

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

YURI CORREIA BARRETO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE ENTOMOTOXICIDADE PERIFÉRICA
INDUZIDOS PELA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU): ENVOLVIMENTO
DOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS**

**São Gabriel
2019**

YURI CORREIA BARRETO

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE ENTOMOTOXICIDADE PERIFÉRICA
INDUZIDOS PELA UREASE DE *Canavalia ensiformis* (JBU): ENVOLVIMENTO
DOS SISTEMAS MONOAMINÉRGICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

Coorientadora: MSc. Raquel Soares Oliveira

**São Gabriel
2019**

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).

B273a Barreto, Yuri Correia

Avaliação dos mecanismos de entomotoxicidade periférica induzidos pela Urease de *Canavalia ensiformis* (JBU): envolvimento dos sistemas monoaminérgicos / Yuri Correia Barreto.

75 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2019.

"Orientação: Cháriston André Dal Belo".

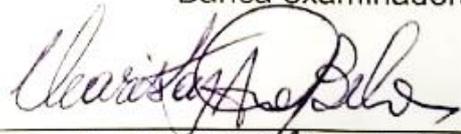
1. Jack bean urease. 2. *Nauphoeta cinerea*. 3. Inseticidas naturais. 4. Sistema neurolocomotor. 5. Vias monoaminérgicas.
I. Título.

YURI CORREIA BARRETO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa *campus* São Gabriel, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

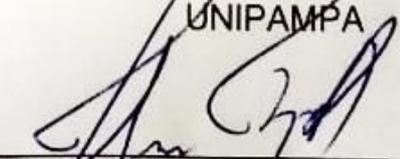
Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 14 de Novembro de 2019

Banca examinadora:



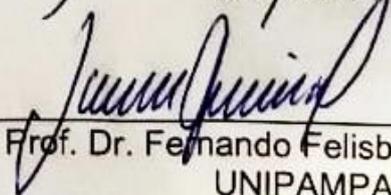
Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

UNIPAMPA



Prof. Dr. Fernando Felisberto Da Silva

UNIPAMPA

Aos meus tios, Olavo de Paula Menezes e Orlando Coqueti (*in memoriam*), pessoas especiais que torceram muito para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente 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.

A minha tia Sandra, por dar todo suporte para a minha mãe e para mim no momento mais difícil e delicado da minha vida.

As minhas melhores amigas, Fran e Fer, por me apoiarem e por fazerem parte da minha vida. Passamos por muitas coisas juntos e ainda passaremos muitas outras.

Aos meus amigos da turma 19, Lucia, Maria, Cynthia, Anderson e Raylane pelos momentos de descontração, tensão, alegria e todos os outros sentimentos desencadeados durante a graduação. Mas quero agradecer-los, principalmente, por terem cuidado e se preocupado, em um momento que eu havia desistido de tudo.

A Denise Czarnescki (só de eu saber escrever seu nome já é uma prova de amizade), por dividir um teto (ou vários) por tanto tempo comigo, mas acima de tudo, por tudo! (e foram muitas coisas que vivemos) Eu sempre vou levar você no meu coração.

Ao Bryan Pablo, da casa dos Moraes. Por ser um amigo muito particular, no melhor sentido da coisa. Por me ensinar (mesmo sem saber) que a autolibertação é essencial na vida das pessoas. Por todas as loucuras que fizemos (e foram muitas!).

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.

A minha amiga e a parceira de senso crítico científico, Maria Eduarda Rosa, por todo estresse causado, mas também por ser uma pessoa extremamente dedicada e focada. Uma parceira para a vida, profissional e pessoal. Minha Crick.

Aos meus diversos amigos da Unipampa, em especial, a Flávia, Tanira, Nathi, Najulia, Lili, Barbão, Susu, Lavys e Jaque.

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.

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

Ao professor Dr. João Teixeira Rocha. Pelo apoio na compra dos inibidores farmacológicos.

Ao Professor Dr. Velci Queiroz, pela minha sonhada bolsa CNPq.

Aos meus professores da graduação.

A FAPERGS e o CNPq pelas bolsas de iniciação científica.

“É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante.”

Paulo Coelho

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 neurolocomotor de *N. cinerea* demonstrou que a JBU (1,5 e 3 µg/g) induz uma diminuição significativa da 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 monoaminérgicos) 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 JBU. Em ensaios para registro dos potenciais de ação compostos neurais espontâneos (PACNE), em perna de *Nauphoeta cinerea*, em presença de JBU (1.5 µg/g), houve uma diminuição significativa no número dos potenciais, em 60min de registros. 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*. Inseticidas naturais.
Sistema neurolocomotor. 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. Neurolocomotor system. Monoaminergic pathways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspectos estruturais das Ureases.....	17
Figura 2 – Efeitos entomotóxicos de <i>Jack bean urease</i> , Canatoxina e Jaburetox...18	
Figura 3 – Barata <i>Nauphoeta cinerea</i> , fêmea adulta.....	20
Figura 4 – Representação esquemática da organização do sistema nervoso de baratas	22
Figura 5 – Representação ilustrada do efeito antagonista de Fentolamina.....	26
Figura 6 – Representação ilustrada do efeito antagonista de SCH23390.....	27
Figura 7 – Representação ilustrada do efeito antagonista de Mianserina.....	28
Figura 8 – Representação ilustrada do efeito antagonista de Reserpina	29
Figura 9 – Representação esquemática ilustrada do processo de diálise.....	31
Figura 10 – Representação esquemática ilustrada do protocolo <i>Locomotion</i>	32
Figura 11 – Representação esquemática ilustrada da preparação MCAM	33
Figura 12 – Representação esquemática ilustrada da preparação de PACNE	34
Figura 13 – Alteração do comportamento Locomotor de <i>Nauphoeta cinerea</i> pelo tratamento com JBU.....	36
Figura 14 – Comportamento Locomotor <i>in vivo</i> e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Fentolamina	38
Figura 15 – Comportamento Locomotor <i>in vivo</i> e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e SCH23390	40
Figura 16 – Comportamento Locomotor <i>in vivo</i> e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Mianserina	42
Figura 17 – Comportamento Locomotor <i>in vivo</i> e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Reserpina.....	44
Figura 18 – Resposta neuromuscular induzida com tratamentos controle salina, JBU e Fentolamina em preparações NMCAM <i>in vivo</i> em baratas	46
Figura 19 – Resposta neuromuscular induzida com tratamentos controle salina, JBU e SCH23390 em preparações NMCAM <i>in vivo</i> em baratas	48
Figura 20 – Resposta neuromuscular induzida com tratamentos controle salina, JBU e Mianserina em preparações NMCAM <i>in vivo</i> em baratas	50
Figura 21 – Resposta neuromuscular induzida com tratamentos controle salina, JBU e Reserpina em preparações NMCAM <i>in vivo</i> em baratas.....	52

Figura 22 – Registro dos PACNE da perna de <i>N. cinerea</i> e análise da cinética dos potenciais com tratamentos controle salina e JBU.....	54
Figura 23 – Registro dos PACNE da perna de <i>N. cinerea</i> e cinética dos potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Fentolamina.....	56
Figura 24 – Registro dos PACNE da perna de <i>N. cinerea</i> e cinética dos potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e SCH23390	58
Figura 25 – Registro dos PACNE da perna de <i>N. cinerea</i> e cinética dos potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Mianserina	60
Figura 26 – Registro dos PACNE da perna de <i>N. cinerea</i> e cinética e potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Reserpina	62
Figura 27: Representação ilustrada do mecanismo de ação primário da entomotoxicidade da JBU sugerido.....	67

,

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Ureases	16
1.1.1	Urease de <i>Canavalia ensiformis</i>	17
1.2	Organismos alternativos para bioensaios e <i>Nauphoeta cinerea</i>	19
1.3	Sistema nervoso de insetos	20
1.3.1	Sistema Octopaminérgico	23
1.3.2	Sistema Dopaminérgico	24
1.3.3	Sistema Serotoninérgico	24
1.4	Antagonismo Farmacológico	25
1.4.1	Fentolamina	26
1.4.2	SCH23390	27
1.4.3	Mianserina	27
1.4.4	Reserpina.....	28
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Diálise da JBU	30
3.3	Salina para insetos e Soluções	31
3.4	<i>Locomotion</i>: comportamento locomotor e exploratório em campo aberto	32
3.5	Preparação nervo-músculo coxal abductor metatorácico	33
3.6	Registros dos potenciais de ação compostos neurais espontâneos	34
3.7	Análises Estatísticas	35
4	RESULTADOS	35

4.1 Hipocinese induzida por JBU em <i>N. cinerea</i>	35
4.1.1 Modulação octopaminérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU	37
4.1.2 Modulação dopaminérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU	39
4.1.3 Modulação serotoninérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU	41
4.1.4 Modulação monoaminérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU	43
4.2 Bloqueio neuromuscular induzido pela JBU na preparação NMCAM	45
4.2.1 Modulação octopaminérgica na preparação NMCAM na presença de JBU	45
4.2.2 Modulação dopaminérgica na preparação NMCAM na presença de JBU	47
4.2.3 Modulação serotoninérgica na preparação NMCAM na presença de JBU	49
4.2.4 Modulação monoaminérgica na preparação NMCAM na presença de JBU	51
4.3 Alterações induzidas por JBU nos PACNE de <i>N. cinerea</i>	53
4.3.1 Modulação octopaminérgica nos PACNE de <i>N. cinerea</i> na presença de JBU	55
4.3.2 Modulação dopaminérgica nos PACNE de <i>N. cinerea</i> na presença de JBU ..	57
4.3.3 Modulação serotoninérgica nos PACNE de <i>N. cinerea</i> na presença de JBU .	59
4.3.4 Modulação monoaminérgica nos PACNE de <i>N. cinerea</i> na presença de JBU ..	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	68
7 REFERÊNCIAS	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).

