

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**CAMPUS SÃO GABRIEL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS**  
**BIOLÓGICAS**

**ANA PAULA KWIATKOWSKI HAMERSKI ZANATTA**

**INATIVAÇÃO PRECOCE DE CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTES E**  
**ATIVIDADE NEUROTÓXICA INDUZIDA PELO PEPTÍDEO JABURETOX (JBTX)**  
**EM BARATAS *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SÃO GABRIEL, RIO GRANDE DO SUL,**  
**BRASIL 2018**

**ANA PAULA KWIATKOWSKI HAMERSKI ZANATTA**

**INATIVAÇÃO PRECOCE DE CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTES E  
ATIVIDADE NEUROTÓXICA INDUZIDA PELO PEPTÍDEO JABURETOX (JBTX)  
EM BARATAS *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana***

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: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Coorientadora: Prof. Hab. Maria Stankiewicz

**SÃO GABRIEL**

**2018**

ZANATTA, Ana Paula Kwiatkowski Hamerski

ATIVIDADE NEUROTÓXICA DO PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO  
JABURETOX (JBTX) em baratas *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta  
americana*

52 folhas;

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Cháriston André DalBelo.

1. Qualidade Ambiental. 2. Neurofarmacologia.

3. Toxinologia.

I. Dal Belo, Cháriston André. II. Doutor

**INATIVAÇÃO PRECOCE DE CANAIS DE SÓDIO VOLTAGEM DEPENDENTES E  
ATIVIDADE NEUROTÓXICA INDUZIDA PELO PEPTÍDEO JABURETOX (JBTX)  
EM BARATAS *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.  
Área de Concentração: Ciências Biológicas  
Linha de Pesquisa: Qualidade Ambiental

Banca examinadora:

---

Dr.<sup>a</sup>. Ângela Regina Piovezan  
Pontifícia Universidade Católica Rio Grande do Sul- PUCRS

---

Dr. Jeferson Luis Franco  
UNIPAMPA – São Gabriel

---

Dr. Cháriston André Dal Belo  
UNIPAMPA – São Gabriel

Mais uma vez, à minha família. Sempre,  
qualquer conquista, à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jairo Antônio Zanatta e Mara Elília Zanatta. Em primeiro lugar, antes de quem seja. Vocês ensinaram as primeiras palavras, os primeiros passos, seguraram na minha mão em todos os primeiros dias. Sofreram e choraram comigo todo e qualquer desafio. Me proporcionaram os ombros de gigantes os quais eu sempre pude subir.

À minha irmã Julia Kwiatkowi Hamerski Zanatta. Saber que independentemente do que haja tu estarás comigo e por mim é uma das melhores sensações na vida. Eu te agradeço por me permitir dividir minha vida contigo e por participar da minha mesmo que longe. Eu amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, por acreditar em mim e me estender a mão como um amigo, pai e líder. As oportunidades a mim oferecidas foram as que eu mais quis, durante toda a minha vida. Espero não o desapontar e que o senhor continue confiando em mim, pois és o líder e o pesquisador que eu almejo ser um dia.

Ao departamento de Biofísica da Faculdade de Ciências Biológicas e Proteção Ambiental da Universidade Nicolau Copérnico de Toruń, por me aceitar como pesquisadora convidada e me proporcionar a melhor experiência da minha vida.

À Dra Maria Stankiewicz, apelidada carinhosamente pelo departamento como “The Goddess”. À Milena Jankowska e Joanna Wyszowska pela parceria de pesquisa. Por todo tempo e dedicação. Dziękuję bardzo!

Aos “tugas” pela amizade e parceria no inverno rigoroso polonês. Ao Erasmus pela oportunidade de convivência com outras culturas.

À Mirelle Manfron, minha amiga de longa data. Poucas são as amigas que nos permitem ter esse grau de confiança e intimidade. És a irmã que pude escolher ter. Obrigada por tudo, sempre!

À Donatella Pipoca, a fofura da minha vida. Poucos são os momentos que me deixas estudar em paz, ou descansar sem preocupações. Mas muitas são as vezes que a tua companhia é o que mais me alegra e me mantém saudável mentalmente. Eu te amo tanto, pitoquinha!

Aos amigos e colegas do Lanetox. Por todas as discussões, sejam elas úteis ou inúteis. Por serem esse grupo de pesquisa.

À Braspol por manter viva a chama da cultura polonesa e me fazer sonhar com as oportunidades que tive e me encorajar a busca-las

E finalmente, à czarna madonna, Nossa Senhora de Częstochowa.

As pessoas que e auxiliaram de uma forma ou outra. Aos Desafios. Às oportunidades.  
Muito Obrigada. Dziękuję bardzo!

“A sabedoria da natureza é tal que  
não produz nada de supérfluo ou  
inútil”

Nicolau Copérnico



## RESUMO

Atualmente, há urgência do aumento da produção mundial de alimentos, o que torna o uso de pesticidas uma necessidade recorrente, mesmo que esses compostos possuam uma série de efeitos indesejados sobre o meio ambiente em geral. Portanto, o desenvolvimento de novos compostos naturais com potencial entomotóxico torna-se não apenas uma alternativa. Diversas moléculas naturais com potencial entomotóxico possuem como alvo principal canais iônicos, destacando-se o canal de sódio voltagem dependente (Nav). Nav é um complexo proteico transmembrana, que possui um poro preenchido com água, onde íons de sódio difundem-se através do gradiente eletroquímico. A diversidade farmacológica dos Navs é vasta e observada através da multiplicidade de substâncias tóxicas, específicas para esses canais. Assim, a investigação de interação de moléculas naturais com esse canal é pertinente. As ureases são metaloenzimas que hidrolizam a ureia em amônia. Esses compostos são sintetizados por diversos organismos e têm sido caracterizados como inseticidas naturais. A atividade entomotóxica da Jack Bean Urease (JBU) é diretamente correlacionada com a liberação de um peptídeo tóxico chamado Jaburetox (Jbtx), derivado da clivagem realizada por catepsinas no sistema digestório dos insetos. Jbtx apresenta efeitos fungitóxicos, entomotóxicos, neurotóxicos antimicrobiano e seu modo de ação ainda aguarda elucidação. O objetivo desse trabalho foi investigar o mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo peptídeo tóxico Jaburetox, sobre o sistema nervoso central e periférico de *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana*, usando diferentes técnicas eletrofisiológicas. Foram utilizados machos adultos das espécies *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana*, criados em insetário em condições laboratoriais. Foram realizados registros *ex situ* dos potenciais de ação compostos de perna de *Nauphoeta cinerea*, além de registros da atividade espontânea de neurônios DUM pertencentes ao gânglio abdominal terminal e dos potenciais de ação através do modo *voltage/current clamp* a partir da técnica de *Double Oil Gap* em cordão nervoso ventral de *Periplaneta americana*. Os dados foram expressos como média da porcentagem  $\pm$  S.E.M. Os grupos experimentais foram analisados por ANOVA one-way / two-way ou regressão, seguido pelo teste de Dunnet como post hoc. O efeito de Jbtx (16 e 32  $\mu\text{g}$  / g animal) sobre os SNCAPs de perna de *N. cinerea* foi caracterizado por diminuição significativa tempo e dose dependente no número de eventos ( $n = 10$ ). O efeito do Jbtx (20 $\mu\text{g}$ /300 $\mu\text{l}$ ) sobre a atividade espontânea de células DUM foi de diminuição progressiva na frequência dos potenciais, após 25 minutos de registro ( $n = 3$ ). Após 40 minutos, houve a completa inativação da atividade espontânea de células DUM. O

tratamento com fentolamina (5 $\mu$ g / 300 $\mu$ l) induziu um retardo no efeito do Jbtx (20 $\mu$ g / 300 $\mu$ l) sobre os potenciais espontâneos das células DUM (8  $\pm$  0.34% spikes / 200ms até 40 min, inibição completa após 55 min (n = 3 , p <0,05). A partir da técnica Double Oil Gap, os registros de voltage e current clamp demonstram que o Jbtx (20 $\mu$ g / 300 $\mu$ l) promove a diminuição dos picos de Na<sup>+</sup> , a partir dos 25 minutos de registro. A hiperpolarização artificial dos potenciais de membrana em repouso provocou uma recuperação para 76  $\pm$  3% e 73  $\pm$  3% da amplitude média dos registros de current e voltage clamp, respectivamente. A diminuição do número de eventos em SNCAP é coerente com o bloqueio neuromuscular demonstrado anteriormente pelo nosso grupo e onde os registros de voltage e current clamp revelam que o Jbtx afetam as correntes de sódio. O retardamento do silenciamento de células DUM, induzido pela aplicação de fentolamina, sugere que o Jbtx está, de uma forma ambígua, modulando a liberação de octopamina. Os resultados sugerem que a interação da Jbtx com Navs promove alterações fisiológicas responsáveis pela modulação comportamental, observada em trabalhos anteriores.

## ABSTRACT

There is the urgent need to increase world food production, making the use of pesticides a recurring necessity, even if these compounds exhibit several undesirable effects on the environment. Therefore, the development of new natural compounds with entomotoxic potential became not only an alternative. Several natural molecules with entomotoxic potential have as main target ionic channels, standing out the voltage gated sodium channel (Nav). Nav is a transmembrane protein complex, with a pore filled with water, where sodium ions diffuse through electrochemical gradient. The pharmacological diversity of the Navs is remarkable and can be observed through the multiplicity of toxic substances with specificity to these channels. Thus, the investigation of the interaction between natural molecules and this channel is pertinent. Ureases are metalloenzymes which hydrolyze urea into ammonia. These compounds are synthesized by several organisms and have been characterized as natural insecticides. The entomotoxic activity of Jack Bean Urease (JBU) is directly correlated with the release of a toxic peptide named Jaburetox (Jbtx), derived from the cleavage by cathepsins inside insect digestive system. Jbtx exhibits fungitoxic, entomotoxic, antimicrobial neurotoxic effects and its mode of action still awaits elucidation. The objective of this work was to investigate the mechanism of neurotoxicity induced by Jaburetox, on the central and peripheral nervous system of *Nauphoeta cinerea* and *Periplaneta americana* cockroaches, using different electrophysiological techniques. Adult males *Nauphoeta cinerea* and *Periplaneta americana* cockroaches were reared under laboratory conditions. Ex situ recordings of the action potentials of *Nauphoeta cinerea* leg were performed. Also, we recorded the spontaneous activity of DUM neurons on terminal abdominal ganglion and the action potentials through the voltage / current clamp mode using the Double Oil Gap technique in the ventral nervous chord of *Periplaneta americana*. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. The experimental groups were analyzed by one-way ANOVA / two-way regression, followed by the Dunnett test as post hoc. The effect of Jbtx (16 and 32  $\mu$ g / g animal) on *N. cinerea* leg SNCAPs was characterized by significant time and dose-dependent decrease in the number of events ( $n = 10$ ). The effect of Jbtx (20 $\mu$ g / 300 $\mu$ l) on the spontaneous activity of DUM cells was a progressive decrease in the frequency of potentials after 25 minutes of recording ( $n = 3$ ). After 40 minutes, there was complete inactivation of spontaneous DUM cell activity. Treatment with phentolamine (5 $\mu$ g / 300 $\mu$ l) induced a delay in the effect of Jbtx (20 $\mu$ g / 300 $\mu$ l) on the spontaneous potentials of DUM cells ( $8 \pm 0.34\%$  spikes / 200ms up to 40 min, complete inhibition after 55 min ( $n = P < 0.05$ ) from the Double Oil Gap technique, the

voltage and current clamp records demonstrate that Jbtx (20 $\mu$ g / 300 $\mu$ l) induced the decrease of Na<sup>+</sup> peaks from the 25 minutes of recording. of resting membrane potentials caused a recovery to 76  $\pm$  3% and 73  $\pm$  3% of the mean amplitude of the current and voltage clamp registers, respectively. The decrease in the number of events in SNCAP is consistent with the neuromuscular block previously demonstrated by our group, and where voltage and current clamp records reveal that Jbtx affect sodium currents. The delay on DUM cell silencing, induced by the application of phentolamine, suggests that Jbtx is ambiguously modulates the release of octopamine. The results suggest that the interaction of Jbtx with Navs promotes physiological changes responsible for behavioral modulation observed in previous studies.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GABA - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GluCl- Canal de Glutamento cloreto

dependente Jbtx- Jaburetox

JBU- *Jack Bean Urease*

nAChRs- Receptores nicotínicos de

cetilcolina  $\text{Nav}^-$  Canal de sódio voltagem  
dependente

## Sumário

AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Pesticidas sintéticos.....	15
1.2. Inseticidas Naturais .....	16
1.3. Canais Iônicos como Alvo de Inseticidas.....	16
1.4. O canal de sódio voltagem dependente ( $Na_v$ ).....	19
1.5. As ureases.....	21
1.6. <i>Canavalia ensiformis</i> .....	22
1.7. O Efeito Entomotóxico do Jaburetox (Jbtx) .....	24
1.8. Baratas como Modelos Experimentais na Neurobiologia.....	26
2. OBJETIVOS .....	28
2.1 Objetivo Geral .....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. MANUSCRITO.....	29
4. CONCLUSÃO.....	47
5. REFERÊNCIAS.....	48

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.Pesticidas sintéticos

Atualmente, existe uma forte demanda para o aumento da produção mundial de alimentos, já que um bilhão de pessoas se somam à população mundial a cada doze anos. A parcela territorial agricultável e, que compreende somente 10% da área total do Planeta Terra, permanece inalterada (SILVA et al., 2018)(EHRLICH et al., 2015; UN Report, 2018). Dessa forma, o uso de pesticidas torna-se uma necessidade recorrente, ainda que esses compostos exerçam uma grande quantidade de efeitos antrópicos sobre o meio ambiente em geral.

