBURE-I – *Jack Bean Urease I*

JBURE-II – *Jack Bean Urease II*

JBURE-III – *Jack Bean Urease III*

CNTX – Canatoxina

JBTX – Jaburetox

Ni - Níquel

Zn – Zinco

DNA – Ácido desoxirribonucleico

cDNA – DNA complementar

SNC – Sistema nervoso central

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

LB – Luria-Bertani

µg - microgramas

mg - miligramas

µL – microlitros

mL – mililitros

µM - micromolar

mM – milimolar

°C – graus Celsius

IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

LC MS/MS – *Liquid Chromatography – Mass spectrometry*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
1.1. Ureases.....	15
1.2. Ureases de plantas.....	16
1.3. Jaburetox, um peptídeo derivado.....	21
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>28</b>
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivo específico.....	28
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
4.1 Manutenção de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	29
4.2 Meio quimicamente definido.....	29
4.3 Teste de oviposição.....	30
4.4 Expressão de Jaburetox-2Ec e eletroforese em gel de poliacrilamida.....	30
4.5 Purificação do Jaburetox utilizando Ni-NTA agarose.....	31
4.6 Teste de exposição das moscas.....	31
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
5.1 Desenvolvimento de um meio quimicamente definido.....	33
5.2 Definição do melhor aditivo para uma maior taxa de oviposição.....	34
5.3 Expressão e purificação de JBTX e teste de exposição contra <i>D. melanogaster</i> .....	35
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Ureases

Ureases são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da ureia a duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (DIXON; GAZZOLA; WATTERS, 1975). Estudos importantes sobre essas enzimas foram de grandes marcos na bioquímica, sendo a ureia, substrato das ureases, a primeira molécula orgânica produzida em laboratório (WÖHLER, 1828). As ureases também foram pioneiras, sendo a urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) a primeira enzima a ser cristalizada, demonstrando assim que enzimas são proteínas e que essas são passíveis de cristalização (SUMNER, 1926). Esta descoberta laureou James B. Sumner com o prêmio Nobel em química em 1946. Estudos com a mesma urease demonstraram pela primeira vez que o níquel possui um papel biológico em organismos vivos (DIXON; GAZZOLA; WATTERS, 1975).

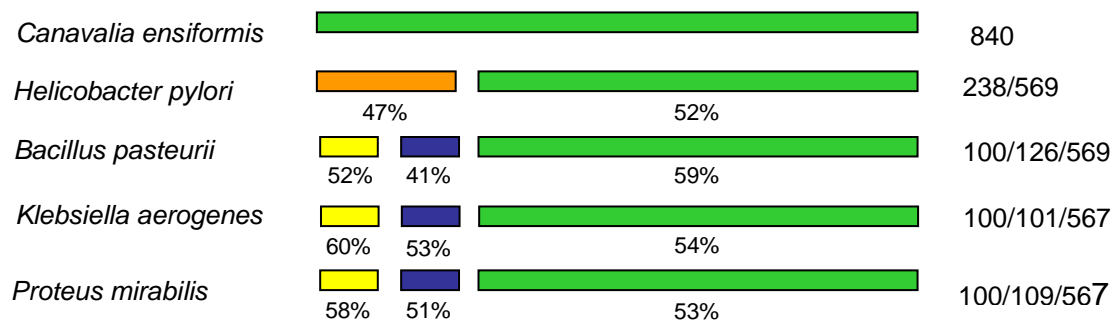
As ureases são sintetizadas por uma variedade de organismos, como plantas, fungos e bactérias, mas não animais (LIGABUE-BRAUN et al., 2013; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER 1995). Ureases de plantas e fungos geralmente são trímeros ou hexâmeros de um único tipo de cadeia polipeptídica com aproximadamente 90 kDa, já as ureases bacterianas são multímeros de duas ou mais subunidades complexas (FOLLMER, 2008; LIGABUE-BRAUN et al., 2013).

Em bactérias, as ureases possuem 2 ou 3 subunidades menores, que se alinham na cadeia polipeptídica única das ureases vegetais, com as quais têm 50-60% identidade de sequência (Figura 1). Independente da fonte, todas as ureases conhecidas compartilham pelo menos 50% de similaridade. Essa similaridade entre os reinos sugere que todas as ureases são variantes da mesma proteína ancestral, podendo possuir estruturas terciárias fortemente conservadas e mecanismos catalíticos similares (KRAJEWSKA, 2009; LIGABUE-BRAUN et al., 2013; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER 1995).

A maior parte das ureases bacterianas caracterizadas até o momento são do tipo (ABC)<sub>3</sub>, como a urease das bactérias patogênicas *Proteus mirabilis* e *Klebsiella*

*aerogene*, 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)<sub>3</sub>. Assim como as ureases vegetais, as enzimas microbianas também são níquel-dependentes (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995).

**Figura 1.** Estrutura das ureases: Ureases vegetais, como a de *C. ensiformis*, são compostas por apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem duas (*H. pylori*) ou três (*K. aerogenes*; *P. mirabilis*; *B. pasteurii*).



Fonte: KRAJEWSKA, 2009

## 1.2. Ureases de plantas

Em plantas, as ureases são encontradas principalmente em leguminosas e curcubitáceas, onde podem estar localizadas em qualquer tecido, mas estando geralmente nas sementes e raízes. O papel desta enzima parece estar relacionado com a reciclagem de nitrogênio, assim como a defesa da planta diante patógenos (SIRKO; BRODZIK, 2000). As ureases de plantas mais bem estudadas são as ureases da soja (*Glycine max* - soybean urease – SBU) e de *C. ensiformes*, popularmente conhecida como feijão de porco (jack bean – JBU).

Atividade ureolítica foi encontrada em todos os tecidos de *G. max* (POLACCO, WINKLER, 1984), que produz duas isoformas de ureases que possuem



87% de similaridade entre si em nível de aminoácidos (TORISKY; POLACCO, 1990). A urease embrio-específica é codificada pelo gene *Eu1* e é sintetizada somente no desenvolvimento embrionário, enquanto a urease que é ubíqua, codificada pelo gene *Eu4*, foi encontrada em todos os tecidos examinados (STEBBINS et al., 1991).

A *C. ensiformis* é uma planta perene, com distribuição pan tropical, com porte de arbusto, crescendo bem em solos pobres (Figura 2). É bastante utilizada na agricultura como cobertura verde para enriquecer o solo de nutrientes. Devido ao seu elevado valor nutricional suas sementes são empregadas na alimentação do gado e suas folhas na alimentação humana. Ela é bastante resistente às variações das condições ambientais, insetos e micro-organismos. Seus principais componentes biologicamente ativos são proteínas, peptídeos, enzimas ou derivados de aminoácidos, dentre os quais é importante chamar a atenção para concanavalina A, urease, canatoxina, jaburetox, serino-proteases e L-canavanina / L-canalina (SILVA-LOPÉZ, 2012).

**Figura 2.** *C. ensiformis*, leguminosa com sementes ricas em urease. A – planta adulta com porte de arbusto; B – semente rica em ureases.



