

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAMPUS SÃO GABRIEL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INDUZIDA PELA *Jack Bean Urease* (JBU) SOBRE O  
SISTEMA NERVOSO DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea***

MARINES DE AVILA HEBERLE

SÃO GABRIEL, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

2015

MARINES DE AVILA HEBERLE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INDUZIDA PELA *Jack Bean Urease* (JBU) SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea***

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

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto

SÃO GABRIEL

2015

HEBERLE, Marines de Avila

Avaliação da atividade induzida pela *Jack Bean Urease* (JBU) sobre o sistema nervoso de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* / Marines de Avila Heberle.

76 folhas;

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2015.

Orientação: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo.

1. Qualidade Ambiental. 2. Neurofarmacologia.  
3. Toxinologia.

I. Dal Belo, Cháriston André. II. Doutor

**MARINES DE AVILA HEBERLE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INDUZIDA PELA *Jack Bean Urease* (JBU) SOBRE O  
SISTEMA NERVOSO DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea***

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

Dissertação defendida e aprovada em 19 de janeiro de 2015.

Banca examinadora:

---

Dr<sup>a</sup>. Daiana Silva de Ávila  
UNIPAMPA - Uruguaiana

---

Dr. Juliano Tomazzoni Boldo  
UNIPAMPA – São Gabriel

---

Dr. Cháriston André Dal Belo  
UNIPAMPA – São Gabriel

Aos meus amados pais, Denecy e Jerônimo, pela educação, apoio, carinho e incentivo para concretizar mais essa etapa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Denecy e Jerônimo, pelo carinho, apoio, compreensão, incentivo e amor incondicional. Pai, mãe, muito obrigada!!! Obrigada por nunca medirem esforços para que eu conseguisse concluir mais essa etapa! As minhas amadas irmãs que também sempre me apoiaram, acreditando no meu potencial e me incentivando sempre. Marilene e Maristela, obrigada! Espero fazê-los sentirem-se orgulhosos hoje e sempre. Amo todos vocês!

Ao meu orientador de longa data Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo pela oportunidade e confiança, desde a iniciação científica. Meus sinceros agradecimentos por contribuir com meu crescimento profissional e pessoal!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto pelos ensinamentos, apoio, incentivo e amizade. Meu muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Lúcia Vinadé pelos ensinamentos ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jeferson Luis Franco e a MSc. Ana Paula Zemolin do Laboratório de Sinalização Celular – UNIPAMPA, pela disponibilidade em ajudar sempre.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Célia Carlini pela concessão da bolsa e os ensinamentos prestados, e ao pessoal do Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX) – UFRGS pela disponibilidade.

Aos queridos amigos Ana Paula Perin, Ana Paula Zanatta, Polyana, Fabíola, Antônio, Nathália, Guilherme, Darlene e Anna Laura, pela paciência, dedicação, confiança e principalmente pela amizade. A vocês meus amigos, muito obrigada!!!

Aos colegas e amigos Graziela Holken, Ana Paula Lucho e Douglas Santos pelo carinho, incentivo, amizade e companheirismo, muito obrigada!

Agradeço à UNIPAMPA e ao PPGCB pela possibilidade de realização deste curso e a CAPES pela bolsa de mestrado.

“A parte mais triste da vida atual é que a ciência cria conhecimento mais rápido do que a sociedade cria sabedoria.”

Isaac Asimov

## RESUMO

A urease de *Canavalia ensiformis* (*Jack bean urease*, JBU) tem sido caracterizada por possuir ação entomotóxica. Apesar de vários trabalhos já terem sido realizados objetivando o estudo desse composto em diferentes modelos de insetos, poucos, ou nenhum, demonstrou o exato mecanismo de ação desse composto sobre o sistema nervoso desses animais. Nesse trabalho foi usado o modelo experimental de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* para se investigar os mecanismos centrais e periféricos induzidos pela JBU. Foram feitos ensaios de letalidade, bem como análises bioquímicas para a determinação da atividade sobre a acetilcolinesterase do cérebro do inseto. Foram usados modelos biológicos *in situ* e *in vivo* com o intuito de se determinar a sensibilidade de diferentes sistemas fisiológicos ao composto. Como bioensaios foram usados a técnica de coração semi-isolado, de nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico *in vivo* e da medida da atividade de *grooming*. Os ensaios para a determinação da dose letal mínima demonstraram que a JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) não é letal para a barata *N. cinerea*. Esse fato pode ser explicado pela ausência de enzimas do tipo catepsinas no sistema digestivo de *N. cinerea*, ou pelo fato de termos administrado a urease pela via circulatória do animal. Os ensaios para a medida da atividade da AChE, nas mesmas doses, demonstraram que a JBU inibe significativamente essa enzima (20±2%, 65±2% e 75±3%). Na avaliação dos efeitos da JBU sobre a frequência cardíaca de barata, a uréase (1.5, 3 e 6µg/g de animal) induziu um efeito cronotrópico positivo que foi de 94±5bat./min no grupo controle salina, e 125±3bat./min com a administração da JBU (3µg/g de animal). Nessa série de experimentos, a adição de neostigmina (5µM) mimetizou o efeito cronotrópico positivo da urease o qual também foi inibido pela atropina (1µM). A obtenção dos registros da força de contração muscular em animais tratados com a JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) demonstrou que a urease induz bloqueio neuromuscular irreversível que foi de (30±10%, 15±4% e 70±7%) respectivamente. Nessa série de experimentos, a administração de acetilcolina (50µg/g de animal) ou hidroxilamina (1µg/g de animal) mimetizou o efeito da urease na junção neuromuscular, sugerindo o envolvimento do neurotransmissor ACh na modulação dos efeitos sobre o sistema nervoso periférico da barata. O tratamento prévio dos animais com dexametasona (40µg/g de animal) inibiu parcialmente o efeito



bloqueador neuromuscular da JBU (~75%) sugerindo que parte do efeito da urease sobre a junção neuromuscular seja modulada por compostos pró-inflamatórios. Também foi evidenciado que o bloqueio dos receptores gabaérgicos pela bicuculina (5µg/g de animal), previne o bloqueio neuromuscular induzido pela JBU (~50%), sugerindo que a inibição da neurotransmissão periférica pela urease seja modulada pelo neurotransmissor GABA. A análise do comportamento de *grooming*, que é caracterizado pela limpeza das pernas e antenas, demonstrou que o valor controle para esse ensaio foi de (153±8s/30min de perna e 70±6s/30min de antena) e que a urease (1.5, 3 e 6µg/g de animal), induz um aumento significativo na frequência dos eventos de perna (177±23s/30min, 253±33s/30min e 363±23s/30min), mas não do de antena. Nesses ensaios a incubação do animal com octopamina (15µg/g de animal) mimetizou o efeito da urease, sugerindo uma atividade relacionada a esse neurotransmissor. O tratamento prévio dos animais com fentolamina (0.1µg/g de animal) impediu o aumento da taxa de *grooming* de perna pela urease, sugerindo que a mesma esteja atuando no receptor de octopamina. Os resultados reforçam o potencial das ureases como agentes inseticidas naturais demonstrando a complexidade dos mecanismos envolvidos na atividade neurotóxica desses compostos em baratas. Além disso, a atividade anticolinesterásica da urease de *C. ensiformis* não é suficiente para produzir a morte dos animais, como ocorre com os inseticidas químicos organofosforados. No entanto o efeito anticolinesterásico deve contribuir para o desenvolvimento das alterações comportamentais observadas.

**Palavras-chave:** Urease, *Canavalia ensiformis*, barata, atividade anticolinesterásica, bloqueio neuromuscular, *grooming*.

## ABSTRACT

The urease of *Canavalia ensiformis* (Jack bean urease, JBU) has been characterized as exhibiting an entomotoxic activity. Although several studies have already been performed aiming the study of this compound in different models of insects, few or none have demonstrated the exact mechanism of action of this compound on the cockroach nervous system. In this work we used the cockroach *Nauphoeta cinerea* as an experimental model in order to investigate the actions induced by JBU at central and peripheral nervous system and its mechanisms. We have performed a lethality assay, as well as a biochemical analysis to determine the activity of the urease on the insect brain cholinesterase. Biological models *in situ* and *in vivo* were also used in order to determine the sensitivity of different physiological systems to the compound, such as the technique of semi-isolated heart, the abductor-metatoracic coxal muscle preparation *in vivo* and the measurement of grooming activity. The assays for the determination of the minimum lethal dose demonstrated that JBU (1.5, 3, 6 µg/g of animal) is not lethal to *N. cinerea*, despite the animals became lethargic after 24h the administration of the compound. Such result can be explained by the absence of cathepsin-like enzymes in the digestive system of *N. cinerea*, or because we have administered the urease by the circulatory system of the animals. The assays for determining the AChE activity, using the same doses, demonstrated that JBU significantly inhibited this enzyme (20±2%, 65±2% and 75±3%). The effects of JBU (1.5, 3 and 6 µg/g animal) upon the insect heart rate, showed a positive chronotropic effect that was 94 ± 5 bat./min in the saline control group, and 125±3 bat./min with the administration of (3 µg/g of animal) JBU. In this set of experiments the addition of neostigmine (5 µM) mimicked the positive chronotropic effect induced by the urease which was also inhibited by atropine (1 µM). The recordings of muscle twitch tension of the cockroaches treated with JBU (1.5, 3, 6 µg/g of animal), showed that the urease induces an irreversible neuromuscular blockade (30±10%, 15±4% and 70±7%), respectively. The administration of acetylcholine (50 µg/g of animal) or hydroxylamine (1 µg/g of animal) mimicked the effect of the urease alone at neuromuscular junctions, suggesting the involvement of the neurotransmitter Ach in the modulatory activity induced by JBU at cockroach peripheral nervous system. Therefore, the pretreatment of the animals with

dexamethasone (40µg/g of animal) partially inhibited the neuromuscular blocking activity of JBU (~75%), suggesting that part of the effect of the urease at insect neuromuscular junctions involves pro-inflammatory compounds. It was shown that the blockage of GABA receptors by bicuculline (5µg/g of animal), prevents JBU-induced neuromuscular activity (~50%), suggesting that the neurotransmitter GABA is involved in the peripheral inhibitory actions of the urease. The analysis of grooming behavior, that is characterized by the cleaning of front legs and antennae, showed that the control value for this assay was (153±8s/30min of legs and 70±6s/30min for the antennae) and after treatment with urease (1.5, 3, 6µg / g of animal) there was a significant increase in frequency of leg events (177±23s/30min, 253±33s/30min and 363±23s/30min), but not the antenna. The incubation of the animals with octopamine (15µg/g of animal) mimicked the effect induced by the urease, suggesting an activity related to this neurotransmitter. The pretreatment of the animals with phentolamine (0.1µg/g of animal) prevented the urease-increasing rate of leg grooming, suggesting a direct action at the octopamine receptor. The results reinforce the potential of ureases as natural insecticides showing the complexity of the mechanisms involved in the neurotoxicity of these compounds at the nervous system of cockroaches. The anticholinesterasic activity of JBU is not sufficient to produce the death of the animals, as do chemical organophosphate insecticides, but favors the development of important behavioral alterations.

**Keywords:** Urease, *Canavalia ensiformis*, cockroach, acetylcholinesterase activity, neuromuscular blockade, *grooming*.

## LISTA DE FIGURAS

1. Reação da hidrólise da ureia .....	20
2. Organização estrutural de ureases .....	20
3. Cordão nervoso ventral de baratas .....	22
4. Estrutura geral de um inseto .....	24
5. Sistema nervoso de baratas.....	25
6. Diagrama do sistema nervoso central de baratas .....	26
7. Barata da espécie <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	33
8. Coração da barata.....	36
9. Setup para registros <i>in vivo</i> de preparações neuromusculares.....	37
10. Open Field.....	38
11. Efeito da JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em homogenato de cérebro de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	41
12. Efeito da JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) sobre o sistema cardiovascular de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	43
13. Efeito cronotrópico positivo induzido pela neostigmina (5µM) sobre o sistema cardiovascular de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	44
14. Atividade induzida pela JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) sobre a força de contração muscular em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	46
15. Efeito da acetilcolina (50µg/g de animal) e da bicuculina (5µg/g de animal) sobre a resposta contrátil em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	48
16. Inibição parcial do bloqueio neuromuscular induzido pela JBU pelo tratamento prévio com bicuculina (5µg/g de animal) em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	50
17. Inibição parcial do bloqueio neuromuscular induzido pela JBU pelo tratamento prévio com fentolamina (10µg/g de animal) em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	52

18. Inibição parcial da resposta bloqueadora neuromuscular da JBU pelo tratamento prévio com dexametasona (40µg/g de animal) em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	54
19. Modulação da resposta de <i>grooming</i> pela administração de diferentes concentrações da urease de <i>Canavalia ensiformis</i> (JBU) em <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	56
20. Modulação da resposta de <i>grooming</i> pela administração da octopamina (15µg/g de animal) em <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	58
21. Inibição do aumento da atividade de <i>grooming</i> pela JBU pelo tratamento prévio com fentolamina (0.1µg/g de animal) em <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	59
22. Modulação da resposta de <i>grooming</i> pela administração da hidroxilamina (20µg/g de animal) em <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

cNOH – Óxido nítrico sintetase constitutiva

DL50 – Dose Letal Mínima

DNQX – Quinoxalinadionas 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-diona

DUM – Neurônio dorsal não-pareado

eNOS – Óxido nítrico sintetase endotelial

GABA - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzida

JBU – *Jack Bean Urease*

JNM – Junção neuromuscular

NADPH – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NMDA – N-metil-d-aspartato

nNOS – óxido nítrico sintetase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintetase

SNC–Sistema Nervoso Central

SNP– Sistema Nervoso Periférico

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	17
1.1 Agentes inseticidas .....	17
1.2 Atividade inseticida das ureases.....	18
1.3 Ureases .....	18
1.3.1 <i>Jack Bean urease</i> (JBU).....	21
1.2.2 Atividade inseticida das ureases .....	21
1.4 Baratas como modelo experimental.....	22
1.5 Anatomia e fisiologia dos insetos .....	23
1.5.1 Sistema nervoso de insetos .....	24
1.5.2 Junção neuromuscular .....	27
1.5.3 Neurotransmissão e contração muscular em baratas .....	28
1.5.4 Sistema colinérgico .....	29
1.5.5 Sistema dopaminérgico .....	30
1.5.6 Sistema octopaminérgico .....	31
1.5.7 Sistema cardiovascular de baratas .....	31
2. Objetivo .....	32
2.1 Objetivos específicos .....	32
3. Material e Métodos .....	33
3.1 Animais .....	33
3.2 Drogas usadas.....	33
3.3 Solução salina.....	34
3.4 Dissolução das drogas.....	34
3.5 Determinação da DL50 .....	34
3.6 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase .....	35
3.7 Preparação coração semi-isolado.....	35
3.8 Ensaios eletromiográficos .....	37
3.9 Atividade de <i>grooming</i> .....	38
3.10 Análise estatística .....	39
4. Resultados .....	40
4.1 Determinação da DL50 .....	40
4.2 Inibição da atividade da acetilcolinesterase pela JBU .....	40

4.3 Efeito da JBU sobre a frequência cardíaca de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	42
4.4 Efeito bloqueador neuromuscular induzido pela JBU em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	45
4.5 Efeito bloqueador neuromuscular induzido pela acetilcolina em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	47
4.6 Inibição do bloqueio neuromuscular induzido pela JBU pelo tratamento prévio com bicuculina em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	49
4.7 Relação entre eicosanoides e o bloqueio neuromuscular induzido pela JBU em preparação <i>in vivo</i> nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	53
4.8 Modulação da atividade de <i>grooming</i> pela urease de <i>Canavalia ensiformis</i> .....	55
4.9 Modulação da atividade de <i>grooming</i> pela octopamina e fentolamina em baratas da espécie <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	57
4.10 Ausência de modulação da atividade de <i>grooming</i> pela hidroxilamina em baratas da espécie <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	60
5. Discussão.....	61
6. Conclusão .....	65
7. Perspectivas futuras.....	66
8. Referências bibliográficas .....	67



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Agentes Inseticidas

O Brasil é um país com muitas peculiaridades e diferenças climáticas e geográficas, abrigando uma diversidade gigantesca de espécies de organismos vivos, como plantas e insetos. Além das espécies nativas, muitas outras foram introduzidas no país por colonizadores e imigrantes, trazendo junto delas espécies exóticas de insetos predadores. Durante muitas décadas o Brasil teve sua economia baseada no setor primário de produção e, atualmente, encontra-se em grande destaque entre os países responsáveis pelo abastecimento mundial de cereais, frutas e outros produtos de origem vegetal sendo, portanto, o controle de pragas, um desafio que persiste e tem se agravado ano após ano (VIEGAS JR, 2003).

