

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

ANA PAULA PERIN

**EFEITO ENTOMOTÓXICO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) E DO
PEPTÍDEO TÓXICO JABURETOX (Jbtx) SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR
DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**São Gabriel
2016**

ANA PAULA PERIN

EFEITO ENTOMOTÓXICO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) E DO PEPTÍDEO TÓXICO JABURETOX (Jbt_x) SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à comissão avaliadora de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, RS, Brasil, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Coorientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena do Canto Vinadé

Coorientador Internacional: Dr. Joseph Polacco

**São Gabriel
2016**

Perin, Ana Paula

EFEITO ENTOMOTÓXICO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) E DO PEPTÍDEO TÓXICO JABURETOX (Jbtx) SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea* / Ana Paula Perin.

47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2016.

"Orientação: Chariston André Dal Belo".

1. Acetilcolinesterase. 2. Urease. 3. Insetos. 4. Junção neuromuscular. I. Título.

ANA PAULA PERIN

EFEITO ENTOMOTÓXICO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) E DO PEPTÍDEO TÓXICO JABURETOX (Jbt_x) SOBRE A JUNÇÃO NEUROMUSCULAR DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à comissão avaliadora de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, RS, Brasil, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

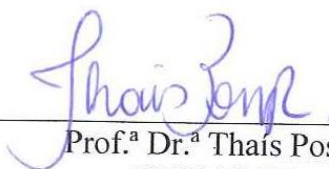
Dissertação defendida e aprovada em: 09 de junho do ano de 2016

Banca examinadora:




Prof.º Dr.º Cháriston André Dal Belo

Orientador
UNIPAMPA



Prof.ª Dr.ª Thais Posser
UNIPAMPA



Dr.ª Patrícia Vieira
UNIPAMPA

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por ter me proporcionado tantas oportunidades boas, sendo uma delas a UNIPAMPA. Apesar da grande maioria das pessoas que trabalham na ciência não acreditar em Deus, eu sou uma pessoa que acredito na existência de um ser divino que nos acompanha.

Aos meus familiares, meu irmão Mauricio, que sempre demonstrou confiar no meu potencial desde muito cedo, quando crianças, tirando as rodinhas de apoio da minha bicicleta antes mesmo de saber que podia andar sem elas. Minha mãe Nadir, exemplo de pessoa, que sempre me deu muito carinho, mas que também puxou minha orelha quando precisou. Agradeço por você ter sempre apoiado minhas decisões, mesmo quando isso incluía ficar longe de casa por muito tempo. Ao meu pai Claudino (*in memoriam*), que infelizmente partiu cedo, mas que foi um excelente pai, deixando-me ensinamentos que são necessários até hoje e seus valiosos genes, os quais me orgulho de ter herdado. Vocês são minha base sólida de apoio que me faz crescer.

Agradeço os meus padrinhos, Elair e Osmar, que sempre desempenharam com excelência o papel de segundos pais, se tornando fonte de apoio e amor quando mais precisei.

Aos meus professores orientadores, Cháriston A. Dal Belo e Lúcia H. do Canto Vinadé, pelos ensinamentos, confiança e dedicação. Sou grata por terem me concedido a oportunidade de aprender e crescer com vocês.

Agradeço o professor Joseph Polacco por ter me proporcionado a grande oportunidade de estagiar em um laboratório nos Estados Unidos e por ter disponibilizado seu tempo orientando-me dentro e fora do laboratório. Sou grata também, por ter apresentado-me a Elizabeth Hoyos, pessoa maravilhosa que teve paciência de auxiliar-me nos procedimentos laboratoriais.

Aos colegas, Darlene Rangel, Marines Heberle, Carlos Gabriel, Graziela Holkem, Ana Lucho e Thiago Carrazoni que de alguma forma, contribuíram para a realização dos meus trabalhos de laboratório.

Agradeço também as amigas sinceras que tive o prazer de conquistar aqui em São Gabriel, amigos que sempre estiveram comigo nos momentos de estudos, trabalhos e pesquisas bem como, nos momentos de alegria e descontração. Sou muito grata a vocês, pois fizeram parte dos melhores momentos da minha vida universitária, preenchendo o vazio da saudade de casa, por estar distante dos familiares.

Toda a ciência começa como filosofia e termina em arte.

Will Durant

RESUMO

O crescimento da população mundial tem gerado a necessidade de um incremento na produtividade agrícola com uso de praguicidas ecologicamente viáveis. Nesse sentido, os compostos naturais, vem sendo estudados com a finalidade de se desenvolver produtos mais seguros para o meio ambiente e consumidores. A ampla diversidade das propriedades biológicas e físico-químicas das plantas proporcionam inúmeras aplicações, que variam da área médica, até produtos controladores de pragas agrícolas. As ureases, são enzimas, que estão envolvidas no mecanismo de defesa das plantas, possuindo propriedade entomotóxica, a qual não está relacionada com a sua atividade enzimática. Existem várias isoformas de ureases, mas o presente trabalho trata apenas da isoforma *Jack Bean Urease* (JBU) e do peptídeo tóxico recombinante, Jaburetox. Portanto, o objetivo do trabalho é investigar o efeito entomotóxico da urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) e do peptídeo tóxico Jaburetox (Jbtx) sobre a junção neuromuscular de *Nauphoeta cinerea*. A expressão heteróloga do Jaburetox foi realizada em *Escherichia coli* e a sua purificação foi realizada em uma coluna de afinidade de níquel. Para a realização dos experimentos, baratas adultas foram utilizadas nas preparações *in vivo* de junção neuromuscular e *in vitro*, na análise da atividade da acetilcolinesterase, em homogenato de cérebro de baratas. Nossos resultados demonstraram que a JBU inibe significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase. Quando as baratas foram tratadas com as doses de JBU 1,5; 3 e 6µg/g, houve uma inibição de 21,2 ±3%, 33±2% e 60±3% na atividade da acetilcolinesterase, respectivamente. Usando-se as mesmas doses de JBU, os ensaios eletromiográficos demonstraram que a JBU induz a um bloqueio neuromuscular tempo-dependente. Quando as doses de 1,5 e 3µg/g foram ensaiadas houve uma inibição de 30±10% e de 15±4% nas respostas contráteis, respectivamente, em 120min de registro. A administração da maior dose 6µg/g, exibiu um reforço do bloqueio neuromuscular máximo de 65±8% aos 120min de registro. A administração prévia dos animais com dexametasona (40µg/g) inibiu parcialmente (~45%) o efeito bloqueador neuromuscular da JBU (6µg/g). Os registros eletromiográficos das baratas com Jbtx, também demonstraram bloqueio neuromuscular tempo-dependente. Nestes ensaios, as doses de 2,5; 5 e 10µg/g induziram 76±16%, 68±10% e 71±8% de inibição da resposta contrátil respectivamente, em 120min de registros. Por outro lado, quando a dose de 15µg/g de animal foi ensaiada, houve apenas 22±12% de inibição da resposta contrátil. Com base nos resultados obtidos pode-se inferir que a JBU possui atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase em insetos. As doses de 1,5 e 6µg/g de JBU induzem inibição da

força de contração muscular progressiva e significativa em preparação neuromuscular de *N. cinerea*. A administração prévia de dexametasona reduz o efeito bloqueador da JBU. Além disso, o Jbtx, nas doses mais baixas (2,5; 5 e 10 μ g/g), também induz bloqueio na força de contração muscular em baratas. Por fim, obteve-se sucesso no processo de expressão e purificação do peptídeo Jaburetox em *E. coli*, obtendo-se ao final do processo, aproximadamente 330 μ g/mL de peptídeo. Em conclusão, esse trabalho demonstra a viabilidade da urease de *Canavalia ensiformis* e do peptídeo Jaburetox como praguicidas naturais, induzindo neurotoxicidade periférica em insetos-alvo.

Palavras-chave: Ureases. Praguicida. Insetos. Acetilcolinesterase. Junção neuromuscular.

ABSTRACT

The growth of world population has generated a necessity of an increase in agricultural productivity using ecological pesticides. For these reasons, the natural compounds have been studied in order to develop safer products for consumers and to the environment. Plants have a range of biological and physicochemical properties that provide several possibilities of application, varying from the medical application to products for controlling the agricultural pests. Ureases are enzymes that are involved in plant defense mechanisms, showing entomotoxic properties, which are unrelated to its enzymatic activity. In addition, there are several isoforms of ureases, but this work covers only those related to the *Jack Bean* urease (JBU) isoform and its recombinant toxic peptide, Jaburetox. Therefore, the aim of this study was to investigate the entomotoxic effect of the *Canavalia ensiformis* urease (JBU) and its recombinant toxic peptide, Jaburetox (Jbtx) on the neuromuscular junction of *Nauphoeta cinerea* cockroach. In order to accomplish this, *in vivo* neuromuscular preparations of adult cockroaches were used together with *in vitro* assays of acetylcholinesterase activity, of the cockroach brain homogenate. The heterologous expression of Jaburetox peptide was carried out in *Escherichia coli*, and its purification was made by a nickel column chromatography. Thereby, our results show that JBU significantly inhibits the acetylcholinesterase (AChE) activity. When the cockroaches were treated with JBU (1.5; 3 and 6 μ g/g), there was an inhibition of 21.2 \pm 3%, 33 \pm 2% and 60 \pm 3% of AChE activity, respectively. The electromyographic assay shows that JBU induced a time-dependent neuromuscular blockage. When the 1.5 and 3 μ g/g doses were assayed, there was a blockage of 30 \pm 10% and 15 \pm 4% of twitch tension, respectively, after 120min of recordings. Moreover, the administration of the higher dose JBU (6 μ g/g) increased the neuromuscular inhibition (65 \pm 8%), after 120min of recording. Nevertheless, the pretreatment of the animals with dexamethasone (40 μ g/g) partially inhibited (~45%) the neuromuscular blocking effect of JBU (6 μ g/g). Furthermore, the electromyographic assay with Jbtx also induced a time-dependent neuromuscular blockage. Thus, when the 2.5; 5 and 10 μ g/g doses were assayed, there was a blockage of 76 \pm 16%, 68 \pm 10% and 71 \pm 8% on twitch tension, after 120min of recording. Even though, when the higher dose (15 μ g/g) was assayed, there was no significative inhibition of the neuromuscular inhibition (22 \pm 12%). Taken together, the results indicate that JBU significantly inhibits the AChE activity in insects. Additionally, JBU (1.5 and 6 μ g/g) induced a progressive and significant inhibition of the neuromuscular twitches of *N.*

cinerea cockroaches. However, the pretreatment with dexamethasone decreases the JBU effect. Furthermore, Jbtx in lower doses (2.5, 5 and 10mg/g) also induced neuromuscular blockage of *N. cinerea* cockroach. Finally, success was achieved in the process of expression and purification of the peptide Jaburetox in *E. coli*, yielding in the end of the process, approximately 330µg/mL of the peptide. In conclusion, this work demonstrated the viability of *Canavalia ensiformis* urease and its peptide Jaburetox as natural pesticides, which induces the peripheral neurotoxicity in target insects.

Keywords: Ureases. Pesticides. Insects. Acetylcholinesterase. Neuromuscular junction.

