



Universidade Federal do Pampa

Campus São Gabriel

Bacharelado em Biotecnologia

ANA PAULA ZANATTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS INDUZIDOS PELA
UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) EM BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta
cinerea* (Olivier, 1789)**

São Gabriel - RS

2015

ANA PAULA ZANATTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS INDUZIDOS PELA
UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) EM BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta
cinerea* (Olivier, 1789)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no *campus*
de São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, como
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cháriston André dal Belo.

Co-orientador: Msc. Douglas Silva dos Santos.

São Gabriel

2015

ANA PAULA ZANATTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS INDUZIDOS PELA
UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) EM BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta
cinerea* (Olivier, 1789)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no *campus*
de São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, como
requisito para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 04 de dezembro de 2015.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Orientador

UNIPAMPA

Prof. Andrés Cañedo

UNIPAMPA

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

UNIPAMPA

ZANATTA, Ana Paula

Avaliação dos efeitos neurocomportamentais induzidos pela urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789) / Ana Paula Zanatta.

65 folhas

Trabalho de Conclusão de Curso, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo.

Aos meus pais, Jairo Antonio Zanatta e Mara Elilia Zanatta, por investirem e acreditarem em mim e à Jujinha, pelo laço fraterno e de amizade que compartilhamos há 14 anos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jairo e Mara Zanatta, pela oportunidade de seguir meu sonho de cursar o Bacharelado em Biotecnologia. Foi difícil sair do ninho e aprender a me virar sozinha aos 17 anos, mas sem os puxões de orelha eu não seria nada. Obrigada por todo o suporte e cobrança, foram dois aspectos fundamentais para a formação da minha personalidade.

À minha irmã Julia, pelo apoio e amizade que temos. A realização do meu maior sonho foi te ver nascer e ver que hoje eu tenho muito mais do que alguém para brincar (já que esse era o que eu mais queria fazer contigo, quando tu chegasse) é sensacional. Obrigada por ser minha irmã e minha melhor amiga, tens meu apoio em tudo e nunca vais me perder. Eu te amo, pintinho!

Aos meus familiares que sempre me apoiaram, mas em especial ao Moisés, a Dinda Fabi, Tio Ricardo, Tia Miriam, Saionara, Linei, Dindinha Édea, tia Denise e o Tio Dilmar. Também uma enorme muito obrigada, do fundo do coração, ao tio Éverson e a tia Celi que foram sempre um pilar na minha graduação, me deram suporte e atenção sempre e foram muitas vezes meus pais aqui em São Gabriel.

Ao “amorinho” Alesson Rangel, por me fazer feliz e me dar toda a atenção e ajuda, sempre que eu preciso e quero, sem hesitar. Tua companhia nesses anos foi mais do que essencial para a finalização dessa jornada. Tu és um namorado maravilhoso, me incentivas a ter atitudes e almejos que eu mesma duvido que possa concretizar. Só tenho a agradecer por ter a ti em minha vida.

Ao Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo por tantas coisas... Em primeiro lugar, por acreditar na minha capacidade de produção científica e dado a mim a oportunidade de trabalhar junto ao grupo de pesquisa. Foi esse voto de confiança que despertou em mim o amor pela farmacologia e toxicologia, que hoje tanto eu, quanto o senhor consideramos ser minha vocação. Também pela amizade, cordialidade e humildade com que comanda o LANETOX. És um líder excepcional. Sinto-me honrada por ter o senhor como meu orientador e espero ter correspondido á todas as suas expectativas. Obrigada!

Aos membros integrantes do Lanetox: A professora Lúcia, pela orientação constante no laboratório, ao Msc Douglas pela coorientação exigente e disciplinada e aos Mestrandos Raquel e Carlos por todas as ajudas (e não foram poucas) durante meus cinco semestres no Lanetox. Também aos colegas Antônio, Fabíola, Allan, Bárbara, Helena, Mayra e Etiely por

todas as ajudas prestadas, desde limpeza de caixas de baratas até experimentos. Foi muito bom ter convivido com vocês!

Aos meus amigos, que moram no meu coração: Ingrid, Ellen, Camila, Ricardo, Rubens, Lauren, Uilliam, Jonas, Marcio e Ozonio, Christian e Leonel. São com vocês os meus melhores risos, as minhas lembranças para a vida e espero não perder a companhia de vocês nunca!

Ao edital Toxinologia 063/2010 CAPES pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.

(Marie Curie)

RESUMO

As ureases são metaloenzimas que hidrolizam a uréia em amônia. Esses compostos são sintetizados por diversos organismos e têm sido caracterizados como inseticidas naturais. A atividade entomotóxica da urease de *Canavalia ensiformis* (*Jack Bean Urease*, JBU) tem sido demonstrada em diferentes modelos de insetos-praga, apesar do seu mecanismo de ação ainda não ter sido completamente elucidado. Nesse aspecto, a complexidade na demonstração do mecanismo de ação de inseticidas naturais aumenta quando esses compostos interagem com o sistema nervoso dos insetos, alterando o comportamento desses animais. O objetivo desse trabalho foi identificar a atividade induzida pela JBU sobre o sistema nervoso central de baratas *Nauphoeta cinerea* e a sua relação na modulação do comportamento de *grooming* desses animais. Nesse trabalho foram usadas baratas adultas de ambos os sexos da espécie *N. cinerea* mantidas em insetário (23-26 °C), água e ração *ad libitum*. A medida da atividade de *grooming* foi feita por observação em um círculo de campo aberto onde o animal nunca havia entrado anteriormente. A contagem do tempo de *grooming* (de perna e de antena) foi realizada em uma sala isolada, em silêncio, com o uso de um cronômetro digital durante 30 min. Os tratamentos foram feitos por meio de injeções na terceira porção abdominal, com um volume fixo de 20 µL usando-se uma seringa de Hamilton. Os resultados foram obtidos contabilizando o tempo total de *grooming* em segundos, em 30 min. Os dados foram plotados como tempo de *grooming* em segundos. Animais controle, sem a injeção de algum composto também foram contabilizados. Foi usado o teste “t” de Student como análise estatística, onde $p < 0.05$ indicou significância. A análise da taxa de *grooming* controle foi de $60 \pm 5 \text{ s} / 30 \text{ min}$ para as pernas e $35 \pm 8 \text{ s} / 30 \text{ min}$ para antenas ($n=30$, respectivamente). Quando a JBU (1,5, 3 e 6 µg/g de animal) foi administrada houve uma alteração dose-dependente na taxa de *groomings*. Assim, para a dose de 1,5 µg/g não houve alteração significativa da taxa de *grooming* de perna e antena. ($n=30$, $p > 0.05$ respectivamente). No entanto, quando a dose de 3 µg/g foi ensaiada houve um aumento de $160 \pm 20 \text{ s}$ no tempo de *grooming* de perna ($n=30$, $p < 0.05$), não havendo modulação do *grooming* de antenas. Na maior concentração testada houve um aumento de $200 \pm 10 \text{ s}$ no *grooming* de pernas ($n=30$, $p < 0.05$), não ocorrendo alteração no tempo de *grooming* de antenas. Quando a octopamina (15 µg/g) foi ensaiada o valor de *grooming* de perna foi de $358 \pm 40 \text{ s}$, não havendo alteração no *grooming* de antena. Nesses ensaios, a pré-administração de fentolamina (0.1 µg/g de animal), e a posterior injeção de octopamina (15 µg/g), resultou em diminuição do tempo de *grooming* para $79 \pm 13 \text{ s} / 30 \text{ min}$ ($p < 0.05$ comparado com o controle octopamina, $n=30$). O ensaio da fentolamina + JBU, também reduziu significativamente a taxa de *grooming* de perna para $56 \pm 7 \text{ s} / 30 \text{ min}$ ($p < 0.05$ comparado com o controle octopamina ou JBU, $n=30$). Os ensaios com hidroxilamina (20 µg/g de animal), um doador de óxido nítrico ou acetilcolina (54 µg/g animal.), não resultaram em alteração na taxa de *groomings*. Os resultados demonstram que a urease de *C. ensiformis* induz alterações sobre o sistema nervoso central de *N. cinerea*, caracterizadas pela modulação do comportamento de *grooming*. As alterações significativas no *grooming* de perna tanto pela JBU quanto pela octopamina, bem como a sua inibição pela fentolamina, indicam que o sistema octopaminérgico é um alvo molecular para o desenvolvimento dos efeitos entomotóxicos da urease.