Os inseticidas, em geral, são compostos químicos, podendo ser estes de origem natural ou sintética, usados no controle de insetos-praga (Revisado por VIEGAS JR, 2003). São substâncias que possuem a capacidade de atrair, repelir ou matar insetos alvo, sendo o seu uso conhecido já na antiguidade, quando extratos de plantas eram usados por meio de fumigação ou aplicação direta para manter os cereais livres de insetos-praga (ADDOR, 1994; CASIDA & QUISTAD, 1998; THACKER, 2002). 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 à necessidade de aumento da produção de alimentos com baixo custo. Por outro lado, se no início a ideia do uso de inseticidas químicos parecia interessante do ponto de vista econômico, a sua ampla toxicidade tornou-se um problema. Devido a baixa seletividade desses compostos, insetos benéficos como abelhas e aqueles não-praga também estão suscetíveis aos seus efeitos. Além disso, a baixa complexidade de suas moléculas, bem como o alto poder residual, levaram a ocorrência de fenômenos de resistência precoce dos insetos-praga e um aumento do acúmulo de xenobióticos em ecossistemas (VIEGAS JR, 2003).

Dessa forma, o estudo de produtos naturais com potencial inseticida é de extrema importância devido à necessidade de aumento da produção de alimentos com responsabilidade ambiental (ROEL, 2001).

A toxicidade de uma substância química sobre insetos não a qualifica necessariamente como um inseticida. Diversas propriedades devem estar ligadas à sua atividade, como por exemplo, sua eficácia mesmo em baixas concentrações, ausência de toxicidade frente a mamíferos e demais animais superiores, ausência de fitotoxicidade, fácil obtenção, manipulação e aplicação, viabilidade econômica e não ser cumulativo no tecido adiposo humano (MARICONI, 1963; ADDOR, 1994).

A grande maioria dos inseticidas afeta de alguma forma um dos quatro sistemas biológicos em insetos. Sendo estes o sistema endócrino, o sistema nervoso, a reciclagem de cutícula e o balanço de água (VALLES & KOEHLER, 2011). O sistema nervoso é um dos mais importantes, podendo levar a alterações do comportamento, tais como padrões de alimentação (NICOLAUS & LEE, 1999), forrageamento (GUEZ *et al.*, 2005), reprodução (DELPUECH *et al.*, 2005) migração e termorregulação (GRUE *et al.*, 1997), entre outros. Dessa forma, as moléculas alvos mais comuns dos inseticidas neurotóxicos são os canais de sódio, os receptores GABA, as enzimas colinesterases, os receptores nicotínicos de acetilcolina, os receptores de glutamato e os receptores de octopamina (RAYMOND-DELPECH *et al.*, 2005).

## 1.2 Atividade inseticida das ureases

Quando administradas por via oral, ureases de *C. ensiformis*, CNTX e JBU, assim como a urease de soja, SBU, apresentam 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 (pepcanatox) quando a proteína é hidrolisada por essas enzimas ácidas (CARLINI *et al.*, 1997; FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Como exemplo de insetos praga sensíveis a essas proteínas podemos citar o

caruncho do feijão de corda (*Callosobruchus maculatus*), o percevejo verde da soja (*Nezara viridula*) e o percevejo manchador do algodão (*Dysdercus peruvianus*) (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; STANISÇUASKI *et al.*, 2005). O barbeiro *Rhodnius prolixus*, um dos vetores da doença de Chagas, também é sensível aos efeitos das ureases (CARLINI *et al.*, 1997).

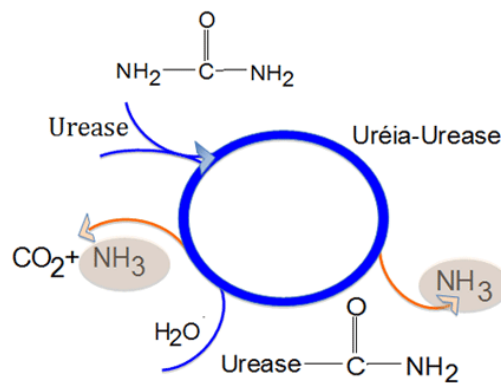
O mecanismo de ação inseticida das ureases ou peptídeos derivados ainda não se encontra completamente elucidado. Já foi demonstrado que JBU reduz a diurese de *R. prolixus* após alimentação, sugerindo um efeito no balanço de água e íons na célula (STANISCUASKI *et al.*, 2009).

No modelo experimental de *Nauphoeta cinerea*, os estudos com JBU não são conhecidos.

### 1.3 Ureases

Devido ao supra exposto, as ureases tornam-se candidatos em potencial ao desenvolvimento de agentes entomotóxicos de origem natural, pelo seu amplo espectro e baixa toxicidade para mamíferos quando administrados por via oral (STANIÇUASKI & CARLINI, 2012).

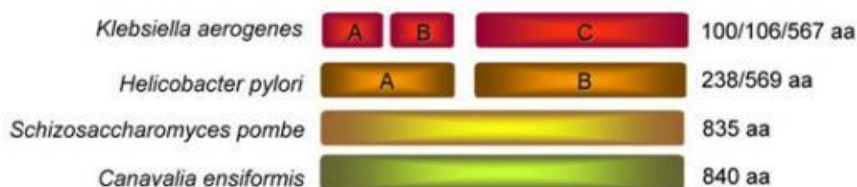
Ureases (EC 3.5.1.5; amidohidrolases de uréia), são enzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise da ureia formando amônia e dióxido de carbono (Figura 1), tem sido isoladas de uma ampla variedade de organismos, incluindo fungos, bactérias e plantas (DIXON *et al.*, 1975; MOBLEY & HAURINGER, 1989; SIRKO & BRODZIK, 2000; FOLLMER, 2008). Independente da sua função enzimática, ureases apresentam várias atividades biológicas, como por exemplo, ação inseticida e antifúngica, além de efeito secretagogo em diferentes modelos celulares (FOLLMER *et al.*, 2004; FOLLMER *et al.*, 2001; STANISCUASKI & CARLINI, 2012).



**Figura 1.** Reação de hidrólise da ureia catalisada pela urease. (Fonte: LAPROTOX)

As sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis*, conhecida popularmente como feijão-de-porco (*Jack bean*), são fontes de isoformas de urease que contribuem para a resistência da planta ao ataque de insetos. A urease majoritária de *C. ensiformis* foi a primeira enzima a ser cristalizada e a primeira enzima níquel-dependente caracterizada (DIXON *et al.*, 1975).

Enquanto ureases de fungos e de plantas são proteínas homo-oligoméricas com subunidades de ~90kDa, ureases bacterianas são multímeros de duas ou três subunidades (Figura 2) (MOBLEY *et al.*, 1995). A alta similaridade de sequência de todas as ureases indica que elas são variantes de uma mesma proteína ancestral e provavelmente possuem similaridades em suas estruturas terciárias e em seus mecanismos catalíticos (MOBLEY *et al.*, 1995; SIRKO & BRODZIK, 2000).



**Figura 2.** Organização estrutural de ureases. As ureases bacterianas geralmente apresentam três tipos de subunidades (ex. *K. aerogenes*) que se alinham 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 sua cadeia A uma "fusão" das cadeias menores de ureases de outras bactérias. Em fungos, (*S. pombe*) e plantas (*C. ensiformis*), as ureases são formadas por um único tipo de cadeia polipeptídica. (Fonte: MOBLEY *et al.*, 1995)

### 1.3.1 Jack Bean Urease (JBU)

A *Canavalia ensiformis* (*Jack bean*) é uma leguminosa usada como adubo verde e de grande resistência a insetos. É também uma fonte de várias proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, tais como a lectina, concavalina A (SUMNER & HOWELL, 1933), inibidores de tripsina (UBATUBA, 1955), urease e a canatoxina (CNTX) (CARLINI & GUIMARÃES, 1981). A isoforma mais abundante de urease da planta *C. ensiformis*, chamada de JBURE-I ou simplesmente de JBU (*Jack Bean Urease*) é uma proteína histórica, que trouxe importantes contribuições para a bioquímica e o estudo das enzimas (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012).

A urease de *C. ensiformis* (JBU) foi a primeira enzima a ser cristalizada (SUMNER, 1926), contribuindo para a demonstração da natureza proteinácea das enzimas (SIRKO & BRODZIK, 2000; FOLLMER, 2008).

A cadeia polipeptídica da JBU é composta por 840 aminoácidos, com massa molecular de 90.770 Da. Sua forma mínima apresentando 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 (POSTAL *et al.*, 2012). Em seu sítio ativo a JBU apresenta dois íons  $Ni^{2+}$ , sendo cada um deles coordenado por dois resíduos de histidinas e por uma lisina carboxilada compartilhada por ambos (REAL-GUERRA *et al.*, 2013).

Estudos anteriores mostram que a JBU possui ação direta sobre o sistema digestório de insetos, diminuindo o transporte de fluídos através do epitélio do estômago. Além disso, promove alteração na frequência e amplitude das contrações do intestino posterior além de alterar o tônus basal do músculo (STANISÇUASKI, 2007). A urease de *C. ensiformis* também é conhecida por permeabilizar a membrana, formando poros de canais (PIOVESAN *et al.*, 2014).

## 1.4 Baratas como Modelo Experimental

As baratas são insetos nos quais a maioria dos sistemas fisiológicos é carente de especialização. Se por um lado, a falta de especialização pode ser um entrave para a comparação com alguns sistemas biológicos animais, do ponto de vista da neurotoxicologia torna-se um importante instrumento na investigação do mecanismo de ação de compostos químicos com atividade tóxica sobre o sistema nervoso (Figura 3) (STANKIEWICZ *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Cordão nervoso ventral de barata. O Sistema Nervoso de insetos é formado por um cordão nervoso ventral organizado em gânglios. (Fonte: STANKIEWICZ *et al.*, 2012) (Modificações: T.C. Freitas)

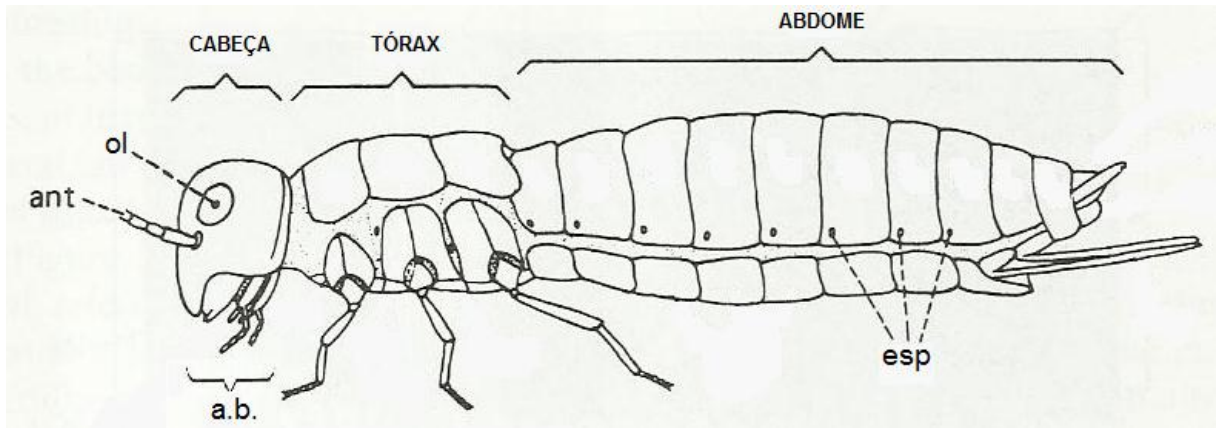
Uma grande vantagem do uso de invertebrados em experimentos de toxicologia é a possibilidade de investigar várias funções do sistema nervoso sem a necessidade de autorização dos comitês de ética em pesquisa com animais. Além disso, por meio de ensaios laboratoriais corriqueiros como os bioquímicos (determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase), ensaios comportamentais (como a medida da atividade de *grooming* - ato de limpeza de antenas e pernas) e ensaios eletrofisiológicos, como preparação neuromuscular, pode-se determinar vias e rotas de sinalização celular *in vivo* e *in vitro* sobre diferentes sistemas neurofisiológicos (OSBOURE, 1996). No caso dos bioinseticidas, muitos deles têm como alvo principal o sistema nervoso, o que facilita, de certa forma, a descrição do seu mecanismo de ação, bem como evidenciar o grau de seletividade (STANKIEWICZ *et al.*, 2012). Como exemplo, podemos citar os piretroides naturais e

sintéticos, que atuam por causar uma ativação persistente dos canais de sódio na junção neuromuscular, induzindo uma despolarização persistente das membranas, sendo esta letal para o inseto (COSTA, 2008; SODERLUND, 2012).

Outros agentes, como por exemplo, algumas toxinas de venenos animais atuam através do sistema nervoso central do inseto, ocasionando um aumento na liberação do neurotransmissor dopamina, induzindo efeitos como letargia e diminuição da locomoção (WEISEL-EICHLER *et al.*, 1999; LIBERSAT, 2003). Além desses mecanismos celulares, também tem sido descritos aspectos bioquímicos na intoxicação induzida por agentes inseticidas naturais (BULLANGPOTI *et al.*, 2006), por exemplo, a inibição da síntese de ATP nas mitocôndrias (YAMAMOTO e KUROKAWA, 1970; STOREY, 1981) ou ainda, inibição da enzima acetilcolinesterase, causando o acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica e, com isso, mantendo a membrana pós-sináptica em constante estado de estimulação, culminando na morte do inseto (KOSTYUKOVSKY *et al.*, 2002; MILLS *et al.*, 2004; SHAYYA & RAFAELI, 2007).

