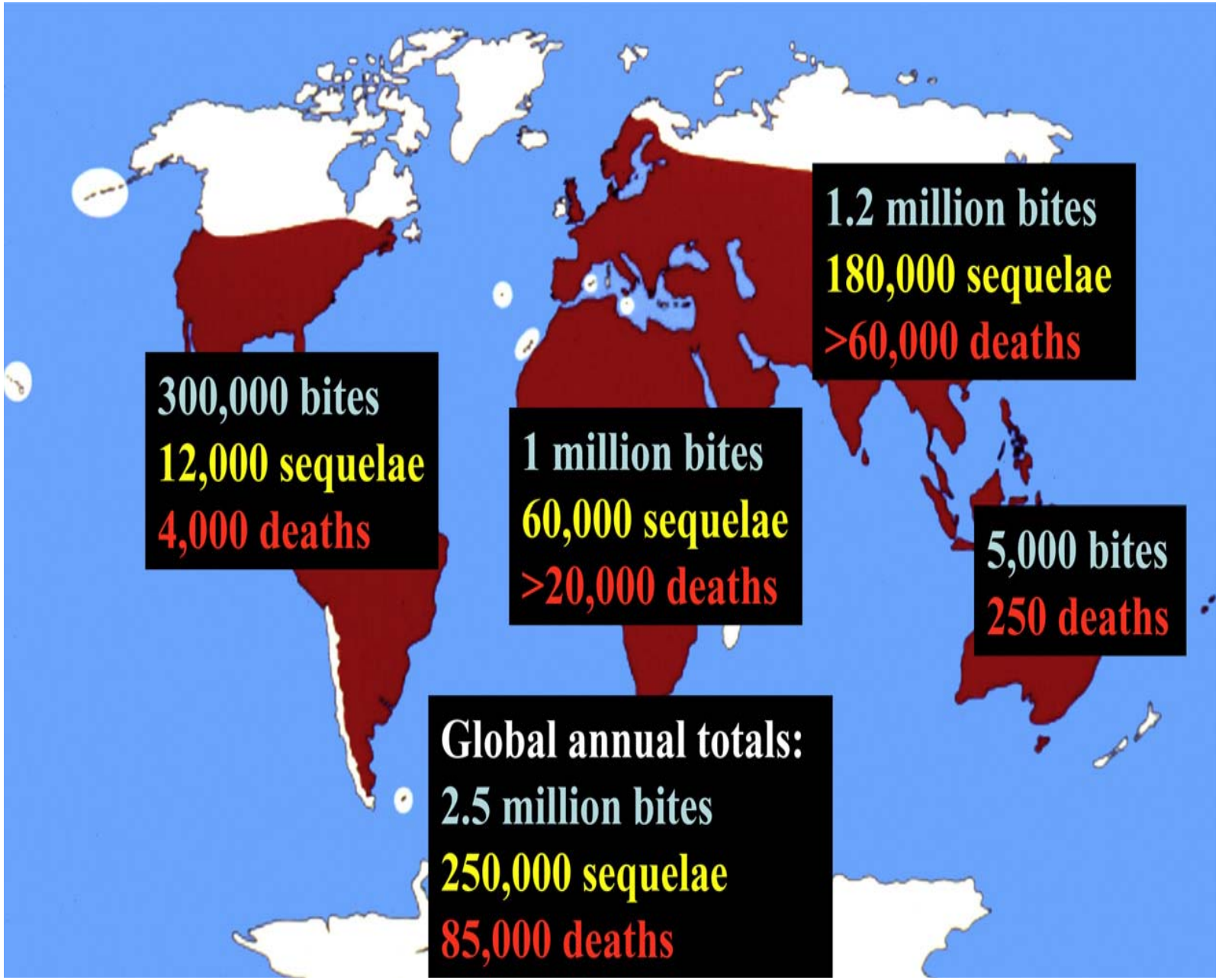
TOXINOLOGIA NO BRASIL

Dezembro de 2009


1.2 million bites
180,000 sequelae
>60,000 deaths
300,000 bites
12,000 sequelae
4,000 deaths
1 million bites
60,000 sequelae
>20,000 deaths
5,000 bites
250 deaths
Global annual totals:
2.5 million bites
250,000 sequelae
85,000 deaths

ACIDENTES CAUSADOS POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - DADOS de 2008*						
		SERPENTES	ARANHAS	ESCORPIÕES	LAGARTAS	ABELHAS
BRASIL	Número de Acidentes	26.156	20.993	37.862	3.968	5.605
	Casos por Milhão de Habitantes	130	110	220	20	30
	Óbitos	119	19	87	5	13
	Letalidade %	0,5	0,10	0,23	0,10 - 0,30	0,23
ACIDENTES POR REGIÃO		CASOS POR MILHÃO DE HABITANTES				
REGIÃO NORTE		520	27	136	7	14
REGIÃO NORDESTE		130	10	326	2	20
REGIÃO CENTRO-OESTE		150	20	100	4	20
REGIÃO SUDESTE		80	55	201	15	31
REGIÃO SUL		110	557	36	80	58

* Fonte: SINAN/SVS/MS - Boletim Epidemiológico Eletrônico, Junho 2009.

ACIDENTES CAUSADOS POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - DADOS de 2008*

Acidentes Causados Por		DADOS TOTAIS BRASIL			
		Total de Casos	Casos por milhão Habitantes	Óbitos	Letalidade %
1	Serpentes	26.156	130	119	0,50
2	Aranhas	20.993	110	19	0,10
3	Escorpiões	37.862	220	87	0,23
4	Lagartas	3.968	20	5	0,10
	- Lonomia	592	---	2	0,30
5	Abelhas	5.605	30	13	0,23
TOTAIS		94.584	510	243	0,1 - 0,5%

* Fonte: SINAN/SVS/MS - Boletim Epidemiológico Eletrônico, Junho 2009.

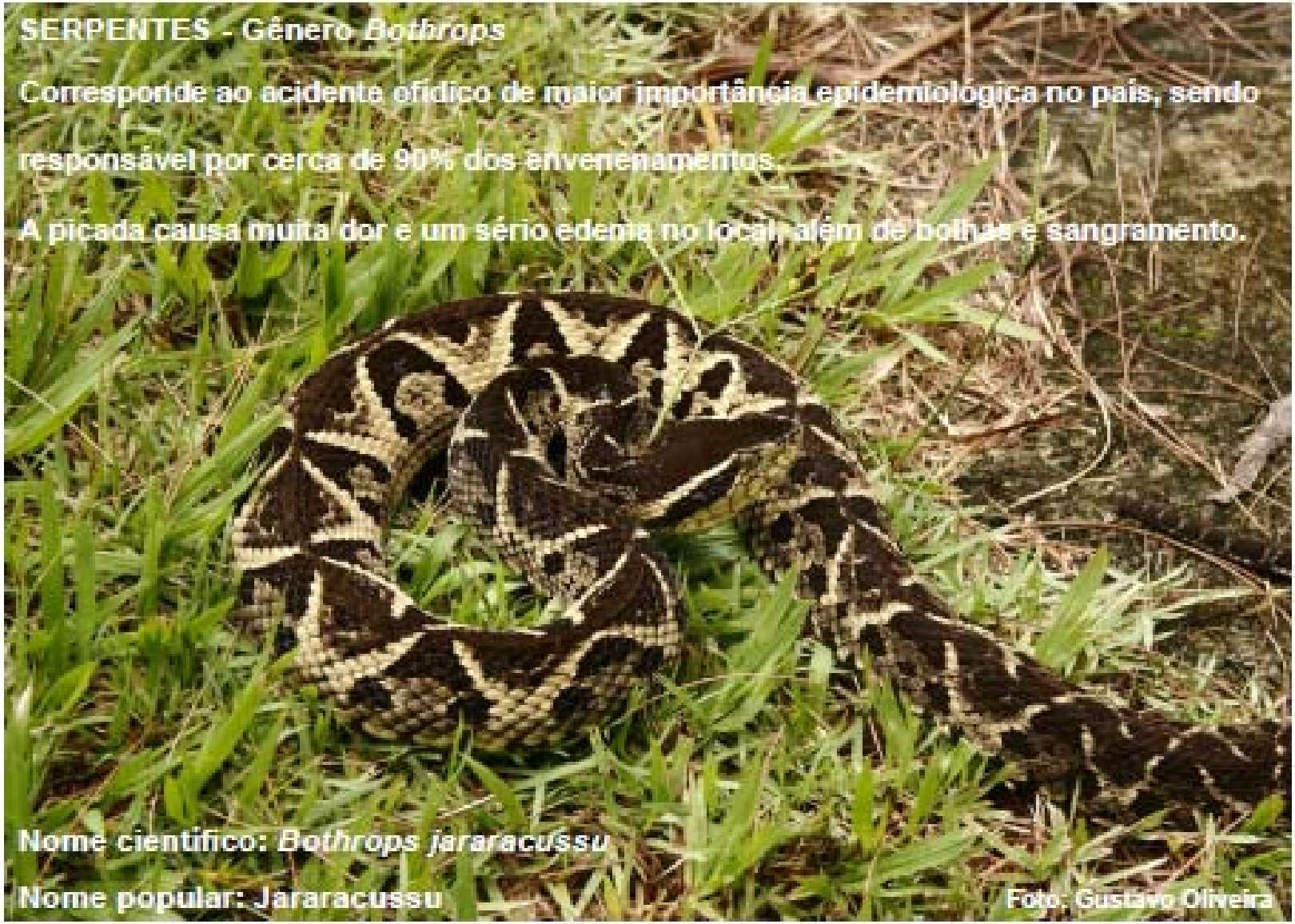
“Assustadores e Venenosos”

Assustado e chocado com as plantas tóxicas? Agora o temor e o choque serão ainda maiores. Nos próximos slides, os três animais peçonhentos mais famosos e perigosos que existem no Brasil serão apresentados. Em um total de 15.834 casos, 22 óbitos foram registrados apenas no ano de 2006 pelo SINITOX.

Diferente dos animais venenosos, que produzem o veneno, mas não possuem um aparelho inoculador (dentes ou ferrões), os animais peçonhentos têm glândulas por onde o veneno passa ativamente. Eles, então, injetam o seu veneno com facilidade e de maneira ativa.

Usar calçados e luvas nas atividades rurais e de jardinagem; afastar a cama da parede; evitar pendurar roupas fora de armários e não acumular lixo orgânico, entulhos e materiais de construção são algumas das prevenções mais importantes.


SERPENTES - Gênero *Crotalus*
É responsável por cerca de 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões. Apresenta o maior coeficiente de letalidade devido à freqüência com que evolui para insuficiência renal aguda (IRA).
Nome científico: *Crotalus durissus*
Nome popular: Cascavel
Foto: Gustavo Oliveira


SERPENTES - Gênero *Bothrops*
Corresponde ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país, sendo responsável por cerca de 90% dos envenenamentos.
A picada causa muita dor e um sério edema no local, além de bolhas e sangramento.
Nome científico: *Bothrops jararacussu*
Nome popular: Jararacussu
Foto: Gustavo Oliveira


SERPENTES - Gênero *Lachesis*
Existem poucos casos relatados na literatura. Por se tratar de serpentes encontradas em áreas florestais, onde a densidade populacional é baixa e o sistema de notificação não é tão eficiente, as informações disponíveis sobre esses acidentes são escassas.
Nome científico: *Lachesis muta*
Nome popular: Surucucu
Foto: Gustavo Oliveira


SERPENTES - Gênero *Micrurus*
Corresponde a 0,4% dos acidentes por serpentes peçonhentos registrados no Brasil.
Não são agressivas e possuem o veneno mais potente do país. Os acidentes podem evoluir para insuficiência respiratória aguda levando ao óbito.
Nome científico: *Micrurus corallinus*
Nome popular: Coral verdadeira
Foto: Gustavo Oliveira

ARANHAS - Gênero *Loxosceles*

Seu veneno causa ferida muito grande no local da picada. Os acidentes ocorrem quando a pessoa ao se vestir, ou mesmo durante o sono, comprime o animal contra a pele. Normalmente, a dor só aparece várias horas após a picada.



Nome científico: ***Loxosceles intermedia***

Nome popular: Aranha marrom

Foto: Gustavo Oliveira

ARANHAS - Gênero *Phoneutria*

Adotando posição de "ataque", ela é uma espécie que se defende quando se sente ameaçada. São encontradas em bananeiras, folhagens, madeiras e pedras empilhadas. Produz dor local imediata sem evoluir para lesão local.



Nome científico: *Phoneutria pert*

Nome popular: Armadeira

Foto: Gustavo Oliveira

ARANHAS - Gênero *Latrodectus*

Uma das aranhas mais perigosas do Brasil. Embora muito pequena, seu veneno é muito tóxico. Encontrada em vegetação de praia, restingas e áreas urbanas. Sua picada produz dor muscular muito forte, sudorese e tremores.



Nome científico: ***Latrodectus curacaviensis***

Nome popular: Viúva-negra

Foto: Gustavo Oliveira

ESCORPIÃO AMARELO – *Tityus serrulatus*

Provoca os acidentes mais graves, com alta mortalidade em crianças menores de sete anos. Única espécie no país que se reproduz por partenogênese (formada por fêmeas). Produz dor intensa na hora da picada.



Foto: Gustavo Oliveira

Em caso de acidente, ligue para o Disque-Intoxicação da RENACIAT (Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica), através do número 0800 722 6001.

Para mais informações acesse o portal www.fiocruz.br/sinitox do SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas), que tem como principal atribuição coordenar o processo de coleta, compilação, análise e divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento registrados no país pela RENACIAT.

(Site e logo do Sinitox em todos os slides!)

Animais: Instituto Vital Brazil

1. OS ACIDENTES COM *Lonomia obliqua*

1.1 O agente

Lonomia obliqua

- **Síndrome hemorrágica**
- **Hábito gregário**







Larvas de sexto instar de *Lonomia obliqua*. Fotos Lab. Bioquímica Farmacológica



Colônia de lagartas *Lonomia obliqua* sobre o tronco de uma árvore. Foto CIT-SC.

1. OS ACIDENTES COM *L. obliqua*

1.4 Quadro clínico

Paciente (M) 64 a – Interior do Paraná

- **Dia do acidente** – Esmagou uma colônia de aproximadamente **30 lagartas** com a mão direita. Imediatamente sentiu dor e apresentou edema e eritrema.
- **8h após acidente** – Vômitos, enchaqueca, hematêmese, **gengivorragia** e **hematúria**.
- **24h após acidente** – Atendimento no **primeiro Hospital**. Diagnóstico de sindrome hemorrágica com IRA. **Possível contato com lagarta *Lonomia* sp.** Encaminhado a outro hospital devido a **indisponibilidade de soro específico**
- **48h após acidente** – Atendimento no **segundo Hospital**. Edema, **equimoses por todo o corpo e hematúria intensa**. Administrado 10 ampolas SAL. Início do tratamento dos distúrbios renais.
- **Dia 4 após acidente** – Coma, bradicardia, hipotermia
- **Dia 7 após acidente** – Coma profundo. Tomografia revelou **múltiplos focos de hemorragia intracerebral**. Parada cardio-respiratória e óbito.

Arq Neuropsiquiatr 2006;64(4):1030-1032

- Sinais clínicos -



Gengivorragia



Equimoses



Tempo após acidente (h)

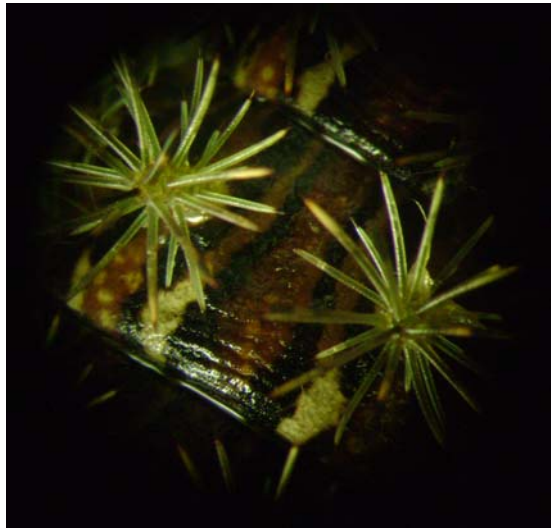
Hematúria

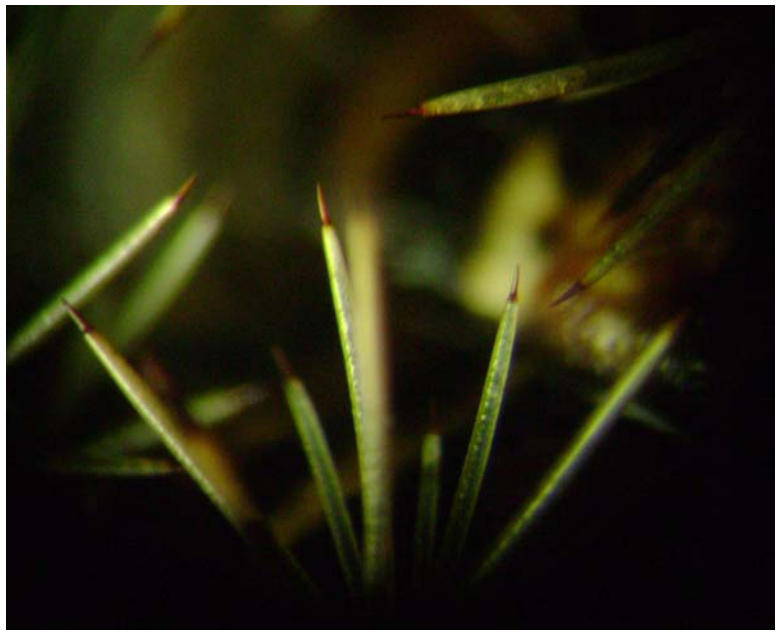


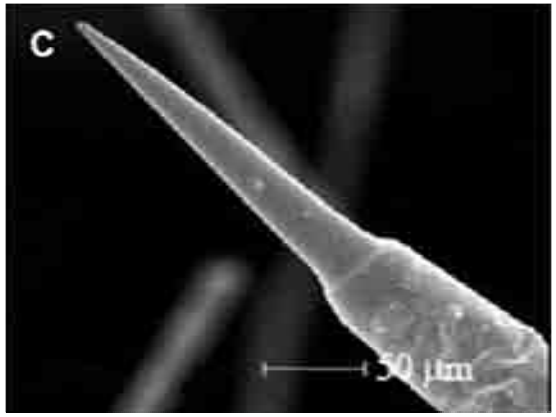
Equimoses

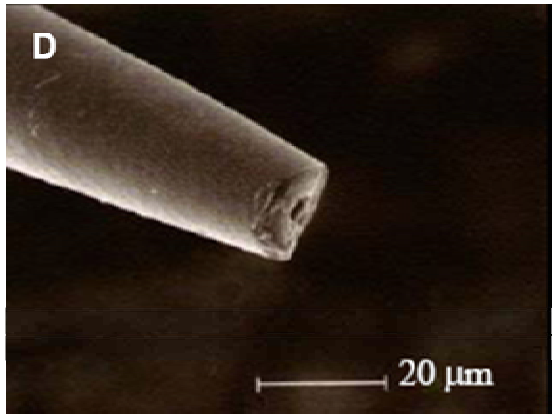
1. OS ACIDENTES COM *Lonomia obliqua*

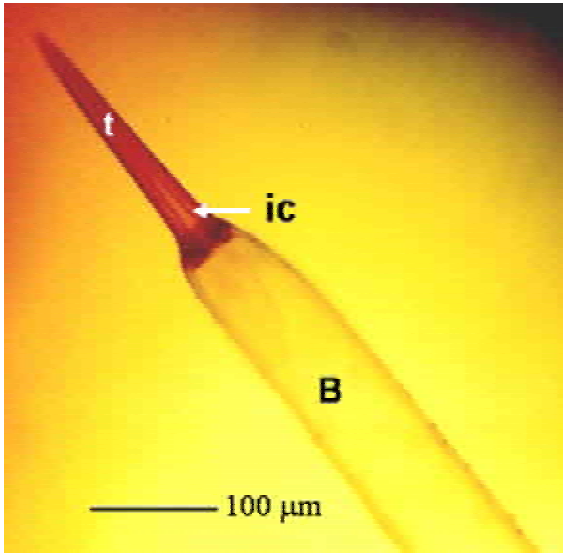
1.2 Estrutura das espículas









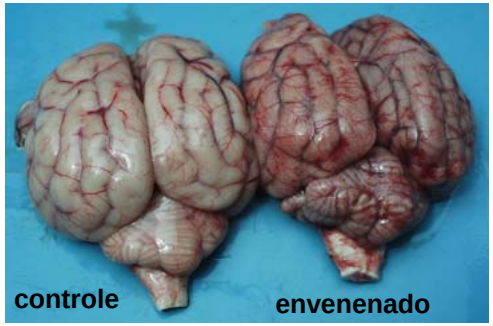


Veiga et al. (2001). Toxicon 39, 1343-1351.