Os inseticidas químicos, são compostos químicos usados no controle de insetos-praga (BLOOMQUIST, 1996; DEVINE; FURLONG, 2007). Esses compostos exibem alta toxicidade contra seus alvos, atraindo-os ou repelindo-os, porém com certa inespecificidade, atuando também contra insetos benéficos. Por outro lado, os inseticidas naturais, foram utilizados mundialmente até a década de 40, quando os produtos sintéticos passaram a ganhar espaço a partir da II Guerra Mundial, devido ao seu baixo custo, meia-vida longa e amplo espectro de ação (DE FREITAS et al., 2016). Se por um lado, o uso de inseticidas químicos, contribuiu para o aumento na produção de alimentos em larga escala, seu uso tem produzido graves problemas ambientais, não só para seres humanos como também sendo nocivos para outros animais, principalmente insetos benéficos(BLENAU; BAUMANN, 2001).

Dessa forma, o risco do uso massivo de inseticidas sintéticos revela-se na degradação do solo, poluição do ar e de lençóis freáticos, bem como no desenvolvimento precoce de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson (DEVINE; FURLONG, 2007). O consumo de alimentos contendo resíduos de agrotóxicos, a médio e longo prazo, também pode levar a problemas hepáticos e oftalmológicos, distúrbios do sistema reprodutivo, câncer e efeitos mutagênicos e teratogênicos (CRISTINA; MONTEIRO, 2004). Assim, esses agentes químicos são responsáveis por mais de 200 mil mortes/ano por intoxicação não intencional, segundo relatório anual da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Por essas razões, existe uma necessidade premente pelo desenvolvimento de novos compostos naturais com potencial entomotóxico, menos tóxicos para humanos e outros animais não alvo e mais específicos para insetos-praga.

## 1.2. Inseticidas Naturais

Um grande grupo de plantas terrestres é conhecido pela sua habilidade de produzir metabólitos com potencial entomotóxico, sintetizados evolutivamente como ferramentas no combate à herbivoria (ISMAN, 2007). Esta é, inclusive, a principal razão de muitas comunidades primitivas ainda usarem extratos vegetais como agentes pesticidas naturais, fazendo com que os cientistas modernos busquem nesses compostos novas moléculas com potencial biotecnológico (BALANDRIN et al., 1985).

Foi dessa forma que os piretroides, inseticidas sintéticos produzidos à partir das piretrinas, encontradas naturalmente em flores do gênero *Pyrethrum*, foram desenvolvidos. (BLOOMQUIST, 1996; RAYMOND-DELPECH et al., 2005). Além das piretrinas, a nicotina e a rotenona, também são exemplos de metabólitos secundários de plantas usadas como pesticidas, sendo ainda alguns esteróides e alcaloides extraídos desses vegetais, usados na fabricação de medicamentos pela indústria farmacêutica (BALANDRIN et al., 1985).

Assim como as piretrinas, muitos inseticidas naturais têm como alvo principal canais iônicos. Os principais alvos primários são os canais de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) cloreto-dependente, o canal de Glutamato cloreto dependente, o receptor nicotínico de acetilcolina, (nAChR), o receptor de rianodina ativado por  $Ca^{+}$  de insetos e o canal de  $Na^{+}$  voltagem dependente (BLOOMQUIST, 1996; NARAHASHI; AVENUE, 1996; RAYMOND-DELPECH et al., 2005).

## 1.3. Canais Iônicos como Alvo de Inseticidas

Com exceção dos inseticidas organofosforados e carbamatos, que inibem as colinesterases, a maioria das neurotoxinas e compostos neuroativos de ação entomotóxica atuam diretamente nos receptores neurais e / ou nos canais iônicos. A atividade desses compostos causa sintomas de intoxicação, provocando modificações fisiológicas e comportamentais, podendo levar o animal a letalidade (NARAHASHI; AVENUE, 1996). Como supracitado, há cinco alvos moleculares envolvendo receptores ionotróficos na ação desse inseticidas (Figura 1) .

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico ou GABA, é o principal neurotransmissor inibitório em vertebrados e invertebrados atuando à partir da abertura de um canal de cloreto, sendo este uma proteína transmembrana pentamérica, que se localiza dentro do receptor de GABA (Figura 1.A.) (FFRENCH-CONSTANT et al., 2016). Esses últimos canais, são divididos em dois tipos: canais  $GABA_A$  e  $GABA_B$ . O receptor  $GABA_A$  é composto, na maioria das vezes, por



pentâmeros de duas subunidades  $\alpha$ , duas subunidades  $\beta$  e uma subunidade  $\gamma$ , conferindo farmacologia própria. Estudos farmacológicos realizados em *Drosophila melanogaster* sugerem que inseticidas, como os ciclodienos e a picrotoxina, uma toxina vegetal extremamente ativa extraída do fruto de *Anamirta cocculus*, atuam nos receptores GABA de insetos como antagonistas não-competitivos (BLOOMQUIST, 1996).

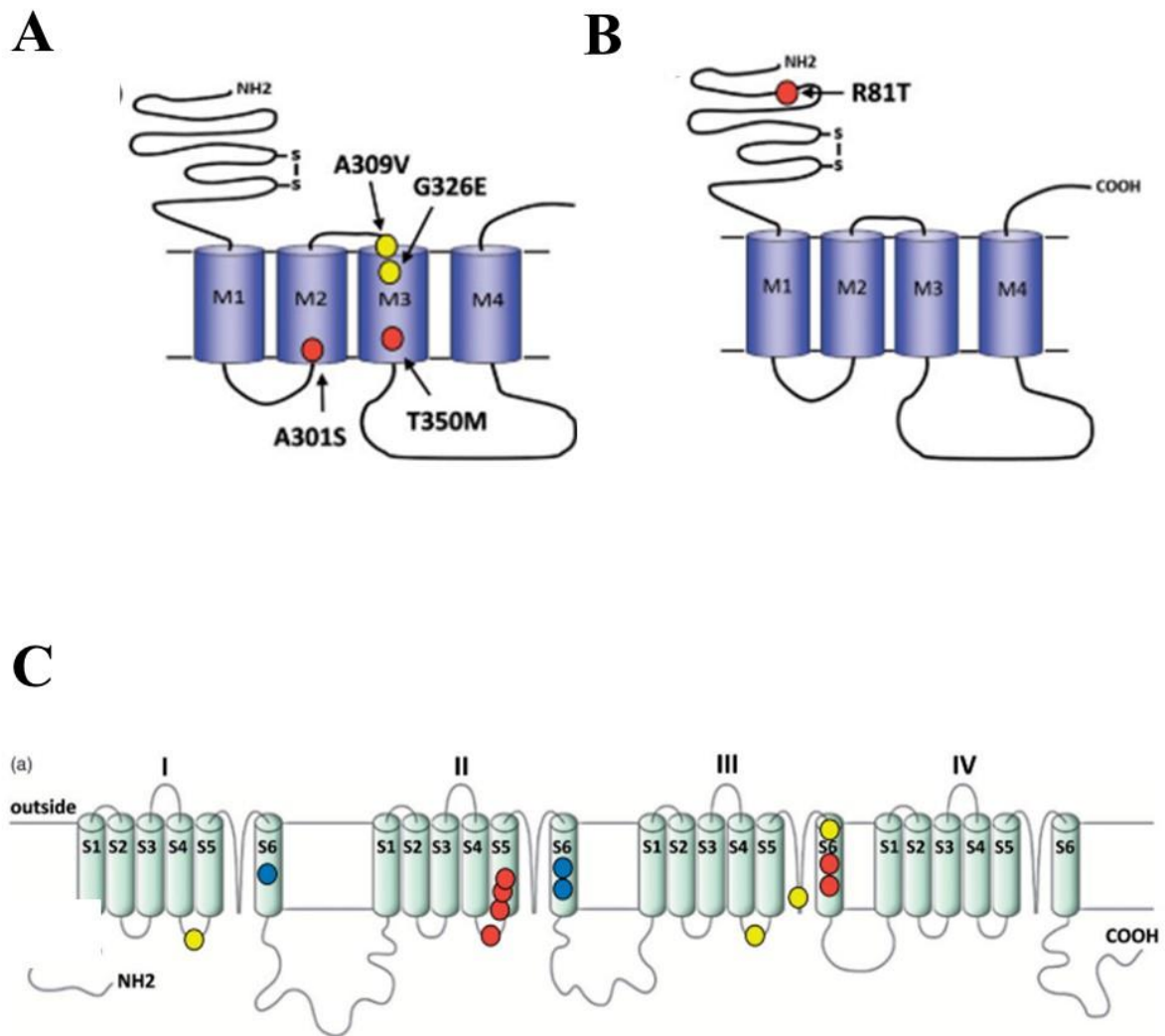
Os canais inotrópicos de Glutamato-Cl<sup>-</sup> dependentes (GluCl), também são importantes alvos moleculares para inseticidas, já que são encontrados exclusivamente em insetos (Figura 1A.). Essas proteínas medeiam sinapses inibitórias do sistema nervoso central e periférico, controlando respostas neurolocomotoras (FFRENCH-CONSTANT et al., 2016). A maioria dos insetos possui um único gene codificante para esse receptor. Esse gene confere característica homopentamérica desse canal que possui uma única subunidade (Figura 1A). Por possuir características tão peculiares, toxinas que interagem sobre esses canais constituem-se por exemplo, como nematicidas, acaricidas e insecticidas. Além disso, esses canais também constituem-se no alvo primário das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) (CATTERALL, 2000)

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) também são canais iônicos permeáveis a cátions que medeiam respostas sinápticas rápidas no sistema nervoso central de ambos vertebrados e invertebrados, e na junção neuromuscular de vertebrados (Figura 1B.)(RAYMOND-DELPECH et al., 2005) Os nAChRs são oligômeros compostos de cinco subunidades, arranjadas em combinações variadas de diferentes subtipos. Estes canais são os principais alvos de duas grandes classes de inseticidas, os neonicotinóides, que dominam o mercado mundial de pesticidas, com mais de 25% do total de vendas. As espinosinas naturais, como as derivadas de *Saccharopolyspora spinosa*, também atuam sobre os nAChRs(BARNSTEDT et al., 2016).

Dentre os alvos moleculares para a ação de inseticidas em geral, os canais de sódio voltagem-dependentes ( $Na_v$ ), também se encontram como os principais alvos moleculares (Figura 1.C.)(CRILL, 1996; GORDON et al., 1996; STEVENS; PEIGNEUR; TYTGAT, 2011) Sendo responsáveis pelo controle da excitabilidade em sistemas biológicos, esse canal é alvo de uma vasta quantidade de neurotoxinas de origem animal ou vegetal. Pelo menos nove classes distintas de neurotoxinas já foram descritas por atuam diretamente sobre os canais de sódio voltagem-dependentes, interagindo de diferentes maneiras com esses canais (ZLOTKIN, 1999). Além disso, novos compostos inseticidas naturais, além de serem de interesse biotecnológico,

também poderão ser validados como novos instrumentos no estudo dos canais iônicos de sódio voltagem-dependentes (DONG, 2007; GAUPP; NEUROPSYCHIATRY; ANGELES, [s.d.]

A estrutura geral dos diferentes tipos de canais iônicos alvos de inseticidas estão representadas logo abaixo.



**Figura 1. Estrutura geral dos principais canais iônicos encontrados em insetos (A)** Os canais de GABA e Glutamato Cl<sup>-</sup> dependentes compartilham estruturas similares com quatro domínios transmembrana (M1-M4). **(B)** Os nAChRs também compartilham estrutura geral semelhante aos canais de GABA e Glutamato Cl<sup>-</sup> dependentes e também contém quatro domínios de transmembrana (M1-M4) e um grande domínio extracelular N-terminal. **(C)** Na<sub>v</sub>

possuem quatro domínios (I-IV), cada um compreendendo seis segmentos (S1-S6). S1 e S6 conectam-se para formar o poro. Adaptado de FFRENCH-CONSTANT et al., 2016.

