

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

YURI CORREIA BARRETO

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À ENTOMOTOXICIDADE DA
UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE
Nauphoeta cinerea: ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS**

**São Gabriel
2022**

YURI CORREIA BARRETO

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À ENTOMOTOXICIDADE DA
UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE
Nauphoeta cinerea: ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Coorientadora: Prof. Dra. Lucia Helena do Canto Vinadé

**São Gabriel
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

B271627i Barreto, Yuri Correia

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À ENTOMOTOXICIDADE SOBRE O SISTEMA NERVOSO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) EM *Nauphoeta cinerea*: ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS / Yuri Correia Barreto.

70 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2022.

"Orientação: Cháriston André Dal Belo".

1. Jack Bean Urease. 2. Entomotoxicidade . 3. Vias monoaminérgicas. I. Título.

YURI CORREIA BARRETO

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ASSOCIADOS À ENTOMOTOXICIDADE
SOBRE O SISTEMA NERVOSO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU) EM
Nauphoeta cinerea: ENVOLVIMENTO DOS
SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação defendida e aprovada em: 16 de Agosto de 2022.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Faculdade Santa Casa de Belo Horizonte

Prof. Dr. Denis Reis de Assis
University of Oslo



Assinado eletronicamente por **Cháriston André Dal Belo, Usuário Externo**, em 17/08/2022, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Maria Elena de Lima Perez Garcia, Usuário Externo**, em 17/08/2022, às 23:14, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Denis Reis de Assis, Usuário Externo**, em 19/08/2022, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0897328** e o código CRC **DB2F34DA**.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeira e principalmente a minha mãe, por sempre fazer o possível e, às vezes, o impossível para prover tudo que fosse necessário para minha educação. Por nunca deixar de acreditar em mim. Espero um dia poder retornar, ao menos em parte, todo o seu suporte.

A minha prima Jéssica, por despertar e estimular a curiosidade em mim (eu nunca poderia imaginar que isso seria o combustível do meu trabalho). Pelos conselhos e por todos os momentos vividos! Sem eles, eu nunca seria a pessoa que eu sou hoje. Você sempre foi minha inspiração!

A toda minha família, em especial a minha vó, Odete e a minha tia, Claudete, pelo suporte financeiro, mas acima de tudo, pela paciência, carinho, por serem como mães. Espero um dia poder retribuir tudo o que fizeram por mim.

Aos meus amigos de laboratório, principalmente a Bruna e Raquel, pela paciência de me ensinar, pelo companheirismo e carinho, pelas mais variadas conversas que se pode ter e por sempre estarem dispostas a me ajudar no que quer que fosse necessário.

Aos meus amigos Andriéli, Carol, Steffany, Guilherme, Duda e Daniel, por conseguir causar uma mudança em mim e, principalmente, por proporcionarem os melhores momentos que tive em 2021 e 2022. Vocês foram especiais demais. Espero reencontrá-los na vida.

A todos os amigos que conheci na universidade, para mim todos foram importantes.

Ao meu orientador, Dr. Cháriston André Dal Belo, por confiar em mim, por permitir que eu realizasse esse trabalho e por me apresentar essa ciência linda que é a Neurofisiologia.

À UNIPAMPA e ao programa de pós-graduação por esta oportunidade, e a CAPES pelo suporte financeiro.

A professora Dra. Célia Regina Carlini e ao MSc. Carlos Gabriel, pela disponibilização da urease.

“(...) Amor, quando nosso vinho amargar ou perder o sabor
Quando a maquiagem borrar e as fotos perderem a cor
Tu ainda vai querer me aquecer quando não me restar nem calor?
E quando o cigarro apagar, vai ter valido a pena as cinzas e o frescor?

Quando a nossa música tocar, tu ainda vai lembrar do ritmo?
Quando o mundo me machucar, tu ainda vai querer curar minha dor?
Tua voz e tua respiração são meus sons preferidos
Mas quando eu esquecer de viver, teu olhar ainda vai me lembrar quem eu sou

Ainda vai querer acordar com meu toque e minha voz no ouvido?
Tua vida ainda vai ter sentido se a nossa for tudo o que te sobrou?
Quando chegar o cansaço, meu abraço ainda vai ser teu abrigo
Mas quando a vida acabar, ainda vai querer ir pro mesmo lugar onde eu vou?

Ainda vai sorrir quando eu for teu único motivo?
Ainda vai ouvir o que eu digo, mesmo quando eu só quiser falar de amor?
Ainda vai tentar me entender quando eu não fizer mais sentido
E ficar comigo quando tiver visto o pior lado de quem eu sou?

Eu sou
De quem eu sou (eu sou)
De quem eu sou
De quem eu sou (de quem eu sou)

Amor.”

Nas vozes de Ludmilla e Glória Groove

Luiz Lins

RESUMO

A entomotoxicidade da JBU e de seus peptídeos derivados tornou-se objeto de estudo nas últimas décadas devido à ampla interação desses compostos com diferentes espécies de insetos e a sua potencial ação inseticida natural. Apesar da diversidade de estudos voltados para o entendimento dos efeitos entomotóxicos da JBU, o mecanismo de ação permanece ainda pouco compreendido. Neste trabalho, investigou-se os efeitos entomotóxicos da JBU em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* sobre as vias neurolocomotoras monoaminérgicas. Utilizou-se instrumentos farmacológicos seletivos de receptores monoaminérgicos em ensaios *in vivo* e *ex vivo*. A análise do comportamento exploratório de *N. cinerea* demonstrou que a JBU (1,5 e 3 µg/g) induz uma diminuição significativa na distância percorrida, enquanto aumentou os episódios de imobilidade e do tempo de parada. Nesses ensaios, o pré-tratamento dos animais com fentolamina (antagonista octopaminérgico), SCH23390 (antagonista dopaminérgico) ou reserpina (antagonista monoaminérgico) alterou significativamente a resposta padrão da JBU. Em preparação nervo-músculo coxal abductor metatorácico (NMCAM), a JBU (1.5 µg/g) induz um bloqueio neuromuscular progressivo, em 120min. Nesses ensaios, o tratamento prévio dos animais com fentolamina, SCH23390 ou reserpina, inibiu significativamente o bloqueio neuromuscular induzido pela JBU. Em ensaios para registro dos potenciais de ação compostos espontâneos (PACNE), em perna de *Nauphoeta cinerea*, em presença de JBU (1.5 µg/g), houve uma diminuição significativa no número dos eventos, em 60min de registro. Nesses ensaios, o pré-tratamento com fentolamina, SCH23390 ou reserpina também preveniu significativamente a resposta da JBU. Em todos os ensaios descritos acima, o tratamento dos animais com a miaserina (antagonista serotoninérgico) foi ineficaz em alterar as respostas neurofisiológicas da JBU. Em conclusão, em nossas condições experimentais, foi demonstrado que a resposta entomotóxica da JBU em *Nauphoeta cinerea* envolve prioritariamente os sistemas octopaminérgico e dopaminérgico, mas não a neurotransmissão serotoninérgica. Futuros ensaios de eletrofisiologia *in situ* e de biologia molecular em cultura de células poderão identificar receptores específicos envolvidos na resposta entomotóxica da JBU em *Nauphoeta cinerea*.

Palavras-Chave: *Jack bean urease*. *Nauphoeta cinerea*. Comportamento exploratório. Neurotoxicidade. Vias monoaminérgicas.

ABSTRACT

The entomotoxicity of JBU and its derived peptides turned to the object of study in the last decades, due to a wide interaction of these compounds with different insect species and their potential natural insecticidal activity. Despite the diversity of studies aimed to understand the entomotoxic effects of JBU, the mechanism of action remains elusive. In this work, we investigated the entomotoxic effects of JBU in cockroaches of *Nauphoeta cinerea* species, on monoaminergic neurolocomotor pathways. Selective pharmacological instruments of monoaminergic receptors were used in *in vivo* and *ex vivo* assays. Thus, an analysis of *N. cinerea* neurolocomotor behavior demonstrates that JBU (1.5 and 3µg/g) induces a significant decrease in the distance traveled while increasing the effects of immobility and stopping times. In these trials, pretreatment of animals with phentolamine, SCH23390 (dopaminergic antagonist) or reserpine (monoaminergic antagonist), alter the standard response of JBU. In metathoracic abductor coxal nerve-muscle preparations (NMCAM), JBU (1.5 µg/g) induces progressive neuromuscular block, in 120min. In these sets of protocols, pretreatment of animals with phentolamine, SCH23390 or reserpine inhibited JBU-induced neuromuscular blockade. In the assays for recording Spontaneous Neural Compound Action Potentials (PACNE) on *Nauphoeta cinerea* leg, in the presence of JBU (1.5 µg / g), there was a significant difference in the number of potentials, in 60min recordings. In these assays, pretreatment with phentolamine, SCH23390 or reserpine also prevented JBU response. In all of the above assays, treatment of the animals with mianserin (a serotonergic antagonist), was ineffective in altering JBU neurophysiological responses. In conclusion, in our experimental conditions, the JBU entomotoxic response in *Nauphoeta cinerea* has been demonstrated to involve primarily octopaminergic and dopaminergic pathways, but not the serotonergic neurotransmission. Future *in situ* electrophysiological and molecular cell biology assays may identify receptors that might affect the entomotoxic JBU response in *Nauphoeta cinerea*.

Keywords: *Jack bean urease. Nauphoeta cinerea.* Natural insecticides. Invertebrate physiology. Monoaminergic pathways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos estruturais das Ureases.....	14
Figura 2 – Efeitos entomotóxicos de Jack bean urease, Canatoxina e Jaburetox.....	15
Figura 3 – Barata <i>Nauphoeta cinerea</i> , fêmea adulta.....	17
Figura 4 – Representação esquemática da organização do sistema nervoso de baratas.....	19
Figura 5 – Representação ilustrada do efeito antagonista de Fentolamina.....	23
Figura 6 – Representação ilustrada do efeito antagonista de SCH23390.....	24
Figura 7 – Representação ilustrada do efeito antagonista de Mianserina.....	25
Figura 8 – Representação ilustrada do efeito antagonista de Reserpina.....	26
Figura 9 – Representação ilustrada do mecanismo de ação primário da entomotoxicidade da JBU sugerido.....	57

MANUSCRITO

Figure 1 – Alteration of the locomotory behavior of <i>Nauphoeta cinerea</i> by the treatment with JBU.....	51
Figure 2 – <i>In vivo</i> pharmacological dissection of the exploratory deficit induced by Jack Bean Urease (JBU) in <i>Nauphoeta cinerea</i> cockroaches.....	52
Figure 3 – Reversal of the neuromuscular failure induced by Jack Bean Urease (JBU), by the previous application of monoaminergic modulators, at <i>in vivo</i> cockroach nerve-muscle preparation.....	53
Figure 4 – Extracellular recordings of leg sensilla spontaneous action potentials in absence and presence of Jack Bean Urease (JBU).....	54
Figure 5 – Protective activity of monoaminergic modulators against the inhibitory action of Jack Bean Urease (JBU) upon the leg sensilla spontaneous action potentials firing.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

JBU: *Jack Bean Urease*

Jaburetox: *Jack Bean Urease Toxin*

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Periférico

JNM: Junção Neuromuscular

GABA: Ácido gama-aminobutírico ou *Gamma-Aminobutyric Acid*

VMATs: Transportadores vesiculares de monoaminas

DA: *Dopamine*

GLU: *Glutamate*

Phento: *Phentolamine*

SCH: SCH23390

Mian: *Mianserin*

Reser: *Reserpine*

ISS: *Insect saline solution*

SNCAP: *Spontaneous Neural Compound Action Potentials*

NMCAM: *Nerve-Muscle Coxal-Adductor Metathoracic preparation*

EJPs: *Excitatory Junction Potentials*

mEJP: *miniature Excitatory Junctional Potential*

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Ureases.....	13
1.1.1 Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>	14
1.2 Organismos modelo alternativos e <i>Nauphoeta cinerea</i>	16
1.3 Sistema nervoso de insetos.....	17
1.3.1 Sistema Octopaminérgico.....	20
1.3.2 Sistema Dopaminérgico.....	21
1.3.3 Sistema Serotoninérgico.....	21
1.4 Antagonismo Farmacológico.....	22
1.4.1 Fentolamina.....	23
1.4.2 SCH23390.....	24
1.4.3 Mianserina.....	24
1.4.4 Reserpina.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MANUSCRITO.....	28
4 PROPOSTA DE MECANISMO DE AÇÃO SOBRE SISTEMA NERVOSO DE INSETOS.....	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	58
6 REFERÊNCIAS.....	59
7 ANEXOS.....	63
7.1 Produções durante o período de vigência do mestrado.....	63
7.1.1 Revisão publicada em 2020.....	63
7.1.2 Artigo publicado em 2020.....	64
7.1.3 Artigo publicado em 2020.....	65
7.1.4 Artigo publicado em 2022.....	66
7.1.5 Depósito de patente (BR 51 2021 002781 7) em 2021.....	67
7.1.6 Depósito de patente (BR 10 2021 011317 0) em 2021.....	68
7.1.7 Depósito de patente (BR 10 2021 015850 6) em 2021.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ureases

As ureases são metaloenzimas sintetizadas por plantas, fungos e bactérias, dependentes de níquel, que hidrolisam a ureia em duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono, possibilitando que os organismos utilizem a ureia como fonte de nitrogênio. As ureases bacterianas são multiméricas, compostas de duas ou três subunidades ureolíticas (domínios α e β ou α , β e γ) (Fig. 1A) sendo uma maior (α , 60-76kDa) e duas menores (β , 8-21 kDa e γ , 6-14kDa), geralmente formando trímeros (Fig. 1B). Ureases de plantas e fungos são homo-oligoméricas com subunidades de aproximadamente 90 kDa (domínio α) geralmente organizadas em trímeros ou hexâmetros podendo formar complexos dodecâmeros (Fig. 1B). Resíduos amino-terminais de plantas e fungos alinham-se com segmentos de cadeia única de ureases bacterianas. Já as subunidades menores das enzimas bacterianas assemelham-se às porções carboxi-terminais de plantas e fungos. Essas similaridades entre as sequências das proteínas indicam a mesma origem ancestral e mecanismos catalíticos (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016; DIXON et al., 1975; JABRI et al., 1995; KRAJEWSKA, 2009; LIGABUE-BRAUN et al., 2013; MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995; SIRKO; BRODZIK, 2000).

As ureases são *Moonlighting proteins*, um termo cunhado para designar proteínas multifuncionais que, desempenham diferentes atividades biológicas independentes e não relacionadas a sua função ureolítica (FOLLMER et al., 2001; JEFFERY, 1999). Na década de 1980, foi isolada da semente de *Canavalia ensiformis* uma proteína altamente tóxica, convulsivante quando injetada intraperitonealmente em ratos e camundongos, denominada Canatoxina. Além da ação neurotóxica em mamíferos, essa isoforma apresenta atividade praguicida específica contra alguns insetos das ordens Coleoptera e Hemiptera, devido à clivagem da Canatoxina pela enzima catepsina, a qual gera um peptídeo de 10kDa (pepcanatox). O pepcanatox seria responsável pela letalidade em insetos que possuem enzimas digestivas do tipo catepsina. Posteriormente, a Canatoxina foi reconhecida como a isoforma menos abundante em *C. ensiformis*, quando foram identificados outros genes relacionados a ureases nessa planta (CARLINI et al., 1997; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; CARLINI; GUIMARÃES, 1981; FOLLMER et

al., 2004a; JEFFERY, 1999; PIRES-ALVES et al., 2003; STANISÇUASKI et al., 2005)

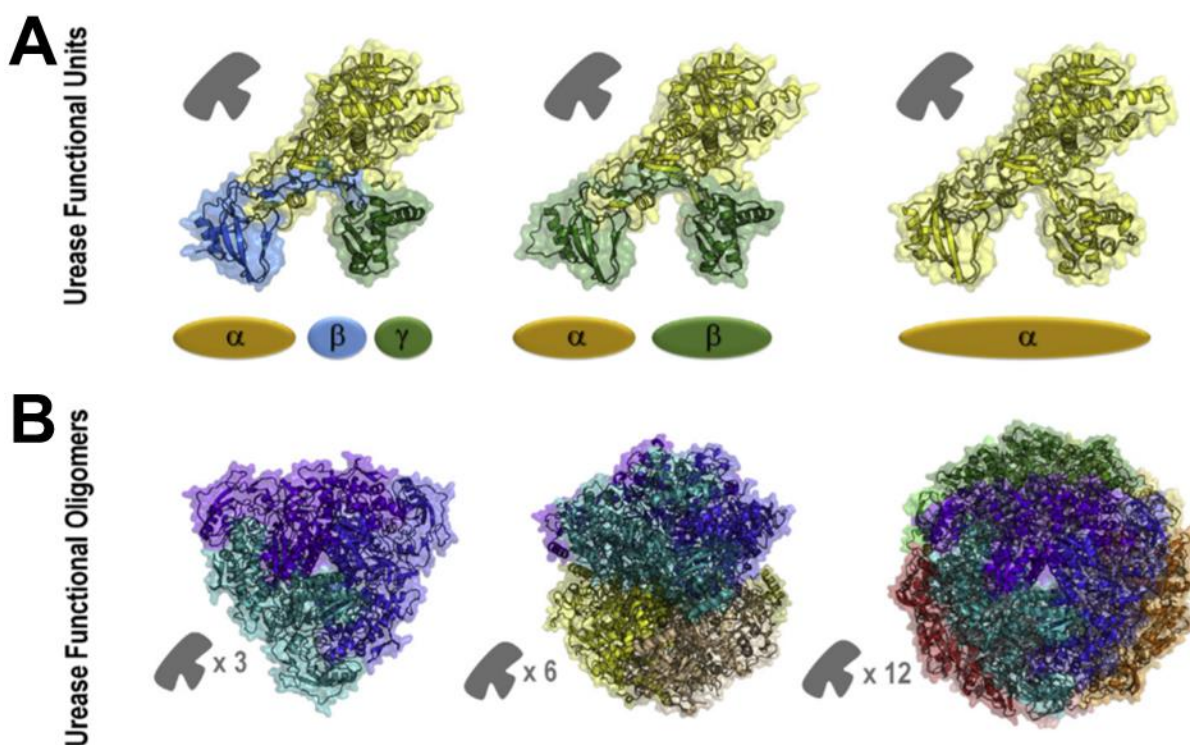


Figura 1 – Aspectos estruturais das Ureases. A) Tipos de subunidades ureolíticas (dímero e trímeros de heterosubunidades e uma subunidade). B) Associação de subunidade funcionais formando complexos de Tri, hexa e dodecâmeros. Fonte: Carlini & Ligabue-Braun (2016).