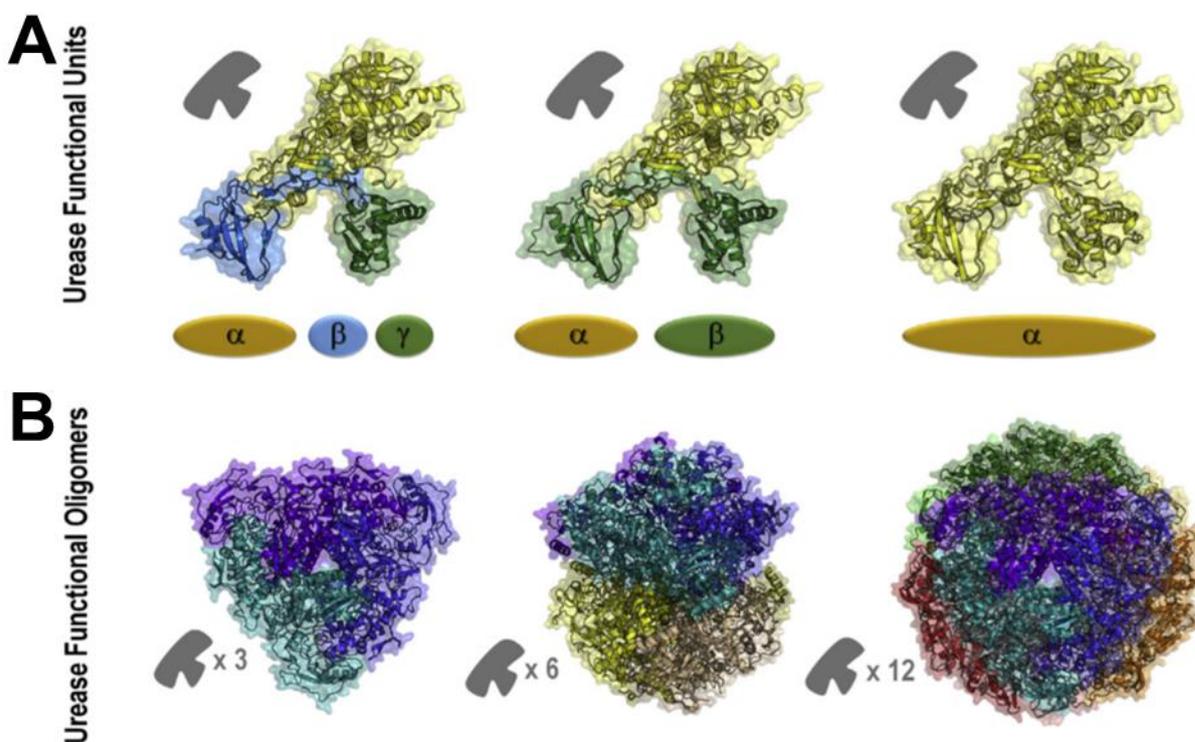


Figura 1 – Aspectos estruturais das ureases. A) Tipos de subunidades ureolíticas (dímero e trímeros de heterosubunidades e uma subunidade). B) Associação de subunidade funcionais formando complexos de Tri, hexa e dodecâmeros. Fonte: Carlini & Ligabue-Braun (2016).

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 peso molecular de 90.770 Da. É 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 também como adubo verde, uma vez que é bastante resistente à 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 ao 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 com *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. 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	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
	Larvae	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	
<i>Triatoma infestans</i>	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
	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 alternativos para bioensaios e *Nauphoeta cinerea*

A utilização de organismos vivos em experimentação científica tem por objetivo proporcionar um melhor entendimento das alterações fisiológicas, bioquímicas e farmacológicas envolvidas na atividade biológica de compostos químicos. Atualmente, principalmente por questões éticas, modelos biológicos alternativos e modelos *in vitro*, estão cada vez mais sendo utilizados em pesquisas, visando minimizar o uso de animais vertebrados, principalmente, mamíferos. Nesse sentido, existe uma grande preocupação a respeito de modelos animais que atendam a demanda da pesquisa e mostrem-se eficientes nas suas diversas áreas (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 à utilização dos insetos são o baixo custo, fácil habituação e manutenção, rápido desenvolvimento, resistência a traumas, insensibilidade à 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).

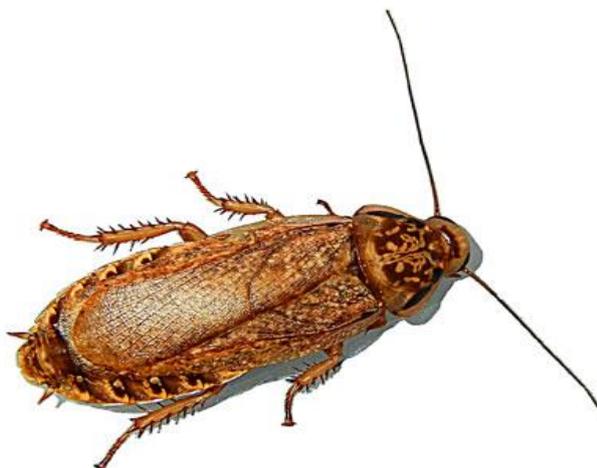


Figura 3 – Barata *Nauphoeta cinerea*, fêmea adulta. Fonte: Science-Peru.

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 chamado de gânglios. Estes gânglios são responsáveis pelo processamento de informações provenientes tanto do ambiente externo quanto do interno, coordenando as funções dos órgãos e também, 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 circo-esofágicos e ao sistema estomatogástrico através dos nervos frontais. O gânglio Subesofágico que é ligado ao cérebro por conectores circo-esofágicos, recebe estímulos aferentes do aparelho bucal, cabeça e pescoço e inerva de forma eferente os músculos do 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 à 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, o 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 γ -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 à 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 as moléculas monoaminérgicas, a octopamina, dopamina e serotonina são consideradas as principais neuromoduladoras 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).

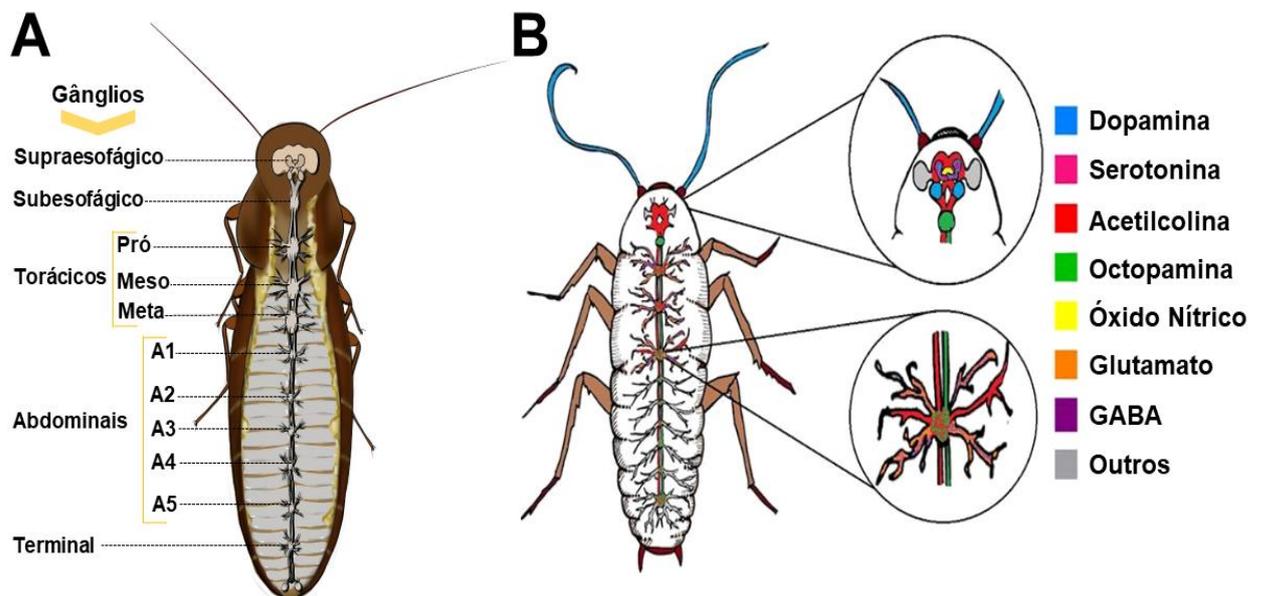


Figura 4: Representação esquemática da organização do sistema nervoso de baratas. A) Esquema da distribuição e anatomia do cordão nervoso ventral, gânglios e sacos aéreos em barata. B) Representação das regiões mais relevantes de modulações e sinapses dos principais neurotransmissores em baratas. Fonte: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

1.3.1 Sistema Octopaminérgico

A octopamina é uma das principais aminas biogênicas, tendo sido 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 metabólito resultante é processado por conjugação. Outra alternativa é a N-metilação catalisada pela feniletanolamina-N-metil-transferase. Todos os receptores de octopamina são acoplados à 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 a 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 à 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, 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 e a 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 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 de receptor é composto por subclasses, pertencentes tanto a receptores acoplado à 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-7A. 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 metabólitos vegetais, ou sintéticos, 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 impedem a ligação dos neurotransmissores (moléculas ligantes ou ativadoras) que o ativariam, 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. No antagonismo não-competitivo, o fármaco atua no sítio alostérico do receptor alvo 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 substâncias 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).

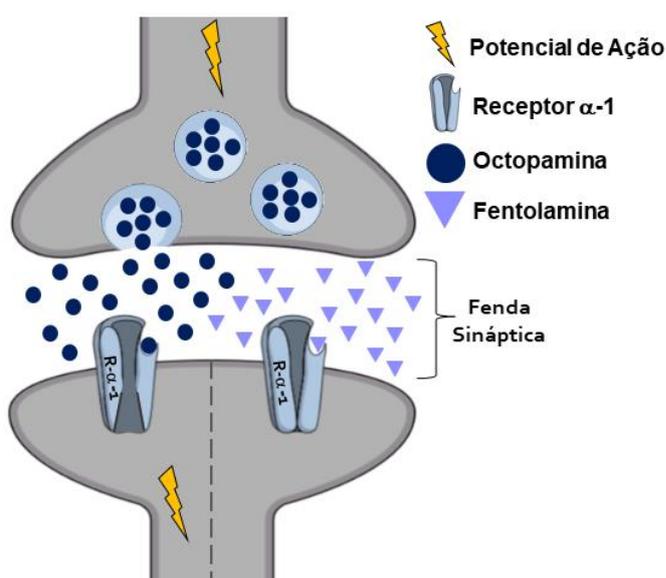


Figura 5: Representação ilustrada do efeito antagonista de Fentolamina. Resumidamente, o potencial de ação chega aos terminais pré-sinápticos causando liberação das vesículas, contendo octopamina, na fenda sináptica. Quando a octopamina se liga no receptor pós-sinápticos alfa-1,

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 dos 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).

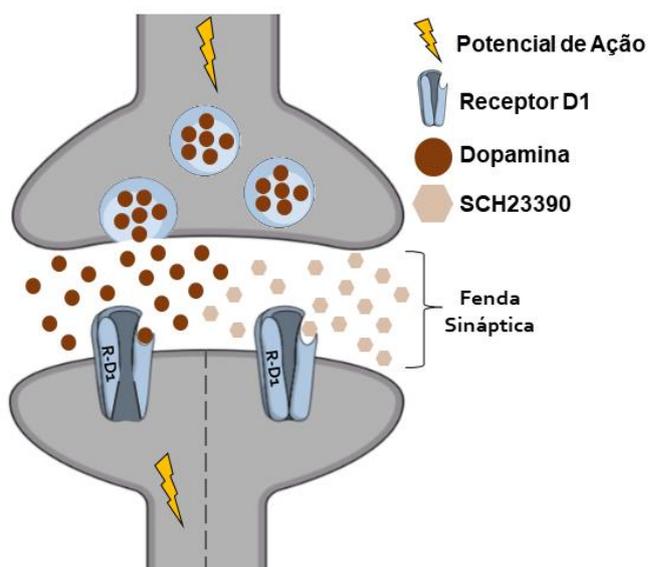


Figura 6: Representação ilustrada do efeito antagonista de SCH23390. Resumidamente, o potencial de ação chega aos terminais pré-sinápticos causando liberação das vesículas, contendo dopamina, na fenda sináptica. Quando a dopamina se liga no receptor pós-sinápticos D1, ocorre o influxo de íons e a continuidade 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 à ansiedade. Seu efeito é atribuído ao bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos pré-sinápticos e à 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).