#### 1.4. O canal de sódio voltagem dependente ( $\text{Na}_v$ )

O canal de sódio voltagem dependente ( $\text{Na}_v$ ) é um complexo proteico transmembrana, que possui um poro preenchido com água, onde íons de sódio podem difundir-se através do gradiente eletroquímico (CATTERALL, 2000). Nessas proteínas, a função de condutância elétrica é operada através de um processo de *gating*, induzido por pequenas mudanças na conformação do canal, expressas na abertura e fechamento dos poros iônicos (CATTERALL, 2000; CESTÈLE; CATTERALL, 2000).

Os canais de sódio, cálcio e potássio dependentes de voltagem revelam homologia nas suas estruturas primárias, incluindo seis segmentos transmembrana putativos. Três fatores chave caracterizam o canal de sódio: ativação dependente de voltagem, rápida inativação e condutância seletiva de íons (CRILL, 1996; PLATKIEWICZ; BRETTE, 2017). Durante a década de 1970, foram desenvolvidos métodos bioquímicos para determinar o fluxo iônico em canais de sódio ativos, além de identificar a ligação de neurotoxinas de alta afinidade a esse canal (GORDON, 2017).

A diversidade farmacológica dos  $\text{Na}_v$ s é observada através da multiplicidade de substâncias tóxicas, naturais ou sintéticas, que são específicas para esses canais e interferindo em sua função (FFRENCH-CONSTANT et al., 2016). Nesse sentido, a descoberta de neurotoxinas que ligam-se com alta afinidade e especificidade aos  $\text{Na}_v$ s, facilitou em muito os estudos bioquímicos que detinham-se a entender aspectos estruturais e funcionais dessas proteínas de membrana. O desenvolvimento de radioligantes específicos para cada subunidade do canal permitiu e facilitou a detecção de mudanças conformacionais, quando da interação com um ligante (Tabela 1) (GORDON, 2017). Assim, os grupos distintos de moléculas com potencial entomotóxico afins ao  $\text{Na}_v$  são definidos por sua atividade fisiológica e pelo tipo de ligação (tabela 1)(ZLOTKIN, 1999). Essas toxinas podem então ser subdivididas em duas categorias: (1) moléculas que inibem o transporte de íons e (2) substâncias que modificam o *gating* dos canais de sódio (GORDON, 2017). Os inibidores de transporte e os modificadores de acesso compartilham duas características importantes: (1) revelam maior afinidade a um dado estado do canal (ativado, inativado ou fechado) e (2) as toxinas ligam-se a sítios específicos e interagem umas com as outras (interações alostéricas ou acoplamento). Já as substâncias que modificam o *gating*, majoritariamente, aumentam ou diminuem a probabilidade

de que um canal abra ou permaneça aberto, tanto pela prevenção da inativação, quanto pelo aumento do tempo de ativação em potencial de repouso, ou por ambos mecanismos. (GAL; LIBERSAT, 2010; GORDON, 2017; GORDON et al., 1996).

**Tabela 1. Toxinas naturais moduladoras de canais de Na<sup>+</sup> voltagem dependentes e seus efeitos fisiológicos.**

<b>Toxinas</b>	<b>Efeitos Fisiológicos</b>
Anestésicos locais	
Anticonvulsivantes	
Tetrodotoxina (TTX)	• Inibição do Transporte de Íons
Saxitoxina (STX)	
μ-Conotoxina	
Batratoxina (BTX)	
Veratidina	
Aconitina	• Ativação persistente
Graianotoxina	
N-Alquilamidas	
α-toxinas de escorpiões	• Inibem a Ativação
Toxina de anêmona marinha (ATXII)	• Produzem Ativação persistente
β-toxinas de escorpiões	• Alteram a voltagem para a ativação
Brevetoxinas	• Alteram a voltagem de ativação
Ciguatoxinas	• Inibem a Inativação
DDT e análogos	• Inibem a Inativação
Piretroides	• Alteram a sensibilidade e a voltagem de ativação
Toxina de coral <i>Goniopora</i>	• Inibem a Inativação
Toxina de <i>Conus stiatius</i>	

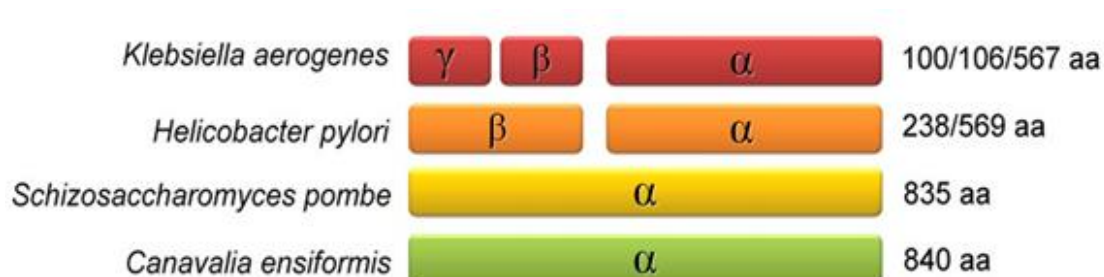
Adaptado de: (ZLOTKIN, 1999)

### 1.5. As ureases

As ureases são metaloenzimas, dependentes de níquel, que hidrolisam a ureia em duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (DIXON; GAZZOLA; WATTERS, 1926). Esses compostos são encontrados em diversos organismos, como plantas, fungos e bactérias e têm sido caracterizados por suas funções bactericidas, antifúngicas e entomotóxicas (Figura 1). Ureases derivadas de bactérias usualmente têm de duas a três subunidades ureolíticas (domínios  $\alpha$  e  $\beta$  ou  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), enquanto ureases derivadas de plantas e fungos, possuem apenas uma unidade ureolítica (domínio  $\alpha$ ). As ureases bacterianas, como a de *Klebsiella 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 *Schizosaccharomyces pombe* e plantas, *Canavalia ensiformis*, por exemplo, as ureases são formadas por um único tipo de cadeia polipeptídica (BRAUN, 2010).

Todavia, animais não têm capacidade de sintetizar ureases e, quando ingeridas, tornam-se alvo de proteases que rapidamente neutralizam o possível efeito tóxico (MOBLEY; HAUSINGER, 1989). O grande interesse em sintetizá-las partiu da descoberta de que a soja (*Glycine 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, a *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, à partir de folhas de feijão de porco (*Jack Bean*) (BLAKELEY; ZERNER, 1984). Dentre diversas propriedades das ureases de *Ccanavalia ensiformis*, a atividade entomotóxica tem sido comprovada (CARLINI; POLACCO, 2008).



**Figura 2.** Comparação esquemática das subunidades estruturais das ureases de organismos selecionados. O número de aminoácidos é apresentado à direita. Fonte: Braun (2010,p: 4).

### ***1.6.Canavalia ensiformis***

A *Canavalia ensiformis* é uma planta perene, com distribuição pan tropical, com porte de arbusto, que tem a capacidade se desenvolve em solos pobres (Figura 2). É bastante utilizada na agricultura como adubo verde uma vez que promove a fixação de nitrogênio no solo. Devido ao seu elevado valor nutricional, suas sementes são empregadas na alimentação do gado e suas folhas na alimentação humana (CHERR; SCHOLBERG; MCSORLEY, 2006).

A *C. ensiformis* é resistente às variações das condições ambientais, contra insetos e micro-organismos, sendo considerada uma planta daninha. Seus principais componentes biologicamente ativos são proteínas, peptídeos, enzimas ou derivados de aminoácidos. Algumas biomoléculas encontradas na *Canavalia ensiformis* são a concanavalina A, ureases, canatoxina, jaburetox, serino-proteases e L-canavanina / L-canalina (ERASMO; AZEVEDO; GARCIA, 2004).

Foi identificada na *C. ensiformis* uma família de genes codificantes de urease, induzidos por ácido abscísico, principal fito-hormônio de processos fisiológicos correlacionados ao estresse (PIRES-ALVES et al., 2003). Os genes codificam pelo menos três isoformas da proteína: a) JBURE-I, acesso M65260, a urease clássica majoritária, cristalizada por SUMNER em 1926; b) o gene JBURE18 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 e Guimarães (1981).



**3. Feijão de Porco (*Canavalia ensiformis*).** O feijão de porco é uma leguminosa amplamente utilizada na agricultura como adubo verde por aumentar as taxas de fixação de nitrogênio no solo, além de promover efeito entomotóxico e repelente (RAMOS et al., 2001). Fonte: Ana Paula Zanatta.

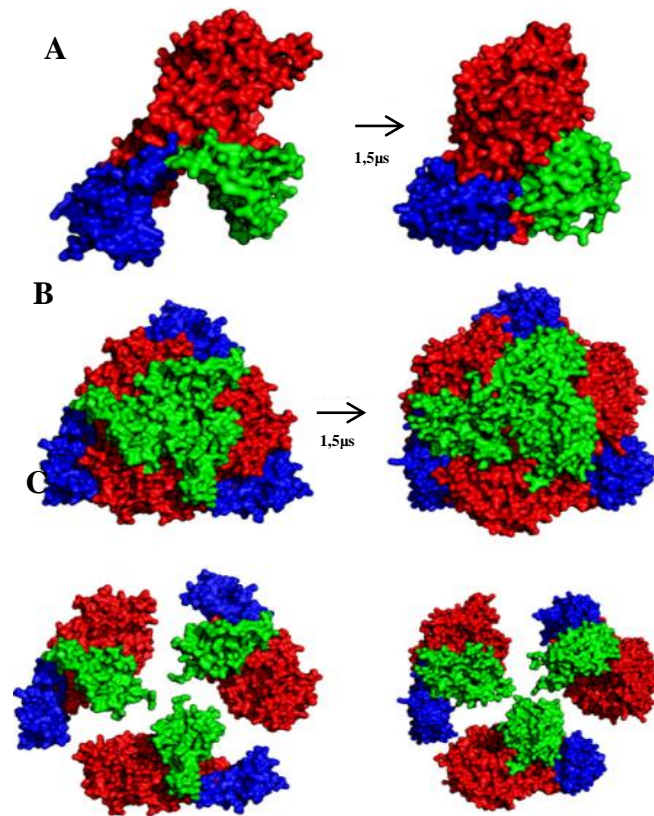
### *Jack Bean Urease (JBU)*

A urease de *C. ensiformis* (Jack Bean Urease) contribuiu na elucidação da natureza proteica das enzimas (CARLINI; POLACCO, 2008). A cadeia polipeptídica da JBU é composta por 840 aminoácidos, com massa molecular de 90,77 kDa. Sua menor isoforma, 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, a qual apresenta efeito entomotóxico (STANISÇUASKI; CARLINI, 2012).

JBURE-I ou somente JBU, é a isoforma de urease mais abundante em *C. ensiformis* e inibe a ação diurética em *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas na América do Sul, que tem sido 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 (CARLINI; POLACCO, 2008).

Quando administradas por via oral, a JBU apresenta toxicidade para insetos que possuem enzimas proteolíticas do tipo catepsinas no seu sistema digestório. Essa toxicidade é dependente da liberação de um peptídeo interno de 10kDa chamado Jaburetox (Jbtx) (CARLINI; FA, 2002; STANISÇUASKI; CARLINI, 2012).



**Figura 4. 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)**

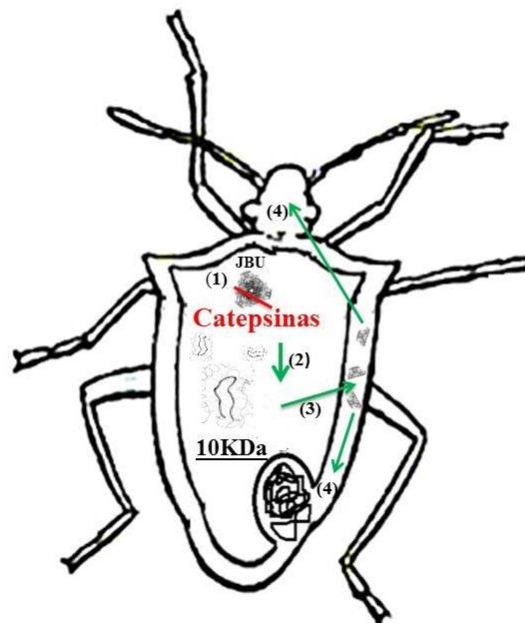
### 1.7. O Efeito Entomotóxico do Jaburetox (Jbtx)

Ensaio de letalidade em percevejos *Rhodnius prolixus* (STÅL, 1859), demonstram que após ingestão de alimento contendo ureases, a letalidade ocorre entre 36 a 48 horas (MULINARI et al., 2007). Conforme descrito por Carlini e Polacco (2008), após a ingestão da JBU, as protoxinas são clivadas por enzimas digestivas do tipo catepsinas. Então, um peptídeo ativo letal de aproximadamente 10 kDa chamado de Jaburetox (Jbtx) é liberado e posteriormente removido do intestino médio, passando a circular na hemolinfa e sendo distribuído para outros tecidos como os túbulos de Malpighi e o sistema nervoso central. Esse mecanismo leva o inseto a letalidade. Entretanto, tanto o mecanismo de ação do peptídeo tóxico, quanto a sua ação em outras espécies de inseto- praga ainda carecem de elucidação (Figura 5).