1.1.1 Urease de *Canavalia ensiformis*

A urease de *C. ensiformis* (*Jack Bean Urease* em inglês), JBURE-I ou JBU é uma proteína composta por 840 aminoácidos, de massa molecular de 90.770 Da. Sendo majoritariamente encontrada nas sementes da planta *C. ensiformis*, uma leguminosa popularmente conhecida como feijão de porco que é utilizada como suplemento alimentar para animais e como adubo verde, uma vez que é bastante resistente a ação de insetos. A JBU possui uma contribuição histórica para a ciência, pois em 1926 James Sumner conseguiu cristalizá-la a partir do feijão de porco, esse achado permitiu o pesquisador demonstrar que enzimas são proteínas, rendendo-lhe o prêmio Nobel em 1946. Esta é a isoforma mais abundante em *C. ensiformes* e tem sido amplamente estudada por apresentar propriedades inseticidas. Tais propriedades variam dependendo do *táxon*. Em trabalhos realizados com *Bombyx mori* e *Rhodnius prolixus* 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. A JBU também apresentou ação sobre os túbulos de Malpighi, através da modulação da via dos eicosanoides. Além disso, peptídeos derivados da urease também demonstram atividade inseticida (1.1). A partir da sequência do pepcanatox, e usando como molde uma terceira isoforma da JBU, a JBURE-II, foi obtido um peptídeo recombinante de 91 aminoácidos, chamado *Jack Bean Urease Toxin* (Jaburetox), o qual mostrou possuir atividade entomotóxica contra diversas espécies. A neurotoxicidade das duas principais isoformas da urease de *C. ensiformis* (JBU e Canatoxina) e a do peptídeo recombinante Jaburetox, foi extensivamente avaliada (Figura 2). Contudo, alguns aspectos do mecanismo de ação da JBU ainda permanecem pouco compreendidos, principalmente aqueles relacionados à atividade sobre o sistema nervoso (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016; CORI, 1981; DEFFERRARI et al., 2014; FOLLMER et al., 2004b; HIRAYAMA et al., 2000; KURAHASHI et al., 2005; MARTINELLI et al., 2014; MULINARI et al., 2007; STANISÇUASKI et al., 2010, 2009).

Insect species	Stage or tissue	Type of assay	Toxin	Effect	Inhibited by
<i>Manduca sexta</i>	Larvae	Feeding	CNTX	None	
<i>Schistocerca americana</i>	Larvae	Feeding	CNTX	None	
<i>Drosophila melanogaster</i>	Adults	Feeding	CNTX	None	
<i>Aedes aegypti</i>	Adults	Feeding	CNTX	None	
<i>Callosobruchus maculatus</i>	Larvae	Feeding	CNTX	Lethality	
<i>Nezara viridula</i>	Larvae	Feeding	CNTX	Lethality	
<i>Dysdercus peruvianus</i>	Larvae	Feeding, injection	CNTX	Development delay, lethality	
	Larvae	Feeding, injection	JBU JBTX	Lethality	
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Larvae	Feeding	JBTX	Lethality	
<i>Blatella germanica</i>	Larvae	Feeding	JBTX	Lethality	
<i>Oncopeltus fasciatus</i>	Larvae	Feeding, injection	JBU	Lethality	
	Larvae	Feeding, injection	JBTX	Lethality	
<i>Rhodnius prolixus</i>	Larvae	Feeding, injection	CNTX	Development delay, lethality	Cathepsin inhibitors
	Larvae	Injection	JBU	Lethality	Knock-down of a PLA2
	Malpighian tubules	Feeding, injection	JBTX	Lethality	
	Malpighian tubules	In vitro	JBU	Inhibition of 5-HT induced secretion -Effect mimicked by PGE2	Dexamethasone, Ca ²⁺ chelation or blockers
	Malpighian tubules	In vitro	JBTX	Inhibition of 5-HT induced secretion	
	Anterior midgut	In vitro	JBU	Increase in frequency of 5-HT induced contractions, inhibition of water transport – Effect mimicked by PGE2, increase in tissue PGE2 content	Indomethacin, AH6809 (eicosanoid receptor antagonist)
	Hemocytes	In vitro	JBU	Aggregation	Dexamethasone, Indomethacin, Ca ²⁺ chelation
<i>Triatoma infestans</i>	Larvae, Adults	Injection	JBTX	Lethality, neurotoxic symptoms, immunolabeling of CNS, Co-immunoprecipitation with CNS proteins, Inhibition of nitric oxide synthase	
<i>Nauphoeta cinerea</i>	Neuro-muscular junction	In vitro	JBTX	Blockade of evoked contractions of coxal muscle	

Figura 2 – Efeitos entomotóxicos de *Jack bean urease*, Canatoxina e Jaburetox. Fonte: Modificado de Carlini & Ligabue-Braun (2016).

1.2 Organismos-modelo alternativos e *Nauphoeta cinerea*

A utilização de organismos modelo na pesquisa de experimentação tem por objetivo proporcionar um melhor entendimento das alterações fisiológicas, bioquímicas e farmacológicas envolvidas no desenvolvimento de processos-mecanismos biológicos. Atualmente modelos biológicos alternativos e modelos *in vitro* estão sendo utilizados em pesquisas, visando minimizar principalmente o uso de animais vertebrados. Nesse sentido, existe uma grande preocupação a respeito de modelos animais que atendam a demanda da pesquisa e mostrem-se eficientes nas diversas áreas da mesma (HUBER; MASLER; RAO, 1990; MORALES, 2008).

Entre os invertebrados, os insetos são os representantes majoritários devido à alta conservação neuroquímica. As vias de sinalização e o princípio biofísico do sistema nervoso dos insetos é bem semelhante ao dos mamíferos. Por exemplo, no sistema nervoso de baratas já foram identificados mais de 200 neurotransmissores e seus receptores, os quais apresentaram grande homologia molecular e estrutural com os de animais vertebrados. Além disso, outras vantagens em relação a utilização dos insetos são o baixo custo, fácil habituação e manutenção, rápido desenvolvimento, resistência a traumas, insensibilidade a dor e, adequação a certos procedimentos experimentais (GULLAN; CRANSTON, 2014; HUBER; MASLER; RAO, 1990; STANKIEWICZ; DĄBROWSKI; DE LIMA, 2012; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005).

A barata *Nauphoeta cinerea* é originária do nordeste da África, possui coloração marrom-acinzentada e corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen, sendo conhecidas como barata lagosta, quando adultas, medem entre 25-29 mm, suas asas são manchadas, não cobrem o abdômen e não permitem alçar voo (Figura 3). Além das vantagens supracitadas, a possibilidade da realização das pesquisas sem a necessidade de aprovação de comitês de ética, sua capacidade de manipulação experimental e o paralelismo biofísico torna seu uso muito conveniente para abordagens neurofisiológicas (HUBER; MASLER; RAO, 1990; STANKIEWICZ; DĄBROWSKI; DE LIMA, 2012; TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005).

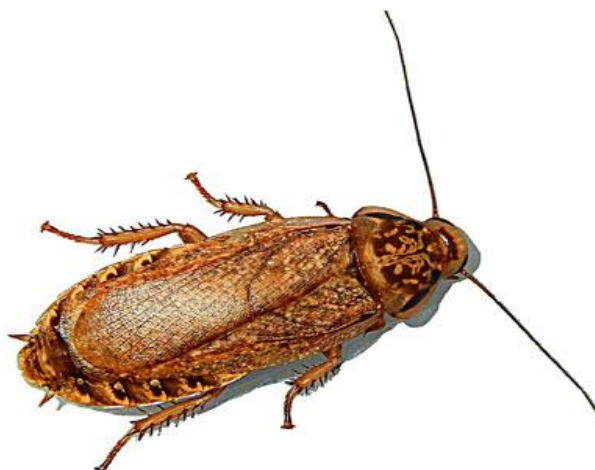


Figura 3 – Barata *Nauphoeta cinerea*, fêmea adulta. Fonte: Science-Peru.

1.3 Sistema nervoso de insetos

O sistema nervoso dos insetos é uma rede de comunicações formada principalmente por neurônios e células gliais, os quais formam circuitos interligados que se distribuem pelo organismo, os gânglios. Estes gânglios são responsáveis pelo processamento de informações provenientes tanto do ambiente externo quanto do interno, coordenando as funções dos órgãos e o processamento das informações geradas pelo próprio sistema nervoso. Tipicamente, cada segmento do corpo destes animais possui um par de gânglios ligados por comissuras e unidos aos gânglios dos segmentos adjacentes por conectivos, constituindo assim, o cordão nervoso ventral. No Sistema Nervoso Central (SNC) os gânglios da cabeça são fundidos formando uma massa cefálica resultando em dois centros ganglionares, o cérebro ou gânglio supraesofágico, e o gânglio subesofágico (Figura 4A). Internamente, o gânglio supraesofágico apresenta as projeções do deutocérebro, protocérebro e tritocérebro. No protocérebro pode ser encontrado o centro sensitivo dos olhos compostos e ocelos, enquanto o deutocérebro, parte mediana do cérebro, a qual chegam os estímulos enviados pelos quimiorreceptores das antenas e partem dois nervos antenais motores. O tritocérebro, que é o menor dos gânglios supraesofágicos, está ligado aos gânglios ventrais por conectivos circum-esofágicos e ao sistema estomatogástrico através dos nervos frontais. O gânglio Subesofágico que é ligado ao cérebro por conectores circum-esofágicos, recebe estímulos aferentes do aparelho bucal, cabeça e pescoço e inerva de forma eferente os músculos aparelho bucal, do pescoço e as glândulas salivares. Os três gânglios torácicos (pro, meso e

meta) juntamente com os seis gânglios abdominais (Figura 4A) são associados a neurofisiologia de cada segmento, sendo responsáveis pela locomoção e controle motor e sensorial da musculatura torácica, coxal, femoral, das asas, de abertura dos espiráculos e da musculatura abdominal. A discriminação entre o SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP) dos insetos, muitas vezes, é bastante difícil, especialmente quando se considera a posição e a função de certos gânglios. Com isso, o SNP consiste em nervos que deixam ou chegam ao SNC para inervar os músculos, o sistema respiratório, o sistema autônomo caudal, que inerva o intestino posterior e os genitais e no sistema estomatogástrico (FUJIHARA, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; LENT, 2010; OSBORNE, 1996; RICHTER et al., 2010).

Uma característica particular dos sistemas nervosos dos insetos, é a presença de neurônios com localizações, formas, projeções axonais e características eletroquímicas específicas. Os neurônios atuam na recepção, transmissão e processamento de estímulos, além de ser o canal a influenciar nas diversas atividades do organismo e liberarem neurotransmissores. A região de contato entre dois neurônios é denominada sinapse, sendo que nos insetos, os contatos sinápticos são majoritariamente axo-axônicos. Na sinapse química, o impulso nervoso ou potencial de ação gera uma corrente despolarizante no axônio do neurônio pré-sináptico, a qual é transformado em um sinal químico (através da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica) que atua sobre a célula pós-sináptica excitando-a ou inibindo-a, dependendo do sinal (neurotransmissor liberado). Quando as moléculas sinalizadoras se ligam aos receptores pós-sinápticos, ocorre a abertura desses canais e um influxo de íons presentes no meio extracelular, resultando em continuidade ou descontinuidade de um processo fisiológico. Um exemplo, é a transmissão entre neurônios e músculos que acontece através da junção neuromuscular, a qual é regulada pela liberação do neurotransmissor inibitório, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e excitatório, o glutamato (Figura 4B). Outra forma de comunicação presente no sistema nervoso dos insetos é a sinapse elétrica, nela não ocorre a sinalização via neurotransmissores, pois a corrente gerada a partir da membrana pré-sináptica é suficiente para excitar a membrana pós-sináptica. Como os organismos têm um número finito de circuitos neurais, os neurônios e as redes devem ser multifuncionais. A neuromodulação fornece um meio poderoso para reconfigurar de maneira drástica, mas reversível, a função de um circuito sensorial. Um efeito

neuromodulador normalmente começa com a ligação de um peptídeo ou outra molécula a um receptor metabotrópico (receptores acoplados a proteína G). Isso, desencadeia uma cascata de reações bioquímicas que mudam a fisiologia da célula e podem provocar efeitos muito mais complexos do que a simples excitação ou inibição da neurotransmissão clássica. Outro efeito da neuromodulação é aumentar a sensibilidade dos neurônios receptores a seus estímulos específicos, ou seja, a neuromodulação pode diminuir o limiar do estímulo necessário para gerar potenciais de ação e respostas comportamentais. As características supracitadas dos neurônios individuais dos invertebrados, podem ter papéis significativos ou até únicos na determinação do comportamento, e normalmente apenas algumas camadas do processamento neural separam a entrada sensorial (aférente) da saída motora (eferente). Dentre moléculas monoaminérgicas, a octopamina, dopamina e serotonina são considerados os principais neuromoduladores do sistema nervoso dos insetos. Além disso, a atividade de neurotransmissão destas aminas somada a sua função de neuromodulação caracterizam os chamados sistemas monoaminérgicos (Figura 4B) (BIRMINGHAM; TAUCK, 2003; CHAPMAN, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; OSBORNE, 1996; RICHTER et al., 2010).

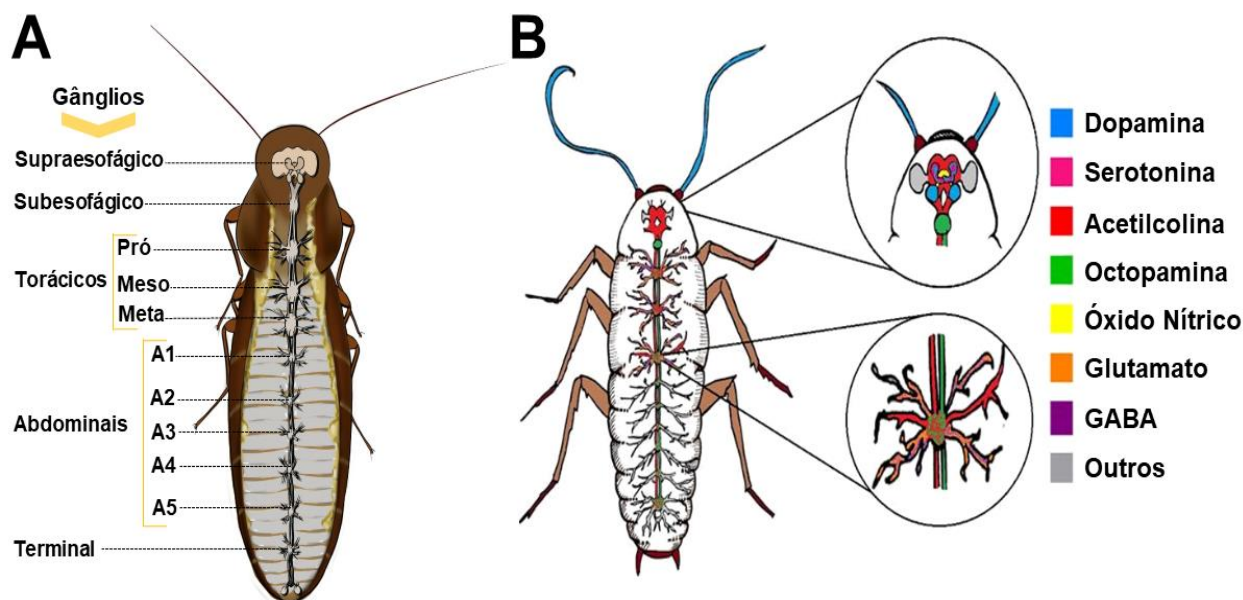


Figura 4: Representação esquemática da organização do sistema nervoso de baratas. A) Esquema da distribuição e anatomia do cordão nervoso ventral, gânglios e sacos aéreos em barata. B) Representação das regiões mais relevantes de modulações e sinapses dos principais neurotransmissores em baratas. Fonte: Modificado de Mra Bruna Trindade Borges e Mra Ana Paula Zanatta.

1.3.1 Sistema Octopaminérgico

A octopamina é uma das principais aminas biogênicas, foi identificada pela primeira vez nas glândulas salivares de polvo. Após duas décadas, ganhou notoriedade pelo seu papel fisiológico em baratas e outros insetos, demonstrando estar presente em altas concentrações em uma variedade de tecidos. Desde então, sugere-se que a octopamina module quase todos os processos fisiológicos nos invertebrados, atuando como neurotransmissor, neuromodulador e neurohormônio em vários invertebrados. O conhecimento da neurotransmissão octopaminérgica, principalmente em insetos, revelou princípios que parecem onipresentes para a ação moduladora de aminas no sistema nervoso em geral. Juntamente com a tiramina, a octopamina é o único transmissor não peptídico neuroativo cujo papel fisiológico é restrito aos invertebrados. Entretanto, desempenha muitos dos papéis funcionais associados à noradrenalina e adrenalina nos vertebrados. A maioria dos órgãos periféricos, órgãos dos sentidos e numerosos alvos no SNC são modulados pela octopamina como, aprendizado e memória, olfato (sensibilidade a feromônios), locomoção, visão, ritmo cardíaco, musculatura de voo e junção neuromuscular, contração do oviduto e muitas outras (Figura 4B). Esta amina, ainda está relacionada com o metabolismo de ácidos graxos em baratas e quanto ao sistema endócrino, atua como hormônio do stress nos insetos. Assim como outras aminas biogênicas a octopamina é sintetizada a partir de outra monoamina, a Tiramina, sendo convertida pela tiramina- β -hidroxilase. Já a degradação da octopamina é realizada por processos mais complexos, a inativação ocorre pela enzima N-acetiltransferase e o metabolito resultante é processado por conjugação. Outra alternativa, é a N-metilação catalisada pela feniletanolamina-N-metil-transferase. Todos os receptores de octopamina são acoplados a proteína G, sendo classificados segundo a homologia estrutural e de sinalização com receptores adrenérgicos de vertebrados em, α -adrenérgic-like, β -adrenérgic-like e receptores Octopa/Tiraminérgicos (EVANS; MAQUEIRA, 2005; HUANG et al., 2012; OSBORNE, 1996; ROEDER, 1999).