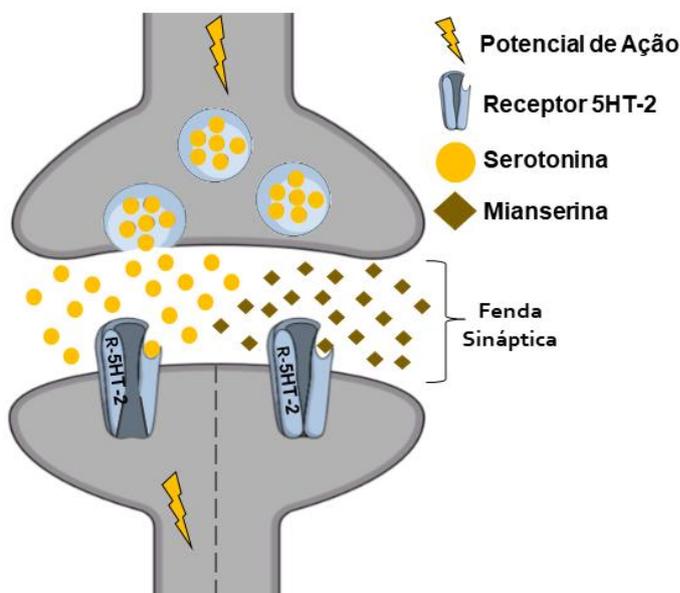


Figura 7: Representação ilustrada do efeito antagonista de Mianserina. Resumidamente, o potencial de ação chega aos terminais pré-sinápticos causando liberação das vesículas, contendo serotonina, na fenda sináptica. Quando a serotonina se liga no receptor pós-sinápticos 5HT-2, ocorre o influxo de íons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

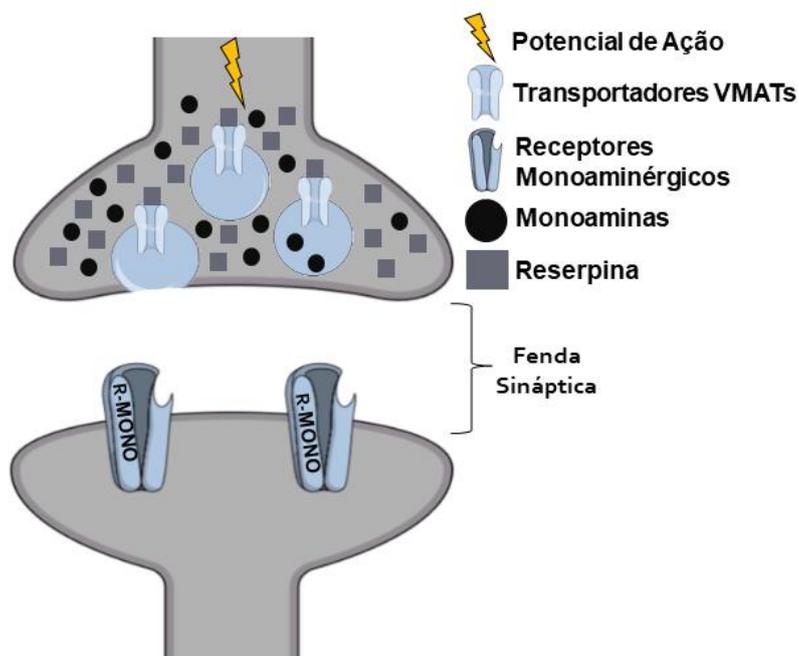


Figura 8: Representação ilustrada do efeito antagonista de Reserpina. Resumidamente, quando a Reserpina está presente nos neurônios pré-sinápticos, ela se liga aos transportadores vesiculares de monoaminas impedindo o abastecimento das mesmas com neurotransmissores. O potencial de ação chega aos terminais 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 (Serotoninérgico, Dopaminérgico e Octopaminérgico), através da utilização de antagonistas farmacológicos seletivos em experimentos comportamentais, eletromiográficos e eletrofisiológicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da JBU sobre o comportamento neurolocomotor de *N. cinerea* por meio de ensaios de locomoção em campo aberto e a sua relação com as respostas neuromusculares *in vivo*;
- Avaliar o efeito da JBU sobre os potenciais de ação neurais espontâneos de sensila de *N. cinerea* e a sua relação com as respostas neuromusculares *in vivo*;
- Discriminar os diferentes alvos moleculares específicos envolvidos na resposta entomotóxica da JBU por meio do uso de compostos antagonistas seletivos de receptores monoaminérgicos (Fentolamina, SCH2390, Mianserina e Reserpina);

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos foram realizados com animais adultos, de ambos os sexos e pesando em média 0,5 grama. Os animais foram criados e mantidos no biotério do *Campus* São Gabriel da Universidade Federal do Pampa, em condições controladas de temperatura (24-26°C), iluminação (ciclos claro/escuro de 12 horas) e com água e alimento *ad libitum*. Os tratamentos foram injetados na 3ª porção abdominal dos insetos, em volume final de 10 microlitros (μL), utilizando uma seringa Hamilton.

3.2 Diálise da JBU

A urease de *Canavalia ensiformis* foi purificada e cedida pelo Laboratório de Neurotoxinas do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, da professora Dra. Célia Carlini. As diálises foram realizadas seguindo a técnica padrão de suspensão de proteínas purificadas. Os cristais de JBU (proteína mais sais) foram dissolvidos em solução de fosfato monossódico (NaH_2PO_4) 20 mM de pH 7,5 e centrifugados a 14000 RPMs, a 4 °C, durante 2 min. Posteriormente, o sobrenadante foi recuperado e pipetado em um saco de diálise (membrana de celulose porosa de l:33 mm x d:21 mm x c:30 cm), sendo selado com um prendedor especial, que garante a

impermeabilidade. Em seguida, o saco foi imerso em um béquer contendo 2L de solução tampão de NaH_2PO_4 10 mM (meio dialisador) de pH 7,5 (Figura 9). Esse sistema foi mantido em resfriamento e agitação (branda) constante, sendo trocado de 2 em 2 horas (por 3 vezes) e mantido *overnight* após a última troca. O conteúdo do saco foi recuperado e lido no espectrofotômetro (Nanovue™ Plus) para a quantificação proteica.

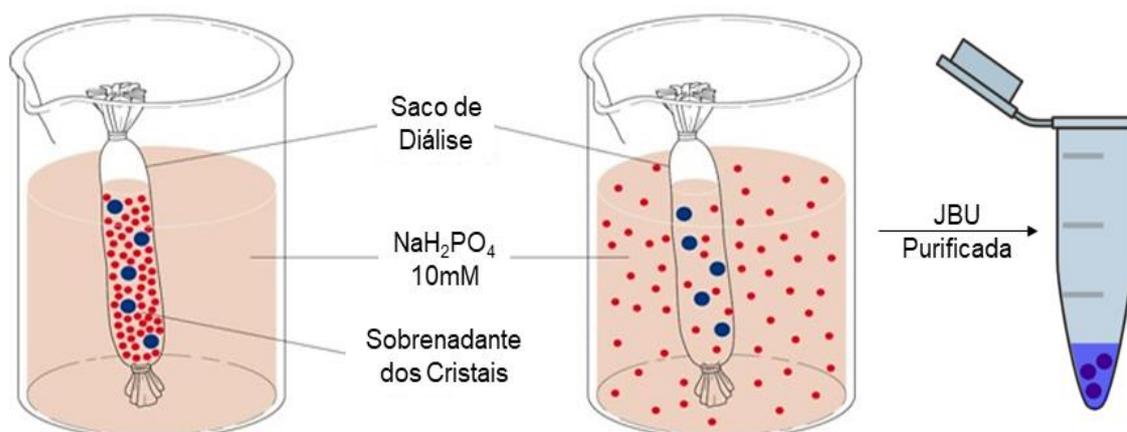


Figura 9 – Representação esquemática ilustrada do processo de diálise. Fonte: Modificado de DocScience.

3.3 Salina para insetos e Soluções

A Solução Salina para Insetos (SSI) foi preparada com a seguinte composição: NaCl 2 M, CaCl_2 1 M, KCl 3 M e Tris 0,5 M com adição de água ultrapura até completar o volume, pH ajustado para 6,8 (STÜRMER et al., 2014).

Todos os compostos farmacológicos e reagentes utilizados foram de elevada pureza e tendo sido obtidos da empresa Sigma Aldrich Brasil. Os compostos (fentolamina, SCH23390, mianserina e reserpina) foram dissolvidos (estoques) e diluídos (soluções de trabalho) em SSI. A JBU também foi diluída em SSI em concentrações pré-estabelecidas. Todas as soluções usadas nos ensaios foram preparadas diariamente, previamente ao uso, para garantir a estabilidade dos compostos a serem ensaiados.

3.4 *Locomotion*: comportamento locomotor e exploratório em campo aberto

A atividade locomotora *in vivo* foi avaliada conforme descrito por Leal et al. (2018). Quatro animais foram tratados e colocados, individualmente, em caixas de poliestireno (25 cm de comprimento x 15 cm de largura x 7 cm de altura), sendo que os mesmos não tiveram contato prévio com a superfície da caixa (Figura 10A). Os registros de vídeo-monitoramento do comportamento exploratório dos animais foram feitos durante 10 min. Os animais dos grupos controle (SSI, JBU e compostos farmacológicos) foram tratados 10 min antes dos registros. Os animais ensaiados na fase dois dos experimentos foram pré tratados 20 min antes dos registros com os compostos farmacológicos e, após 10 minutos, foram injetados com JBU. Os registros foram realizados por uma webcam (Logitech® HD) fixada acima do sistema, conectada a um computador Desktop (Dell, São Paulo, Brasil) (Figura 10B). Os parâmetros comportamentais foram automaticamente calculados a uma taxa de 30 frames/s usando o software de monitoramento de vídeo IDtracker® (Stoelting, CO, USA). A análise dos dados gerados pelo IDtracker foi realizada usando um script ad-hoc desenvolvido no software Matlab®. Para garantir condições experimentais padronizadas, todos os experimentos foram realizados durante o mesmo período do dia (das 11:00 às 18:00h) e nas mesmas condições ambientais as quais os animais são mantidos.