LISTA DE ABREVIATURAS

JBU ou JBURE-I - *Jack Bean Urease I*

Jbtx – Jaburetox

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

CNTX – Canatoxina

NMDA - N-metil-D-aspartato

AMPA - Ácido α -amino- 3-hidroximetil-4-isoxazolepropionico

GABA - Ácido γ -aminobutírico

JNM - Junção neuromuscular

GLU – Glutamato

SNP – Sistema nervoso periférico

SNC – Sistema nervoso central

IPTG - Isopropil β - D -1-tiogalactopiranósido

SDS-PAGE - Dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

ABA - ácido abcísico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Importância da agricultura	12
1.2 O uso indiscriminado de agentes químicos e seus efeitos	13
1.3 Plantas como fonte de compostos com atividade praguicida	13
1.4 Ureases	15
1.4.1 Jack Bean Urease (JBU)	16
1.4.2 Jaburetox (Jbtx)	17
1.5 Modelo de estudo, barata (<i>Nauphoeta cinerea</i>)	18
1.6 Sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de baratas	19
1.6.1 Sistema colinérgico	21
1.6.2 Sistema glutamatérgico	22
1.6.3 Sistema gabaérgico	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais	23
3.2 Reagentes e Drogas	24
3.3 Solução Fisiológica para Insetos	24
3.4 Ensaio Bioquímico	24
3.4.1 Medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)	24
3.5 Preparação Biológica	25
3.5.1 Preparação junção neuromuscular de baratas	25
3.6 Expressão heteróloga e purificação do peptídeo recombinante Jaburetox	26
3.7 Análise Estatística	27
4. RESULTADOS	27
4.1 Efeito bloqueador neuromuscular da <i>Jack Bean Urease</i> (JBU) em <i>Nauphoeta cinerea</i>, ensaio eletromiográfico	27
4.2 Efeito da JBU sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)	28
4.3 Inibição do efeito neurotóxico da JBU pelo tratamento prévio com dexametasona em preparação neuromuscular de <i>Nauphoeta cinerea</i>, ensaio eletromiográfico	29

4.4 Expressão heteróloga e purificação do peptídeo recombinante Jaburetox (Jbtx)..	30
4.5 Atividade neurotóxica induzida pelo Jbtx em junção neuromuscular de baratas, ensaio eletromiográfico.....	32
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância da agricultura

A agricultura é uma prática básica de grande valor econômico e social. Além da função de produção de alimentos para a população, a agricultura tem um papel significativo na economia dos países que a executam. No Brasil, no ano de 2014 cerca de 23% do Produto Interno Bruto (PIB) foi representado pelo agronegócio, sendo 70% relacionados à atividade agrícola e 30% à atividade agropecuária (BRASIL, 2014). O desenvolvimento agrícola também tem impactado na geração de empregos formais, muitas vezes liderando o número de contratações, destacando-se no setor de serviços (SOCIEDADE RURAL BRASILEIRA, 2011).

Devido ao crescimento da população mundial, existe a necessidade inerente de um incremento na produtividade agrícola. Dados obtidos por KINKARTZ (2012), demonstram que no ritmo atual de crescimento populacional (cerca de 83 milhões de pessoas por ano), em 2050 o planeta terá nove bilhões de habitantes. Nesse contexto, é necessário aumentar a produtividade agrícola, não necessariamente expandindo a área de plantio, mas principalmente otimizando a capacidade de produção do solo.

Dessa forma, o aumento da prática agrícola vem intensificando cada vez mais o uso de agroquímicos (BALSAN, 2006). No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), houve um aumento de 163% no consumo de praguicidas entre os anos de 2000 e 2012 (ABRASCO, 2015). Assim, no ano de 2012 o volume de recursos gasto pelo Brasil com a compra de praguicidas foi de 9.71 bilhões de dólares (AGRIMONEY, 2013). Nesse sentido, os insetos-pragas têm sido uma das maiores causas de danos na produção de alimentos sendo estas perdas da ordem de 20 a 30% da produção mundial (ESTRUCH et al., 1997). A utilização exacerbada de agentes químicos, na tentativa de reduzir as pragas agrícolas e melhorar a produção, é então um dos fatores que mais vem preocupando a sociedade atual. Como resultado da aplicação excessiva de agrotóxicos em lavouras, tem-se aumentando os casos de intoxicação em animais e humanos, bem como a poluição ambiental (BETTIOL, 2012). Não obstante, os métodos convencionais de proteção das culturas, baseados no uso de agroquímicos, não têm evitado as altas perdas na produção agrícola (PEFERÖEN, 1997).

1.2 O uso indiscriminado de agentes químicos e seus efeitos

Após a revolução verde da década de 1940, o processo de produção agrícola sofreu uma grande mudança, quando os produtores começaram a investir mais na produção extensiva com maior possibilidade de lucro. Mas, para que isso fosse possível, houve a necessidade do emprego de defensivos químicos industrializados, caindo em desuso a aplicação de agentes naturais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE a). Atualmente o método mais eficiente para o controle de pragas nas lavouras é a aplicação de agroquímicos, os quais exibem um alto grau de acumulação no solo e nos alimentos (BALSAN, 2006; CANTARUTTI, et al., 2008).

Dessa forma, os praguicidas químicos podem contaminar o solo, recursos hídricos e afetar a fauna e a flora que estão próximas dos locais onde são aplicados (FREIRE DE MELO, et al., 2010). O fato dos defensivos químicos não possuírem especificidade para seus alvos, torna-os mais perigosos para o ambiente, pois também afetam organismos não-alvo. Um exemplo real desse problema é o colapso das abelhas, um fenômeno caracterizado pelo desaparecimento repentino das abelhas, que muitas vezes abandonam suas colmeias com crias e alimentos (PEREIRA, 2016). No caso das abelhas, acredita-se que dois grandes protagonistas do fenômeno de desaparecimento, são os praguicidas organofosforados e neonicotinóides (FAIRBROTHER, et al., 2014).

Pelo fato dos agentes químicos possuírem essa desvantagem ambiental as pesquisas para desenvolvimento e descoberta de produtos naturais vem se tornando mais frequentes. O fato dos consumidores preferirem alimentos mais saudáveis, impulsionou os produtores na busca de novas técnicas agrícolas com o uso de produtos menos agressivos ao meio ambiente (BETTIOL, 2012). Nesse sentido, os compostos naturais oriundos de metabólitos vegetais e animais, vêm sendo estudados com a finalidade de se desenvolver produtos mais seguros para o meio ambiente bem como para os consumidores.

1.3 Plantas como fonte de compostos com atividade praguicida

Ao longo dos séculos, a maioria dos praguicidas naturais foram substituídos por seus análogos sintéticos. Entre as principais razões para a popularização dos praguicidas sintéticos são o baixo custo, amplo espectro para ser usado em diferentes espécies de insetos e a sua

longevidade no campo. Contudo, essas características que inicialmente pareciam atraentes, revelaram-se catastróficas ao meio ambiente, já que os praguicidas químicos não fazem discriminação entre insetos praga e outras espécies de insetos benéficos. Além disso, a simplicidade da estrutura química dos praguicidas favorecem a resistência dos insetos (HEMINGWAY, et al., 2004; LI, 2004; SUZUKI & HAMA, 1998), o que normalmente, requer o aumento da dosagem e da frequência das aplicações, resultando em prejuízos ao meio ambiente. Por esses motivos a busca por novas moléculas naturais com potencial praguicida tem se tornado mais uma necessidade do que uma alternativa.

As piretrinas são compostos derivados das plantas do gênero *Pyrethrum* (*Tanacetum cinerariifolium*) que possuem ação praguicida (Revisado por ELLIOTT, 1976). Esse composto é um exemplo da aplicação de praguicidas derivados de produtos naturais, sendo mais seguro por possuir baixa persistência no ambiente e baixa toxicidade para vertebrados. Os piretróides são análogos sintéticos que foram desenvolvidos para substituir as piretrinas, pois são muito instáveis quando expostos ao ambiente. Contudo os piretróides mantiveram as características positivas das piretrinas, com a vantagem de serem estáveis quando expostos à luz solar e ao ar (CASIDA & QUISTAD, 1998).

O Brasil, como detentor da maior biodiversidade do planeta (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE b), pode contribuir com a descoberta de agentes agrotóxicos ecologicamente viáveis. Infelizmente, apenas 5,8% das patentes registradas sobre produtos oriundos de plantas nativas foram depositadas por brasileiros (PULPO, et al., 2007). Isso demonstra o quanto ainda temos que evoluir, no sentido de aumentarmos a disponibilidade de compostos de origem natural, viáveis para a utilização na agricultura.

As plantas possuem um vasto e desenvolvido arsenal de defesa contra fitopatógenos, predadores e agentes infecciosos como vírus, bactérias e fungos (RYAN, C.A., 1990; BOWLES, D.J., 1990). Essas defesas são baseadas em proteínas, como lectinas, arcelinas, chitinasas, e enzimas do tipo das ureases (OSBORN, et al., 1988; HERGET, et al., 1990; CARLINI, et al., 1997), que se acumulam principalmente nas folhas e sementes. A ampla diversidade das plantas, em relação às suas propriedades biológicas e físico-químicas (SIMÕES & SCHENKEL, 2002), proporcionam inúmeras aplicações, que variam da área médica, até produtos controladores de pragas como os praguicidas (PINTO et al., 2002). Dessa forma, o aumento do conhecimento sobre as propriedades não-enzimáticas das ureases tem revelado o seu potencial como agente praguicida natural (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012).

1.4 Ureases

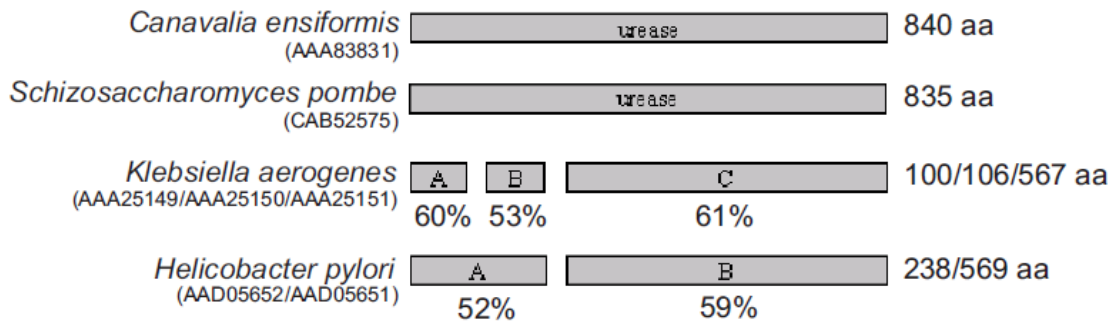
As ureases (ureia amidohidrolases, EC 3.5.1.5), constituem uma classe de proteínas encontradas em plantas, bactérias e fungos (MOBLEY, et al., 1995), são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono (DIXON, 1974), possibilitando a utilização da ureia como fonte de nitrogênio (JABRI, et al., 1995). As ureases de plantas e fungos são proteínas homo-oligoméricas com subunidades de 90 kDa. A *Canavalia ensiformis* e o *Schizosaccharomyces pombe* são exemplos de organismos que sintetizam esses tipos de ureases. Já as ureases bacterianas são proteínas multiméricas compostas de duas ou três subunidades (ex.: *Helicobacter pylori* e *Klebsiella aerogenes*) (Fig. 1) (MOBLEY et al., 1995; SIRKO & BRODZIK, 2000).

As principais ureases de plantas estudadas são derivadas da *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco). A primeira isoforma de urease tóxica isolada foi a Canatoxina (CNTX) em 1981 (CARLINI & GUIMARÃES, 1981). Essa isoforma apresenta atividade praguicida (FERREIRA-DA SILVA, et al., 2000; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002), evidenciando assim seu papel na defesa das plantas contra agentes patogênicos. Esse último efeito é independente da sua atividade enzimática (FOLLMER, et al., 2004). Para que a urease possa atuar como inseticida, é necessária a ingestão da proteína pelo inseto. Assim, a enzima digestiva catepsina promove a clivagem da canatoxina, gerando peptídeos de 10kDa, chamado de pepcanatox. O pepcanatox é o responsável pela letalidade induzida pela urease em insetos, os quais possuem enzimas digestivas do tipo catepsina (CARLINI, et al., 1997).