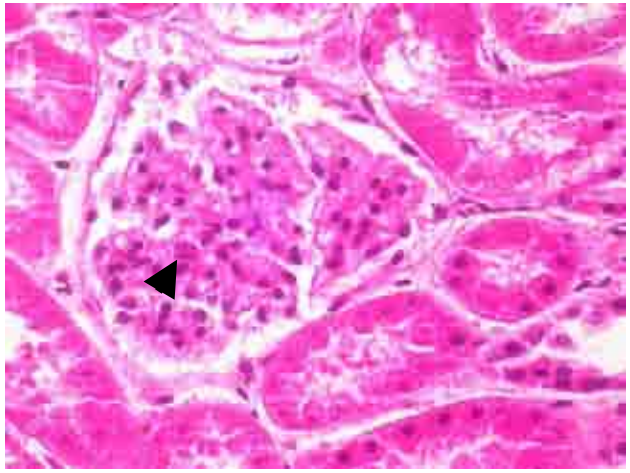
RESULTADOS EXPERIMENTAIS



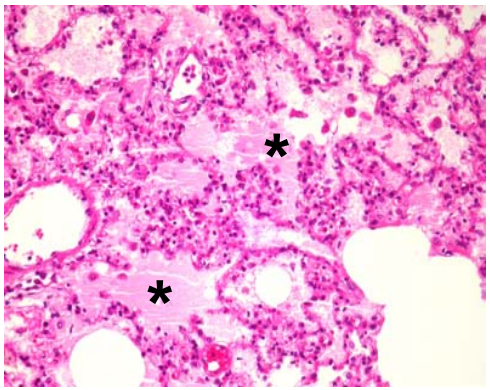
Hemorragia subcutânea



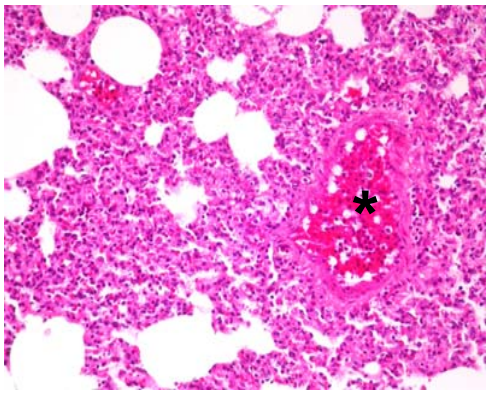
Hemorragia cerebral



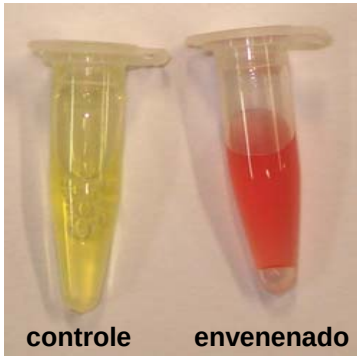
Rim – microtrombo glomerular



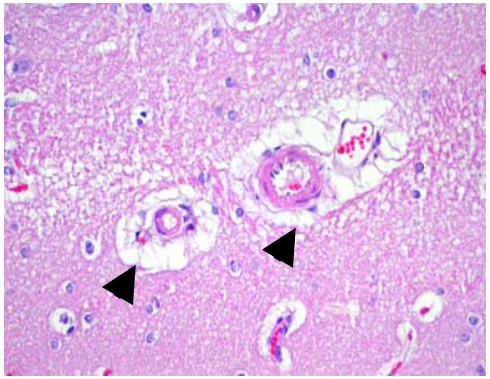
Pulmão - edema



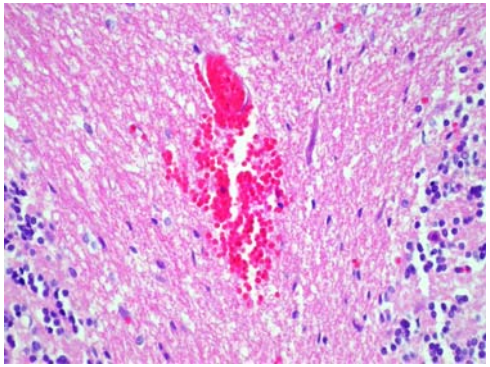
Pulmão - trombose



Urina – hematúria



Cérebro – edema perivascular

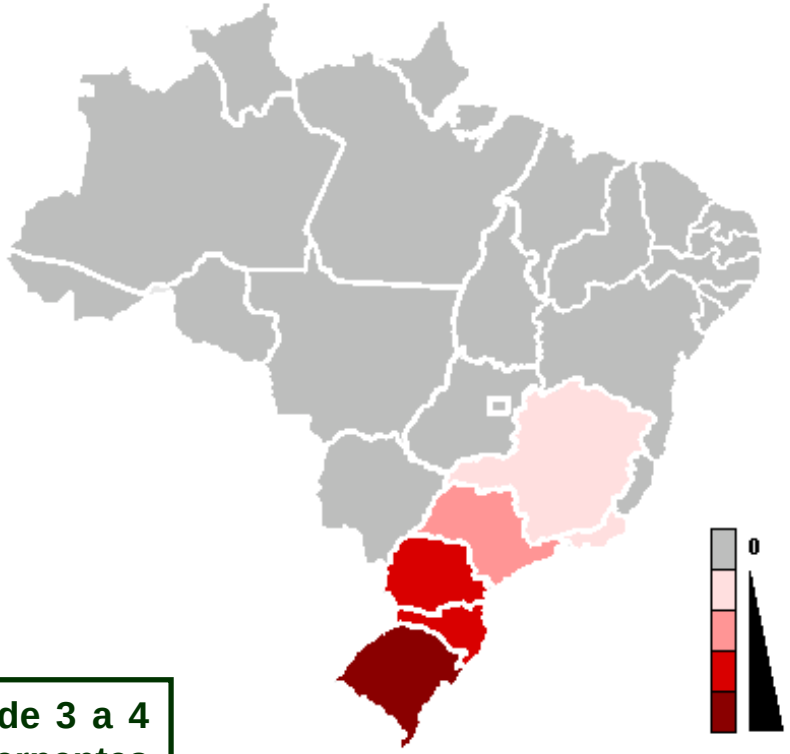


Cerebelo – hemorragia

1. OS ACIDENTES COM *Lonomia obliqua*

1.3 Epidemiologia

Estados de maior incidência de casos



No Rio Grande do Sul:

1009 ACIDENTES no período de 1997 – 2005 (CIT-RS)

Os níveis de letalidade dos acidentes são de 3 a 4 vezes maiores que os causados por serpentes (Toxicon 47, 2006, 68-74)

Abella, HB; Marques, MGB; Silva, KRLM; Rossoni, MG; Torres, JB. *Toxicovigilância Toxicologia Clínica (CIT-RS)*, 29-34, 2006.

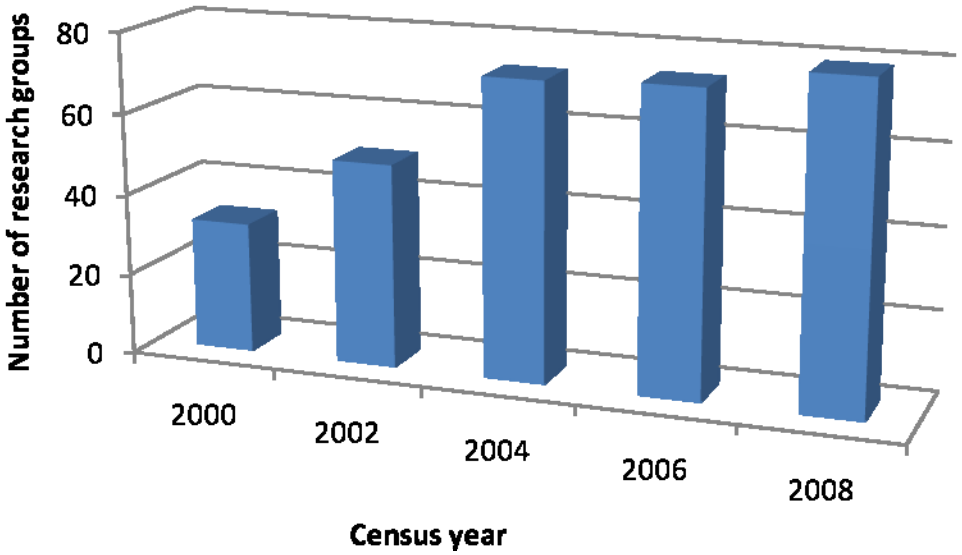


Fig. 4. Number of research groups working on toxins/toxinology in Brazil. Data were taken from the “Lattes Research Group Directory” from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) in December 2009. The word “ toxin” was searched in the name, research line or key word of the group.

Table 1. Number of documents published in Toxicon (1963-2009)

	Toxicon		
	Articles-Reviews	Address "Brazil"	
Period*			
All years: 1963 - 2009	4947	767	15.5 %
1963 - 1979	673	18	2.8 %
1980 - 1989	850	49	5.8 %
1990 - 1999	1301	204	15.7%
2000 - 2004	912	213	23.3 %
2005 - 2009	1193	291	24.4 %

* source: Thomson ISI Web os Science, date: December 18, 2009

** of which 739 are articles and 28 are reviews

Table 2. Citations of articles and reviews in Toxicon

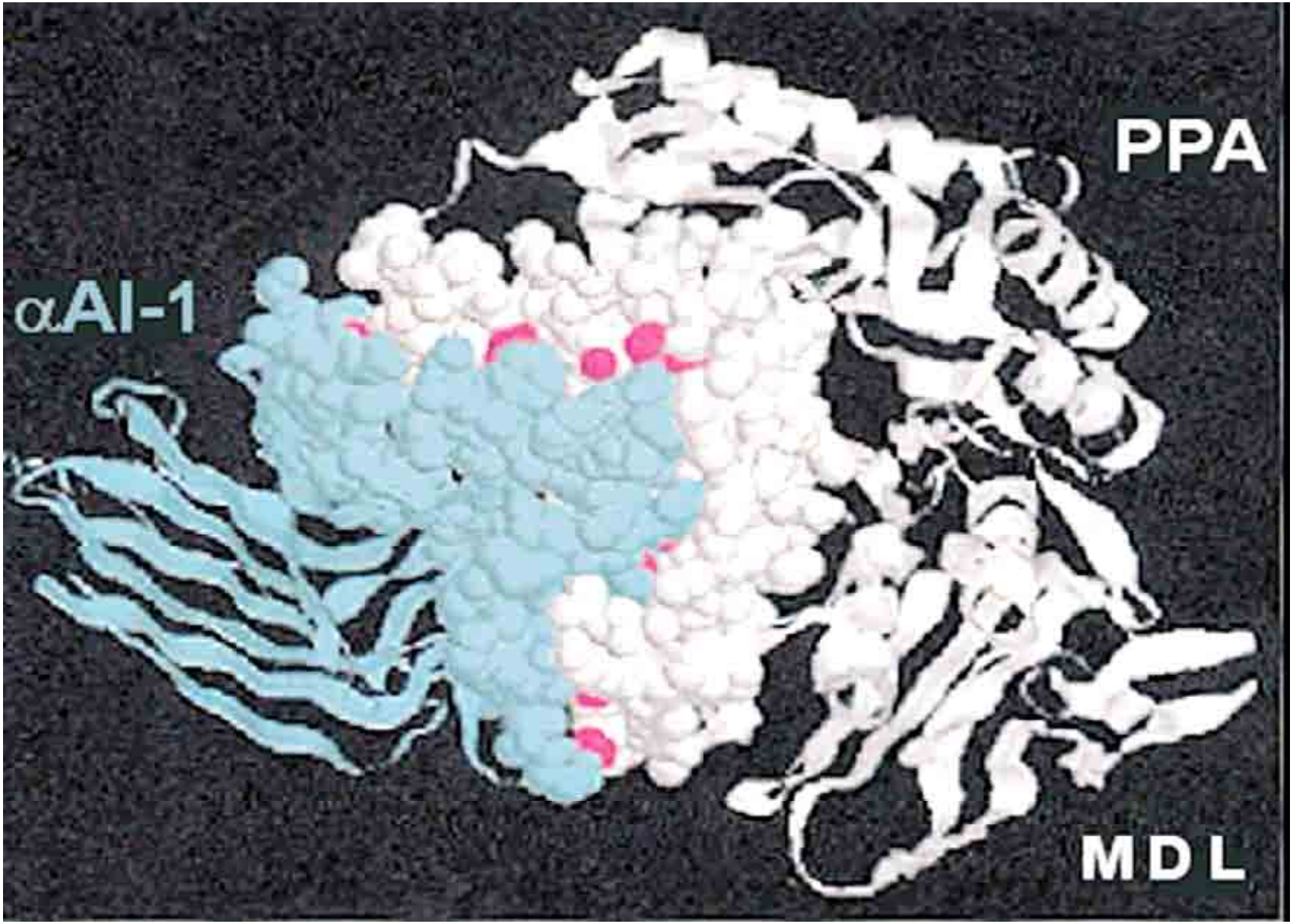
Index	All countries	Address of authors			
		USA	Brazil	Japan	Australia
Articles + reviews	4947	1,064	767	490	274
Total citations(*)	76,239	19,648	9,670	8,852	4,880
Factor H	82	59	40	45	33
articles with 100 citations or more	49	13	6	5	7

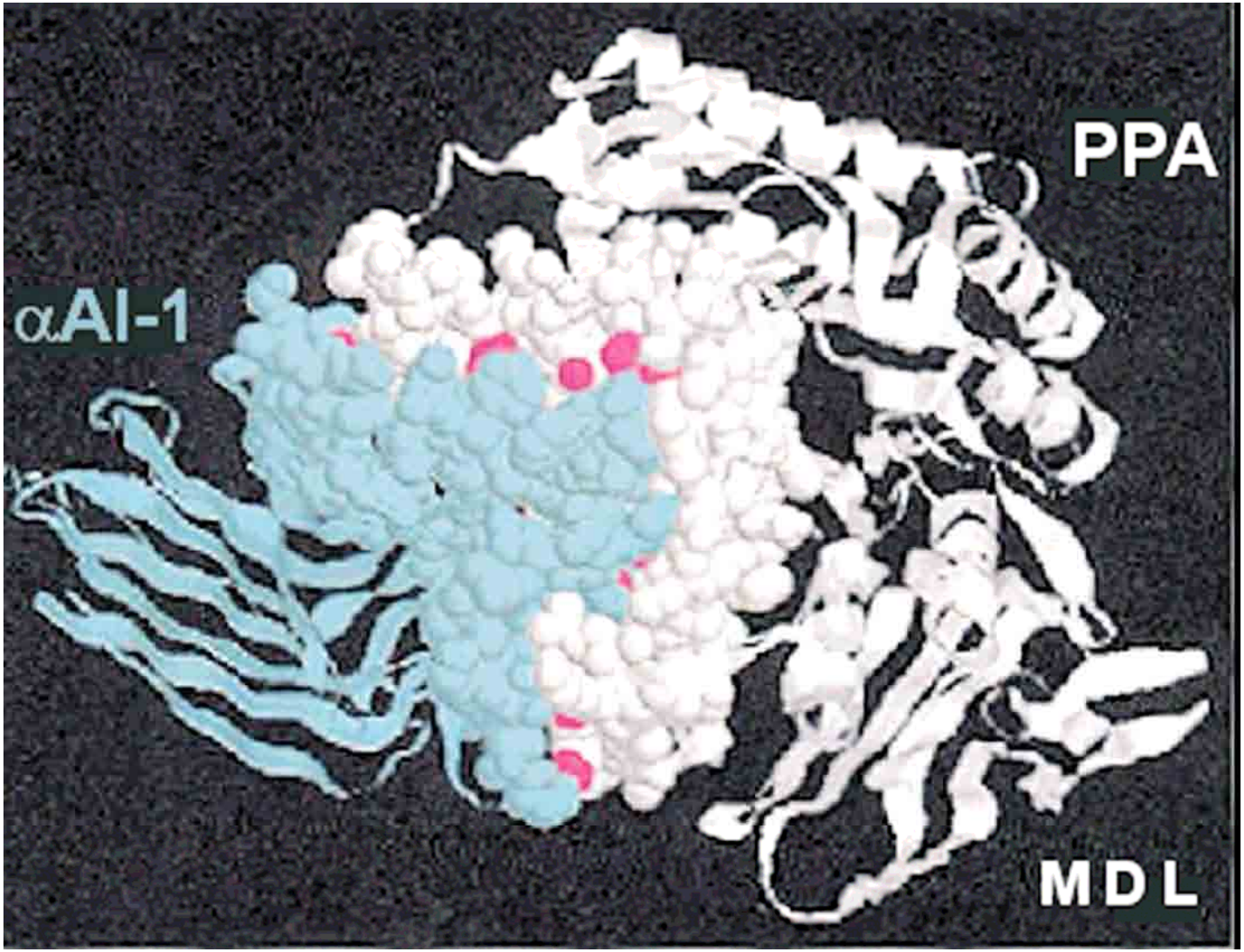
source: Thomson ISI Web of Science, date: December 30, 2009
*citations counted only for articles and reviews

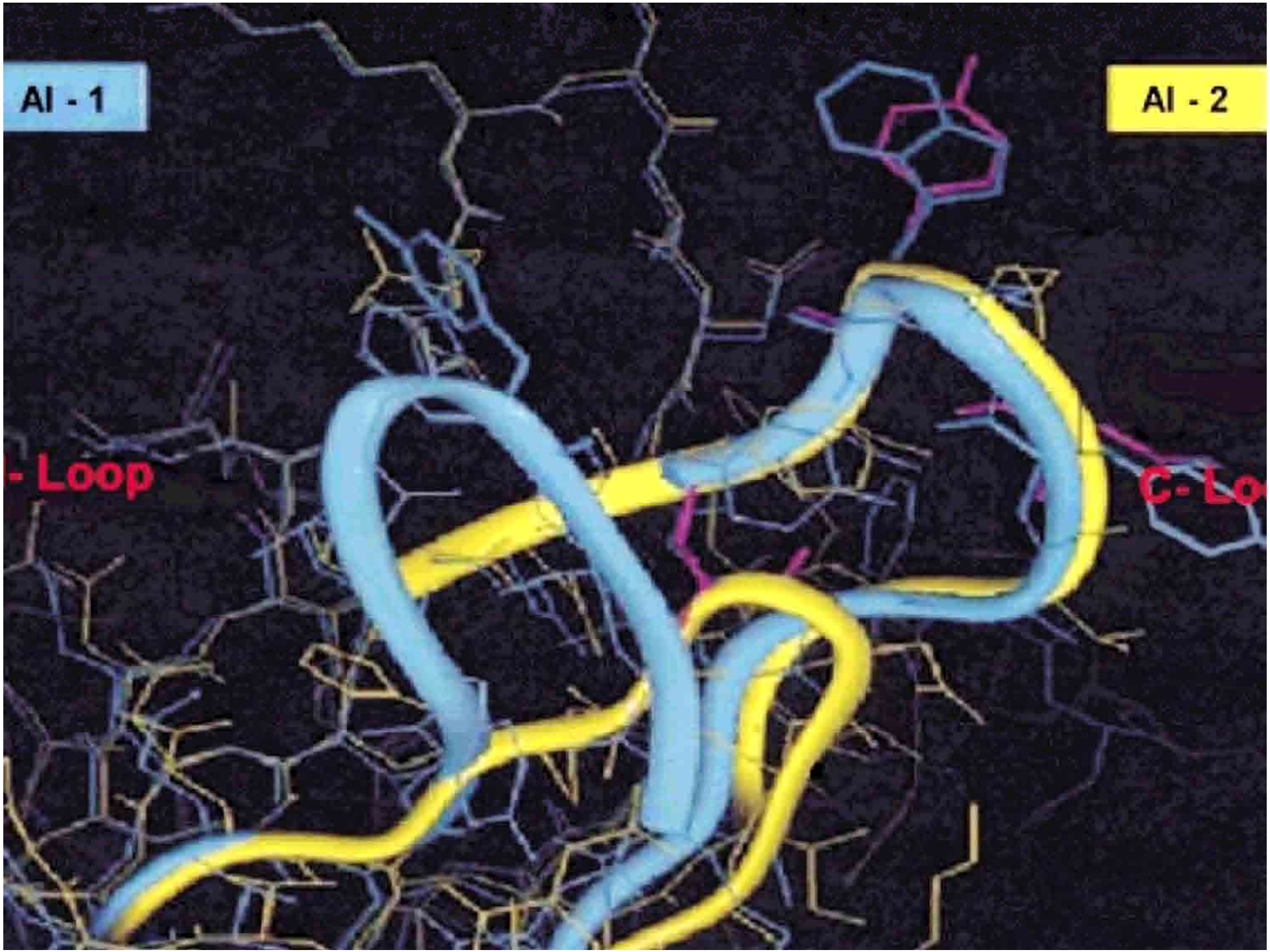
Table 4. Top five Brazilian authors and institutions with more publications in Toxicon*