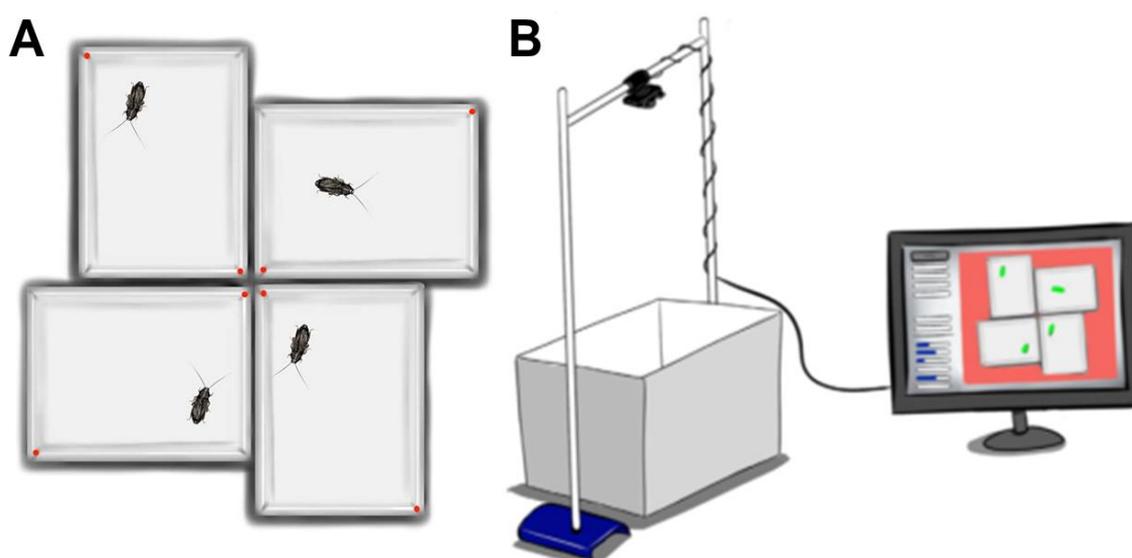


Figura 10 – Representação esquemática ilustrada do protocolo *Locomotion*. A) Distribuição dos animais e posicionamento das caixas. B) Representação do sistema completo. Fonte: Mra Bruna Trindade Borge.

3.5 Preparação nervo-músculo coxal abdutor metatorácico

A preparação *in vivo* Nervo-Músculo Coxal Abdutor Metatorácico (NMCAM) foi montada segundo descrito por Martinelli et al. (2014). Após a anestesia dos animais por resfriamento a 5 °C (7 min) e afixação do mesmo com alfinetes entomológicos em decúbito dorsal em uma placa de dissecação, a perna do animal foi amarrada na altura da tíbia com linha de costura e conectada a um transdutor isométrico (1gf) acoplado a um sistema para registros eletromiográficos (AVS, São Carlos, Brasil). Em seguida, foi realizada a remoção da quitina na região correspondente ao grupamento metatorácico (que inclui o axônio motor do músculo coxal e compreende o último par de pernas) para a exposição do nervo 5. Um eletrodo bipolar de Ag/AgCl foi inserido para aplicação de estímulos elétricos (2-5V, 0.5 Hz, 0.5ms) (Figura 11). Os registros neuromusculares foram feitos durante 120 min. Os animais dos grupos controle (SSI, JBU e compostos farmacológicos) foram injetados no minuto 10 dos registros. Na fase dois dos experimentos, eles foram injetados aos 10 min de registro com os compostos farmacológicos e, no minuto 20, foram injetados com JBU. Os registros isométricos de contração muscular foram obtidos por meio de um amplificador de sinais modelo AECAD 04, sendo digitalizados e armazenados pelo software AQCAD. Os dados foram posteriormente analisados usando o software ANCAD (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil).

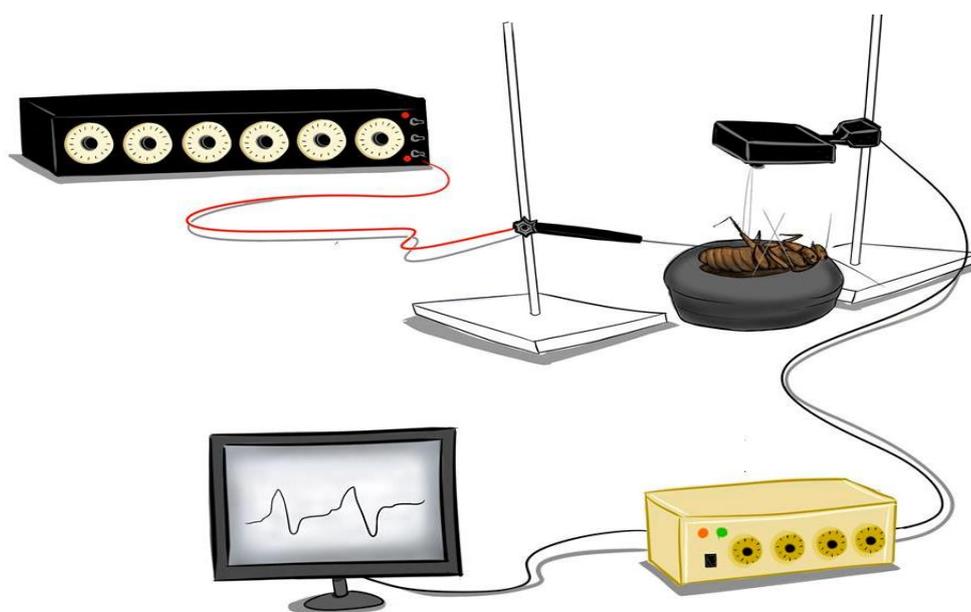


Figura 11 – Representação esquemática ilustrada da preparação NMCAM. Fonte: MSc. Bruna Trindade Borges.

3.6 Registros dos potenciais de ação compostos neurais espontâneos

A preparação *ex vivo* dos registros dos Potenciais de Ação Compostos Neurais Espontâneos (PACNE) foi realizada conforme descrito por Dos Santos et al. (2016), com modificações. Após o tratamento e anestesia, a perna do inseto (região metatorácica) foi cuidadosamente retirada, sendo seccionada o mais próximo possível do corpo do animal, garantindo que a coxa, o fêmur, a tíbia e o tarso permanecessem intactos e fixada sob uma placa de cortiça do aparelho *SpikerBox* (Backyard Brains, EUA), por um par de eletrodos (Figura 12A-B). Um dos eletrodos foi conectado ao conector de terra do amplificador e o outro foi colocado no fêmur como eletrodo de registro ativo (Figura 12A). Os sinais foram gravados em áudio a uma taxa de amostragem de 1,0 kHz e digitalizados pelo *Neuron SpikerBox*. Os registros foram feitos durante 60 min. Os animais dos grupos controle (SSI, JBU e compostos farmacológicos) foram tratados 10 min antes da remoção da perna dos animais e, conseqüentemente, início dos registros. Na fase dois dos experimentos, os animais foram injetados 20 min antes da remoção da perna com os compostos farmacológicos e, após 10 min, foram injetados com JBU. Os potenciais de ação foram visualizados, registrados e recuperados no software BYB Spike Recorder (Backyard Brains, EUA) e a análise foi feita pelo software WinWCP (John Dempster, Universidade de Strathclyde, Scotland).

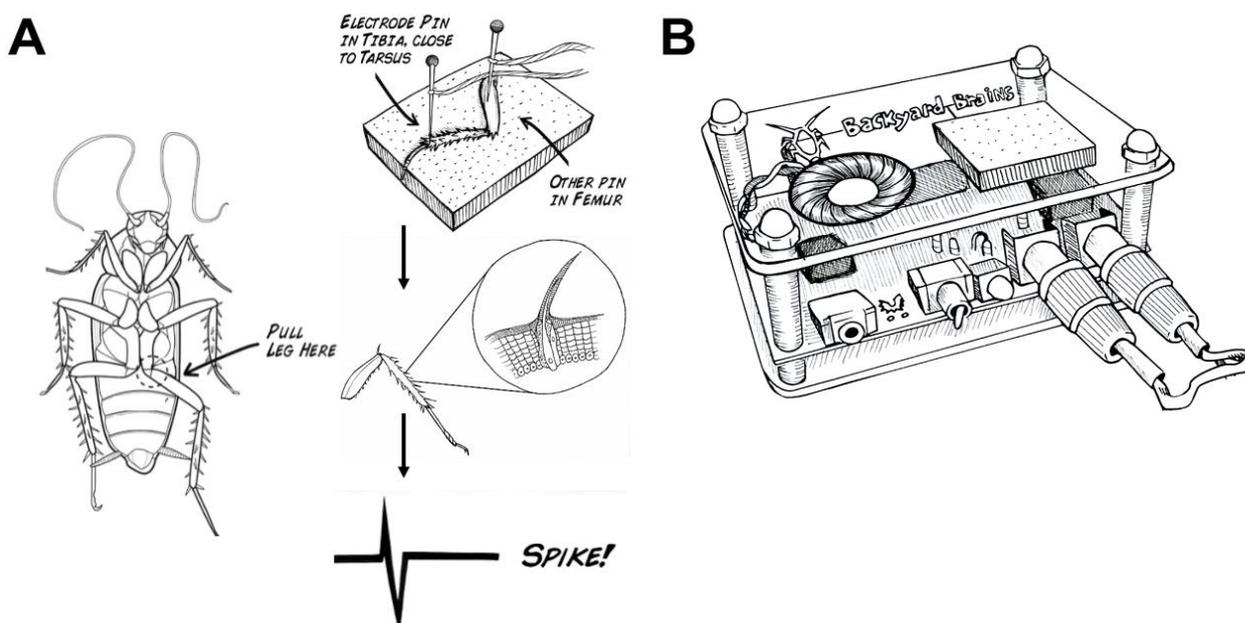


Figura 12 – Representação esquemática ilustrada da preparação de PACNE. A) Esquema de montagem e transdução do sinal da preparação. B) Aparelho *SpikerBox*. Fonte: Modificado de Backyard Brains.