1.3.2 Sistema Dopaminérgico

A dopamina é uma catecolamina (juntamente com adrenalina e noradrenalina) e ocorre universalmente através dos *táxons*, pesquisadores detectaram dopamina em uma ampla variedade de microrganismos, fungos e animais. Isso indica, que o desenvolvimento da dopamina como neurotransmissor coincide com o início mais precoce dos sistemas nervosos, há mais de 500 milhões de anos atrás. Nos insetos, os neurônios dopaminérgicos são amplamente distribuídos no sistema nervoso de todas essas espécies, encontrada em concentrações relativamente altas em todos os principais neurópilos, indicando assim, que essa amina desempenha funções importantes no SNC e periférico desses animais. A dopamina é um modulador de comportamentos e processos como, memória olfativa (atrativa e aversiva), alimentação, motivação, maturação sexual, social, locomoção, desenvolvimento neuronal, esclerotização e melanização da cutícula, entre outros. A síntese da dopamina é semelhante à da octopamina, ocorrendo a partir da Tirosina, na qual a enzima tirosina hidroxilase a converte em 3,4-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA) que é descarboxilada pela 3,4-di-hidroxifenil-alanina descarboxilase para produzir a dopamina. A degradação é realizada por N-acetilação, resultando em a N-acetildopamina ou N- β -alanildopamina. Os insetos possuem quatro tipos de receptores dopaminérgicos, todos acoplados a proteína G. Os três primeiros mostram considerável conservação das propriedades funcionais e estruturais com o sistema receptor de dopamina dos vertebrados. O Dop1 e Dop2 são relacionados ao receptor D1 de vertebrados, enquanto o Dop3 é associado ao D2. O quarto grupo de receptor é o Dop/ecd, esse é caracteriza um modelo de sinalização exclusivo de invertebrados (OSBORNE, 1996; VERLINDEN, 2018).

1.3.3 Sistema Serotoninérgico

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina também pertence ao grupo das aminas biogênicas, estando presente nos organismos da maioria dos filos animais. A serotonina é um neurotransmissor muito estudado em vertebrados, por regular funções neurofisiológicas muito importantes, como comportamento social, alteração da homeostase deste neurotransmissor está relacionada a uma série de condições fisiopatológicas. Em invertebrados, a serotonina também é encontrada no SNC,

principalmente nas células *mushroom bodies*, regulando o comportamento de aprendizagem, a agressividade, locomoção, alimentação e a fisiologia sensorial. Por outro lado, no SNP de insetos modula respostas eletrofisiológicas e viscerais. No sistema endócrino, atua como hormônio diurético e no controle do apetite. A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano. A enzima triptofano-hidroxilase adiciona um grupo hidroxila ao triptofano, formando o 5-hidroxitriptano que pela ação da 5-HTP-descarboxilase é convertido em serotonina. A serotonina é uma das moléculas de sinalizadoras mais antigas da evolução, isso explica a grande diversidade de receptores dessa molécula. Testes farmacológicos mostraram uma gama de receptores 5-HT amplamente distribuídos nos tecidos nervosos, nos quais cada tipo e receptor é composto por subclasses, pertencentes tanto a receptores acoplado a proteína G, quanto aos canais iônicos. A classificação desses receptores foi realizada com base na farmacologia e similaridades de sequência com vertebrados, a qual compreende, os receptores 5HT-1 a 7 e diversas subclasses, por exemplo, 5HT-7_A, isso pode esclarecer a variedade de funções moduladas por esta amina (OSBORNE, 1996; VLEUGELS; VERLINDEN; BROECK, 2015).

1.4 Antagonismo Farmacológico

Os compostos que interferem na atividade normal de proteínas envolvidas na neurotransmissão sináptica são conhecidos como inibidores, podendo ser de origem natural, como toxinas animais e metabolitos vegetais ou, sintéticas, como os fármacos. As drogas que exercem inibição a receptores pós-sinápticos de neurotransmissão química são chamadas de antagonistas farmacológicos, os quais se ligam a determinados receptores, porém sem resultar em ativação e assim impedindo que os neurotransmissores (moléculas ligantes ou ativadores) que o ativariam de se ligarem, culminando na redução ou ausência de resposta. Quando a droga atua no mesmo alvo molecular que o ativador, sua afinidade pelo receptor é alta e a sua estrutura química é similar à do ligante, o antagonismo é então chamado de competitivo. Enquanto no antagonismo não-competitivo, o fármaco atua no sítio alostérico do alvo receptor reduzindo sua afinidade com o ligante, uma vez que, ao ter sua estrutura alterada o agonista não consegue interagir com sítio de ligação. Os compostos antagonistas ainda podem ser caracterizados em antagonismo parcial e total. No primeiro, a ação ocorre apenas em receptores específicos e limitados (em

um único subtipo de receptor) sem causar anulação completa dos efeitos do agonista. Enquanto no segundo, o efeito antagonista é mais amplo, ou seja, o mesmo composto pode interagir com mais de um subtipo ou classe de receptores. Através de análises neurofarmacológicas foi possível descobrir, identificar e localizar subtipos de receptores ativados por um mesmo neurotransmissor, relacionar sistemas de neurotransmissores, funções fisiológicas e efeitos de substância tóxicas. Nesse sentido, o antagonismo seletivo funciona como uma ferramenta neurofisiológica, a qual possibilita a relação e compreensão do mecanismo de ação de substâncias com determinados sistemas de sinalização (BEAR et al., 2008; HRUBY, 2014; KATZUNG; TREVOR, 2014).

1.4.1 Fentolamina

A Fentolamina é uma droga sintética pertencente a classe do alcaloide Imidazol. O principal mecanismo de ação deste composto é a atuação antagonista competitiva aos receptores Alfa-adrenérgicos, alfa-1 e alfa-2 (Figura 5). Na formulação comercial (mesilato de fentolamina), é usado em emergências hipertensivas, podendo ser usado no tratamento de hipertensão, feocromocitoma, síndrome de Reynaud, impotência, doença vascular periférica e na remediação dos efeitos de medicamentos em pacientes que tomam inibidores da monoaminas oxidase (MAO) (HRUBY, 2016; ZAHIR; GOULD, 1971).

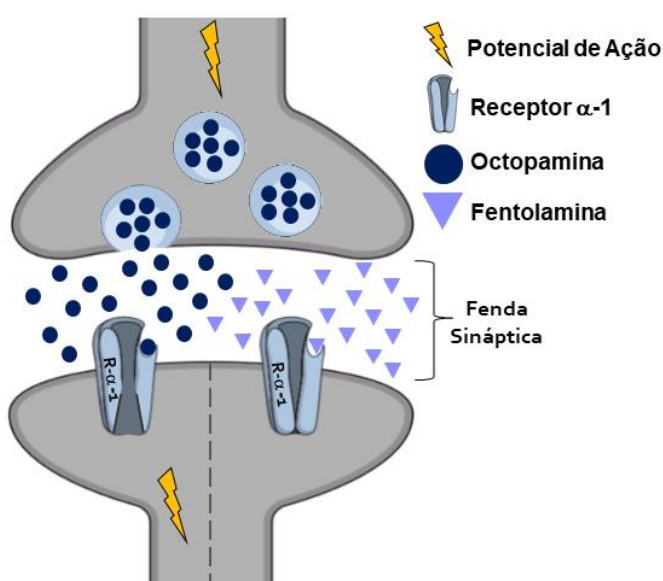


Figura 5: Representação ilustrada do efeito antagonista de Fentolamina. Resumidamente, o potencial de ação chega aos terminais pré-sinápticos causando liberação das vesículas, contendo octopamina, na fenda sináptica. Quando a octopamina se liga no receptor pós-sinápticos alfa-1,

ocorre o influxo de íons e a continuidade do potencial de ação, entretanto se a Fentolamina se liga nesse receptor, ocorre a inativação do mesmo. Fonte: Autor.

1.4.2 SCH23390

O SCH23390 ou halo-benzazepina é um potente composto antagonista seletivo dos receptores pós-sinápticos de dopamina (D1) e mais fracamente receptores D5 (Figura 6). O SCH23390 é usado como modelo para distúrbios neurológicos relacionados a dopamina como, por exemplo, a doença de Parkinson. Esse composto também já foi utilizado em diversas pesquisas, como ferramenta na determinação topográfica de receptores D1 cerebrais de mamíferos, da influência das vias dopaminérgicas no comportamento geral e locomotor, em estudos referentes a convulsão e em trabalhos eletromiográficos (BOURNE, 2001; STÜRMER et al., 2014).

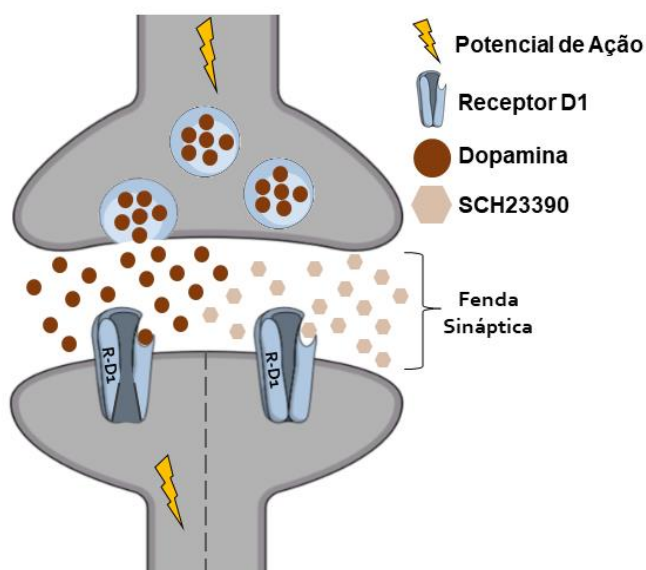


Figura 6: Representação ilustrada do efeito antagonista de SCH23390. Resumidamente, o potencial de ação chega aos terminais pré-sinápticos causando liberação das vesículas, contendo dopamina, na fenda sináptica. Quando a dopamina se liga no receptor pós-sinápticos D1, ocorre o influxo de íons e a continuidade do potencial de ação, entretanto se o SCH23390 se liga nesse receptor, ocorre a inativação do mesmo. Fonte: Autor.

1.4.3 Mianserina

A Mianserina é um fármaco utilizado no tratamento da depressão e depressão associada com ansiedade. Seu efeito é atribuído, ao bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos pré-sinápticos e a atividade antagonista dos receptores de serotonina 5HT-2 (Figura 7). A Mianserina é classificada como um antidepressivo atípico,

devido aos seus mecanismos de ação, os quais não se caracterizam como Tricíclicos, como inibidores seletivos da recaptação da serotonina e nem como Inibidores da MAO, classificação comum utilizada (KATZUNG; TREVOR, 2014; MORENO; MORENO; SOARES, 1999).

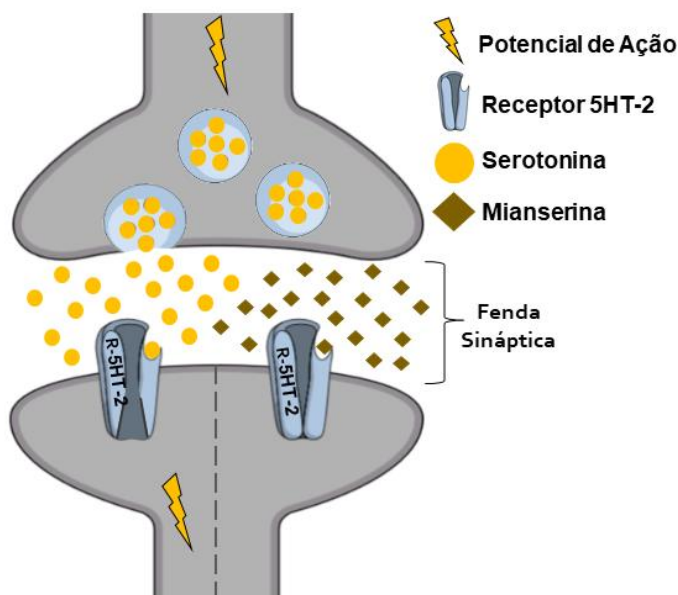


Figura 7: Representação ilustrada do efeito antagonista de Mianserina. Resumidamente, o potencial de ação chega aos terminais pré-sinápticos causando liberação das vesículas, contendo serotonina, na fenda sináptica. Quando a serotonina se liga no receptor pós-sinápticos 5HT-2, ocorre o influxo de íons e a continuidade do potencial de ação, entretanto se o Mianserina se liga nesse receptor, ocorre a inativação do mesmo. Fonte: Autor.

1.4.4 Reserpina

A Reserpina é um alcaloide isolado do arbusto *Rauwolfia serpentina* (nativo da Índia), o qual foi primariamente utilizado como tratamento anti-hipertensivo, sendo o primeiro fármaco a atuar no sistema simpático do SNP. Contudo, os pacientes que faziam seu uso passaram a apresentar comportamento depressivo (alguns quadros muito graves) com isso foi descoberto que a Reserpina reduzia drasticamente os níveis de serotonina no SNC por depletar os estoques de monoaminas nas vesículas das terminações nervosas. Os efeitos da administração de Reserpina ocorrem de forma aguda, uma vez presente nos neurônios pré-sinápticos a droga se liga aos transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs) (essas proteínas são responsáveis pelo abastecimento das vesículas no terminal pré-sináptico) impedindo ou reduzindo a entrada dos neurotransmissores nas mesmas (Figura 8). O antagonismo causado pela Reserpina pode ser classificado como total, pela ação

depletora inespecífica de monoaminas, isso também possibilita a utilização desse fármaco como modelo para estudos doenças, tanto psicológicas quanto neurodegenerativas (ANTKIEWICZ-MICHALUK et al., 2014; BUZNIKOV et al., 2007; HRUBY, 2014; MCQUEEN; DOYLE; SMIRK, 1954).

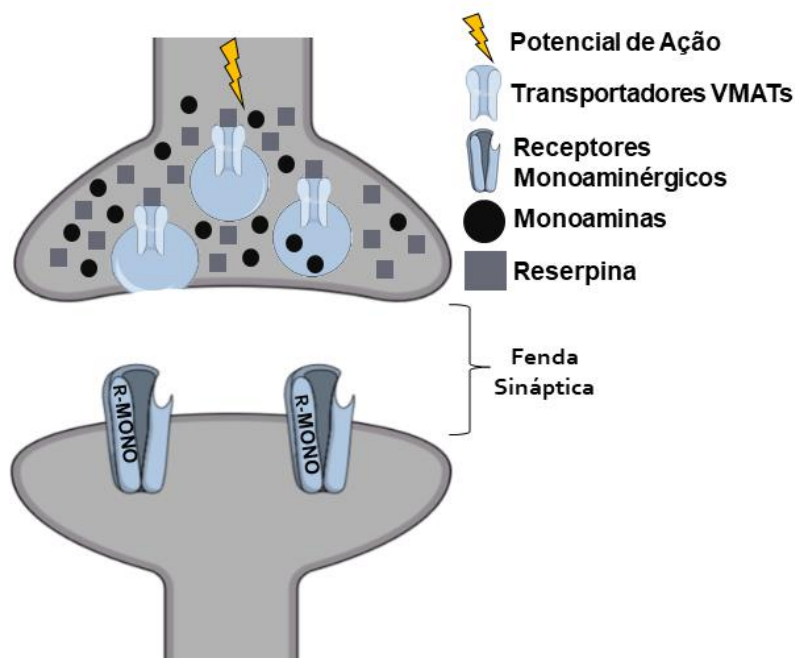


Figura 8: Representação ilustrada do efeito antagonista de Reserpina. Resumidamente, quando a Reserpina está presente nos neurônios pré-sinápticos, ela se liga aos transportadores vesiculares de monoaminas impedindo o abastecimento das mesmas com neurotransmissores. O potencial de ação chega aos terminais pré-sinápticos causa a liberação das vesículas na fenda sináptica, mas as vesículas estão vazias ou pouco abastecidas, resultando na não ativação dos receptores pós-sinápticos. Fonte: Autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a relação entre a neurotoxicidade da Urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) em baratas *Nauphoeta cinerea* e os sistemas monoaminérgicos (Seroto, Dopa e Octopaminérgico), através da utilização de antagonistas farmacológicos seletivos em experimentos eletromiográficos e comportamentais.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da JBU no comportamento locomotor de *N. cinerea* através de ensaios de locomoção em campo aberto;
- Avaliar o efeito da JBU nos potenciais de ação neurais espontâneos de *N. cinerea*;
- Investigar influência das monoaminas na JNM de *N. cinerea* e a relevância dessas na neurotoxicidade da JBU;
- Determinar atividade da JBU em alvos moleculares específicos por meio do uso de compostos antagonistas seletivos (Fentolamina, SCH2390, Mianserina e Reserpina);

3 MANUSCRITO

Todos os Resultados, bem como os itens Materiais e Métodos, Discussão e Referências Bibliográficas que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Este manuscrito está disposto na forma na qual foi submetido para o periódico **Pesticide Biochemistry and Physiology** (ISSN: 0048-3575) e intitulado como: **The neurotoxic mechanism of Jack Bean Urease in insects involves the interplay between octopaminergic and dopaminergic pathways**. O manuscrito passou pela análise preliminar do Editor e encontra-se em fase de avaliação pelos referees.

The neurotoxic mechanism of Jack Bean Urease in insects involves the interplay between octopaminergic and dopaminergic pathways

Yuri Correia Barreto^a, Raquel Soares Oliveira^a, Bruna Trindade Borges^a, Maria Eduarda Rosa^a, Ana Paula Zanatta^a, Carlos Gabriel Moreira de Almeida^{a,c}, Lúcia Vinadé^a, Celia Regina Carlini^d, Cháriston André Dal Belo^{a,b,*}

^aLaboratório de Neurobiologia e Toxinologia (LANETOX), Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, São Gabriel, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (PPGMCS), Pmtefical Cathollic University Rio Grande de Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Brain Institute (Inscer) and School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande de Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author:

Dr. Cháriston André Dal Belo

CIPBiotec, Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa. Rua Aluizio Barros Macedo s/n, BR 290, km 423, 97307-020, São Gabriel, Brasil. Tel./fax: +55 55 3237-0850. e-mail: charistonbelo@unipampa.edu.br

Abstract

In the last decades, the entomotoxicity of JBU and its derived peptides became an object of study, due mainly to the ubiquitous interaction of these compounds with different species of insects and their potential as natural insecticides. In this work, we investigated the neurotoxic effects of JBU in *Nauphoeta cinerea* cockroaches by dissecting pharmacologically the monoaminergic pathways involved. Selective pharmacological modulators for monoaminergic pathways in *in vivo* and *ex vivo* experimental models were employed. Thus, the analysis of *N. cinerea* neurolocomotory behavior demonstrated that JBU (1.5 and 3 µg/g) induces a significant decrease in the exploratory activity. In these assays, pretreatment of animals with phentolamine, SCH23390 or reserpine, interfered significantly with the response of JBU. Using *in vivo* abductor metathoracic preparations JBU (1.5 µg/g) induced progressive neuromuscular blockade, in 120 min recordings. In this set of experiments, the previous treatment of the animals with phentolamine, SCH23390 or reserpine, completely inhibited JBU-induced neuromuscular blockade. The recordings of spontaneous compound neural action potentials in *N. cinerea* legs showed that JBU, only in the smallest dose, significantly decreased the number of potentials in 60 min recordings. When the animals were pretreated with phentolamine, SCH23390, or reserpine, but not with mianserin, there was a significant prevention of the JBU-inhibitory responses on the action potentials firing. Meanwhile, the treatment of the animals with mianserin did not affect JBU's inhibitory activity. The data presented in this work strongly suggest that the neurotoxic response of JBU in *N. cinerea* involves a cross talking between OCTOPAMIN-ergic and DOPAMIN-ergic nerve systems, but not the SEROTONIN-ergic neurotransmission. Further molecular biology studies with expression of insect receptors associated with voltage clamp techniques will help to discriminate the selectivity of JBU over the monoaminergic transmission.