Fonte: <https://laneurotox.net.br/>

Em *C. ensiformis*, identificamos uma família de genes de urease, os quais são induzidos por ácido abscísico, um fito-hormônio (PIRES-ALVES et al., 2003). Esses genes codificam pelo menos 3 isoformas da proteína: a) JBURE-I, acesso M65260, a urease clássica majoritária, cristalizada por SUMNER em 1926; b) o gene JBURE-

II, acesso AF468788 (PIRES-ALVES et al., 2003) e EU938655 (MULINARI et al., 2011), com 86% de similaridade com a urease clássica; e c) JBURE-III, um terceiro membro desta família, ainda não totalmente sequenciado, que codificaria a canatoxina, uma proteína tóxica, isolada e caracterizada por CARLINI & GUIMARÃES (1981).

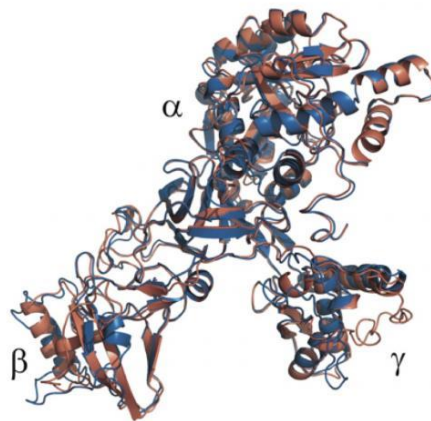
A canatoxina (CNTX), um dímero de cadeias de 95 kDa ligadas não covalentemente, apresenta alta homologia e ~40% da atividade enzimática da urease majoritária (FOLLMER et al., 2001). A baixa atividade ureolítica da CNTX pode estar relacionada com sua forma dimérica e/ou com a presença de um átomo de Ni e um de Zn em seu centro ativo (FOLLMER et al., 2002), contrastando com os dois átomos de Ni presentes na urease clássica, que é um hexâmero de cadeias de 90.7 kDa. A CNTX demonstrou ser tóxica para ratos quando injetada intraperitonealmente, causando convulsões seguida de morte, porém foi ineficaz quando administrada oralmente (CARLINI; GUIMARÃES, 1981). Em mamíferos, CNTX induz exocitose em plaquetas, mastócitos, sinaptossomas cerebrais, ilhotas pancreáticas isoladas, neutrófilos e macrófagos, porém sem alterar a integridade da membrana (STANISÇUASK; CARLINI, 2012).

O primeiro relato de que ureases vegetais têm propriedades entomotóxicas foi feito por nosso grupo (CARLINI et al., 1997) em estudos mostrando o efeito inseticida da CNTX quando ingerida por insetos bruquídeos (ex: *Callosobruchus maculatus*) e percevejos (Hemiptera, ex: *Nezara viridula*, *Dysdercus peruvianus*, *Rhodnius prolixus*, *Oncopeltus fasciatus*), sem contudo afetar outros insetos (Lepidoptera, ex: *Manduca sexta*, *Anticarsia gemmatalis*; Orthoptera, ex: *Schistocerca americana*; Díptera, ex: *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*) (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). O efeito entomotóxico espécie-específico da CNTX foi relacionado ao tipo de enzima digestiva do inseto, sugerindo um processo de ativação proteolítica da proteína, liberando fragmentos tóxicos (FERREIRA-DASILVA et al., 2000).

JBURE-II é a isoforma mais recentemente isolada e sequenciada, apresentando 82% de similaridade com a urease majoritária (Figura 3) e assim

como as outras ureases presentes em *C. ensiformes*, apresenta efeitos fungitóxicos e entomotóxicos (MULINARI et al., 2011).

**Figura 3.** Sobreposição da estrutura da JBU determinada por difração de raios-X e o modelo molecular da JBURE-IIb. O grau de semelhança das duas estruturas é evidente, refletindo a identidade de 82% de suas sequências.



Fonte: LIGABUE-BRAUN, 2010

JBURE-I ou somente JBU, é a isoforma de urease mais abundante e inibe a ação diurética em *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas na América do Sul, que tem sido extensivamente usado como modelo de estudo para a elucidação dos mecanismos de ação das ureases e seus peptídeos derivados, agindo nos túbulos de Malpighi, ativando a via dos eicosanoides e dependendo do transporte de cálcio (STANISÇUASKI et al., 2009).

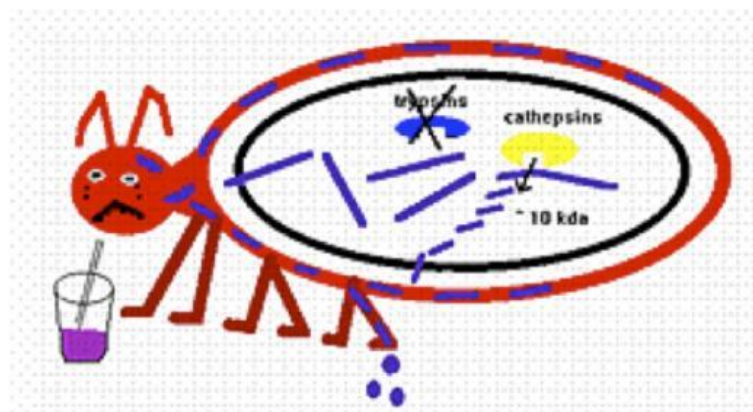
A JBU não possui atividade quando administrada intraperitonealmente em ratos (FOLLMER et al., 2001), o que pode ser explicado pelo tamanho da molécula de JBU ser maior que a molécula de CNTX, tendo assim uma absorção sistêmica mais lenta, devido ao seu tamanho, que poderia favorecer sua degradação, evitando o acúmulo das concentrações letais. Porém a JBU se apresenta tóxica quando administrada por via intravenosa, causando convulsões e outros sinais de

intoxicação no sistema nervoso central (SNC), associado com o alto nível de amônia encontrado no sangue de ratos e coelhos (TAUBER; KLEINER 1931).

JBU também possui atividade fungitóxica, afetando fungos filamentosos e leveduras. O efeito fungitóxico consiste na inibição da proliferação, indução de alterações morfológicas com formação de pseudohifas, mudanças no transporte de  $H^+$  e no metabolismo de energia e permeabilização das membranas levando à morte celular (POSTAL et al, 2012).

O efeito entomotóxico das ureases de *C. ensiformis* se dá devido a um peptídeo de aproximadamente 10 kDa que é liberado quando o inseto possui o trato digestivo baseado em catepsina. Este peptídeo é chamado de Jaburetox (JBTX) quando derivado de JBU e de pepcanotox quando derivado de CNTX e apresenta efeitos fungitóxicos, entomotóxicos, antimicrobianos e neurotóxicos (Figura 4). Posteriormente demonstramos que esses peptídeos (10-15 kDa) entomotóxicos podem ser produzidos in vitro por digestão da CNTX/ureases com enzimas tipo-catepsina de *C. maculatus* (FERREIRA-DASILVA et al., 2000).

**Figura 4:** Clivagem da urease em insetos e liberação do peptídeo tóxico. A JBU é tóxica para insetos que possuem o sistema digestivo baseado em catepsina, enzima que cliva JBU/CNTX em peptídeos tóxicos com aproximadamente 10 kDa.