Palavras-chave: Inseticidas naturais, ureases, comportamento de *grooming*, sistema octopaminérgico.

ABSTRACT

Ureases are metalloenzymes that hydrolyze urea to ammonia. These compounds are synthesized by many organisms and have been characterized as natural insecticides. The entomotoxic activity of *Canavalia ensiformis* urease (Jack Bean Urease, JBU) has been demonstrated in different models of insect pests, although its mechanism of action has not yet been fully elucidated. In this regard, the complexity in the demonstration of natural insecticides mechanism of action increases when these compounds interact with the nervous system of insects, altering the behavior. The aim of this study was to demonstrate the activity induced by JBU on the central nervous system of *Nauphoeta cinerea* cockroaches and its role in the modulation of grooming behavior of these animals. In this work were used adult cockroaches *N. cinerea* of both sexes kept in insectary (23-26 °C) with water and food *ad libitum*. The recording of grooming activity was made by observation in an open field circle where the animal had never been in contact before. The counting of time spending grooming (leg and antenna) was made in an isolated room, silently, using a digital timer during 30 minutes. Treatments were made by means of injection at the insect third abdominal portion with a fixed volume of 20 µL using a Hamilton syringe. The results were obtained by counting the total time spending grooming in seconds in 30 minutes. Data were plotted as the time spending grooming in seconds. Control animals, without the injection of any compound, were also accounted. Statistics were applied using the Student "t" test where $p < 0.05$ indicated significance. In control animals, without any treatment, the grooming rate was $60 \pm 5s / 30min$ for leg and $35 \pm 8 s / 30min$ for antennas ($n = 30$, respectively). When JBU (1.5, 3 and 6 µg/g of animal) was administered there was a dose-dependent alteration in the groomings level. Thus, at the dose of 1.5 µg/g, no significant change of the leg and antenna groomings were observed ($n = 30$, $p > 0.05$, respectively). However, when the dose of 3 µg/g was assayed there was an increase of $160 \pm 20s$ on the time of leg grooming ($n = 30$, $p < 0.05$), with no modulation in the grooming of antenna. At the highest concentration tested there was an increase of $200 \pm 10s$ in the leg grooming ($n = 30$, $p < 0.05$), with no change in the grooming of antennas. When the octopamine (15µg/g) was administered the value of leg grooming was of $358 \pm 40s$, with no change in the grooming of antenna. In these set of experiments, the pre-administration of phentolamine (0.1µg/g of animal), and subsequent octopamine (15µg/g) injection resulted in the decrease on the time spending grooming to $79 \pm 13s/30min$ ($p < 0.05$ compared to control octopamine, $n=30$). When phentolamine + JBU were assayed there was a reduction in the leg grooming rates to $56 \pm 7s/30min$ ($p < 0.05$ compared with the control or JBU octopamine, $n = 30$). When hydroxylamine (20µg/g of animal), a nitric oxide donor or acetylcholine (54 µg/g animal) was assayed, there was no change in groomings rate. The significative alterations induced by both JBU and octopamine in the leg groomings and the subsequent inhibition by phentolamine, indicate that the octopaminergic system is potentially the molecular target for the development of behavioral effects of *C. ensiformis* urease in cockoaches.

Keywords: Natural insecticides, ureases, grooming behavior, octopaminergic system.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
1.1	Ureases.....	5
1.2	A urease de <i>Canavalia ensiformis</i>	6
1.3	Inseticidas.....	7
1.4	Sistema Nervoso da Barata da espécie <i>Nauphoeta cinerea</i>	9
1.5	Ação Entomotóxica e Inseticida da JBU	10
1.6	<i>Grooming</i>	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1	Animais.....	14
3.2	Drogas usadas	14
3.3	Solução salina para Insetos.....	14
3.4	Dissolução das drogas	15
3.5	Atividade de <i>grooming</i>	15
3.6	Análise Estatística.....	16
4	RESULTADOS.....	17
5	DISCUSSÃO.....	21
6	CONCLUSÕES	23
	REFERÊNCIAS	24
	APÊNDICE	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ureases

As ureases são metaloenzimas, dependentes de níquel, que hidrolisam a ureia em duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (DIXON et al.,1975). Elas são encontradas em diversos organismos, como plantas, fungos e bactérias (Figura 1). Ureases derivadas de bactérias usualmente têm de duas a três subunidades ureolíticas (domínios α e β ou α , β e γ), enquanto em ureases derivadas de plantas e fungos, apenas uma unidade é ureolítica (domínio α). As ureases bacterianas, como a de *K. aerogenes* por exemplo, geralmente apresentam três tipos de subunidades que alinham-se com segmentos de cadeia única de ureases vegetais e fúngicas, com as quais tem cerca de 50-60% de identidade. As ureases de bactérias do gênero *Helicobacter* apresentam dois tipos de cadeias polipeptídicas, sendo a primeira delas uma “fusão” das cadeias menores de ureases de outras bactérias. Já em fungos, como o *S. pombe*, e plantas, *C. ensiformis*, por exemplo, as ureases são formadas por um único tipo de cadeia polipeptídica.(BRAUN,2010)

Entretanto, animais não têm capacidade de sintetizar ureases, e, quando ingeridas, tornam-se alvo de proteases que rapidamente neutralizam o possível efeito tóxico (MOBLEY AND HAUSINGER, 1989). O grande interesse em sintetizá-las partiu da descoberta de que a soja (*Glicine max*) é riquíssima em ureases. Posteriormente, foi descoberto que a *C. ensiformis* possui até 15 vezes mais ureases do que o *Glycine max*, caracterizando, portanto, *C. ensiformis* como organismo modelo para o estudo de ureases (BRAUN, 2010).

A urease de *C. ensiformis* JBU foi primeiramente cristalizada por Sumner, em 1926, a partir de folhas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) (SUMNER,1926). Dentre diversas propriedades que as ureases possuem, uma delas é a atividade entomotóxica (CARLINI & POLACCO, 2008).

<i>Klebsiella aerogenes</i>	γ	β	α	100/106/567 aa
<i>Helicobacter pylori</i>	β		α	238/569 aa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	α			835 aa
<i>Canavalia ensiformis</i>	α			840 aa

Figura 1: Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de organismos selecionados. O número de aminoácidos é apresentado à direita.. Fonte: Braun (2010,p: 4).

1.2 A urease de *Canavalia ensiformis*

A *C. ensiformis* é uma leguminosa popularmente conhecida como feijão de porco (*Jack bean*, em inglês) e é utilizada como adubo verde, uma vez que é bastante resistente a ação de insetos. Além de um potencial inseticida, o feijão de porco é fonte de diversas proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, tais como a lectina, utilizada como suplemento alimentar para animais (SUMNER & HOWELL, 1933) e inibidores de tripsina, que auxiliam na digestão em mamíferos (UBATUBA, 1955). Como citado anteriormente, a atividade entomotóxica da *C. ensiformis* é atribuída à *Jack Bean Urease* e à sua isoforma denominada canatoxina (CNTX), (CARLINI E GUIMARÃES, 1981).

A urease de *C. ensiformis* (*Jack Bean Urease*) contribuiu na elucidação da natureza proteica das enzimas (SIRKO & BRODZIK, 2000; FOLLMER, 2008). A cadeia polipeptídica da JBU é composta por 840 aminoácidos, com massa molecular de 90,77 kDa. Sua menor forma, com atividade enzimática em solução é a de um trímero com 270 kDa, e a conformação nativa mais provável é de um hexâmetro de 540 kDa, forma essa que apresenta efeito entomotóxico (POSTAL *et al.*, 2012) (Figura 2).