Keywords: Natural insecticides; *Jack bean urease*; *Nauphoeta cinerea* cockroaches; Neurolocomotor disturbance; Monoaminergic pathways.

1. Introduction

Ureases are nickel-dependent metalloenzymes synthesized by plants, fungi, and bacteria, which hydrolyze urea into two molecules of ammonia and one of carbon dioxide, which enable organisms to use urea as a source of nitrogen (Carlini and Ligabue-Braun, 2016; Dixon et al., 1975). Ureases are *moonlighting* proteins, a term coined to designate multifunctional proteins that perform different biological activities that are independent and unrelated to their ureolytic function (Follmer et al., 2001; Jeffery, 1999, Carlini and Ligabue-Braun, 2016). In the 1980s, a highly toxic protein called Canatoxin, which induces convulsions when injected intraperitoneally into rats and mice, was isolated from the seeds of *Canavalia ensiformis* (a legume known as Jack bean). Later, Canatoxin was characterized as one of the three isoforms of urease produced by this plant, the other two are JBU (**J**ack **B**ean **U**rease, or JBURE-I, most abundant isoform, Sumner, 1926) and JBURE-II (Follmer et al., 2001; Mulinari et al., 2011; for a review see Kappaun et al., 2018). Besides neurotoxicity in mammals, Canatoxin and JBU also display entomotoxic activity when ingested by some insects, particularly from the Hemiptera order. The insecticidal effect of Canatoxin and JBU fed to these insects is in part due to the cleavage of proteins by the insect's digestive cathepsin-like enzymes, which generates a ~10 kDa entomotoxic peptides (Carlini et al., 1997; Ferreira-DaSilva et al., 2000; Piovesan et al., 2009; Deferrari et al., 2011). Moreover, JBU possesses many entomotoxic properties that does not require proteolytic cleavage. Such properties vary depending on the taxon (Stanisquaski and Carlini, 2012; Kappaun et al., 2018). In studies carried out with *Bombyx mori* (Hirayama et al., 2000; Kurahashi et al., 2005) and with *Rhodnius prolixus*, it was

demonstrated that JBU can cross the intestinal epithelium towards the insect hemolymph, reaching the tissues and potentially causing alterations in the physiology of these animals (Stanisçuaski and Carlini, 2012). JBU also presented action on Malpighi tubules, through modulation of the eicosanoid pathway (Stanisçuaski et al., 2010, 2009). JBU induces the formation of ion channels that are highly selective to cations in planar lipid bilayers and lipid vesicles (Micheletto et al., 2016; Piovesan et al., 2014). Recently, JBU was found to alter cathepsin D activity in *Dipetalogaster maximus* nymphs (Moyetta et al., 2021). In *Nauphoeta cinerea*, JBU showed central and peripheral neurotoxicity, causing neuromuscular blockade, cardiac negative chronotropism, decrease of acetylcholinesterase activity and increase of grooming behavior (Carrazoni et al., 2016). Another important effect related to JBU is the increase of calcium ion influx, observed in the cockroach metathoracic ganglion (Carrazoni et al., 2018). Furthermore, recombinant urease-derived peptides, jaburetox (from JBU) and soyuretox (from soybean urease), have also demonstrated entomotoxic activity, which does not require proteolytic processing by insect's digestive enzymes (Mulinari et al., 2007, Kappaun et al., 2019).

Recently our group showed an intrinsic relationship between the entomotoxic activity of JBU and the monoaminergic system, using cockroaches as biological models (Carrazoni et al., 2016). The entomotoxicity mechanisms of JBU, in fact, are complex and remain poorly understood. Thus, in this work we investigated the relationship between the different insect monoaminergic pathways in the neurotoxicity the JBU in *N. cinerea* cockroaches. To accomplish this, different modulators of Serotonergic, Dopaminergic and Octopaminergic receptors were tested on behavioral, electromyographic and electrophysiological parameters of JBU's effects in *N. cinerea*.

2. Material and methods

2.1. Animals

All experiments were carried out with adult *Nauphoeta cinerea* cockroaches, of both sexes, weighing an average of 0.5 grams (g). The animals were raised and maintained at São Gabriel Campus's vivarium in the Federal University of Pampa, under controlled conditions of temperature (24-26°C), lighting (12-hour light/dark cycles) and water and food *ad libitum*. The treatments were injected into the 3rd abdominal portion of the insects, in a final volume of 10 microliters (µL), using a Hamilton syringe.

2.2. Jack Bean Urease (JBU)

Jack Bean Urease (JBU) was purified from *Canavalia ensiformis* (Casa Agrodora, São Paulo, Brazil) as described elsewhere (Follmer et al., 2004; Weber et al., 2008). Protein crystals (protein and salts) were dissolved in and dialyzed against a neutral sodium phosphate buffer to give a final concentration of 1 µM and kept at 4°C until use.

2.3. Reagents and solutions

The Insect saline solution (ISS) was prepared with the following composition: 2 M NaCl, 1 M CaCl₂, 3 M KCl and 0.5 M Tris with the addition of ultrapure water to complete volume, pH adjusted to 6.8 (Stürmer et al., 2014).

All compounds and reagents used were of high purity and were obtained from Sigma Aldrich, Merck, or BioRad. The pharmacological compounds (Phentolamine, SCH23390, Mianserin and Reserpine) were dissolved (stocks) and diluted (working solutions) in SSI. JBU was also diluted in ISS at pre-set concentrations. All solutions used in the tests were prepared daily, before use, to ensure the stability of the compounds to be tested.

2.4. Recording of Locomotory activity

In vivo locomotor activity was evaluated as described by Leal et al. (2018). Four animals were individually treated and placed in polystyrene boxes (25 cm long x 15 cm wide x 7 cm high), and they had no previous contact with the surface of the box. Video-monitoring records of the animals' exploratory behavior were made for 10 min. The animals in the control groups (ISS, JBU and pharmacological compounds) were treated 10 min before recordings. The animals tested in phase two of the experiments were pretreated 20 min before recording with the pharmacological compounds and, after 10 min, they were injected with JBU. Recordings were performed by a webcam (Logitech® HD) fixed above the system, connected to a Desktop computer (Dell, São Paulo, Brazil). Behavioral parameters were automatically calculated at a rate of 30 frames/s using IDtracker® vídeo monitoring software (Stoelting, CO, USA). Data analysis generated by IDtracker was performed using an *ad-hoc* script developed in Matlab® software. To ensure standard experimental conditions, all experiments were carried out during the same period of the day (11:00 am to 6:00 pm) and under the same environmental conditions in which the animals were kept.

2.5. *In vivo* cockroach Nerve-Muscle Coxal-Adductor Metathoracic preparation (NMCAM)

The *in vivo* coxal-adductor metathoracic nerve-muscle preparation was assembled as described by Martinelli et al. (2014). After anesthetizing the animals by cooling to 5 °C (7 min) and fixing it with entomological pins in dorsal decubitus on a dissecting plate, one of the third pair of cockroaches's leg was tied at the level of the tibia with a sewing thread and connected to a isometric transducer (1gf) coupled to an electromyographical recording system (AVS, São Carlos, Brazil). Then, the chitin was removed in the region corresponding to the metathoracic group (which includes the motor axon of the thigh

muscle and comprises the last pair of legs) to expose the nerve 5. A bipolar Ag/AgCl electrode was inserted for the application of electrical stimuli (2-5V/0.5 Hz/0.5ms). Neuromuscular recordings were made for 120 min. In control groups the animals (SSI, JBU and pharmacological compounds) were injected at the 10th minute of recordings. In phase two of the experiments, they were injected at 10 min of the recording period with the pharmacological compounds and, at the 20th minute, they were injected with JBU. The isometric recordings of muscle contraction were obtained using a signal amplifier model AECAD 04 (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brazil), being digitized and stored by the AQCAD software (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brazil). Data were further analyzed using ANCAD software (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brazil).

2.6. *Ex situ* recordings of the extracellular Spontaneous Neural Compound Action Potentials (SNCAP)

The preparation for SNCAP recordings was mounted as described by dos Santos et al. (2016) with modifications. After treatment and anesthesia by chilling (5 °C, 7 min), the insect's leg (metathoracic region) was carefully removed, being sectioned as close as possible to the animal's body, ensuring that the thigh, femur, tibia and tarsus remained intact and fixed under a plate cork of the SpikerBox device (Backyard Brains, USA), by a pair of Ag-AgCl electrodes. One of the electrodes was connected to the amplifier's ground connector and the other was placed onto the femur as an active recording electrode. Signals were recorded as audio recordings at a sampling rate of 1.0 kHz and digitized by the Neuron Spiker Box (Backyard Brains, USA). These conditions allowed recordings of 60-90 min. The animals in the control groups (SSI, JBU and pharmacological compounds) were treated 10 min before the removal of the animals' legs and, consequently, the beginning of the recordings. In phase two of the experiments, the animals were injected 20

min before leg removal with the pharmacological compounds and, after 10 min, they were injected with JBU. Action potentials were visualized, recorded, and retrieved in BYB Spike Recorder software (Backyard Brains, USA) and the analysis was done by WinWCP software (John Dempster, University of Strathclyde, Scotland).

2.7. Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyzes were performed using analysis of variance (One / Two) way-ANOVA followed by Dunnett, Sidak or Tukey test as *post hoc*, when necessary. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. All statistical analyzes were performed using the Graphpad Prism 7.0 software (Software Inc., San Diego, CA), where the significance in the One-way ANOVA is represented by * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$.

3. Results

3.1. JBU-induced hypokinesia in *N. cinerea*

To verify the effects of JBU upon the locomotor behavior of cockroaches, we employed the same doses, 1.5, 3 and 6 micrograms per gram of animal ($\mu\text{g/g}$), used by Carrazoni et al. (2016), in a previous study. In our experimental conditions, the total distance traveled by the animals in the saline control group was 518.9 ± 40.5 cm ($n = 40$). When JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ and 3 $\mu\text{g/g}$ were injected, there was a significant reduction in the distance traveled to 128.4 ± 13.4 cm and 194.9 ± 24.7 cm, respectively ($p < 0.0001$). However, the dose of 6 $\mu\text{g/g}$ did not significantly change the distance covered by the animals, remaining at 493.2 ± 54.6 cm (Fig. 1A). The percentage of stopping time of the animals was 40 ± 2 % in the saline control, 82 ± 1 % ($p < 0.0001$) and 73 ± 2 % ($p < 0.0001$) in JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ and 3 $\mu\text{g/g}$, respectively (Fig. 1B). In animals treated with JBU 6 $\mu\text{g/g}$, there was no significant change in any of those parameters.

3.2. Effect of pharmacological modulators on JBU-induced hypokinesia

To identify the relevance of the main monoaminergic systems in the alterations of the locomotor deficits caused by urease of *C. ensiformis*, different pharmacological instruments were employed. Thus, it was used selective inhibitors of octopamine (phentolamine), dopamine (SCH23390), serotonin (mianserin) receptors, and a presynaptic monoamine inhibitor (Reserpine).

In the locomotion tests, the total distance traveled by the animals in the saline control group was 518.9 ± 40.5 cm ($n = 40$). The injection of $1.5 \mu\text{g/g}$ JBU reduced total locomotion to 128.4 ± 13.4 cm ($p < 0.0001$). In the $0.6 \mu\text{g/g}$ phentolamine (**phento**) control, the animals traveled 353.5 ± 33.5 cm, a significant reduction compared to the saline control ($p < 0.03$). When pretreated with $0.6 \mu\text{g/g}$ **phento** and later injected with $1.5 \mu\text{g/g}$ JBU, the locomotion increased to 490.4 ± 44.9 cm (Fig. 2A), compared to JBU alone. The stopping time (%) of the animals was 40 ± 2 % in the saline control and 82 ± 1 % ($p < 0.0001$) in JBU $1.5 \mu\text{g/g}$. In the **phento** $0.6 \mu\text{g/g}$ and **phento** plus JBU $1.5 \mu\text{g/g}$ groups, the stopping time was 60 ± 2 ($p < 0.0001$) and 49 ± 3 % ($p < 0.05$) respectively, differing significantly from the control saline (Fig. 2B).

In the SCH23390 (**SCH**) $0.2 \mu\text{g/g}$ control, the animals walked 354.3 ± 37.6 cm, a significant reduction compared to the saline control ($p < 0.002$). When pretreated with **SCH** $0.2 \mu\text{g/g}$ and later injected with JBU $1.5 \mu\text{g/g}$, the distance traveled was increased to 385.1 ± 37.5 cm ($p < 0.05$), when compared with JBU alone (Fig. 2C). In the **SCH** groups $0.2 \mu\text{g/g}$ and **SCH** plus JBU $1.5 \mu\text{g/g}$ the stopping time was 58 ± 3 % ($p < 0.0001$) and 54 ± 3 % ($p < 0.001$) respectively, differing significantly from the control saline (Fig. 2D).

The treatment of the animals with mianserin 0.5 $\mu\text{g/g}$ alone (control mianserin, **mian**), resulted in a distance traveled of 446.5 ± 34.1 cm. Overall, the pretreatment of the cockroaches with **mian** did not interfere in JBU neurolocomotory deficit activity. Thus, when the animals were pretreated with 0.5 $\mu\text{g/g}$ **mian** and later injected with 1.5 $\mu\text{g/g}$ JBU, the distance traveled was 186.1 ± 20.5 cm, a similar reduction as in JBU alone treated animals, when compared to saline control ($p < 0.0001$) (Fig.2E). In the groups **mian** 0.5 $\mu\text{g/g}$ and **mian** plus JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ the stopping time was 51 ± 3 ($p < 0.03$) and 84 ± 2 % ($p < 0.0001$) respectively, differing significantly from the control saline (Fig. 2F).

In the reserpine control (**reser**) 0.3 $\mu\text{g/g}$ the animals walked 302.8 ± 30.4 cm, a significant reduction compared to the saline control ($p < 0.0001$). When pretreated with 0.3 $\mu\text{g/g}$ **reser** and later injected with 1.5 $\mu\text{g/g}$ JBU the distance traveled was 302.6 ± 31.8 cm ($p < 0.0001$) (Fig. 2G). In the **reser** 0.3 $\mu\text{g/g}$ and **reser** plus JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ groups, the stopping time was 59 ± 3 ($p < 0.0001$) and 62 ± 3 % ($p < 0.0001$) respectively, differing significantly from the saline control (Fig. 2A-H).

3.3. Effect of pharmacological modulators upon JBU-induced neuromuscular blockade in NMCAM preparation

In the NMCAM preparation, in saline control conditions, there was no change in twitch tension within 120 min recordings ($n = 6$). However, the injection of JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ resulted in a 60 % time-dependent neuromuscular blockade, reducing the contractile response to 40 ± 8 % in 120 min recordings ($p < 0.0001$). The **phento** control 0.6 $\mu\text{g/g}$ alone did not differ statistically from the saline control throughout the recordings. The group pretreated with **phento** and later injected with 1.5 $\mu\text{g/g}$ JBU produced a similar effect to the 0.6 $\mu\text{g/g}$ **phento** control alone (Fig. 3A).

Overall, when the SCH23390 control 0.2 $\mu\text{g/g}$ was assayed alone, there was only a significant difference at the times of 20 and 30min, when compared to the saline control, with responses in 101 ± 2 ($p < 0.03$) and 99 ± 2 % ($p < 0.02$), respectively. In the group pretreated with **SCH** following the injection of JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ there was no difference in the twitch tensions, compared to control conditions (100 ± 0.5 %), after 50 min recordings onwards (Fig. 3B).

The assay with mianserin 0.5 $\mu\text{g/g}$ alone showed no statistical difference when compared with the saline control, during the entire recording. The group pretreated with **mian** and later injected with JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ showed a similar effect to the control JBU 1.5 μg , with maximum contraction reduction of 53 ± 3 % ($p < 0.0001$), at 120 minutes of recording (Fig. 3C).

Overall, the treatment of the animals with reserpine 0.3 $\mu\text{g/g}$ alone (**reser**), decreased the contractile response upto 70 minutes recordings, reaching 73 ± 9 % ($p < 0.0001$). After 70min recordings, the motor response began to increase progressively. Therefore, the group pretreated with **reser** and 1.5 $\mu\text{g/g}$ JBU produced an effect similar to the saline control (Fig. 3D), showed that the drug was able to counteract the JBU-deleterious activity upon the cockroaches neuromuscular function.

3.4. JBU-induced changes in *N. cinerea* PACNE

The effect of JBU on PACNE recordings was also investigated, In our experimental conditions, the total number of events in control saline conditions, given as the spike number, were 3145 ± 110 ($n = 12$). When the animals received only JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$, the events dropped to 1726 ± 57 ($p < 0.0001$ compared to the control saline). However, doses of 3 and 6 $\mu\text{g/g}$ did not change the number of spikes, when compared to the control saline (Fig. 4A). In control saline animals, the average duration of the action potentials was 1.03 ± 0.10 milliseconds (ms), while in JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ counterparts the time was 1.53 ± 0.12 ms

($p < 0.002$) (Fig. 4B). Both the 3 $\mu\text{g/g}$ and the 6 $\mu\text{g/g}$ doses did not cause any significant change in the kinetics of the potentials.