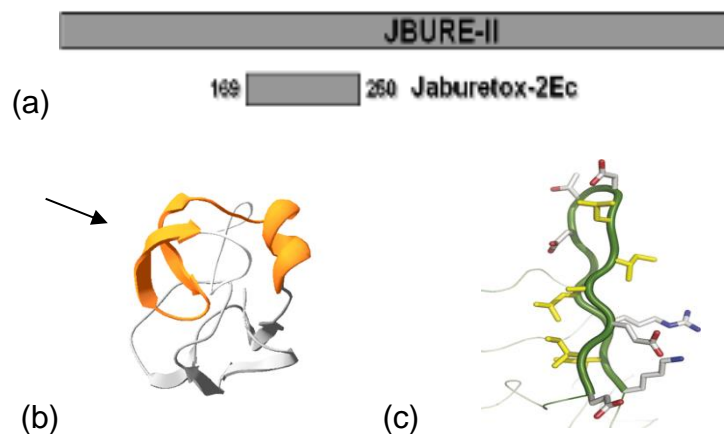
Fonte: <https://laneurotox.net.br/>

### 1.3. Jaburetox, um peptídeo derivado

Peptídeos recombinantes como o Jaburetox-2Ec, obtido a partir de um cDNA parcial da isoforma de urease JBURE-IIb de *C. ensiformis* (Figura 5), mostram potente atividade inseticida, inclusive contra insetos que não são susceptíveis às ureases nativas, mostrando-se inócuos, se injetados intraperitonealmente ou administrados por via oral, em ratos e camundongos. Duas versões recombinantes deste peptídeo foram desenvolvidas, JBTX-2Ec e JBTX, diferindo uma da outra apenas pela presença de um epítipo viral V5 no primeiro, ambos exibindo uma potente atividade inseticida (POSTAL et al, 2012).

A estrutura do peptídeo JBTX-2Ec, predita *ab initio* ou por modelamento molecular comparativo, mostrou um motivo  $\beta$ -hairpin similar aos encontrados em uma classe de peptídeos neurotóxicos ou formadores de poros, como carabdotoxina (do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus*) ou protegrinas (de leucócitos suínos) (BARROS et al, 2009; MULINARI et al, 2007). A presença deste motivo  $\beta$ -hairpin foi posteriormente confirmada em uma estrutura cristalográfica de JBU (BALASUBRAMANIAM; PONNURAJ, 2010).

**Figura 5.** 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  $\beta$ -hairpin, mostrado em maior detalhe em (c).



Fonte: BARROS et al, 2009 e MULINARI et al, 2007.

Quando testado como uma estratégia para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, vetor responsável pela transmissão de doenças como febre amarela urbana, dengue, Chikungunya e Zika vírus, JBTX foi superexpresso em *Escherichia coli*, liofilizado e adicionado à comida de peixe e então os mosquitos foram alimentados com essa mistura. Uma suspensão de *E. coli* contendo 100 µg de JBTX causou uma mortalidade de 90% nas larvas de *A. aegypti* no primeiro dia e 97,5% em seis dias. Este estudo demonstra o efeito tóxico de JBTX para o controle de *A. aegyptis*, interferindo no seu ciclo de vida biológico e causando mortalidade (KAPPAUN, 2017).

JBTX também possui efeitos em insetos que causam grandes perdas econômicas na agricultura, como *Dysdercus peruvianus*, que após 10 dias da alimentação com JBTX apresentaram uma mortalidade duas vezes maior. Lepidópteras com o sistema digestivo baseado em tripsina também se mostraram suscetíveis aos efeitos de JBTX (MULINARI et al., 2007).

*Helicoverpa armigera*, causador de um grande impacto econômico nas produções de algodão, soja, milho, grãos verdes e tomates, alimentado com alguns microgramas de JBTX teve uma taxa de mortalidade aumentada, assim como uma diminuição na quantia de alimento ingerida nas larvas do inseto (dado não publicado).

Em *Rhodnius prolixus*, além de interferir na diurese, fisiologia e causando efeitos relacionados ao SNC, JBTX tem sido demonstrado como perturbador do sistema imune, afetando a capacidade do inseto de neutralizar infecções bacterianas (FRUTTERO et al., 2016).

O efeito neurotóxico do JBTX em *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, ambos vetores da doença de Chagas, é causado pela ligação do peptídeo a células neuronais e a interferência com pelo menos duas enzimas: a ligação de JBTX e o aumento da atividade de UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase e a inibição da enzima óxido nítrico sintase, diminuindo, assim os níveis de óxido nítrico neurotransmissor (FRUTTERO et al., 2017; GALVANI et al., 2015).

Sobre o efeito antibacteriano de JBTX, este demonstrou ter um efeito inibidor no crescimento de três linhagens bacterianas: *E. coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, quando o peptídeo foi adicionado ao meio de crescimento na concentração de 13,5  $\mu$ M. Este efeito inibitório foi revertido quando as bactérias foram transferidas para um meio que não continha o peptídeo (TERRA, 2017).

Em membranas, JBTX foi demonstrado ter a habilidade de interagir com membranas lipídicas. Como demonstrado por Barros et al. 2009, JBTX foi capaz de permeabilizar lipossomos ácidos e liberar carboxi-fluoroceína ligadas. Piovesan et al. 2014 reportaram que JBTX foi capaz de se inserir em bicamadas lipídicas planares formando canais iônicos cátion seletivos (BARROS et al., 2009; PIOVESAN et al., 2014).

Atualmente, alguns avanços foram feitos na área de plantas transgênicas expressando JBTX. O peptídeo foi inserido no genoma do tabaco utilizando uma transformação com *Agrobacterium*. As folhas do tabaco transgênico expressando JBTX induziram a letalidade de 50% em larvas de *Spodoptera frugiperda* depois de 30 dias (MULINARI, 2017).

No entanto, a base molecular do mecanismo de ação pelo qual as ureases e os peptídeos derivados de *C. ensiformis* causam entomotoxicidade em *Drosophila melanogaster* ainda são inexistentes na literatura.