Posteriormente no trabalho de TAKASHIMA, et al. (1988) foi determinado a estrutura primária das ureases, intitulada *Jack Bean Urease I* (JBURE-I ou JBU), a qual é constituída por 840 aminoácidos e peso molecular de 90.770 Da (TAKASHIMA, et al., 1988). Em 2003, outra isoforma de urease foi proposta por PIRES-ALVES, et al. (2003), o estudo foi baseado em um ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) derivado do tratamento de plântulas com ácido abscísico (ABA), esse cDNA foi comparado com o banco de dados e apresentou 86% de similaridade com a urease primária (JBURE-I). Essa última proteína foi classificada como da família das ureases, e nomeada *Jack Bean Urease II* (JBURE-II) (PIRES-ALVES, et al., 2003).

No ano de 2007 foi desenvolvida a mais recente isoforma derivada das ureases, um peptídeo com aproximadamente 10 kDa, chamado de Jaburetox. Esse peptídeo é recombinante, clonado a partir de *primers* da sequência N-terminal do pepcanatox utilizando o cDNA da JBURE-II para a amplificação, resultando em um produto de 270 pares de bases, equivalente

ao pepcanatox (sequência de aminoácidos resultante da clivagem da canatoxina pela enzima digestiva catepsina) (MULINARI, et al., 2007).



Fonte: SIRKO & BRODZIK, 2000.

FIGURA 1 - Representação esquemática comparando as subunidades estruturais das ureases de diferentes organismos. O nome de cada organismo com o devido número de acesso no GenBank (lado esquerdo) e o número de aminoácidos (lado direito) presente em cada urease. Os valores representados em porcentagem abaixo da representação da *Klebsiella aerogenes* e *Helicobacter pylori* são referentes ao grau de identidade dessas ureases com a *Jack Bean* (*Canavalia ensiformis*).

1.4.1 Jack Bean Urease (JBU)

A *Jack Bean Urease* (JBURE-I ou JBU), é uma proteína composta por 840 aminoácidos e peso molecular de 90.770 Da. Essa isoforma é a mais abundante nas sementes da planta *Canavalia ensiformis*. A urease JBU possui uma contribuição histórica para a ciência, pois foi a primeira enzima a ser cristalizada, esse achado permitiu o pesquisador Sumner demonstrar que enzimas são proteínas (SUMNER, 1926). A urease JBU tem sido amplamente estudada por apresentar propriedade praguicida que não está relacionada com a atividade enzimática (FOLLMER, et al., 2004). Estudos anteriores em insetos, relatam que a JBU tem ação sobre os túbulos de Malpighi e que isso ocorre através da modulação da via dos eicosanoides (STANISÇUASKI, et al., 2009). Nos trabalhos realizados com *Bombyx mori* (HIRAYAMA, et al. 2000; KURAHASHI, et al., 2005) e com *Rhodnius prolixus* (STANISÇUASKI, et al., 2010) foi demonstrado que a JBU pode transpassar o epitélio intestinal para a hemolinfa do inseto, atingindo os tecidos e potencialmente causando alterações nos processos fisiológicos desses animais. Contudo ainda há outros mecanismos de ação dessa proteína em insetos, que ainda não

são bem conhecidos, principalmente àqueles associados à atividade sobre o sistema nervoso (MARTINELLI, et al., 2014).

1.4.2 Jaburetox (Jbtx)

Jaburetox é um peptídeo de 93 aminoácidos obtido através da expressão heteróloga em *Escherichia coli* (TOMAZETTO, et al., 2007). Esse peptídeo recombinante é equivalente ao peptídeo entomotóxico (pepcanatox) resultante da hidrólise da canatoxina (CNTX) pela catepsina, enzima presente no sistema digestório de alguns insetos (MULINARI, et al., 2007). Estudos vêm sendo realizados para caracterizar o mecanismo de ação desse peptídeo, principalmente sobre o sistema nervoso de insetos (BARROS, et al., 2009; PIOVESAN, et al., 2014). Com a finalidade de identificar qual o motivo estrutural do peptídeo possui relação com os efeitos tóxicos, foram desenvolvidas três versões do peptídeo nomeadas Jbtx $\Delta\beta$, Jbtx N-ter e Jbtx C-ter (Fig. 2). Sendo, o Jbtx $\Delta\beta$ uma variação do peptídeo sem a porção β -hairpin (aminoácidos 61-74), o Jbtx N-ter apenas a parte N-terminal do peptídeo (aminoácidos 1-44) e o Jbtx C-ter compreendendo apenas a porção C-terminal da sequência (aminoácidos 45-93) (MARTINELLI, et al., 2014).

Estudos anteriores demonstraram que esse peptídeo, possui toxicidade restrita aos insetos e não exerce efeito sobre ratos ou camundongos quando administrado por via oral (STANISÇUASKI, et al., 2005; TOMAZETTO, et al., 2007). Essa característica reforça as chances desse composto ser utilizado como biopraguicida em potencial.



Fonte: MARTINELLI, et al., 2014

FIGURA 2 - Representação esquemática do Jaburetox e das três versões mutantes, no lado esquerdo da figura estão os respectivos nomes e na porção à direita estão os aminoácidos correspondentes.

1.5 Modelo de estudo, barata (*Nauphoeta cinerea*)

As baratas são pertencentes ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta e ordem Blattaria. São encontradas em todas as partes do planeta, em diversos habitats (DA COSTA LIMA, 1939). Para muitos as baratas são consideradas apenas insetos-praga, no entanto são animais muito utilizados em ensaios de toxilogia, em protocolos de neurofarmacologia (revisado por STANKIEWICZ, et al., 2012).

Nesse sentido, torna-se importante ressaltar que o princípio biofísico do sistema nervoso dos insetos e dos mamíferos é bem semelhante; vários neurotransmissores são comuns aos dois organismos, embora a sua distribuição seja variável. Sendo assim, os estudos e observações feitas em baratas podem ser correlacionados, em sua grande maioria, ao de vertebrados (revisado por STANKIEWICZ, et al., 2012). Por exemplo, mais de 200 neurotransmissores e seus receptores já foram identificados no sistema nervoso de baratas, possuindo alto nível de identidade comparado aos de outros insetos mais evoluídos apresentando grande homologia molecular com os de animais vertebrados (FOURTNER & KAARS, 1990). Outra vantagem da utilização dos insetos como organismos-modelo, é a facilidade na montagem de preparações fisiológicas. Um bom exemplo, são as preparações de junção neuromuscular, as quais em insetos, respondem aos neurotransmissores glutamato (GLU) e ácido γ -aminobutírico (GABA), os mesmos do sistema nervoso de vertebrados (OSBOURE, 1996).

Outros fatores que têm estimulado o uso de baratas em ensaios laboratoriais, é a sua fácil adaptação em criadouros, seu ciclo de vida rápido, o tamanho reduzido, bem como o baixo custo de manutenção e principalmente a inexistência de fatores éticos para o seu uso. Em comparação com a *Periplaneta americana*, que é geralmente a barata mais utilizada em ensaios laboratoriais, a *Nauphoeta cinerea* (Fig. 3) é mais domesticada. Além disso, essa espécie não possui o inconveniente de voar, o que facilita a sua manipulação e manutenção.



Fonte: Do autor

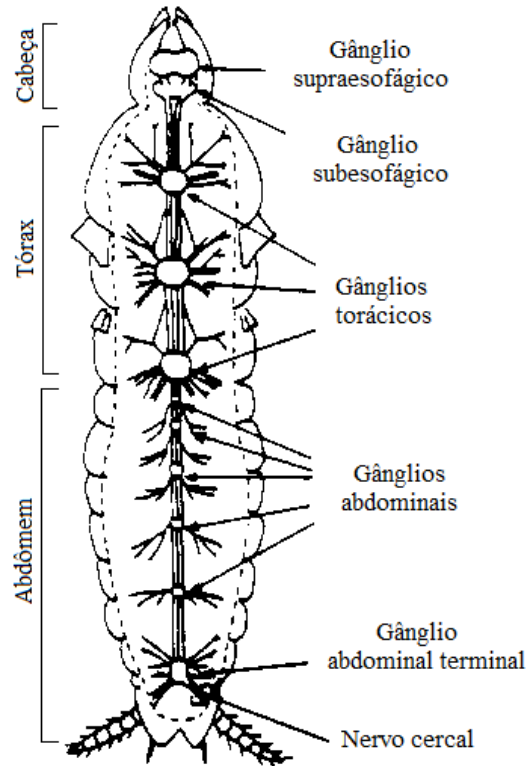
FIGURA 3 - Foto ilustrativa do organismo utilizado nos experimentos, barata da espécie *Nauphoeta cinerea*.

1.6 Sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de baratas

O funcionamento adequado do sistema nervoso requer um isolamento distinto dos sinais elétricos demandando um alto nível de regulação. O controle dessa complexa função inicia-se no nível dos canais iônicos e é mantido posteriormente, pelo efeito desses canais sobre a atividade de redes neurais altamente organizadas (CAVALHEIRO, et al., 1991). O sistema nervoso central (SNC) das baratas é formado basicamente por dois elementos morfológicos, gânglios e conectivos, sendo gânglios agregados de neurônios e os conectivos estruturas que

unem um gânglio ao outro, constituindo assim o caminho neural. Esse sistema é composto por onze gânglios sendo, dois gânglios presentes na cabeça (o supra e subesofágico), três gânglios no tórax (o pró -, meso- e metatorácico) e por fim os seis últimos gânglios localizados no abdômen (FOURTNER & KAARS, 1990) (Fig. 4). Os principais neurotransmissores que modulam esse sistema são acetilcolina, a dopamina, a octopamina, a 5-hidroxitriptamina e a histamina (TAYLOR & NEWBURGH, 1979; OSBOURE, 1996).

O gânglio supraesofágico é o local de recebimento das informações sensoriais, compreendendo a interação sináptica sensorial-motora, iniciação dos comandos para a ação locomotora e também integração dos reflexos neuroendócrinos. Esse gânglio é composto por três regiões, o protocérebro, deutocérebro e o tritocérebro, cada porção é responsável pelo controle de diversas partes do inseto, como por exemplo, pela parte sensorial e motora das antenas, parte motora dos corpos cardíacos e sensorial dos ocelos e componentes oculares. Em contribuição para o controle motor do inseto, o gânglio subesofágico tem por função controlar os músculos do aparelho bucal do animal (mandíbula, maxila e lábio) e o controle locomotor comportamental (Fig. 4). Os três gânglios torácicos são responsáveis pelo controle motor e sensorial da musculatura do pescoço, torácica, coxal, femoral e das asas. Os seis últimos gânglios abdominais inervam os espiráculos e a musculatura abdominal (OSBOURE, 1996; FORTNER & KAARS, 1990). As ramificações que partem principalmente do gânglio mesotorácico e inervam as regiões periféricas constituem o sistema nervoso periférico (SNP) do inseto (FOURTNER & KAARS, 1990). No sistema nervoso periférico, a transmissão entre neurônio e músculos acontece através da junção neuromuscular, que é modulada pela liberação do neurotransmissor inibitório, o ácido γ -aminobutírico (GABA) e excitatório, o glutamato (GLU) (OSBOURE, 1996).



Fonte: modificado de LEARN ZOOLOGY, 2013.