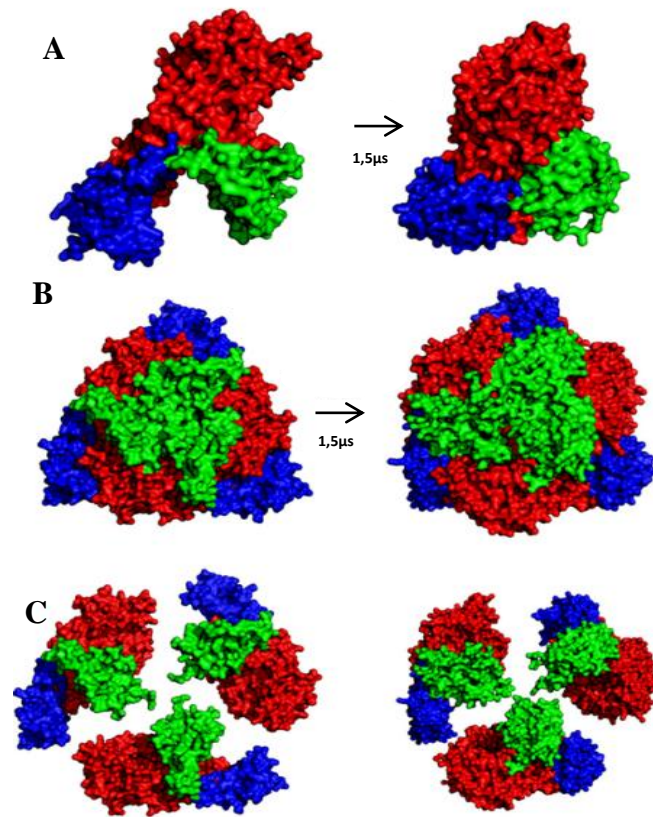


Fig. 02. Mudanças conformacionais na urease de *C. ensiformis* obtidas por simulação de campo de força. (A) monômeros, (B) trímeros ativos e (C) estrutura trímica, ativa, formada pelos monômeros de JBU.
 Fonte: Braun (2010,p:38)

1.3 Inseticidas

Inseticidas são compostos químicos de origem natural ou sintética que tem por função o controle de insetos praga principalmente em países em desenvolvimento. Atualmente, são oferecidos no mercado inseticidas que afetam um desses cinco sistemas biológicos: o sistema nervoso, a produção de energia, a reciclagem de cutícula, o sistema endócrino e o balanço de água (VALLES & KOEHLER, 2011). Dentre eles, o sistema nervoso apresenta relevância uma vez que quando sob disfunção, pode levar a alterações no comportamento, como padrões anormais de alimentação (NICOLAUS & LEE, 1999), reprodução (DELPUECH & BARDON & BOULÉTRE, 2005), forrageamento (GUEZ & ZHANG & SRINIVASAN, 2005), migração e termorregulação (GRUE & GIBERT & SEELEY, 1997).

Assim, devido a esse amplo espectro de ação no sistema nervoso, os inseticidas

frequentemente tem por alvos moleculares os canais de sódio, os receptores do ácido γ -amino-butírico (GABA), as enzimas colinesterases (figura 3), e os receptores nicotínicos, glutamatérgicos e octopaminérgicos (RAYMOND-DELPECH *et al*, 2005).

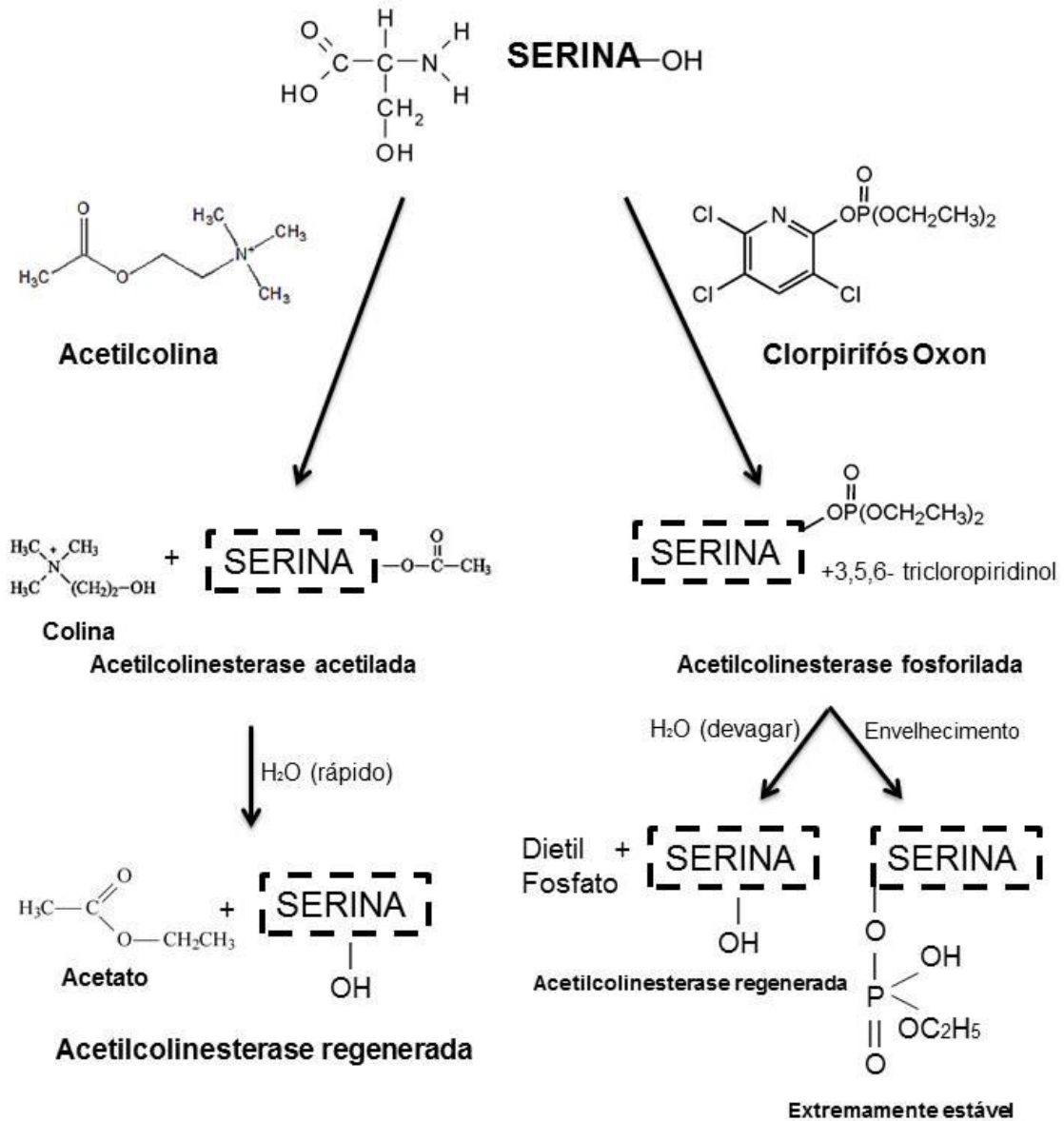


Figura 03. Esquema da hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase e reação do clorpirifós oxon com a acetilcolinesterase. Uma vez em contato com organofosforados, um grupo de inseticidas bastante usado, a acetilcolinesterase é fosforilada, o que a impede de ser regenerada pelo mecanismo natural. A isoforma fosforilada é mais estável, e portanto, tem maior probabilidade de ser formada em comparação com acetilcolinesterase ativa. Adaptado de: STURMER, 2014.