#### 1.4. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

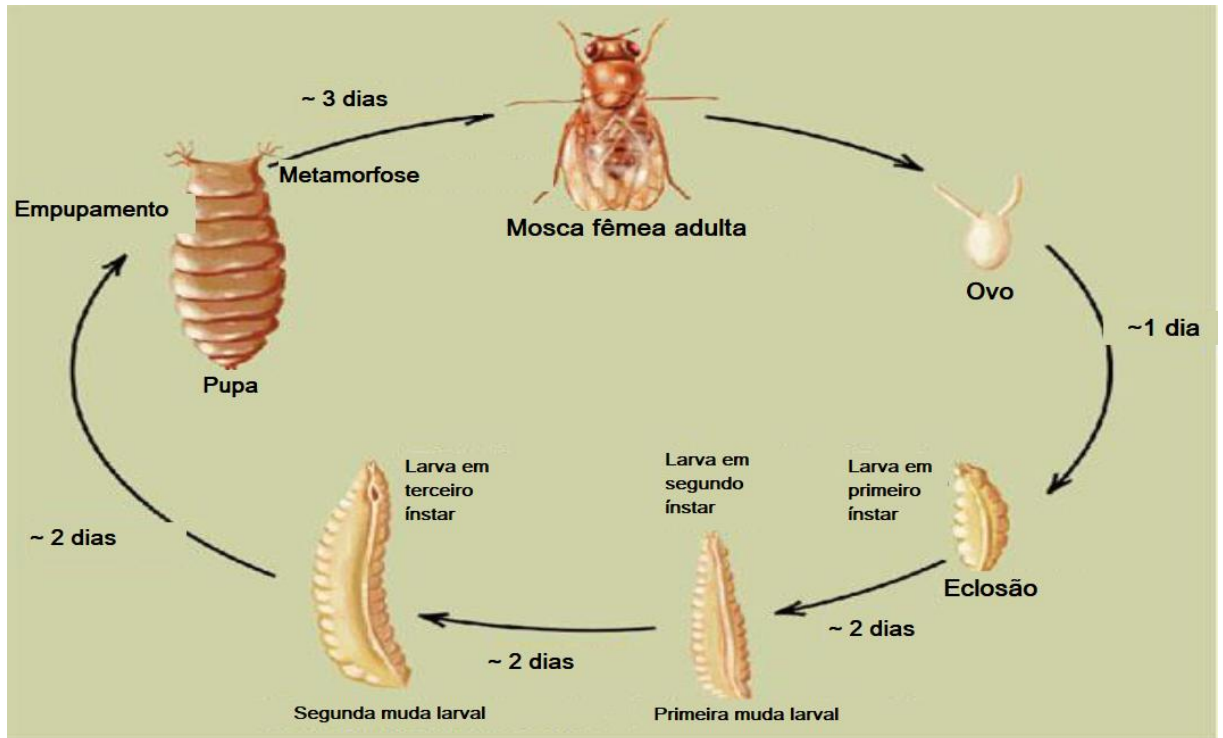
*Drosophila* é um gênero de pequenas moscas, pertencente à família Drosophilidae, cujos membros são frequentemente chamados de "moscas da fruta". Uma espécie de *Drosophila* em particular, *D. melanogaster*, tem sido fortemente utilizada na pesquisa em genética e é um organismo modelo comum em biologia do desenvolvimento. O gênero inteiro, no entanto, contém cerca de 1.500 espécies e é muito diverso em aparência, comportamento e habitat de reprodução. Essa diversidade pode ser explicada devido à sua capacidade de ser competitivo em quase todos os habitats, incluindo os desertos (DEEPA; AKSHAYA; SOLOMON, 2009).

Sendo um organismo modelo, seu comportamento, incluindo a oviposição, tem sido amplamente utilizado para o estudo de uma variedade de processos biológicos. *D. melanogaster* utilizam frutas em processo de fermentação como fonte de alimento e lugar para oviposição. A oviposição e a taxa de viabilidade são duas medidas que são facilmente quantificáveis e descrevem a aptidão biológica e resposta comportamental em ensaios com diferentes químicos (LEUNG et al, 2015). Essas respostas são governadas por pelos sensoriais que cobrem o corpo das moscas e que são constituídos de neurônios para detecção de gosto, toque, olfato e presença de químicos, exibindo evasão, atração e seleção do local para oviposição. Estudos recentes têm demonstrado que várias toxinas e químicos induzem diferentes taxas de oviposição, o que é de alto interesse para trabalhos que dependem de uma grande quantidade de ovos (WU et al, 2010).

*Drosophila* possui quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mosca (Figura 6). Cada fêmea pode colocar aproximadamente cem ovos por dia, durante vinte dias, demorando cerca de dez dias a uma temperatura de 25 °C para um embrião se desenvolver em uma mosca adulta fértil (JENNINGS, 2011).

**Figura 6.** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. A figura demonstra os estágios de desenvolvimento do inseto, desde o ovo até o organismo adulto.





Fonte: Editado de [http://www.zoology.ubc.ca/~bio463/lecture\\_13.htm](http://www.zoology.ubc.ca/~bio463/lecture_13.htm).

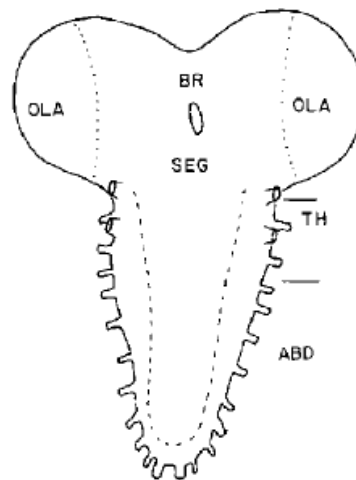
Acessado por último dia 14/08/2017 às 22:30.

As larvas de *D. melanogaster* são especializadas para viver em meios semilíquidos. A cabeça é reduzida e invertida para dentro do tórax, sendo a única parte voltada para o ambiente externo um par de ganchos bucais retráteis. O corpo não possui membros e tem uma quantidade reduzida de neurônios sensoriais. Dentro de 100 horas, a uma temperatura de 25 °C, a larva passa por 3 estágios larvais, denominados ínstars, tendo seu tamanho aumentado em 300 vezes. Durante este período, as células larvais não se dividem e o seu crescimento se dá pelo aumento de tamanho das células, onde a maioria das células se torna poliplóide até o momento em que o crescimento se completa (TRUMAN, 1996).

O SNC larval consiste de dois lóbulos cerebrais esféricos que são amplamente ligados através de conectivos que darão origem ao sistema nervoso ventral, que é formado por gânglios segmentados fundidos incluindo os segmentos subesofágicos, torácico e abdominal (Figura 7). O sistema nervoso larval também possui um grande número de células-tronco neuronais, denominados neuroblastos, concentrados principalmente no cérebro e regiões torácicas do SNC. Os

neuroblastos se dividem repetidamente durante a fase larval gerando grupos de neurônios pós mitóticos imaturos (TRUMAN,1990).

**Figura 7:** Vista ventral do sistema nervoso central de larval de *D. melanogaster* em terceiro ínstar de desenvolvimento. ABD – neuromeros abdominais; BR – cérebro; SEG – neuromeros subesofágicos; OLA – lobulos ópticos anlages; TH – neurômeros torácicos.



Fonte: Truman, 1990

*D. melanogaster* é um organismo modelo por quase um século, apresentando uma gama de vantagens como ciclo de vida curto, baixo custo de manutenção, facilidade de manuseio, além de ter seu genoma sequenciado e suas proteínas anotadas. *D. melanogaster* também possui seu SNC bem estudado, sendo composto de somente em torno de 1000 neurônios, o que torna *D. melanogaster* um ótimo modelo para doenças neurodegenerativas e ensaios de neurotoxicidade (BOERNER; DUCH, 2010, PANCHAL; TIWARI,2017).

Atualmente, com os avanços proteômicos em relação a *Drosophila* temos: i) mapeamento e catalogação do proteoma, ii) análise de interações proteína-proteína, iii) análise de modificações de proteínas pós-traducionais; iv) análise quantitativa do

proteoma, e v) estudos funcionais que muitas vezes combinam mais de uma abordagem (VERASKA, 2010).

Tendo em vista o grande potencial da urease de *Canavalia ensiformis* e seus peptídeos derivados em diferentes áreas e a falta de dados na literatura sobre como o JBTX age sobre o sistema nervoso central de *Drosophila melanogaster*, este trabalho busca elucidar este mecanismo, bem como desenvolver um meio quimicamente definido, uma vez que esse é necessário para o controle do que está sendo ingerido pelas larvas, dando assim uma maior confiabilidade e reprodutibilidade aos resultados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Definir um meio quimicamente definido para a utilização de *D. melanogaster* como modelo para toxicologia e avaliar o efeito do peptídeo tóxico JBTX de *Canavalia ensiformis* sobre o sistema nervoso de larvas de *Drosophila melanogaster*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver um meio quimicamente definido;
- Definir qual o melhor aditivo para aumentar a taxa de oviposição;
- Expressar de forma heteróloga e purificar o peptídeo tóxico JBTX de *C. ensiformis*;
- Avaliar o efeito de peptídeo tóxico JBTX de *C. ensiformis* sobre o sistema nervoso de larvas de *D. melanogaster*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Manutenção de *Drosophila melanogaster*.