Recentemente, foi demonstrado que o Jbtx não induz letalidade em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* (PERIN et al, 2018. Em submissão). Esse fato provavelmente está associado ao tipo de enzimas digestivas as quais essa espécie 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. 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. Assim, insetos como baratas *Nauphoeta cinerea*, que tem a digestão no intestino médio feita por serinas e cisteínas não apresentam letalidade (CARRAZONI et al., 2016).

Por outro lado, recentemente nosso grupo demonstrou que, embora o peptídeo tóxico não seja letal à *Nauphoeta cinerea*, a neurotoxicidade induzida pela aplicação de Jbtx leva alterações fisiológicas importantes, modulando o comportamento desse inseto e diminuindo drasticamente a sua atividade neurolocomotora (SILVA et al., 2018). O Jbtx mostrou modular o comportamento de *grooming* e a atividade locomotora, além de promover o boqueio neuromuscular progressivo e modulação cardiotônica negativa em *Nauphoeta cinerea*.



**Figura 5. Mecanismo entomotóxico da JBU em *Rhodnius 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

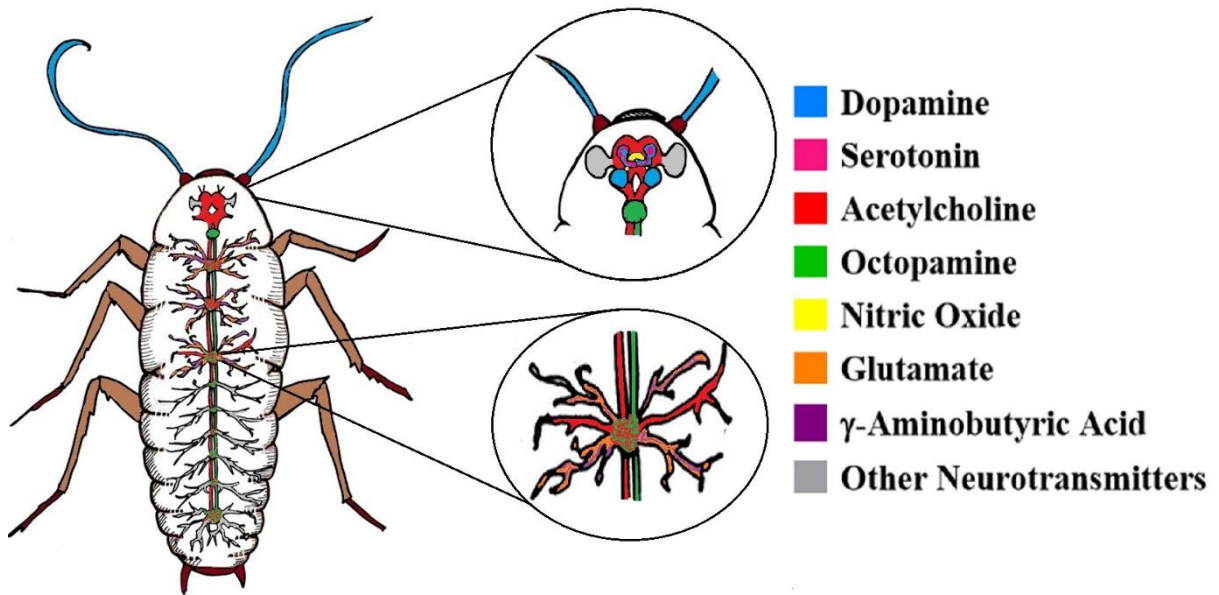
### **1.8. Baratas como Modelos Experimentais na Neurobiologia**

As baratas são insetos-praga primitivos com sistemas fisiológicos pouco especializados. Se por um lado, a falta de complexidade dos sistemas pode dificultar a correlação dos processos fisiológicos do inseto com sistemas biológicos mais especializados, do ponto de vista da neurotoxicologia, esses animais mostram-se instrumentos úteis na investigação do mecanismo de ação de atividade entomotóxica (STANKIEWICZ; DBROWSKI; DE LIMA, 2012). São animais alongados bilateralmente simétricos (JUST et al., 1996; OSBORNE, 1996). A hemocele é preenchida por hemolinfa e revestida pela endoderme e ectoderme. A hemolinfa é o principal fluido corporal de distribuição de nutrientes e remoção de metabólitos corporais do animal (TITLOW et al., 2013).

O sistema nervoso desses insetos integra um conjunto diversificado de aparelhos sensoriais externos e informações fisiológicas (Figura 6). 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 efector, como por exemplo, o músculo (ORCHARD; LANGE, 1986) 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 principalmente em insetos com função similar a adrenalina e noradrenalina dos vertebrados (OSBORNE, 1996).

Na junção neuromuscular desses insetos há a presença peculiar de neurônios DUM (*Dorsal Unpaired Median*). Os neurônios DUM produzem e secretam uma ampla gama de neurotransmissores, em especial a octopamina. (LAPIED et al., 1999) A atividade dessas células é intimamente dependente da condução elétrica axonal, modulada, principalmente, pela atividade dos canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  voltagem dependentes presentes na membrana. A octopamina é uma amina biogênica responsável pela modulação de quase todos os processos fisiológicos

em invertebrados, dentre eles, os relacionados aos órgãos sensoriais, aos sistemas periféricos e aos processos no sistema nervoso central (ORCHARD; LANGE, 1986; PAPAETHIMIOU; THEOPHILIDIS, 2011).



**Figura 6. Organização do sistema nervoso em baratas.** O cérebro, ou gânglio supraesofágico, localiza-se superior ao cordão nervoso ventral e é composto por diversas subunidades, como os *mushroom bodies*, estruturas responsáveis 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. Adaptado de: (KHALIFA et al., 1997; LAPIED et al., 1999; OSBORNE, 1996; STANKIEWICZ; DBROWSKI; DE LIMA, 2012)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Através de diferentes técnicas eletrofisiológicas, investigar o mecanismo de neurotoxicidade induzido pelo peptídeo tóxico Jaburetox, sobre o sistema nervoso central e periférico de *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana*.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do Jbtx sobre a sensibilidade das sensilas através em preparação de perna isolada de *Nauphoeta cinerea*.
- Elucidar a modulação do Jbtx sobre a atividade espontânea de neurônios dorsais não-pareados de gânglio de *Periplaneta americana*;
- Entender o efeito do Jbtx sobre os potenciais de ação, através da avaliação da amplitude das correntes evocadas de sódio em neurônio isolado de axônio gigante de *Periplaneta americana* em preparação *double oil gap*;
- Avaliar a modulação do Jbtx sobre a repolarização de células excitáveis através do registro da amplitude das correntes evocadas de potássio em neurônio isolado de gânglio de *Periplaneta americana* em preparação *double oil gap*;

### 3. MANUSCRITO

A sessão “Materiais e métodos” bem como “Resultados” e “Discussão” dessa dissertação estão dispostos na forma de manuscrito, o qual será submetido para o Periódico Chemicobiological Interactions (ISSN: 0009-2797) intitulado “Inactivation of cockroach voltage-gated sodium channels by the ureased-derived peptide Jaburetox: novel clues to uncover its complex insecticide activity”.

## **Inactivation of cockroach voltage-gated sodium channels by by the ureased-derived peptide Jaburetox: novel clues to uncover its complex insecticide activity**

Ana Paula Zanatta <sup>a,b</sup>; Milena Jankowska <sup>b</sup>; Yuri Correia Barreto<sup>a</sup> ; Maria Eduarda Rosa<sup>a</sup>; Alessandra Magnuson <sup>a,c</sup> Anne Helene Souza Martinelli<sup>c</sup> ; Celia R. Carlini<sup>d</sup>; Maria Stankiewicz <sup>b</sup>; Chariston A. Dal Belo<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pampa-UNIPAMPA, São Gabriel, RS, Brazil;*

<sup>b</sup> *Department of Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Safety, Nicolaus Copernicus University, Toruń, Poland* <sup>c</sup> *Graduate Program in Cell and Molecular Biology, Biotechnology Center, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil* <sup>d</sup> *Laboratory of Neuroscience, Brain Institute of Rio Grande do Sul, InsCer, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.*

\*Corresponding author:

Dr. Chariston André Dal Belo

CIPBiotec, Campus São Gabriel, Federal University of Pampa

Av. Antônio Trilha, 1847

97300000 São Gabriel, Brazil

Tel./fax: + 55 55 3232-6075.

e-mail: [charistonbelo@unipampa.edu.br](mailto:charistonbelo@unipampa.edu.br)

### **ABSTRACT**

The role of ionic channels in excitable membranes is crucial to maintain cellular integrity and function. Due to their crucial enrolment in membrane excitability, The voltage gated Na<sup>+</sup> channel (Navs) is the molecular target of a huge variety of natural neurotoxins. The spontaneous firing of action promoted by Navs are responsible, for example, by the synaptic communication in the dorsal unpaired median (DUM) neurons. The proprieties of plant ureases are intriguing, as these molecules indeed share entomotoxic activity. The entomotoxic effect of *Canavalia ensiformis* urease is independent of its ureolytic activity and requires proteolytic cleavage by insect digestive enzymes into ~10 kDa peptide called Jaburetox (Jbtx). The mechanism of toxicity still awaits clarification. Cockroaches are frequently used in biomedical research due to a relative simplicity and suitability for certain experimental procedures. In addition, the cockroach nervous system share many similarities with other insect species. In this work we

investigated, through a range of different electrophysiological protocols, the mechanism associated to the neurotoxic activity of the insecticide peptide Jbtx on the central and peripheral nervous system of two different species of cockroaches *Nauphoeta cinerea* and *Periplaneta americana*. We used male animals from our stock colonies. All animals used on biological assays were chosen randomly and had no previous contact with the environment until tests. SNCAP experiments were performed on adult male *Nauphoeta cinerea* cockroaches in ex situ preparations. Recordings of spontaneous activity of DUM neurons were performed on DUM neuron cell bodies isolated from the midline of the TAG of the nerve cord of adult male cockroach *Periplaneta americana*. Current and voltage clamp experiments were performed on giant axons dissected from abdominal nerve cord of the cockroach *Periplaneta americana*, using the double oil gap single fiber technique described by Pelhate and Zlotkin (1982). Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. The experimental groups were analysed by one way/two way ANOVA or regression followed by Dunnet test as post hoc. The effect of Jbtx (16 and 32  $\mu\text{g}$  / g animal) on *N. cinerea* leg SNCAPs was characterized by significant time and dose-dependent decrease in the number of events (n= 10). The action of Jbtx (20 $\mu\text{g}$  / 300 $\mu\text{l}$ ) on the spontaneous activity of DUM cells was a progressive decrease in the frequency of potentials after 25 minutes of recordings (n = 3). After 40 minutes, there was complete inactivation of spontaneous DUM cell activity. Treatment with phentolamine (5 $\mu\text{g}$  / 300 $\mu\text{l}$ ) induced a delay in the effect of Jbtx (20 $\mu\text{g}$  / 300 $\mu\text{l}$ ) on the spontaneous potentials of DUM cells. On Double Oil Gap technique, the voltage and current clamp recordings demonstrate that Jbtx (20 $\mu\text{g}$  / 300 $\mu\text{l}$ ) promotes the decrease of Na<sup>+</sup> peaks. After hyperpolarizing pulse there was recovery to  $76 \pm 3\%$  and  $73 \pm 3\%$  of the mean amplitude of the current and voltage clamp amplitude, respectively. The decrease in the number of events in SNCAP is consistent with the neuromuscular blockade previously demonstrated by our group. Voltage and current clamp experiments indicate the direct decrease effect of Jbtx on Na<sup>+</sup> currents. The retarded delay induced by Jbtx on DUM cells after application of phentolamine suggest that Jbtx is ambiguously modulating the release of octopamine. The results suggest that the interaction between Jbtx and Navs promotes physiological changes responsible for behavioral modulation observed in previous studies.