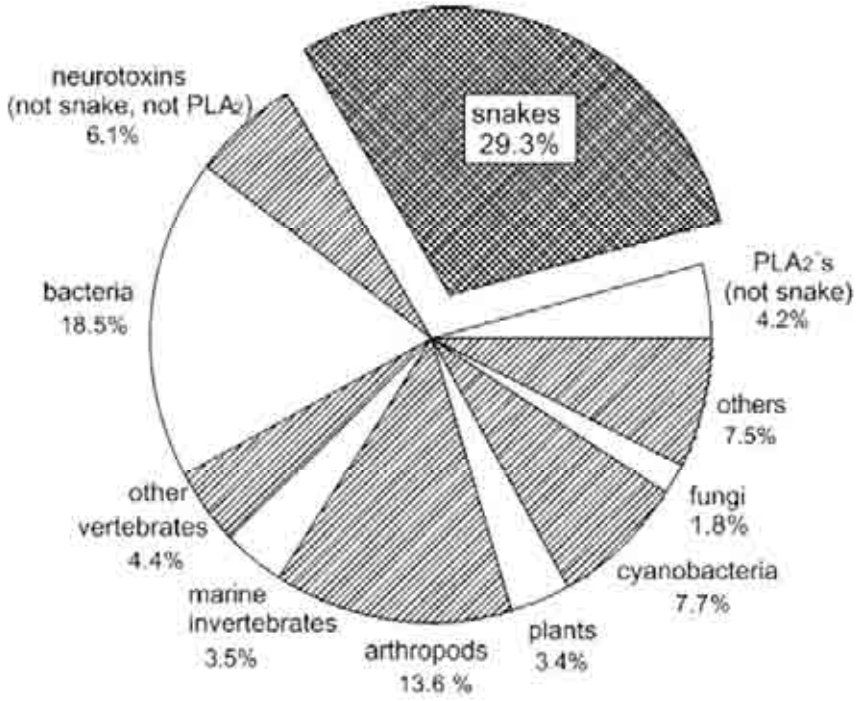
Brazilian Author (institution)	Number of publications **
Sergio Marangoni (Unicamp)	48
Carlos R. Diniz (UFMG)	36
José Roberto Giglio (USP-RP)	36
Carlos Chavez-Olortegui (UFMG)	34
Marcos H. Toyama (UNESP)	31

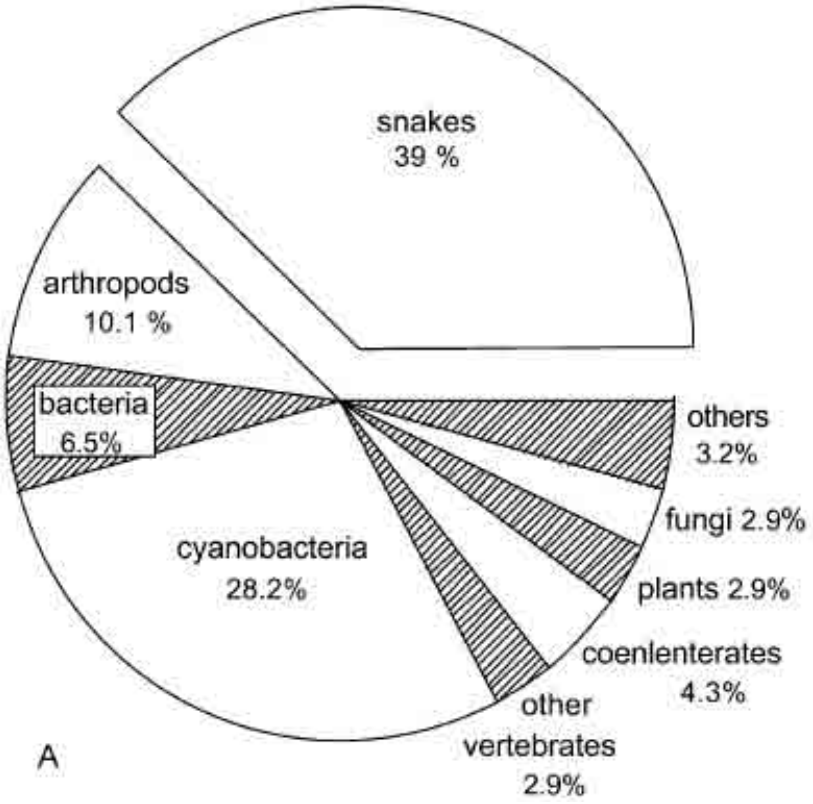
Brazilian Institution	Number of publications **
Inst. Butantan (IB)	244
Univ. São Paulo (USP)	203
Univ. Fed. Minas Gerais (UFMG)	124
Univ. Est. Campinas (UNICAMP)	123
Fund. Ezequiel Dias (FUNED)	57

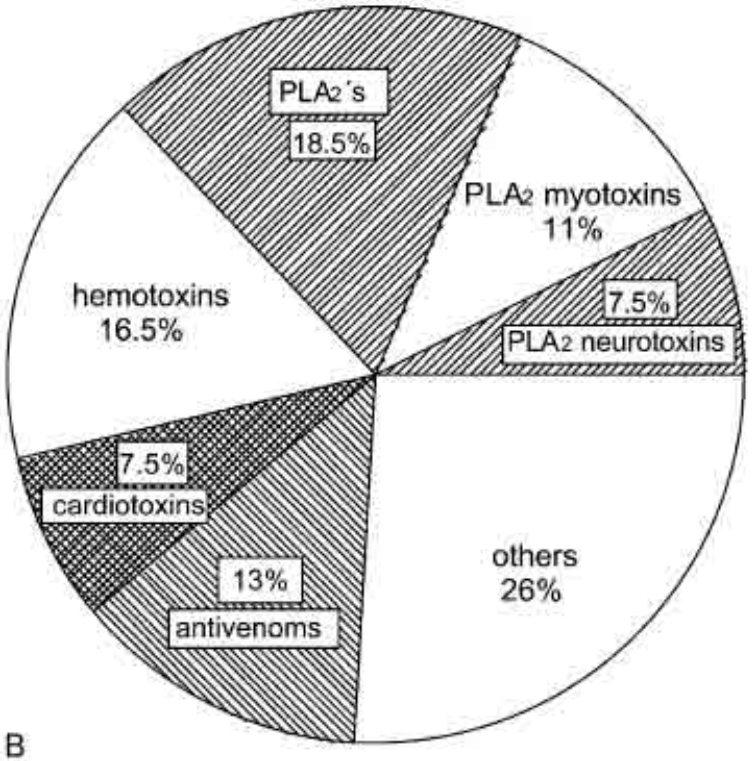

αAI-1
PPA
MDL


αAI-1
PPA
MDL


AI - 1
AI - 2
- Loop
C- Lo


neurotoxins
(not snake, not PLA2)
6.1%
snakes
29.3%
PLA2's
(not snake)
4.2%
bacteria
18.5%
others
7.5%
other
vertebrates
4.4%
fungi
1.8%
cyanobacteria
7.7%
marine
invertebrates
3.5%
arthropods
13.6 %
plants
3.4%


snakes
39 %
arthropods
10.1 %
bacteria
6.5%
cyanobacteria
28.2%
others
3.2%
fungi 2.9%
plants 2.9%
coenlenterates
4.3%
other
vertebrates
2.9%
A


PLA2´s
18.5%
PLA2 myotoxins
11%
7.5%
PLA2 neurotoxins
hemotoxins
16.5%
7.5%
cardiotoxins
13%
antivenoms
others
26%
B

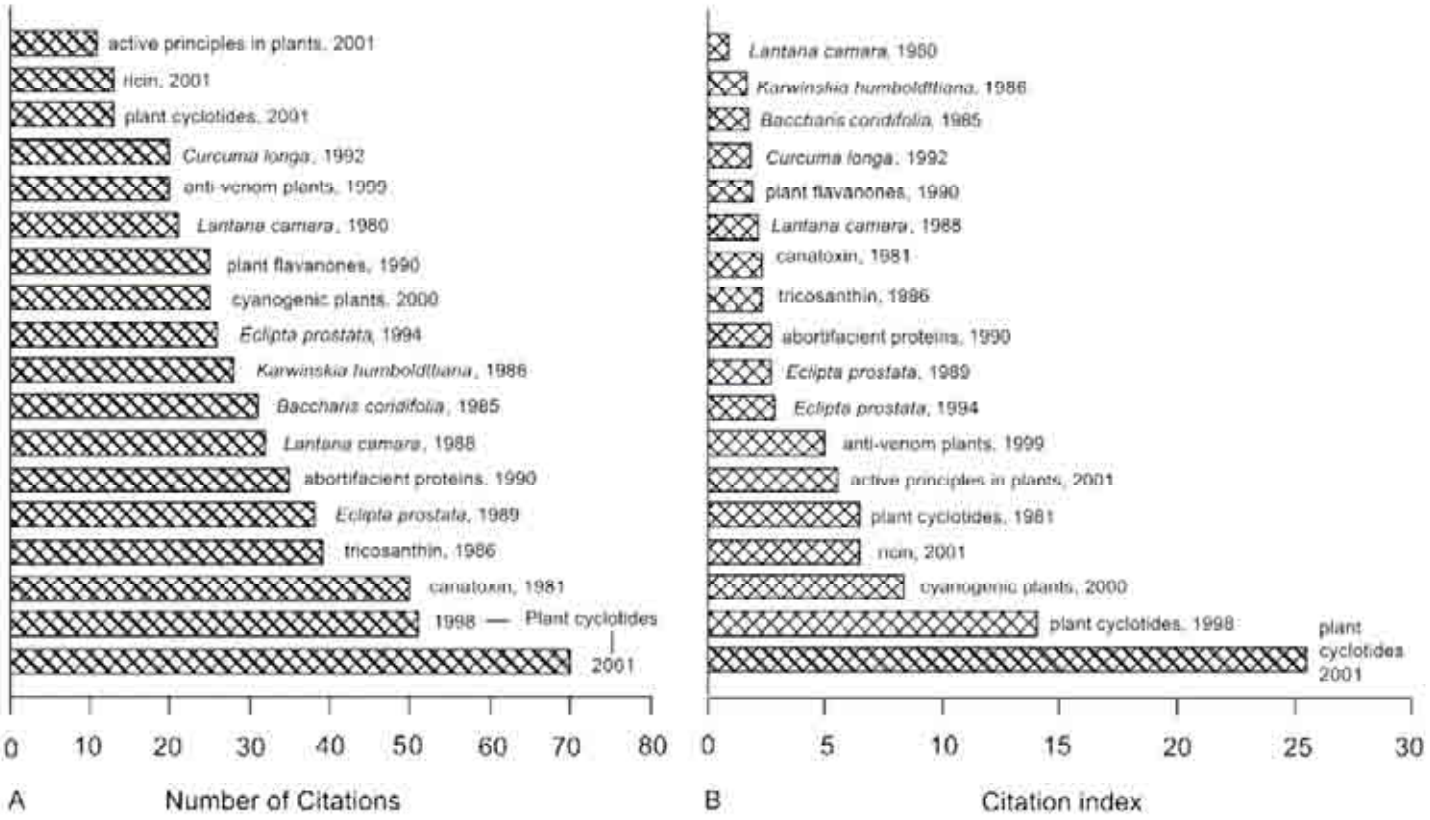


Fig. 3. Most cited papers on plant topics published in Toxicon in the 1963–2003 period. Articles and review papers dealing with plant topics published in Toxicon in the period 1963–2003 with at least 20 citations or with a citation index of 5.0 or higher are shown in the figure, ranked by the number of citations received (panel A) and by their citation index (panel B). The topic and year of publication of the 18 papers are also shown.

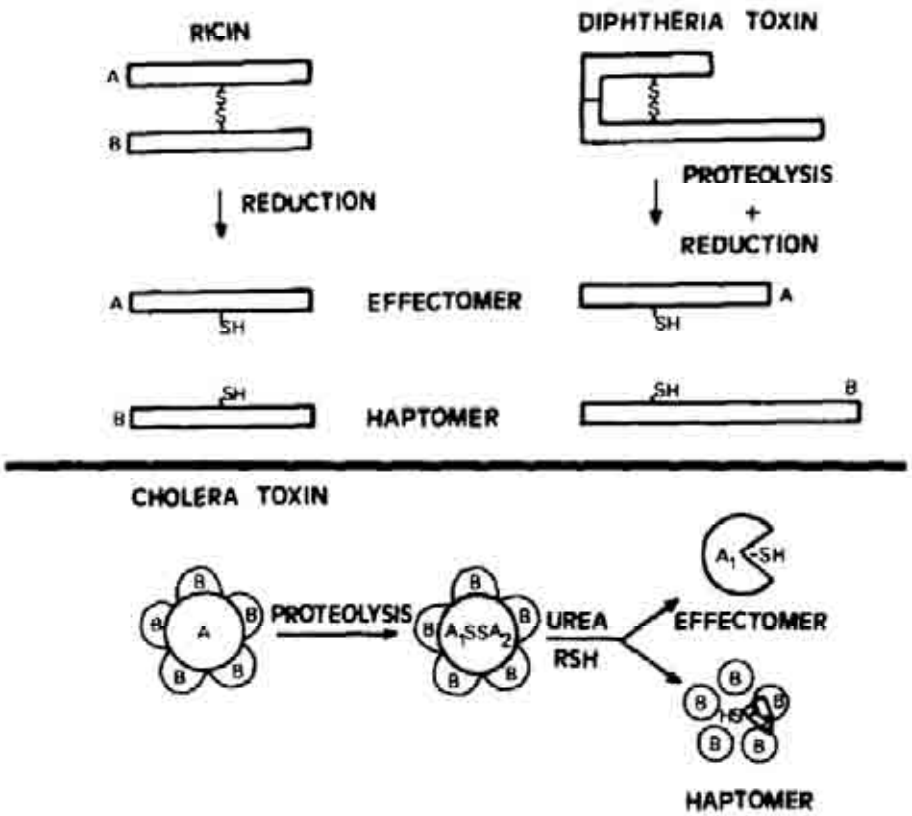
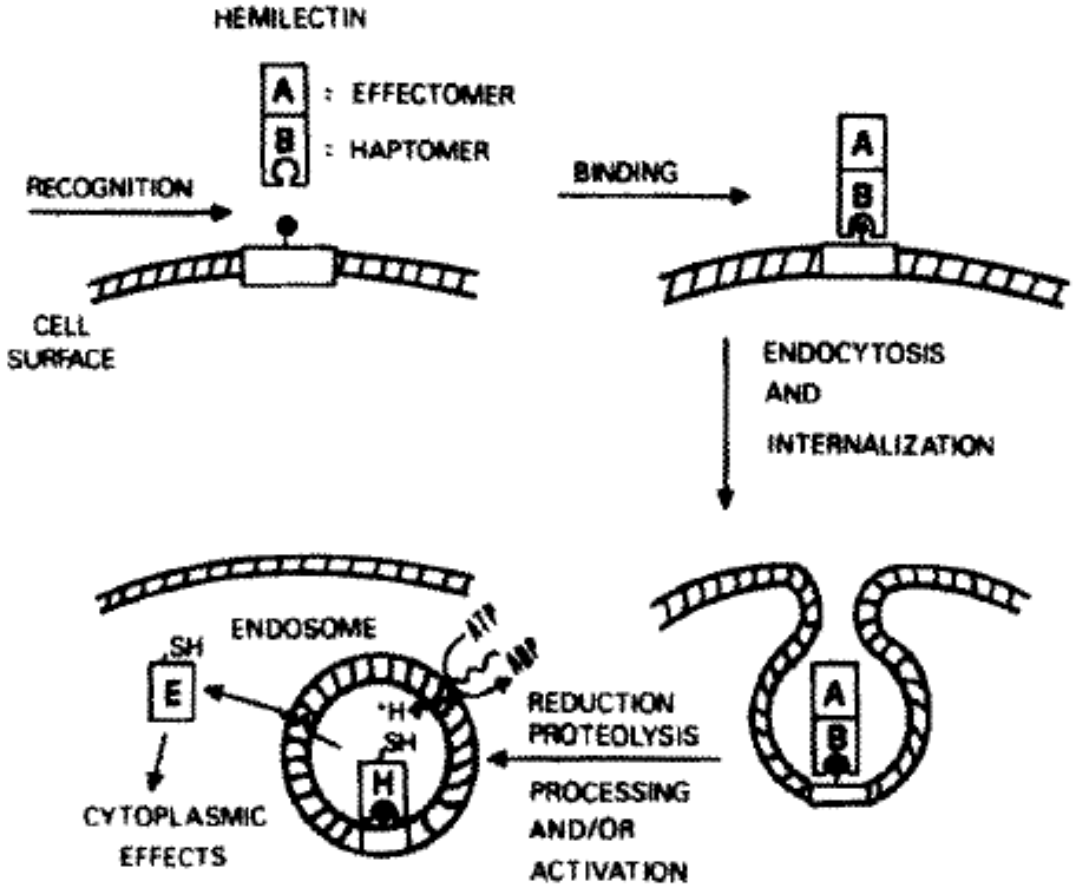


FIG. 2. STRUCTURE OF TOXIC HEMILECTINS FULFILLING THE A AND B SUBUNIT MODEL.
Toxic proteins fulfilling the A and B subunit model are characteristically composed of two polypeptides chains or domains with distinct biological properties. The haptomer or B domain behaves as a monovalent lectin and binds to glycoderivatives present at the surface of the target cell. The effectomer or A domain, once released inside the target cell, acts enzymatically to modify cytoplasmic components leading to the toxic effects.

Toxicon Vol. 29, No. 7, pp. 791–806, 1991

CÉLIA R. CARLINI and JORGE A. GUIMARÃES



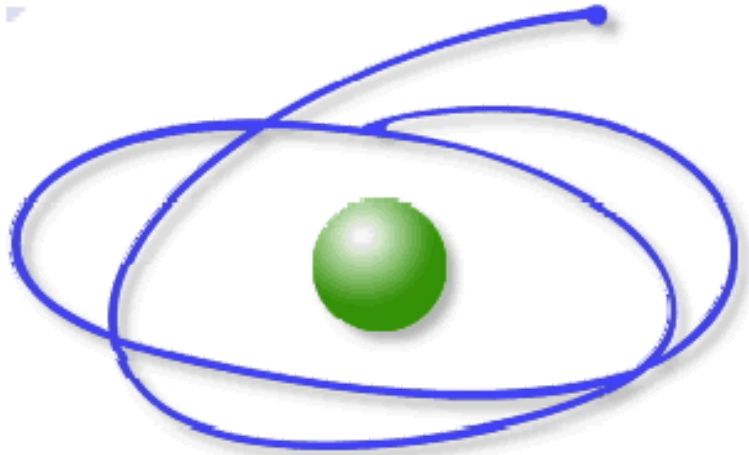
Saber é preciso



Só sei que:

"Estamos apenas começando, devemos continuar e nunca terminaremos" (Fernando Sabino)

MUITO OBRIGADO





Toxinas Proteicas:

Mecanismos de Ação e Aplicabilidades

Célia R. Carlini

Out/2003

TOXINAS PROTEICAS:
Modelos de investigação estrutura X função e aplicações como ferramentas biológicas.