A colônia de *D. melanogaster* linhagem Oregon foi mantida em incubadora do tipo B.O.D, em meio padrão composto de farinha de milho grossa, farinha de milho média, gérmen de trigo, açúcar, leite em pó e sal, segundo WALLAU (2010) sob uma temperatura de 23 °C e ciclos 12/12h claro/escuro.

### 4.2. Meio quimicamente definido

Com o objetivo de ter controle sobre a alimentação dos estágios larvais de *D. melanogaster*, desenvolveu-se um meio de cultura para estes animais com especificação química definida visto que o meio de cultura padrão é baseado em compostos não bem definidos. Para o desenvolvimento deste meio foram utilizados ágar, sacarose, fermento biológico e metilparabeno, sendo estes reagentes o mínimo necessário para o desenvolvimento larval, uma vez que a sacarose e o fermento fornecem a nutrição, o metilparabeno possui atividade fungicida e o ágar dá a consistência semi-sólida necessária ao meio. Foi realizado também a comparação deste meio quimicamente definido com o meio comercial para cultura de insetos Grace (Himedia).

Para a realização destes testes, 10 ovos de *D. melanogaster* foram coletados do meio à base de farinha de milho, desinfetados com solução de hipoclorito 10% por 30 segundo e dispostos em placas de plástico contendo o meio comercial para cultura de insetos Grace suplementado com 10% de soro fetal bovino o meio teste contendo os nutrientes necessários para a dieta das moscas, composto de ágar (15 mg/mL), sacarose (30 mg/mL), fermento biológico (1,25 mg/mL) e metilparabeno (1 mg/mL) (Figura 8), sendo todo este experimento realizado em triplicata As placas foram mantidas a 23°C em incubadora B.O.D.

**Figura 8:** Procedimento de preparação dos ovos de *Drosophila melanogaster* para teste do meio quimicamente definido. A – Ovos de *D. melanogaster* ainda em meio

de cultura padrão. B – Local onde os ovos recolhidos do meio de cultura padrão são colocados. C – Desinfestação dos ovos.



#### 4.3. Teste de oviposição

Para a avaliação do melhor aditivo para indução de uma maior taxa de oviposição, onde com base na literatura foram escolhidos dois aditivos, o etanol (5%) (Azanchia; Kauna; Heberleina, 2013) e o ácido propiônico (1%) aditivo comumente utilizado em laboratório.

As moscas foram expostas a um meio quimicamente definido, composto de ágar, sacarose, fermento biológico e metilparabeno. Foi utilizado um controle negativo, meio onde não houve adição de nenhum aditivo, um meio com adição de etanol 5%, e um meio com adição de ácido propiônico 1%. Aproximadamente 150 moscas, entre machos e fêmeas, foram colocadas em frascos e então expostas aos meios por aproximadamente 20 horas, sendo realizadas três repetições para cada aditivo e para o controle. Após, estas moscas foram recolocadas no meio de cultura padrão a base de farinha de trigo. Os meios foram avaliados e então fotografados.

#### 4.4. Expressão de Jaburetox-2Ec e eletroforese em gel de poliacrilamida

Um plasmídeo recombinante pET 101/Jaburetox-2Ec foi transformado quimicamente em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) e inoculado em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. As culturas foram incubadas a 37 °C até atingirem uma OD 600 de 0,6-0,8. IPTG foi adicionado a uma concentração final de 0,75 mM e 0,5 mL da cultura foi amostrada após 1 hora. As culturas sem indução serviram como controle. As células foram centrifugadas (5.000 g, 10 min), ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE e analisadas em gel de

poliacrilamida 12%, de acordo com LAEMMLI (1970) e coradas com Comassie Blue R-250.

#### **4.5. Purificação do Jaburetox utilizando Ni-NTA agarose**

Para o isolamento e purificação do Jaburetox-2EC, 250 ml de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina foi inoculado com 5 mL da cultura já mencionada. As células cresceram durante 2 horas a 37 °C sob agitação e então IPTG foi adicionado na concentração de 1 mM. Após 2 horas, as células foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em 10 mL de tampão de lise (50 mM fosfato de sódio, pH 7.0, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% (v/v) glicerol, 0.5% (v/v) Triton X-100 and 10 mM imidazol), sonicadas e centrifugadas e 10 µL do sobrenadante ou 5 µL da amostra de pellet foram analisadas por SDS-PAGE. 2 mL do sobrenadante foi carregado em uma coluna de afinidade de níquel (Ni-NTA-QIAGEN), que foi previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM tampão fosfato de sódio pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol). Após 30 minutos, a coluna foi lavada com 20 mL do mesmo tampão, contendo 20 mM de imidazol. A proteína foi eluída com tampão de equilíbrio contendo 200 mM de imidazol e quantificada através do método de Bradford. As amostras foram dializadas contra água deionizada.

#### **4.6. Teste de exposição das moscas**

Ovos de *D. melanogaster* foram coletados do meio quimicamente definido e dispostos em placas de plástico onde havia meio quimicamente definido com duas diferentes concentrações de JBTX: 1,5 µg/mL; 15 µg/mL e um controle negativo onde não foi adicionado o peptídeo. Os ovos foram deixados para eclosão e as larvas desenvolveram-se até o terceiro instar, quando tiveram um tecido rico em SNC excisado com auxílio de pinça e bisturi. O tecido foi então macerado com tampão de lise e auxílio de nitrogênio líquido.

As amostras maceradas foram submetidas a SDS-PAGE. Para isso, 150 µg de proteínas foram desnaturadas em 20 µL de tampão de amostra (água deionizada, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 0,5%) sob fervura

durante cinco minutos. As amostras foram então aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% e separadas por eletroforese a 100 v. Após o termino da eletroforese, o gel foi corado com Comassie Blue R-250.



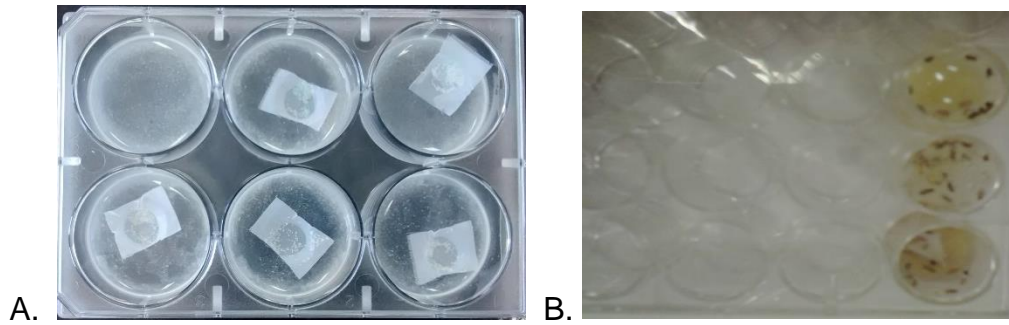
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desenvolvimento de um meio quimicamente definido

Nas placas contendo 200  $\mu$ L de meio para inseto Grace, suplementado com 10% de soro fetal bovino, foi observado um comportamento de canibalismo predatório entre as larvas e estas não completaram seu desenvolvimento. Este evento já foi descrito na literatura (VIJENDRAVARMA et al. 2012) e pode ser explicado pela deficiência nutricional do meio Grace para o desenvolvimento larval de *D. melanogaster*. O meio de cultura para insetos Grace foi originalmente designado para cultura de células de *Antherea eucalypti* e atualmente é amplamente usado para cultura de células de *Spodeptera frugiperda* porém para o cultivo de larvas de *Drosophila melanogaster*, se mostrou ineficiente ao nutrir as larvas. Nas placas contendo 500  $\mu$ L do meio desenvolvido neste trabalho, houve a eclosão de 60% dos ovos expostos ao meio e o total desenvolvimento do organismo foi observado (Figura 9).