## **1.5 Anatomia e fisiologia dos insetos**

Baratas são mais ou menos alongadas e possuem formato cilíndrico sendo bilateralmente simétrico (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2005). A cavidade corporal, também chamada de hemocele, é preenchida por hemolinfa, e é revestido pela endoderme e ectoderme. A hemolinfa é responsável por transmitir os nutrientes, remover os metabólitos além de outras inúmeras funções (GULLAN & CRANSTON, 2005). O corpo é dividido numa série de segmentos, os metâmeros, e estes são agrupados em três regiões distintas: cabeça, tórax e abdome (Figura 4) (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2005).



**Figura 4.** Estrutura geral de um inseto. *ant*, antena; *ol*, olho composto; *a.b.*, aparelho bucal; *esp*, espiráculos. (Fonte: TRIPLEHORN & JOHNSON, 2005)

As funções primárias da cabeça são a percepção sensorial, a integração neural, e a coleta de alimentos. O tórax suporta as pernas e as asas, enquanto o abdome abriga a maioria dos órgãos viscerais, incluindo componentes do aparelho digestório, excretor e sistema reprodutor (TRIPLEHORN & JOHNSON, 2005).

O sistema motor, sensorial e todos os processos fisiológicos são controlados pelo sistema nervoso juntamente com os hormônios. O cérebro e o cordão nervoso ventral são facilmente visíveis na dissecação do inseto, porém a maioria dos centros nervosos, sítios de neurosecreção, muitas das fibras nervosas, músculos e outros tecidos não podem ser visualizados a olho nu (GULLAN & CRANSTON, 2005).

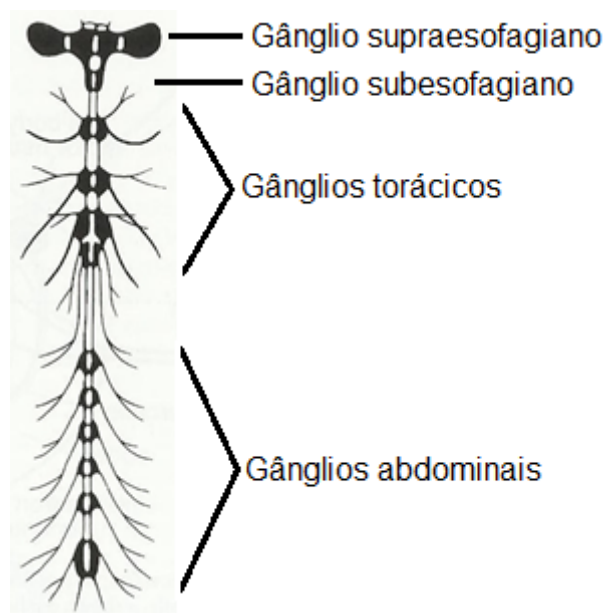
### 1.5.1 Sistema nervoso de insetos

O sistema nervoso de insetos é complexo e integra um conjunto diversificado de aparelhos sensoriais externos e informações fisiológicas. Em comum com outros animais, o componente principal é o neurônio, composto pelo corpo celular e duas projeções, 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, estas estimulam ou inibem neurônios efetores ou músculos. Em comum com os vertebrados, os principais neurotransmissores incluem a acetilcolina e catecolaminas assim como a dopamina (GULLAN & CRANSTON, 2005).

Os corpos celulares dos interneurônios e neurônios motores são agregados com as fibras que interligam todos os tipos de células nervosas formando centros nervosos chamados gânglios (GULLAN & CRANSTON, 2005). Caracteristicamente, 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 (Figura 5) (RANDALL *et al.*, 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 (Figura 6) (GULLAN & CRANSTON, 2005). Nenhum dos gânglios contém um centro absolutamente vital, razão pela qual um inseto decapitado ainda pode caminhar (Revisado por OSBOURE, 1996).



**Figura 5.** Sistema nervoso de baratas. Arranjo de gânglios formando o cordão nervoso ventral composto, em baratas, pelo gânglio supraesofágico, o gânglio subesofágico, três gânglios torácicos e seis abdominais. (Fonte: GULLAN & CRANSTON, 2005)



salivares, músculos bucais, túbulos de Malpighi e cutícula (SETTEMBRINI & VILLAR, 2004).

FMRFamida são peptídeos pertencentes a uma família encontrada no sistema nervoso, central e periférico, com funções estimuladoras na contração muscular, principalmente do coração e vísceras (GREENBERG & PRICE, 1992).

O óxido nítrico é um neurotransmissor difusível no cérebro dos insetos, que leva a formação de GMPc nas células alvo. Participa de muitos processos, dentre eles: olfato, visão, desenvolvimento, sensor de oxigênio, associado à locomoção e a formação de memória. Também está associado às glândulas salivares (STANISQUASKI, 2007).

O sistema nervoso periférico desses animais é composto por todos os axônios dos neurônios motores que irradiam para os músculos dos gânglios do SNC e sistema nervoso estomodeal. Compreende ainda os neurônios sensoriais das estruturas sensitivas cuticulares (os órgãos dos sentidos) que recebem estímulos mecânicos, químicos, térmicos e visuais do ambiente (GULLAN & CRANSTON, 2005).

### **1.5.2 Junção neuromuscular**

A junção neuromuscular (JNM) é uma estrutura complexa que serve para comunicar de forma eficiente o impulso elétrico dos neurônios motores com o músculo esquelético. As características musculares e da arquitetura da JNM estão focadas na comunicação entre nervo e músculo (HUGHES *et al.*, 2006).

A junção neuromuscular de baratas se vale do neurotransmissor glutamato, para produzir contração muscular pela ativação dos receptores de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (HUBER *et al.*, 1990). Ao longo dos anos foram realizados inúmeros estudos para avaliar a evidência de que o glutamato age como um neurotransmissor na junção neuromuscular de insetos. Essa evidência foi confirmada pela demonstração de que o receptor de glutamato está presente na placa motora de insetos. O glutamato é liberado a partir dos terminais nervosos do

SNP, o que relaciona sua semelhança com a acetilcolina na junção neuromuscular de mamíferos (FONNUN, 1984). Além do glutamato, a junção neuromuscular de insetos se vale do neurotransmissor ácido-gama aminobutírico (GABA), do qual receptores não estão confinados apenas na região da junção, mas parecem estar espalhados por toda a fibra muscular (CULL-CANDY & MILEDI, 1981). O papel fisiológico dos receptores de GABA<sub>A</sub> em insetos envolve a abertura de canais de cloreto. Tanto na junção neuromuscular quanto no sistema nervoso central, os receptores de GABA parecem estar envolvidos na sincronização de respostas excitatórias envolvendo o padrão central de geração (HUBER *et al.*, 1990). Portanto, a junção neuromuscular de insetos tem sido extensivamente estudada em termos da natureza dos receptores e canais iônicos envolvidos, assim como na modulação das respostas contráteis dos músculos fásicos (OSBOURE, 1996). Por essa razão, as baratas são reconhecidas como modelos de extrema utilidade em ensaios de neurobiologia (HUBER *et al.*, 1990).

### **1.5.3 Neurotransmissão e contração muscular em baratas**

A neurotransmissão é um processo que envolve vários estágios e é regulado por um grande número de moléculas ativas. Essas moléculas estão contidas em vesículas que são liberadas em resposta aos estímulos específicos a partir de diferentes tipos de células neuronais ou afins. A excitação regulada é a base da neurotransmissão e inclui a secreção de neurotransmissores a partir de neurônios. Como resultado ocorre a liberação de neurotransmissores rápidos, tais como aminoácidos e acetilcolina, a partir de sinapses centrais e periféricas. Também são liberados polipeptídios relativamente lentos que atuam em neurônios centrais e periféricos e em células neuroendócrinas (LANGLEY & GRANT, 1997).

No sistema nervoso, os sinais elétricos são responsáveis por controlar a contração muscular, a secreção de hormônios, as sensações provenientes do ambiente, o processamento de informações no cérebro e sua propagação do cérebro para os tecidos periféricos (YU & CATTERALL, 2004).

As células nervosas e musculares são eletricamente excitáveis devido à presença em sua membrana superficial de canais iônicos sensíveis à voltagem, sendo estes seletivos para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ . Devido à voltagem da membrana, esses canais podem se abrir ou fechar, possibilitando assim um movimento rápido de íons apropriados, em função de seus gradientes de concentração. Dessa forma, correntes iônicas são criadas em fluxo para dentro ou para fora da célula despolarizando ou hiperpolarizando a membrana. Os canais de sódio, potássio e cálcio são responsáveis pelos sinais elétricos, necessários para a geração e condução do potencial de ação (MARCUSSE *et al.*, 2011).

Os potenciais de ação são conduzidos pelo axônio até o terminal nervoso causando despolarização da terminação pré-sináptica que, por sua vez, induz a abertura transitória de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem. O  $\text{Ca}^{2+}$  do fluido intersticial flui a favor do gradiente de potencial eletroquímico, para dentro da terminação do axônio. O aumento da concentração interna de  $\text{Ca}^{2+}$  induz a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática e a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica por exocitose. Com isso, o neurotransmissor se difunde através da fenda sináptica e se liga aos receptores específicos na superfície externa do neurônio seguinte ou de células efetoras tais como as de músculo esquelético (MARCUSSE *et al.*, 2011). Pelo supra exposto, preparações sinápticas em insetos oferecem excelentes modelos experimentais para estudos de múltiplos transmissores e suas ações conjuntas nos cruzamentos neuromusculares identificadas de forma exclusiva (O'SHEA *et al.*, 1985).

#### **1.5.4 Sistema colinérgico**

Em relação ao sistema nervoso colinérgico, que faz uso da acetilcolina como neurotransmissor, a maioria dos elementos necessários para o funcionamento das sinapses desse sistema já foram identificadas em insetos (KERKUT *et al.*, 1969). Receptores nicotínicos, muscarínicos, e mistos nicotínicos/muscarínicos têm sido encontrados no tecido nervoso de várias espécies de insetos, inclusive em baratas

(BREER & SATTELLE, 1987). Sinapses colinérgicas no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) de insetos parecem possuir autoreceptores muscarínicos, estes, localizados sobre o nervo terminal pré-sináptico, onde ocorre o controle da liberação de acetilcolina (Revisado por OSBOURE, 1996).

A acetilcolina encontra-se localizada principalmente nos axônios, dendritos dos neurônios do SNC e, em menor quantidade, nos gânglios ao longo do cordão nervoso. Os receptores muscarínicos estão localizados principalmente no SNC, SNP e sistema estomogástrico. Já os receptores mistos (nicotínicos e muscarínicos) encontram-se no SNC (Revisado por OSBOURE, 1996).

### **1.5.5 Sistema dopaminérgico**

A dopamina e seus receptores encontram-se amplamente distribuídos por todo o sistema nervoso dos insetos (Revisado por OSBOURE, 1996).

A dopamina possui um importante papel na regulação do comportamento motor dos insetos (MUSTARD *et al.*, 2010). Podendo, assim, agir em vários locais para influenciar o comportamento locomotor, afetando a informação sensorial na periferia, a regulação de geradores de padrão central e/ou de processamento da informação no cérebro (MUSTARD *et al.*, 2010).

O *grooming*, cuja função é a de limpeza da superfície do corpo em insetos, pode também apresentar outras funções, tais como sinalização social, comportamento de corte, atividade de deslocamento e de excitação (SPRUIJT *et al.*, 1992). Esse padrão de comportamento é provavelmente modulado pela estimulação dos receptores da dopamina no SNC da barata (WEISEL-EICHLER *et al.*, 1999; LIBERSAT *et al.*, 1999).

### **1.5.6 Sistema octopaminérgico**

A octopamina, uma monoamina biogênica estruturalmente relacionada com a noradrenalina, atua como um neurohormônio, neuromodulador e neurotransmissor em invertebrados (ROEDER, 1999). Encontra-se presente no sistema nervoso ganglionar e central dos insetos (OSBOURE, 1996).

A octopamina é responsável pela modulação de quase todos os processos fisiológicos em invertebrados estudados até o momento. Dentre estes, destacam-se os relacionados aos órgãos dos sentidos, ao sistema nervoso periférico e aos processos no sistema nervoso central. Todos os receptores de octopamina pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (ROEDER, 1999).

Diferente dos mamíferos, os neurônios octopaminérgicos são espacialmente separados dos neurônios catecolaminérgicos (GUEZ *et al.*, 2005).

### **1.5.7 Sistema cardiovascular de baratas**

O coração de barata tem sido objeto de estudo em bioensaios de agentes farmacológicos e hormônios. É composto por 12 câmaras interligadas onde a hemolinfa penetra através de doze pares de aberturas (CORNWELL, 1968). As pulsações do coração são geradas primariamente por contrações da parede muscular, possivelmente assistida por músculos alares. A contração do coração de baratas é caracterizada por três fases: sístole (contração), diástole (relaxamento) e diástase (período de repouso) e é modulada pela acetilcolina e octopamina (COLLINS & MILLER, 1977).

## 2. OBJETIVO

- Identificar o mecanismo de ação da JBU sobre diferentes sistemas em preparações *in vivo* e *in vitro* de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Investigar o potencial bioinseticida da JBU em modelo experimental de *N. cinerea*;
- Avaliar o efeito da JBU na cinética de inibição da enzima acetilcolinesterase;
- Determinar o mecanismo de neurotoxicidade da JBU sobre o sistema nervoso central por meio da técnica de *grooming* em baratas;
- Determinar o mecanismo de ação sobre o sistema nervoso periférico, usando a preparação neuromuscular de *N. cinerea in vivo*;
- Identificar a ação da JBU sobre o sistema cardiovascular usando a preparação de coração semi-isolado de *N. cinerea*;
- Identificar os receptores potenciais envolvidos na modulação do sistema nervoso de *N. cinerea* por meio do uso de instrumentos farmacológicos.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se 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 sob condições de laboratório com temperatura controlada (22-25°C), e com água e comida *ad libitum*. Os experimentos foram realizados com temperatura ambiente controlada (22-25°C).



**Figura 7.** Barata da espécie *Nauphoeta cinerea*. (Fonte: autor)

#### 3.2 Drogas usadas

A urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) foi obtida da empresa Sigma-Aldrich Brasil. As demais drogas foram do mais alto grau de pureza obtidos de empresas como a Sigma-Aldrich Brasil, Merck e Biorad.

### 3.3 Solução salina

A salina para insetos foi preparada com a seguinte composição: NaCl 150mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 10mM e Tris 10mM em adição de água ultra pura até o volume de 200ml, com pH 6,8 ajustado com NaOH. O pH foi medido 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 Determinação da DL50

O ensaio para a determinação da DL50 de JBU em *Nauphoeta cinerea* foi realizado conforme descrito por STURMER *et al.* (2014). Várias concentrações da JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) dissolvidas em Tampão Fosfato foram injetadas entre o terceiro e o quarto segmentos abdominais da barata. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e utilizando-se dez animais para cada dose. As baratas injetadas com a JBU foram mantidas sob temperatura controlada (22-25°C) durante 24 horas após o tratamento com água e ração *ad libitum*.