Conhecimento multidisciplinar:

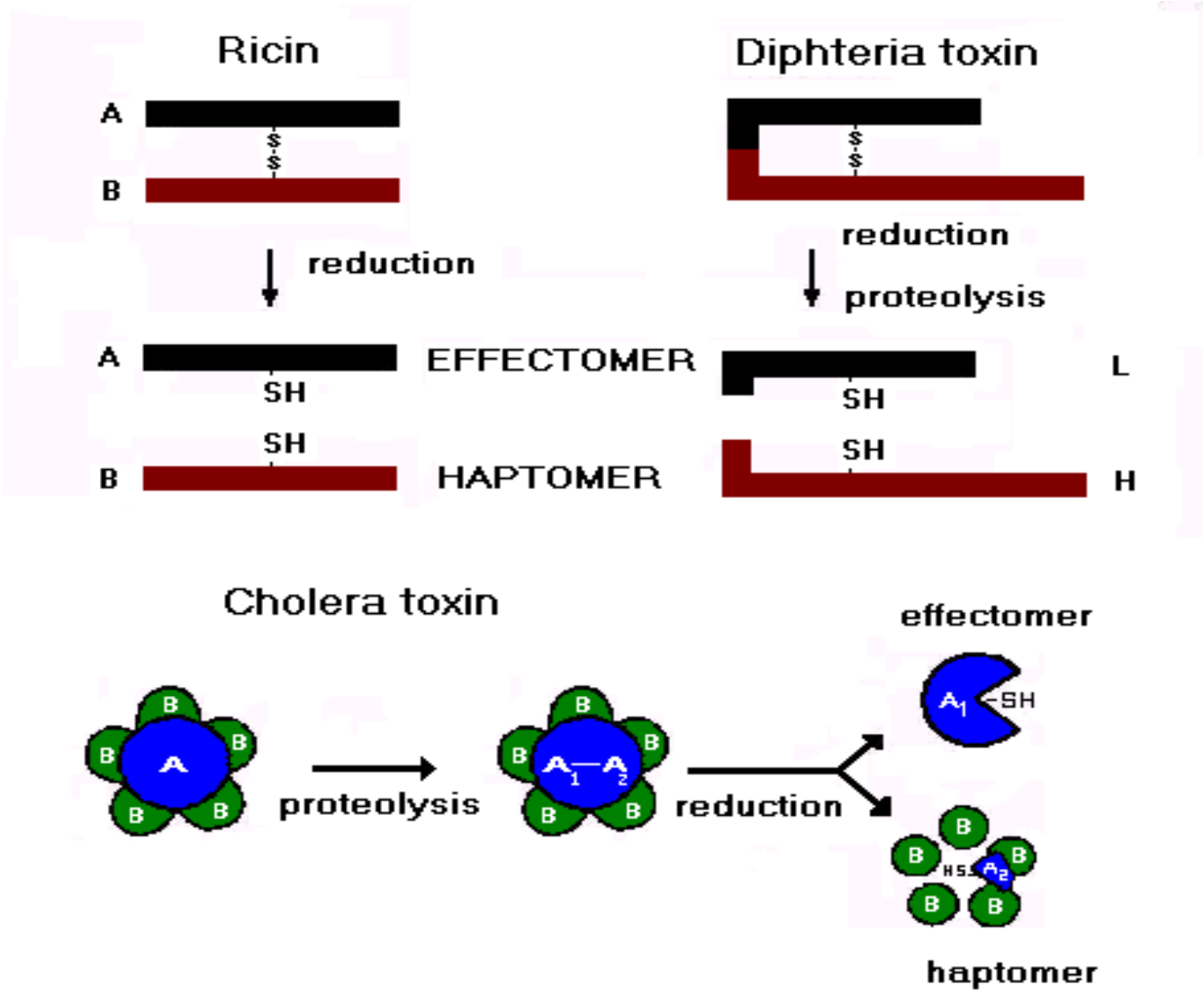
- *propriedades estruturais da proteína*
- *fisiologia do organismo afetado*
- *interação com receptores/aceptores na célula- ou tecido-alvo*
- *endocitose e translocação para o meio intracelular, processamento das toxinas no lisossomo, efeitos enzimáticos na célula-alvo.*

1. toxinas que interferem na síntese proteíca:
RNA N-glicosidases (ricina e abrina; RIP's 1 e 2)
ADP-ribolisases (tox. diftérica, Pseudomonas exotoxina A)

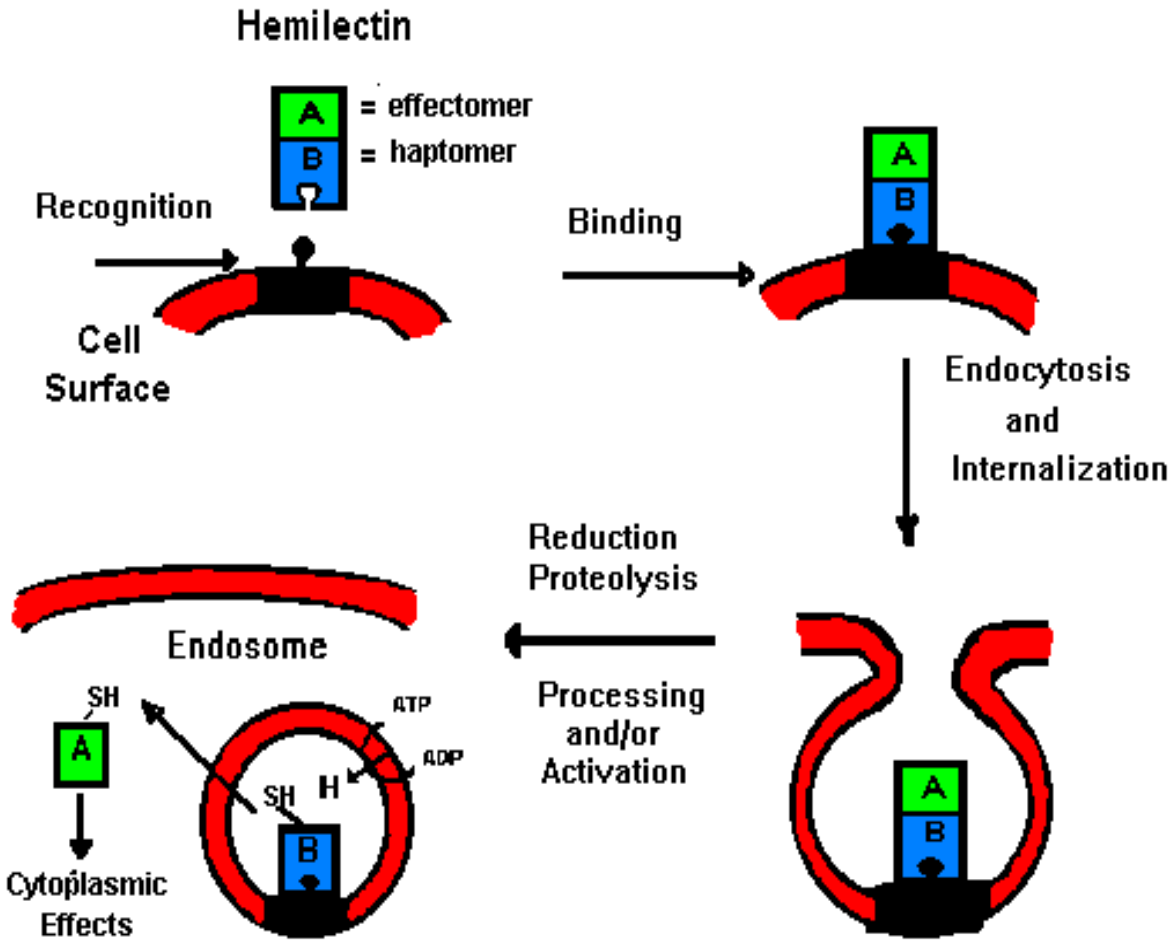
2. toxinas que interferem com Proteínas G:
ADP-ribosilases (tox. cólera e tox. Pertussis)

3. toxinas clostridiais:
zinco-metaloproteinases (tox. tetânica e botulínicas)

5. proteínas inseticidas: inibidores de enzimas hidrolíticas.



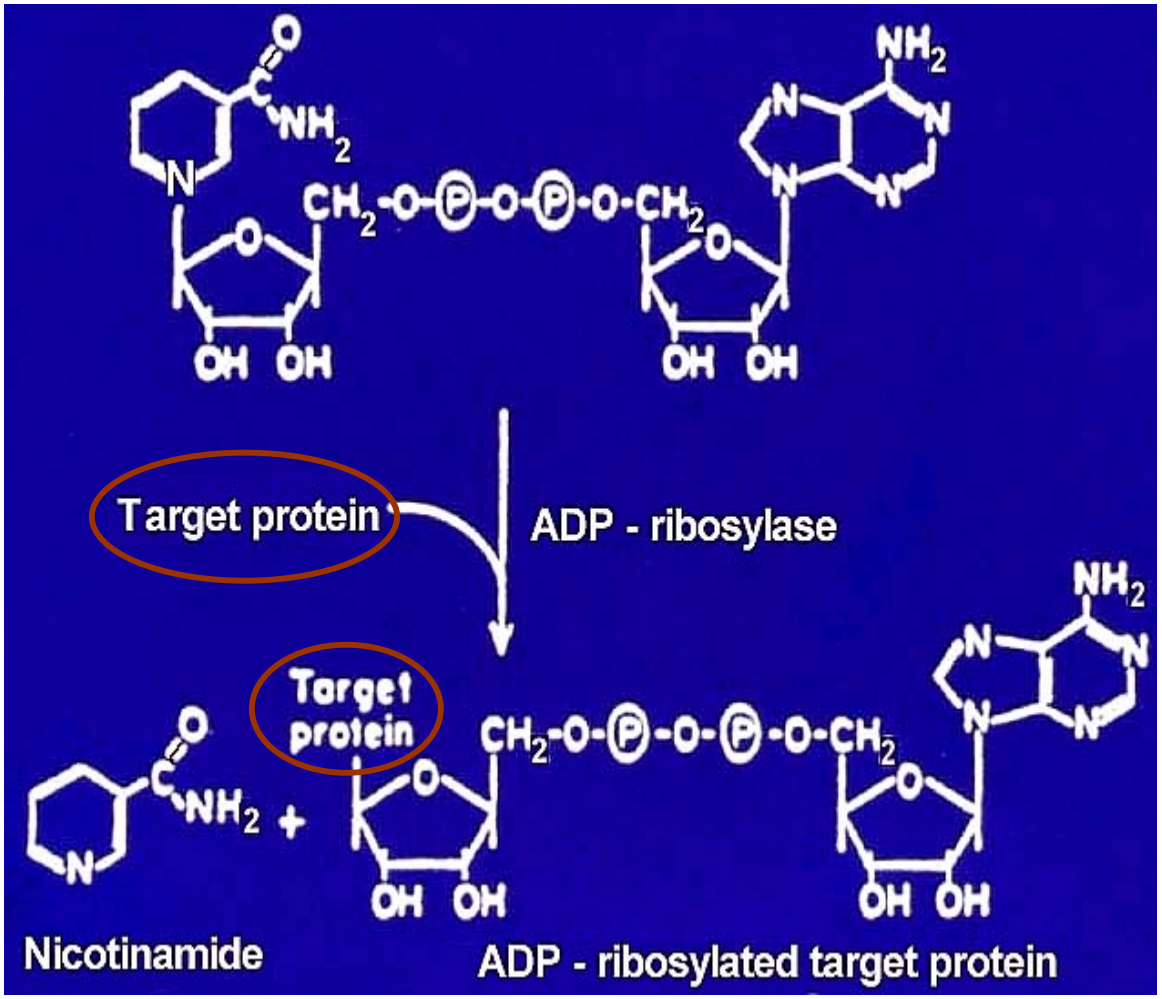
Estrutura geral de toxinas proteicas com modelo AB



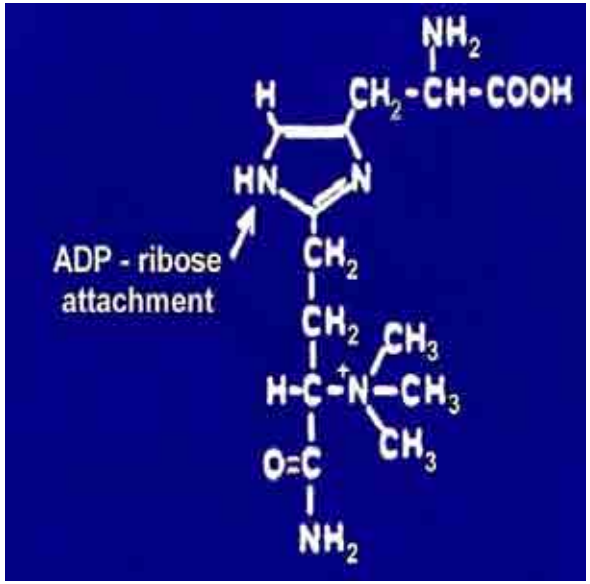
Ligação a receptor e internalização de complexos proteicos tipo AB

Efeitos Intracelulares de Toxicas Proteicas

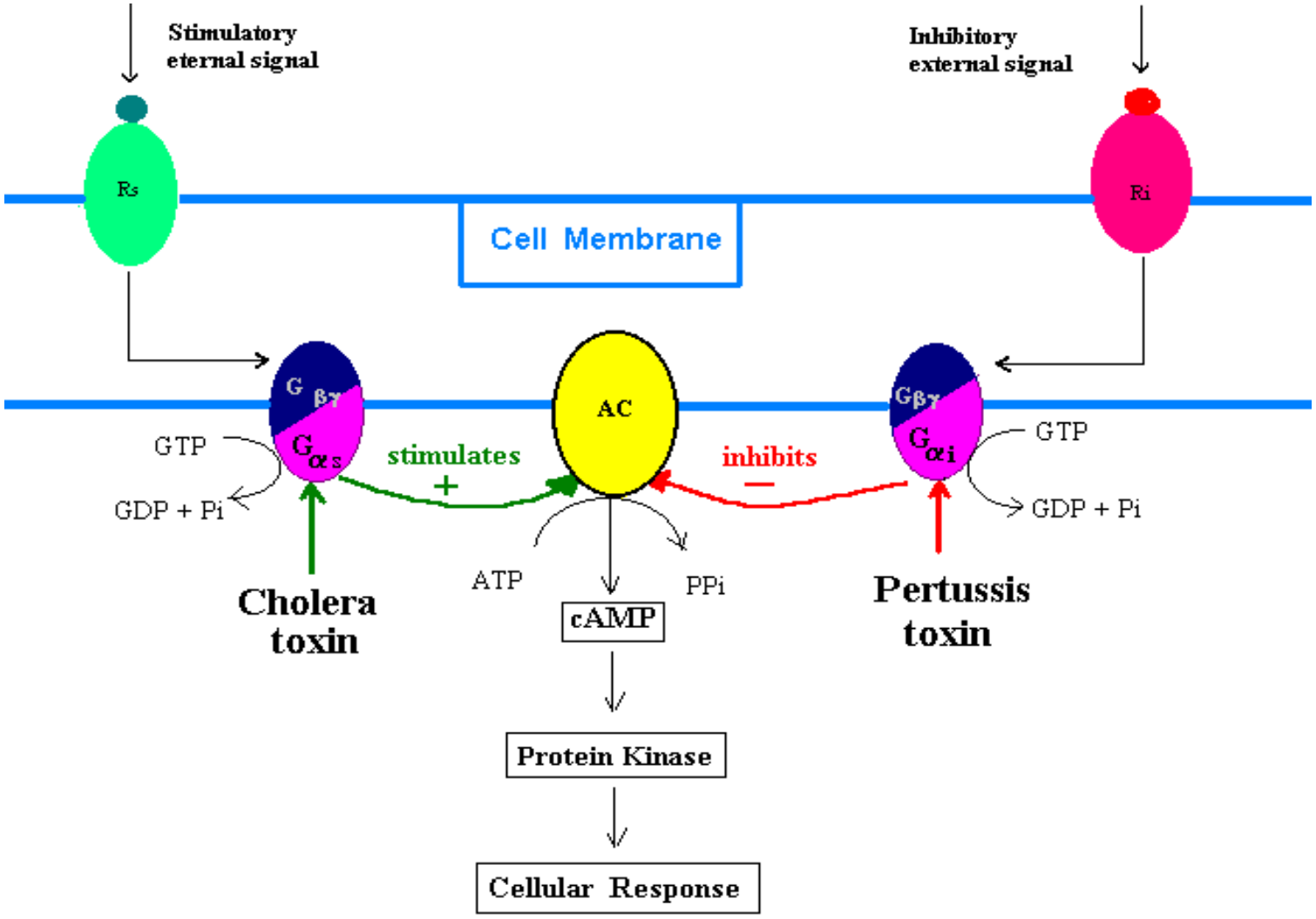
Toxinas bacterianas como NADH-ADP ribosilases



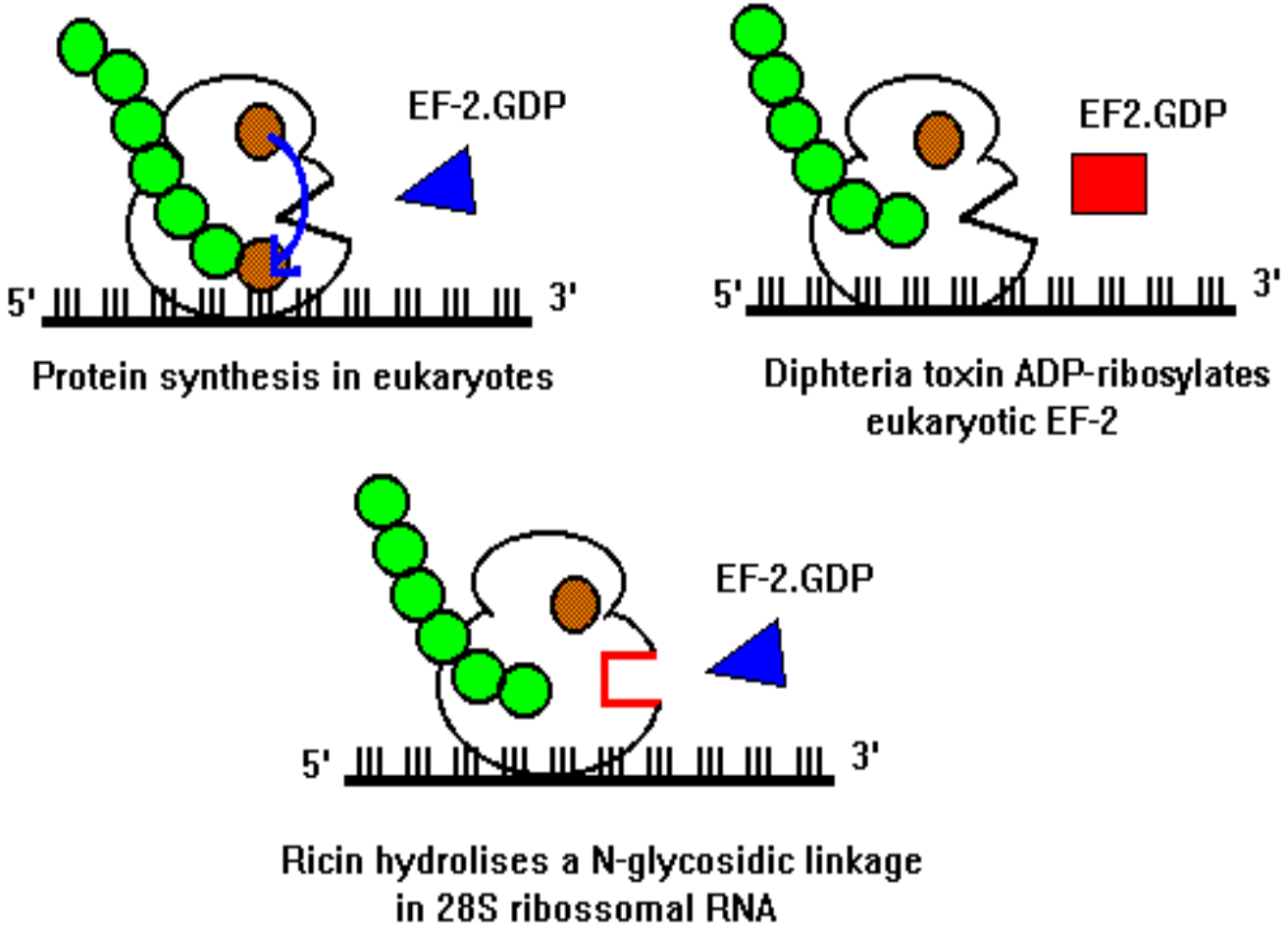
Diphtamida (um análogo de arginina) é o sítio de ADP-ribosilação no fator de elongação eukarioto EF-2



Toxina diftérica ADP ribosila o fator de elongação eucarioto EF-2, inibindo a síntese p



As toxinas da cólera e Pertussis ADP-ribosilam Proteínas G e interferem com as vias de sinalização reguladas por cAMP.