### Abbreviations

Jbtx, Jaburetox; JBU, Jack Bean Urease; NCPS, *Nauphoeta cinerea* physiological saline; Na<sub>v</sub>, voltage-gated sodium channel; OA, octopamine; DUM neurons, Dorsal Unpaired Median, SNCAPS, *spontaneous neural compound action potentials* DOG, Double Oil Gap;

**Key words:** Plant ureases, entomotoxic peptide, central neurotoxicity, neuromuscular activity, voltage-gated sodium channels.

## 1. Introduction

The role of ionic channels in excitable membranes is crucial to maintain cellular integrity and function<sup>1-3</sup>. Due to their crucial enrolment in membrane excitability, ionic channels, such as voltage gated Na<sup>+</sup> channels, are the molecular target of a huge variety of natural neurotoxins, such as tetrodotoxin, scorpion toxins, and batrachotoxin, which are produced for defense or predation<sup>2</sup>. Indeed, many natural insecticides have ionic channels as the main target<sup>4,5</sup>, five of them being proprietary for small molecule insecticides: the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), the glutamate-gated chloride channel (GluCl), the insect nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), the insect ryanodine receptor (RyRs) and the voltage-gated sodium channel (Nav)<sup>6</sup>. For all the reasons explained above, investigating the changes induced by natural compounds on insect neurophysiology by its ion channels interactions may be a fruitful way to uncover their mode of action.

The spontaneous firing of action potentials from insect's central neurosecretory nerve cells are common events responsible, for example, by the synaptic communication in the dorsal unpaired median (DUM) neurons, including their octopaminergic representatives<sup>7</sup>. Hence, an interaction between natural or synthetic toxic chemical compounds with the neuronal membrane may cause a disturbance in the ionic environment of these cells leading to neurobehavioral alterations in the insects<sup>8</sup>.

The proprieties of plant ureases are intriguing, as these molecules indeed share entomotoxic activity, despite the unresolved mechanism of action<sup>9,10</sup>. The entomotoxic effect of *Canavalia ensiformis* urease is independent of its ureolytic activity and requires proteolytic processing by insect digestive enzymes<sup>11</sup>. However, in the case of the ~10 kDa peptide Jaburetox its circulation in the insect hemolymph is solely enough to affect tissues such as Malpighian tubules and the central nervous system, thereby killing the insect by mechanisms that still need clarification<sup>12,13</sup>.

Blattodea is a diverse order of insect plagues, in which cockroaches are the most famous representatives. These species are frequently used in biomedical research due to a relative simplicity and suitability for certain experimental procedures. In addition, the cockroach



nervous system share many similarities with other insect species<sup>7,8,14,15</sup>. Their amenability to experimental manipulation and biophysical parallelism with vertebrates also make their use very convenient for a number of neurophysiological approaches<sup>16</sup>.

In this work we investigated, through a range of different electrophysiological protocols, the mechanism associated to the neurotoxic activity of the insecticide peptide Jbtx on the central and peripheral nervous system of two different species of cockroaches *Nauphoeta cinerea* and *Periplaneta americana*. We have identified possible functional targets involved in the entomotoxic activity of Jbtx.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents and solutions

All chemicals and reagents used were of the highest purity and were obtained from Sigma-Aldrich, Merck, Roche, Life Technologies or BioRad. Test solutions were prepared daily by dilution in a physiological saline for insects immediately before use. This saline was carbonate-buffered solutions prepared with the following composition in mM, respectively: NCPS - NaCl, 214; KCl, 3.1; CaCl<sub>2</sub>, 9; sucrose, 50; HEPES buffer, 5 and pH 7.2<sup>22</sup>; LMPS - NaCl 150; CaCl<sub>2</sub> 10; KCl 4; MgCl<sub>2</sub> 2; NaHCO<sub>3</sub> 4; HEPES 5; and Sucrose 90<sup>23</sup>.

### 2.1. Experimental animals

#### 2.1.1 *Nauphoeta cinerea* and *Periplaneta americana* cockroaches

The animals were reared under laboratory conditions with controlled temperature (22–25 °C) on a 12 h:12 h L:D cycle. The cockroaches were provided with water and food *ad libitum*.

#### 2.1.2. Experimental design for biological assays

All animals used on biological assays were chosen randomly and had no previous contact with the environment until tests. The standard protocol for animal manipulation was followed strictly. No animals were touched without gloves. The insects were taken right before the of experiments, to avoid to spend time far from the insectary. Treatments were codified by numbers and randomly arrayed.

### 2.3. Expression of the recombinant peptide Jaburetox (Jbtx)

The recombinant peptide Jaburetox was expressed and purified as described by<sup>17–19</sup> with modifications. Briefly, *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL harboring the plasmid pET-23a:

Jaburetox was cultured in 20 ml LB (Luria Bertani) Broth, supplemented with 1% glucose, 100 µg/ml ampicillin and 40 µg/ml chloramphenicol. The culture was grown overnight at 37 °C and 200 rpm. The pre-inoculum was inoculated in 1 liter of autoinduction medium (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l glycerol, 3.3 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.8 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/l glucose and 2 g/l lactose, with 100 µg/ml ampicillin and 40 µg/ml chloramphenicol). The inoculated medium was cultured at 37 °C, 200 rpm, until absorbance reached 0.7 at 600 nm, then the temperature was lowered to 20 °C, and maintained under stirring at 200 rpm overnight. The culture was centrifuged at 8000 × g for 10 min. The cells were resuspended in 100 ml buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl and 5 mM imidazole), the cell suspension was sonicated (20 cycles of 1 min, 20 kHz frequency). The final cell lysate was centrifuged at 14,000 ×g for 40 min at 4°C and the supernatant was submitted to affinity chromatography according to <sup>17</sup>. As last step of purification, Jbtx was submitted to a size exclusion chromatography using Superdex 200 26/600 (GE Healthcare) in 50 mM sodium phosphate pH 7.5, 1 mM EDTA and 1 mM TCEP. The fractions were pooled and concentrated in 3 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filter (Merk Millipore) and stored at -20°C. Before its use for incubations or injections, the peptide (Mr ~11 kDa) was dialyzed in 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 using 3 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filter.

## 2.4 Biological assays

### 2.4.1. *Ex vivo extracellular recordings of spontaneous neural compound action potentials (SNCAP)*

*Ex vivo* extracellular recordings of spontaneous neural compound action potentials (SNCAP) experiments were performed on adult (3–4 months after adult molt) male *Nauphoeta cinerea* cockroaches. For the recordings of SNCAP, the animals (*Nauphoeta cinerea* cockroaches) were anesthetized by chilling and one of the legs of third pair was carefully removed and fixed on the SpikerBox (Backyard Brains, USA) cork plate, with a pair of electrodes. The leg was detached as close as possible to the body, to ensure that the thigh, femur, tibia and tarsus remained intact. One of the electrodes was connected to the ground connector of the amplifier and the other to its indifferent (–) connector. The third electrode was placed into the femur, as the active recording electrode (+). The signals were recorded at a sampling rate of 1.0 kHz and digitalized by the Neuron SpikerBox, which converts the sound of each spike in a digitalized deflection on the computer screen. The action potentials were visualized, recorded and retrieved for later analysis in the computer-

based software BYB Spike Recorder (Backyard Brains, USA), and the analysis was done by the software WinWCP (John Dempster, University of Strathclyde, Scotland). In this set of experiments, the animals were injected in the leg with Jbtx (16 and 32  $\mu\text{g/g}$  animal), 10 and 50 min before the procedure for the detachment of a third pair leg. Using the described conditions, the preparation could be used for at least 1 h without changes in the action potentials waveforms.

#### 2.4.2. Spontaneous Activity of DUM cells

Experiments were performed on DUM neuron cell bodies isolated from the midline of the TAG of the nerve cord of adult male cockroach *Periplaneta americana*. Isolation of adult DUM neuron cell bodies was performed using mechanical dissociation of the median parts of the TAG ( Terminal Abdominal Ganglion) from the nerve cord of the cockroach as described from Lapiéd et al, 1999. The activity of DUM cells was recorded using the cell-attached configuration of the patch-clamp technique. Patch pipettes were coated with sylgard (Dow Corning Corporation, Midland, USA) to reduce stray capacitance. The liquid junction potential between bath and internal pipette solution was always corrected before the formation of a giga ohm seal ( $\rightarrow$  30 G $\Omega$ ). Currents were recorded using an Axopatch 200A (Axons Instruments, Foster City, CA, USA) amplifier, filtered at 2 kHz ( $-3$  dB, 4-pole lowpass Bessel filter). These signals were stored on-line on the hard disk of an IBM pentium 100 computer connected to a 125 kHz labmaster DMA data acquisition system (TL-1-125 interface, Axon Instruments). The pClamp package (version 6.03, Axons Instruments) was used for data acquisition and analysis. The sampling frequency was six times the  $-3$  dB filter frequency (12.5 kHz). Baseline noise fitted with a Gaussian function had a SD ( $\sigma$ ) of 0.12 pA (at  $-50$  mV) for the Axon Instruments headstage at 2 kHz. Transitions from closed to open states were determined by a 50% threshold detection method (LAPIED et al, 1999). All points amplitude histograms were constructed from the data points of selected channel openings that outlasted the rise time ( $T_r$ ) of the recording system. Curve fittings, both exponential and Gaussian, were performed using pClamp analysis programs, and current amplitudes obtained at minimally four potentials were used for estimation of single channel conductance by linear regression.

#### 2.4.3. Current and voltage clamp protocols in cockroach isolated axons

Current and voltage clamp experiments were performed on giant axons dissected from abdominal nerve cord of the cockroach *Periplaneta americana*, using the double oil gap single fiber technique<sup>22</sup>. Jbtx (20 µg/300µL saline) were dissolved in saline solution just before test. The isolation of the axon was performed essentially as Khalifa et al., 1997. Adult male cockroaches (*Periplaneta americana*) were fixed on a dissection platform, where the nerve chord were dissected and cleaned using a lupe. A segment (1,5-2,5mm) of one giant axon was isolated from connective linking the fourth and fifth abdominal ganglia and cleaned of adhering fibers. The preparation was transferred to an experimental chamber with two lateral Ag-AgCl electrodes. The electrodes were in contact with the severed ends of the axon and a central electrode was in contact through the external bathing solution with a 100-150µm segment of the dissected axon. The preparation was immersed in paraffin oil and an “artificial node of Ranvier” was created. The active membrane area of 0.01-0.02mm<sup>2</sup> (node) was superfused with saline or the solution containing Jbtx. Membrane potentials and transmembrane currents of the small surface of axonal membrane were recorded in current clamp or voltage clamp as described by Pelhate and Zloktin, 1982. Only isolated axons providing resting potentials more negative than -55Mv and evoked action potentials above 90Mv were selected for these studies. This axonal preparation contains two or three layers of glial cells surrounding the axonal membrane, which limit the ability of toxin molecules to reach their channel receptor sites. As a result, relatively high concentrations of toxin are required to detect their activity. Control experiments were performed using physiological saline described above.

### 2.5. Statistical Analysis

Data were expressed as mean ± S.E.M. The experimental groups were analysed by one way/two way ANOVA or regression followed by Dunnett test as *post hoc*. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0. (Software, San Diego, CA, USA). The values were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Effect of JBTX on spontaneous neural compound action potentials (SNCAP) in *Nauphoeta cinerea* leg

The effect of Jbtx (16 and 32 µg/g animal) over *N. cinerea* leg's SNCAPs was characterized by a significant time and dose-dependent decrease in the number of events ( $n =$

10). No alterations were observed with the dose of 16µg/g animal, in the first 10 min incubation. For the dose of 32 µg/g animal, there was significant decrease of about 62%, in the number of the potentials at the first 10 min recordings ( $p < 0.05$ ).

Following 50 min recordings, both doses induced a drastic decrease in the number of the SNCAP that were ( $33 \pm 3\%$  and  $12 \pm 1\%$ , respectively,  $p < 0.05$ ).

### 3.2 Effect of Jbtx on the spontaneous activity of DUM cells

In this set of protocols, the value for control saline experiments was  $16 \pm 0.12$  spikes/200ms, in 90 min recordings ( $n=3$ ). The application of Jbtx (20µg/300µl) on the TAG led to a late permanent silencing of the spontaneous activity of DUM cells, in 90 min (Fig. 2A). Although the peptide did not change the amplitude of the DUM cells action potentials, there was a progressive decrease in the frequency of the potentials that begun after 25 minutes recordings. Thus, from 0-15<sup>th</sup> minutes after Jbtx administration, there was no alteration in the number of spikes (Fig. 2B). However, after 25min recordings, there was a progressive decrease in the number of events to  $4 \pm 0.57$  spikes/200ms ( $n=3$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2C). At 35 min, there was only 11% of the spikes were remaining, when compared to the control saline recordings ( $n=3$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2D). By 40min recordings, there was a complete decrease of the spontaneous activity of DUM cells (Fig 2E), that was preserved until the end of 90 min of experiments. Treatment with phentolamine (5µg/300µl) induced a delay in the effect of Jbtx (20µg/300µl) over DUM cells spontaneous potentials ( $8 \pm 0.34\%$  spikes/200ms by until 40 min, following a complete inhibition after 55 min ( $n = 3$ ,  $p < 0.05$ ).