3.7 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando-se análise de variância (One / Two) way-ANOVA seguida pelo teste de *Dunnnett*, *Sidak* ou *Tukey* como *post hoc*, quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 7.0 (Software Inc., San Diego, CA), onde a significância na *One-way* ANOVA é representada por * $p < 0,05$, ** $p < 0,03$, *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS

4.1 Hipocinese induzida por JBU em *N. cinerea*

Para avaliar os efeitos da JBU sobre o comportamento locomotor das baratas foram utilizadas as mesmas doses (1,5; 3 e 6 microgramas por grama de animal ($\mu\text{g/g}$)) testadas em trabalhos anteriores, como em Carrazoni et al. (2016). Nesses ensaios, o caminho percorrido total pelos animais do grupo controle salina foi em média de $518,9 \pm 40,5$ cm ($n = 40$). Quando a JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ e $3 \mu\text{g/g}$ foi administrada, houve uma redução significativa do caminho percorrido para $128,4 \pm 13,4$ cm e $194,9 \pm 24,7$ cm, respectivamente ($p < 0,0001$). Entretanto, a dose de $6 \mu\text{g/g}$ não alterou significativamente a distância percorrida pelos animais, ficando em $493,2 \pm 54,6$ cm (Figura 13A). Outro parâmetro avaliado foi o de episódios de imobilidade, que corresponde ao número de episódios (n). Nessa avaliação o grupo controle apresentou 340 ± 24 episódios, enquanto as doses de JBU $1,5$ e $3 \mu\text{g/g}$ aumentaram os episódios de imobilidade para 534 ± 16 ($p < 0,0001$) e 436 ± 13 ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 13B). A porcentagem do tempo de parada dos animais foi de 40 ± 2 % no controle salina, 82 ± 1 % ($p < 0,0001$) e 73 ± 2 % ($p < 0,0001$) com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ e $3 \mu\text{g/g}$, respectivamente (Figura 13C). Nos animais tratados com JBU $6 \mu\text{g/g}$ não houve alteração significativa em nenhum dos parâmetros.

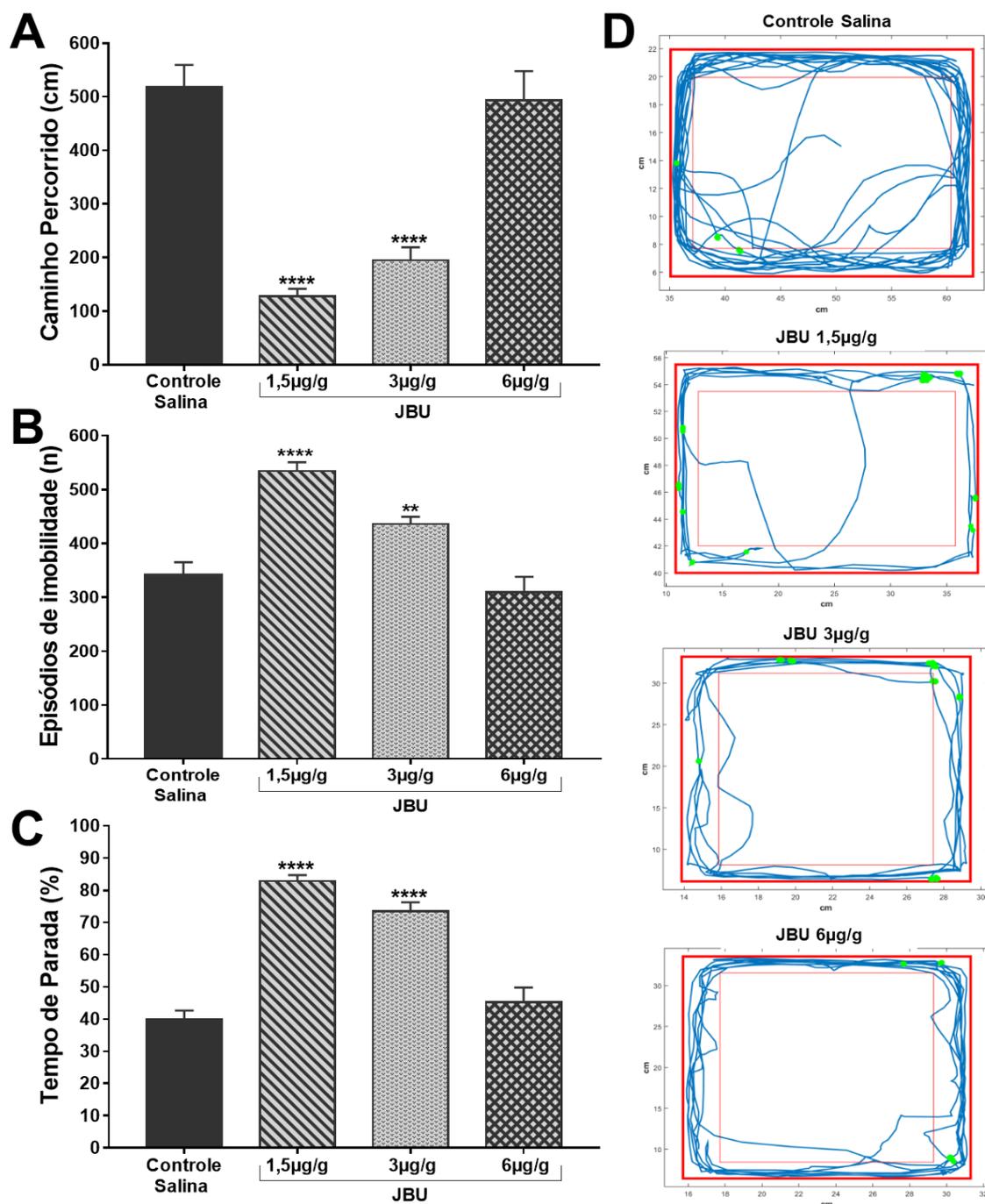


Figura 13 – Alteração do comportamento locomotor de *Nauphoeta cinerea* pelo tratamento com JBU. A) Caminho percorrido (cm). B) Episódios de imobilidade (n). C) Tempo de parada (%). D) Representação 2D da trajetória dos animais durante os experimentos. Os pontos verdes referem-se as zonas de maior concentração de episódios de imobilidade. Os resultados foram expressos como Média ± EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnnett* (n= 40). Fonte: Autor.

4.1.1 Modulação octopaminérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU

Sabe-se que existe alguma relação entre os receptores octopaminérgicos e o efeito entomotóxico de JBU (CARRAZONI et al., 2016). Com o objetivo de identificar a relevância desse sistema na locomoção e comprovar a atividade direta da urease de *C. ensiformis* sobre essa via, foi usado o inibidor seletivo de receptores de octopamina, fentolamina. No ensaio de locomoção o caminho percorrido total pelos animais do grupo controle salina foi de $518,9 \pm 40,5$ cm ($n = 40$). A administração de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ reduziu a locomoção para $128,4 \pm 13,4$ cm ($p < 0,0001$). No controle fentolamina (fento) $0,6 \mu\text{g/g}$ os animais percorreram $353,5 \pm 33,5$ cm, uma redução significativa em relação ao controle salina ($p < 0,03$). Quando pré tratados com fento $0,6 \mu\text{g/g}$ e posteriormente injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ a trajetória foi de $490,4 \pm 44,9$ cm (Figura 14A). No parâmetro de episódios de imobilidade, o grupo controle apresentou cerca de 340 ± 24 episódios e após JBU $1,5 \mu\text{g/g}$, 534 ± 16 , um aumento de 57 % no número episódios ($p < 0,0001$). Tanto o controle fento $0,6 \mu\text{g/g}$ quanto o tratamento fento mais JBU alteraram significativamente a resposta quando comparado ao controle salina (Figura 14B). O tempo de parada (%) dos animais foi de 40 ± 2 % no controle salina e 82 ± 1 % ($p < 0,0001$) na dose de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. Nos grupos fento $0,6 \mu\text{g/g}$ e fento mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo de parada foi de 60 ± 2 ($p < 0,0001$) e 49 ± 3 % ($p < 0,05$) respectivamente, diferindo significativamente do controle salina (Figura 14C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU no comportamento locomotor pelo tratamento prévio com fentolamina, comparamos o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ versus o grupo pré tratado com fento $0,6 \mu\text{g/g}$ seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa com $p < 0,0001$ em todos os parâmetros avaliados (Figura 14).

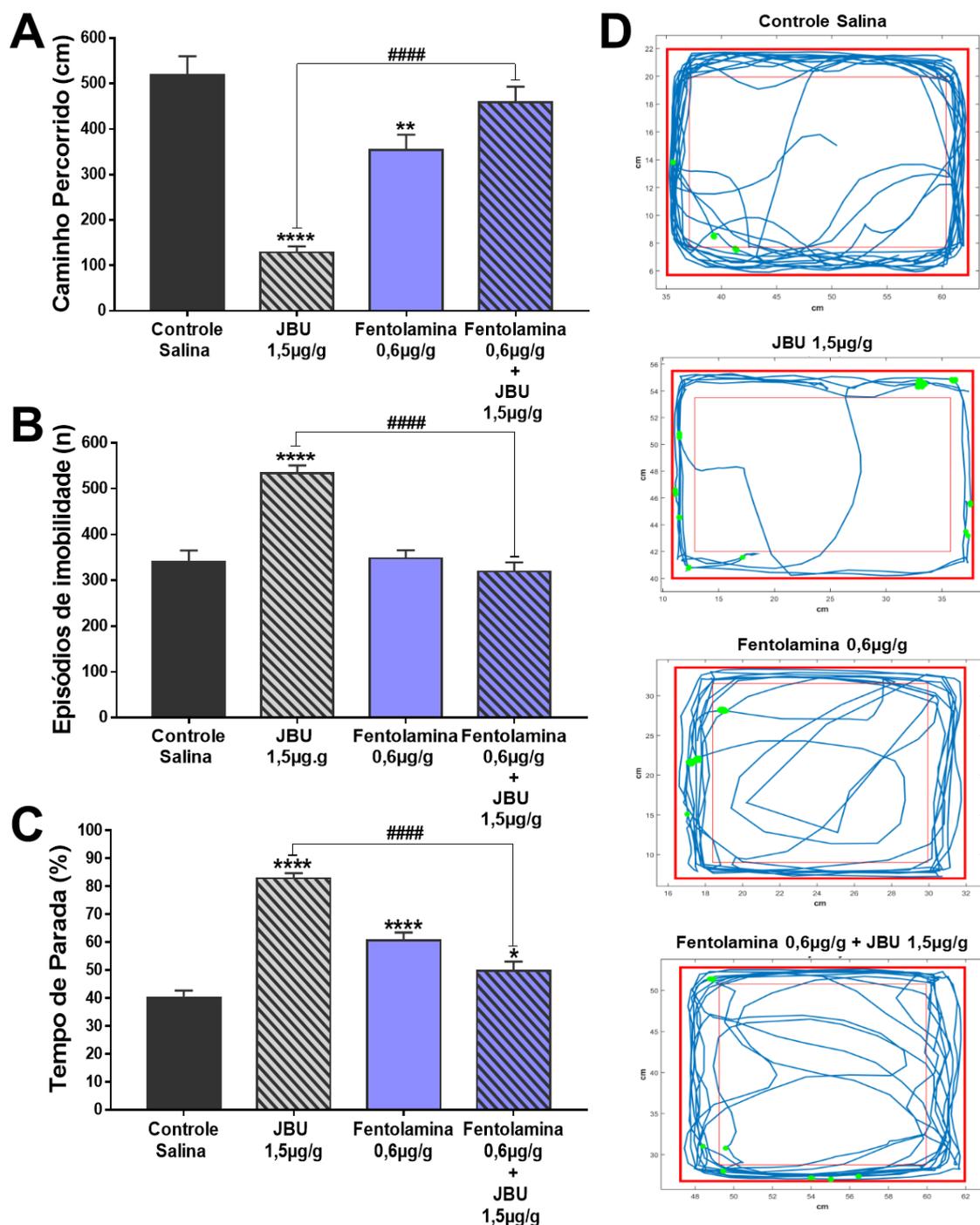


Figura 14 – Comportamento Locomotor *in vivo* e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Fentolamina. A) Caminho percorrido (cm). B) Episódios de imobilidade (n). C) Tempo de parada (%). D) Representação 2D da trajetória dos animais durante os experimentos. Os Pontos verdes referem-se as zonas de maior concentração de episódios de imobilidade. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnett* e *Sidak* (#### representa $p < 0,0001$) ($n = 40$). Fonte: Autor.