Mecanismos de ação de toxinas proteicas que inibem a síntese proteica

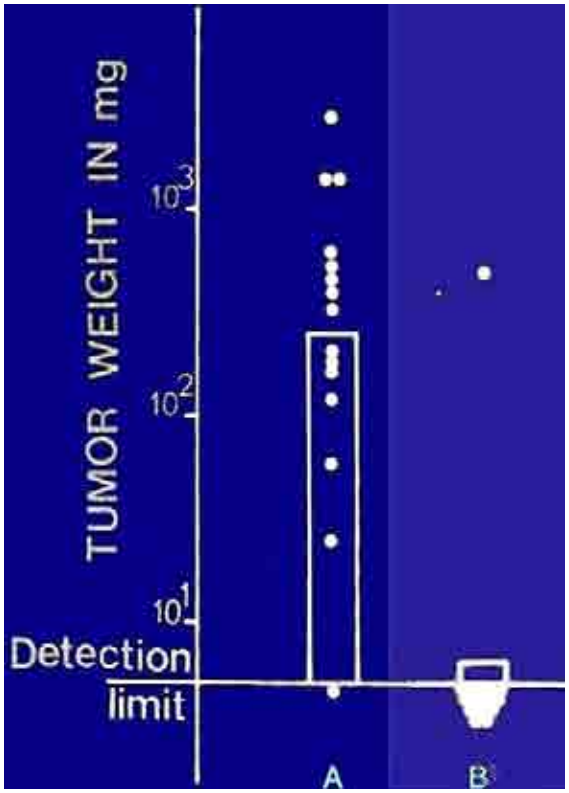
Effects of Toxins and A-chains on protein synthesis

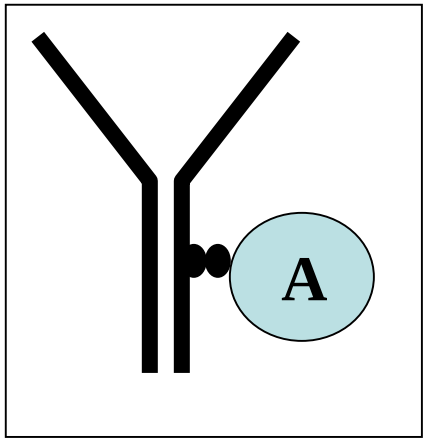
TOXIN	Inhibition of Protein Synthesis (IC_{50}, nM)	
	Cells[1]	Cell-free[2]
Ricin	0,001	84
A-chain		0,1
Abrin	0,004	88
A-chain		0,5
Viscumin	0,008	43
A-chain		3,5
Modeccin	0,0003	45
A-chain		2,3
Volkensin	0,012	84
A-chain		0,4

[1] HeLa cells
[2] rabbit reticulocyte lysate

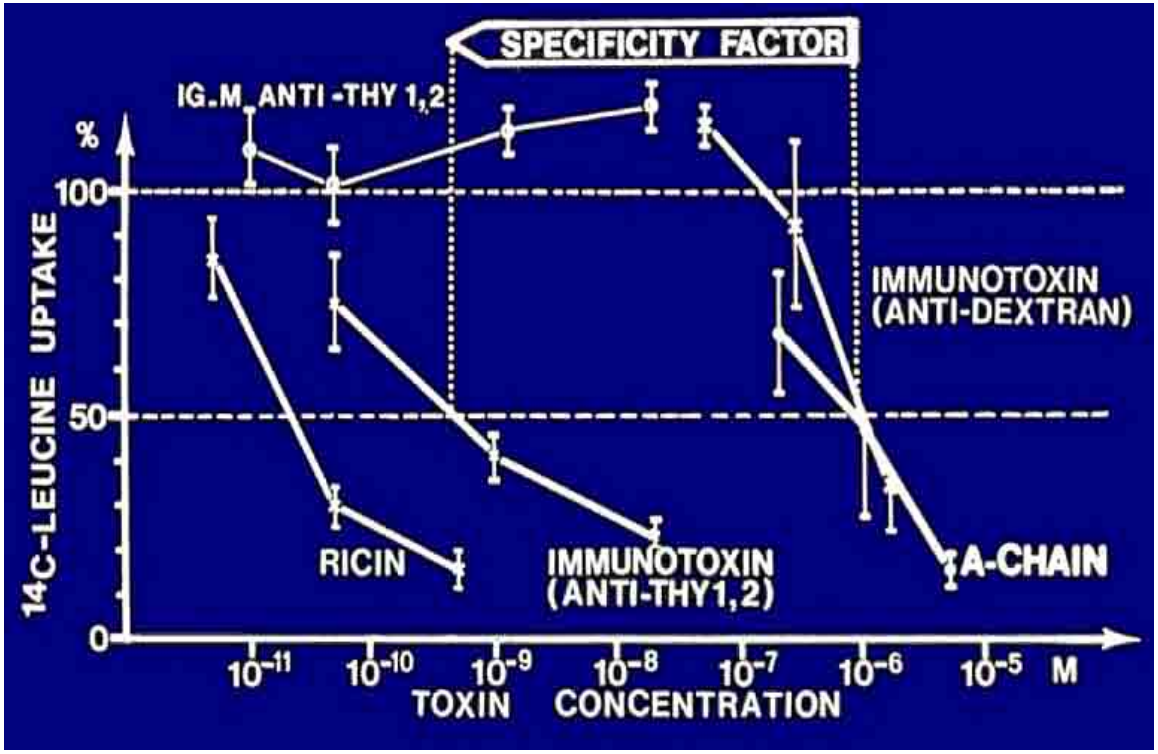
Cadeia A das RIPs-2 é um RNA-glicosidase que remove a Adenine 4324 do rRNA 28S

4315 -C-U-C-A-G-U-A-C-G-A-G-A-G-G-A-A-C-C-G-C-A-
4335



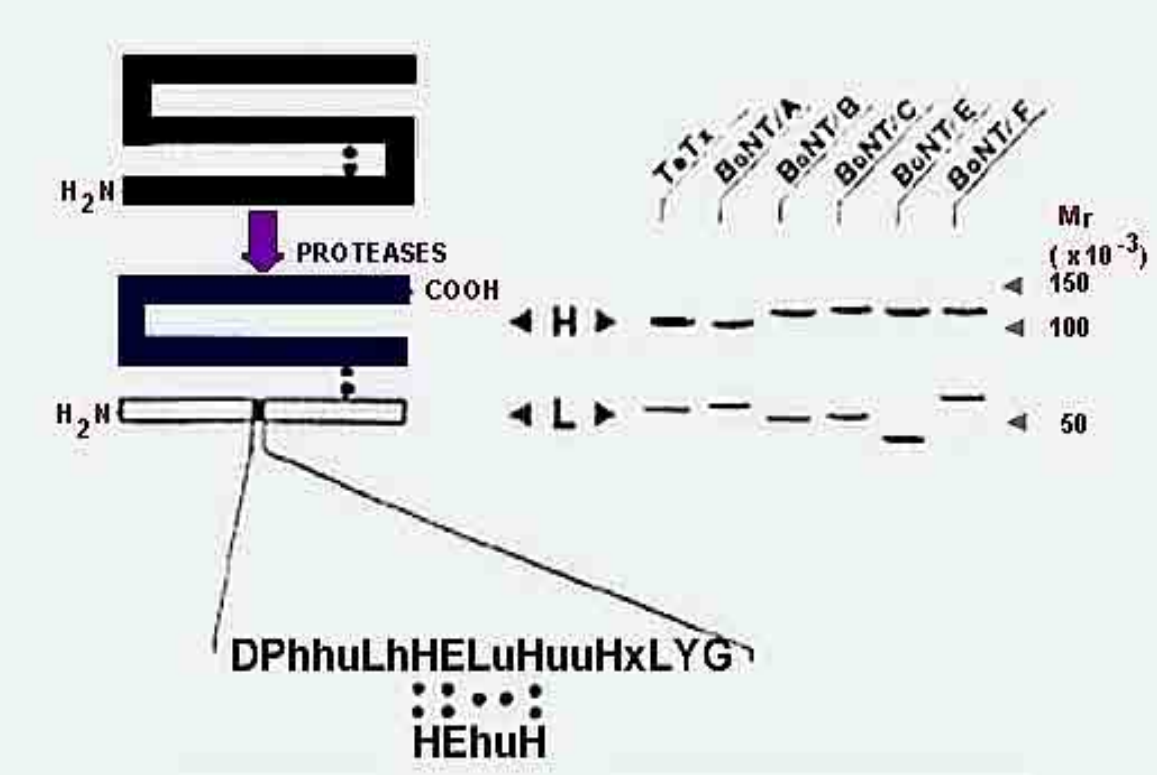


Imunotoxinas são “custom-made”



Imunotoxinas são específicas para o tipo celular “escolhido” pela sua porção anticorpo

Comparação da Estrutura Molecular de neurotoxinas de *Clostridium.*



Tétano:

- *Clostridium tetani*

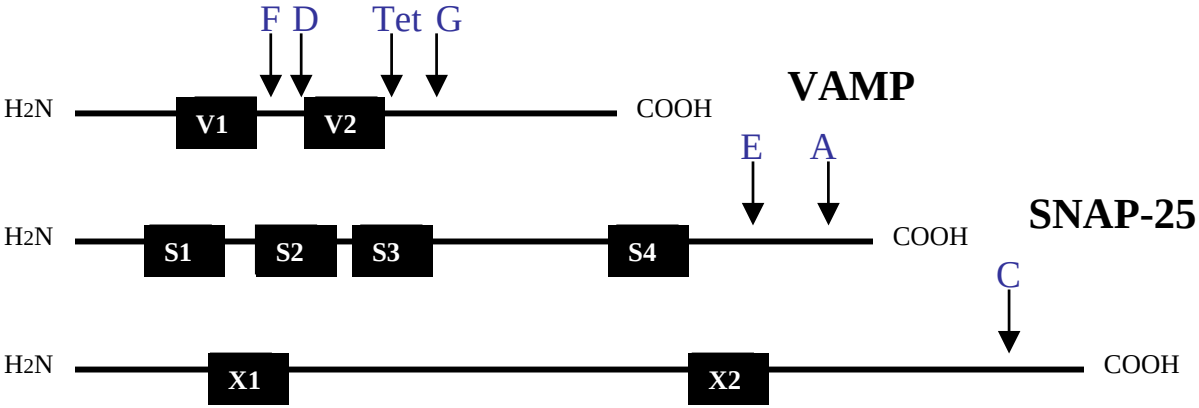
Botulismo

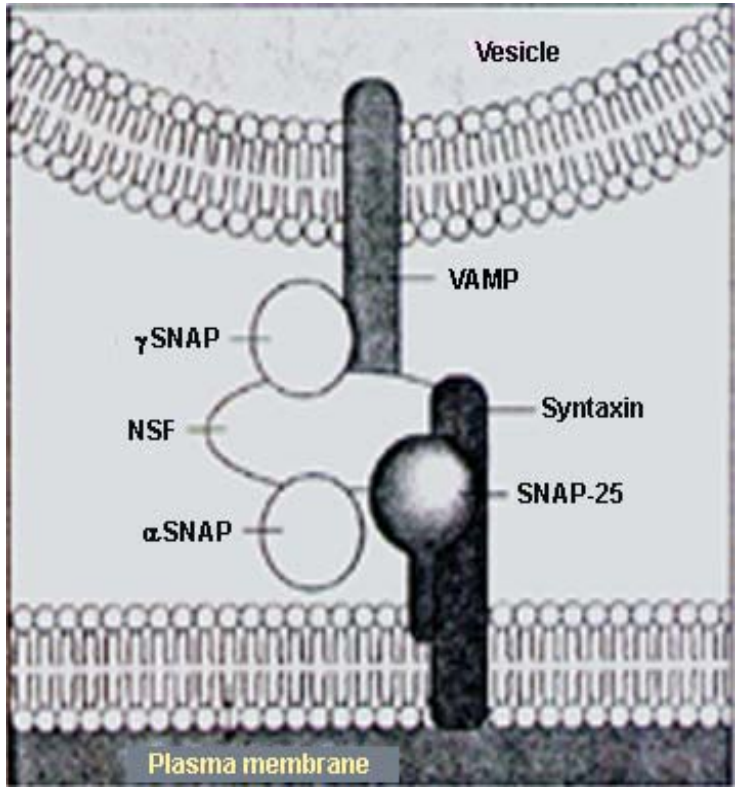
- *Clostridium botulinur*

(8 sorotipos)

A toxina tetânica e as toxinas botulínicas são endoproteinase Zn^{2+}-dependente

Neurotoxins Clostridiais clivam diferentes pontos das proteínas-alvo do complexo SNARE

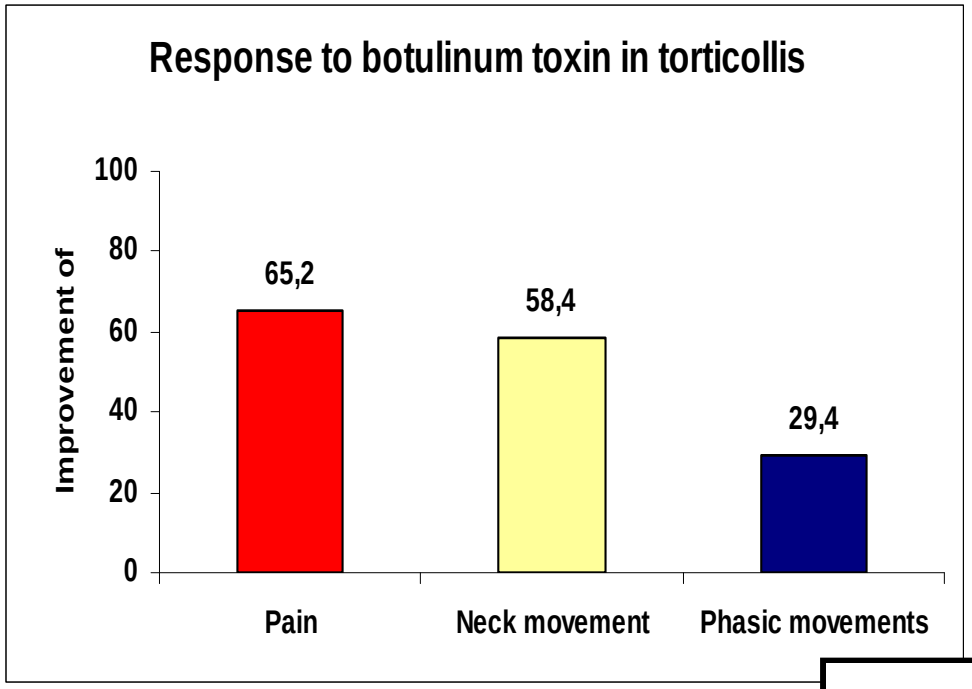




Complexo SNARE

V1	^{38}Q	V	D	E	V	V	D	I	M	R^{47}
V2	^{62}E	L	D	D	R	A	D	A	L	Q^{71}
S1	^{21}L	A	D	E	S	L	E	S	T	R
R^{31}										
S2	^{35}L	V	E	E	S	K	D	A	G	I
R^{45}										
S3	^{49}M	L	D	E	Q	G	E	Q	L	E
R^{59}										
S4	^{145}E	M	D	E	N	L	E	Q	V	S
G^{155}										
X1	^{29}F	M	D	E	F	F	E	Q	V	E^{38}
X2	^{164}E	L	E	D	M	L	E	S	G	N^{173}

Motif in target proteins: 3 carboxylic groups on one face and 3 hydrophobic residues on the contigous thrid of the helice.



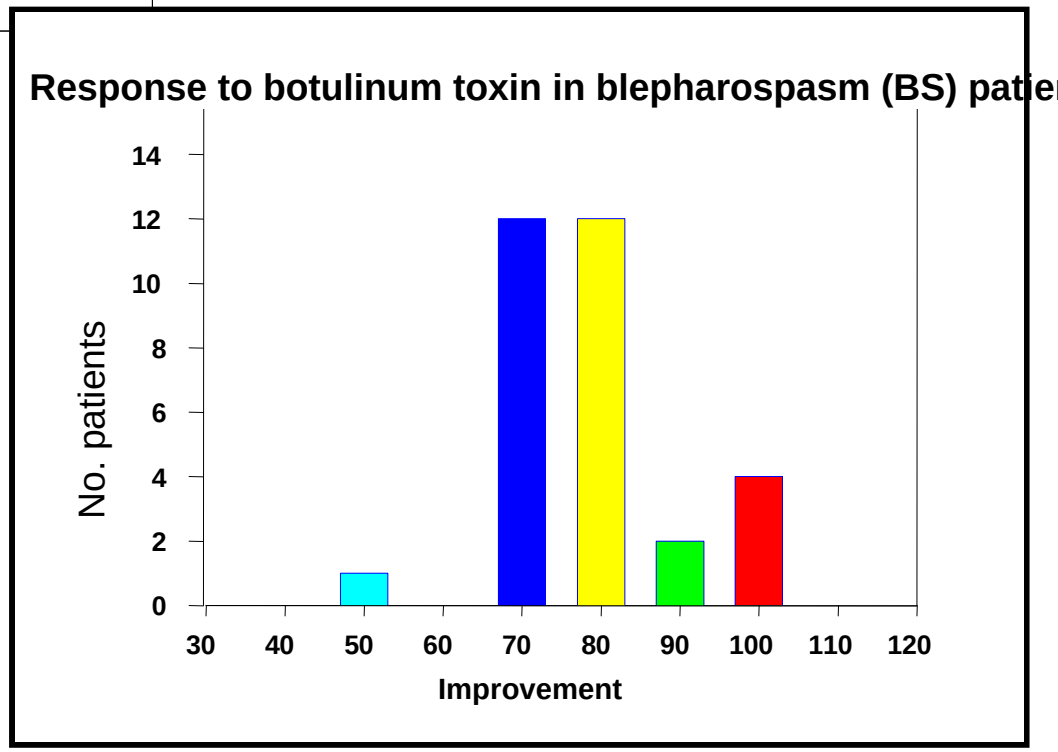
Usos terapêuticos das

Toxinas Botulinicas

Botox: cosmético

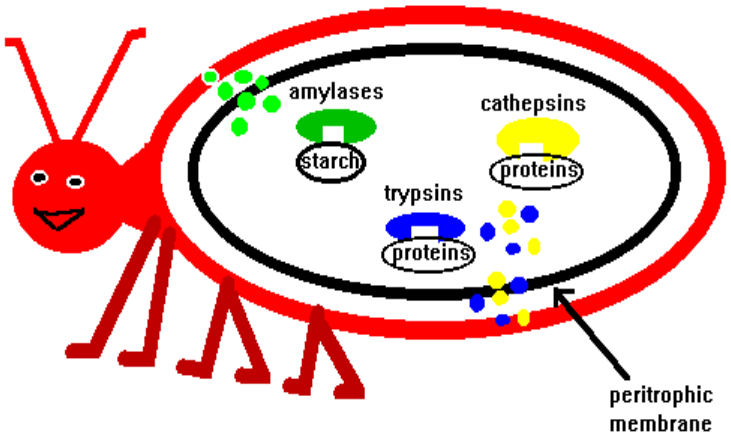
- controle de rugas

- injeções periodicas

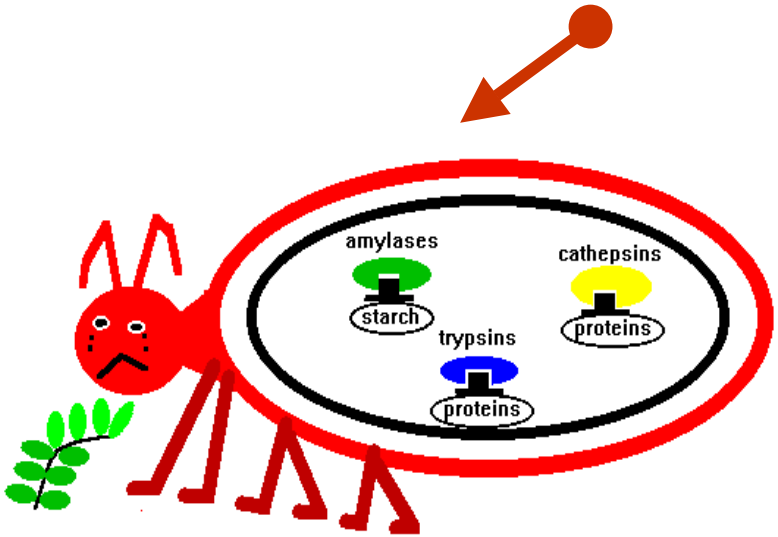


Mecanismos de ação de proteínas inseticidas

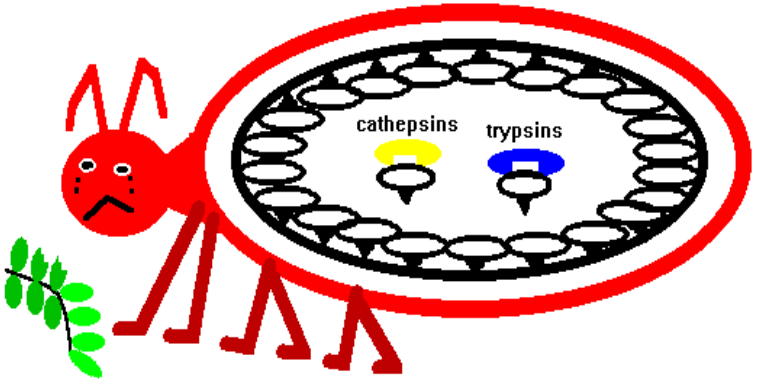
Macromoléculas polares: efeito por ingestão