1.4 Sistema Nervoso da Barata da espécie *Nauphoeta cinerea*

O sistema nervoso de insetos é complexo e integra um conjunto diversificado de aparelhos sensoriais externos e informações fisiológicas. Assim como os outros animais, o componente principal do sistema nervoso é o neurônio, composto pelo corpo celular, os dendritos, que recebem os estímulos; e o axônio, que transmite informações para outro neurônio ou a um órgão efetor, como por exemplo, o músculo. Os neurônios liberam uma variedade enorme de substâncias químicas nas sinapses, chamadas de neurotransmissores, que estimulam ou inibem neurônios efetores ou músculos. Assim como em vertebrados, os principais neurotransmissores incluem o GABA, o glutamato, e catecolaminas como a dopamina, serotonina e a acetilcolina (figura 4), bem como a octopamina, um neurotransmissor encontrado apenas em insetos com função similar a adrenalina em vertebrados (GULLAN & CRANSTON, 2005).

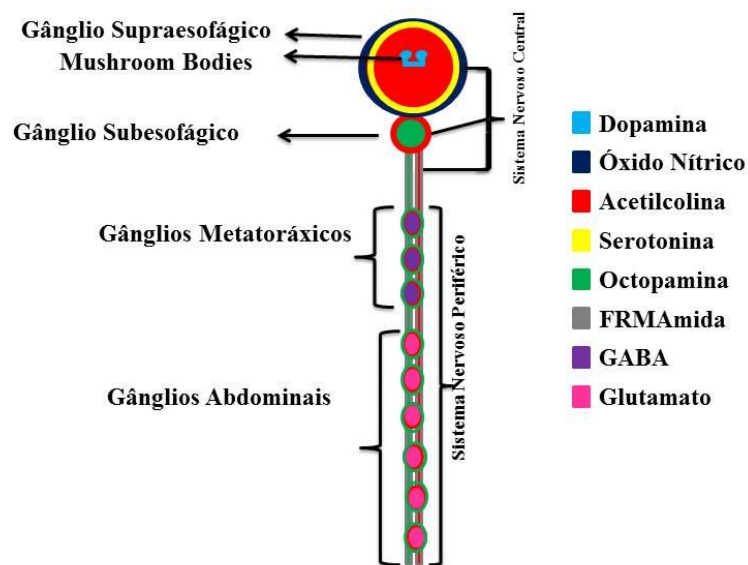


Figura 4. Organização do sistema nervoso de *N. cinerea*. O cérebro, ou gânglio supraesofágico, localiza-se superior ao cordão nervoso ventral e é composto por diversas subunidades, como os *mushroom bodies*, estrutura essa responsável pela memória no animal. No cérebro, predomina a transmissão colinérgica, mas nele também encontram-se sinapses serotoninérgicas, dopaminérgicas e de óxido nítrico. Já no gânglio subesofágico, estrutura essa que é a extremidade do cordão nervoso ventral, há predominantemente transmissão octopaminérgica e colinérgica. Imediatamente abaixo, encontram-se três gânglios metatorácicos, com modulação predominantemente gabaérgica, e seis gânglios abdominais, com modulação predominantemente glutamatérgica. Desses gânglios, partem interneurônios que transmitem sinapses excitatórias e inibitórias para outras regiões, formando a junção neuromuscular. Além desses neurotransmissores sé encontrada a FRMAmida, que controla a contração cardíaca. FONTE: O autor.

Cada segmento do corpo dos insetos possui um par de gânglios fundidos ligados em uma região que une as duas metades simétricas dos centros nervosos e unidos longitudinalmente aos gânglios dos segmentos adjacentes por conectivos (RANDALL & BURGGRE & FRENCH 2000; GALLO *et al.*, 2002). Os gânglios de todos os segmentos da cabeça são fundidos formando dois centros ganglionares, o cérebro ou gânglio supraesofágico e o gânglio subesofágico (GULLAN & CRANSTON, 2005). Nenhum dos gânglios contém um centro absolutamente vital, razão pela qual um inseto decapitado ainda pode caminhar (Revisado por OSBOURE, 1996)

1.5 Ação Entomotóxica e Inseticida da JBU

Estudos anteriores demonstram diminuição do transporte de fluídos através do epitélio do estômago no sistema digestório dos insetos, causado pela ação direta da JBU sobre o inseto. Além disso, a Jack Bean Urease promove alteração na frequência e na amplitude das contrações do intestino posterior e altera o tônus basal do músculo (STANISÇUASKI, 2007). Outro efeito previamente observado foi a permeabilização da membrana, formando poros de canais para o íon potássio (PIOVESAN *et al.*, 2014).

Em relação ao mecanismo de ação entomotóxica, este ainda não foi elucidado quanto a atividade das ureases e ainda carecem de estudos mais aprofundados (CARLINI & POLACCO, 2008). Estudos recentes de letalidade em percevejos *Rhodnius prolixus* (STÅL, 1859), demonstram que após ingestão de alimentos contendo canatoxina ou ureases, a letalidade ocorre entre 36 a 48 horas (CARLINI *et al.*, 1997). Nesse aspecto existe uma relação direta entre a presença de catepsinas no intestino dos animais que possibilitam a conversão da JBU em um peptídeo tóxico de 10kDa (Jaburetox) (figura 5). Nesses mesmos estudos, assim como observado previamente por Mulinari *et al.* (2007) e Tomazetto *et al.* (2007), foram demonstrados efeitos neurotóxicos tais como paralisia e movimento descoordenado das pernas e antenas, que antecedem a morte do animal (MULINARI *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrada a ação anticolinesterásica exercida por doses subletais da JBU sobre o sistema nervoso central de baratas *N. cinerea*. Esse efeito corrobora os demais mecanismos entomotóxicos já elucidados (Carrazoni *et al.*, 2015, em submissão).

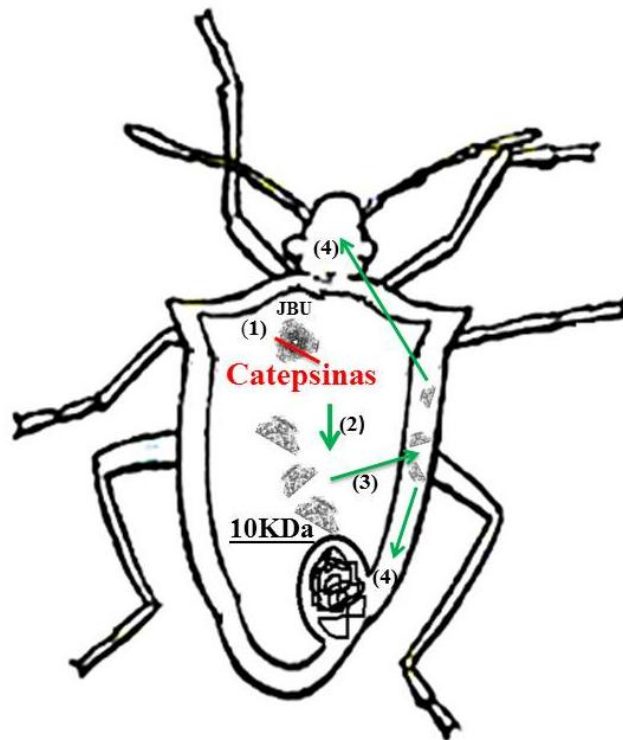


Figura 5. Mecanismo entomotóxico da JBU em *Rhodinus prolixus*. Para exercer seu mecanismo de ação, as proteínas inseticidas precisam ser ingeridas pelos insetos alvos; (1) Uma vez no sistema digestivo, as protoxinas são clivadas (2) pelas enzimas digestivas do hospedeiro. No caso da toxicidade em *Rhodinus prolixus*, a urease de *C. ensiformis* sofre clivagem de catepsinas. Então, um peptídeo ativo letal de aproximadamente 10 kDa é liberado (3), que é removido do intestino médio e passa a circular na hemolinfa, atingindo outros tecidos, como por exemplo, (4) os túbulos de Malpighi e o sistema nervoso central, terminando por matar o inseto. Adaptado de: CARLINI & POLACCO, 2008

1.6 Grooming

O *grooming* é o movimento de limpeza de pernas e antenas exercido por insetos e, além de assear a superfície externa do corpo, pode ter outras funções como comportamento de corte, sinalização social, atividade de deslocamento e de excitação (SPRUIJT et al 1992)(figura 6). Em baratas, esse padrão de comportamento é provavelmente provocado através da estimulação do sistema nervoso central, que, de acordo com o tipo de *grooming* exercido, demonstra a neurotransmissão mais provável existente: no *grooming* perna, atua principalmente a octopamina e dopamina quando o animal desempenha o *grooming* de antena (WEISEL-EICHLER et al 1999; LIBERSAT & PFLUEGER 2004).