4.1.2 Modulação dopaminérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU

Com o objetivo de identificar a relevância do sistema dopaminérgico na alteração da locomoção induzida pela JBU sobre essa via, foi usado o inibidor seletivo de receptores de dopamina, o SCH23390. Nos ensaios de locomoção, o caminho percorrido total pelos animais do grupo controle salina foi de $518,9 \pm 40,5$ cm ($n = 40$). A administração de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ reduziu a locomoção para $128,4 \pm 13,4$ cm ($p < 0,0001$). No controle SCH23390 (SCH) $0,2 \mu\text{g/g}$ os animais percorreram $354,3 \pm 37,6$ cm, uma redução significativa em relação ao controle salina ($p < 0,002$). Quando pré tratados com SCH $0,2 \mu\text{g/g}$ e posteriormente injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o trajeto percorrido foi de $385,1 \pm 37,5$ cm ($p < 0,05$) (Figura 15A). No parâmetro de episódios de imobilidade, o grupo controle apresentou cerca de 340 ± 24 episódios e a JBU $1,5 \mu\text{g/g}$, 534 ± 16 , um aumento de 57 % no número episódios ($p < 0,0001$). Tanto o controle SCH $0,2 \mu\text{g/g}$ quanto o tratamento SCH mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ não sofreram alteração significativa em relação ao controle salina (Figura 15B). O tempo de parada (%) dos animais foi de 40 ± 2 % no controle salina e 82 ± 1 % ($p < 0,0001$) na dose de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. Nos grupos SCH $0,2 \mu\text{g/g}$ e SCH mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo de parada foi de 58 ± 3 % ($p < 0,0001$) e 54 ± 3 % ($p < 0,001$) respectivamente, diferindo significativamente do controle salina (Figura 15C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU sobre o comportamento locomotor, pelo tratamento prévio com SCH23390, comparou-se o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ com o grupo pré tratado com SCH $0,2 \mu\text{g/g}$, seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa, com $p < 0,0001$ em todos os parâmetros avaliados (Figura 15).

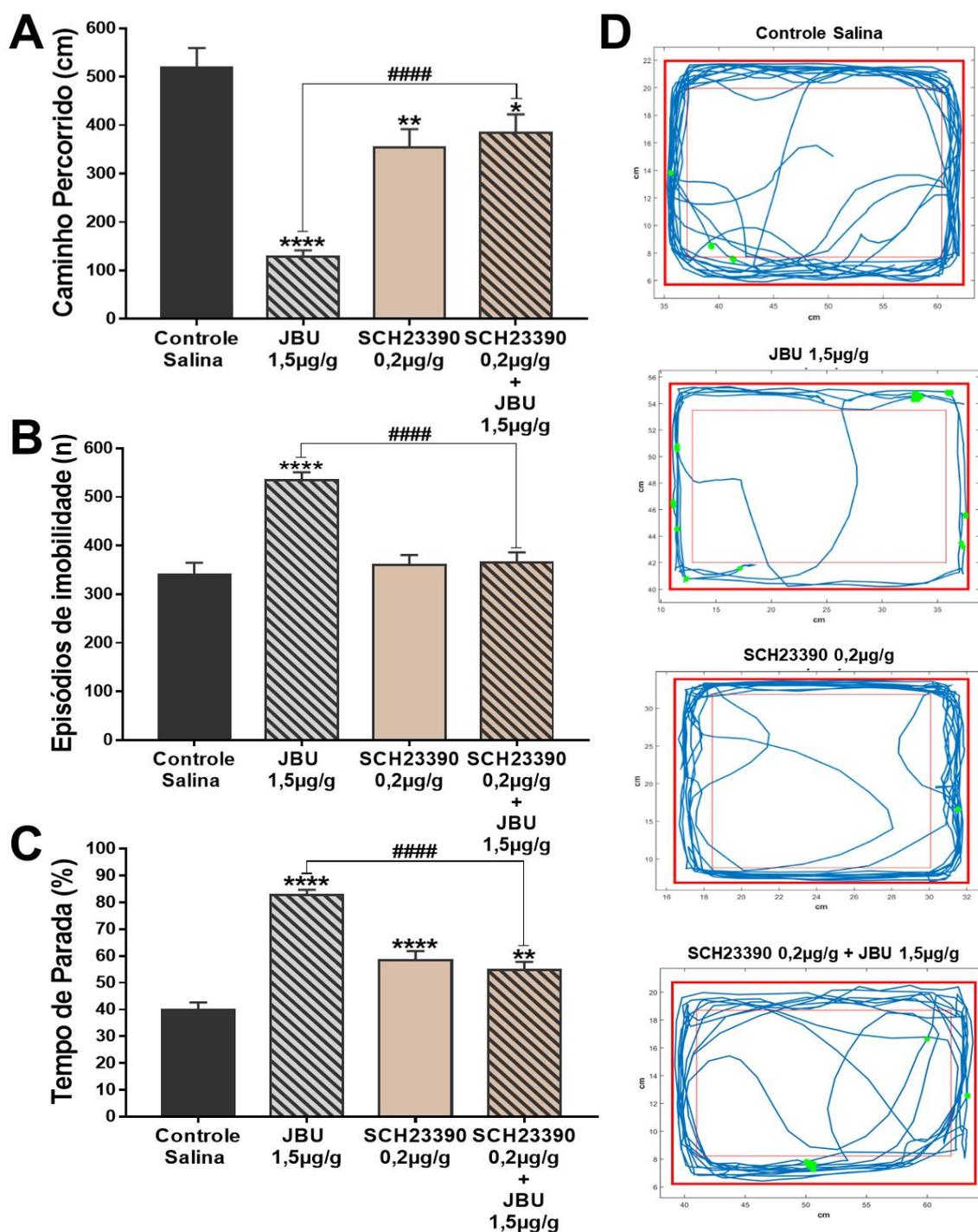


Figura 15 – Comportamento locomotor *in vivo* e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e SCH23390. A) Caminho percorrido (cm). B) Episódios de imobilidade (n). C) Tempo de parada (%). D) Representação 2D da trajetória dos animais durante os experimentos. Os Pontos verdes referem-se as zonas de maior concentração de episódios de imobilidade. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnett* e *Sidak* (#### representa $p < 0,0001$) ($n = 40$). Fonte: Autor.

4.1.3 Modulação serotoninérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU

Com o objetivo de identificar a relevância do sistema serotoninérgico sobre a locomoção dos insetos e identificar se essa via estaria envolvida na toxicidade induzida pela urease de *C. ensiformis*, foi usado o inibidor seletivo de receptores de serotonina, mianserina. No ensaio de locomoção, o caminho percorrido total pelos animais do grupo controle salina foi de $518,9 \pm 40,5$ cm ($n = 40$). A administração de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ reduziu a locomoção dos animais para $128,4 \pm 13,4$ cm ($p < 0,0001$). No controle mianserina (mian) $0,5 \mu\text{g/g}$, os animais percorreram $446,5 \pm 34,1$ cm. Quando pré tratados com mian $0,5 \mu\text{g/g}$ e posteriormente injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o caminho foi $186,1 \pm 20,5$ cm, uma redução bastante significativa em relação ao controle salina ($p < 0,0001$) (Figura 16A). No parâmetro de episódios de imobilidade, o grupo controle apresentou cerca de 340 ± 24 episódios e a JBU $1,5 \mu\text{g/g}$, 534 ± 16 , um aumento de 57% no número episódios ($p < 0,0001$). No controle Mianserina $0,5 \mu\text{g/g}$ ocorreram 378 ± 17 episódios, enquanto no grupo de mian mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ houve um aumento superior ao causado pela JBU sozinha ($p < 0,0001$) (Figura 16B). O tempo de parada (%) dos animais foi de $40 \pm 2\%$ no controle salina e $82 \pm 1\%$ ($p < 0,0001$) para a dose de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. Nos grupos Mian $0,5 \mu\text{g/g}$ e Mian mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo foi de 51 ± 3 ($p < 0,03$) e $84 \pm 2\%$ ($p < 0,0001$) respectivamente, diferindo significativamente do controle salina (Figura 16C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU sobre o comportamento locomotor, pelo tratamento prévio com mianserina, comparou-se o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ com o grupo pré tratado com mianserina $0,5 \mu\text{g/g}$, seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. Nesse protocolo, não houve diferença estatística do caminho percorrido e do tempo de parada entre os dois tratamentos. No entanto, apenas o episódio de imobilidade foi alterado significativamente com o segundo grupo de tratamento ($p < 0,0001$) (Figura 16).