Interferência com os processos digestivos



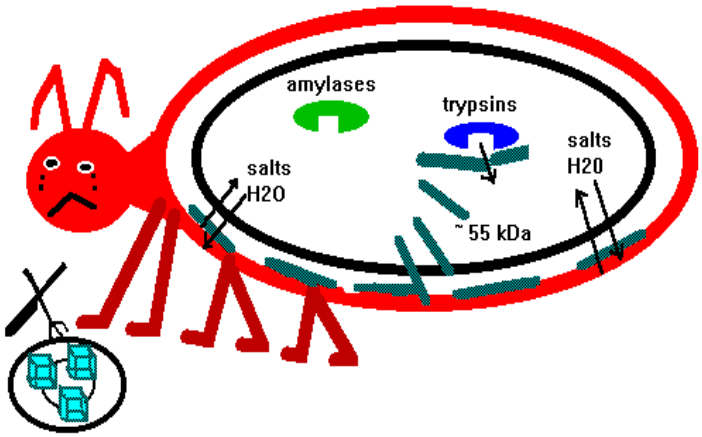
Inibidores de proteinases e de amilases



Lectinas, quitinases e proteínas de reserva modificadas

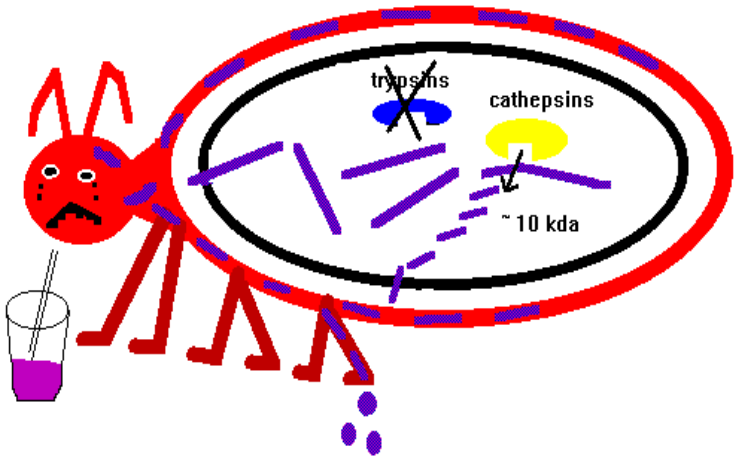
Protoxinas: ativação por proteólise limitada

Endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*



- **protoxinas são clivadas por tripsinas para originar peptideos tóxicos**
- **receptores na membrana da célula epitélial do intestino**
- **formam poros na membrana, causando lise**

Canatoxina e ureases vegetais



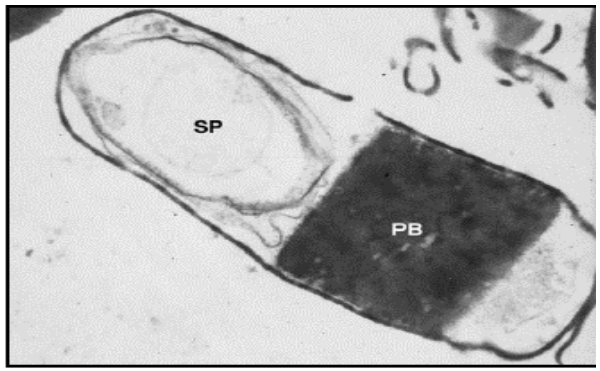
- **protoxinas são clivadas por catepsinas para originar peptídeos tóxicos**
- **receptores e mecanismos de ação ainda desconhecidos**
- **neurotoxicidade ??**

TOXINAS BACTERIANAS com atividade INSETICIDA

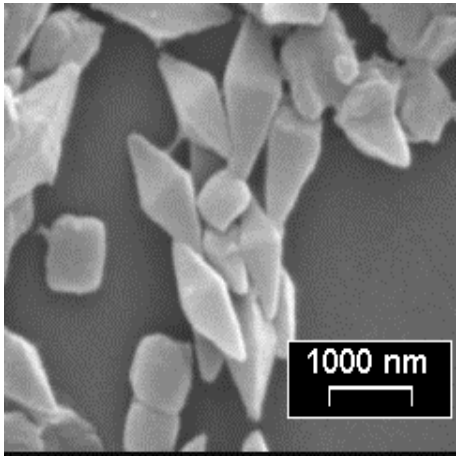
- **gêneros *Xenorhabdus* sp e *Photorhabdus* sp:** bactérias gram-negativas são simbiontes de nematóides entomopatogênicos da família Heterorhabditidae

- **gênero *Bacillus (B.thuringiensis, B.sphaericus, B.cereus, e outras sp.)***

Bacillus thuringiensis

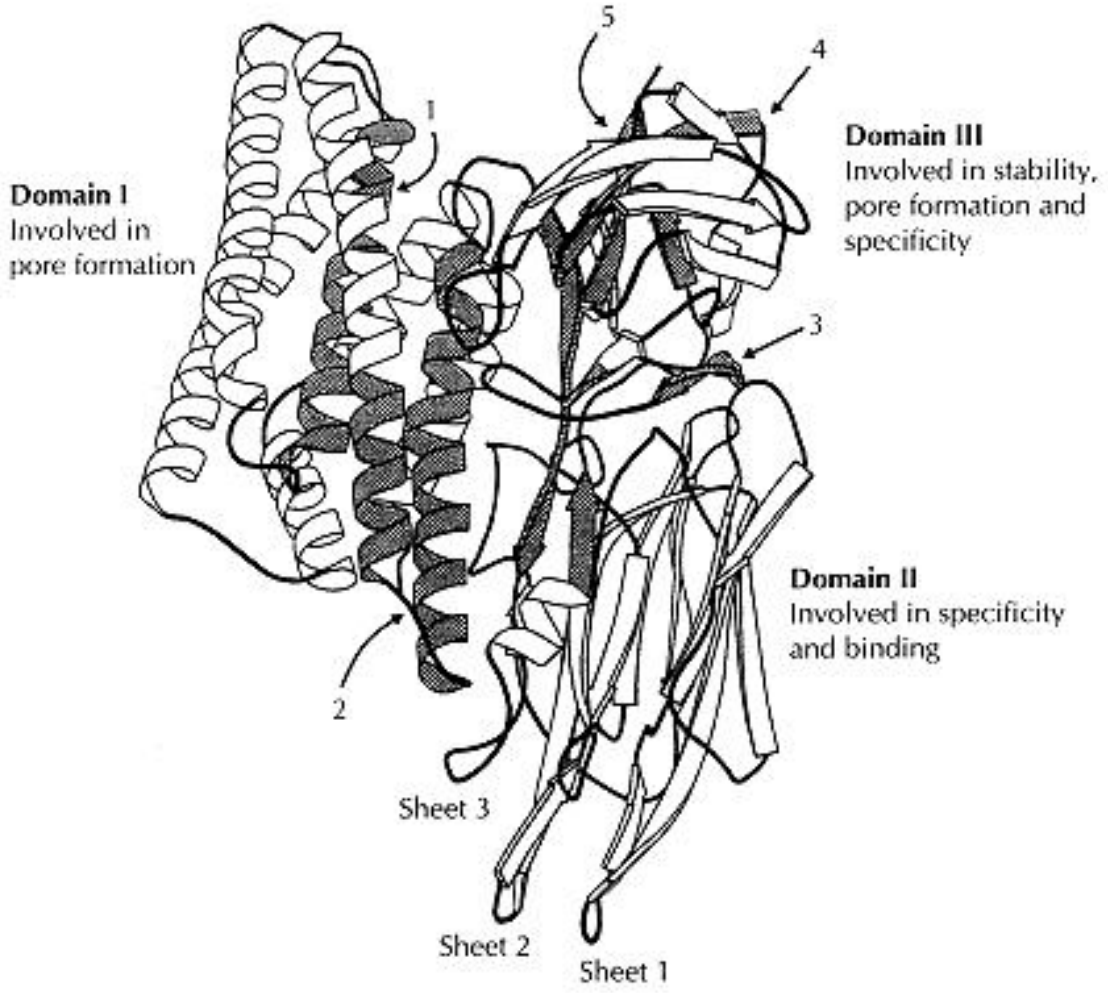


- Habitat natural é o solo
- Gram positivas, bastonetes esporulantes
- Inclusão paraesporais cristalina, produzidas na esporulação
- Efeito entomopatogênico: delta-endotoxinas ou proteínas Cry
- São protoxinas: clivadas pelas enzimas digestivas, liberando **fragmentos tóxicos** de 60-55 kDa.
- As toxinas induzem a formação de **poros**, inserindo-se na membrana celular do **epitélio intestinal**, provocando lise células intestinais.



Classificação das toxinas de *B. thuringiensis* (Lereclus *et al*., 1993)

Toxinas	PM (kDa)	Hospedeiros	Espécies de insetos suscetíveis
CryIAa	132,2	**Lepidóptera**	*Manduca sexta, Bombyx mori, Plutella xylostella, Ostrinia nubilalis*
CryIAb	131,0	**Lepidóptera**	*Manduca sexta, Heliothis virescens, Pieris brassicae*
CryIAc	133,3 130,0	**Lepidóptera** **Díptera**	*Heliothis virescens, Pieris brassicae, Manduca sexta, Trichoplusia ni* *Aedes aegypti*
CryIB	138,0	**Lepidóptera**	*Pieris brassicae*
CryIC	134,8	**Lepidóptera**	*Spodoptera littoralis, Spodoptera exigua, Mamestra brassicae*
CryID	132,5	**Lepidóptera**	*Manduca sexta, Spodoptera exigua*
CryIE	130,0	**Lepidóptera**	*Manduca sexta, Spodoptera littoralis, Spodoptera exigua*
CryIF	133,6	**Lepidóptera**	*Ostrinia nubilalis, Heliothis virescens, Spodoptera exigua*
CryIG	129,7	**Lepidóptera**	-
CryIIA	70,9	**Lepidóptera** **Díptera**	*Heliothis virescens, Manduca sexta, Lymantria dispar* *Aedes aegypti*
CryIIB	70,8	**Lepidóptera**	*Manduca sexta, Heliothis virescens, Lymantria dispar, Trichoplusia ni*
CryIIC	69,5	**Lepidóptera**	*Manduca sexta, Lymantria dispar, Trichoplusia ni*
CryIIIA	73,1	**Coleóptera**	*Leptinotarsa decemlineata, Phaedon cochleariae*
CryIIIB	74,5	**Coleóptera**	*Leptinotarsa decemlineata*
CryIIIC	72,0	**Coleóptera**	*Leptinotarsa decemlineata, Diabrotica undecimpunctata*
CryIIID	73,9	**Coleóptera**	-
CryIVA	134,4	**Díptera**	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi, Culex pipiens*
CryIVB	127,8	**Díptera**	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi*
CryIVC	77,8	**Díptera**	*Aedes aegypti*
CryIVD	72,4	**Díptera**	*Aedes aegypti, Culex pipiens*
CryVA	81,2	**Lepidóptera** **Coleóptera**	*Ostrinia nubilalis* *Leptinotarsa decemlineata, Diabrotica sp.*



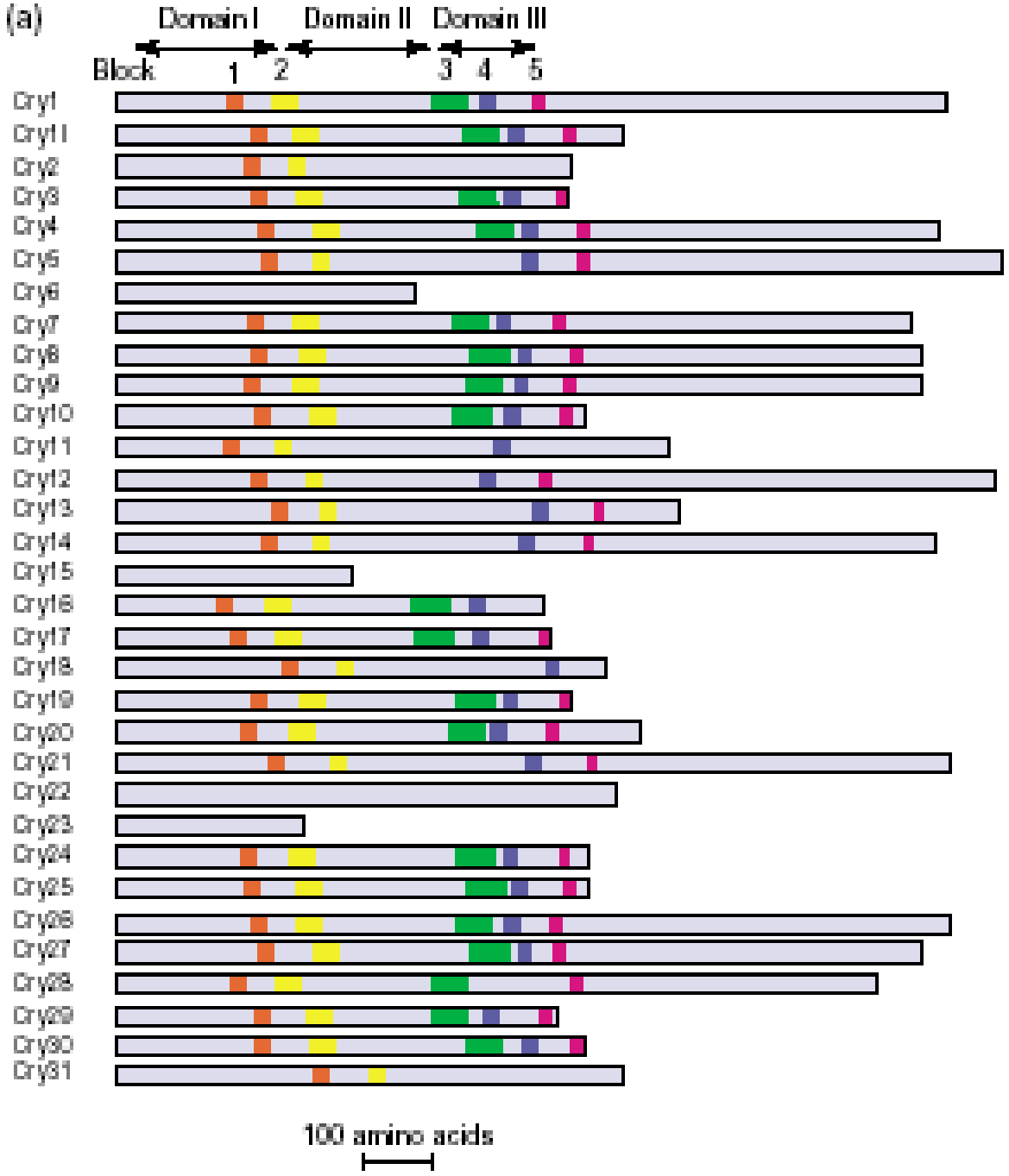
N-terminal (~ 70 kDa) da protoxina: dois domínio

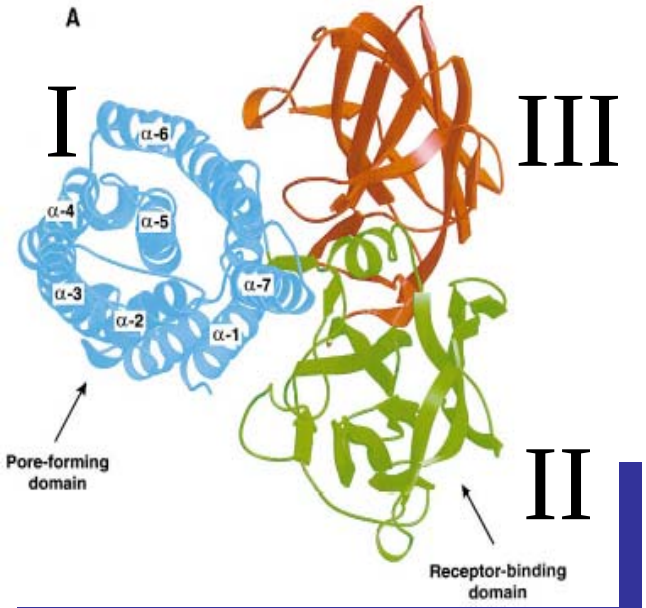
Domínio I " tóxico", rico em regiões hidrofóbicas

Domínio II "específico", ligação ao receptor das células epiteliais do intestino dos insetos

Domínio III - C-terminal da protoxina, mais conservada de uma proteína a outra. Envolvido na formação e estabilidade do cristal.

Toxina CryIIIA – Os 5 "blocos" estruturais conservados estão sombreados





Domain I- 250 aas-Pore formation.

Domain II- 200 aas-Binding to the receptor.

Domain III- 150 aas-?

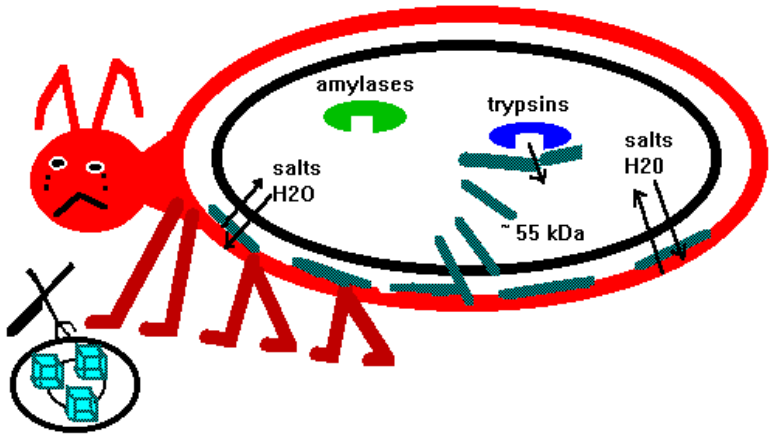
- **Stability of the structure of entire molecule**
- **Determining specificity**
- **Pore formation**

Mecanismo de ação das toxinas Bt

1. A **solubilização dos cristais** em pH 10-11 no intestino médio dos insetos, libera as protoxinas de 130-140 kDa para CryI e 70 kDa para CryII.

2. As protoxinas são ativadas pelas enzimas digestivas, formando **fragmentos tóxicos** de 60-55 kDa.

3. As toxinas reconhecem **receptores** específicos nas microvilosidades das celulas epiteliais do **intestino** médio das larvas suscetíveis.



4. As toxinas induzem a formação de **poros**, inserindo-se na membrana celular do **epitélio intestinal**, provocando desequilíbrio iônico nas células, vacuolização e lise celular, levando o inseto a paralisia e morte

Uso de Formulações de Bt (bactéria liofilizada) para uso ambiental (aspersão): desde 1930

controle de insetos e nematóides na agricultura
controle ambiental de mosquitos,
controe de térmites.