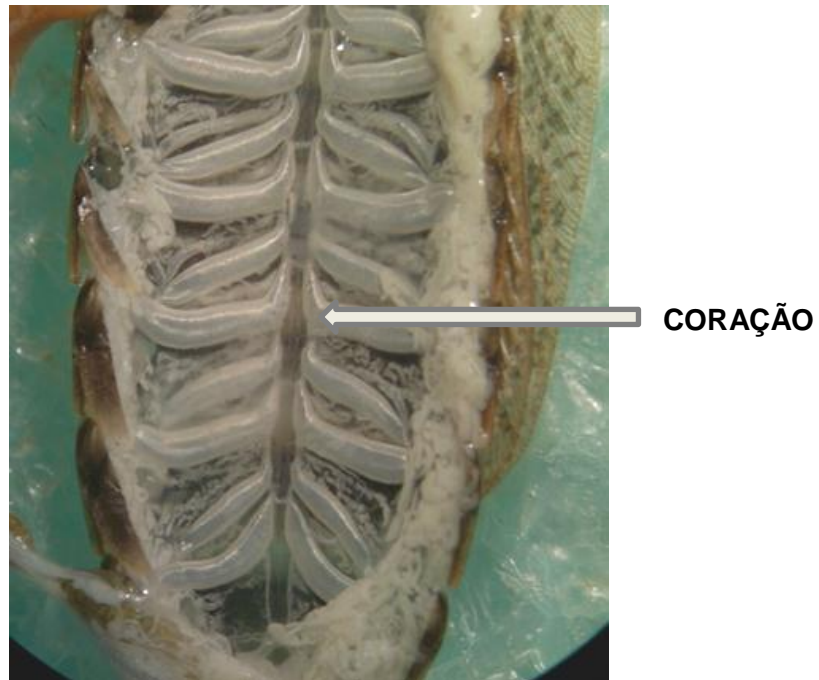
### 3.6 Determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase

A inibição *in vitro* da AChE foi avaliada de acordo com os ensaios descritos por STURMER *et al.* (2014). Dessa forma, cinco baratas foram injetadas com JB U (1.5, 3 e 6µg/g de animal) seis horas antes da análise da acetilcolinesterase. As baratas foram então anestesiadas por resfriamento (-20°C) e seus cérebros removidos. O material foi misturado com 600µL de Tampão Kpi de pH 7,0 em micro tubos com um sistema de agitação de esferas de aço (TissueLyser II). Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas (500 rpm / 5 minutos / 4°C). Logo em seguida, 400µL do sobrenadante foram retirados e isolado em recipiente estéril, sendo mantido no gelo. Para a análise da acetilcolinesterase, utilizou-se 50µL de cada amostra, juntamente com 50µL de DTNB 5mM, 500µL de Kpi 0,1M (pH 8,0) e 25µL de acetilcolina. A reação foi medida após 60 segundos a 412nm usando um Espectrofotômetro UV-Visível (Modelo Evolution 60S, Thermo Scientific, New Hampshire, EUA) e analisados pelo software Vision Lite (Thermo Scientific). Todas as análises foram feitas em triplicatas.

### 3.7 Preparação coração semi-isolado

A preparação de coração semi-isolado de baratas (BAUMANN E GERSCH, 1982) adaptado por RODRIGUES *et al.* (2012) foi utilizada para avaliar os efeitos farmacológicos induzidos pela JBU no sistema cardiovascular de baratas. Os animais foram anestesiados por resfriamento (-20°C/7min) e imobilizados em uma placa de dissecação usando alfinetes entomológicos em decúbito dorsal. As laterais do abdome foram cortadas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e uma pinça entomológica removendo a cutícula abdominal, expondo assim as vísceras, as quais foram cuidadosamente afastadas para que o coração fosse exposto (Figura 8). Suas pernas também foram removidas para que não atrapalhassem a contabilização dos batimentos cardíacos. O coração foi banhado com solução salina (NaCl 150mM,

CaCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 10mM e Tris 10mM, pH 6,8 ajustado com NaOH) em temperatura ambiente. Após os 5 minutos iniciais para a estabilização da frequência cardíaca, as diferentes concentrações de JBU (1,5, 3 e 6µg/g animal) e as drogas testadas foram aplicadas sobre o coração em um volume final de 100µL/animal. Os batimentos cardíacos foram monitorados através de um microscópio estereoscópio (Olympus, Damstat, Alemanha) durante 30 minutos. Após esse período, a preparação foi lavada com solução salina e monitorada por mais 5 minutos para verificar se haveria recobro da frequência cardíaca. Para cada dose de reagente testada foi usado 9 animais (n=9).

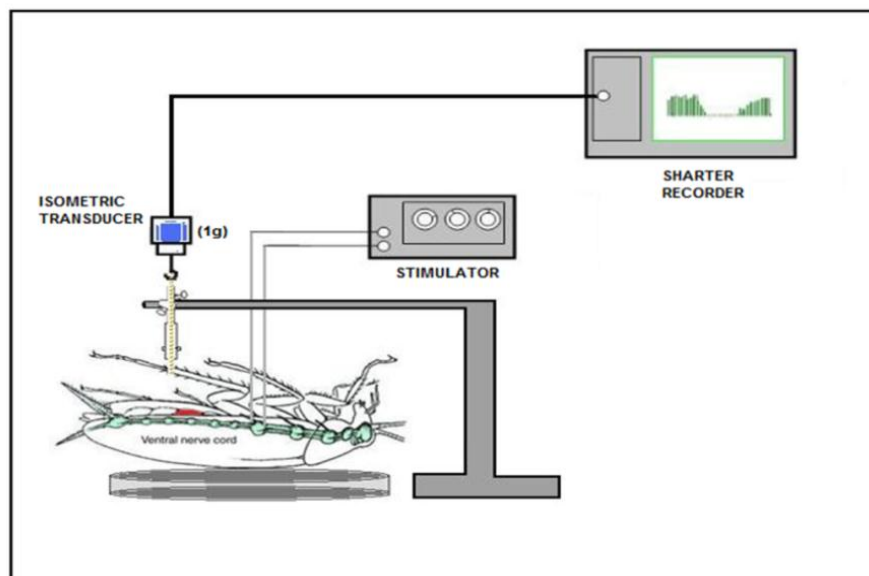


**Figura 8.** Coração da barata. (Fonte: Fabíola Duarte)

### 3.8 Ensaios eletromiográficos

#### Preparação nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de barata *in vivo*

Para analisar a neurotoxicidade periférica, foi utilizada a preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de baratas (MARTIMELLI *et al.*, 2014) (Figura 9). Os animais foram anestesiados por resfriamento ( $-20^{\circ}\text{C}/7\text{min}$ ), e fixados em decúbito dorsal, em placa de dissecação usando alfinetes entomológicos. A perna esquerda foi então amarrada na altura da tíbia com uma linha de sutura odontológica e conectada a um transdutor de força (1g) (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil). A quitina da região metatorácica foi removida e o Nervo 5 foi exposto. Ali foi inserido um eletrodo bipolar para fornecer estímulos elétricos. Os tratamentos foram injetados utilizando uma seringa de Hamilton em um volume máximo de  $20\mu\text{L}$ . O nervo foi estimulado a  $0.5\text{Hz}/5\text{ms}$ , com o dobro do limiar durante 120 minutos. A força de contração foi registrada, digitalizada e recuperada usando um computador baseado no software AQCAD (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil). Os dados foram posteriormente analisados usando o software ANCAD (AVS Instrumentos, São Carlos, SP, Brasil).



**Figura 9.** Setup para registros *in vivo* de preparações neuromusculares. (Fonte: Modificado de Dempster, 1988)

### 3.9 Atividade de *grooming*

A atividade de *grooming* foi avaliada essencialmente como descrito por LIBERSAT (2003). Para isso, os animais foram injetados entre a terceira e a quarta porção abdominal, utilizando-se uma seringa Hamilton e o volume máximo de 20 $\mu$ L, com a droga a ser testada e colocados em uma arena circular (Open Field, Insight), usada em testes comportamentais (recipiente circular de 20cm de raio e 30cm de altura) (Figura 10). 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. Os animais nunca haviam estado no Open Field anteriormente e, portanto, era um ambiente novo em todos os casos. A temperatura no ambiente dos testes foi controlada (22-25°C). Os testes foram realizados no período entre 2-8 horas após o início do ciclo de luz.



**Figura 10.** Open Field (Fonte: Guilherme Camargo)

### 3.10 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” de 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 (Origin Lab Corporation, MA, EUA).

## 4. RESULTADOS

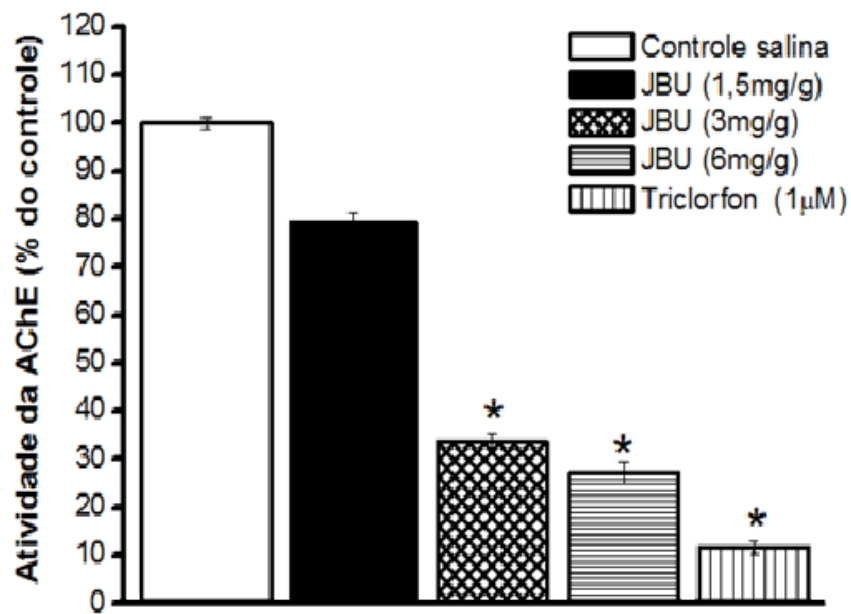
### 4.1 Determinação da DL50

Os ensaios para determinação da DL50 realizados com as doses de JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) não causaram nenhuma morte dos animais injetados, após 24h. Porém, constatou-se que os animais encontravam-se letárgicos, apresentando dificuldade na locomoção.

### 4.2 Inibição da atividade da acetilcolinesterase pela JBU

A análise da atividade da AChE em homogenatos de cérebro de baratas com a injeção de diferentes concentrações de JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) revelou uma inibição da enzima, sendo esta dose-dependente. Assim, a análise do grupo tratado com JBU 1.5µg/g de animal (n=3), apresentou um valor menor na atividade da enzima quando comparado com o controle salina (20±2%). Quando a concentração de 3µg/g de animal (n=3), houve uma diminuição da atividade da AChE para (65±2%). Com o aumento da concentração de JBU para 6µg/g de animal (n=3), houve um aumento da inibição da atividade da AChE para (75±3%) em comparação ao controle salina, podendo esta ser comparada com a inibição causada pelo Triclorfon, um inibidor já conhecido de AChE (Figura 11).

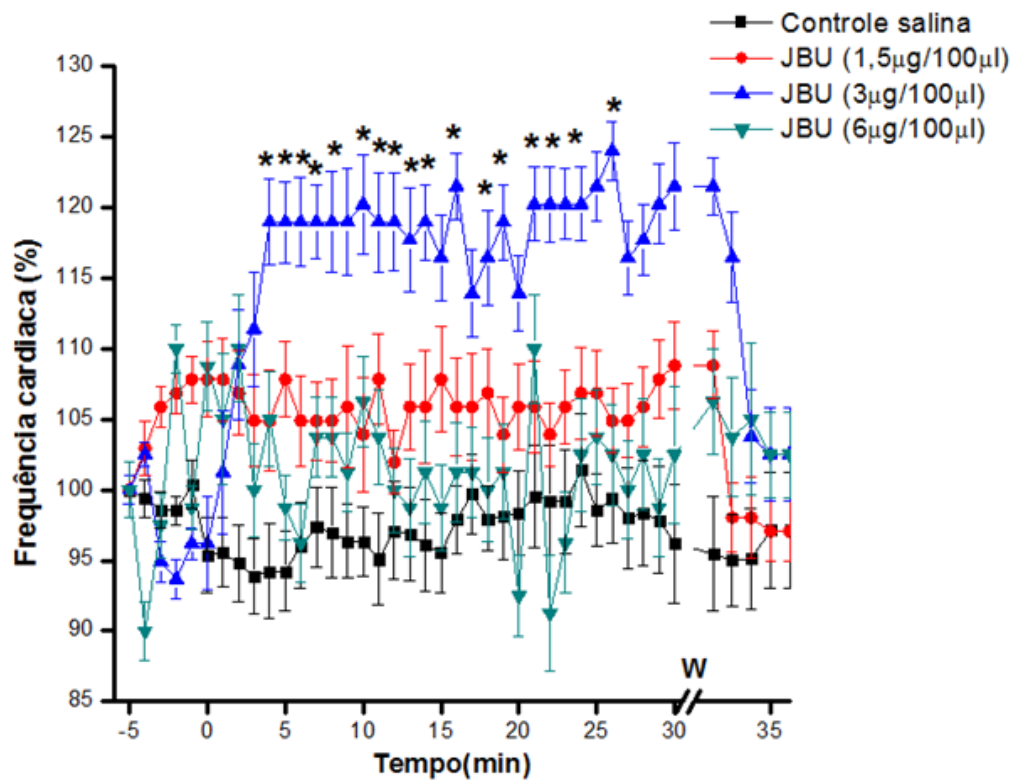




**Figura 11.** Efeito da JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em homogenato de cérebro de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada barra representa a média ± E.P.M. da porcentagem de inibição da acetilcolinesterase em relação ao controle salina. Foi usado o homogenato de cérebro de *N. cinerea* (n=3) após seis horas do tratamento com JBU.\*  $p < 0.05$  em comparação com o controle salina.