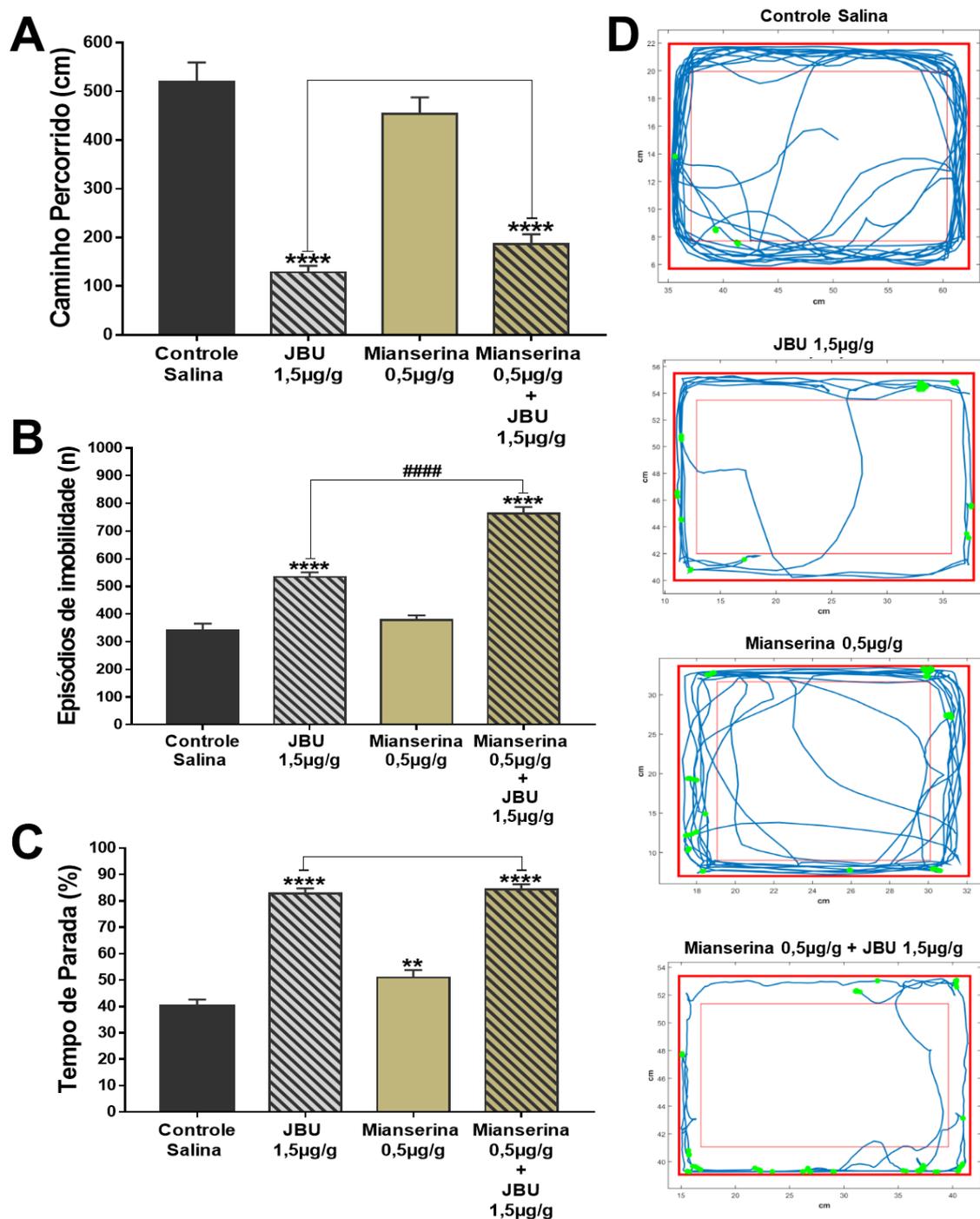


Figura 16 – Comportamento locomotor *in vivo* e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Mianserina. A) Caminho percorrido (cm). B) Episódios de imobilidade (n). C) Tempo de parada (%). D) Representação 2D da trajetória dos animais durante os experimentos. Os Pontos verdes referem-se as zonas de maior concentração de episódios de imobilidade. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnett* e *Sidak* (#### representa $p < 0,0001$) ($n = 40$). Fonte: Autor.

4.1.4 Modulação monoaminérgica no comportamento locomotor e exploratório na presença de JBU

Com o objetivo de confirmar a relevância dos sistemas monoaminérgicos na locomoção e comprovar se ocorre atividade direta da urease de *C. ensiformis* sobre essas vias, foi usado o inibidor seletivo pré-sináptico de transportadores VMATs, a reserpina. Nos ensaios de locomoção, o caminho percorrido total pelos animais do grupo controle salina foi de $518,9 \pm 40,5$ cm ($n = 40$). A administração de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ reduziu a locomoção para $128,4 \pm 13,4$ cm ($p < 0,0001$). No controle reserpina (reser) $0,3 \mu\text{g/g}$ os animais percorreram $302,8 \pm 30,4$ cm, uma redução significativa em relação ao controle salina ($p < 0,0001$). Quando pré tratados com reser $0,3 \mu\text{g/g}$ e posteriormente injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o caminho foi $302,6 \pm 31,8$ cm ($p < 0,0001$) (Figura 17A). No parâmetro de episódios de imobilidade, o grupo controle apresentou cerca de 340 ± 24 episódios e o grupo JBU $1,5 \mu\text{g/g}$, 534 ± 16 , um aumento de 57% no número episódios ($p < 0,0001$). Tanto o controle reser $0,3 \mu\text{g/g}$ quanto o tratamento reser mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ não sofreram alteração significativa em relação ao controle salina (Figura 17B). O tempo parada (%) dos animais foi de 40 ± 2 % no controle salina e 82 ± 1 % ($p < 0,0001$) na dose de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. Nos grupos Reser $0,3 \mu\text{g/g}$ e Reser mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo foi de 59 ± 3 ($p < 0,0001$) e 62 ± 3 % ($p < 0,0001$) respectivamente, diferindo significativamente do controle salina (Figura 17C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU no comportamento locomotor pelo tratamento prévio com Reserpina, comparamos o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ versus o grupo pré tratado com reser $0,3 \mu\text{g/g}$, seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa com $p < 0,0001$ em todos os parâmetros avaliados (Figura 17).

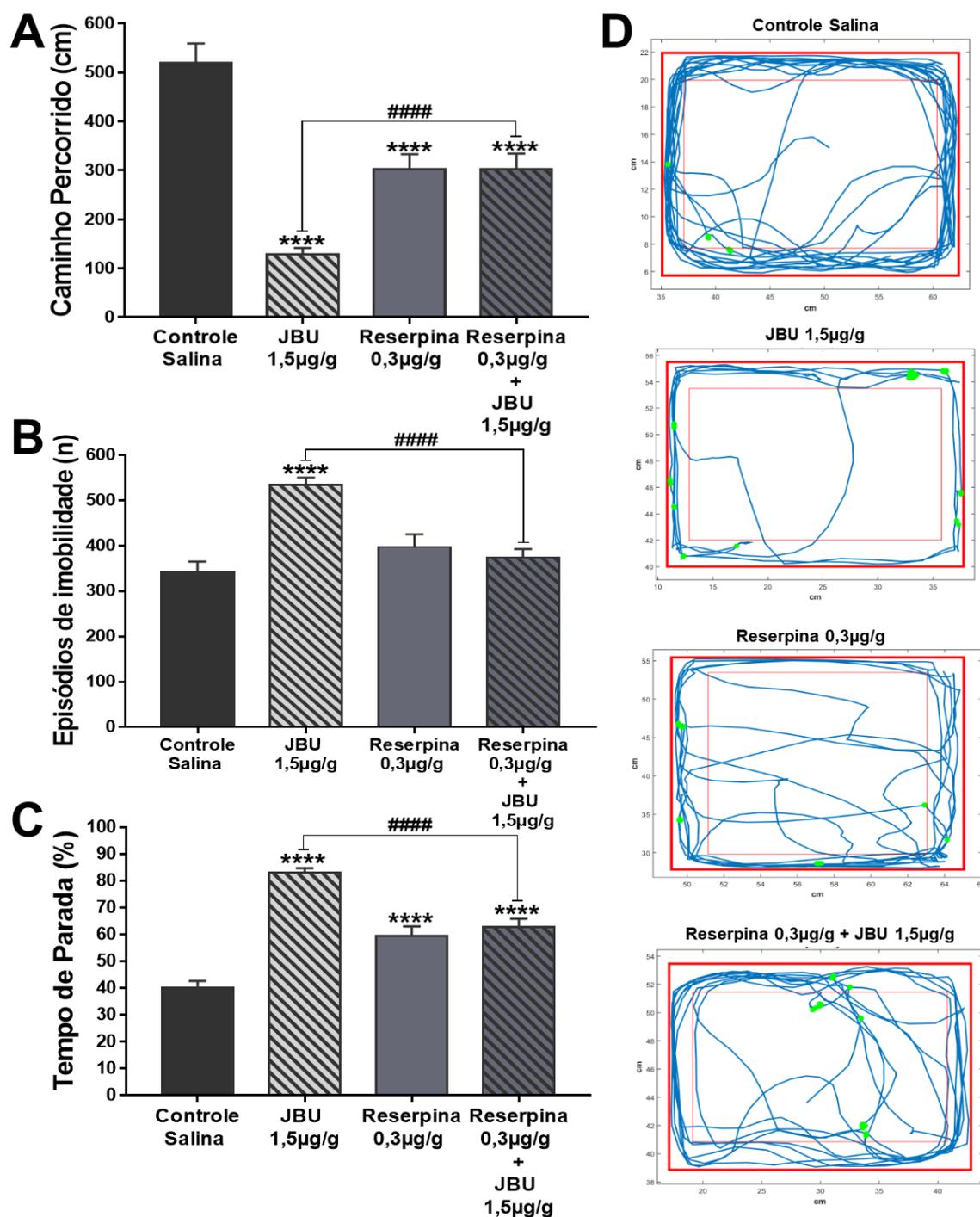


Figura 17 – Comportamento locomotor *in vivo* e pontos finais motores avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Reserpina. A) Caminho percorrido (cm). B) Episódios de imobilidade (n). C) Tempo de parada (%). D) Representação 2D da trajetória dos animais durante os experimentos. Os Pontos verdes referem-se as zonas de maior concentração de episódios de imobilidade. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnett* e *Sidak* (#### representa $p < 0,0001$) ($n = 40$). Fonte: Autor.

4.2 Bloqueio neuromuscular induzido pela JBU na preparação NMCAM

A ação da JBU na preparação NMCAM já havia sido caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa, em trabalhos anteriores (ver. Carrazoni et al., 2016) sendo que as doses supracitadas produzem um efeito bloqueador neuromuscular dose-dependente em *Nauphoeta cinerea* (CARRAZONI et al., 2016). Para relacionar este efeito com a nossa investigação, foi ensaiada a dose mais efetiva de JBU sobre a preparação NMCAM, no resultado anterior (4.1) como controle e juntamente com os compostos farmacológicos.

4.2.1 Modulação octopaminérgica na preparação NMCAM na presença de JBU

Na preparação NMCAM os ensaios do controle salina não induziram alteração na resposta contrátil nos 120 minutos de registro ($n = 6$). A administração de JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$ resultou em bloqueio neuromuscular tempo dependente de 60%, reduzindo a resposta contrátil para $40 \pm 8\%$ aos 120 minutos ($p < 0,0001$). O controle fentolamina 0,6 $\mu\text{g/g}$ não se diferenciou estatisticamente do controle salina durante todo o registro. O grupo pré tratado com fento e posteriormente injetado com JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$ produziu um efeito semelhante ao controle fento 0,6 $\mu\text{g/g}$ (Figura 18A).

Para confirmar se houve Inibição do efeito bloqueador da JBU na junção neuromuscular pelo tratamento prévio com fentolamina, comparamos o controle JBU 1,5 μg *versus* o grupo pré tratado com fento 0,6 $\mu\text{g/g}$ seguido pela injeção de JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa com $p < 0,0001$, portanto o tratamento prévio com Fentolamina impediu a redução da resposta contrátil causada pela JBU (Figura 18A).