Os resultados demonstram que a condição nutricional do meio para a cultura de *D. melanogaster* é de extrema importância, visto que a deficiência nutricional acarreta em um comportamento não comumente observado na natureza em animais não carnívoros. Assim, o meio para cultura de *D. melanogaster* elaborado neste trabalho demonstrou ser eficiente para o desenvolvimento das mesmas, proporcionando maior facilidade de elaboração e tornando-se uma alternativa mais criteriosa que o meio convencional.

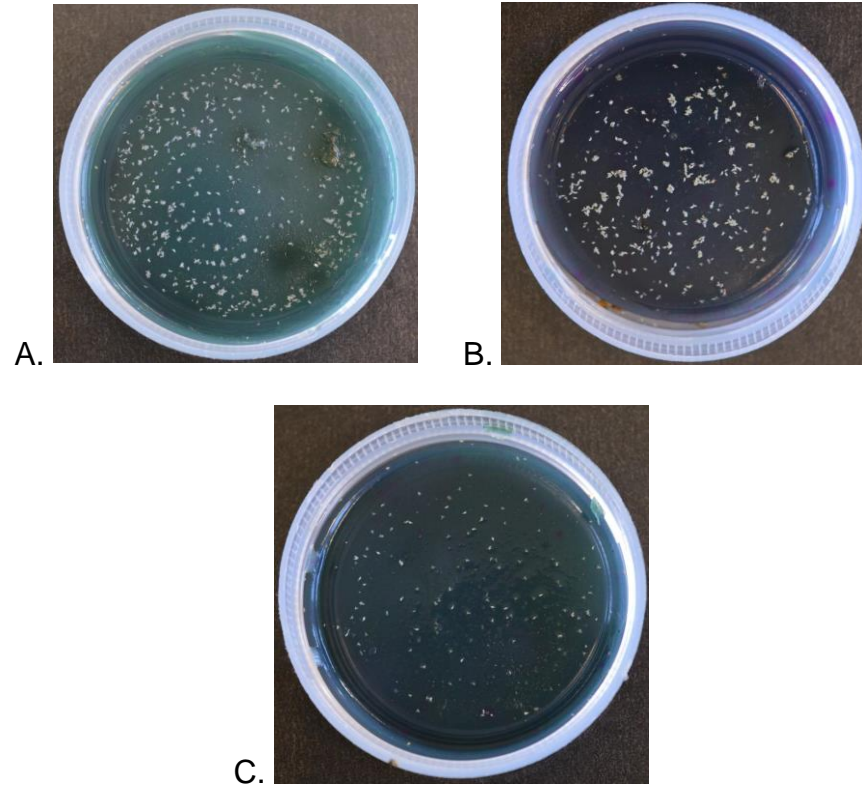
**Figura 9.** Desenvolvimento de *D. melanogaster* em meio quimicamente definido A- Placas contendo ovos de *D. melanogaster*. B- Placa contendo indivíduos adultos de *D. melanogaster*.



## 5.2. Definição do melhor aditivo para uma maior taxa de oviposição

Neste trabalho nós demonstramos que a adição de etanol aumenta a taxa de oviposição. O meio que apresentou a maior taxa de oviposição foi o meio com adição de etanol 5%, onde pode observar-se que aproximadamente 700 ovos foram postos, muitos se sobrepondo, o que pode ser justificado pelo fato de que o etanol é um dos principais metabólitos na degradação de frutas, apresentando um local mais atrativo para a oviposição (Figura 10), porém concentrações de etanol maiores que 5% podem ser tóxicas para ovos e larvas, sendo esta a maior concentração. No controle negativo também houve uma grande taxa de oviposição, em torno de 500 ovos, porém estes não chegaram a se sobrepor. O meio com menor taxa de oviposição foi o meio com adição de ácido propiônico, que apresentou em torno de 200 ovos, com espaçamento entre eles. Desta maneira, demonstramos que o meio com adição de etanol é mais atrativo para a oviposição, possivelmente devido a sua semelhança com o ambiente natural. Nossos experimentos também demonstram que a adição de ácido propiônico pode não ser a maneira mais efetiva para a obtenção de uma maior taxa de oviposição.

**Figura 10.** Ovos de *D. melanogaster* em meios com diferentes aditivos químicos. A - controle negativo; B – meio com adição de etanol; C – meio com adição de ácido propiônico.

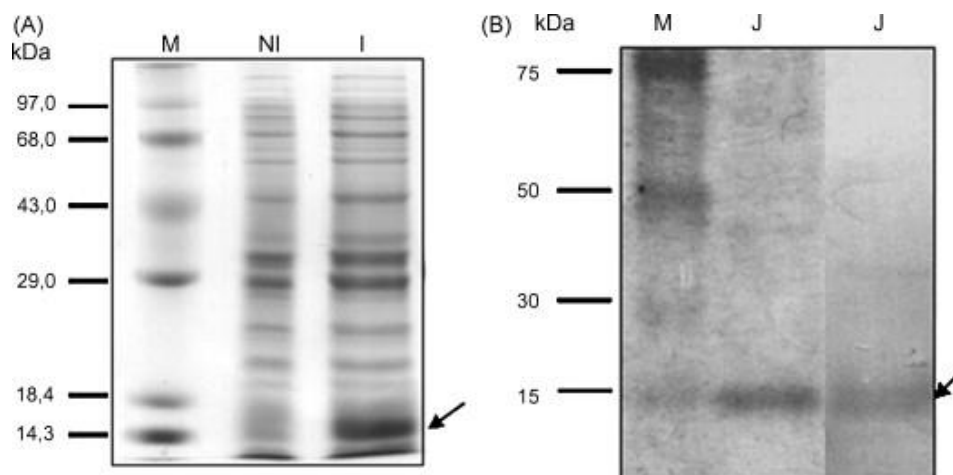


### 5.3. Expressão e purificação de JBTX e teste de exposição contra *D. melanogaster*.

O vetor pET/Jaburetox-2Ec foi transformado em *E. coli* linhagem BL21 Star (DE3). A linhagem resultante, *E. coli* BL21 (pEt101/Jaburetox-2Ec) produziu aburetox-2Ec recombinante com um epítipo V5-His6, regulado por um promotor T7 induzível por IPTG. Uma banda diferencial correspondente aos 13 kDa esperados (10kDa do Jabureto-2 e 3 kDa do epítipo V-5 e da cauda His6) da proteína recombinante foi observado em SDS-PAGE do lisado total de *E. coli* BL21 (pET101/Jaburetox-2Ec) após a indução com IPTG (Figura 11 A). Essa banda estava ausente no lisado total do controle (não induzido). As condições de expressão foram otimizadas para o aumento da expressão de Jaburetox-2Ec e os melhores resultados foram obtidos após a indução com 1mM de IPTG a 37 °C por 2 horas. Utilizando estas condições, Jaburetox-2Ec foi purificado de 250 mL de cultura de *E. coli* (pET/Jaburetox-2Ec). O volume de proteína recombinante permaneceu solúvel após a sonicação das células, permitindo a purificação de proteínas nativas

por cromatografia de afinidade por Ni<sup>2+</sup> (Figura 11 B). A produção final de Jaburetox-2Ec purificado foi reconhecido por anticorpos policlonais anti-canatoxina (Figura 11 B).