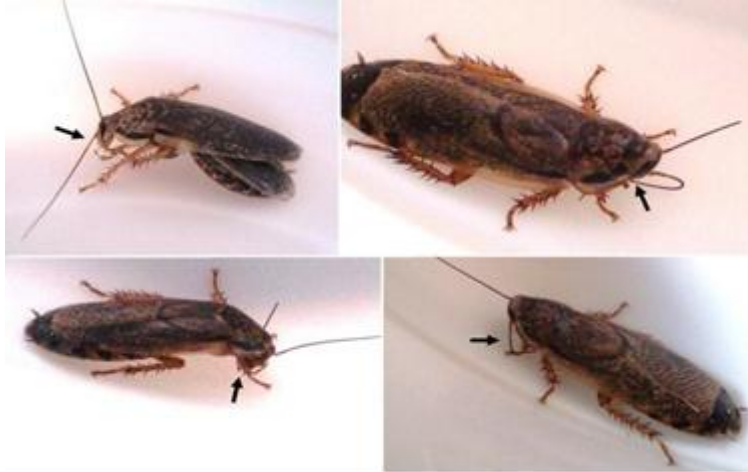


Figura 6. Baratas realizando o comportamento de *grooming*. Esse comportamento é observado quando o animal limpa as antenas e patas várias vezes ao dia. Fonte: Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia (LANETOX).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar se a atividade entomotóxica da urease de *C. ensiformis* envolve alterações comportamentais em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* por meio da análise do comportamento de *grooming*.

2.2 Objetivos específicos

- Discriminar a atividade moduladora da JBU entre os diferentes tipos de *grooming* (pernas e antenas);
- Identificar a atividade da JBU em alvos moleculares específicos por meio do uso de instrumentos farmacológicos (fentolamina);
- Identificar a atividade da JBU em vias de sinalização celular como as da octopamina, óxido nítrico e acetilcolina;
- Investigar se a atividade entomotóxica da JBU envolve as vias do Ca^{++} sobre neuronios do sistema nervoso central de *Nauphoeta cinerea*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Nos experimentos, foram utilizados animais adultos da espécie *Nauphoeta cinerea* (Figura 7), de ambos os sexos. Os animais foram criados e mantidos em insetário no Campus de São Gabriel da Universidade Federal do Pampa sobre condições de laboratório com temperatura controlada (22-26°C), e com água e comida *ad libitum*. Os ensaios foram realizados com temperatura ambiente controlada (22-25°C).



Figura 7. Barata da espécie *Nauphoeta cinerea*. É popularmente conhecida como barata salpicada e é originária do continente americano. Fonte: Douglas Silva dos Santos, Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia (LANETOX).

3.2 Drogas usadas

A urease de *C. ensiformis* foi obtida da empresa Sigma-Aldrich Brasil. As demais drogas (Octopamina, Fentolamina, Iodeto de Acetilcolina e Hidroxilamina) foram do mais alto grau de pureza obtidos da empresa Biorad.

3.3 Solução salina para Insetos

Foi utilizada solução salina, conforme HEBERLE (2015), composta por NaCl 150 mM, CaCl₂ 2mM, KCl 10mM e Tris 10mM em adição de água ultra pura até o volume de 200ml, com pH 6,8 corrigido com NaOH. O pH foi ajustado com pHmetro de eletrodo de

vidro, previamente calibrado.

3.4 Dissolução das drogas

A JBU e as demais drogas foram dissolvidas em Tampão Fosfato (PBS) sendo preparadas diariamente e previamente aos ensaios de atividade biológica. Antes da administração da JBU e das demais drogas nas preparações, as mesmas foram diluídas em solução salina para insetos quando necessário.

3.5 Atividade de *grooming*

A atividade de *grooming* foi avaliada essencialmente como descrito por STURMER (2014). Para isso, os animais foram injetados sob a terceira porção abdominal, utilizando-se uma seringa Hamilton e o volume máximo de 20 μ L, com a droga a ser testada e colocada em uma arena circular (*Open Field*, Insight), usada em testes comportamentais (recipiente circular de 30 cm de raio e 30 cm de altura) (Figura 8). O comportamento de limpeza das baratas foi monitorado e o tempo contínuo em segundos de *grooming* foi medido durante um período de 30 minutos, 10 minutos após o tratamento e cinco minutos de adaptação ao ambiente. Os animais nunca haviam estado no *Open Field* anteriormente, e, portanto, era um ambiente novo em todos os casos, justificando o período de adaptação uma vez que animais acurados poderiam gerar artefatos. Os testes foram realizados no período entre 2-8 horas após o início do ciclo de luz.

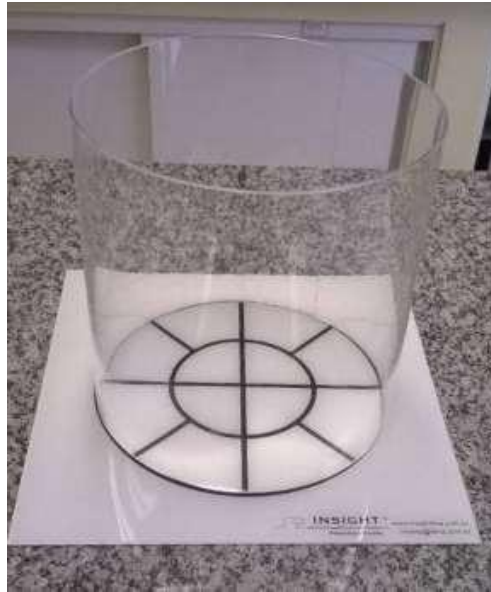


Figura 8. Círculo de campo aberto (*Open Field*). O animal era alocado na arena cinco minutos antes de começar os ensaios para que se familiarizasse com o local, e somente então começava-se a contagem do tempo de *grooming* constante em 30 minutos. O *open field* era limpo com álcool 70% ao final de cada ensaio, para que o odor do animal anterior não interferisse no padrão de *grooming* do próximo.

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro-padrão da média. As diferenças foram obtidas usando-se a análise de variância (ANOVA/MANOVA) juntamente com teste “t” Student. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os gráficos foram plotados como média \pm erro-padrão usando o software Origin Pro 8.6 (OriginLab Corporation, MA, EUA).

4 RESULTADOS

Os tempos de *grooming* em segundos foram contabilizados separadamente para pernas e antenas, e estes plotados como média \pm erro-padrão. Em experimentos controle, onde os animais foram tratados somente com solução salina para insetos (n=30) os valores de *grooming* de pernas e de antenas foram respectivamente (153 \pm 8s/30min e 70 \pm 6s/30min). Quando a JBU foi administrada em diferentes doses (1.5, 3 e 6 μ g/g de animal) houve um efeito dose-dependente sobre a atividade de *grooming* de pernas, mas não no de antenas. Assim, na dose de 1.5 μ g/g de animal de JBU houve um aumento para 177 \pm 23s/30min no *grooming* de pernas ($p>0.05$, n=30). Quando a dose de 3 μ g/g foi administrada, ocorreu um aumento no tempo de *grooming* em comparação a primeira dose para 253 \pm 33s/30min ($p<0.05$, n=30). Com a maior dose ensaiada houve um aumento ainda maior no tempo de *grooming* de pernas para 363 \pm 23s/30min ($p<0.05$, n=30), sem alteração significativa do *grooming* de antenas (Figura 9).