Plantas-Bt comercializadas nos Estados Unidos:

- Batata (Cry3A), desde 1995
- Algodão (Cry1Ac), desde 1996
- Milho (Cry1Ab), desde 1996

Table 1. Transgenic plants expressing crystal-protein genes from *Bacillus thuringiensis*

Crystal proteins	Target insects	Transformed plants
Cry1Aa	Lepidoptera	Cranberry[a], poplar[9], rutabaga[10]
Cry1Ab	Lepidoptera	Apple[a], cotton[11], maize[12], poplar[13], potato[14], rice[15], tobacco[3,16], tomato[17], white clover[18], white spruce[19]
Cry1Ac	Lepidoptera	Apple[20], broccoli[21], cabbage[21], cotton[22], grapevine[a], oilseed rape[23], peanut[24], rice[25], soybean[26], tobacco[27], tomato[a], walnut[20]
Cry1Ba	Lepidoptera	White clover[28]
Cry1Ca	Lepidoptera	Alfalfa[29], *Arabidopsis*[29], tobacco[29]
Cry1H	Lepidoptera	Maize[30]
Cry2Aa	Lepidoptera	Cotton[a]
Cry3A	Coleoptera	Eggplant[a], potato[31], tobacco[32]
Cry6A	Coleoptera	Alfalfa[a]
Cry9C	Lepidoptera	Maize[33]
Bt (unspecified)		Juneberry[24], hawthorn[24], pear[24], sugar cane[24]

[a]USDA/APHIS Biotechnology Permit Database (http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/).

Problemas e Perpectivas no uso de plantas transgênicas para toxinas Bt:

Desenvolvimento de resistência:

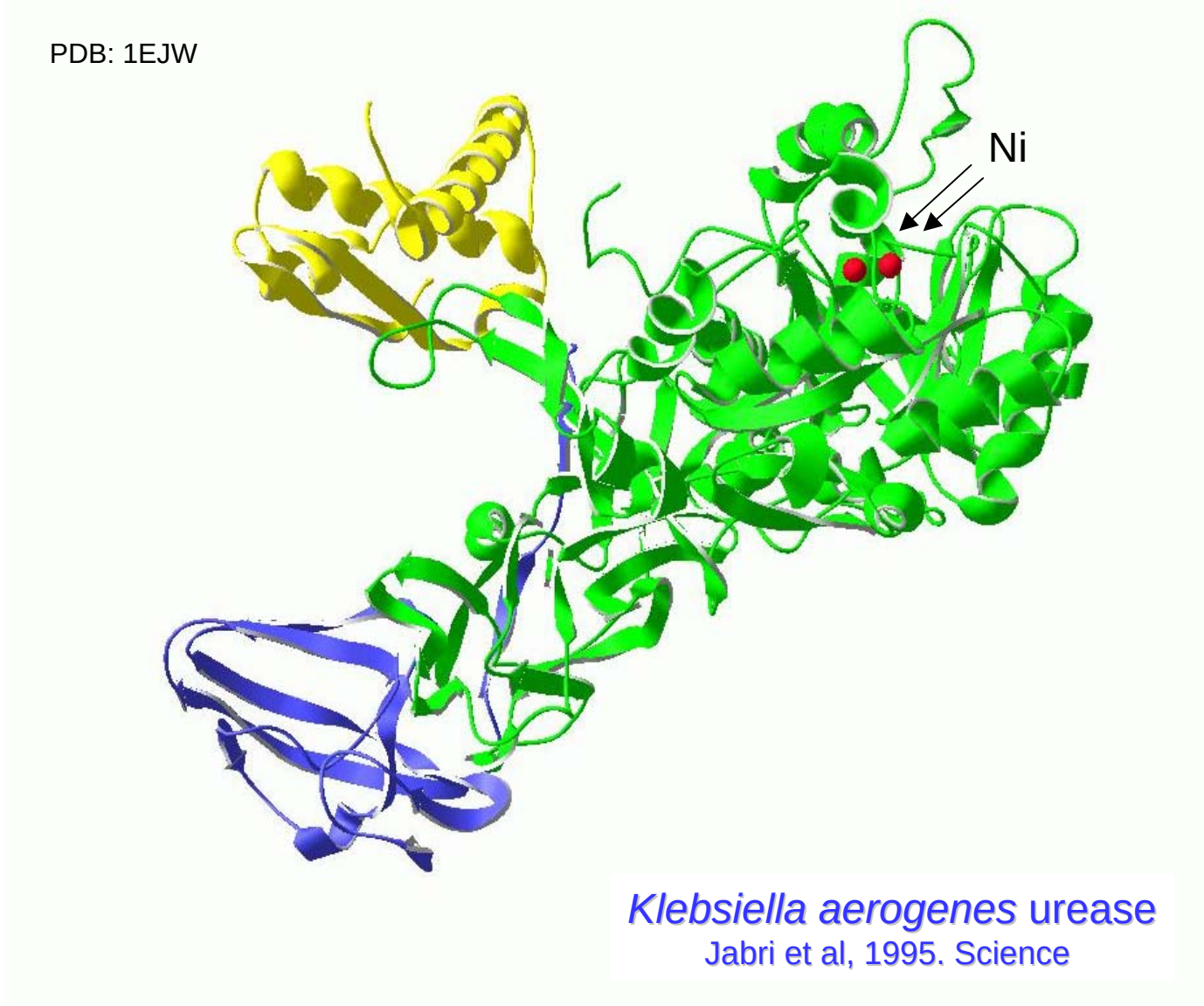
- baixa expressão do transgene: alto conteúdo A/T do gene em comparação com genes vegetais; outros fatores.
- adaptação dos insetos: mudança nos receptores intestinais

Perspectivas:

- refúgios ecológicos, para diminuir pressão de seleção
- alterações do transgene para aumentar eficiência da tradução;
- construções com mais de um transgene (pirimidação de genes), com mecanismos de ação distintos

Impacto ecológico e questões de saúde do consumidor:

- nenhuma comprovação cientifica de efeitos nocivos para o ser humano
- interações tritróficas
- uso de promotores tecido-específico



Ureases (EC 3.5.1.5) are abundant in bacteria-plants-fungi



Isoformas de Urease na *C. ensiformis*

alternative splicing?

JBURE-I

Crystals: Sumner, 1926

AA sequence: Mamiya *et al*. 1985

cDNA: Riddles *et al*. 1991

Major form ~ 90 % total ureases

Higher specific activity

JBURE-II

cDNA
Pires-Alves *et al.* 2003

86% identity nt

82% identity aa

CNTX

Isolated by Carlini & Guimarães, 1981.

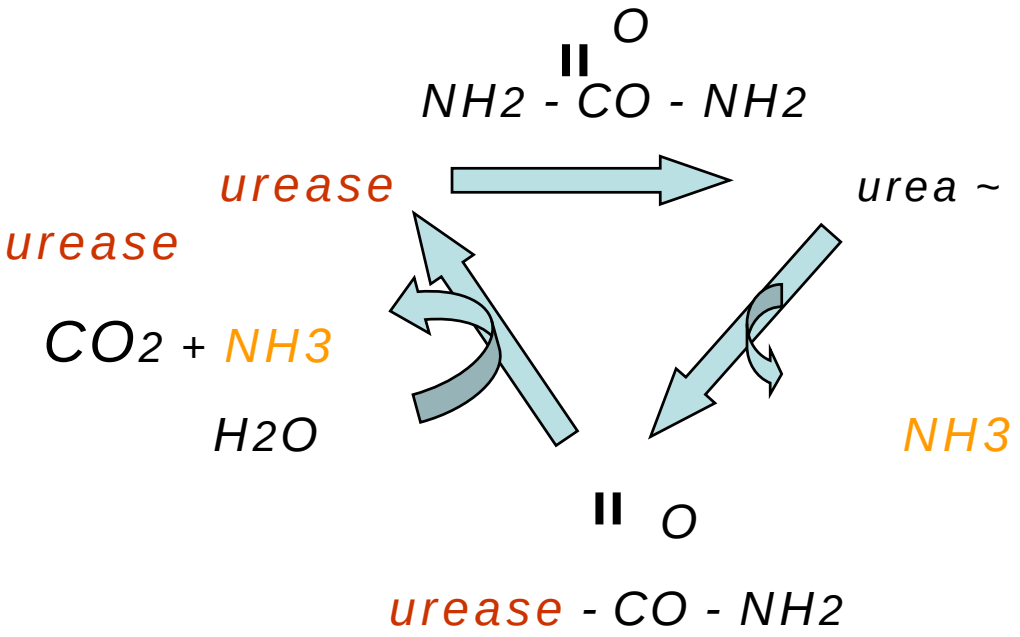
Isoform of urease:
Follmer *et al.*, 2001

Less than 10%

Lower urease activity

Qual é a função das ureases nas plantas ?

Biodisponibilidade de Nitrogênio ?



Ureia não é um metabólito abundante em plantas

Insecticidal Activity of Plant Ureases

INSECTS TESTED

Schistocerca americana	(Orthoptera, Acrididae)
Drosophila melanogaster	(Diptera, Drosophilidae)
Aedes aegypti	(Diptera, Culicidae)
Anticarsia gemmatalis	(Lepidoptera, Noctuidae)
Manduca sexta	(Lepidoptera, Sphingidae)
Spodoptera frugiperda	(Lepidoptera, Noctuidae)
Callosobruchus maculatus	(Coleoptera, Bruchidae)
Rhodnius prolixus	(Hemiptera, Reduviidae)
Dysdercus peruvianus	(Hemiptera, Pyrrhocoridae)
Nezara viridula	(Hemiptera, Pentatomidae)

DIGESTIVE ENZYME

trypsin-like

NO EFFECT

cathepsin-like

LETHAL EFFECT

CANATOXIN was given to the insects by oral route

Callosobruchus maculatus - cowpea weevil

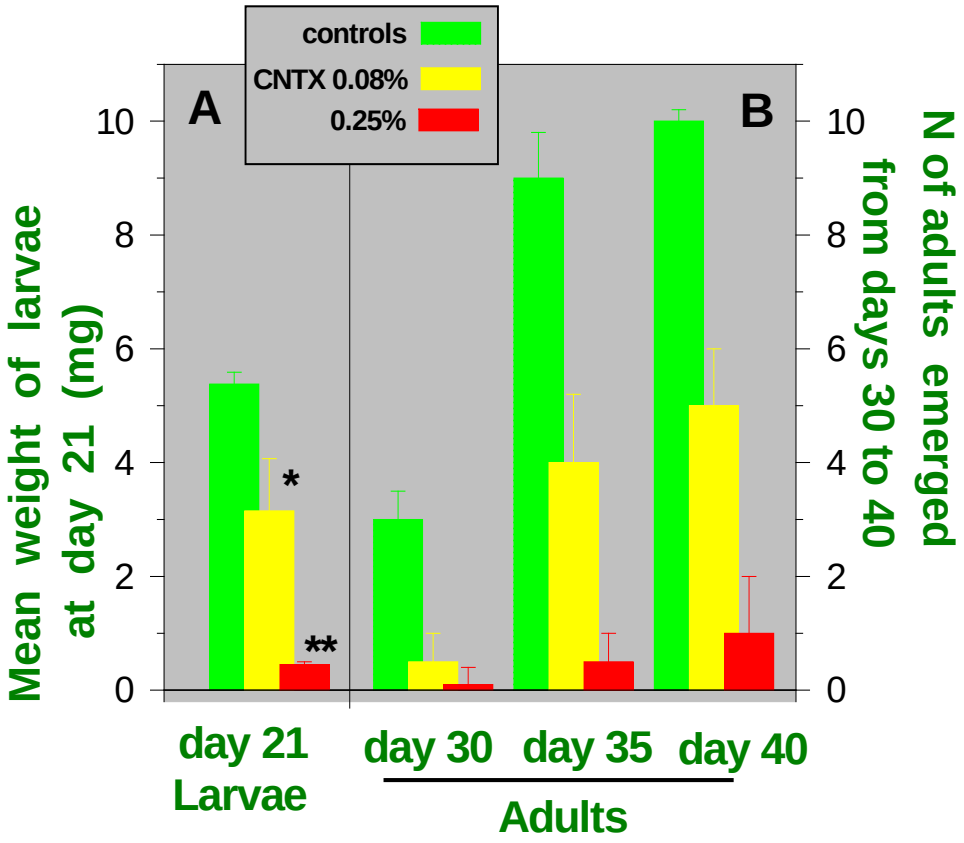


Artificial seeds (*V.unguiculata* meal) + freeze-dried **CNTX** → 10 eggs of *C.maculatus* /seed:

growth of larvae

adult emergence

C.maculatus development is arrested in CNTX-containing seeds



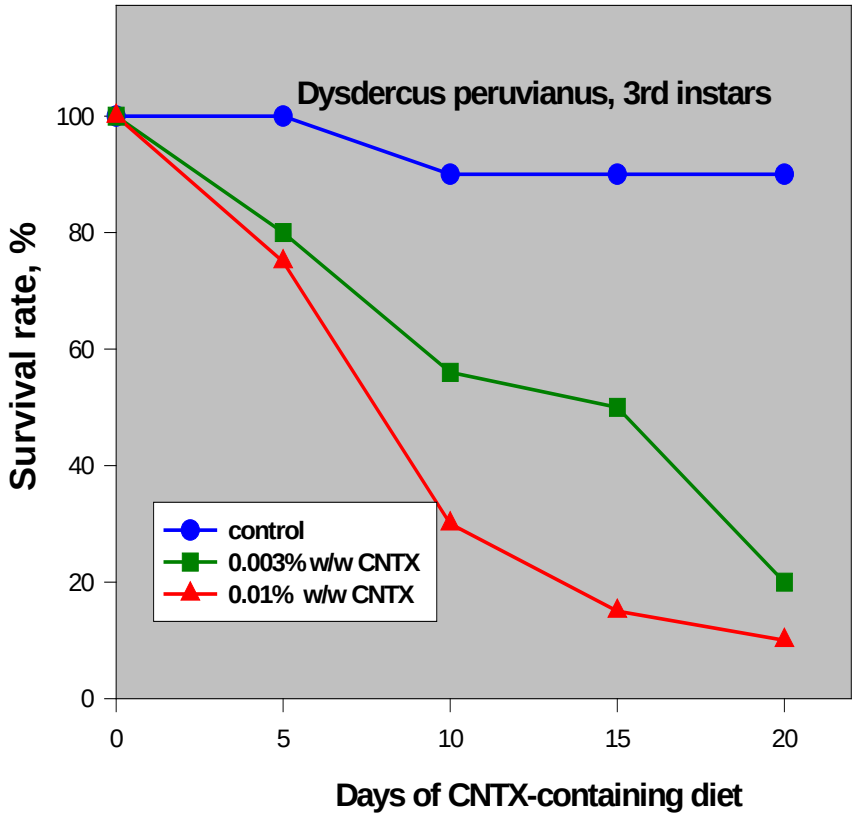
Carlini et al., 1997, *J. Econ. Entomol*.90: 340-

Dysdercus peruvianus

(cotton sucker bug)



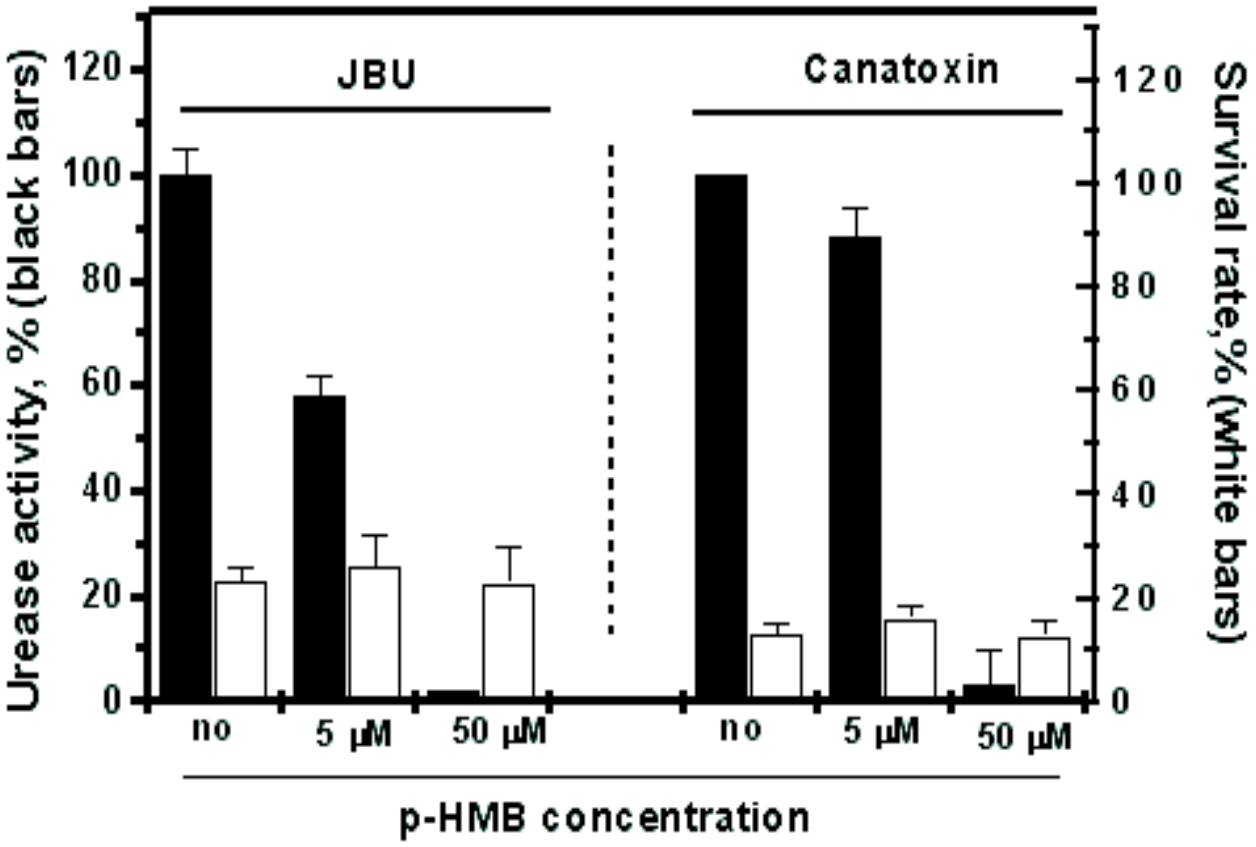




Stanisçuaski et al, 2005. Toxicon 45, 753-760.