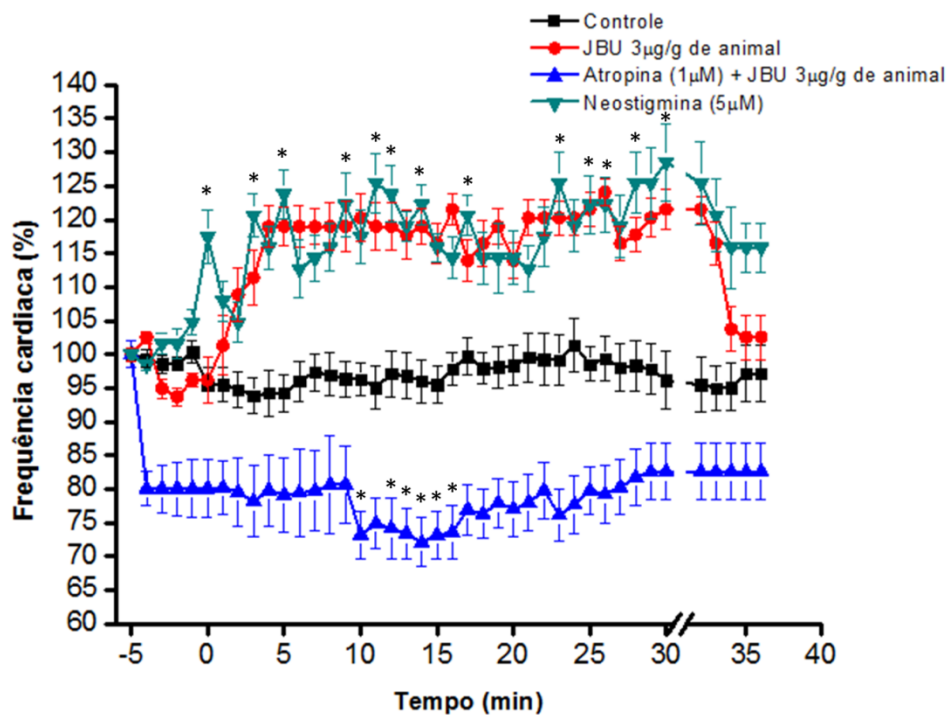
### 4.3 Efeito da JBU sobre a frequência cardíaca de *Nauphoeta cinerea*

Nos ensaios com a preparação coração semi-isolado de *Nauphoeta cinerea*, houve uma resposta tempo-dependente induzida pelas diferentes concentrações de JBU. Assim em preparações controle, sem a adição de nenhum tratamento a resposta cronotrópica foi de  $94 \pm 5$  bat./min. Quando a concentração menor de JBU ( $1.5 \mu\text{g/g}$  de animal) foi administrada ( $n=9$ ), esta causou uma pequena aceleração na frequência cardíaca da barata ( $105 \pm 3$  bat./min), porém, não foi significativa quando comparada ao controle. A JBU causou a aceleração da frequência cardíaca do animal de forma significativa, comparada com o controle, quando sua concentração intermediária ( $3 \mu\text{g/g}$  de animal) foi administrada ( $n=9$ ), chegando a  $125 \pm 3$  bat./min. Este efeito teve início logo após a aplicação da JBU sobre o coração, e atingiu seu pico em torno de 5min após a aplicação, mantendo-se durante os 30min de observação (Figura 12). Após a lavagem do coração com salina, esse efeito diminuiu, chegando a frequência cardíaca do início do experimento. A maior concentração de JBU ( $6 \mu\text{g/g}$  de animal) não teve efeito significativo sobre a frequência cardíaca do animal ( $100 \pm 3$  bat./min).



**Figura 12.** Efeito da JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinerea*. Gráfico da resposta cardíaca da barata frente ao tratamento com diferentes concentrações de JBU. Note o aumento da frequência cardíaca do animal com a administração da concentração intermediária de JBU. Cada ponto corresponde à média  $\pm$  erro-padrão. (n=9) \* p<0.05em relação ao controle salina.

Sabe-se que a frequência cardíaca de insetos é modulada positivamente por agentes colinérgicos. Assim, quando a neostigmina ( $5\mu\text{M}$ ), um composto anticolinesterásico, foi ensaiada sobre a preparação coração semi-isolado ( $n=9$ ) houve um aumento de 30% na frequência cardíaca dos animais (Figura 13). Esse efeito foi semelhante ao induzido pela JBU ( $6\mu\text{g}$  de animal). Nos ensaios utilizando a JBU ( $3\mu\text{g}$  de animal) com tratamento prévio de Atropina ( $1\mu\text{M}$ ), que é conhecida por ser um composto anticolinérgico, esta inibiu o aumento da frequência cardíaca induzido pela JBU (Figura 13).

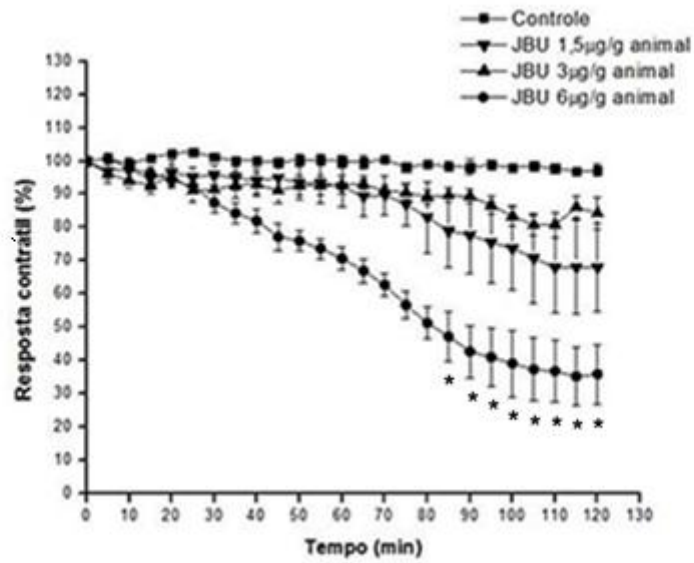


**Figura 13.** Efeito cronotrópico positivo induzido pela neostigmina ( $5\mu\text{M}$ ) sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinerea*. Comparação entre os efeitos da neostigmina e da JBU sobre o sistema cardiovascular de *N. cinerea*. Note que o pré-tratamento da preparação com atropina ( $5\mu\text{M}$ ) inibiu o efeito cronotrópico positivo da JBU. ( $n=9$ ) \*  $p < 0.05$  comparado com o controle salina.

#### **4.4 Efeito bloqueador neuromuscular induzido pela JBU em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea***

Para analisar os efeitos da JBU sobre o sistema nervoso periférico da barata foi utilizado a preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico. A administração de solução salina isolada no inseto não interferiu com respostas neuromusculares durante os 120min de registro (n=6) (Figura 14). A administração de JBU (1.5, 3 e 6µg/g de animal) induziu um bloqueio neuromuscular tempo-dependente durante os 120min de registro. Quando a dose mais baixa (1.5µg/g de animal) de JBU foi ensaiada, houve um bloqueio da força de contração muscular de 30±10% em 120min de registro (n=6). A administração de 3µg/g de JBU no animal induziu uma inibição de apenas 15±4% na força de contração muscular em 120min (n=6). A administração da maior concentração de JBU (6µg/g de animal) induziu o maior nível de bloqueio neuromuscular, chegando a 70±7% em 120min (n=6) (Figura 14).

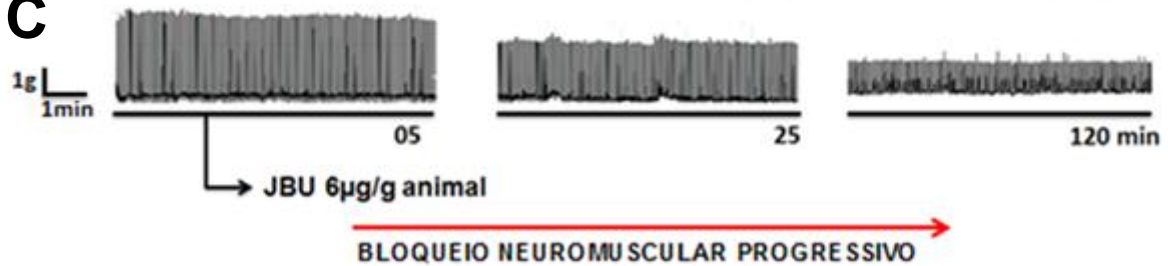
A



B



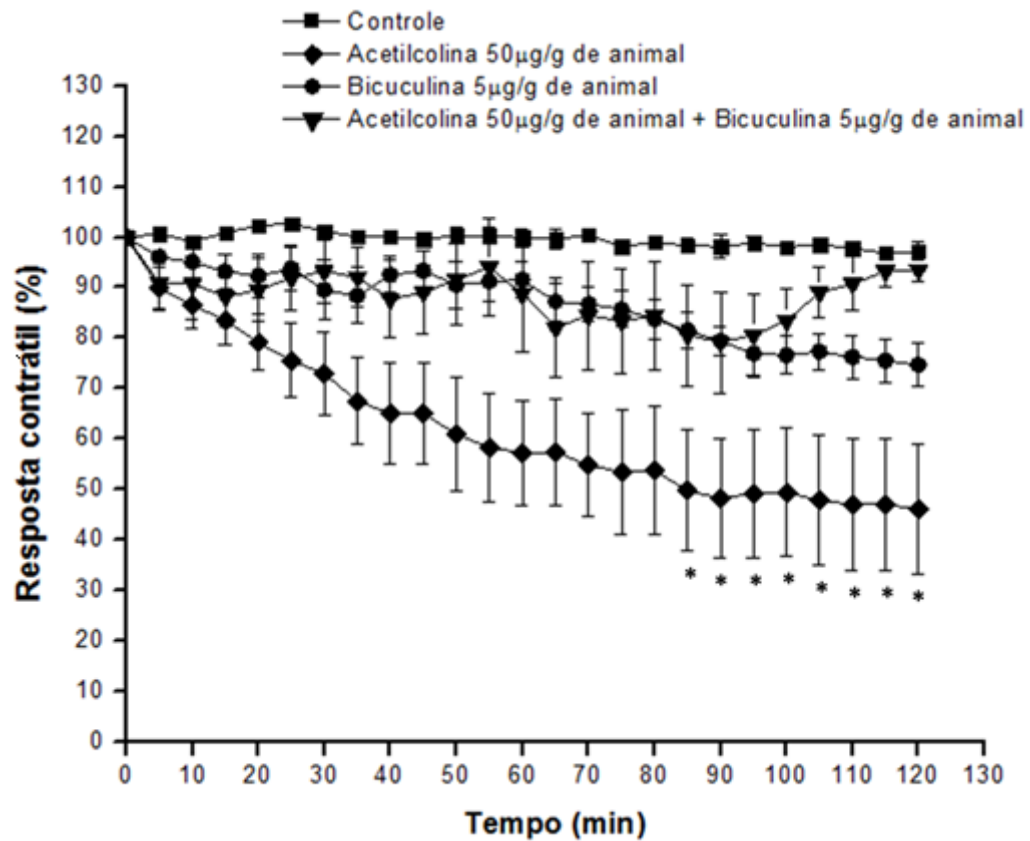
C



**Figura 14.** Atividade induzida pela JBU (1.5,3 e 6µg/g de animal) sobre a força de contração muscular em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. Em **A**, cada ponto corresponde a média  $\pm$  erro-padrão da porcentagem da força de contração muscular (n=6). Em **B**, registro representativo da contração muscular na ausência da JBU em preparação tratada com salina para insetos. Em **C**, registro representativo da contração muscular na presença de JBU (6µg/g de animal). \* p<0.05

#### **4.5 Efeito bloqueador neuromuscular induzido pela acetilcolina em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea***

Em insetos, a acetilcolina é um neurotransmissor presente nas regiões pré-sinápticas do cordão nervoso ventral. Como foi dito anteriormente na parte introdutória deste trabalho, a JBU possui uma atividade permeabilizante de membranas, o que poderia induzir a despolarização de nervos colinérgicos pré-ganglionares, aumentando as respostas neuromusculares inibitórias ou excitatórias. Para testar essa hipótese, foram realizados ensaios utilizando acetilcolina (50µg/g de animal) (n=6) e a bicuculina (5µg/g de animal), um inibidor dos receptores GABA (n=6) (Figura 15) em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de barata tratadas com JBU. A acetilcolina (50µg/g de animal) induziu um efeito de bloqueio neuromuscular de  $55\pm 12\%$  (Figura 15), enquanto que a bicuculina (5µg/g de animal) não alterou significativamente a força de contração neuromuscular (Figura 15). Quando a bicuculina foi administrada após um pré-tratamento com acetilcolina, houve uma inibição de praticamente 100% do bloqueio neuromuscular pela Acetilcolina.

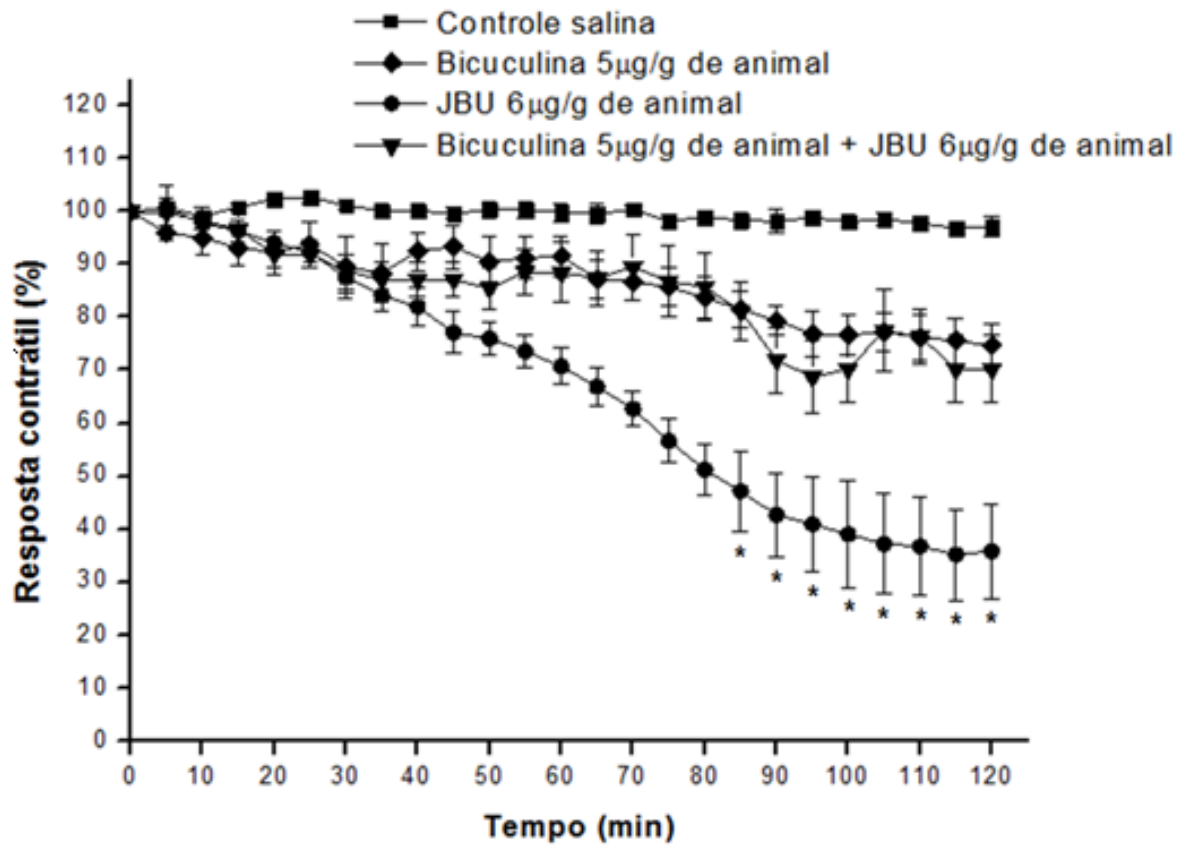


**Figura 15.** Efeito da acetilcolina (50µg/g de animal) e da bicuculina (5µg/g de animal) sobre a resposta contrátil em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto corresponde a média  $\pm$  erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil (n=6). Note que a bicuculina inibiu a resposta bloqueadora neuromuscular induzida pela acetilcolina. \*  $p < 0.05$