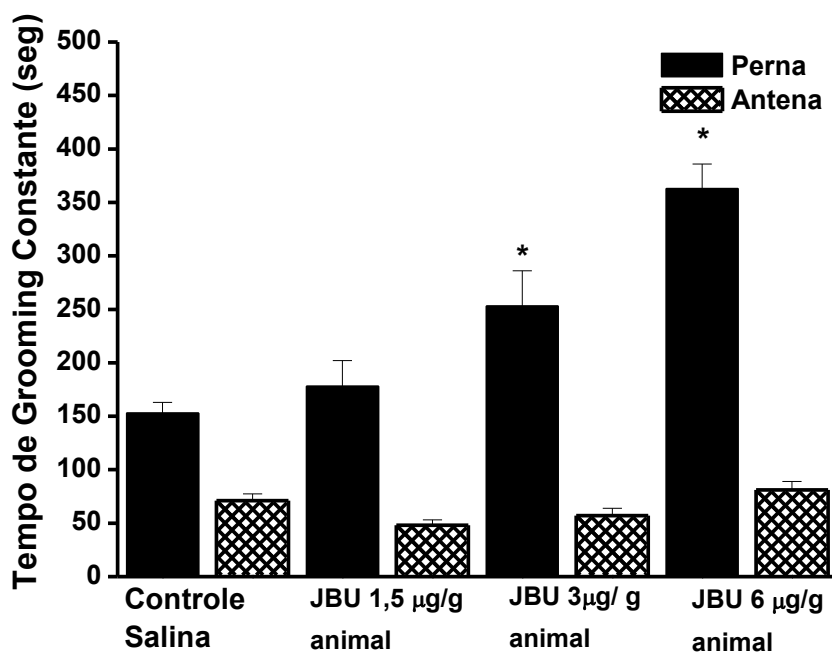


Figura 9. Modulação da resposta de *grooming* pela administração de diferentes concentrações da urease de *C. ensiformis* (JBU) em *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada barra representa a média \pm E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. * $p<0.05$. Foi demonstrado um efeito dose dependente do *grooming* de perna, com o maior tempo de *grooming* de perna na dose 6 μ g/g animal. JBU= *Jack Bean Urease*. Fonte: O Autor.

A literatura demonstra que a modulação do *grooming* de pernas em baratas é modulada pelo neurotransmissor dopamina/octopamina (LIBERSAT et al., 1999.). Dessa forma, quando a octopamina (15µg/g de animal) foi administrada nos animais, houve um aumento da taxa de *grooming* para $358 \pm 27s/30min$ ($p < 0.05$, $n=30$) (Figura 10). Esse último resultado foi similar ao padrão de *grooming* apresentado pela JBU 6µg/g animal.

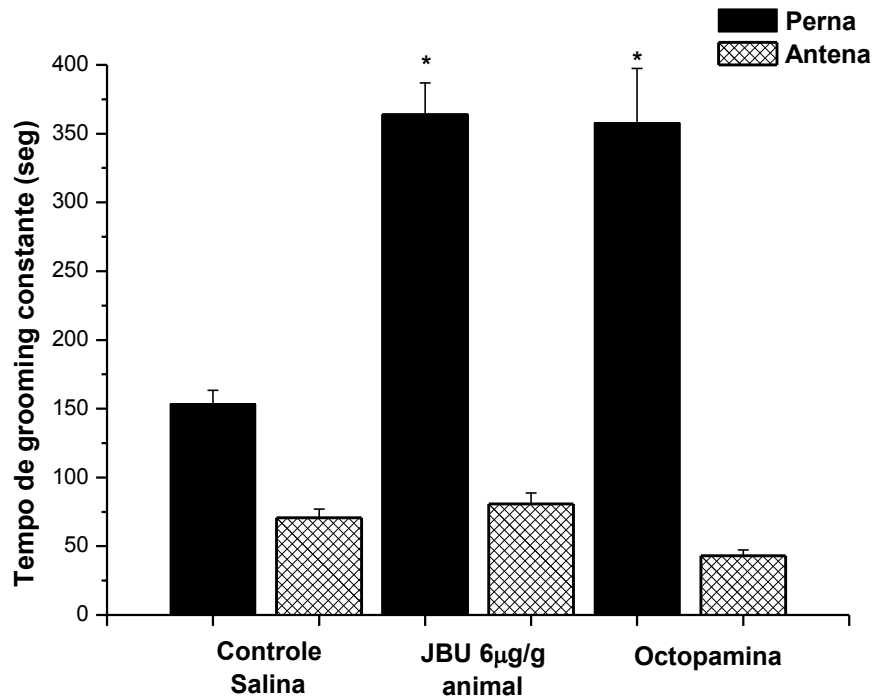


Figura 10. Modulação da resposta de *grooming* pela administração de JBU (6µg/g de animal) e octopamina (15 µg/g animal). No gráfico, cada barra representa a média ± E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. * $p < 0.05$. Foi observada similaridade entre os padrões de *grooming* apresentados pela JBU e pela octopamina, que apresentaram um aumento do *grooming* de perna e inalteração no *grooming* de antena. Octo=Octopamina; JBU= Jack Bean Urease.

Com o objetivo de comprovar uma atividade direta da urease de *C. ensiformis* sobre os receptores octopaminérgicos, foi usado o inibidor seletivo do receptor ionotrópico de octopamina, fentolamina. A injeção de fentolamina (0.1µg/g de animal) foi feita 15min antes do tratamento com octopamina (15µg/g animal) ou JBU (6µg/g de animal) nos animais ($n=30$). Assim, o pré-tratamento com fentolamina inibiu o efeito da octopamina sobre o *grooming* de perna para $79 \pm 13s/30min$ ($p < 0.05$ comparado com o controle octopamina, $n=30$). Quando a fentolamina (0.1µg/g de animal) foi administrada 15 minutos antes do tratamento com JBU (6µg/g de animal), também houve uma diminuição significativa da taxa de *groomings* de perna para $56 \pm 7s/30min$ ($p < 0.05$ comparado com o controle JBU, $n=30$).

(figura 11) Esses dados corroboram a hipótese de que a JBU esteja atuando em sítios octopaminérgicos.

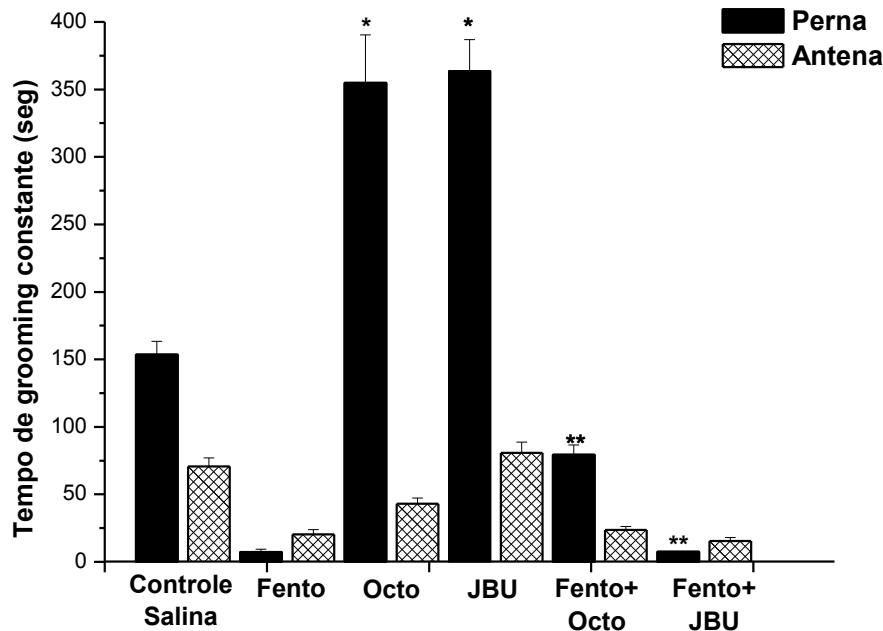


Figura 11. Modulação do tempo de grooming pela octopamina (15 µg/g animal), seu antagonista fentolamina (0.1 µg/g de animal) e JBU (6 µg/g de animal). No gráfico, cada barra representa a média ± E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. * p<0.05. Quando a Fentolamina foi administrada como pré-tratamento em conjunto com a Octopamina ou JBU, observou-se uma diminuição significativa nos tempos de grooming de perna, corroborando com a hipótese elaborada de que a JBU esteja simulando a octopaminérgica. Fento= Fentolamina; Octo=Octopamina; JBU= *Jack Bean Urease*.