Insecticidal activity of jackbean ureases is independent of the enzyme's ureolytic activity



Follmer et al, 2004. *Plant Science* 167, 241-246

Rhodnius prolixus



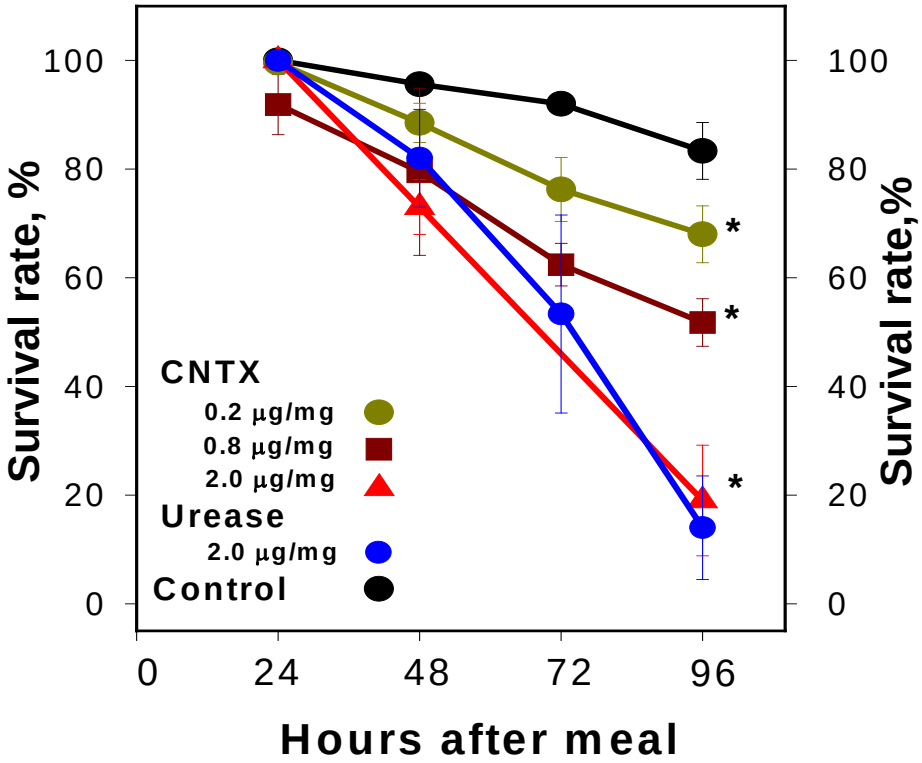
- recent acquisition of blood-feeding behavior
- life cycle is synchronized with blood meals
- ingestion up to 10 times its body weight

Artificial “meal” :

- Canatoxin in Tyrode solution, at 37 C
- ATP as phagoestimulant

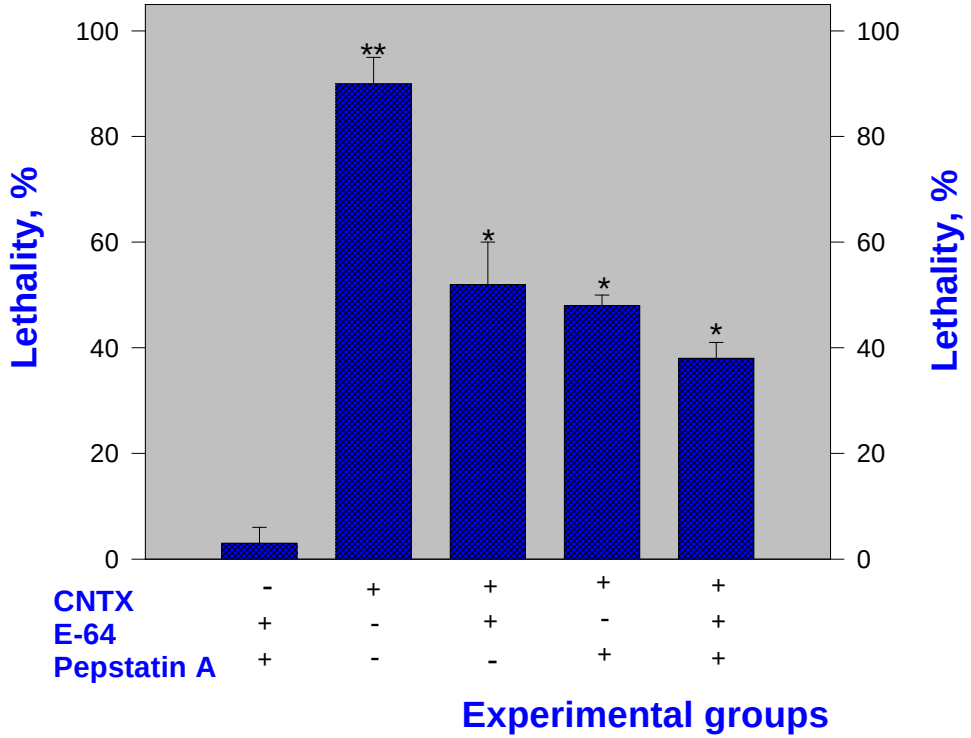


Canatoxin's lethal effect in *R.prolixus* nymphs is time-, and dose-dependent

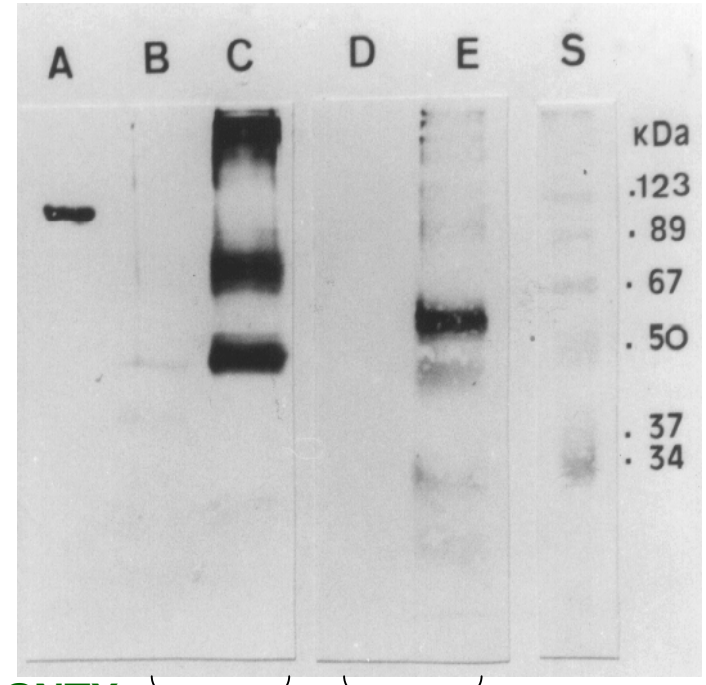


Carlini et al., 1997, *J. Econ. Entomol.*90: 340-348.

CNTX undergoes proteolytic “activation” by insect cathepsin-like digestive enzymes



Western blot of midgut content of CNTX-fed *R. prolixus*

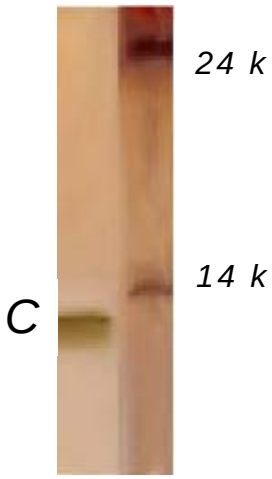


E-64: inhibitor of cystein proteinases (cathepsin B)
Pepstatin A: inhibitor of aspartic proteinases (cathepsin D)

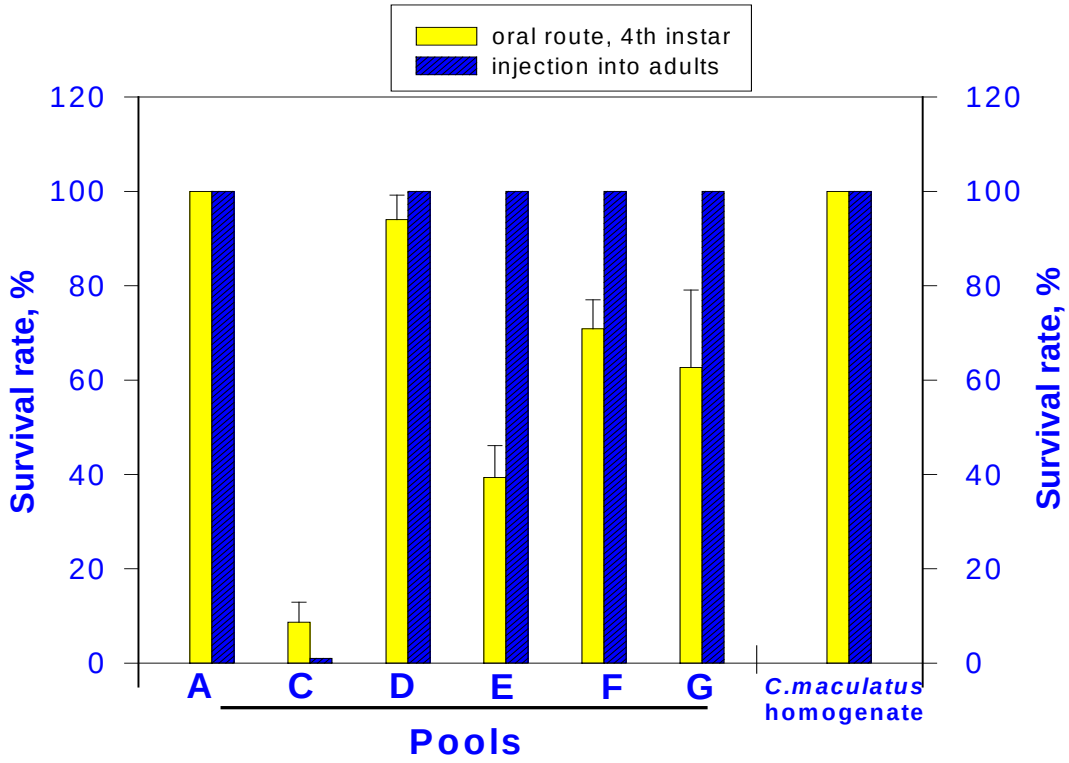
B and D: CNTX alone
C and E: + 2 μM pesptatin

Carlini et al., 1997, *J. Econ. Entomol*.90: 340-348.
Ferreira-DaSilva et al., 2000, *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 44: 162-171

Proteolytic “activation” of CNTX can be reproduced *in vitro*

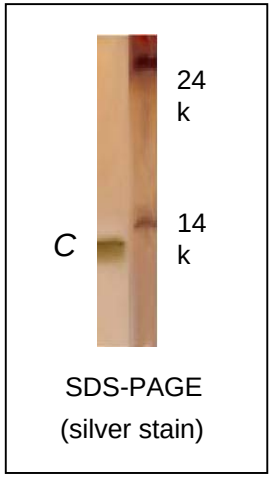


SDS-PAGE
(silver stain)

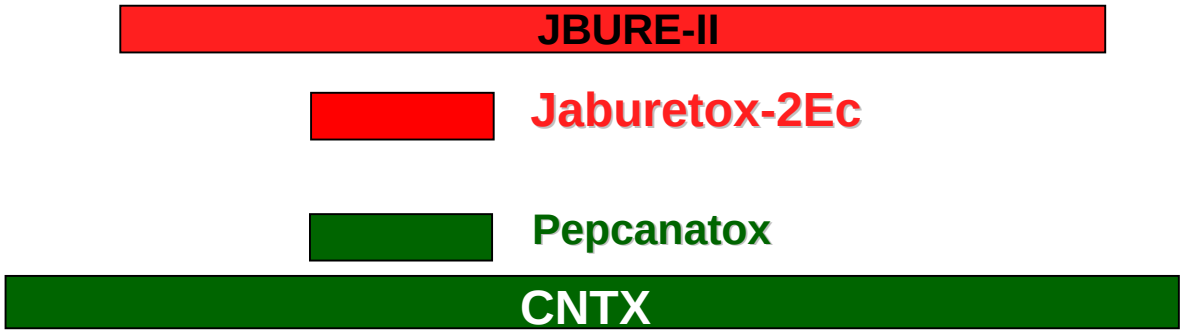


Ingestion of cathepsin inhibitors together with Pool C does not protect against entomotoxic effects.

Ferreira-DaSilva et al., 2000, *Arch. Insect Biochem. Physiol*. 44: 162-171



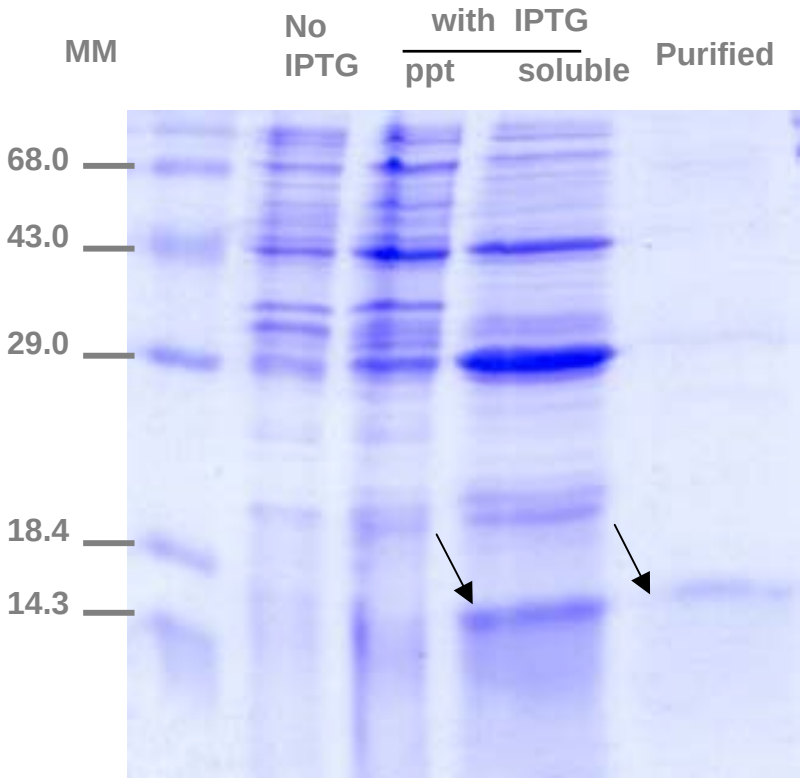
SDS-PAGE
(silver stain)



- N-terminal residue of the recombinant peptide was chosen to match that of pepcanatox.
- C-terminal residue was deduced from the estimated size of pepcanatox (81 amino acid residues)
- cDNAs encoding the entomotoxic peptide was PCR-amplified using *jbure-II* gene as template and cloned into vector pET-101 for expression in *E.coli* cells.

- patent INPI-RS PI0003334-0, Carlini *et al*., 2000.
- patent INPI-RS PI001120/RS, Mulinari *et al*., 2004.

Expression and purification of the recombinant peptide



- peptide in the soluble fraction
- purified by metal affinity chromatography in a Nickel NTA~Agarose resin

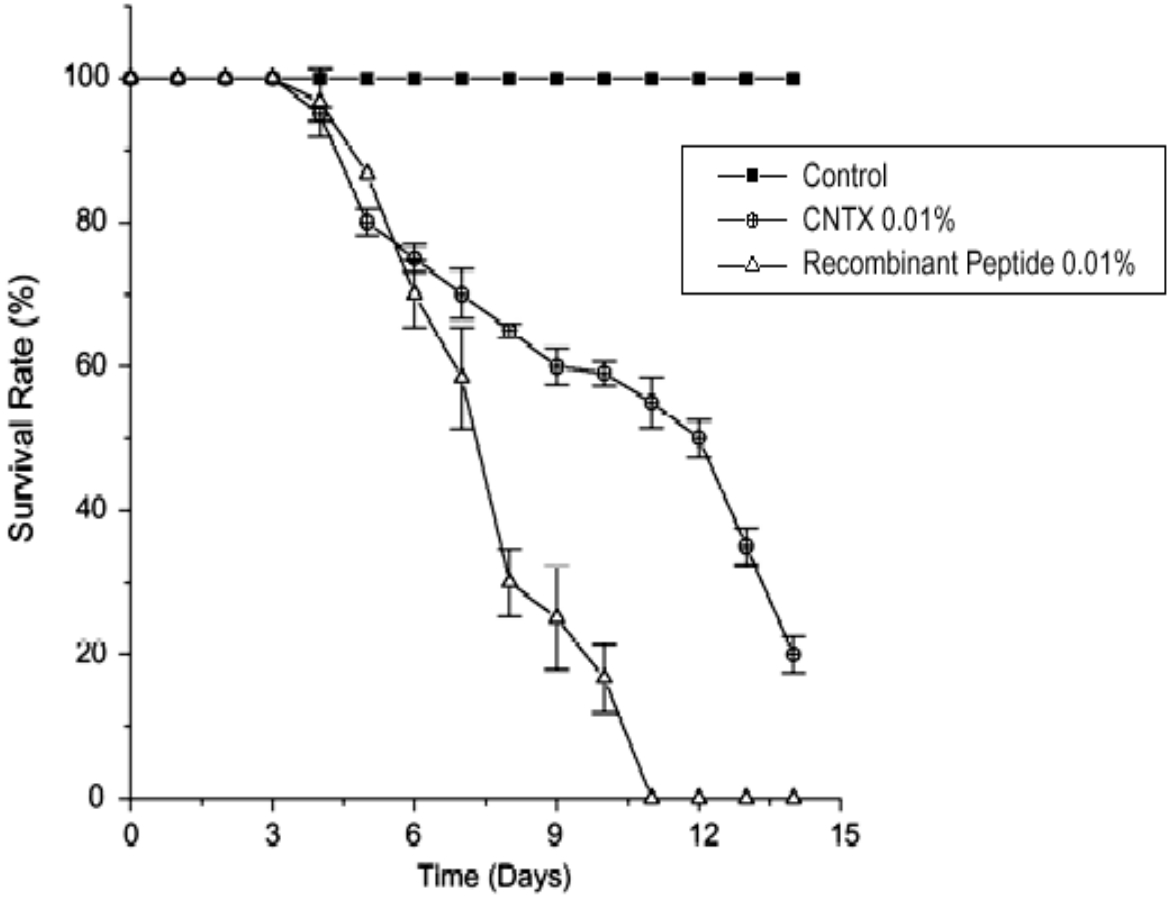
- Jaburetox-2Ec: 6 mg. L^{-1} culture

Mulinari et al, 2004, patent.

Insecticidal effect of jaburetox-2Ec



Dysdercus peruvianus
Cotton stainer bug



Stanisçuaski et al., 2005. Toxicon 45, 753-760

Insects not affected (trypsin-based digestion) by intact ureases are susceptible to jaburetox-2Ec

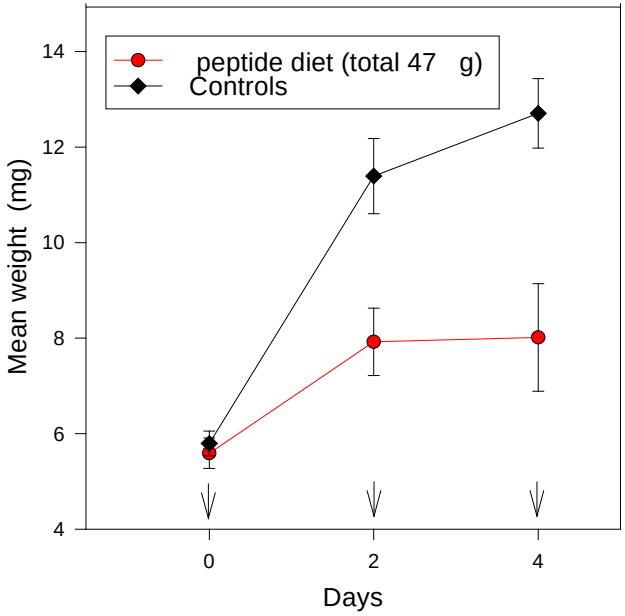
Spodoptera frugiperda
Fall armyworm

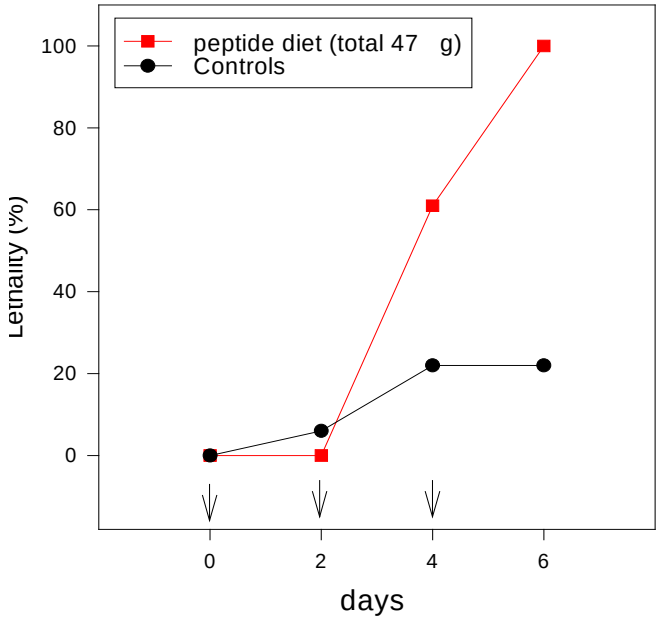




Blatella germanica

100% mortality in 3 days
0.1% peptide w/w diet





Mulinari, Vargas, Stanisçuaski, Grossi-de-Sá, Carlini, in preparation

Jaburetox-2Ec



Effects of Canatoxin and Jaburetox-2 in newborn rats

	Intraperitoneal	Oral
canatoxin*	Lethal	Non lethal
jaburetox-2*	Non lethal	Non lethal

*Groups of 4 newborn rats received canatoxin (2 mg/Kg) or Jaburetox-2 (10 mg/Kg) by intraperitoneal or oral route and were observed for 5 days. * three independent experiments.

Effects of Canatoxin and Jaburetox-2 in mice

	Intraperitoneal	Oral
canatoxin*	Lethal	Non lethal
jaburetox-2*	Non lethal	Non lethal

*Groups of 4 mice received canatoxin (2 mg/Kg) or Jaburetox-2 (10 mg/Kg) by intraperitoneal or oral route and were observed for 5 days. * three independent experiments.

No acute toxic effects in mammals

Ferreira-DaSilva, 2002. Ph.D., UFRGS

Obrigada !



www.ufrgs.br/laprotox