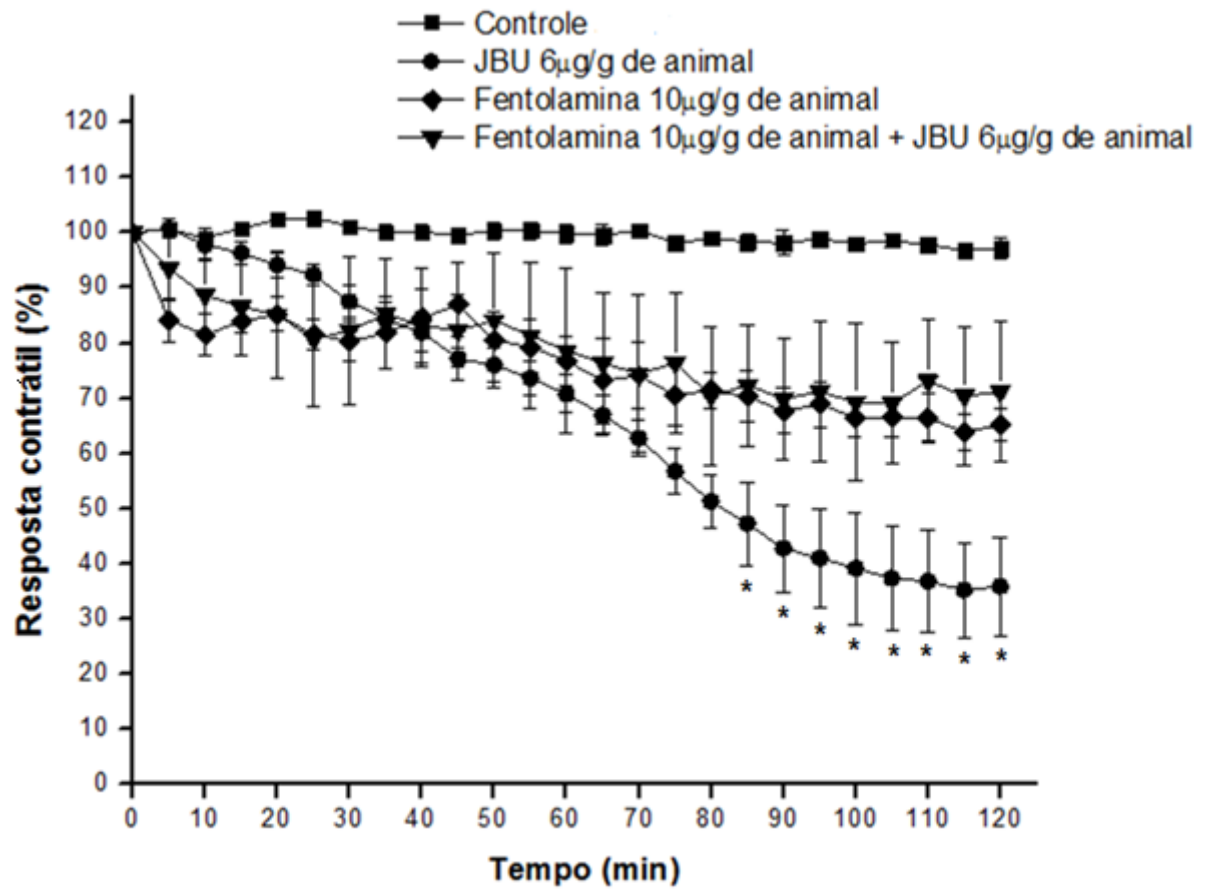
#### **4.6 Inibição do bloqueio neuromuscular induzido pela JBU pelo tratamento prévio com bicuculina em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea***

Em todos os ensaios neuromusculares com a JBU, não foram observadas respostas facilitadoras da força de contração muscular. Como dito anteriormente, a junção neuromuscular de insetos possui inervações glutamatérgicas e gabaérgicas. Como a JBU é conhecida por produzir poros em membranas biológicas (PIOVESAN *et al.*, 2014), estabelecemos a hipótese de que essa urease estaria despolarizando nervos gabaérgicos induzindo respostas inibitórias da força de contração muscular. Dessa forma, foram feitos ensaios utilizando a bicuculina (5µg/g de animal) (n=6), um bloqueador seletivo dos receptores GABA. Quando a bicuculina foi previamente administrada 15min antes da JBU (6µg/g de animal) (n=6) houve uma inibição de ~50% na resposta bloqueadora neuromuscular da JBU (Figura 16). Os ensaios com bicuculina (5µg/g de animal) isoladamente induziram um bloqueio da resposta contrátil de 25±4% em 120min de registro (Figura 16).



**Figura 16.** Inibição parcial do bloqueio neuromuscular induzido pela JBU pelo tratamento prévio com bicuculina (5µg/g de animal) em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto corresponde à média ± erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil (n=6). Note que a bicuculina inibiu a resposta bloqueadora neuromuscular induzida pela JBU. \*p<0.05

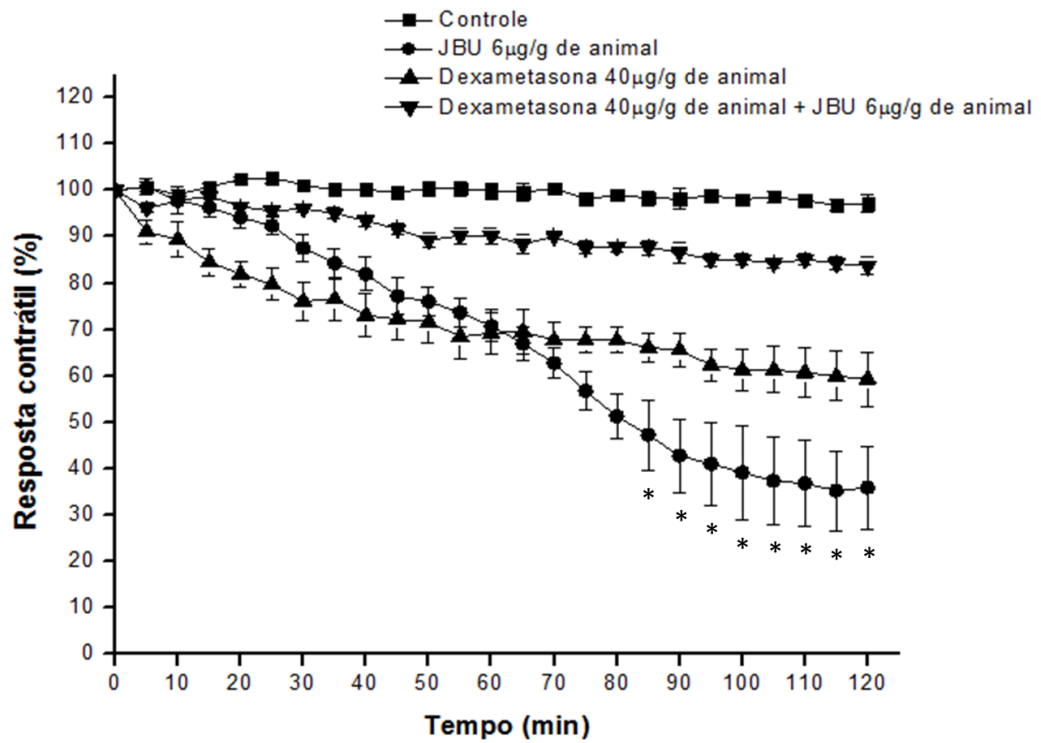
Sabe-se que a octopamina é um neurotransmissor presente na região pré-ganglionar dos gânglios metatorácicos de onde partem os nervos que inervam a junção neuromuscular de insetos. Como dito anteriormente, a JBU é um permeabilizante de membranas que poderia estar despolarizando neurônios octopaminérgicos nas regiões pré-ganglionares induzindo ondas despolarizantes que invadiriam o terminal nervoso motor gabaérgico induzindo um bloqueio da resposta contrátil. Para testar essa hipótese, incubamos as preparações com a fentolamina, um bloqueador competitivo dos receptores de octopamina. Quando a fentolamina (10 $\mu$ g/g de animal) (n=6) foi administrada na preparação nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *N. cinerea* houve uma redução da resposta contrátil para 30 $\pm$ 3% em 120min de registros. (Figura 17). Quando a fentolamina foi previamente incubada 15min antes da administração da JBU (6 $\mu$ g/g de animal) houve uma inibição de ~15% da força de contração muscular.



**Figura 17.** Inibição parcial do bloqueio neuromuscular induzido pela JBU pelo tratamento prévio com fentolamina (10µg/g de animal) em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto corresponde a média ± erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil (n=6). Note que a fentolamina inibiu a resposta bloqueadora neuromuscular induzida pela JBU. \*p<0.05

#### 4.7 Relação entre eicosanoides e o bloqueio neuromuscular induzido pela JBU em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*

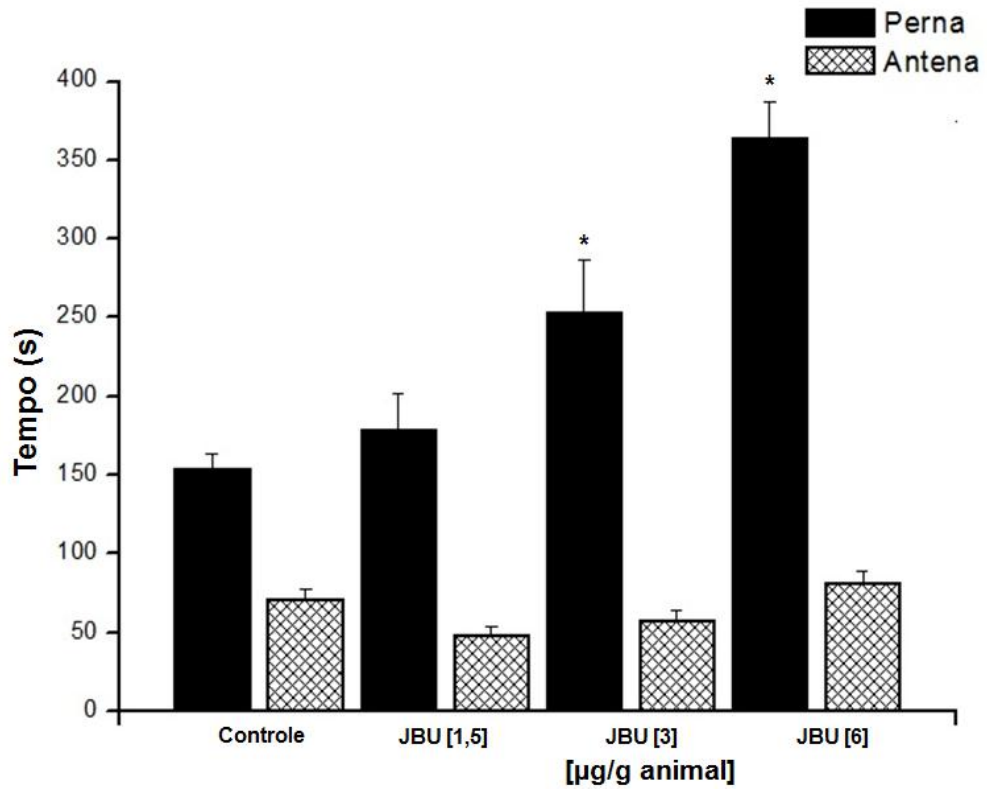
Recentemente, foi demonstrado por UBERTI *et al.*(2013) a relação entre a formação de compostos pró-inflamatórios e os efeitos neurotóxicos induzidos pela urease de *Canavalia ensiformis* em insetos. Com ênfase nessa hipótese, foram realizados ensaios com a dexametasona, um glicocorticoide, anti-inflamatório que possui a capacidade de inibir a fosfolipase A2 de membranas, o que inibiria a produção de eicosanóides. A dexametasona (40µg/g de animal), administrada 15min antes do tratamento com JBU (6µg/g de animal) (n=6) produziu uma inibição da resposta bloqueadora neuromuscular induzida pela urease em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de barata (Figura 18). Quando a JBU (6µg/g de animal) foi administrada, houve um bloqueio neuromuscular de 70±7% em 120min de registro (n=6). Por outro lado, quando a dexametasona (40µg/g de animal) (n=6) foi previamente incubada, houve apenas 15±2% de bloqueio neuromuscular em 120min de registro (Figura 18).



**Figura 18.** Inibição parcial da resposta bloqueadora neuromuscular da JBU pelo tratamento prévio com dexametasona (40µg/g de animal) em preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto corresponde a média  $\pm$  erro-padrão da porcentagem da resposta contrátil (n=6). Note que a dexametasona inibiu a resposta bloqueadora neuromuscular induzida pela JBU. \* p<0.05

#### 4.8 Modulação da atividade de *grooming* pela urease de *Canavalia ensiformis*

Para medir a atividade de *grooming* em *Nauphoeta cinerea*, foi feita a observação das baratas dentro do Open Field durante 30min após os tratamentos (n=30). O *grooming* pode ser entendido como o movimento de limpeza das pernas e antenas. Em nossas condições experimentais foram avaliados individualmente os tempos de *grooming* de pernas e de antenas, já que a literatura se refere a esses comportamentos como sendo modulados pela dopamina, no caso das antenas e octopamina, no caso das pernas (LIBERSAT *et al.*, 1999). 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) (Figura 19). Quando a JBU foi administrada em diferentes doses (1.5, 3 e 6 $\mu$ g/g de animal) houve um efeito dose-dependente sobre a atividade de *grooming* constante de pernas mas não no de antenas (Figura 19). Assim, na dose de 1.5 $\mu$ 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 $\mu$ g/g de animal 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 houve um aumento ainda maior no tempo de *grooming* de pernas para 363 $\pm$ 23s/30min ( $p<0.05$ , n=30) (Figura 19).