FIGURA 4 - Desenho esquemático do sistema nervoso central e periférico de barata.

1.6.1 Sistema colinérgico

A cinética de funcionamento do sistema colinérgico foi caracterizada através de estudos feitos em insetos, o qual compreende desde a conversão da colina e acetil-coenzima A na molécula de acetilcolina até a sua degradação pela acetilcolinesterase (PRESTCOTT, et al., 1977). O sistema colinérgico está presente principalmente no SNC dos insetos (TAYLOR & NEWBURGH, 1979). Por outro lado, também foi demonstrada a presença de receptores colinérgicos do tipo muscarínicos, nicotínicos e mistos (muscarinos/ nicotínicos) no sistema nervoso periférico (SNP) de insetos (DAVID & SATTELLE, 1984; BREER & SATTELLE, 1987). Os receptores nicotínicos estão presentes principalmente no SNC dos insetos; relatos na literatura mostram que esses receptores foram encontrados em gânglios subesofágicos de *Schistocerca gregaria* (FILBIN, et al., 1983), no sexto gânglio abdominal de *Periplaneta americana* (BREER & SATTELLE, 1987) e no cérebro de gafanhotos (HANKE & BREER, 1986). A presença dos receptores muscarínicos ocorre no SNP e SNC dos insetos estando

localizados na porção pré-sináptica do nervo, controlando a liberação de ACh (OSBOURE, 1996). Os receptores mistos estão presentes no SNC, e estudos realizados por ELDEFRAWI & O'BRIEN (1970), utilizando homogenizados de cérebro de moscas domésticas, demonstraram que existem sítios de ligação para ambos, com igual afinidade (ELDEFRAWI & O'BRIEN, 1970).

1.6.2 Sistema glutamatérgico

No SNP dos insetos, existe a presença prevalente do neurotransmissor glutamato, mas há relatos de sua presença também no SNC dos insetos (GILES & USHERWOOD, 1985; WAFFORD & SATTELLE, 1986). A ação excitatória do glutamato na junção neuromuscular dos insetos já é bem conhecida, tendo sido demonstrada a sua interação em preparações de músculo coxal de barata (KERKUT, et al., 1965). Os receptores de glutamato são do tipo ionotrópico e metabotrópico (mGluR), sendo os ionotrópicos definidos como NMDA (N-metil-D-aspartato) e não-NMDA, além do ácido α -amino-3-hidroxi-4-isoxazolepropionico (AMPA) e Kainato (LEE, et al., 2009).

1.6.3 Sistema gabaérgico

Esse sistema é modulado pelo neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA), que desencadeia respostas inibitórias na junção neuromuscular (JNM) (USHERWOOD & GRUNDFEST, 1965). Estudos realizados em barata *Periplaneta americana* mostram que o GABA provoca a ativação dos canais de Cl^- , resultando assim na inibição da neurotransmissão da JNM (PINNOCK, et al., 1988). O receptor de GABA é ligado aos canais de cloreto ($GABA_A$ R), sendo amplamente estudado pela neurociência e medicina, pois esses receptores estão distribuídos por todo o sistema nervoso de vertebrados e invertebrados (SMART, 1980; ACCARDI, et al., 2012). Por esse fato, são alvos de muitas drogas (GIELEN, et al., 2012) e praguicidas (HOSIE, et al., 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar o efeito entomotóxico da urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) e do peptídeo tóxico Jaburetox (Jbtx) sobre a junção neuromuscular de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a cinética do efeito neurotóxico induzido pela JBU em ensaios de dose-resposta em preparação neuromuscular *in vivo* de *N. cinerea*;
- Avaliar o efeito da JBU sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase de cérebro de *N. cinerea*;
- Investigar a influência de eicosanóides na neurotoxicidade da JBU em *N. cinerea*;
- Expressar e purificar o peptídeo tóxico Jbtx em cultura de *Escherichia coli*.
- Determinar a cinética do efeito neurotóxico induzido pelo Jbtx em ensaios de dose-resposta em preparação neuromuscular *in vivo* de *N. cinerea*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Baratas adultas de ambos os sexos da espécie *Nauphoeta cinerea* foram obtidas através de criadouro legalizado (Insetos online, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) e acondicionadas em caixas especiais para insetos. Os animais foram mantidos sob condições de laboratório com temperatura controlada (22-25°C), e com água e comida *ad libitum*.

3.2 Reagentes e Drogas

A urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) e o peptídeo tóxico (Jbtx) foram doados pelo laboratório LAPROTOX (Laboratório de Proteínas Tóxicas) sob a coordenação da Prof^a. Dra Célia Regina Carlini da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS e pelo Prof. Dr. Joseph Polacco da University of Missouri, Estados Unidos. Os demais reagentes e sais foram adquiridos das empresas, Sigma-Aldrich Brasil e Biorad.

3.3 Solução Fisiológica para Insetos

A solução salina para insetos foi preparada com a seguinte composição: NaCl 150mM, CaCl₂ 2mM, KCl 10mM e Tris 10mM em adição de água ultrapura até completar o volume, pH 6,8 ajustado com NaOH. O pH foi medido com pHmetro de eletrodo de vidro, previamente calibrado.

3.4 Ensaio Bioquímico

3.4.1 Medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A atividade *in vitro* da acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada de acordo com os ensaios descritos por ELLMAN, et al. (1961) com algumas modificações (FRANCO, et al. 2009). Após 6 horas do momento em que os animais foram injetados com as drogas, suas cabeças (n=6) foram removidas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e homogeneizadas com 600µL tampão fosfato salina fria (pH – 7,0) em eppendorfs com um sistema de agitação de esferas de aço (TissueLyser II). Logo após, o preparado foi centrifugado a 4000 rpm durante 5 minutos a uma temperatura de 4°C.

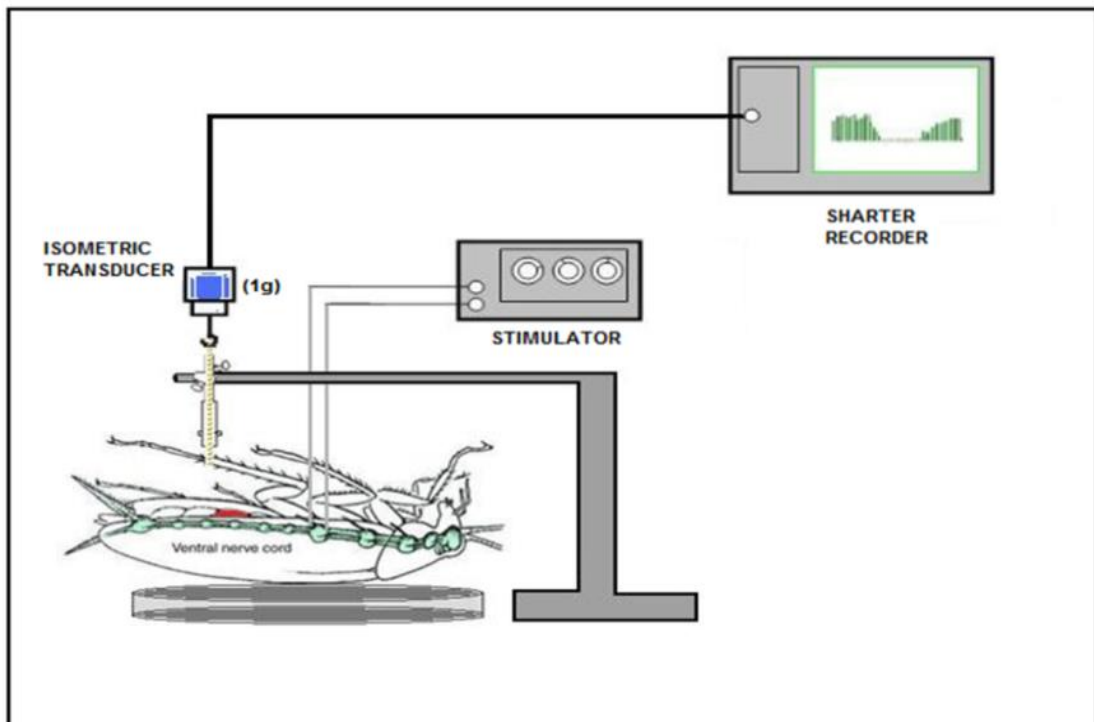
O sobrenadante foi retirado e isolado em recipiente estéril, sendo mantido no gelo até ser utilizado para determinação da atividade da acetilcolinesterase em espectrofotômetro a 412nm. Como controle positivos, utilizamos a solução salina e como controle negativo utilizou-

se o Triclorfon, organofosforado inibidor da AChE. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

3.5 Preparação Biológica

3.5.1 Preparação junção neuromuscular de baratas

Para analisar a neurotoxicidade periférica, foi utilizada a preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de baratas (MARTIMELLI, et al., 2014) (Fig. 5). Os animais foram anestesiados por resfriamento ($-20^{\circ}\text{C}/7\text{min}$), e afixados 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 de Ag/AgCl para fornecer estímulos elétricos. Os tratamentos com o Jaburetox, com a JBU e a dexametasona foram feitos utilizando uma seringa de Hamilton em um volume máximo de $20\mu\text{L}$. O nervo 5 foi estimulado a uma voltagem variando entre 2-5 volts e frequência de $0.5\text{Hz}/5\text{ms}$, 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).



Fonte: Modificado de DEMPSTER, 1988.

FIGURA 5 - Setup para registros *in vivo* de preparações neuromusculares.

3.6 Expressão heteróloga e purificação do peptídeo recombinante Jaburetox

O sub-peptídeo recombinante Jaburetox foi clonado no plasmídeo pET23a em linhagens de *Escherichia coli* BL 21, induzíveis com IPTG (Isopropil β - D -1-tiogalactopiranósido) e a expressão foi sob controle do promotor T7, como descrito por POSTAL, et al. (2012). Para a expressão, 250 mL de meio de cultura Luria Bertani contendo 100 μ g/mL de ampicilina foram inoculados com 10mL de culturas *overnight*. As bactérias cresceram sob temperatura constante (37°C) e agitação de 200rpm. Quando as culturas estavam com densidade óptica OD600= 0,7 foi adicionado 1mM de IPTG e deixado crescer por 3h. Após esse período a cultura foi centrifugada a 10.000rpm/10min e o pellet foi ressuspensionado em 10mL de tampão para lise (50mM Tris buffer 7,5pH, 500mM NaCl e 5mM imidazol). Procedeu-se a lise celular em uma prensa francesa e centrifugou-se novamente a 11.000rpm/30min a 4°C. A seguir, utilizou-se o sobrenadante e o pellet para o dodecil sulfato de sódio gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O sobrenadante foi adicionado na coluna de afinidade de níquel (Ni-NTA, QIAGEN). O processo de equilíbrio da coluna e purificação foi realizado segundo as recomendações do fabricante.

Todas as frações eluídas foram armazenadas em diferentes tubos para centrífuga (1mL) e a quantificação proteica foi realizada através do método Bradford (595nm). Para a remoção excessiva do imidazol, sal utilizado para eluir o peptídeo da coluna de níquel, utilizou-se a técnica usando-se colunas do tipo Centricon, realizada segundo as recomendações do fabricante. Para confirmação da presença do Jaburetox foi realizado Western blotting contra anticorpos de urease de soja. A massa molecular de aproximadamente 13kDa (10 kDa do Jaburetox-2 e 3 kDa do V-5 epitopo e 6 *His Tag*) foi considerada para o Jaburetox. Para confirmação da eficiência do anticorpo, extrato de sementes de soja que tinham a capacidade de expressar e de não expressar a urease foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, para o ensaio de Western blotting.