### 3.3 Effect of Jbtx on the amplitude of voltage and current recordings of isolated giant axons of *Periplaneta americana*

Using double oil gap (DOG) technique, overall Jbtx (20µg/300µl) led to an inactivation steady state voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. Thus, in the current-clamp mode, there was a reduction of the action potentials amplitude right after 20 min Jbtx application ( $80 \pm 3\%$  of the controls,  $n = 4$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 3A). After 25min, there was a maintenance in the decreasing activity leading to  $71 \pm 4\%$  and  $65 \pm 3\%$  at 30min, of the control values, respectively ( $p < 0.05$ ). At 35min following Jbtx administration, the amplitude was  $58 \pm 12\%$  of the control APs size ( $n=4$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 3C). In this set of protocols, the artificial hyperpolarization of the resting membrane potentials provoked a recovery to  $76 \pm 3\%$  of the AP mean amplitude (Fig 3D), compared to the control saline counterparts (Fig 3B).

In voltage-clamp mode, the mean amplitude for evoked Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in control parameters were 84± 2 and 16±3 mV during all 90min period of recordings (Fig 4B). After 20 min Jbtx application, there was a reduction to 77 ± 3% ( $p < 0.05$ ) in the sodium current amplitude, compared to the control saline (n=4), with no modifications in the K<sup>+</sup> component. (Fig. 4A). The decrease in Na<sup>+</sup> current amplitude was progressive and happened until 40min recordings, when the waveform reached a plateau (41 ± 2%, n = 4,  $p < 0.05$ ) (Fig 4C). At this point, an artificial hyperpolarization of the resting membrane potential partially restored the current amplitude to 73 ± 3% ( $p < 0.05$ ) (Fig 4D). Hence, the progressive decrease of current amplitude induced by Jbtx can be divided into two phases: (1) an initial slow decrease in the amplitude of the peak Na<sup>+</sup> current and (2) a late steep and progressive decrease in the peak of Na<sup>+</sup> current.

### 3. Discussion

In this work, we have brought to light novel information about the mechanisms involved in the entomotoxic activity of Jbtx, a toxic peptide derived from *C. ensiformis* urease (Jack Bean Urease, JBU). Jbtx induced significant alterations in the frequency of spontaneous compound action potentials from *Nauphoeta cinerea* legs and a decrease in the sodium current in *Periplaneta Americana* central neurons. The results will be discussed in detail therein.

When tested for insecticidal activity upon injection into *R. prolixus* or *O. fasciatus* nymphs, Jbtx, caused significant mortality after 96 h, clearly demonstrating its entomotoxic activity. Despite Jbtx being lethal to some insect classes, this ability is not confirmed for *Nauphoeta cinerea*<sup>37</sup>. However, in our experimental model, Jbtx is not lethal but induce neurotoxicity causing profound alterations in the insect behavior, related to a modulation in both central and peripheral nervous system<sup>24</sup>. Even the central and peripheral modulatory activity has been confirmed in different insect models for Jbtx, the precise mechanisms are far from a complete elucidation.

In our experimental model of *N. cinerea* the electrophysiological recordings of the cockroach hair sensilla spikes showed that Jbtx decrease the firing rates of these potentials. This result is coherent with the neuromuscular blockade demonstrated previously by our group<sup>13</sup> and suggest a possible modulation by Jbtx of voltage-gated sodium or potassium channels. To date, voltage-gated sodium channels are integral transmembrane proteins responsible for the rapidly rising phase of action potentials. On the contrary, K<sub>v</sub>-channels are responsible for the decay phase of action potentials, being involved in the membrane repolarization<sup>25,26</sup>. Thus, the

decrease in the frequency without affecting the amplitude of SNCAPS, is a strong clue that Jbtx interacts exclusively with sodium channels<sup>27</sup>. Indeed, DOG recordings of *Periplaneta americana* central neurons in voltage-clamp mode, reveal that Jbtx does not affect potassium currents. The mode of action by which natural toxins affect sodium channels can be generically classified into three manners: 1- those which bind on the mouth of the channels, inhibiting the entrance of sodium, 2- binding inside the channel pore, producing a progressive decrease in the sodium current and 3- targeting the sodium channel voltage-sensor alternating the gating properties<sup>28</sup>.

Because the limitation of our experimental milieu we cannot rule out about the exact molecular mechanism involved in the Jbtx binding into sodium channels. However, sodium channels consist of a large pore forming transmembrane with  $\alpha$ -subunit and several small auxiliary  $\beta$ -subunits. Like the mammalian sodium channel  $\alpha$ -subunits, insect voltage gated sodium channels have four homologous domains (named I–IV), each having six transmembrane segments (named S1–S6)<sup>2,29</sup>. The S4 segments function as voltage sensors, which move sodium outward in response to membrane depolarization to initiate the opening of the sodium channel<sup>2,25,30</sup>. Hence, the partial recovery of both current and voltage amplitudes, after a hyperpolarizing pulse in DOG preparation, strongly suggest that Jbtx attaches on the S4 segment, altering the gating function of the channel by disrupting its voltage sensor<sup>6,29</sup>.

A number of vegetal insecticides affect sodium channels in order to paralyze the target. For example, insecticidal pyrethrins, found in pyrethrum from flower extracts of *Tanacetum cinerariaefolium* (Elliott, 1977), act on sodium channels, inhibiting the channel deactivation and inactivation, and stabilizing the open state, causing prolonged opening<sup>29</sup>. As far as our knowledge, this is the first time that the mechanism of a vegetal toxin is related to the prevention of the sodium channel opening by driving inactivation states to more negative membrane potentials.

Finally, we have demonstrated that the octopaminergic system is also involved in the modulation of insect's behavior. This system controls locomotion, processing of sensory information in the periphery, central pattern generators, and processing of information within the brain.<sup>31</sup> In fact, in invertebrate and particularly in insect central nervous system, there are evidences of spontaneously firing action potentials in neurosecretory cells, e.g. the dorsal unpaired median (DUM) neurons which include identified octopaminergic neurotransmission L<sup>21</sup>. The retardation of DUM cells silencing, induced by the application of phentolamine, suggest that Jbtx is modulating octopamine release. However, our data is not enough to

speculate how the pro-inactivation activity induced Jbtx on sodium channels are involved in the neurobehavioral activity of this neuropeptide in insects (dos Santos et al., 2018) . One hypothesis could be that somehow Jbtx must inhibit specific classes of inhibitory interneurons that are connected to the octopaminergic ones, driving an ambiguous release of octopamine to promote its pharmacological activity.

#### **4. Conclusion**

Our results indicate that the entomotoxic activity of Jaburetox involves significant changes in the voltage gated sodium channels, at the ganglia of ventral nerve chord. The toxic effect begins with the pro-inactivation activity of the voltage-gated sodium channels to prevent cell hyper sensibility. As a result, DUM neurons, have their spontaneous activity silenced, disturbing the physiological afferent reception of signal of leg sensillas and promoted an ambiguous release of octopamine at central neurons. As consequence, there are modifications in animal behavior, heart rate and twitch tensions (Fig 05). Further biochemical, electrophysiological and molecular attempts are required to elucidate the complexity of actions of Jbtx on the insect nervous system.

#### **Acknowledgments**

We would like to thank the partnership between LANETOX (Laboratory of Neurobiology and Toxinology-UNIPAMPA) and the Biophysics Department of the Faculty of Biology and Environmental Safety, Nicolaus Copernicus University, Toruń, Poland. This work was conducted during a scholarship supported by the CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil. A.P. Zanatta would like to thank Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES for the fellowship and for the financial support by means of the Edital 063/2010 Toxinologia.

**Conflict of interests:** The authors declare that there is no conflict of interests regarding this work.

1. Bloomquist, J. R. ION CHANNELS AS TARGETS FOR INSECTICIDES. (1996).
2. Dong, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience* **7**, 17–30 (2007).
3. Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B. M., Rauh, J. J. & Sattelle, D. B. Ion channels:



- Molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience* **5**, 119–133 (2005).
4. Narahashi, T. & Avenue, C. Neuronal Ion Channels as the Target Sites. 1–14 (1996).
  5. Casida, J. E. & Durkin, K. A. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology* **58**, 99–117 (2013).
  6. ffrench-Constant, R. H., Williamson, M. S., Davies, T. G. E. & Bass, C. Ion channels as insecticide targets. *Journal of Neurogenetics* **30**, 163–177 (2016).
  7. Lapied, B. *et al.* Biophysical properties of scorpion  $\alpha$ -toxin-sensitive background sodium channel contributing to the pacemaker activity in insect neurosecretory cells ( DUM neurons ). **11**, 1449–1460 (1999).
  8. Leal, A. P. *et al.* Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **148**, 175–181 (2018).
  9. Stanisçuaski, F. & Carlini, C. R. Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties. *Toxins* **4**, 55–67 (2012).
  10. Carrazoni, T. *et al.* Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Toxicology* (2016). doi:10.1016/j.tox.2016.09.007
  11. Mulinari, F. *et al.* Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* **28**, 2042–2050 (2007).
  12. Carlini, C. R. & Polacco, J. C. Toxic properties of urease. *Crop Science* **48**, 1665–1672 (2008).
  13. Martinelli, A. H. S. *et al.* Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1840**, 935–944 (2014).
  14. Osborne, R. H. *Insect Neurotransmission : Neurotransmitters and Their Receptors*. **69**, 117–142 (1996).
  15. Stankiewicz, M. *et al.* Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system, a native *Xenopus* oocyte receptor and on an expressed *Drosophila* muscarinic receptor. *Toxicon* **37**, 1431–1445 (1999).
  16. Stankiewicz, M., Dbrowski, M. & De Lima, M. E. Nervous system of *Periplaneta americana* cockroach as a model in toxicological studies: A short historical and actual view. *Journal of Toxicology* **2012**, (2012).
  17. Broll, V. *et al.* Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **159**, 849–860 (2017).
  18. Fruttero, L. L. *et al.* Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors* **9**, 1–14

- (2016).
19. Carlini, C. R. & Ligabue-Braun, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon* **110**, 90–109 (2016).
  20. Achenbach, H., Walther, C. & Wicher, D. Octopamine modulates ionic currents and spiking in dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Neuroreport* **8**, 3737–3741 (1997).
  21. Lapied\_et\_al-1999-European\_Journal\_of\_Neuroscience.
  22. Pelhate, M. & Zlotkin, E. Actions of insect toxin and other toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* on isolated giant axons of the cockroach (*Periplaneta americana*). *J Exp Biol* **97**, 67–77 (1982).
  23. Khalifa, R. Y. M. B. E. N., Stankiewicz, M., Khalifa, R. Ben, Stankiewicz, M. & Pelhate, M. Action of babycurus-toxin I from the east african scorpion on the isolated cockroach giant axon several components which are highly active in insects ( Zlotkin et al ., 1994 ). Insect toxins have been purified from the venoms of *Androctonus* species ( Pelh. **35**, 1069–1080 (1997).
  24. Silva, D. *et al.* Jaburetox , a natural insecticide derived from Jack Bean Urease , activates voltage-gated sodium channels to modulate insect behavior. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 0–1 (2018). doi:10.1016/j.pestbp.2018.11.003
  25. Catterall, W. A. From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron* **26**, 13–25 (2000).
  26. Stankiewicz, M. Transient K + Current and Periaxonal Potassium Accumulation in the Giant Axon of the Cockroach *Periplaneta americana*. **39**, 1075–1082 (1993).
  27. Ramdya, P. *et al.* behaviour in *Drosophila*. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature14024
  28. Stevens, M., Peigneur, S. & Tytgat, J. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. *Frontiers in Pharmacology* **2**, 1–13 (2011).
  29. Silver, K. S. *et al.* *HHS Public Access*. (2018). doi:10.1016/B978-0-12-417010-0.00005-7.Voltage-Gated
  30. Zlotkin, E. The insect voltage-gated sodium channel as target. (1999).
  31. Papaefthimiou, C. & Theophilidis, G. Octopamine — A single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs . inhibition. *Journal of Insect Physiology* **57**, 316–325 (2011).