3.5. Effect of pharmacological modulators on JBU-induced changes in *N. cinerea* PACNE

Using the same rationale to verify the influence of different monoaminergic systems in the JBU neurotoxicity, we have recorded the spontaneous sensilla action potentials, pretreating the animals with phentolamine, SCH, mianserin and reserpine. In this set of experiments, the number of events in the control saline group was 3145 ± 110 , in 60 min recordings ($n = 12$). When JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ was injected, there was a significant reduction in the number of events to 1726 ± 57 ($p < 0.0001$). However, in both 0.6 $\mu\text{g/g}$ phentolamine control and the group pre-treated with **phento** and later injected with 1.5 $\mu\text{g/g}$ JBU, no statistical difference was evidenced compared to the saline group (Fig. 5A). In animals in the control saline group, the average duration of action potentials was 1.03 ± 0.10 ms, while in those injected with JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ the time was 1.53 ± 0.12 ms ($p < 0.002$). Both in the 0.6 $\mu\text{g/g}$ **phento** and the **phento** + JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ group, there was no change in the duration of the potentials (Fig. 5B).

When SCH23390 0.2 $\mu\text{g/g}$ and **SCH** and JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ were injected in the animals, there was a partial reduction in the number of events to 2747 ± 114 ($p < 0.01$) and 2676 ± 83 ($p < 0.005$), respectively (Fig. 5C). Both SCH 0.2 $\mu\text{g/g}$ and **SCH** plus JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ did not alter the duration significantly (Fig. 5D).

In the animals treated with control mianserin 0.5 $\mu\text{g/g}$ alone and in the group pre-treated with **mian** and later injected with JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$, there was a reduction in the number of events to 2490 ± 66 ($p < 0.0001$) and 1751 ± 88 ($p < 0.0001$) respectively. Thus it was evidenced an ineffectiveness of **mian** to prevent the JBU 1.5 $\mu\text{g/g}$ comom effect upon frequency of the cockroaches leg sensilla spikes (Fig. 5E). In the **mian** 0.5

$\mu\text{g/g}$ group the duration was not significantly changed, while in the group treated with **mian** plus JBU $1.5 \mu\text{g/g}$ there was an increase in the duration of the potentials to $1.70 \pm 0.05 \text{ ms}$ ($p < 0.0008$), being higher than the increase caused by the JBU control $1.5 \mu\text{g/g}$ (Fig. 5F).

The assay with **reser** $0.3 \mu\text{g/g}$ alone and in the group pretreated with **reser** and later injected with JBU $1.5 \mu\text{g/g}$, showed no statistical difference compared to the saline control (Fig. 5G). In both animals treated with **reser** $0.3 \mu\text{g/g}$ and those treated with **reser** plus JBU $1.5 \mu\text{g/g}$, the duration was unchanged (Fig. 5H).

4. Discussion

In this work, the mechanisms involved in the central and peripheral neurotoxic effects induced by the urease of *Canavalia ensiformis* in insects were further investigated. Here, it was demonstrated that the octopaminergic-dopaminergic pathways are the main neurotransmission systems affected by JBU to cause alterations of the locomotory activity. The results obtained go along with previous data showing that lower doses of JBU produce more intense effect, including neurotoxic action, thus confirming the JBU u-shape dose-response curve that has been reported in earlier works of our group (Follmer et al., 2004; Stanisçuaski et al., 2009). The detailed scientific comments about the results presented in this paper and their implications to understand the mechanisms involved in the insecticidal activity of ureases are discussed here.

We have demonstrated that the administration of JBU in cockroaches induces hypokinesia, characterized by a significant decrease in the distance traveled parameter, and consequently, a significant increase in the immobility episodes (data not shown) and stopping time. The reduction in the locomotory activity of cockroaches is a phenomenon strikingly linked with the grooming activity (Barreto et al., 2020; Leal et al., 2020). Thus, considering

our experimental conditions and the current literature, we suggest that the decrease in the cockroaches' exploratory activity caused by JBU is a secondary effect, resulting from the increase in grooming behavior (mostly leg grooming) induced by JBU, as we previously reported (Carrazoni et al., 2016).

The locomotory behavior of insects is modulated by monoamines in central pattern generators, mainly octopamine and serotonin (Goossens et al., 2020). In our experimental conditions of locomotory behavior assays, the treatment of the cockroaches with different doses of JBU induced a significant reduction in the exploratory behavior. This pro-inhibitory activity of JBU was counteracted by the administration of **phento** < **SCH** < **reser**. Thus, it was clearly demonstrated that the monoaminergic' pathways modulators alter the pattern of JBU-induced locomotory deficit, reinforcing the suggestion that the neurotoxic effect of ureases involve modulation of the octopaminergic system (Carrazoni et al., 2016; Barreto et al., 2020). But one question still remains: How could the DA dopaminergic receptor selective inhibitor also prevent the JBU's pro-inhibitory effect on the locomotory activity? One clue is the observation that dopamine, despite being involved in triggering insect movement by modulating motor circuits via DA receptors (Zhukovskaya et al., 2013), also induce a pronounced increase in hind-leg grooming activity by activating D1 receptors (Pitmon et al., 2016), a phenomenon that we also observed here (data not shown). Thus, we suggest that in our experimental conditions, the protective activity of **SCH23390** upon the locomotory deficit induced by JBU in cockroaches involves the prevention of hind-leg grooming activity, therefore, decreasing the number of stopped time events and consequently favoring the exploratory behavior. On the other hand, mianserin did not affect the overall effect of JBU upon exploratory activity, showing no interference on the decrease of distance traveled by the cockroaches or deficit of exploratory activity of the animals, suggesting that serotonin is probably less involved in the entomotoxic activity (Vleugels et al., 2015).

JBU also induces an irreversible neuromuscular blockade in *N. cinerea* (Carrazoni et al., 2016). As expected, in our experimental conditions, JBU reproduced the reduction in the twitch tension we reported previously, however, at lower dose. In insects, it is well known that, at the neuromuscular junction, glutamate (**GLU**) acts as the main excitatory neurotransmitter and gamma aminobutyric acid (**GABA**) is the main inhibitory neurotransmitter. Furthermore, in insect endplates, the release of **GLU** or **GABA** can induce both an increase and a decrease in muscle twitching, depending on the type of muscle or synapse involved at neuromuscular junction. Although to a lesser extent, serotonin is also responsible for a reduction in the muscle twitch tension in a model of *S. gregaria* preparation (Watson, 1986). However, in our experimental conditions, mianserin failed to alter the JBU pro-inhibitory activity, suggesting a lesser involvement in the JBU-negative modulation of the insect neuromuscular transmission. In this set of experiments, both **phento** and **SCH** were able to prevent the JBU pro-inhibitory activity upon the cockroaches neuromuscular function. The biogenic amine octopamine is widely distributed within the nervous system of invertebrates. In insects, octopamine can act as a neurotransmitter, a neurohormone, and a neuromodulator (Orchard, 1982). Data from literature indicate that octopamine may act as an association neurotransmitter, controlling the release of **GLU** and **GABA** in the synaptic cleft of insects (Farooqui, 2012). In *Drosophila melanogaster* larval muscles, the exogenous application of octopamine decreases the input resistance of muscle fibers, increases the amplitude of excitatory junction potentials (EJPs), augments contraction force and duration (Ormerod et al., 2013). Recently our research group showed that JBU increases the spontaneous excitatory junctional potentials (mEJPs) in *Drosophila melanogaster* neuromuscular preparations, an effect that, ultimately, lead to an increase of calcium influx in nerve terminals (Carrazoni et al., 2018). This pro-excitatory activity of JBU would cause an hyperexcitation of the insect nervous system leading to the exhaustion of the neurotransmitter

that would ultimately cause the neuromuscular failure. However, since JBU positively modulates the insect octopaminergic systems (Carrazoni et al., 2016), and taking into account that phentolamine prevents the octopamine activity, one can infer that phentolamine is counteracting the JBU hyperexcitatory activity by preventing the action of octopamine. Regarding the opposite effect of **SCH** against the JBU neuromuscular blocking activity, Cooper and Neckameyer (1999) demonstrated that dopamine reduces the responsiveness of glutamate in some postsynaptic neurons. Potentially the anti-JBU activity of **SCH** could be caused either by an increased responsiveness of **GLU** at the insect neuromuscular junction, or by preventing dopamine binding also to presynaptic receptors at insect neuromuscular junctions, thereby causing an augmentation in the number of vesicles that released due to neural activity (Cooper and Neckameyer, 1999).

JBU also induced alterations in the kinetic and frequency of PACNE in *N. cinerea*, characterized by a decrease in the number of events together with an increase in the duration of the potentials. This effect agreed with our previous results (Carrazoni et al. 2018), which showed that JBU increased the spontaneous EJPs at *Drosophila* neuromuscular junctions. In our experimental conditions, **reser>SCH>phento**, but not **Mian**, were able to prevent, to a certain extent, the negative effect of JBU upon the frequency of the spontaneous potentials. In cockroaches, each tactile hair is composed of a hollow hair shaft whose base is fixed to the dendritic tip of a single bipolar sensory neuron. The hair acts as a lever arm that exerts forces on the tip of the sensory neuron dendrites, where mechanotransduction channels open to produce electrical currents (French and Sanders, 1981). The ionic basis of mechanoreceptor transduction is probably similar for all insect mechanoreceptor types, but the driving force for this current is due in part to the large K^+ gradient, that is maintained across the high resistance layer of epithelial cells between the endolymph and the central hemolymph (Tuthill and Wilson, 2016). An ion channel of the transient receptor potential-TRP superfamily has been

identified which is required for production of mechanoreceptor currents by insect bristles and seems likely to represent a new kind of mechanically gated channel (Duggan et al, 2000). Furthermore, TRP channels are often activated by chemicals that provide the sensory experience associated with their normal sensory function. In this regard, the reestablishment of mechanosensory transduction in *N. cinerea* bristles by reserpine, SCH23390 and mianserin seems to rely on a complex mechanism. Therefore, the literature shows the beneficial interaction of these monoaminergic modulators in physiopathological conditions involving the disturbance of TRP channels (Berktur et al. 2019; Wang et al. 2020). In addition, all these drugs can indeed affect voltage-gated calcium channels (Login et al., 1985; Lavoie et al., 1997), which controls depolarization in neurons (Simms and Zamponi, 2014) and it is potentially involved in the JBU peripheral neurotoxicity (Carazoni et al., 2018).

Finally, in all assays performed in this work, the lowest dose of JBU was found to be the most effective in reproducing the typical neurotoxic activity of the urease in cockroaches. Many works have investigated the oligomerization behavior of JBU and how this is related to its catalytic and entomotoxic properties. It is believed that the partial or transient exposure of hydrophobic clumps on the surface of the protein is responsible for this phenomenon. It has been shown that the JBU oligomerization process is mainly concentration-dependent, resulting in a reduction or inhibition of protein activity (Follmer et al., 2004; Stanisquaskiet al., 2009).

5. Conclusions

Taken together our results confirm that the behavioral disturbance of *Nauphoeta cinerea*, as part of the entomotoxic activity of JBU, relies on the modulation of monoaminergic systems. The inhibitory activity of JBU, which involves a detrimental decrease in both nerve action potentials, neuromuscular functions and ultimately the exploratory activity, are reflex of an

interplay between the octopaminergic-dopaminergic pathways, and in a lesser degree the octopaminergic-serotonergic signal transduction. Further site-direct electrophysiological studies on the direct interactions of Jack Bean Urease with the *Nauphoeta cinerea* nervous system are under way aiming to unveil more details of the molecular targets involved in the neurotoxic activity of this urease.

Credit authorship contribution statement

Yuri Correia Barreto: Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Raquel Soares Oliveira:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Software. **Bruna Trindade Borges:** Data curation, Formal analysis, Methodology. **Maria Eduarda Rosa:** Formal analysis, Methodology. **Ana Paula Zanatta:** Methodology. **Carlos Gabriel Moreira de Almeida:** Methodology, Data curation. **Lúcia Vinadé:** Methodology, Supervision. **Celia Regina Carlini:** Funding Acquisition, Resources, Supervision. **Cháriston Andre Dal Belo:** Conceptualization, Funding acquisition, Investigation, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

YCB, RSO, BTB, MER, APZ and CGMA were supported by scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil; Finance Code 001). This Work Was Supported by a grant from CAPES (Edital 063/2010 Toxinologia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Ed. Universal 2014 [Nº. 446052/2014-1] and Bolsa de Produtividade em Pesquisa [No. 306098/2014-8], and by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Doenças Cerebrais e Excitotoxicidade [CNPq 465671/2014-4 and FAPERGS 17/2551-0000516-3].

References

Alekseyenko, O. V., Chan, Y.B., Okaty, B.W., Chang, Y.J., Dymecki, S.M., Kravitz, E.A.,

2019. Serotonergic Modulation of Aggression in *Drosophila* Involves GABAergic and Cholinergic Opposing Pathways. *Curr. Biol.* 29, 2145–2156.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.070>
- Ayali, A., Johnson, B.R., Harris-Warrick, R.M., 1998. Dopamine modulates graded and spike-evoked synaptic inhibition independently at single synapses in pyloric network of lobster. *J. Neurophysiol.* 79, 2063–2069. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.4.2063>
- Barreto, Y.C., Rosa, M.E., Zanatta, A.P., Borges, B.T., Hyslop, S., Vinadé, L.H., Dal Belo, C.A., 2020. Entomotoxicity of jaburetox: revisiting the neurotoxic mechanisms in insects. *J. Venom Res.* 10, 38–44.
- Bektur, E., Şahin, E., Ceyhan, E., Donmez, D. B., Canbek, M., Baycu, C., & Can, O. D., 2019. Beneficial effect of mirtazapine on diabetes-induced hyperalgesia: involvement of TRPV1 and ASIC1 channels in the spinal cord and dorsal root ganglion. *Neurological Research*, 1–10. doi:10.1080/01616412.2019.158046
- Birmingham, J.T., Tauck, D.L., 2003. Neuromodulation in invertebrate sensory systems: from biophysics to behavior. *J. Exp. Biol.* 206, 3541–6. <https://doi.org/10.1242/jeb.00601>
- Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1515–39. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00240-4](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00240-4)
- Carlini, C.R., Guimarães, J.A., 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19, 667–675. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90104-5)
- Carlini, C.R., Ligabue-Braun, R., 2016. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon* 110, 90–109. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.020>
- Carlini, C.R., Oliveira, A.E.A., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Wells, M.A., 1997. Biological Effects of Canatoxin in Different Insect Models: Evidence for a Proteolytic Activation of the Toxin by Insect Cathepsinlike Enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90, 340–348. <https://doi.org/10.1093/jee/90.2.340>
- Carr, C.E., Fournier, C.R., 1980. Pharmacological Analysis of a Monosynaptic Reflex in the Cockroach, *Periplaneta Americana*. *J. Exp. Biol.* 86.
- Carrazoni, T., de Avila Heberle, M., Perin, A.P.A., Zanatta, A.P., Rodrigues, P.V., dos Santos, F.D.M., de Almeida, C.G.M., Vaz Breda, R., dos Santos, D.S., Pinto, P.M., da Costa, J.C., Carlini, C.R., Dal Belo, C.A., 2016. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Toxicology* 368–369, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.09.007>
- Carrazoni, T., Nguyen, C., Maciel, L.F., Delgado-Cañedo, A., Stewart, B.A., Lange, A.B., Dal Belo, C.A., Carlini, C.R., Orchard, I., 2018. Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions. *Pestic. Biochem. Physiol.* 146, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.009>
- Chapman, R.F., 2012. *The Insects*. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139035460>
- Cooper, R.L., Neckameyer, W.S., 1999. Dopaminergic modulation of motor neuron activity and neuromuscular function in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 122, 199–210. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(98\)10160-8](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(98)10160-8)
- Defferrari, M.S., Da Silva, R., Orchard, I., Carlini, C.R., 2014. Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Toxicon* 82, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.006>
- Defferrari, M. S.; Demartini D. R.; Marcelino, T.B.; Pinto, P.M.; Carlini, C. R., 2011. Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. *Insect Biochemistry*

- and Molecular Biology, v.41, p.388 - 399.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B., 1975. Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel? J. Am. Chem. Soc. <https://doi.org/10.1021/ja00847a045>
- dos Santos, D.S., Carvalho, E.L., de Lima, J.C., Breda, R.V., Oliveira, R.S., de Freitas, T.C., Salamoni, S.D., Domingues, M.F., Piovesan, A.R., Boldo, J.T., de Assis, D.R., da Costa, J.C., Dal Belo, C.A., Pinto, P.M., 2016. Bothriurus bonariensis scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems. Chem. Biol. Interact. 258, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.08.008>
- Duggan A, García-Añoveros J, Corey DP., 2000. Insect mechanoreception: what a long, strange TRP it's been. Curr Biol. May 18;10(10):R384-7. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00478-4
- Erber, J., Kloppenburg, P., Scheidler, A., 1993. Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behavior, neuroanatomy and electrophysiology. Experientia. <https://doi.org/10.1007/BF01929916>
- Farooqui, T. (2012). Review of octopamine in insect nervous systems. Open Access Insect Physiology, 1. doi:10.2147/oaip.s20911
- Follmer C, Barcellos GB, Zingali RB, Machado OL, Alves EW, Barja-Fidalgo C, Guimarães JA, Carlini CR., 2001. 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. 2001 Nov 15;360(Pt 1):217-24. doi: 10.1042/0264-6021:3600217.
- Follmer, C., Pereira, F. V., da Silveira, N.P., Carlini, C.R., 2004. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering. Biophys. Chem. 111, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.03.009>
- Goossens, S., Wybouw, N., Van Leeuwen, T., 2020. The physiology of movement. Mov Ecol 8, 5. <https://doi.org/10.1186/s40462-020-0192-2>
- Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H., Nakamura, M., 2000. Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 4, 1415–1421. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00063-9)
- Jeffery, C.J., 1999. Moonlighting proteins. Trends Biochem. Sci. 24, 8–11. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01335-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01335-8)
- Junqueira, L. C. Carneiro, J., 2013. Histologia Básica: Texto e Atlas, 12°. ed. Guanabara Koogan.
- Kappaun, K., Piovesan, A.R., Carlini, C.R., Ligabue-Braun, R., 2018. Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. J. Adv. Res. 13, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>
- Kappaun, K.; Martinelli, A. H. S.; Broll, V.; Zambelli, B.; Lopes, F. C.; Ligabue-Braun, R.; Fruttero, L.L.; Moyetta, N. R.; Bonan, C. D.; **Carlini, Celia R.**; Ciurli, S., 2019. Soyuretox, an Intrinsically Disordered Polypeptide Derived from Soybean (Glycine Max) Ubiquitous Urease with Potential Use as a Biopesticide. International journal of molecular sciences. v.20, p.e5401.
- Kurahashi, H., Atiwetin, P., Nagaoka, S., Miyata, S., Kitajima, S., Sugimura, Y., 2005. Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 51, 1055–1061. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2005.05.007>
- Leal, A.P., Oliveira, R.S., Perin, A.P.A., Borges, B.T., de Brum Vieira, P., dos Santos, T.G., Vinadé, L., Valsecchi, C., Belo, C.A.D., 2018. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. Pestic. Biochem. Physiol. 148, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.016>