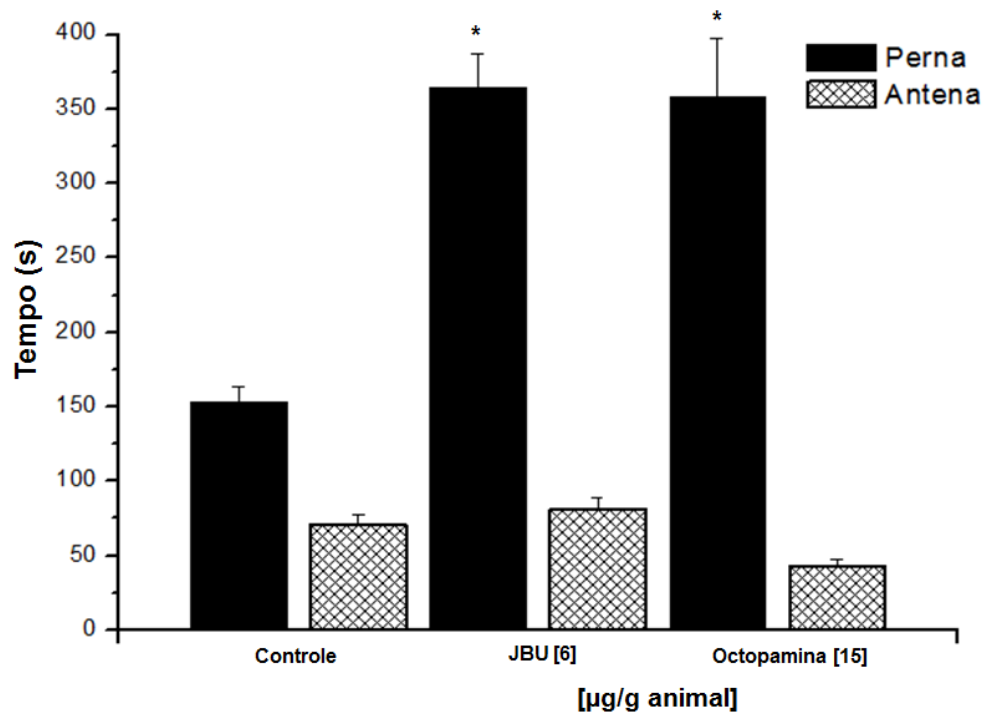


**Figura 19.** Modulação da resposta de *grooming* pela administração de diferentes concentrações da urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) em *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. \*  $p < 0.05$  em comparação com o controle salina.

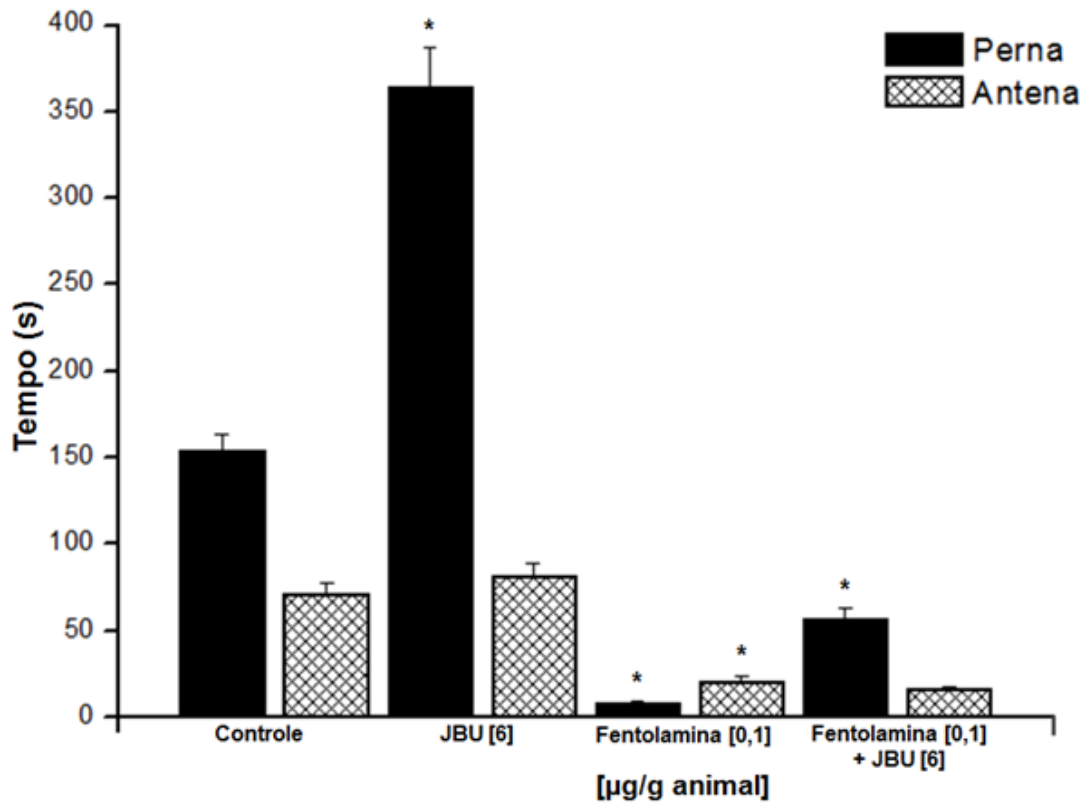


#### 4.9 Modulação da atividade de *grooming* pela octopamina e fentolamina em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*

Como dito anteriormente, a literatura demonstra que a modulação do *grooming* de pernas em modelo de baratas é modulada pelo neurotransmissor octopamina. Para confirmar esse dado em nossas condições experimentais foram ensaiadas a octopamina e o antagonista competitivo dos receptores de octopamina, a fentolamina. Quando a octopamina (15 $\mu$ g/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 20). A administração de fentolamina (0.1 $\mu$ g/g de animal) previamente ao tratamento com octopamina (dados não mostrados) ou JBU (6 $\mu$ g/g de animal) nos animais ( $n=30$ ), induziu uma diminuição da taxa de *grooming* para 79 $\pm$ 13s/30min ( $p < 0.05$  comparado com o controle octopamina,  $n=30$ ). Quando a fentolamina (0.1 $\mu$ g/g de animal) foi administrada 15min antes da injeção, houve uma diminuição significativa da taxa de *grooming* de perna para 56 $\pm$ 7s/30min ( $p < 0.05$  comparado com o controle octopamina ou JBU,  $n=30$ ) (Figura 21).



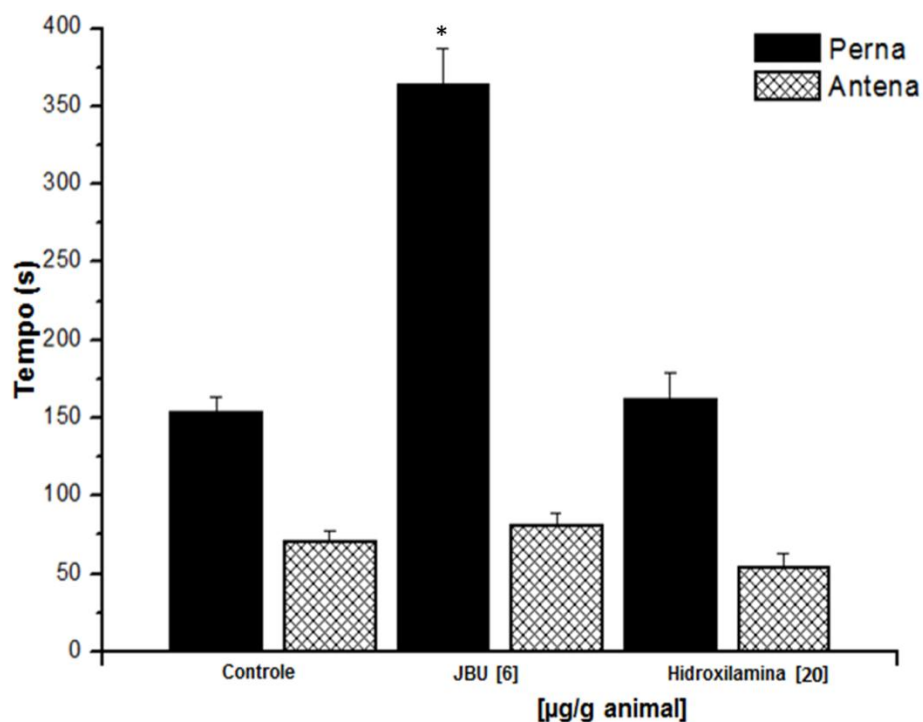
**Figura 20.** Modulação da resposta de *grooming* pela administração da octopamina (15 $\mu\text{g/g}$  de animal) em *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. \* $p < 0.05$  em comparação com o controle salina.



**Figura 21.** Inibição do aumento da atividade de *grooming* induzido pela JBU pelo tratamento prévio com fentolamina (0.1 $\mu$ g/g de animal) em *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. Note que a fentolamina inibiu o aumento na taxa de *grooming* induzido pela JBU. \* $p < 0.05$  em relação ao controle salina.

#### 4.10 Ausência de modulação da atividade de *grooming* pela hidroxilamina em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*

No sentido de investigar se a atividade induzida pela JBU sobre o sistema nervoso central de *N. cinerea* era modulada pela geração de compostos de óxido nítrico, foi ensaiada a hidroxilamina, um substrato para a enzima óxido nítrico sintase. Quando a hidroxilamina (20µg/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) (Figura 22).



**Figura 22.** Modulação da resposta de *grooming* pela administração da hidroxilamina (20µg/g de animal) em *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada barra representa a média ± E.P.M. de no mínimo 30 ensaios. \*p<0.05 em relação ao controle salina.

## 5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho foi demonstrada a atividade tóxica da urease de *Canavalia ensiformis* sobre diferentes sistemas neurofisiológicos de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Os diferentes mecanismos envolvidos na interação da urease sobre cada sistema, bem como as suas relações no desenvolvimento do processo entomotóxicos serão discutidos a seguir.

Apesar da JBU ter demonstrado atividade entomotóxica em diferentes insetos (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012), ela parece não ser letal para *N. cinerea*, pelo menos por administração intra-abdominal. A letalidade induzida pela *Jack Bean Urease* está relacionada com a alta especificidade da canatoxina. Sendo assim, somente insetos que contenham enzimas do tipo catepsinas (proteases de sistéina e ácido aspártico), tais como, *Callosobruchus maculatus* e *Rhodnius prolixus*, são sensíveis à toxina. Por outro lado, insetos que possuem tripsinas como enzimas digestivas (proteases de serina), tais como *Manduca sexta*, *Schistocerca americana*, *Drosophila melanogaster* e *Aedes aegypti*, não demonstram entomotoxicidade. Na verdade, ELPIDINA *et al.* (2000) demonstraram que a digestão no intestino médio de *N. cinerea* está relacionada a três tipos ativos de serinas e cisteínas, o que explicaria a atividade não-letal da JBU no nosso modelo experimental.

A JBU demonstrou inibir a AChE, causando uma facilitação da neurotransmissão colinérgica. Esse dado corrobora os ensaios realizados sobre a frequência cardíaca e as respostas contráteis de *N. cinerea*, nos quais a acetilcolina induziu um efeito mimético ao da JBU. Em insetos a frequência cardíaca é modulada positivamente pela acetilcolina, que advém de nervos adjacentes ao túbulo cardíaco (COLLINS & MILLER, 1977). Em nossas condições experimentais a JBU induziu aceleração cardíaca, semelhante à neostigmina, um inibidor da atividade da acetilcolinesterase. Esse efeito sugere uma exacerbação da neurotransmissão colinérgica nesse órgão. Esse último dado foi também demonstrado por RODRIGUES *et al.* (2012), que em ensaios com anatoxina a(s), um organofosforado natural. Esse dado também sugere que, além da atividade anticolinesterásica, a JBU poderia estar despolarizando nervos colinérgicos cardíacos, através do seu efeito

permeabilizante de membranas (PIOVESAN *et al.*, 2014), o que também favoreceria um aumento da frequência cardíaca dos animais.

Nesse sentido, a JBU induziu um bloqueio progressivo da força de contração muscular em preparação neuromuscular *in vivo* de *N. cinerea*. Esse efeito sugere que parte do efeito entomotóxico induzido pela JBU em insetos seja devido a uma interação direta desse composto, inibindo a neurotransmissão periférica. No entanto, ainda não é possível afirmar se este composto estaria interagindo somente sobre os nervos periféricos, causando um impedimento na propagação dos potenciais de ação para a região muscular, ou diretamente sobre a musculatura da coxa do animal, causando impedimento da contração muscular.

Já foi demonstrado em insetos que receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina estão presentes ao longo do cordão nervoso ventral (CARR & FOURTNER, 1980). Em insetos, interneurônios colinérgicos fazem sinapse com neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos aumentando a excitabilidade nesses locais, incluindo a junção neuromuscular (THANY & TRICOIRE-LEIGNEL, 2011). Quando a acetilcolina foi ensaiada em nossas condições experimentais, a mesma induziu um bloqueio neuromuscular semelhante ao produzido pela JBU. Além disso, o tratamento prévio do animal com bicuculina foi capaz de inibir tanto o bloqueio neuromuscular induzido pela JBU, como aquele pela aplicação da acetilcolina.

Dessa forma, uma hipótese plausível seria a de que a JBU, por sua ação despolarizante, interagiria com interneurônios colinérgicos que fariam sinapses com neurônios gabaérgicos. Essa hipótese torna-se ainda mais atraente, já que, em nossas condições experimentais, não visualizamos nenhuma atividade facilitadora da força de contração muscular em presença de JBU, o que seria provável, caso neurônios glutamatérgicos estivessem sendo ativados (CALABRESE, 1989).

Em nossas condições experimentais, foi demonstrado que a administração prévia da dexametasona, 15min antes do tratamento dos animais com JBU, inibiu parcialmente o bloqueio neuromuscular induzido pela urease. A dexametasona é um anti-inflamatório esteroide, o qual inibe a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> em membranas biológicas de insetos (STANLEY *et al.*, 2012). A rota dos eicosanóides inicia-se com a liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípidios das membranas celulares, por ação de uma fosfolipase A<sub>2</sub>. Em cada tipo de célula ou tecido existe um conjunto de enzimas que transformará o ácido

araquidônico em seus metabólitos, os eicosanoides, tais como: prostaglandinas, tromboxanos, epóxidos, leucotrienos. Duas enzimas chaves iniciam essas rotas: as ciclo-oxigenases para as prostaglandinas, e as lipoxigenases, para leucotrienos e hidroperóxidos (GOODMAN & GILMAN, 2006). Já a biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina e é catalisada pela enzima NO sintetase (NOS) com a participação da forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), como um doador de elétron. As enzimas constituintes estão normalmente presentes na célula, enquanto as outras são induzidas por algum mecanismo externo, que no caso da NO sintetase é o estímulo imunológico. A enzima NO sintetase constitutiva (cNOS), que foi inicialmente descoberta no endotélio vascular, é conhecida como eNOS (NOS endotelial), ao passo que aquela que se encontra presente no cérebro e no sistema nervoso periférico é chamada de nNOS (NOS neuronal). A forma da enzima NO sintetase induzida pelo estímulo imunológico ou inflamatório é designada como iNOS (NOS induzida). Recentemente foi demonstrado o papel do NO sobre a junção neuromuscular de insetos, provando que o mesmo, quando aumentada a sua concentração em terminais nervosos pré-sinápticos, aumenta a liberação de neurotransmissores (WILDEMANN & BICKER, 1999). Nesse sentido, DEFERRARI *et al.*, (2014), demonstraram que em hemócitos de insetos a administração do JBU estimula o aumento de eicosanóides e a agregação plaquetária, um processo que foi inibido pela administração previa de dexametasona. Assim, nossos dados corroboram esses achados e suportam a ideia de que, pelo menos em parte, o efeito bloqueador neuromuscular do JBU envolveria a produção de mediadores pró-inflamatórios, possivelmente por aumentar a liberação do neurotransmissor GABA. De fato, quando a bicuculina foi previamente administrada ao JBU sobre a junção neuromuscular de *N. cinerea in vivo*, houve uma inibição do bloqueio neuromuscular induzido pela urease, comprovando a hipótese de exacerbação da resposta gabaérgica.