## Legends

**Fig. 1.** Influence of Jbtx on spontaneous neural compound action potentials kinetic (SNCAP) in *Nauphoeta cinerea* leg. **(A)** The figure shows the decrease on number of events (action potentials) is time of treatment and dose dependent **(B)** and may be easily observed in the

recordings Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M of recordings conducted with 10 animals per group. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA followed by the Dunnett test. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**Fig. 2.** Effect of Jbtx over the activity of DUM cells in *Periplaneta americana* TAG. (A) In the graph, each point corresponds to the mean  $\pm$  S.E.M. of the activity of DUM cells measured during 40 min after exposition to Jbtx. Note that Jbtx (20 $\mu$ g/ 300 $\mu$ l) slows the frequency of spontaneous activity leading to complete silence of the cell (B-E).. The data were expressed by non linear regression. (n=4).

**Fig. 3.** Decrease in voltage amplitude modulated by Jbtx. (A) Jbtx decreased the amplitude of voltage in giant axons of *Periplaneta americana*. (B) Control experiments remained stable during 50 minutes of experiment. (C) After 20min of experiment, there was a progressive decrease in the voltage amplitude caused by Jbtx. (D) After artificial hyperpolarization of the resting membrane potential, the preparation recovered 76% $\pm$ 2,69 of amplitude size, comparing to the same time lapse under control conditions. The data were analyzed by One-way ANOVA followed by the Dunnett's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; n=4;.

**Fig. 4.** Decrease in current amplitude modulated by Jbtx. (A) Jbtx decreased the amplitude of current in giant axons of *Periplaneta americana*. (B) Control experiments remained stable during 50 minutes of experiment. (C) Jbtx modulated a progressive decrease in the current amplitude by the 20<sup>th</sup> minute of experiment (D) Artificial hyperpolarization of the resting membrane potential recovered 73% $\pm$ 2,54 of amplitude size, comparing to the same time lapse under control condition. The data were analyzed by One-way ANOVA followed by the Dunnett's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ;

**Fig 5.** Summary figure. The toxic effect induced by Jbtx begins with the inactivation of the majority of voltage gated sodium channels in order to prevent cell hypersensibility. As a result, DUM neurons, present at the neuromuscular junctions have their spontaneous activity completely silenced. This silencing disrupts the physiological afferent reception of signal of leg sensillas. As consequence, there are modifications in animal behavior, heart rate and twitch tension.

Fig. 1

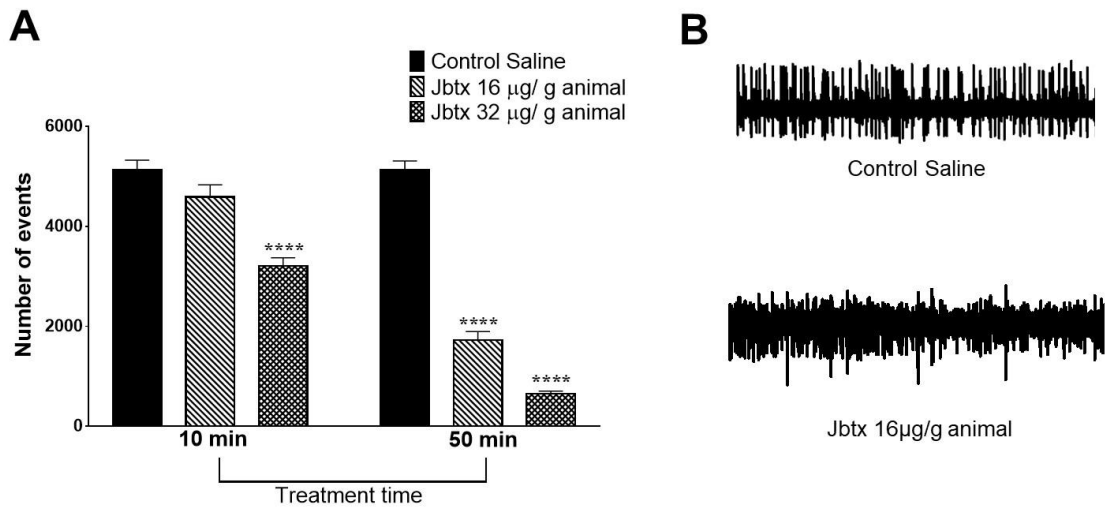


Fig. 2

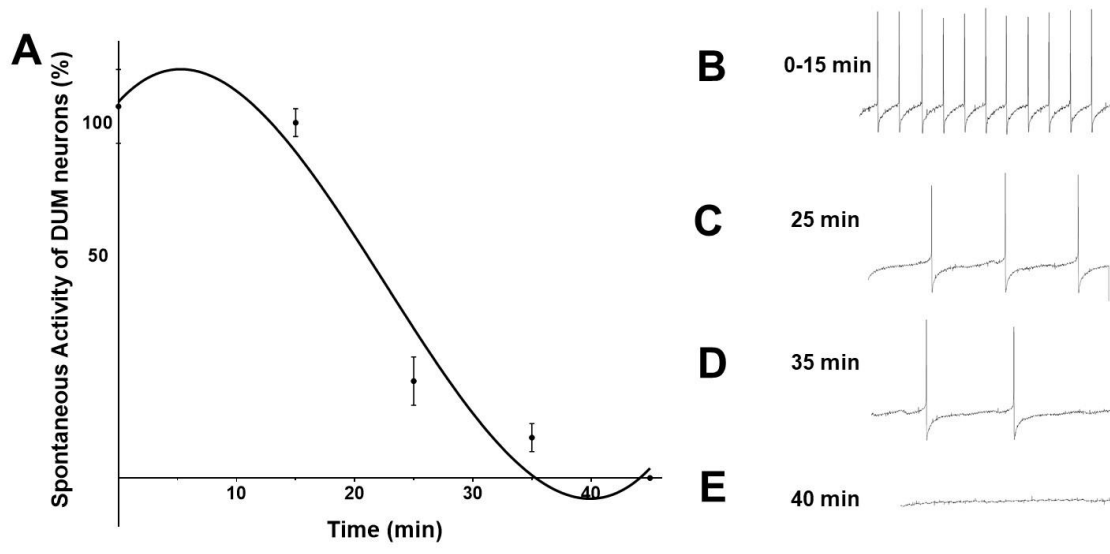


Fig. 3

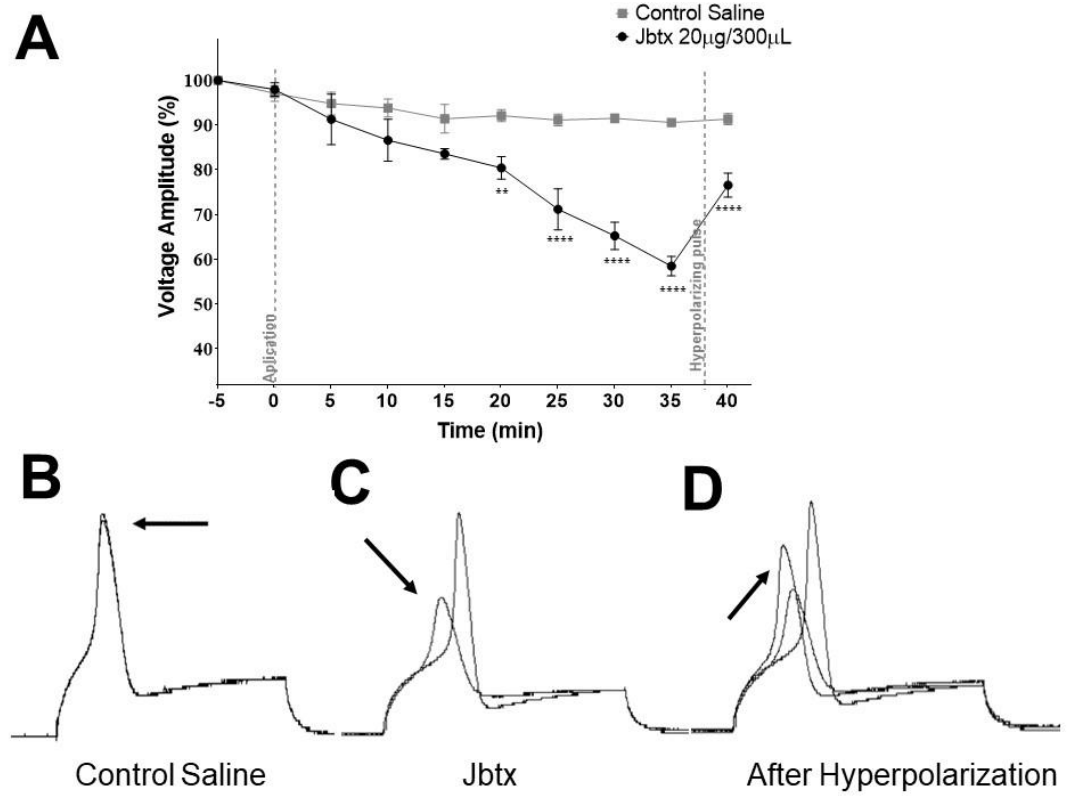


Fig. 4

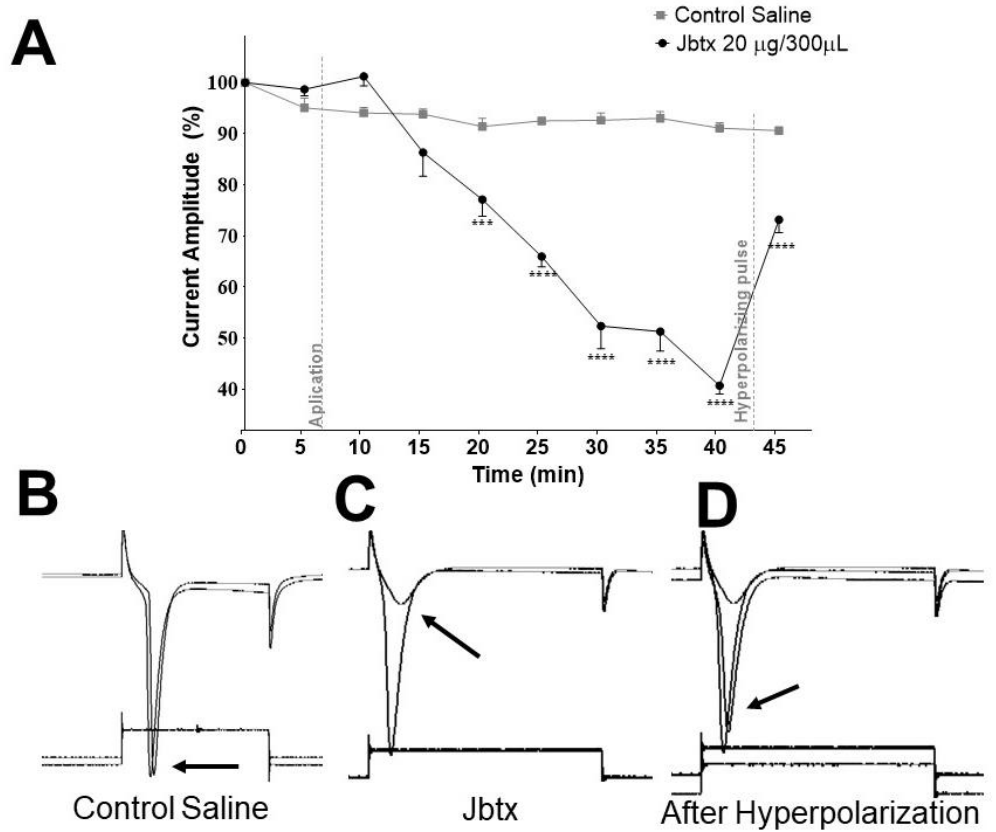
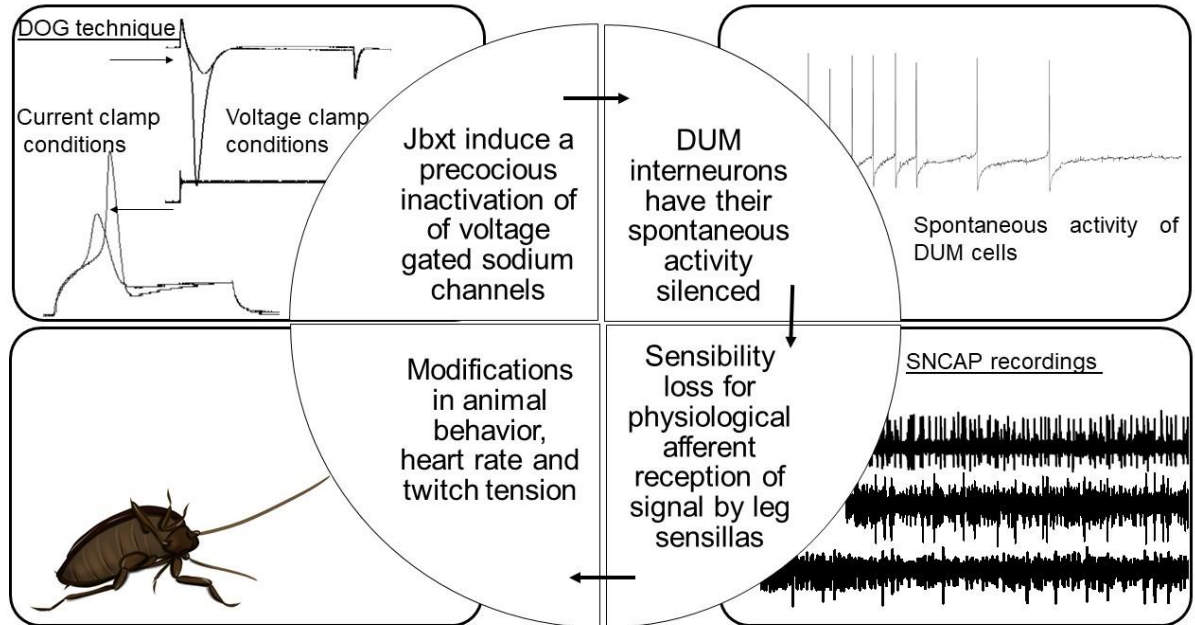


Fig. 5.