3.7 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) juntamente com o teste “*t*” de *Student* como *pos hoc*. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os gráficos foram plotados como média \pm erro-padrão usando o software Origin Pro 8,6 (OriginLab Corporation, MA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Efeito bloqueador neuromuscular da *Jack Bean Urease* (JBU) em *Nauphoeta cinerea*, ensaio eletromiográfico

A administração da JBU em diferentes doses (1,5; 3 e 6 μ g/g de animal) induziu um efeito de bloqueio neuromuscular tempo-dependente. Quando a dose de 1,5 μ g/g foi ensaiada houve um bloqueio de 30 \pm 10% em 120min de registro (n=6, Fig.6). Na dose de 3 μ g/g, houve um efeito inibitório da força de contração muscular máximo de 15 \pm 4%, em 120min (n=6, Fig7). Por outro lado, quando a dose de 6 μ g/g de animal foi administrada, houve um reforço do bloqueio neuromuscular que foi máximo para a dose ensaiada (65 \pm 8%) aos 120min de registro

(n=6, Fig.6). Também foram feitos ensaios controle onde somente foi utilizada a solução salina para insetos, que não induziu alteração na resposta contrátil em 120min de registro (Fig.6).

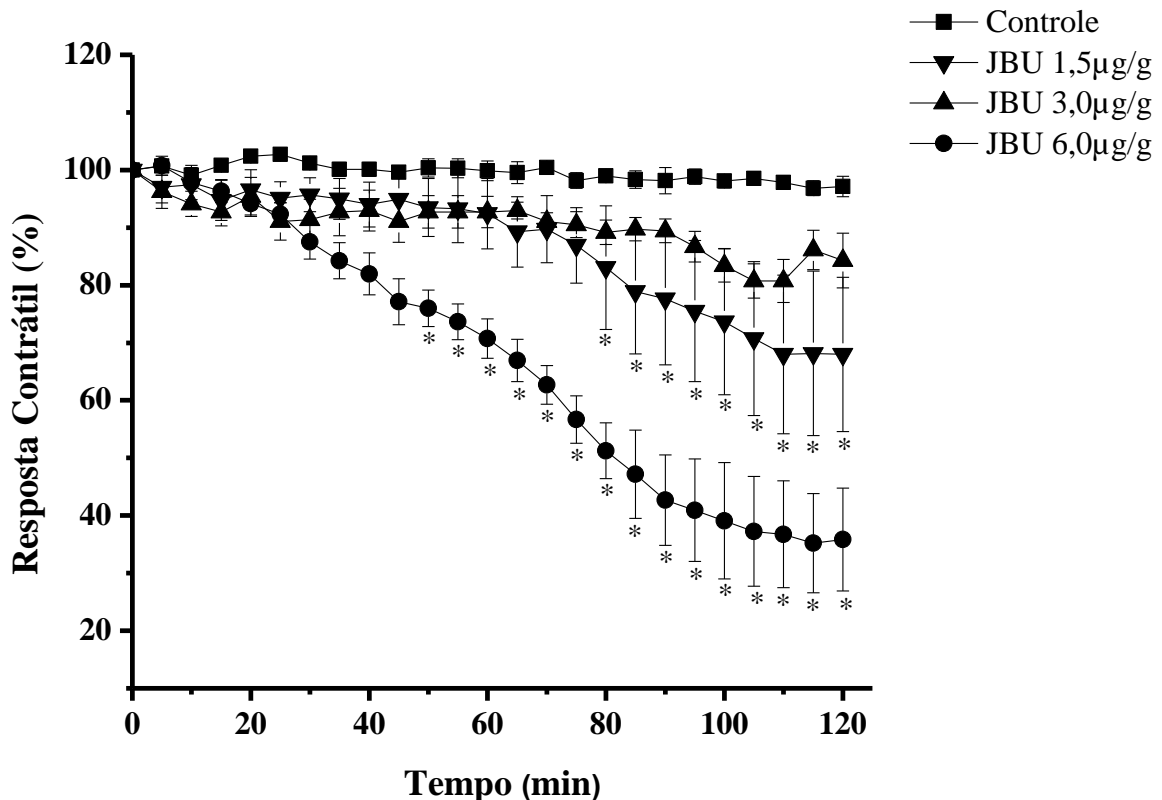


FIGURA 6 - Bloqueio neuromuscular induzido pela *Jack Bean Urease* (JBU) em preparação *in vivo* músculo-coxal adutor metatorácico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. No gráfico, cada ponto representa a média \pm E.P.M da resposta contrátil (%) em cada tratamento. Ensaios controle onde apenas solução salina foi administrada também foram realizados. * $p < 0.05$ em comparação com o controle salina.

4.2 Efeito da JBU sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A análise da atividade da AChE, em homogenato de cérebro de baratas, com a administração de diferentes concentrações de JBU (1,5; 3 e 6µg/g de animal) e Triclorfon (0,03µg/g de animal), revelaram uma inibição dose-dependente dessa enzima, em comparação com o controle salina. Assim, quando os animais foram tratados apenas com solução salina para insetos, o valor da atividade da enzima foi de 186 ± 3 mU/mg de proteína. Quando a JBU 1,5µg/g de animal (n=3, $p < 0,05$) foi administrada, houve inibição de apenas ($21.2 \pm 3\%$, n=3) ($p > 0.05$, comparado com o controle salina) (Fig. 7). Para a concentração de 3µg/g de animal

(n=3), houve inibição de ($33\pm 2\%$, n=3) ($p<0.05$). Com o aumento da concentração de JBU para $6\mu\text{g/g}$ de animal (n=3), houve um aumento da inibição da atividade da AChE para ($60\pm 3\%$) em comparação ao controle salina, sendo esta inibição similar à induzida pelo organofosforado Triclorfon (77 ± 5), um inibidor clássico da AChE (Fig. 7).

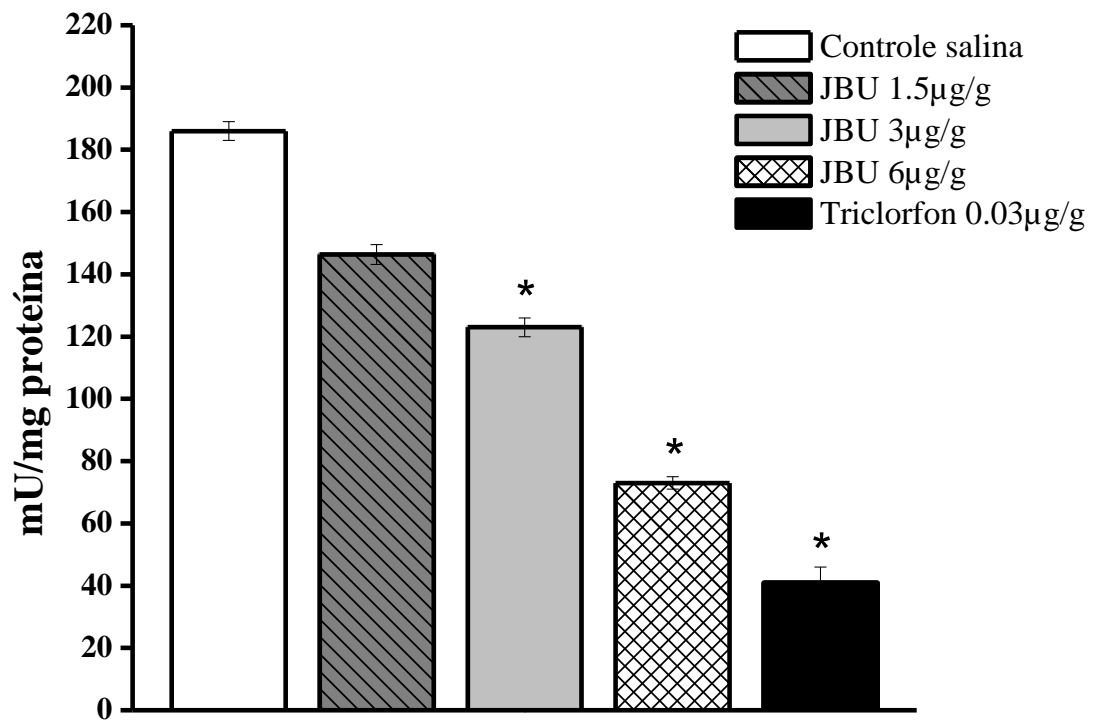


FIGURA 7 - Efeito da JBU (1,5; 3 e $6\mu\text{g/g}$ de animal) e do triclorfon sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em homogenato de cérebro de *Nauphoeta cinerea*. A atividade da acetilcolinesterase foi medida após exposição *in vivo* das baratas ao triclorfon e a diferentes doses de JBU, durante 6h. Os dados foram expressos como mU/mg de proteína. * $p<0.05$ em comparação com o controle salina

4.3 Inibição do efeito neurotóxico da JBU pelo tratamento prévio com dexametasona em preparação neuromuscular de *Nauphoeta cinerea*, ensaio eletromiográfico.

Sabe-se que existe uma relação entre a formação de compostos pró-inflamatórios, eicosanoides, e os efeitos neurotóxicos induzidos pela urease de *Canavalia ensiformis* em insetos da espécie *Rhodnius prolixus* (UBERTI et al., 2013). Dessa forma, realizou-se ensaios com a dexametasona, um glicocorticoide, anti-inflamatório que possui a capacidade de inibir a fosfolipase A₂ de membranas, o qual inibe a cascata de produção dos eicosanoides (STANLEY-

SAMUELSON et al., 1991). A administração de dexametasona ($40\mu\text{g/g}$ de animal) isoladamente na preparação neuromuscular induziu um bloqueio de $32\pm 3\%$, em 120min de registro ($p < 0.05$, $n=6$). Quando a dexametasona ($40\mu\text{g/g}$ de animal) foi administrada 15 minutos antes do tratamento com JBU $6\mu\text{g/g}$, houve uma inibição de aproximadamente 45% da resposta bloqueadora induzida pela urease isolada ($n=6$, $p < 0.05$ comparado com o controle positivo somente com a urease) (Fig. 8).