Também foi demonstrado usando a preparação nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *N. cinerea*, que a fentolamina, um inibidor seletivo de receptores ionotrópicos de octopamina, previne o bloqueio neuromuscular induzido pelo JBU. Nesse sentido, o neurônio dorsal não-pareado (DUM) de baratas, o qual possui o seu corpo celular no gânglio metatorácico libera octopamina como neurotransmissor

excitatório que exerce ação sobre os motoneurônios ativando o músculo tibial extensor (HUBER *et al.*, 1990). Somando-se essa informação ao fato de a urease de *C. ensiformis* possuir ação despolarizante sobre membranas, sugerimos que o JBU aumentaria as descargas sinápticas por despolarizar a membrana do gânglio metatorácico, aumentando a liberação do neurotransmissor inibitório GABA na junção neuromuscular.

Os resultados aqui apresentados também revelam que o JBU induz um aumento do comportamento de *grooming* (que se traduz em uma atividade sobre o sistema nervoso central) de forma complexa, produzindo alterações quantitativas. O *grooming* em insetos tem a função de limpeza da superfície externa do corpo bem como outras funções as quais incluem o comportamento de corte, sinalização social, a atividade de deslocamento e de excitação (SPRUIJT *et al.*, 1992). Em insetos, apesar do centro neural envolvido no comportamento de *grooming* ainda ser desconhecido, foi demonstrado que o principal neurotransmissor associado 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* induzida pela JBU, corroborando uma ação da urease sobre a neurotransmissão octopaminérgica. 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 AChE. 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 patas dianteiras (LIBERSAT *et al.*, 1999).

Assim, os dados apresentados nessa dissertação de mestrado reforçam o papel das ureases como agentes inseticidas naturais. Também 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. Ensaios futuros de imunohistoquímica bem como de eletrofisiologia celular poderão trazer luz a essas questões.



## 6. CONCLUSÃO

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

- ✓ A urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) não exerceu atividade letal quando injetada via intra-abdominal no modelo experimental de *Nauphoeta cinerea*;
- ✓ A JBU possui atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase em insetos;
- ✓ A JBU induz alterações cronotrópicas positivas sobre o sistema cardiovascular de *Nauphoeta cinerea*;
- ✓ A JBU induz inibição da força de contração muscular progressiva em preparação neuromuscular de *Nauphoeta cinerea in vivo*;
- ✓ A JBU induziu um aumento no comportamento de *grooming* de pernas, sugerindo o envolvimento da neurotransmissão octopaminérgica no sistema nervoso central;
- ✓ A bicuculina inibe o efeito bloqueador neuromuscular induzido pela JBU sugerindo uma atividade da urease sobre a neurotransmissão gabaérgica no sistema nervoso periférico;
- ✓ A acetilcolina mimetiza o bloqueio neuromuscular induzido pela JBU sugerindo que a urease esteja interagindo no gânglio metatóraco ativando interneurônios gabaérgicos na placa motora.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar se a JBU exerce atividade direta sobre o gânglio subesofágico, por meio de técnicas de autorradiografia e imuno-fluorescência;
- Investigar se o bloqueio neuromuscular é devido a uma ação direta da urease sobre a junção neuromuscular ou se o efeito ocorre antes no gânglio metatorácico, através de ensaios eletrofisiológicos e intracelulares;
- Investigar se a atividade anticolinesterásica influencia as respostas gabaérgicas e octopaminérgicas, por meio de análises neuroquímicas;
- Investigar qual porção da molécula da JBU estaria envolvida na neurotoxicidade induzida em baratas, por análises bioquímicas e produção de peptídeos derivados da JBU.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDOR, R.W. Agrochemical from Natural Products. In: Godfrey, C.R.A. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York-USA, 45. 1994.

BAGATINI, P.B., SAUR, L., RODRIGUES, M.F., BERNARDINO, G.C., PAIM, M.F., COELHO, G.P., SILVA, D.V., OLIVEIRA, R.M., SCHIRMER, H., SOUTO, A.A., VIANNA, M.R., XAVIER, L.L. The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: a locomotor analysis. *Invert. Neurosci.* 11: 43-50. 2011.

BAUMANN E. & GERSCH M. Purification and identification of neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry.* 12: 7-14. 1982.

BENTON, R. Chemical sensing in *Drosophila*. *Curr.Opin.in Neurob.* 18: 57- 63. 2008.

BREER, H., & SATTELLE, D.B. Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. *The Journal of Insect Physiology.* 33: 771-790. 1987.

BULLANGPOTI, V., VISETSON, S., MILNE, M., MILNE, J., PORNBANLUALAP, S., SUDTHONGKONGS, C., YAYAPAT, S. The novel botanical insecticide for the control brown plant hopper (*Nilaparva talugens* Stal.) *Commun Agric Appl Biol Sci.* 71: 475–481. 2006.

CALABRESE, R.L. Modulation of muscle and neuromuscular junction in invertebrates. *The Neuroscience.* 1: 25-34. 1989.

CARLINI, C.R. & GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon.* 40: 1515-1539. 2002.

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 enzymes. *Journal of Economical Entomology*. 90: 340-348. 1997.

CARR, C. E.; FOURTNER, C. R. Pharmacological analysis of a monosynaptic reflex in the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* 86: 259-273. 1980.

CASIDA, J.E., QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual Review of Entomology* 43: 1-16. 1998.

COLLINS, C. & MILLER, T. Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. Department of Entomology. Division of Toxicology and Physiology; University of California, *Exp. Bio.* 67: 1-15. 1977.

CORNWELL, P.B. The cockroach. A laboratory insect and an industrial pest. London: Hutchinson, 1. 1968.

COSTA, L.G. Toxic effects of pesticides. In Casarett & Doll's *Toxicology: the basic science of poisons*. Seventh edition, 2008.

CULL-CANDY, S. G. & MILEDI, R. Junctional and extrajunctional membrane channels activated by GABA in locust muscle fibres. *Proc. R. Soc. Lond.* 211: 527-535. 1981.

DEFFERRARI, M.S., LEE, D.H., FERNANDES, C.L., ORCHARD, I., CARLINI, C.R. A phospholipase A<sub>2</sub> gene is linked to Jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 1840: 396-405. 2014.

DELPUECH, J., BARDON, C., BOULÉTREAU, M. Increase of the behavioral response to kairomones by the parasitoid wasp *Leptopilina heterotoma* surviving insecticides. Archives Environmental Contamination Toxicology. 49:186-191. 2005.

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.

FERREIRA-DASILVA, C.T., GOMBAROVITS, M.E.C., MASUDA, H., OLIVEIRA, C.M., CARLINI, C.R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 44: 62-71. 2000.

FOLLMER, C., BARCELLOS, G.B., ZINGALI, R.B., MACHADO, O.L., ALVES, E.W., BARJA-FIDALGO, C., GUIMARÃES, J.A., CARLINI, C.R. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. Biochem. J. 360: 217-224. 2001.

FOLLMER, C. Insights into the role and structure of plant ureases. Phytochemistry 69: 18-28. 2008.

FOLLMER, C., REAL-GUERRA, R., WASSERMAN, G.E., OLIVERA-SEVERO, D., CARLINI, C.R. Jack bean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. Eur. J. Biochem. 271: 1357-1363. 2004.

FONNUM, F. Glutamate a neurotransmitter in mammalian brain. J. Neurochem. 42: 1-11, 1984.

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.

GOODMANN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. 11<sup>a</sup> Ed. 2006.

GREENBERG, M.J. & PRICE, D.A. Relationships among the FMRFamide-like peptides. Prog. Brain Res. 92: 25-37. Review. 1992.

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. AmerZool 37: 369-388. 1997.

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. 3<sup>rd</sup> Ed. 2005.

HILL, S.R. & ORCHARD, I. FMRFamide-related peptides in the gut of *Locusta migratoria* L.: a comprehensive map and developmental profile. Peptides. 24:1511-1524. 2003.

HUBER, I., MASLER, E., RAO, B. Cockroaches As Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research. CRC Press. 280. 1990.

HUGHES, B.W., KUSNER, L.L., KAMINSKI, H.J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. Muscle & Nerve. 445-461. 2006.

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.

KOSTYUKOVSKY, M., RAFAELI, A., GILEADI, C., DEMCHENKO, N., SHAYA, E. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. Pest Manag. Sci. 58: 1101-1106. 2002.

LANGLEY, K., GRANT, N.J. Are exocytosis mechanisms neurotransmitter specific? *Neurochem Int.*, Oxford 31: 739-57. 1997.

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.

MARCUSSI, S.M., ARANTES, E.C., SOARES, A.M. Escorpiões: biologia, envenenamento e mecanismos de ação e suas toxinas. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2011.

MARICONI, F.A. Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas. Agron. Ceres Ltda. São Paulo. 2ª Ed. 1963.

MARTINELLI A.H.S., KAPPAUN K., LIGABUE-BRAUN R., DEFFERRARI M.S., PIOVESAN A.R., STANISÇUASKI F., DEMARTINI D.R., DAL BELO C.A., ALMEIDA C.G.M., FOLLMER C., VERLI H., CARLINI C.R., PASQUALI G. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840: 935-944. 2014.

MIGGIANI, L., ORCHARD, I., TE BRUGGE, V. The distribution and function of serotonin in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. A comparative study with the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *J. insect Physiol.* 45:1029-1036. 1999.

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.

MOBLEY, H.L., ISLAND, M.D., HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol.* 59: 451-480. 1995.

MUSTARD, J.A., PHAM, P.M., SMITH, B.H. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *J Insect Physiol.* 56:422–430. 2010.

NICHOLS, C.D. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.*, 112: 677-700. 2006.

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

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

O'SHEA M., ADAMS M. E., BISHOP C., WITTEN J., WORDEN M. K. Model Peptidergic Systems at the Insect Neuromuscular Junction. *Peptides.*6: 417-424. 1985.

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 peptides. *Peptides.* 38: 22-32. 2012.

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



RAYMOND-DELPECH, V., MATSUDA, K., SATTELLE, B., RAUJ, J., SATTELLE D. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *InvertebrateNeuroscience*5: 19-33. 2005.

REAL-GUERRA, R., CARLINI, C.R., STANISÇUASKI, F. Role of lysine and acidic amino acid residues on the insecticidal activity of Jack bean urease. *Toxicon*. 71: 73-83. 2013.

RODRIGUES, V., MORI, B., DORR, F.A., DAL BELO, C.A., COLEPICOLO, P., PINTO, E. Effects of a cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) on the cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans*. *Revista Bras. De farmacognosia*. 22: 775-781. 2012.

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

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. *Rev. Int. Des. Local*. 1: 43-50. 2001.

SETTEMBRINI, B.P. & VILLAR, M.J. Distributions of serotonin in the central nervous system of the blood-feeding Heteropteran, *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *J. Morphol*. 260: 21-32. 2004.

SETTEMBRINI, B.P. & VILLAR, M.J. FMRFamide-like immunocytochemistry in the brain and subesophageal ganglion of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). Coexpression with beta-pigment-dispersing hormone and small cardioactive peptide B. *Cell Tissue Res*. 321: 299-310. 2005.

SHAAYA, E., RAFAELI, A. Essential oils as biorational insecticides. Potency and mode of action. Chapter 11. In Ishaaya, Nauen and Rami Horowitz —insecticides design using advanced technologies.249-261. 2007.

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

SODERLUND, D.M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch Toxicol.* 86 (2): 165-181. 2012.

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.

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

STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C.T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M., CARLINI, C.R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug. *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon.* 45: 753-760. 2005.

STANISCUASKI, F., TEBRUGGE, V., CARLINI, C.R., ORCHARD, I. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J. Insect Physiol.* 55: 255-263. 2009.

STANISCUASKI, F., TEBRUGGE, V., CARLINI, C.R., ORCHARD, I. Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. *J. Insect Physiol.* 56: 1078-1086. 2012.

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.

STANKIEWICZ, M., DABROWSKI, M., LIMA, M. Nervous System of *Periplaneta Americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View. *Journal of Toxicology.* 2012: 1-11. 2012.

STANLEY, D., HAAS, E., MILLER, J. Eicosanoids: Exploiting Insect Immunity to Improve Biological Control Programs. *Insects.* 3: 492-510. 2012.

STOREY, K.B., STOREY, J.M. Biochemical strategies of overwintering in the gall fly larva, *Eurosta solidaginis*: effect of low temperature acclimation on the activities of enzymes of intermediary metabolism. J. Comp. Physiol. 144: 191–199. 1981.

STÜRMER, 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.

SUMNER, J.B., HOWELL, S.F. Identification of the hemagglutinin of jackbean with Con A. J. Bacteriol. 32: 227-240. 1933.

TAYLOR, D. & NEWBURGH, R. The synthesis and content of neurotransmitters and their effect on cyclic nucleotide accumulation in the central nervous system of *Manduca sexta*. Insect Biochemistry. 9:265-272. 1979.

THACKER, J.R.M. An introduction to arthropod pest control. Cambridge University Press, 45: 343. 2002.

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.

TRIPLEHORN C.A. & JOHNSON N.F. Borror and DeLong's introduction to the study of insects. Thonson-Brooks/cole. Estados Unidos. 7<sup>th</sup> Ed. 2005.

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

UBERTI A. F., OLIVERA-SEVERO D., WASSERMANN G. E., SCOPEL-GUERRA A., MORAES J. A., BARCELLOS-DE-SOUZA P., BARJA-FIDALGO C., CARLINI C. R. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon*. 69: 240-249. 2013.

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

VIEGAS, C.Jr. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26: 390-400. 2003.

VILLAR, M.J., SETTEMBRINI, B.P., HOKFELT, T., TRAMEZZANI, J.H. NOS is present in the brain of *Triatoma infestans* and is colocalized with CCK. *Neuroreport*. 6:81-84. 1994.

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.

WILDEMANN, B. & BICKER, G. Nitric Oxide and Cyclic GMP Induce Vesicle Release at *Drosophila* Neuromuscular Junction. 1999.

YAMAMOTO, C., KUROKAWA, M. Synaptic potentials re-corded in brain slices and their modification by changes in tissue ATP. *Exp. Brain Res*. 10: 159-170. 1970.

YANG, Y., GEHRKE, S., IMAI, Y., HUANG, Z., OUYANG, Y., WANG, J. W. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 103: 10793-10798. 2006.

YU, F.H., CATTERALL, W.A. The VGL-chanome: a protein super family specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci STKE*253: 15. 2004.