- Leal, A.; Karnopp, E.; Barreto, Y.C.; Oliveira, R.S.; Rosa, M.E.; Borges, B.T.; Goulart, F.L.; Souza, V.Q.d.; Laikowski, M.M.; Moura, S.; Vinadé, L.; Rocha, J.B.T.d.; Dal Belo, C.A., 2020. The Insecticidal Activity of *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) Paratoid Secretion in *Nauphoeta cinerea* Cockroaches. *Toxins*, 12, 630. <https://doi.org/10.3390/toxins12100630>
- Lavoie PA, Beauchamp G, Elie R., 1997. Atypical antidepressants inhibit depolarization-induced calcium uptake in rat hippocampus synaptosomes. *Can J Physiol Pharmacol*. Aug;75(8):983-7. doi: 10.1139/cjpp-75-8-983.
- Login, I. S., Judd, A. M., Cronin, M. J., Yasumoto, T., & MacLeod, R. M., 1985. Reserpine is a calcium channel antagonist in normal and GH3 rat pituitary cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 248(1), E15–E19. doi:10.1152/ajpendo.1985.248.1
- Marder, E., Bucher, D., Schulz, D.J., Taylor, A.L., 2005. Invertebrate central pattern generation moves along. *Curr. Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.022>
- 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., 2014. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 935–944. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.11.010>
- Micheletto, Y.M.S., Moro, C.F., Lopes, F.C., Ligabue-Braun, R., Martinelli, A.H.S., Marques, C.M., Schroder, A.P., Carlini, C.R., da Silveira, N.P., 2016. Interaction of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and a derived peptide with lipid vesicles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 145, 576–585. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.063>
- Moyetta, N.R., Fruttero, L.L., Leyria, J., Ramos, F.O., Carlini, C.R., Canavoso, L., 2021. The entomotoxin Jack Bean Urease changes cathepsin D activity in nymphs of the hematophagous insect *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part - B Biochem. Mol. Biol.* 251. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2020.110511>
- 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., 2007. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides* 28, 2042–2050. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.009>
- Mulinari, F.; Becker-Ritt, A. B.; Demartini D. R.; Ligabue-Braun, R.; Stanisçuaski, F.; Verli, H.; Fragoso, R.R.; Schroeder, E.K.; Carlini, C. R.; Grossi-de-Sá, M.F., 2011. Characterization of JBURE-IIb Isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC Urease. E-pub Jul 2, 2011. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*. v.1814, p.1758 - 1768.
- Orchard, I., 1982. Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator. *Canadian Journal of Zoology*, 60(4), 659–669. doi:10.1139/z82-095
- Ormerod, K. G., Hadden, J. K., Deady, L. D., Mercier, A. J., & Krans, J. L., 2013. Action of octopamine and tyramine on muscles of *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Neurophysiology*, 110(8), 1984–1996. doi:10.1152/jn.00431.2013
- Osborne, R.H., 1996. Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol. Ther.* [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02054-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02054-3)
- Piovesan, A. R.; Stanisçuaski, F.; Marco-Salvadori, J.; Real-Guerra, R.; Defferrari, M. S.; Carlini, C. R., 2008. Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the Release of Entomotoxic Peptides from *Canavalia ensiformis* Urease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v.38, p.1023 – 1032.
- Piovesan, A.R., Martinelli, A.H.S., Ligabue-Braun, R., Schwartz, J.L., Carlini, C.R., 2014. *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid

- bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 547, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.006>
- Pitmon, E., Stephens, G., Parkhurst, S. J., Wolf, F. W., Kehne, G., Taylor, M., & Lebestky, T., 2016. The D1 family dopamine receptor, DopR, potentiates hind leg grooming behavior in *Drosophila*. *Genes, Brain and Behavior*, 15(3), 327–334. doi:10.1111/gbb.12264
- Richter, S., Loesel, R., Purschke, G., Schmidt-Rhaesa, A., Scholtz, G., Stach, T., Vogt, L., Wanninger, A., Brenneis, G., Döring, C., Faller, S., Fritsch, M., Grobe, P., Heuer, C.M., Kaul, S., Møller, O.S., Müller, C.H.G., Rieger, V., Rothe, B.H., Stegner, M.E.J., Harzsch, S., 2010. Invertebrate neurophylogeny: Suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. *Front. Zool.* 7. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-29>
- Sollai, G., Solari, P., Corda, V., Masala, C., Crnjar, R., 2012. The spike generator in the labellar taste receptors of the blowfly is differently affected by 4-aminopyridine and 5-hydroxytryptamine. *J. Insect Physiol.* 58, 1686–1693. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.010>
- Stanisçuaski, F., Te Brugge, V., Carlini, C.R., Orchard, I., 2009. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *J. Insect Physiol.* 55, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.12.002>
- Stanisçuaski, F., Te Brugge, V., Carlini, C.R., Orchard, I., 2010. Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. *J. Insect Physiol.* 56, 1078–1086. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.002>
- Simms, B. A., & Zamponi, G. W., 2014. Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. *Neuron*, 82(1), 24–45. doi:10.1016/j.neuron.2014.03.016
- Stanisçuaski, F.; CARLINI, C. R., 2012. Plant Ureases and Related Peptides: Understanding Their Entomotoxic Properties. *Toxins*. v.4, p.55 – 67.
- Stürmer, G., de Freitas, T.C., de Avila Heberle, M., de Assis, D.R., Vinadé, L., Batista Pereira, A., Luis Franco, J., André Dal Belo, C., 2014. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal Doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 109, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.006>
- Sumner, J.B., 1926. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69, 435–441.
- Tuthill, J. C., & Wilson, R. I., 2016. Mechanosensation and Adaptive Motor Control in Insects. *Current Biology*, 26(20), R1022–R1038. doi:10.1016/j.cub.2016.06.070
- Vleugels, R., Verlinden, H., Broeck, J. Vanden, 2015. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. *Neurotransmitter* 3, 1–14. <https://doi.org/10.14800/nt.314>
- Wang, R., Tu, S., Zhang, J., & Shao, A., 2020. Roles of TRP Channels in Neurological Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1–13. doi:10.1155/2020/7289194
- Watson, A.H.D., 1986. The distribution of GABA-like immunoreactivity in the thoracic nervous system of the locust *Schistocerca gregaria*. *Cell Tissue Res.* 246, 331–341. <https://doi.org/10.1007/BF00215895>
- Weber, M., Jones, M.J., Ulrich, J., 2008. Optimisation of isolation and purification of the jack bean enzyme urease by extraction and subsequent crystallization. *Food Bioprod. Process.* 86, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2007.10.005>
- Weisel-Eichler, A., Haspel, G., Libersat, F., 1999. Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *J. Exp. Biol.* 202, 957–964.
- Zhukovskaya, M.; Yanagawa, A.; Forschler, B.T., 2013. Grooming Behavior as a Mechanism of Insect Disease Defense. *Insects*, 4, 609–630. <https://doi.org/10.3390/insects4040609>

Figure Legends

Figure 1. Alteration of the locomotory behavior of *Nauphoeta cinerea* by the treatment with JBU. A) Distance traveled (cm). B) Stopping time (%). C) 2D representation of the animals' trajectory during the experiments. Green dots refer to areas with the highest concentration of immobility episodes (data not shown). Results were expressed as Mean \pm SEM by One-way ANOVA, followed by Dunnett (n=40).

Figure 2. *In vivo* pharmacological dissection of the exploratory deficit induced by Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. (A-B) Phentolamine. (C-D) SCH23390. (E-F) Mianserin. (G-H) Reserpine. I) 2D representation of the animals' trajectory during the experiments. Green dots refer to areas with the highest concentration of immobility episodes (data not shown). Results were expressed as Mean \pm SEM using One-way ANOVA analysis, followed by Dunnett and Sidak (#### represents $p < 0.0001$) (n=40).

Figure 3. Reversal of the neuromuscular failure induced by Jack Bean Urease (JBU), by the previous application of monoaminergic modulators, at *in vivo* cockroach nerve-muscle preparation. A) Phentolamine. B) SCH23390. C) Mianserin. D) Reserpine. E) Representative traces of neuromuscular recordings, at times 30, 60, 90 and 120 minutes, with the bar representing 1 gram of force. The points on the graph were expressed as Mean \pm SEM through Two-way ANOVA analysis, followed by Tukey (“#” represents the comparison between JBU 1.5 μ g/g versus pharmacological modulators + JBU.5 μ g/g where #### is equal $p < 0.0001$) (n = 6).

Figure 4. Extracellular recordings of leg sensilla spontaneous action potentials in absence and presence of Jack Bean Urease (JBU). A) Events (number of Spike). B) Duration (ms). C) Representation of the PACNE records of *N. cinerea* where the dashed line represents 1 second (1s). Results were expressed as Mean \pm SEM using One-way ANOVA analysis, followed by Dunnett (n = 12).

Figure 5. Protective activity of monoaminergic modulators against the inhibitory action of Jack Bean Urease (JBU) upon the leg sensilla spontaneous action potentials firing. (A-B) Phentolamine. (C-D) SCH23390. (E-F) Mianserin. (G-H) Reserpine. I) Representation of PACNE records where the dashed line represents 1 second. The results were expressed as Mean \pm SEM through One-way ANOVA analysis, followed by Dunnett and Sidak (# represents $p < 0.05$, ## represents $p < 0.03$ and #### represents $p < 0.0001$) (n = 12).