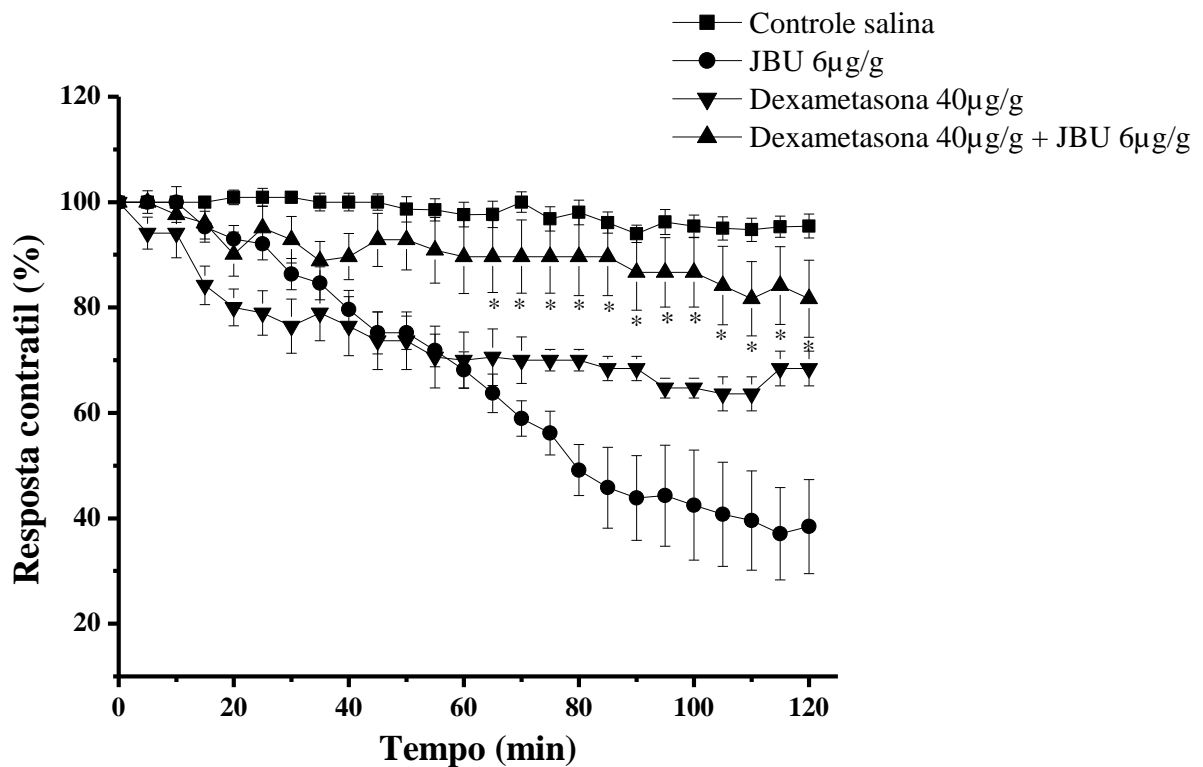
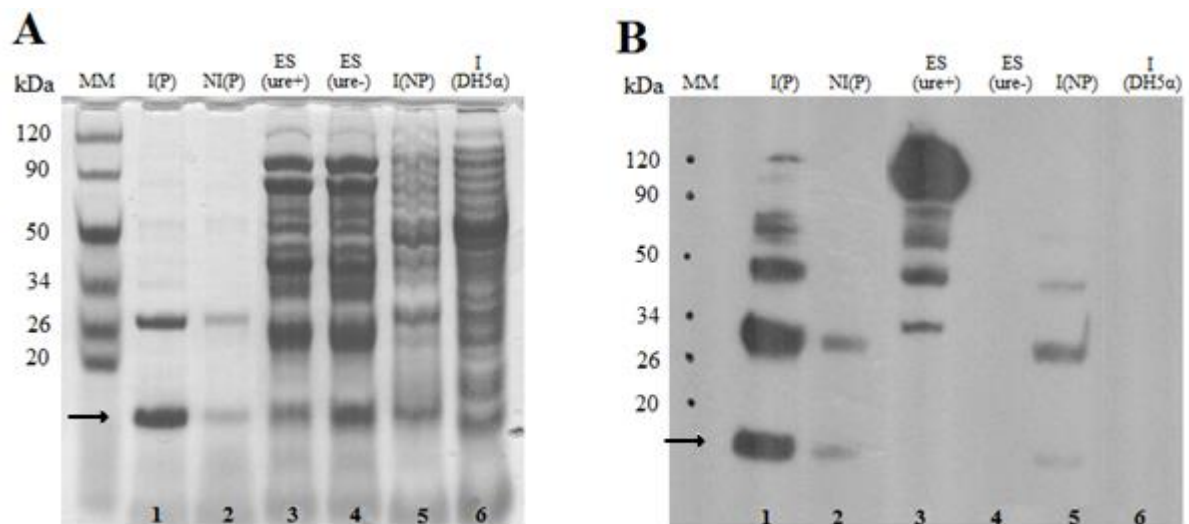


FIGURA 8 – Prevenção do efeito neurotóxico induzido pela JBU em preparação neuromuscular de barata *in vivo* pelo tratamento prévio com dexametasona. No gráfico cada ponto representa a média \pm E.P.M da cinética da resposta contrátil (%), relativa aos diferentes tratamentos. Também foram realizados ensaios controle apenas com solução salina para insetos. * $p < 0.05$ em comparação com o controle positivo JBU.

4.4 Expressão heteróloga e purificação do peptídeo recombinante Jaburetox (Jbtx)

As linhagens mutantes de *E. coli* BL 21 (pET 23a) resultaram na expressão do peptídeo recombinante Jaburetox. A banda correspondente ao Jaburetox 13kDa (10 kDa do Jaburetox e 3 kDa do epítipo V-5 e 6 His Tag) foi observada no gel SDS-PAGE na fração que corresponde

ao lisado de *E. coli* (BL 21) induzidas durante 3h com IPTG (0,1mM), fração purificada (Fig 9A). Posteriormente, foram feitos ensaio de western blotting com anticorpos policlonais contra ureases de sementes de soja, para a confirmação da presença do peptídeo (Fig. 9B). Os extratos de sementes de soja foram utilizados como controles positivos e negativos, os quais podiam conter ou não a urease expressa, respectivamente. Além disso, testou-se o sobrenadante dos lisados celulares de *E. coli* BL 21 e DH5- α para confirmar que apenas BL 21 era capaz de expressar o peptídeo Jaburetox. O rendimento final do peptídeo Jaburetox purificado foi de aproximadamente 330 μ g/mL, sendo que a quantificação foi realizada por meio do método de Bradford (595nm). Por fim, o gel SDS-PAGE, juntamente com o western blotting confirmaram que o processo de purificação com coluna de níquel funcionou como o esperado.



Fonte: Do autor.

FIGURA 9 - Expressão do peptídeo Jaburetox recombinante. (A) SDS-PAGE (12,5%) análise do Jaburetox nas células lisadas (peptídeo purificado e não purificado). (B) Análise de Western blot com anti-soro (policlonal) de urease de semente de soja. **Linha 1:** Lisado de *E. coli* BL 21 induzidas durante 3h com IPTG (0,1 mM), fração purificada; **Linha 2:** Lisado de *E. coli* BL 21 não induzidas com IPTG (0,1mM), fração purificada; **Linha 3:** Extrato de sementes de soja que produzem urease (*eul*, “Williams 82”); **Linha 4:** Extrato de sementes de soja que não produzem urease (*eul-a*); **Linha 5:** Sobrenadante do lisado total de *E. coli* BL 21 induzidas com IPTG (0,1mM durante 3h) fração não purificada; **Linha 6:** Lisado de *E. coli* DH5- α (não possuem o plasmídeo que produz o Jaburetox) induzidas com IPTG. A flecha está indicando o peso molecular de 13kDa, correspondente ao Jaburetox.

4.5 Atividade neurotóxica induzida pelo Jbtx em junção neuromuscular de baratas, ensaio eletromiográfico

A preparação *in vivo* nervo-músculo coxal de barata (*Nauphoeta cinerea*) foi feita para avaliar o efeito do peptídeo recombinante Jaburetox sobre a placa motora de insetos. Nesse sentido, o peptídeo foi dissolvido em solução salina para insetos, e ensaiado nas concentrações de (2,5; 5; 10 e 15 μ g/g de animal). Ensaio controle salina também foram realizados. Assim, a administração do Jbtx em diferentes concentrações induziu um efeito tempo-dependente em 120min de registro. Nestes ensaios, as doses de 2,5; 5 e 10 μ g/g induziram 76 \pm 16%, 68 \pm 10% e 71 \pm 8% de inibição da resposta contrátil respectivamente, em 120min de registros (n=6, p<0.05 em relação ao controle salina). Por outro lado, quando a dose de 15 μ g/g de animal foi ensaiada, houve apenas 22 \pm 12% de inibição da resposta contrátil (n=6, p>0.05). Nos ensaios realizados apenas com a solução salina para insetos não houve alteração da resposta contrátil, em 120 min de registro (n=6) (Fig.10).

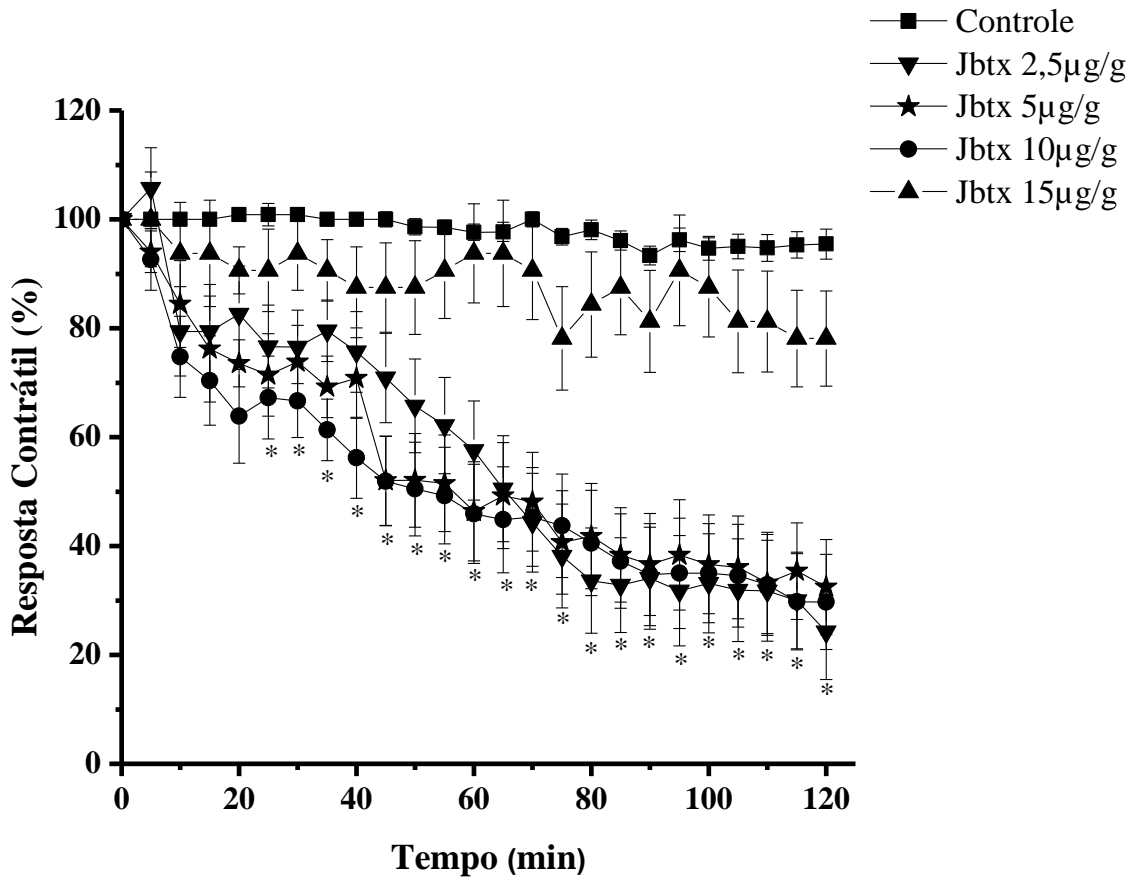


FIGURA 10 - Bloqueio neuromuscular induzido pelo peptídeo tóxico Jaburetox (Jbtx) em preparação nervo-músculo coxal abdutor metatorácico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. No gráfico cada ponto representa a média \pm E.P.M da resposta contrátil (%) em diferentes tempos, relativa aos tratamentos. Também foram feitos ensaios controle com solução salina para insetos. * $p < 0.05$ em comparação com o controle salina.

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho investigou-se o efeito entomotóxico da urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) e do peptídeo tóxico Jaburetox (Jbtx) sobre a junção neuromuscular de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Em especial, verificou-se a influência de mediadores pró-inflamatórios na neurotoxicidade induzida pela JBU em baratas. Também, obteve-se sucesso no processo de expressão heteróloga e purificação do peptídeo Jaburetox em bactérias *E. coli*, alcançando ao final do processo de purificação, aproximadamente 330µg/mL de peptídeo.