Além disso, sabe-se que em insetos o óxido nítrico está envolvido em alterações comportamentais (LIBERSAT & PFLUEGER, 2004). Nesse sentido, foi ensaiada a hidroxilamina, um substrato para a enzima óxido nítrico sintase que favorece o aumento da produção de óxido nítrico. Quando a hidroxilamina (20 µg/g de animal) foi ensaiada (n=30), não houve diferença significativa tanto na taxa de *grooming* de pernas como na de antenas (p>0.05, n=30) (Fig. 13), sugerindo que vias do óxido nítrico não estejam envolvidas em alterações na taxa de *grooming*.

Recentemente o nosso grupo demonstrou que compostos com atividade anticolinesterásica induziam um aumento da taxa de *groomings* em *N. cinerea* (SUTURMER et al., 2014). Nesse sentido foi ensaiado o neurotransmissor acetilcolina (54 µg/g animal), um que está presente no sistema nervoso de *N. cinerea*. Não houve modulação significativa do tempo de *groomings* quando a acetilcolina foi ensaiada. (Figura 12).

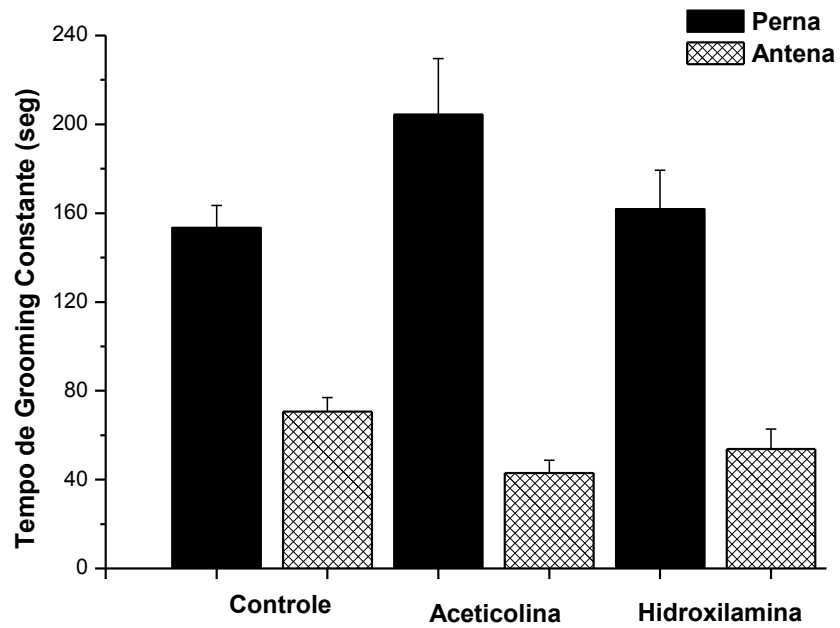


Figura 12. Modulação do tempo de *grooming* durante o tratamento com Acetilcolina (54 µg/g animal) e Hidroxilamina (20 µg/g de animal). No gráfico, cada barra representa a média ± E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. * $p < 0.05$. Os resultados não apresentaram diferenças significativas.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi demonstrada a atividade tóxica da urease de *C. ensiformis* sobre o padrão neurocomportamental de *grooming* em baratas *N. cinerea*. Os diferentes mecanismos envolvidos na interação da urease com o sistema nervoso, bem como as suas relações no desenvolvimento do processo entomotóxicos serão discutidos a seguir.

Apesar das doses de JBU terem demonstrado atividade entomotóxica em diferentes insetos (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012), ela parece não apresentar letalidade para a *Nauphoeta cinerea* por administração intra-abdominal. Esse fato provavelmente está associado ao tipo de enzimas digestivas que o animal possui. A letalidade induzida pela JBU está relacionada com o alvo da canatoxina, que causa morte apenas em insetos que contenham enzimas do tipo catepsinas. Esse processo já foi descrito anteriormente. Portanto, a urease pode demonstrar-se letal para insetos como *Callosobruchus maculatus* e *Rhodnius prolixus*, que são sensíveis à toxina devido a esse mecanismo digestivo. Portanto, insetos como baratas *Nauphoeta cinerea*, que tem a digestão no intestino médio feita por três tipos ativos de serinas e cisteínas não apresenta letalidade (CARRAZONI *et al.*, 2015, em submissão). Todavia, outros mecanismos de toxicidade podem afetar esses animais, causando a morte de forma indireta.

Foi também observado que a JBU induz um aumento no tempo do comportamento de *grooming* de perna. Em insetos, apesar do centro neural envolvido no comportamento de *grooming* ainda ser desconhecido, foi demonstrado que o principal neurotransmissor associada com esta resposta é a dopamina nas antenas (WEISEL-EICHELER *et al.*, 1999) e a octopamina nas pernas (LIBERSAT *et al.*, 1999). Em nossas condições experimentais, o tratamento dos animais com octopamina mimetizou o aumento do tempo de *grooming* induzido pela JBU. Além disso, o inibidor seletivo do receptor de octopamina, a fentolamina, inibiu drasticamente a resposta de *grooming* de perna induzida pela JBU, corroborando uma ação da urease sobre a neurotransmissão octopaminérgica.

Em adição, o fato da hidroxilamina, um substrato da oxido nítrico sintase, não ter alterado a frequência do comportamento de *grooming*, demonstra que não deve haver relação entre a modulação desse comportamento e a produção de óxido nítrico, pelo menos em nossas condições experimentais. Outro aspecto relevante, é o fato do *grooming* de antena não ter sido alterado, mesmo tendo sido demonstrado que o JBU inibe a atividade da acetilcolinesterase. Recentemente, foi demonstrado que inibidores de colinesterase induzem aumento da taxa de *grooming* de antena (STURMER *et al.*, 2014), o que sugere uma ação direta do JBU sobre o

gânglio subesofágico, que é supostamente o principal ativador das respostas cinéticas das pernas dianteiras (LIBERSAT et al., 1999).

Assim, os dados apresentados nesse trabalho reforçam o papel das ureases como agentes inseticidas naturais. Eles demonstram que esses compostos induzem alterações comportamentais importantes em insetos resistentes, como as baratas, e que essas alterações envolvem mecanismos complexos sobre o sistema nervoso central e periférico dos insetos. Ensaio futuros de imunohistoquímica bem como de eletrofisiologia celular poderão trazer luz a essas questões.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados aqui, bem como os aspectos relevantes que foram discutidos, nos permitem elencar as seguintes conclusões:

- A urease de *C. ensiformis* (JBU) não exerceu atividade letal quando injetada via intra-abdominal no modelo experimental de *Nauphoeta cinerea*;
- A JBU induziu um aumento no comportamento de *grooming* de pernas, sugerindo o envolvimento da neurotransmissão octopaminérgica no sistema nervoso central;
- Embora na literatura relatos de sistemas afetados pela injeção exógena de acetilcolina, nesse trabalho não foram demonstradas alterações no comportamento de *grooming* de *N. cinérea*, quando o composto foi injetado via intra-abdominal.