Figure 1

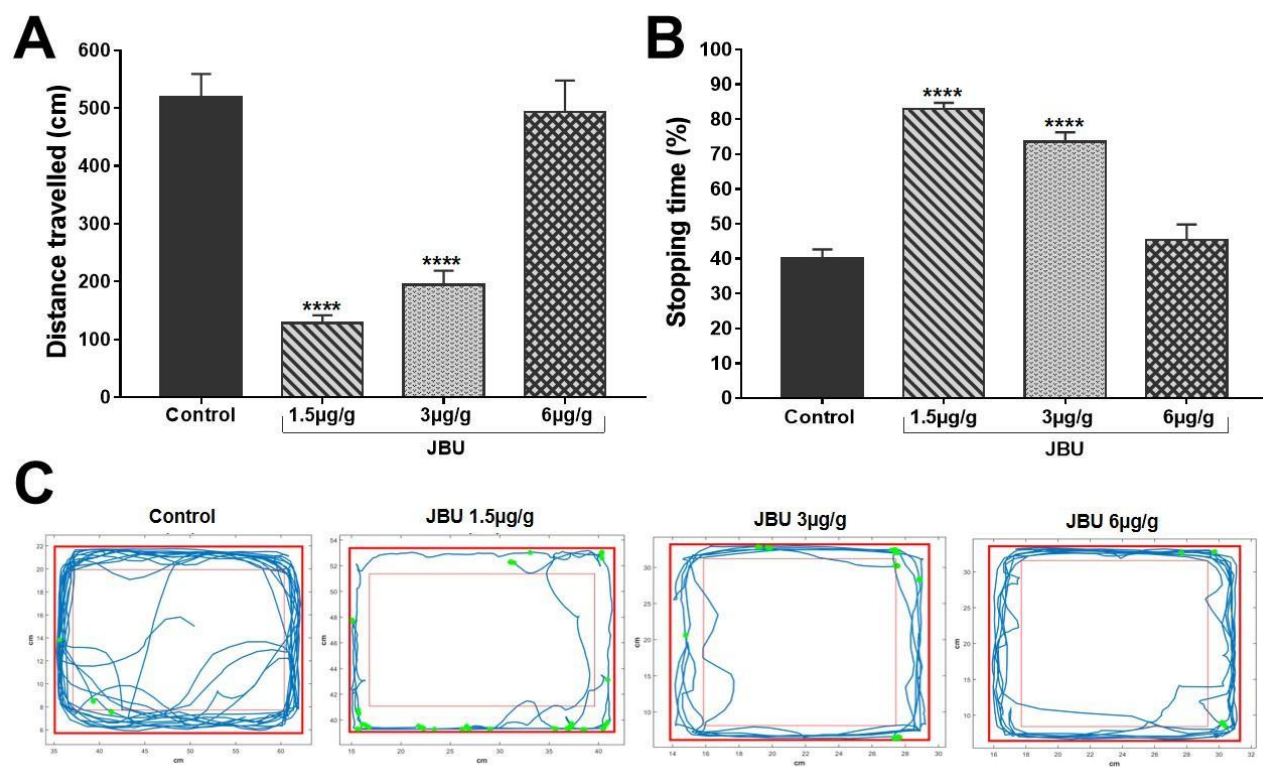


Figure 2

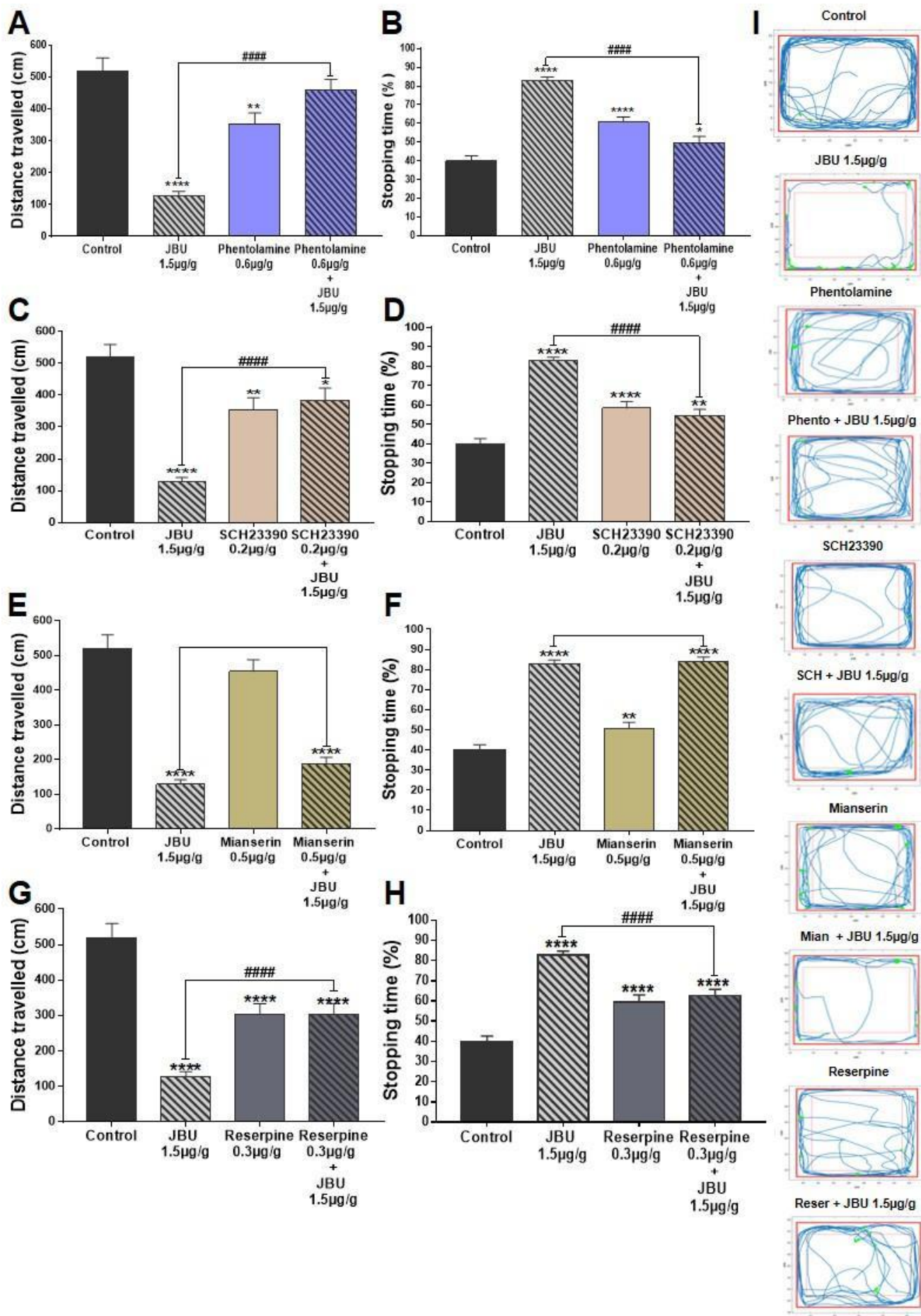


Figure 3

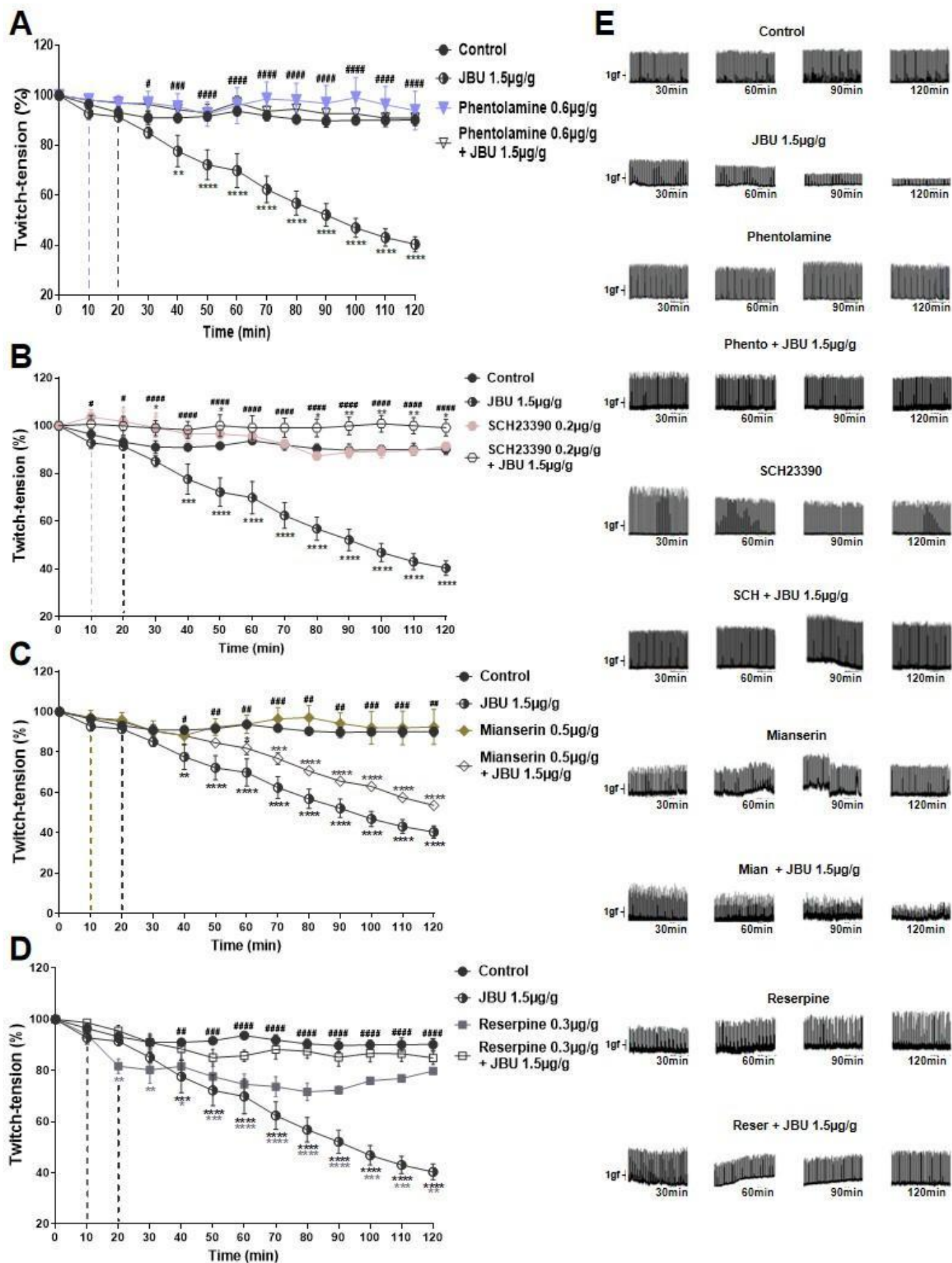


Figure 4

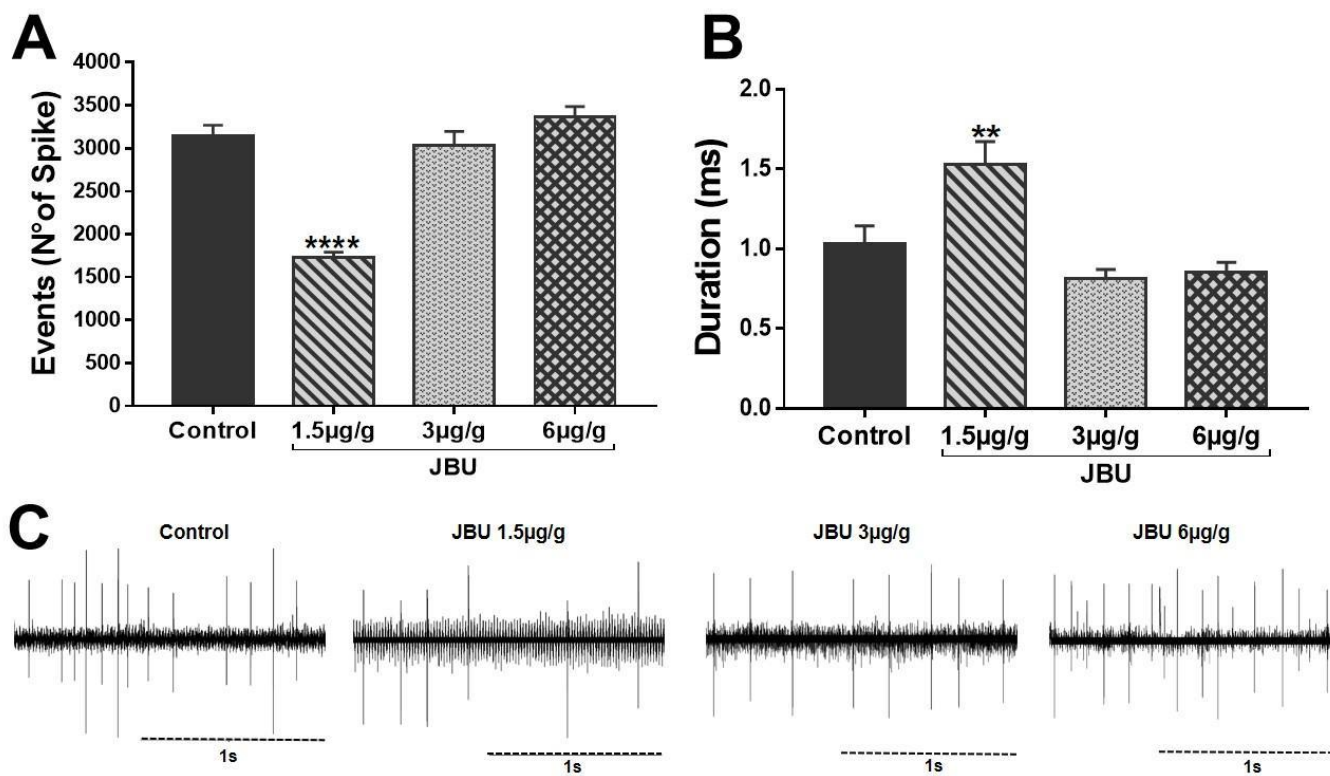
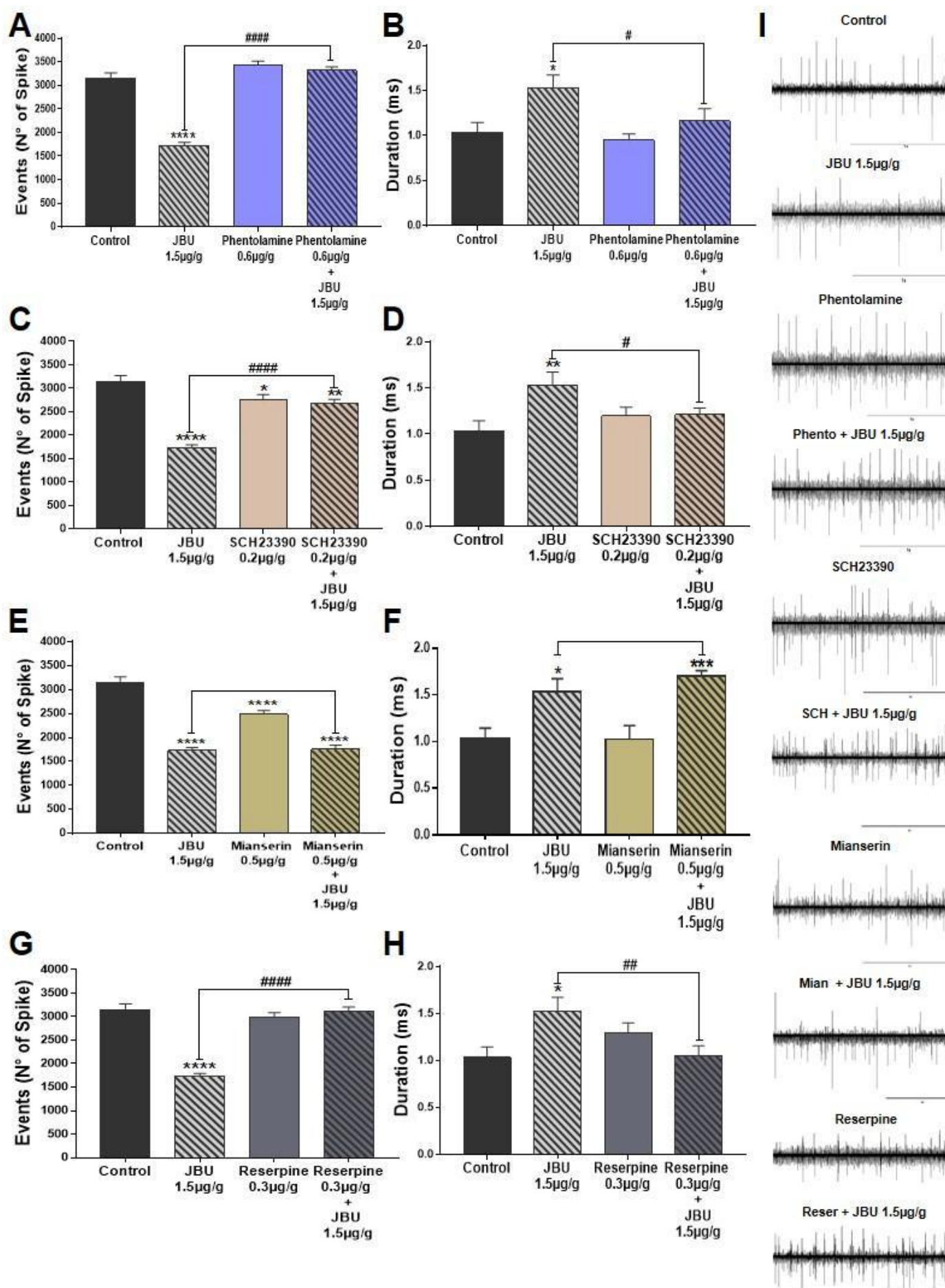


Figure 5



4 PROPOSTA DE MECANISMO DE AÇÃO SOBRE SISTEMA NERVOSO DE INSETOS

Carrazoni et al. (2018) confirmaram através do ensaio de imagem de cálcio, utilizando o gânglio metatorácico de *N. cinerea*, que um dos efeitos da JBU é o aumento do cálcio intracelular, sendo esse o fator chave para a neurotoxicidade de JBU. No trabalho supracitado, o aumento nos potenciais espontâneos de *D. melanogaster* indicou que o possível mecanismo de ação da JBU fosse a liberação de neurotransmissores pré-sinápticos. Outra hipótese sugerida por Carrazoni et al. (2016), é que o mecanismo de ação da JBU seja a modulação via células pré-sinápticas. A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, através do controle positivo (Reserpina, um antagonista inibidor dos transportadores VMATs), foi possível observar que nos grupos pré tratados com esse antagonista, o efeito da JBU foi abolido, embasando assim, esta hipótese.

Baseado no supraexposto, juntamente aos resultados obtidos nesse trabalho, propomos que o mecanismo primário da entomotoxicidade da principal isoforma da urease de *C. ensiformis*, ocorre pela promoção do influxo dos íons de cálcio (Ca^{2+}) nos terminais pré-sinápticos dos neurônios monoaminérgicos. Existem duas hipóteses sobre como a JBU promove esse influxo. A primeira, seria por influência direta da JBU sobre os canais de cálcio voltagem-dependentes. Na segunda, a urease poderia se inserir na membrana do neurônio e formar canais seletivos a cálcio. De qualquer maneira, o influxo resultaria em ancoramento e, conseqüentemente, liberação dos neurotransmissores (monoaminas) na fenda sináptica, sem a ocorrência de um sinal nervoso (potencial de ação) originado do sistema do animal. Esse evento, acontecendo de forma paralela em várias sinapses, resultaria em uma superestimulação dos neurônios pós-sináptico, e conseqüentemente, em diversas alterações comportamentais e fisiológicas (Figura 9). Este mecanismo também explicaria a dificuldade de reprodutibilidade em experimentos realizados com JBU (CARRAZONI et al., 2016, 2018; PIOVESAN et al., 2014).

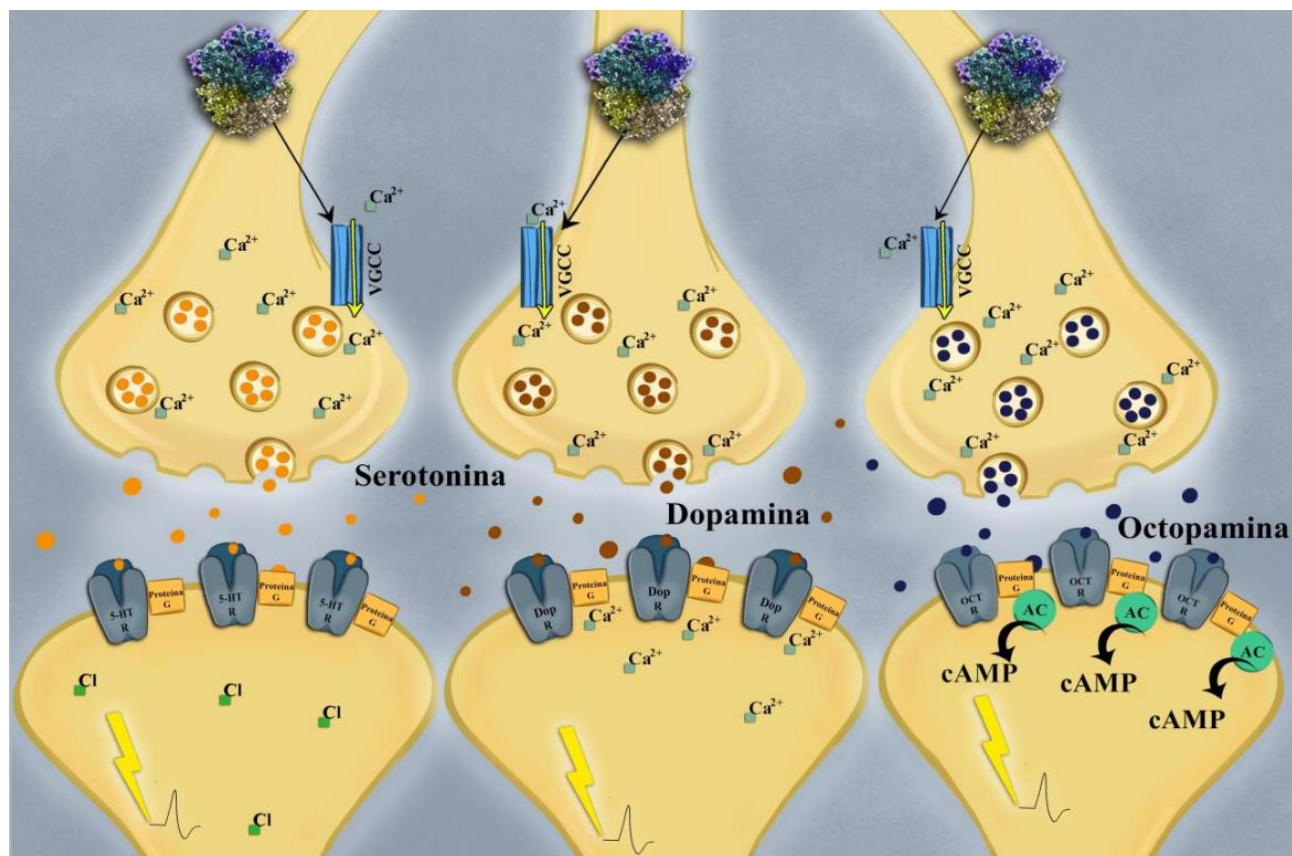


Figura 9: Representação ilustrada do mecanismo de ação primário da entomotoxicidade da JBU sugerido. Resumidamente, a influência da JBU sobre os canais de cálcio voltagem-dependentes (VGCC) causando liberação dos neurotransmissores, resultando em ativação dos receptores pós-sinápticos acoplados a proteína G, ativando assim, cascatas de segundos mensageiros, por exemplo, Ca²⁺, Cl⁻ e cAMP. Resultando em alterações fisio-comportamentais. Fonte: MSc. Bruna Trindade Borges.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

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

- A JBU induziu hipocinesia e alteração do comportamento exploratório de *N. cinerea*, demonstrando o envolvimento das vias octo, seroto e dopaminérgica, possivelmente como efeito secundário da alteração do *grooming*;
- A menor concentração de JBU (1,5µg/g) causou bloqueio neuromuscular em *N. cinerea*, caracterizando o forte efeito de oligomerização dessa urease, sendo condizente com os resultados encontrados na literatura.
- A JBU induziu alterações na biofísica e na frequência dos PACNEs em *N. cinerea*, possivelmente pela interferência nos canais TRP e/ou nos canais de sódio voltagem-dependente, via modulação octo/dopaminérgica;
- A neuromodulação monoaminérgica é essencial para a homeostase do sistema nervoso de *N. cinerea*, e para entomotoxicidade periférica de JBU;
- Provavelmente, o mecanismo de ação da JBU seja a alteração na neurotransmissão monoaminérgica, pela influência da urease nos canais de cálcio voltagem-dependentes nos terminais pré-sinápticos;
- Este trabalho contribui para elucidar a atividade biológica e o mecanismo de ação da JBU em sistema nervoso periférico de invertebrados. A entomotoxicidade apresentada pela urease reforça a possibilidade de utilização bioativos de origem natural e aplicabilidade biotecnológica;
- Outros estudos eletrofisiológicos sobre as interações diretas da JBU com o sistema nervoso da *N. cinerea* estão em andamento com o objetivo de desvendar mais detalhes dos alvos moleculares envolvidos na atividade neurotóxica desta urease, para compreender de qual forma a JBU produz o influxo de cálcio nos neurônios pré-sinápticos.

6 REFERÊNCIAS

- ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. Antidepressant-like effect of tetrahydroisoquinoline amines in the animal model of depressive disorder induced by repeated administration of a low dose of reserpine: behavioral and neurochemical studies in the rat. **Neurotoxicity research**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 85–98, 2014.
- BEAR, M. F. et al. **Neurociências desvendando o sistema nervoso**. 3° ed. [s.l.] : Artmed, 2008.
- BIRMINGHAM, J. T.; TAUCK, D. L. Neuromodulation in invertebrate sensory systems: from biophysics to behavior. **The Journal of experimental biology**, [s. l.], v. 206, n. Pt 20, p. 3541–6, 2003.
- BOURNE, J. A. SCH 23390: the first selective dopamine D1-like receptor antagonist. **CNS drug reviews**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 399–414, 2001.
- BUZNIKOV, G. A. et al. The sea urchin embryo, an invertebrate model for mammalian developmental neurotoxicity, reveals multiple neurotransmitter mechanisms for effects of chlorpyrifos: Therapeutic interventions and a comparison with the monoamine depleter, reserpine. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 221–231, 2007.
- CARLINI, C. R. et al. Biological Effects of Canatoxin in Different Insect Models: Evidence for a Proteolytic Activation of the Toxin by Insect Cathepsinlike Enzymes. **Journal of Economic Entomology**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 340–348, 1997.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 1515–39, 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**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 667–675, 1981.
- CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, [s. l.], v. 110, p. 90–109, 2016.
- CARRAZONI, T. et al. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Toxicology**, [s. l.], v. 368–369, p. 162–171, 2016.
- CARRAZONI, T. et al. Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 146, p. 63–70, 2018.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects**. Cambridge: Cambridge University Press, 2012.
- CORI, C. F. J. B. Sumner and the chemical nature of enzymes. **Trends in** 71

Biochemical Sciences, [s. l.], v. 6, p. 194–196, 1981.