Foi demonstrado que a administração da JBU nas baratas induziu bloqueio neuromuscular irreversível (Fig. 6). Em insetos, sabe-se que a junção neuromuscular se vale do glutamato como o principal neurotransmissor excitatório e do GABA, como o principal

neurotransmissor inibitório (USHERWOOD & GRUNDFEST, 1965; PINNOCK, et al., 1988; KERKUT, et al., 1965). Além disso, na placa motora de insetos, a liberação do glutamato ou do GABA na fenda sináptica pode induzir tanto o aumento quanto a diminuição na força de contração muscular, dependendo do tipo de músculo ou da fenda sináptica correspondente à junção neuromuscular (CHAPMAN, 2013). Nesse sentido, a JBU poderia induzir o bloqueio neuromuscular em *N. cinerea* por aumentar a neurotransmissão gabaérgica ou por inibição das vias glutamatérgicas.

No nosso modelo experimental, a contração muscular foi obtida pela estimulação do nervo 5. Em baratas, o axônio do neurônio motor depressor coxal lento (Ds) parte do gânglio metatorácico a partir do nervo 5 e inerva o músculo depressor coxal (músculo 177D) (CARR & FOURTNER, 1980). Ensaios imunológicos da região metatorácica em gafanhoto *Schistocerca gregaria*, revelam que pelo menos duas inervações de neurônios inibitórios (gabaérgicos) partem do nervo 5 para o gânglio metatorácico (WATSON, 1986). Ao longo do nervo 5 a atividade é conduzida centralmente (vindo de sinais aferentes dos órgãos sensoriais) ou periféricamente, para o gânglio metatorácico através do motoneurônio monossináptico conectado à via de sinapses colinérgicas (CARR & FOURTNER, 1980).

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, observamos que a atividade da enzima acetilcolinesterase foi diminuída, nos ensaios que foram realizados com cérebro de baratas (Fig. 7). Nesse sentido, a inibição da atividade da enzima AChE induziria um aumento da concentração de acetilcolina nas sinapses colinérgicas (COSTA, 2006). Além disso, o fato de em nossas condições experimentais não visualizarmos nenhuma atividade facilitadora da força de contração muscular em presença da JBU (Fig. 6), reforça a ideia de que os neurônios gabaérgicos poderiam estar sendo ativados (BUCKINGHAM, et al., 2005).

Mesmo tendo os dados acima como base, 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. Ensaios para medida da atividade da enzima creatina quinase estão sendo viabilizados, o que poderia confirmar uma atividade direta da urease sobre a musculatura esquelética da barata.

Recentemente foi demonstrado o papel do óxido nítrico (NO) sobre a junção neuromuscular de insetos, evidenciando que o mesmo, quando em concentração aumentada em terminais nervosos pré-sinápticos, estimula 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 prévia de dexametasona. Dessa forma, foi elaborado um protocolo para evidenciar o envolvimento do óxido nítrico na atividade neurotóxica da JBU em baratas. Assim, foi demonstrado, em nossas condições experimentais, que a administração prévia da dexametasona, seguida da JBU, inibiu parcialmente o bloqueio neuromuscular induzido pela urease. A dexametasona é um anti-inflamatório esteroide, o qual inibe a atividade da fosfolipase A₂ em membranas biológicas de insetos (STANLEY-SAMUELSON et al., 1991). A rota dos eicosanóides inicia-se com a liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolípidos das membranas celulares, por ação de uma fosfolipase A₂. Em cada tipo de célula ou tecido existe um conjunto de enzimas que convertem o ácido araquidônico em metabólitos, os eicosanóides, tais como: prostaglandinas, tromboxanos, epóxidos, leucotrienos, hidroperóxidos (CHABNER, et al., 2011). A biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina e é catalisada pela enzima NO sintetase (NOS) (PUFAHL, et al., 1992) com a participação da forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), como um doador de elétrons. As enzimas constituintes estão fisiologicamente presentes na célula, enquanto as outras são induzidas por mecanismo externo, 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) (IGNARRO, 1990), 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) (SERBINA, et al., 2003).

Assim, nossos dados corroboram esses achados e suportam a ideia de que, pelo menos em parte, o efeito bloqueador neuromuscular da JBU envolveria a produção de mediadores pró-inflamatórios, que possivelmente estimulariam a enzima NO induzida, aumentando assim a quantidade de NO, resultando no aumento da liberação do neurotransmissor GABA.

Os registros eletromiográficos de baratas administradas com Jbtx, peptídeo tóxico recombinante, revelaram uma atividade de bloqueio neuromuscular (Fig. 10). Esses resultados corroboram com os dados obtidos no ensaio miográficos feitos com a JBU (Fig. 6). Sabe-se que muitas propriedades biológicas, mas não todas elas, são compartilhadas entre a molécula de urease e o seu peptídeo tóxico, Jaburetox. Particularmente relevante para os presentes resultados, estudos prévios do nosso grupo têm demonstrado que em concentrações de nano molar a JBU e o Jbtx são capazes de permeabilizar uma bicamada lipídica artificial, resultando

na criação de canais catiônicos seletivos (PIOVESAN, et al., 2014). A região da molécula de JBU que compreende a sequência do Jaburetox está mais exposta à superfície da proteína. Sendo assim, possivelmente a porção que corresponde ao Jbtx media a maioria das interações da molécula de urease com o seu alvo (PIOVESAN, et al., 2014). Contudo, a maior dose (15 μ g/g) de Jbtx resultou em bloqueio neuromuscular não significativo em relação ao controle. Esse fenômeno de diminuição da atividade farmacológica em doses mais altas também foi observado com a JBU por FOLLMER, et al. (2004). Este último, demonstrou que em solução, a JBU sofre um processo de oligomerização, dependente da concentração, que pode levar à formação de porções oligoméricas menos ativas (FOLLMER, et al., 2004). Sendo assim, a possível oligomerização do peptídeo Jbtx não estaria completamente descartada, já que no gel SDS-PAGE dimerizações do peptídeo podem ser observadas. Por outro lado, outra possível explicação para a redução do efeito em doses maiores seria o envelhecimento do composto em solução, resultando na recorrente perda da sua atividade farmacológica.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nos aspectos discutidos pode-se inferir que a JBU possui atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase em insetos. Que nas doses de 1,5 e 6 μ g/g a JBU induz inibição da força de contração muscular progressiva e significativa em preparação neuromuscular de *Nauphoeta cinerea in vivo*. Contudo, quando a barata é tratada previamente com dexametasona (40 μ g/g) o efeito bloqueador da JBU 6 μ g/g é inibido (~45%). Além disso, acredita-se que o bloqueio neuromuscular promovido pela JBU ocorre através da interação com as vias de sinalização colinérgicas e gabaérgicas, bem como, envolvendo a produção de mediadores pró-inflamatórios. Do mesmo modo, conclui-se que o Jbtx, em doses mais baixas (2,5; 5 e 10 μ g/g) também resulta em atividade inibitória na força de contração muscular em baratas. Por fim, obteve-se sucesso no processo de expressão heteróloga e purificação do peptídeo Jaburetox em *E. coli*.

REFERÊNCIAS

ABRASCO (Brasil). **Brazil: Pesticide Use Jumped 162% in 12 Years**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://fracturedparadigm.com/2015/07/27/brazil-pesticide-use-jumped-162-in-12-years/>> Acesso em: 21 mar. de 2016.

ACCARDI, M.V.; BEECH, R.N.; FORRESTER, S.G. **Nematode cys-loop GABA receptors: biological function, pharmacology and sites of action for anthelmintics**. *Invert Neurosci.*, v.12, p.3–12, 2012.

AGRIMONEY. **Insect threats lift Brazil pesticide bill to \$10bn**. Reino Unido, 2013. Disponível em: <[http://www.agrimoney.com/news/insect-threats-lift-brazil-pesticide-bill-to-\\$10bn--5758.html](http://www.agrimoney.com/news/insect-threats-lift-brazil-pesticide-bill-to-$10bn--5758.html)>. Acesso em: 12 de abr. de 2016.

BALSAN, R. **Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira**. *CAMPO-TERRITÓRIO: revista de geografia agrária*, Uberlândia, Edufu, v. 1, n. 2, p. 123-151, Ago. 2006.

BARROS, P.R.; STASSEN, H.; FREITAS, M.S.; CARLINI, C.R.; NASCIMENTO, M.A.; FOLLMER, C. **Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases**. *Biochim. Biophys. Acta.*, v.1794, p.1848–1854, 2009.

BETTIOL, W. **Produtos biocompatíveis para o controle de doenças de plantas**. Workshop Insumos para uma Agricultura Sustentável. Jaguariúna-SP. 2012. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77801/1/2012AA91.pdf>> Acesso em: 20 jan. 2016.

BOWLES, D.J. **Defense-related proteins in higher plants**. *Annu Rev Biochem.*, v.59, p.873-907, 1990

BREER, H.; SATTELLE, D. B. **Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors**. *J. Insect Physiol.*, v.33, p. 771-790, 1987.

BUCKINGHAM, S.D.; BIGGIN, P.C.; SATTELLE, B.M.; BROWN, L.A.; SATTELLE, D.B. **Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides**. *Mol. Pharmacol.*, v.68, p.942-951, 2005.

CANTARUTTI, T.F.P.; DE ARAÚJO, S.L.; ROSSI, S.C.; DALSENTER, P.R. **Resíduos de pesticidas em alimentos.** *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente*, Curitiba, v. 18, p. 9-16, jan./dez. 2008

CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A. **Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A.** *Toxicon*, v.19, p.667-675, 1981.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides.** *Toxicon*, v. 11, p. 1515-1539, 2002.

CARLINI, C.R.; OLIVEIRA, A.E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M.A. **Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes.** *J. Econ. Entomol.*, v. 90, p.340–348, 1997.

CARR, C. E.; FOURTNER, C. R. **Pharmacological analysis of a monosynaptic reflex in the cockroach, *Periplaneta americana*.** *J. exp. Biol.*, v.86, p.259-2, 1980.

CASIDA, J.E. & QUISTAD, G.B. **GOLDEN AGE OF INSECTICIDE RESEARCH: Past, Present, or Future?** *Annu. Rev. Entomol.*, v.43, p.1–16, 1998.

CAVALHEIRO, E.A.; LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; TURSKI, W.A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. **Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures.** *Epilepsia*, v. 32, p.778-82, 1991.

CHABNER, B.; BRUNTON, L.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, ed. 12, McGraw-Hill Education, 2011, 1808 p.

CHAPMAN, R.F. **The insects, Structure and Function**, ed.5, Cambridge University Press, 2013, 929 p.

COSTA, L.G. **Current issues in organophosphate toxicology.** *Clinica Chimica Acta*, v.366, p.1-13, 2006.

DA COSTA LIMA, A. M. **Insetos do Brasil.** Rio de Janeiro: Oficinas de Obras do Jornal do Comercio. Vol 1, 1939.

DAVID, A.; SATTELLE, D. B. **Actions of cholinergic pharmacological agents on the cell body membrane of the fast coxal depressor motoneurone of the cockroach (*Periplaneta americana*).** *J. Exp. Biol.*, v.108, p.119- 136, 1984.

DEFFERRARI, M.S.; LEE, D.H.; FERNANDES, C.L.; ORCHARD, I.; CARLINI, C.R. **A phospholipase A2 gene is linked to Jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*.** *Biochimica et Biophysica Acta.*, v.1840, p.396–405, 2014.