#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nessa dissertação de mestrado, bem como os aspectos relevantes que foram discutidos, nos permitem elencar as seguintes conclusões:

- O peptídeo tóxico Jaburetox, derivado da urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) embora não exerça atividade letal quando injetado via intra-abdominal em *Nauphoeta cinerea*, altera vias fisiológicas por mecanismos ainda a serem elucidados;
- O Jaburetox induz a diminuição da frequência dos potenciais de ação compostos aferentes e conseqüentemente, diminui a sensibilidade das sensilas de *Nauphoeta cinerea*;
- Esse efeito em SNCAP é dose e tempo dependente.
- O Jaburetox modula o silenciamento da atividade espontânea de neurônios do tipo DUM, presentes no gânglio abdominal terminal de *Periplaneta americana*.

## 5. REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; WALTHER, C.; WICHER, D. **Octopamine modulates ionic currents and spiking in dorsal unpaired median (DUM) neurons.** *Neuroreport*, [s. l.], v. 8, n. 17, p. 3737–3741, 1997.
- BALANDRIN, M. et al. **Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials.** *Science*, [s. l.], v. 228, n. 4704, p. 1154–1160, 1985.
- BLAKELEY, Robert L.; ZERNER, Burt. **Jack bean urease: the first nickel enzyme.** [s. l.], v. 23, p. 263–292, 1984.
- BLENAU, Wolfgang; BAUMANN, Arnd. **Molecular and Pharmacological Properties of Insect Biogenic Amine Receptors : Lessons From *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*.** [s. l.], v. 38, n. April, p. 13–38, 2001.
- BLOOMQUIST, Jeffrey R. **Ion channels as targets for insecticides.** [s. l.], 1996.
- BROLL, Valquiria et al. **Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, [s. l.], v. 159, p. 849–860, 2017.
- CARLINI, Celia R.; GUIMARÃES, Jorge A. **Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A.** *Toxicon*, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 667–675, 1981.
- CARLINI, Celia R.; LIGABUE-BRAUN, Rodrigo. **Ureases as multifunctional toxic proteins: A review.** *Toxicon*, [s. l.], v. 110, p. 90–109, 2016.
- CARLINI, Célia R.; POLACCO, Joe C. **Toxic properties of urease.** *Crop Science*, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 1665–1672, 2008.
- CARLINI, R.; FA, Maria. **Plant toxic proteins with insecticidal properties . A review on their potentialities as bioinsecticides.** [s. l.], v. 40, p. 1515–1539, 2002.
- CARRAZONI, Thiago et al. **Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches.** *Toxicology*, [s. l.], 2016.
- CASIDA, John E.; DURKIN, Kathleen A. **Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects.** *Annual Review of Entomology*, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 99–117, 2013.
- CATTERALL, William A. **From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels.** *Neuron*, [s. l.], v. 26, p. 13–25, 2000.



- CESTÈLE, Sandrine; CATTERALL, William A. **Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels**. *Biochimie*, [s. l.], v. 82, n. 9–10, p. 883–892, 2000.
- CHERR, C. M.; SCHOLBERG, J. M. S.; MCSORLEY, R. **Green manure approaches to crop production: A synthesis**. *Agronomy Journal*, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 302–319, 2006.
- CRILL, Wayne E. **Persistent sodium current in mammalian**. [s. l.], n. 31, 1996.
- CRISTINA, Graciela; MONTEIRO, Magali. **Sistema orgânico de produção de alimentos**. [s. l.], p. 73–86, 2004.
- DE FREITAS, Thiago Carrazoni et al. **Central and peripheral neurotoxicity Induced by the Jack Bean Urease (JBU) in Nauphoeta cinerea cockroaches**. *Toxicology*, [s. l.], v. 368–369, p. 162–171, 2016.
- DEVINE, Gregor J.; FURLONG, Michael J. **Insecticide use : Contexts and ecological consequences**. [s. l.], p. 281–306, 2007.
- DIXON, Nicholas E.; GAZZOLA, Carlo; WATTERS, James J. **also form complexes with hydroxamic acids<sup>2</sup>] and hydroxy- urea.<sup>22</sup> T h e present work indicates that phosphoramidate may also be a useful reversible probe of the sites**. [s. l.], v. 1, p. 4131–4133, 1926.
- DONG, Ke. **Insect sodium channels and insecticide resistance**. *Invertebrate Neuroscience*, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 17–30, 2007.
- dos Santos et al 2018 (22082018)**. , [s.d.].
- EHRlich, Paul R. et al. **Weather and the " regulation " of subalpine populations '.** [s. l.], v. 53, n. 2, p. 243–247, 2015.
- ERASMO, E. A. L.; AZEVEDO, W. R.; GARCIA, E. **Potential of Species Used as Green Manure in the Integrated Weed Management**. *Planta Daninha*, [s. l.], v. 22, n. 39, p. 337–342, 2004.
- FFRENCH-CONSTANT, Richard H. et al. **Ion channels as insecticide targets**. *Journal of Neurogenetics*, [s. l.], v. 30, n. 3–4, p. 163–177, 2016.
- FOLLMER, Cristian et al. **of its ureolytic activity**. [s. l.], v. 224, p. 217–224, 2001.
- FRUTTERO, Leonardo L. et al. **Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism Rhodnius prolixus**. *Parasites & Vectors*, [s. l.], v. 9, n. 412, p. 1–14, 2016.
- GAL, Ram; LIBERSAT, Frederic. **On predatory wasps and zombie cockroaches**. *Communicative & Integrative Biology*, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 458–461, 2010.

- GAUPP, E.; NEUROPSYCHIATRY, The; ANGELES, Los. **Pyrethroid Insecticides : Stereospecific Allosteric Interaction the Batrachotoxinin-A Benzoate Binding Site of Mammalian Sodium Channels**. [s. l.], p. 54–59, [s.d.].
- GORDON, Dalia et al. **Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels** *Scorpion Toxins Affecting Sodium Current Inactivation Bind to Distinct Homologous Receptor Sites on Rat Brain and Inse*. [s. l.], v. 271, n. September 2015, p. 8034–8045, 1996.
- GORDON, Dalia. **Sodium channels as targets for neurotoxins : Mode of action and interaction of neurotoxins with receptor sites on sodium channels**. [s. l.], n. January 1997, 2017.
- ISMAN, Murray B. **Insecticides Design Using Advanced Technologies**. [s. l.], n. January, 2007.
- JUST, Frank et al. **The effects of serotonin and dopamine on salivary secretion by isolated cockroach salivary glands**. [s. l.], v. 413, p. 407–413, 1996.
- KHALIFA, R. Y. M. B. E. N. et al. **Action of babycurus-toxin 1 from the east african scorpion on the isolated cockroach giant axon several components which are highly active in insects ( zlotkin et al ., 1994 ). insect toxins have been purified from the venoms of androctonus species ( Pelh**. [s. l.], v. 35, n. 96, p. 1069–1080, 1997.
- Lapied\_et\_al-1999-European\_Journal\_of\_Neuroscience**. , [s.d.].
- LAPIED, B. et al. **Biophysical properties of scorpion  $\alpha$  -toxin-sensitive background sodium channel contributing to the pacemaker activity in insect neurosecretory cells ( DUM neurons )**. [s. l.], v. 11, n. November 1998, p. 1449–1460, 1999.
- LEAL, Allan Pinto et al. **Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation**. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, [s. l.], v. 148, n. April, p. 175–181, 2018.
- MARTINELLI, Anne H. S. et al. **Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease**. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, [s. l.], v. 1840, n. 3, p. 935–944, 2014.
- MOBLEY, Harry L. T.; HAUSINGER, Robert P. **Microbial Ureases : Significance , Regulation , and Molecular Characterization**. [s. l.], v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.
- MULINARI, F. et al. **Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis***. *Peptides*, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 2042–2050, 2007.

- NARAHASHI, Toshio; AVENUE, Chicago. **Neuronal Ion Channels as the Target Sites.** [s. l.], p. 1–14, 1996.
- ORCHARD, Ian; LANGE, Angela B. **Neuromuscular transmission in an insect visceral muscle.** *Journal of Neurobiology*, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 359–372, 1986.
- OSBORNE, Richard H. **Insect Neurotransmission : Neurotransmitters and Their Receptors.** [s. l.], v. 69, n. 2, p. 117–142, 1996.
- PAPAEFTHIMIOU, Chrisovalantis; THEOPHILIDIS, George. **Octopamine — A single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): Acceleration vs . inhibition.** *Journal of Insect Physiology*, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 316–325, 2011.
- PELHATE, M.; ZLOTKIN, E. **Actions of insect toxin and other toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* on isolated giant axons of the cockroach (*Periplaneta americana*).** *J Exp Biol*, [s. l.], v. 97, p. 67–77, 1982.
- PIRES-ALVES, Melissa et al. **Characterization and Expression of a Novel Member ( JBURE-II ) of the Urease Gene Family from Jackbean [ *Canavalia ensiformis* ( L . ) DC ]**. [s. l.], v. 44, n. 2, p. 139–145, 2003.
- PLATKIEWICZ, Jonathan; BRETTE, Romain. **Impact of Fast Sodium Channel Inactivation on Spike Threshold Dynamics and Synaptic Integration.** [s. l.], p. 1–42, 2017.
- RAMDYA, Pavan et al. **behaviour in *Drosophila*.** *Nature*, [s. l.], 2014.
- RAYMOND-DELPECH, Valérie et al. **Ion channels: Molecular targets of neuroactive insecticides.** *Invertebrate Neuroscience*, [s. l.], v. 5, n. 3–4, p. 119–133, 2005.
- SILVER, Kristopher S. et al. **HHS Public Access.** [s.l: s.n.].
- STANISÇUASKI, Fernanda et al. **In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules.** *Journal of Insect Physiology*, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 255–263, 2009.
- STANISÇUASKI, Fernanda; CARLINI, Célia R. **Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties.** *Toxins*, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 55–67, 2012.
- STANKIEWICZ, M. **Transient K + Current and Periaxonal Potassium Accumulation in the Giant Axon of the Cockroach *Periplaneta americana*.** [s. l.], v. 39, n. 12, p. 1075–1082, 1993.
- STANKIEWICZ, Maria et al. **Effects of a centipede venom fraction on insect nervous system, a native *Xenopus* oocyte receptor and on an expressed *Drosophila* muscarinic**

**receptor.** *Toxicol*, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1431–1445, 1999.

STANKIEWICZ, Maria; DBROWSKI, Marcin; DE LIMA, Maria Elena. **Nervous system of *Periplaneta americana* cockroach as a model in toxinological studies: A short historical and actual view.** *Journal of Toxicology*, [s. l.], v. 2012, 2012.

STEVENS, Marijke; PEIGNEUR, Steve; TYTGAT, Jan. **Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels.** *Frontiers in Pharmacology*, [s. l.], v. 2, n. November, p. 1–13, 2011.

SUSTAINABLE, The; GOALS, Development. **The Sustainable Development Goals Report.** [s. l.], 2018.

TITLOW, Josh S. et al. **Neural Circuit Recording from an Intact Cockroach Nervous System.** [s. l.], n. November, p. 1–10, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics - monitoring health for the sdgs.** World Health Organization, [s. l.], p. 1.121, 2016.

ZLOTKIN, Eliahu. **The insect voltage-gated sodium channel as target.** [s. l.], 1999.