DAIANE STÜRMER, G. et al. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal Doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 109, p. 56–62, 2014.

DEFFERRARI, M. S. et al. Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. **Toxicon**, [s. l.], v. 82, p. 18–25, 2014.

DIXON, N.E., et al. Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel? *J. Am. Chem. Soc.*, 1975.

EVANS, P. D.; MAQUEIRA, B. Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. **Invertebrate neuroscience : IN**, [s. l.], v. 5, n. 3–4, p. 111–8, 2005.

FOLLMER, C. et al. 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. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 360, n. 1, p. 217, 2001.

FOLLMER, Cristian et al. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 271, n. 7, p. 1357–1363, 2004. a.

FOLLMER, C. et al. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 79–87, 2004. b.

FUJIHARA, R. T. Insetos de importância econômica: guia ilustrado para identificação de famílias. 1° ed. [s.l.] : **FEPAP**, 2016.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. The insects : an outline of entomology. 5th. ed. [s.l.] : **Wiley-Blackwell**, 2014.

HIRAYAMA, C. et al. Host plant urease in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 1415–1421, 2000.

HRUBY, Ruben Vardanyan; Victor. Manual De Farmacologia E Terapeutica - Goodman E Gilman. 2° Edição ed. [s.l.] : **Mcgraw Hill Education**, 2014.

HRUBY, V; Vardanyan R. Synthesis of Best-Seller Drugs. [s.l.] : **Elsevier**, 2016.

HUANG, J. et al. The characterization of a concentration-sensitive α -adrenergic-like octopamine receptor found on insect immune cells and its possible role in mediating stress hormone effects on immune function. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 942–950, 2012.

HUBER, I.; MASLER, E. P.; RAO, B. R. Cockroaches as models for neurobiology : applications in biomedical research. [s.l.] : **CRC Press**, 1990.

JABRI E, CARR MB, HAUSINGER RP, KARPLUS PA. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science*. May 19;268(5213):998-1004, 1995.

JEFFERY, C. J. Moonlighting proteins. **Trends in biochemical sciences**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 8–11, 1999.

JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 12° ed. [s.l.], **Guanabara Koogan**, 2013.

KATZUNG, B. G; TREVOR, A. J. *Farmacologia Basica E Clínica* 12Ed. ed. **AMGH** [s.l: s.n.], 2014.

KURAHASHI, H. et al. Absorption of mulberry root urease to the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 1055–1061, 2005.

KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of molecular catalysis*. [Online] 59 (1-3), 9–21, 2009.

LENT, R. *Cem bilhoes de neurônios : conceitos fundamentais de neurociência*. [s.l.] : **Atheneu**, 2010.

LIGABUE-BRAUN, R. et al. 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases. **Naturwissenschaften**, [s. l.], v. 100, n. 5, p. 459–467, 2013.

MARTINELLI, A. H. S. et al. Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s. l.], v. 1840, n. 3, p. 935–944, 2014.

MCQUEEN, E. G.; DOYLE, A. E.; SMIRK, F. H. Mechanism of hypotensive action of reserpine, an alkaloid of *Rauwolfia serpentina*. **Nature**, [s. l.], v. 174, n. 4439, p. 1015, 1954.

MOBLEY HL, ISLAND MD, HAUSINGER RP. *Biologia molecular de ureases microbianas*. *Microbiol Rev*. Set;59(3):451-80, 1995.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade ? **Ciência e Cultura**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 33–36, 2008.

MORENO; D. H., MORENO; MACEDO, SOARES. *Psicofarmacologia de antidepressivos*. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 24–40, 1999.

MULINARI, F. et al. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 2042–2050, 2007.

OSBORNE, R. H. *Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors* *Pharmacology and Therapeutics*. **Elsevier Inc**, 1996.

PIOVESAN, A. R. et al. *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 547, p. 6–17, 2014.

PIRES-ALVES, M. et al. Characterization and Expression of a Novel Member (JBURE-II) of the Urease Gene Family from Jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 139–145, 2003.

RICHTER, S. et al. Invertebrate neurophylogeny: Suggested terms and definitions for a neuroanatomical glossary. **Frontiers in Zoology**, [s. l.], v. 7, 2010.

ROEDER, T. Octopamine in invertebrates *Progress in Neurobiology*, 1999.

SIRKO A, BRODZIK R. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol.* 47(4):1189-95, 2000.

STANISÇUASKI, F. et al. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 753–760, 2005.

STANISÇUASKI, F. et al. Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 1078–1086, 2010.

STANISÇUASKI, F. et al. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 255–263, 2009.

STANKIEWICZ, M.; DĄBROWSKI, M.; DE LIMA, M. E. Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View. **Journal of Toxicology**, [s. l.], v. 2012, p. 1–11, 2012.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. *Borror and DeLong's introduction to the study of insects*. [s.l.] : **Thompson Brooks/Cole**, 2005.

VERLINDEN, H. Dopamine signalling in locusts and other insects *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **Elsevier Ltd**, 2018.

VLEUGELS, R.; VERLINDEN, H.; BROECK, J. V. Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. **Neurotransmitter**, [s. l.], v. 3, n. Figure 1, p. 1–14, 2015.

ZAHIR, M.; GOULD, L. Phentolamine and Beta-Adrenergic Receptors. **The Journal of Clinical Pharmacology and New Drugs**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 197–203, 1971.

7 ANEXOS

7.1 Produções durante o período de vigência do mestrado

7.1.1 Revisão publicada em 2020

Acesso: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7659472/>



ISSN: 2044-0324

J Venom Res, 2020, Vol 10, 38-44

MINI-REVIEW

Entomotoxicity of jaburetox: revisiting the neurotoxic mechanisms in insects

Yuri Correia Barreto¹, Maria Eduarda Rosa¹, Ana Paula Zanatta¹, Bruna Trindade Borges¹, Stephen Hyslop², Lúcia Helena Vinadé¹, Cháriston André Dal Belo^{1*}

¹Centro Interdisciplinar de Pesquisa em Biotecnologia (CIPBiotec), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Avenida Antônio Trilha 1847, Campus São Gabriel, São Gabriel 97300-000, RS, Brazil

²Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, 13083-887, Campinas, SP, Brazil

*Correspondence to: Cháriston André Dal Belo, E-mail: charistonbelo@unipampa.edu.br, Tel/Fax: +55 55 3237 0850

Received: 29 May 2020 | Revised: 04 August 2020 | Accepted: 31 August 2020 | Published: 15 September 2020

© Copyright The Author(s). This is an open access article, published under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>). This license permits non-commercial use, distribution and reproduction of this article, provided the original work is appropriately acknowledged, with correct citation details.

ABSTRACT

Ureases are metalloenzymes that hydrolyze urea to ammonia and carbamate. The main urease isoforms present in the seeds of *Canavalia ensiformis* (jack bean urease – JBU and canatoxin) exert a variety of biological activities. The insecticidal activity of JBU is mediated, at least in part, by jaburetox (Jbtx), a recombinant peptide derived from the JBU amino acid sequence. In this article, we review the neurotoxicity of Jbtx in insects. The insecticidal activity of Jbtx has been investigated in a variety of insect orders and species, including Blattodea (the cockroaches *Blattella germanica*, *Nauphoeta cinerea*, *Periplaneta americana* e *Phoetalia pallida*), Bruchidae (*Callosobruchus maculatus* – cowpea weevil), Diptera (*Aedes aegypti* – mosquito), Hemiptera (*Dysdercus peruvianus* – cotton stainer bug; *Oncopeltus fasciatus* – large milkweed bug, and the kissing bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*), Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda* – fall army worm) and Orthoptera (*Locusta migratoria* – locust). In *N. cinerea*, the injection of Jbtx induces marked alteration of locomotor and grooming behavior, whereas in *T. infestans* Jbtx causes leg paralysis, an extension of the proboscis and abnormal antennal movements. Electromyographical analysis showed that Jbtx causes complete neuromuscular blockade in *P. pallida*. The same treatment in *N. cinerea* and *L. migratoria* causes a decrease in the action potential firing rate. Jbtx forms membrane pore-channels compatible with cations in bilipid membranes. A study using *B. germanica* voltage-gated sodium (Nav1.1) channels that were heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes correlated the entomotoxicity of Jbtx with the activation of these channels. Taken together, these findings demonstrate the potential of this peptide as a natural pesticide.

7.1.2 Artigo publicado em 2020

Acesso: <https://doi.org/10.3390/toxins12100630>



Article

The Insecticidal Activity of *Rhinella schneideri* (Werner, 1894) Paratoid Secretion in *Nauphoeta cinerea* Cockroaches

Allan Leal^{1,2}, Etiely Karnopp¹, Yuri Correia Barreto¹ , Raquel Soares Oliveira¹, Maria Eduarda Rosa¹, Bruna Trindade Borges¹, Flávia Luana Goulart¹, Velci Queiróz de Souza¹ , Manuela Merlin Laikowski³, Sidnei Moura³, Lúcia Vinadé¹ , João Batista Teixeira da Rocha² and Cháriston André Dal Belo^{1,2,*}

¹ Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia, LANETOX, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, São Gabriel RS 97307-020, Brazil; allanleal@unipampa.edu.br (A.L.); etielykarnopp@gmail.com (E.K.); barreto78@outlook.com (Y.C.B.); raquelsoaresoliveira@yahoo.com.br (R.S.O.); mariaer2.aluno@unipampa.edu.br (M.E.R.); brunaborges.aluno@unipampa.edu.br (B.T.B.); flaviagoulart.aluno@unipampa.edu.br (F.L.G.); velcisolza@unipampa.edu.br (V.Q.d.S.); luciavinade@unipampa.edu.br (L.V.)

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica (PPGBTox), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima 1000, Santa Maria RS 97105-900, Brazil; jbtrocha@gmail.com

³ Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Caxias do Sul RS 95070-560, Brazil; manusnowwhite@yahoo.com.br (M.M.L.); smsilva11@ucs.br (S.M.)

* Correspondence: charistonbelo@unipampa.edu.br

Received: 24 July 2020; Accepted: 26 August 2020; Published: 1 October 2020



Abstract: *Rhinella schneideri* is a common toad found in South America, whose paratoid toxic secretion has never been explored as an insecticide. In order to evaluate its insecticidal potential, *Nauphoeta cinerea* cockroaches were used as an experimental model in biochemical, physiological and behavioral procedures. Lethality assays with *Rhinella schneideri* paratoid secretion (RSPS) determined the LD₅₀ value after 24 h (58.07 µg/g) and 48 h exposure (44.07 µg/g) ($R^2 = 0.882$ and 0.954 , respectively). Acetylcholinesterase activity (AChE) after RSPS at its highest dose promoted an enzyme inhibition of 40%, a similar effect observed with neostigmine administration ($p < 0.001$, $n = 5$). Insect locomotion recordings revealed that RSPS decreased the distance traveled by up to 37% with a concomitant 85% increase in immobile episodes ($p < 0.001$, $n = 36$). RSPS added to in vivo cockroach semi-isolated heart preparation promoted an irreversible and dose dependent decrease in heart rate, showing a complete failure after 30 min recording ($p < 0.001$, $n \geq 6$). In addition, RSPS into nerve-muscle preparations induced a dose-dependent neuromuscular blockade, reaching a total blockage at 70 min at the highest dose applied ($p < 0.001$, $n \geq 6$). The effect of RSPS on spontaneous sensorial action potentials was characterized by an increase in the number of spikes 61% ($p < 0.01$). Meanwhile, there was 42%

7.1.3 Artigo publicado em 2020

Acesso: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104651>

Pesticide Biochemistry and Physiology 169 (2020) 104651



Contents lists available at ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pest

Modulation of octopaminergic and cholinergic pathways induced by Caatinga tree *Manilkara rufula* chemical compounds in *Nauphoeta cinerea* cockroaches



Bruna Trindade Borges^{a,b}, Patrícia de Brum Vieira^b, Allan P. Leal^{a,c}, Etiely Karnopp^a, Bárbara A.B. Ogata^a, Maria Eduarda Rosa^{a,b}, Yuri Correia Barreto^a, Raquel Soares Oliveira^{a,b}, Cháriston André Dal Belo^{a,b,c}, Lúcia Vinadé^{a,b,*}

^aLaboratório de Neurobiologia e Toxinologia, Universidade Federal do Pampa, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Plant extract
Caatinga biome
Bioinsecticides
Central and peripheral neurotoxicity
Insect behavior

ABSTRACT

The entomotoxic potential of *Manilkara rufula* crude extract (CEMR) and its aqueous (AFMR) and methanolic (MFMR) fractions were evaluated against *Nauphoeta cinerea* cockroaches. The results point out to a direct modulation of octopaminergic and cholinergic pathways in insect nervous system. CEMR induced an anti-acetylcholinesterase (AChE) effect in cockroach brain homogenates. CEMR significantly decreased the cockroach heart rate in semi-isolated heart preparations. CEMR also caused a broad disturbance in the insect behavior by reducing the exploratory activity. The decreased antennae and leg grooming activities, by different doses of CEMR, mimicked those of phentolamine activity, a selective octopaminergic receptor antagonist. The lethargy induced by CEMR was accompanied by neuromuscular failure and by a decrease of sensilla spontaneous neural compound action potentials (SNCAP) firing in *in vivo* and *ex vivo* cockroach muscle-nerve preparations, respectively. AFMR was more effective in promoting neuromuscular paralysis than its methanolic counterpart, in the same dose. These data validate the entomotoxic activity of *M. rufula*. The phentolamine-like modulation induced in cockroaches is the result of a potential direct inhibition of octopaminergic receptors, combined to an anti-AChE activity. In addition, the modulation of CEMR on octopaminergic and cholinergic pathways is probably the result of a synergism between AFMR and MFMR chemical compounds. Further phytochemical investigation followed by a bio-guiding protocol will improve the molecular aspects of *M. rufula* pharmacology and toxicology to insects.

7.1.4 Artigo publicado em 2022

Acesso: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.017>

Toxicon 210 (2022) 115–122



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Modulation of the cholinergic pathway induced by skin secretion of *Phyllomedusa iheringii* Boulenger, 1885 in a vertebrate model

Bruna Trindade Borges^{a,*}, Raquel Soares Oliveira^a, Allan Pinto Leal^{a,c}, Maria Eduarda Rosa^a, Yuri Correia Barreto^a, Tiago Gomes dos Santos^b, Patrícia de Brum Vieira^d, Cháriston André Dal Belo^{a,d}, Lúcia Vinadé^{a,d}

^a Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS, Brazil

^b Laboratório de Estudos em Biodiversidade Pampiana, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^d Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Handling Editor: Ray Norton

Keywords:

Nervous system
Cholinergic pathway
Muscular contraction
Neuroprotection

ABSTRACT

Amphibians represent one of the main natural sources of bioactive molecules of interest to biotechnological research. The Phyllomedusidae family has several species occurring in Brazil and some studies demonstrate the biological potential of poisons of these species, however many still need to be characterized. *Phyllomedusa iheringii* is endemic in Brazilian and Uruguayan Pampa Biome and has little data in the literature regarding the action of its poison on experimental organisms. Thus, the present work evaluates the biological activity of *P. iheringii* secretion on the central and peripheral nervous system of a vertebrate model. The skin secretions of *P. iheringii* (SSPI) were collected through manual compression and electrical stimulation of the animal's bodies. The resulting content was used in neurobiological tests searching for modulatory effects on the main pathways involved in the neurotoxicity mechanism of vertebrates. SSPI affected the contraction force of the chick *biventer cervicis* muscle (*Gallus gallus domesticus*) at some concentrations used (5, 10, and 12 µg/mL). In slices from the cerebral cortex of *G. gallus domesticus* an increase in cell viability was observed after treatment with SSPI (10 µg/mL) and a neuroprotective effect when treated simultaneously with hydrogen peroxide (H₂O₂), Neostigmine (NEO) and Trichlorfon (TRI). The cholinergic pathway is possibly the main pathway modulated by SSPI since assays with the cerebral cortex and *biventer cervicis* muscle demonstrated the increased activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) (SSPI 10 µg/mL and 12 µg/mL, respectively). SSPI (10 µg/mL) also prevented the modulation of NEO and TRI, two recognized anticholinesterase agents, in AChE activity in slices of the cerebral cortex. Therefore, our results have demonstrated the unpublished biotechnological potential of *P. iheringii* over the vertebrate model and its modulation on the nervous system, with apparent action on the cholinergic pathway.

7.1.5 Depósito de patente (BR 51 2021 002781 7) em 2021



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS INTEGRADOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512021002781-7**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 12/07/2021, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: Cardiac Rithm Virtual Counter - CRVC

Data de publicação: 12/07/2021

Data de criação: 12/07/2021

Titular(es): FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Autor(es): CHIARA VALSECCHI; ALLAN PINTO LEAL; CHÁRISTON ANDRÉ DAL BELO; LUCIA HELENA DO CANTO VINADE; JACSON WEBER DE MENEZES; VELCI QUEIRÓZ DE SOUZA; RAFAEL PRATES QUEVEDO; LUAN PEREIRA VARGAS; ANA PAULA KWIATKOWSKI HAMERSKI ZANATTA; YURI CORREIA BARRETO

Linguagem: PYTHON

Campo de aplicação: BL-01; BL-07

Tipo de programa: SM-01; TC-01

Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:

359d91abaa7d3beb6fca7f9704d246238d22dfe98410dd189a20e41eb3552ca8260e0d016ee4c661a526def63139a555294c5b7047db4e0246f1ee691ae14c06

Expedido em: 30/11/2021

Aprovado por:
Carlos Alexandre Fernandes Silva
Chefe da DIPTO

7.1.6 Depósito de patente (BR 10 2021 011317 0) em 2021



11/06/2021 870210052395
07:57

29409161933695233

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 011317 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 09341233000122

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. General Osório, 1139

Cidade: Bage

Estado: RS

CEP: 96400100

País: Brasil

7.1.7 Depósito de patente (BR 10 2021 015850 6) em 2021



11/08/2021 870210073444
16:56

29409161938344013

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 015850 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 09341233000122

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. General Osório, 1139

Cidade: Bage

Estado: RS

CEP: 96400100

País: Brasil

Telefone: 5332405406

Fax:

Email: nit@unipampa.edu.br