DEMPSTER, J. **A set of computer programs for electrophysiological analysis of the end plate-current characteristics.** *Br. J. Pharmacol.*, v.85, p.390, 1988.

DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. **Jack-bean urease (EC 3.5.1.5) Metalloenzyme—Simple biological role for nickel.** *J. Am. Chem. Soc.*, v.97, p.4131–4133, 1975.

ELDEFRAWI, A. T.; O'BRIEN, R. D. **Binding of muscarone by extracts of housefly brain: relationship to receptors for acetylcholine.** *J. Neurochem.*, v.17, p.1287-1293, 1970.

ELLIOTT, M. **Properties and Applications of Pyrethroids.** *Environmental Health Perspectives.* v.14, p.3-13, 1976.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. **A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.** *Biochemical Pharmacology*, v.7, p.88, 1961.

ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; DUCK, N.B.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G. **Transgenic plants: an emerging approach to pest control.** *Nature Biotechnology*, New York, v.15, p.137-141, 1997.

FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELL, R. **Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees.** *Environ Toxicol Chem.*, v.4, p. 719–731, 2014.

FERREIRA-DA SILVA, C.T.; GOMBAROVITS, M.E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C.M.; CARLINI, C.R. **Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes.** *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, v.44, p.162-171, 2000.

FILBIN, M. T.; LUNT, G. G.; DONNELLAN, J. F. **Partial purification and characterisation of an acetylcholine receptor with nicotinic properties from the supraoesophageal ganglion of the locust (*Schistocerca gregaria*).** *Eur. J. Biochem.*, v.132, p.151-156, 1983.

FOLLMER, C.; PEREIRA, F. V.; SILVEIRA, N. P.; CARLINI, C. R. **Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering.** *Biophysical Chemistry*, v.111, p.79– 87, 2004.

FOLLMER, C.; REAL-GUERRA, R.; WASSERMAN, GE.; OLIVERA-SEVERO, D.; CARLINI, CR. **Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity.** *Eur J Biochem.*, v.271, p.1357-1363, 2004.

FOURTNER, C. R.; KAARS, C.J. **Anatomy of the central nervous system and its usefulness as a model for neurobiology** in HUBER, I.; MASLER, E. P.; RAO, B. R. (Eds). *Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research*, II. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, p.3-34, 1990.

FRANCO J.L.; POSSER T.; MATTOS J.J.; TREVISAN, R.; BROCARDI, P.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B.; FARINA, M.; MARQUES, M.R.; BAINY, A.C.; DAFRE, A.L. **Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses.** *Toxicology Letters*, v.187, p.137-143, 2009.

FREIRE DE MELO, R.; DE LIMA BRITO, L.T.; PETRERE, V.G.; ANGELOTTI, F.; MIGUEL, A.A. **Pesticidas e seus impactos no ambiente.** 2010. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/89981/1/Roseli.pdf>>. Acesso em: 25 abr. de 2016.

GIELEN, M.C.; LUMB, M.J.; SMART, T.G. **Benzodiazepines modulate GABAA receptors by regulating the preactivation step after GABA binding.** *J Neurosci.*, v.32, p.5707–5715, 2012.

GILES, D.; USHERWOOD, P. N. R. **The effects of putative amino acid neurotransmitters on somata isolated from neurons of the locust central nervous system.** *Camp. Biochem. Physiol.*, v.80C, p.231-236, 1985.

HANKE, W.; BREER, H. **Channel properties of an insect neuronal acetylcholine receptor protein reconstituted in planar lipid bilayers.** *Nature*, v.321, p.171-174, 1986.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.J.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. **The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, p. 653-665, 2004.

HERGET, T.; SCHELL, J.; SCHREIER, P.H. **Elicitor-specific induction of one member of the chitinase gene family in *Arachis hypogaea*.** *Mol. Gen. Genet.*, v. 224, p.469–476, 1990.

HIRAYAMA, C.; SUGIMURA, M.; SAITO, H.; NAKAMURA, M. **Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.** *J. Insect Physiol.*, v.46, p.1415–1421, 2000.

HOSIE, A.M.; ARONSTEIN, K.; SATTELLE, D.B.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. **Molecular biology of insect neuronal GABA receptors.** *Trends Neurosci.*, v.20, p.578–583, 1997.

IGNARRO, L.J. **Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, v.30, p. 535-60, 1990.

JABRI, E.; CARR, M.B.; HAUSINGER, R.P.; KARPLUS, P.A. **The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*.** *Science*, v.268, p.998-1004, 1995.

KERKUT, G. A.; SHAPIRA, A.; WALKER, R. J. **The effect of acetylcholine, glutamic acid and GABA on the perfused cockroach leg.** *Comp. Biochem. Physiol.*, v.16, p.37-48, 1965.

KINKARTZ, S. **Crescimento populacional e o desafio da alimentação.** Disponível em: <<http://www.ufjf.br/ladem/2012/02/28/crescimento-populacional-e-o-desafio-da-alimentacao-por-sabine-kinkartz/>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

KURAHASHI, H.; ATIWETIN, P.; NAGAOKA, S.; MIYATA, S.; KITAJIMA, S.; SUGIMURA, Y. **Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm. *Bombyx mori*.** *J. Insect Physiol.*, v.51, p.1055–1061, 2005.

LEARN ZOOLOGY. **Nervous system of *Periplaneta americana*.** Disponível em:<<https://learnzoology.wordpress.com/2013/12/10/nervous-system-of-periplaneta-americana/>>. Acesso em 05 mai. 2016.

LEE, J.-Y.; BHATT, D.; BHATT, D.; CHUNG, W.Y.; COOPER R.L. **Furthering pharmacological and physiological assessment of the glutamatergic receptors at the *Drosophila* neuromuscular junction.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.150, p.546–557, 2009.

LI, F.; HAN, Z.J. **Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 34, p. 397- 405, 2004.

MARTINELLI, A.H.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M.S.; PIOVESAN, A.R.; STANISÇUASKI, F.; DEMARTINI, D.R.; DAL BELO C.A.; ALMEIDA, C.G.; 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. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1840, p.935–944, 2014.

MILLIGAN, G. **Constitutive Activity and Inverse Agonists of G Protein-Coupled Receptors: a Current Perspective.** *Mol. Pharmacol.*, v.64, p.1271–1276, 2003.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE a. **Agrotóxicos.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em: 19 fev. de 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE b. **Biodiversidade Brasileira.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 20 jan. de 2016.

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

MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; BERTHOLDO-VARGAS, L.R.; POSTAL, M.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; RIGDEN, D.J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; CARLINI, C.R. **Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*.** *Peptides*, v.28, p.2042-2050, 2007.

OSBORN, T.C.; ALEXANDER, D.C.; SUN, S.S.M.; CARDONA, C.; BLISS, F.A. **Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein.** *Science*, v. 240, p. 207–210, 1988.

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

PEFERÖEN, M. **Progress and prospects for field use of Bt genes in crops.** *Trends in Biotechnology*, Cambridge, v.15, p.173-177, 1997.

PEREIRA, F. **Desordem do Colapso das Colônias (DCC).** Disponível em: <<http://www.cpmn.embrapa.br/apicultura/desordemColapso.php>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

PINNOCK, R. D.; DAVID, J. A.; SATTELLE, D. B. **Ionic events following GABA receptor activation in an identified insect motor neuron.** *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v.232, p.457-470, 1988.

PINTO, A. C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas.** *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 45- 61, 2002.

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.** *Arch. Biochem. Biophys.*, v.547, p.6–17, 2014.

PIRES-ALVES, M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; BARCELLOS, G.B.; CARLINI, C.R.; MORAES, M.G. **Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC].** *Plant Cell Physiol.*, v. 44, p. 139-145, 2003.

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

PRESCOTT, D. J.; HILDEBRAND, J. G.; SANES, J. R.; JEWETT, S. **Biochemical and developmental studies of acetylcholine metabolism in the central nervous system of the moth *Munduca sexta*.** *Camp. Biochem. Physiol.*, v.56C, p.77-84, 1977.

PUFAHL, R.A.; NANJAPPAN, P.G.; WOODARD, R.W.; MARLETTA, M.A. **Mechanistic probes of N-hydroxylation of L-arginine by the inducible nitric oxide synthase from murine macrophages.** *Biochemistry*, v.31, p. 6822-8, 1992

PULPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. **Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais.** *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1446-55, 2007.

RYAN, C.A. **Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens.** *Annu. Rev. Phytopathol.*, v.28, p.425–449, 1990.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. **A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, n. 1, p.35-40, 2002.

SERBINA, N.V.; SALAZAR-MATHER, T.P.; BIRON, C.A.; KUZIEL, W.A.; PAMER, E.G. **TNF/*i*NOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection.** *Immunity*, v.19, p.59-70, 2003.

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

SMART, T.G. **Do motor-nerve terminals have gamma-aminobutyric acid receptors?** *Br. J. Pharmacol.*, v.71, p.279–286, 1980.

SOCIEDADE RURAL BRASILEIRA (BRASIL). **Agricultura lidera geração de empregos formais em maio.** São Paulo, 2011. Disponível em:<http://www.srb.org.br/noticias/article.php?article_id=5653> Acesso em: 20 jan de 2016.

STANISÇUASKI, F.; BRUGGE, V.T.; 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.*, v.55, p.255–263, 2009.

STANISÇUASKI, F.; BRUGGE, V.T.; CARLINI, C.R.; ORCHARD, I. **Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut.** *J. Insect Physiol.*, v.56, p.1078–1086, 2010

STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C.R. **Plant Ureases and Related Peptides: Understanding Their Entomotoxic Properties,** *Toxins*, v.4, p.55-67, 2012.

STANISCUASKI, 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*, v.45, p.753–760, 2005.

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*, v.2012, p.1-11, 2012.

STANLEY-SAMUELSON, D.W.; JENSEN, E.; NICKERSON, K.W.; TIEBEL, K.; OGG, C.L.; HOWARD, R.W. **Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids.** *Proc. Natl. Acad Sci.*, v.88, p.1064-1068, 1991

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

SUZUKI, K.; HAMA, H. **Carboxylesterase of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. Isoelectric point variants in an organophosphorus insecticide resistant clone 1, 2.** *Entomol. Zool.*, v.33, p. 11–20, 1998.

TAKASHIMA, K.; SUGA, T.; MAMIYA, G. **The structure of jackbean urease: the complete amino acid sequence, limited proteolysis and reactive cysteine residues.** *Eur. J. Biochem.*, v.175, p. 151–165, 1988.

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*, v.9, p.265-272, 1979.

TOMAZETTO, G.; MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; SETTEMBRINI, B.; CARLINI, C.R.; ZACHIAAYUB, M.A. **Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity.** *Enzym. Microb. Technol.*, v.41, p. 821–827, 2007.

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

USHERWOOD, P. N. R.; GRUNDFEST, H. **Peripheral inhibition in skeletal muscle of insects.** *J. Neurophysiol.*, v.28, p.497-518, 1965.

WAFFORD, K. A.; SATRELLE, D. B. **Effects of amino acid neurotransmitter candidates on an identified insect motoneurone.** *Neurosci. Lett.*, v.63, p.135-140, 1986.

WATSON, A. H. D. **The distribution of GABA-like immunoreactivity in the thoracic nervous system of the locust *Schistocerca gregaria*.** *Cell Tissue Res.*, v.246, p.331-341, 1986.

WILDEMANN, B. & BICKER, G. **Nitric oxide and cyclic GMP induce vesicle release at *Drosophila* neuromuscular junction.** *J Neurobiol.*, v.39, p.337-46, 1999.