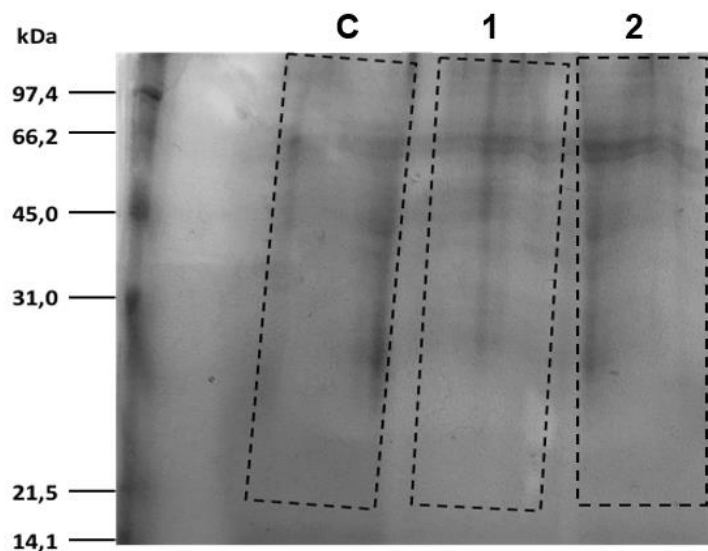
**Figura 11** – Produção de Jaburetox-2Ec recombinante. A - Análise de Jaburetox-2Ec recombinante de lisado celular em SDS-PAGE. Canaleta NI, sem a indução. Canaleta I, 1 hora de indução com 0,75 mM de IPTG. B – Análise de Jaburetox-2Ec purificado. Canaleta J: 10 µg de proteína eluída da coluna de cromatografia por afinidade com Ni<sup>2+</sup>. Lado direito: Análise de Western blot do Jaburetox-2ec recombinante com anticorpos anti-canatoxina e IgG de coelhos conjugados à fosfatase alcalina. Nas duas imagens as canaletas M representam o marcador de peso molecular. Os números escritos a esquerda indicam os marcadores de peso molecular *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range* da Bio-Rad. Os géis foram corados com Comassie Blue.



Com o objetivo de avaliar o efeito do peptídeo tóxico JBTX de *C. ensiformis* sobre o sistema nervoso central, ovos de *D. melanogaster* foram coletados e expostos a duas diferentes concentrações de JBTX: 1,5 µg/µL e 15 µg/µL, além de um controle negativo na ausência do peptídeo. As larvas de terceiro ínstar tiveram um tecido rico em SNC excisado e foi preparado um extrato proteico com dois objetivos de (i) realizar uma análise por proteômica comparativa LC-MS/MS a ser

realizada na unidade de química de proteínas e espectrometria de massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia (CBiot) da UFRGS. A referida análise está aguardando o equipamento do Uniprote-MS voltar de manutenção, estando as amostras preparadas segundo as normas desta unidade e (ii) visualizar o perfil eletroforético destes extratos proteicos na tentativa de identificar diferenças significativas entre os tratamentos. O perfil pode ser visto na Figura 12, onde em todas as amostras testadas proteínas foram detectadas, entretanto, por resultado de uma eletroforese aberrante não foi possível caracterizar diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas na expressão de proteínas entre os extratos testados.

**Figura 12.** Perfil eletroforético do sistema nervoso central de *D. melanogaster* sobre o efeito de JBTX. M – Marcador de peso molecular *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range* da Bio-Rad, C – controle; 1 - concentração de 1,5 $\mu$ g/ $\mu$ L de JBTX; 2 - concentração de 15  $\mu$ g/ $\mu$ L de JBTX.



## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste trabalho foi desenvolvido um meio quimicamente definido, bem como foi avaliado o melhor aditivo para uma maior taxa de oviposição. Com estes resultados será possível a otimização dos experimentos futuros, tornando estes mais rápidos e eficientes. No perfil eletroforético não foi possível avaliar quantitativamente ou qualitativamente exposição proteica, devido a uma eletroforese aberrante, porém foi possível a visualização e confirmação da presença de proteínas.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar testes toxinológicos com JBU e JBTX de *C. ensiformis* em três diferentes concentrações em larvas e moscas adultas de *D. melanogaster*, linhagem Harwich;
- Dissecar o sistema nervoso central, glândulas salivares e túbulos de Malpighi de larvas e mosca adultas de *D. melanogaster*.
- Produzir mapas proteômicos de referência em diferentes faixas de pH para as proteínas presente nas amostras de diferentes tecidos de *D. melanogaster*, incluindo a identificação de padrões de processamento pós-traducional;
- Realizar a análise proteômica do sistema nervoso central, túbulos de Malpighi e glândulas salivares de *D. melanogaster* por eletroforese bidimensional e MALDI-TOF MS/MS,
- Validar os genes identificados nas condições testadas através da técnica de RT-PCR.

## REFERÊNCIAS

Azanchia, R; Kauna, K.R; Heberleina; U. **Competing dopamine neurons drive oviposition choice for ethanol in *Drosophila***. PNAS, 110:52, p. 21153–21158, 2013

Barros, P. R.; Stassen, H.; Freitas, M. S.; Carlini, C. R.; Nascimento, M. A.; Follmer, C. **Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1794:12, p. 1848-1852, 2009.

Balasubramanian, A.; Ponnuraj, K. **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, 400:3, p. 274-283, 2010.

Boerner, J.; Duch, C. **Average Shape Standard Atlas for the Adult *Drosophila* Ventral Nerve Cord**. The Journal of Comparative Neurology, 518, p. 2437–2455, 2010.

Carlini, C.; Guimarães, J. **Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A**. Toxicon, 19:7, p. 667-675, 1981.

Carlini, C.R.; Oliveira, A.E.A.; Azambuja, P.; Xavier-Filho, J.; Wells, M.A. **Biological Effects of Canatoxin in Different Insect Models: Evidence for a Proteolytic Activation of the Toxin by Insect Cathepsinlike Enzymes**. Journal of Economic Entomology, 90:2, p. 340-348, 1997.



Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F. **Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides.** *Toxicon*, 40:11, p. 1515-1539, 2002.

Deepa, P. V.; Akshaya, A. S.; Solomon, F. D. P. **Wonder animal model for genetic studies - *Drosophila Melanogaster* - its life cycle and breeding methods - a review.** *Sri Ramachandra Journal of Medicine*, 2:2, p. 33-38, 2009.