REFERÊNCIAS

- BRAUN, R.L.. **Comportamento Conformacional da Urease de *Canavalia ensiformis***. Dissertação de Mestrado do Programa De Pós-Graduação Em Biologia Celular E Molecular-UFRGS.2010.
- BREER, H., & SATTELLE, D.B. **Molecular properties and functions of insect acetylcholinereceptors.***The Journal of Insect Physiology*. 33: 771-790. 1987.
- CALABRESE, R.L. **Modulation of muscle and neuromuscular junction in invertebrates.** *The Neuroscience*. 1: 25-34. 1989.
- CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A. **Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A.** *Toxicon* 19: 667-675. 1981.
- CARLINI, C.R., OLIVEIRA, A.E., AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J., WELLS, M.A. **Biological effects of canatoxin, a plant toxic protein, in different insect models. Evidence for proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like**
- CARLINI C.R. & POLACCO,J.C. **Toxic Properties of Urease.** *CROP SCIENCE*. 48: 1665-1672. 2008
- CASARETT & DOULL'S.**Toxicology: the basic science of poisons.** editor, Curtis D. Klaasen – 7th edition. McGraw-Hill. New York. 1309 p. 2008.
- CRAIG, C. & STITZEL, R. **Modern pharmacology with clinical applications.** 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 832p. 2004.
- DELPUECH, J., BARDON, C., BOULÉTREAU, M. **Increase of the behavioral response to kairomones by the parasitoid wasp *Leptopilinaheterotomasurviving***
- DIXON, N.E., GAZZOLA, T.C., BLAKELEY, R.L., ZERMER, B. **Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme.A simple biological role for nickel?***J Am Chem Soc*;97: 4131-4133. 1975.
- FOLLMER, C. **Insights into the role and structure of plant ureases.** *Phytochemistry* 69: 18-28. 2008.
- FREITAS, T.C.D, HEBERLE,M.A.,PERIN,A.P., ZANATTA,A.P. RODRIGUES, P.V.,SANTOS, F.D.M.D. ALMEIDA, C.G.M.D., BREDA, R.V. SANTOS, D.S.D, PINTO,P.M., COSTA, J.C.D., CARLINI,C.R., BELO, C.A.D. **Central and Peripheral Neurotoxicity Induced by Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: interplay among cholinergic, gabaergic and octopaminergic neurotransmission.** *Revista BBA General Subjects*, em submissão. 2015.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R., DE BAPTISTA, G., BERTI FILHO, E., PARRA, J., ZUCCHI, R., ALVES, S., VENDRAMIM, J., MARCHINI, L., LOPES, J., OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. FEALQ. Piracicaba- SP. 10: 920. 2002.

GRUE, C., GIBERT, P., SEELEY, M. **Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: Thermoregulation, food consumption and reproduction**. *Amer Zool* 37: 369-388. 1997.

GUEZ, D., ZHANG, S., SRINIVASAN, M. **Methyl parathion modifies foraging** HIRATA, R. & SKORTZARU, B. & NARCISO, E. **Avaliação de degradação de inseticidas, em função do pH, utilizando *Drosophilamelanogastere* teste de inibição enzimática.***Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.70, n.3, p.359-365. 2003

GUEZ, D., ZHANG, S., SRINIVASAN, M. **Methyl parathion modifies foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera*)**. *Ecotoxicology* 14:431-437. 2005.

GULLAN P.J. & CRANSTON P.S. **The insects: an outline of entomology**. Blackweel Publishing Ltd. Estados Unidos. 3rd Ed. 2005.

KERKUT, G.; Pitman, R.; Walker, R. **Sensitivity of neurones of the insect central nervous system to iontophoretically applied acetylcholine or GABA**. *Nature* 222:1075–1076. 1969.

LIBERSAT F., WEISEL-EICHLERA., HASPEL G. **Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach**. *The Journal of Experimental Biology*. 202: 957-964. 1999.

LIBERSAT F. **Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey**. *J. Comp. Physiol*. 189: 497-508. 2003.

LIBERSAT, F & PFLUEGER, H. **Monoamines and the orchestration of behavior**. *BioScience* 54:17–25. 2004

MILLS, C., CLEARY, B.J., GILMER, J.F., WALSH, J.J., **Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil**. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56:375–379. 2004.

MOBLEY, H.L. & HAUSINGER, R.P. **Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization**. *Microbiol*. 53: 85-108. 1989.

NICOLAUS, L. & LEE, H. **Low acute exposure to organophosphate produces long-term changes in bird feeding behavior**. *EcolAppl* 9: 1039-1049. 1999.

OSBOURE, R. **Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and Their Receptors**. *PharmacolTher*. 69:117-142. 1996.

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: 6-17. 2014

POSTAL, M., MARTINELLI, A.H., BECKER-RITT, A.B., LIGABUE-BRAUN, R., DEMARTINI, D.R., RIBEIRO, S.F., PASQUALI, G., GOMES, V.M., CARLINI, C.R. **Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptidies.** Peptides. 38: 22-32. 2012.

RANDALL, D., BURGGREN, W., FRENCH, K. **Fisiologia Animal.** Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 4^a Ed. 729. 2000.

SPRUIJT, B.M., HOL, T., ROUSSEAU, J. **Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique.** Physiology & Behavior. 51:747-752. 1992.

RAYMOND-DELPECH, V., MATSUDA, K., SATTELLE, B., RAUJ, J., SATTELLE D. **Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides.** InvertebrateNeuroscience5: 19-33. 2005.

ROEDER, T. **Octopamin in vertebrates.** Prog.Neurobiol. 59: 533-561. 1999.

SANTOS, V., DONNICI, C., COSTA, J., CAIXEIRO, J. **Compostos organofosforadospentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais.** *Química Nova* 30: 159-170. SHONO, T.; Ohsawa, K.; Casida, J. (1979). *Metabolism*. 2007.

SIRKO A, BRODZIK R. **Plant ureases: roles and regulation.** Acta Biochim Pol; 47: 1189-1195. 2000.

SPRUIJT, B.M., HOL, T., ROUSSEAU, J. **Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique.** Physiology & Behavior. 51:747-752. 1992.

STANISÇUASKI, F. **Ureases de *Canavalia ensiformis*: processamento e mecanismo de ação em insetos.** Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

z

STURMER, G.D., CARRAZONI, T.F., HEBERLE, M.A., ASSIS, D.R., VINADÉ,L., BATISTA, A.P., FRANCO, J.L., DAL BELO, C.A. **Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal Doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 109: 56-62. 2014.

SUMNER, J.B. **The isolation and crystallization of the enzyme urease.** J. Biol. Chem. 69: 435-441. 1926.

THANY, S.H. & TRICOIRE-LEIGNEL, H. **Emerging Pharmacological Properties of cholinergic Synaptic Transmission: Comparison between Mammalian and Insect Synaptic and Extrasynaptic Nicotinic Receptors.** Current Neuropharmacology, 9: 706-714. 2011.

TOMAZETTO, G., F. MULINARI, F. STANISÇUASKI, B.P. SETTEMBRINI, **Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties.** Toxins (Basel). J. Biol. Chem. 69:435–441. 2007.

UBATUBA, F.B. **Ocurrence of a trypsin inhibiting factor in the seeds of *Canavalia ensiformis*.** Rev. Bras. Biol. 15: 1-8. 1955.

VALLES, S. & KOEHLER, P. **Insecticides Used in the Urban Environment: Mode of Action.** University of Florida. Disponível em:<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN07700.pdf>. 2011.

WEISEL-EICHLER, A., HASPEL, G., LIBERSAT, F. **Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach.** The Journal of Experimental Biology. 202: 957-964. 1999.

APÊNDICE

Em anexo, o artigo científico com dados apresentados nesse trabalho de conclusão de curso, submetido para a revista BBA General Subjects.