Dixon, N.; Gazzola, C.; Watters, J. J. **Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel?.** *Phytochemistry*, 69:1, p. 18-28, 1975.

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

Follmer, C.; Barcellos, G. B.; Zingali, R. B.; Machado, O. L.; Alves, E. W.; Barja-Fidalgo, C.; Guimarães, J.; Carlini, C. R. **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.** *The Biochemical Journal*, 360, p. 217-244, 2001.

Follmer, C.; Carlini, C. R.; Yoneama, M. L.; Dias, J.F. **PIXE analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds.** *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 189, p. 482-486, 2002.

Follmer, C. **Insights into the role and structure of plant ureases.** *Phytochemistry*, 69:1, p. 18-28, 2008.

Fruttero, L. L.; Moyetta, N. R.; Uberti, A. F.; Grahl, M. V. C.; Lopes, F. C.; Broll, V.; Feder, D.; Carlini, C. R. **Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*.** *Parasites & Vectors*, 412:9, p. 1-14, 2016.

Fruttero, L. L.; Moyetta, N. R.; Siebra, M.; Broll, V.; Coste, M. V.; Real-Guerra, R.; Stanisçuaski, F.; Carlini, C. R. **Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector.** *Acta Tropica*, 168, p. 54-63, 2017.

Galvani, G. L.; Fruttero, L. L.; Coronel, M. F.; Nowicki, S.; Demartini, D. R.; Defferrari, M. S.; Postal, M.; Canavoso, L. E.; Carlini, C. R.; Settembrini, B. P. **Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera).** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850:2, p. 255-262, 2015.

Jennings, B. H. ***Drosophila* – a versatile model in biology and medicine.** *Materials Today*, 14:5, p. 190-195, 2011.

Kappaun K. **Estudos com o Jaburetox: efeito tóxico de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo e análise da influência do epitopo v5 na formação de agregados.** Trabalho de conclusão de curso, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017.

Krajewska, B. **Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59:1-3, p. 9-21, 2009.

Laemmli, U.K. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature*, 227, p. 680-685, 1970.

Leung, J. C. K.; Taylor-Kamall, R. W.; Hilliker, A. J.; Rezai, P. **Agar-polydimethylsiloxane devices for quantitative investigation of oviposition behaviour of adult *Drosophila melanogaster*.** *Biomicrofluidics*, 9, 2015.

Ligabue-Braun, R.; Andreis, F. C.; Verli, H.; Carlini, C. R. **3-to-1: Unraveling structural transitions in ureases.** *Naturwissenschaften*, 100:5, p. 459-467, 2013.

Mobley, H. L. T.; Island, M. D.; Hausinger, R. P. **Molecular Biology of Microbial Ureases.** *Microbiological Reviews*, 59:3, p. 451-480, 1995.

Mulinari, F.; Stanisçuaski, 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*, 28, p. 2042-2050, 2007.

Mulinari, F. **Ureases de *Canavalia ensiformis* e peptídeo inseticida derivado.**

Tese de doutorado. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

Mulinari, F.; Becker-Ritt, A.; Demartini, D. R.; Ligabue-Braun R.; Stanisçuaski, F.; Verli, H.; Fragoso, R. R.; Schroeder, E. K.; Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M. F. **Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease.**

Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 1814:12, p. 1758-1768, 2011.

Panchal, k.; Tiwari, A. ***Drosophila melanogaster* “a potential model organism” for identification of pharmacological properties of plants / plant-derived components.** Biomedicine et Pharmacotherapy, 89, p. 1331-1345, 2017.

Piovesan, A. R.; Martinelli, A. H. S.; Ligabue-Braun, R.; Schwartz, J. L.; Carlini, C. R. ***Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers.** Archives of biochemistry and biophysics, 547, p. 6-17, 2014.

Pires-Alves, M.; Grossi-de-Sá, M. F.; Barcellos, G. B. S.; Carlini, C. R.; Moraes, M. G. **Characterization and Expression of a Novel Member (JBURE-II) of the Urease Gene Family from Jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC].** Plant and Cell Physiology, 44:2, p. 139-145, 2003.

Polacco, J. C.; Winkler, R. G. **Soybean Leaf Urease: A Seed Enzyme?.** Plant Physiology, 74:4, p. 800-803, 1984.

Postal, M.; Martinelli, A. H. S.; Becker-Ritt, A. B.; Ligabue-Braun, R.; Demartini, D. R.; Ribeiro, S. F. F.; Pasquali, G.; Gomes, V. M.; Carlini, C. R. **Peptides Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides.** Peptides, 38:1, p. 22-32, 2012.

Sirko, A.; Brodzik, R. **Plant ureases: Roles and regulation.** Acta Biochimica Polonica, 47:4, p. 1189-1195, 2000.

Silva-Lopéz, R. E. ***Canavalia ensiformis* (L) DC (Fabaceae)**, 2012, <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/15134>, acessado por último no dia 13/07/2017 às 20:50.

Stanisçuaski, F.; Te Brugge, V.; Carlini, C. R.; Orchard, I. **In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules.** Journal of Insect Physiology, 55:3, p. 255-263, 2009.

Stanisçuaski, F.; Carlini, C. R. **Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties.** Toxins, 4:2, p. 55-67, 2012

Stebbins, N.; Holland, M. A.; Cianzio, S. R.; Polacco, J. C. **Genetic Tests of the Roles of the Embryonic Ureases of Soybean.** Plant Physiology, 97:3, p. 1004-1010, 1991.

Sumner, J. B.; **The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper.** Journal of biological chemistry, 69, p. 435-441, 1926.

Tauber H.; Kleiner, I. S. **Studies on crystalline urease: iii. The toxicity of crystalline urease.** Journal of Biological Chemistry, 92, p. 177, 1931.

Terra I. A. **Avaliação da atividade antibacteriana do peptídeo Jaburetox.** Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil. 2016.

Torisky, R. S.; Polacco, J. C.; **Soybean roots retain the seed urease isozyme synthesized during embryo development.** *Plant Physiology*, 94:2, p. 681-689, 1990.

Truman, J. W. **Steroid receptors and nervous system metamorphosis in insects.** *Developmental Neuroscience*, 18, p. 87-101, 1996.

Truman, J. W. **Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*.** *Developmental Neuroscience*, 21:7, p. 1072-1084, 1990.

Wallau, G. L. **Protocolos LabDros,** 2010, [www.ufsm.br/labdros/arquivos/Protocolos.pdf](http://www.ufsm.br/labdros/arquivos/Protocolos.pdf), acessado por último no dia 05/08/2017 às 19:50.

Wöhler, F. **Ueber den Pyrochlor, eine neue Mineralspecies.** *Annalen der Physik*, 83:8, p. 417-428, 1826.

Wu, C. L.; Fu, T. F.; Chou, F. F.; Yeh, S. R. **A Single Pair of Neurons Modulates Egg-Laying Decisions in *Drosophila*** *Plos One*, 10:3, 2015.

Veraksa, A. **When peptides fly: Advances in *Drosophila* proteomics.** *Journal of Proteomics*, 73, p. 2158-2170, 2010.

Vijendravarma, R. K.; Narasimha, S.; Kawecki, T. J. **Predatory cannibalism in *Drosophila melanogaster* larvae.** *Nature communications*, 4, article number: 1789, 2013.