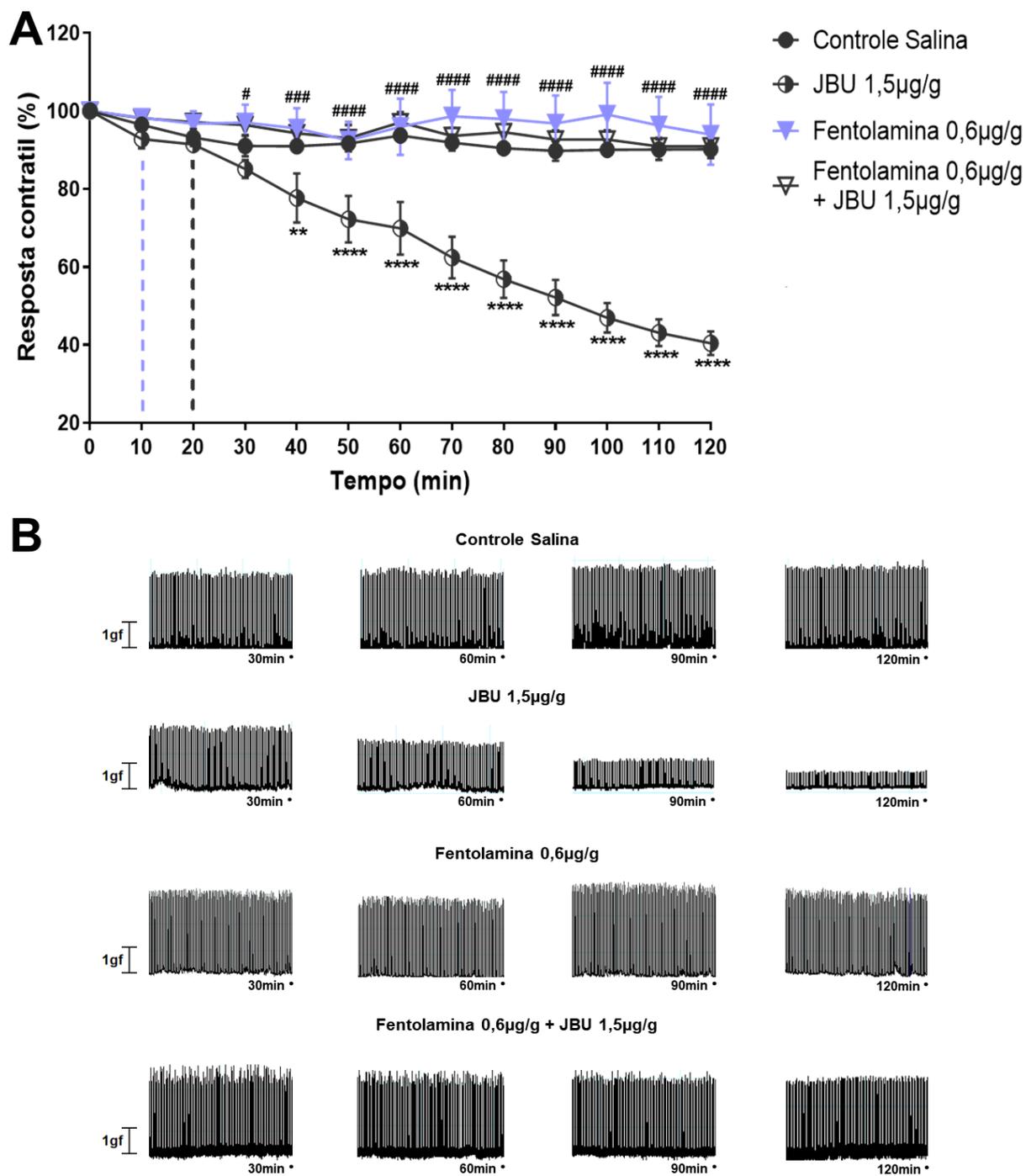


Figura 18 – Resposta neuromuscular produzida com tratamentos controle salina, JBU e Fentolamina em preparações NMCAM *in vivo* em baratas. A) Gráfico da preparação NMCAM. B) Traços representativos dos registros neuromusculares, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, com a barra representando 1 grama força. Os pontos no gráfico foram expressos como Média \pm EPM através de análise *Two-way ANOVA*, seguida por *Tukey* (“#” representa a comparação entre JBU 1,5µg/g e Fentolamina + JBU,5µg/g onde, ##### é igual $p < 0,0001$) ($n = 6$). Fonte: Autor.

4.2.2 Modulação dopaminérgica na preparação NMCAM na presença de JBU

Na preparação NMCAM os ensaios com controle salina para insetos não induziram alteração na resposta contrátil nos 120 minutos de registro ($n = 6$). A administração de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ resultou em bloqueio neuromuscular tempo dependente de 60 %, reduzindo a resposta contrátil para 40 ± 8 % aos 120 minutos ($p < 0,0001$). O controle SCH23390 $0,2 \mu\text{g/g}$ se diferenciou do controle salina apenas nos tempos 20 e 30 do registro, com respostas em 101 ± 2 ($p < 0,03$) e 99 ± 2 % ($p < 0,02$) respectivamente. O grupo pré tratado com SCH e posteriormente injetado com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ manteve a contração constante ($100 \pm 0,5$ %) a partir de 50 minutos (Figura 19A).

Para confirmar se houve inibição do efeito bloqueador da JBU na junção neuromuscular pelo tratamento prévio com SCH23390, comparamos o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ *versus* o grupo pré tratado com SCH $0,2 \mu\text{g/g}$ seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa com $p < 0,0001$, portanto o tratamento prévio com SCH23390 impediu a redução da resposta contrátil causada pela JBU (Figura 19A).

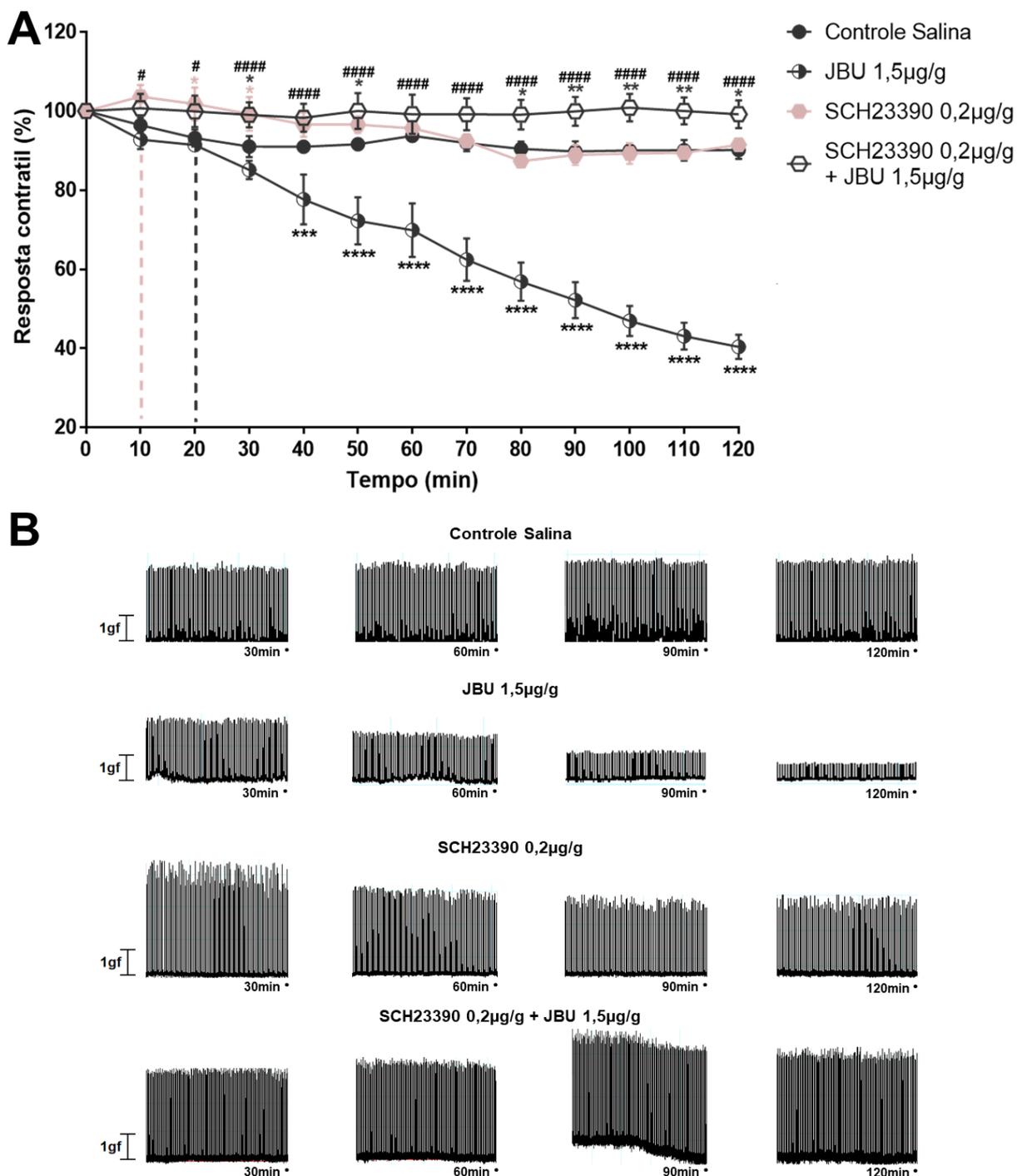


Figura 19 – Resposta neuromuscular produzida com tratamentos controle salina, JBU e SCH23390 em preparações NMCAM *in vivo* em baratas. A) Gráfico da preparação NMCAM. B) Traços representativos dos registros neuromusculares, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, com a barra representando 1 grama força. Os pontos no gráfico foram expressos como Média \pm EPM através de análise *Two-way ANOVA*, seguida por *Tukey* (“#” representa a comparação entre JBU 1,5µg/g e SCH23390 + JBU,5µg/g onde, #### é igual $p < 0,0001$) ($n = 6$). Fonte: Autor.

4.2.3 Modulação serotoninérgica na preparação NMCAM na presença de JBU

Na preparação NMCAM os ensaios com controle salina para insetos não induziram alteração na resposta contrátil nos 120 minutos de registro ($n = 6$). A administração de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ resultou em bloqueio neuromuscular tempo dependente de 60 %, reduzindo a resposta contrátil para 40 ± 8 % aos 120 minutos ($p < 0,0001$). O controle mianserina $0,5 \mu\text{g/g}$ não se diferenciou estatisticamente do controle salina durante todo o registro. O grupo pré tratado com mian e posteriormente injetado com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ produziu um efeito tendencial (tempo dependente) semelhante ao controle JBU $1,5 \mu\text{g}$, com redução máxima da contração para 53 ± 3 % ($p < 0,0001$) aos 120 minutos de registro (Figura 20A).

Para confirmar se houve Inibição do efeito bloqueador da JBU na junção neuromuscular pelo tratamento prévio com mianserina, comparamos o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ *versus* o grupo pré tratado com mian $0,5 \mu\text{g/g}$ seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi significativa com $p < 0,0009$, no entanto o tratamento prévio com Mianserina não impediu completamente a redução da resposta contrátil causada pela JBU (Figura 20A).

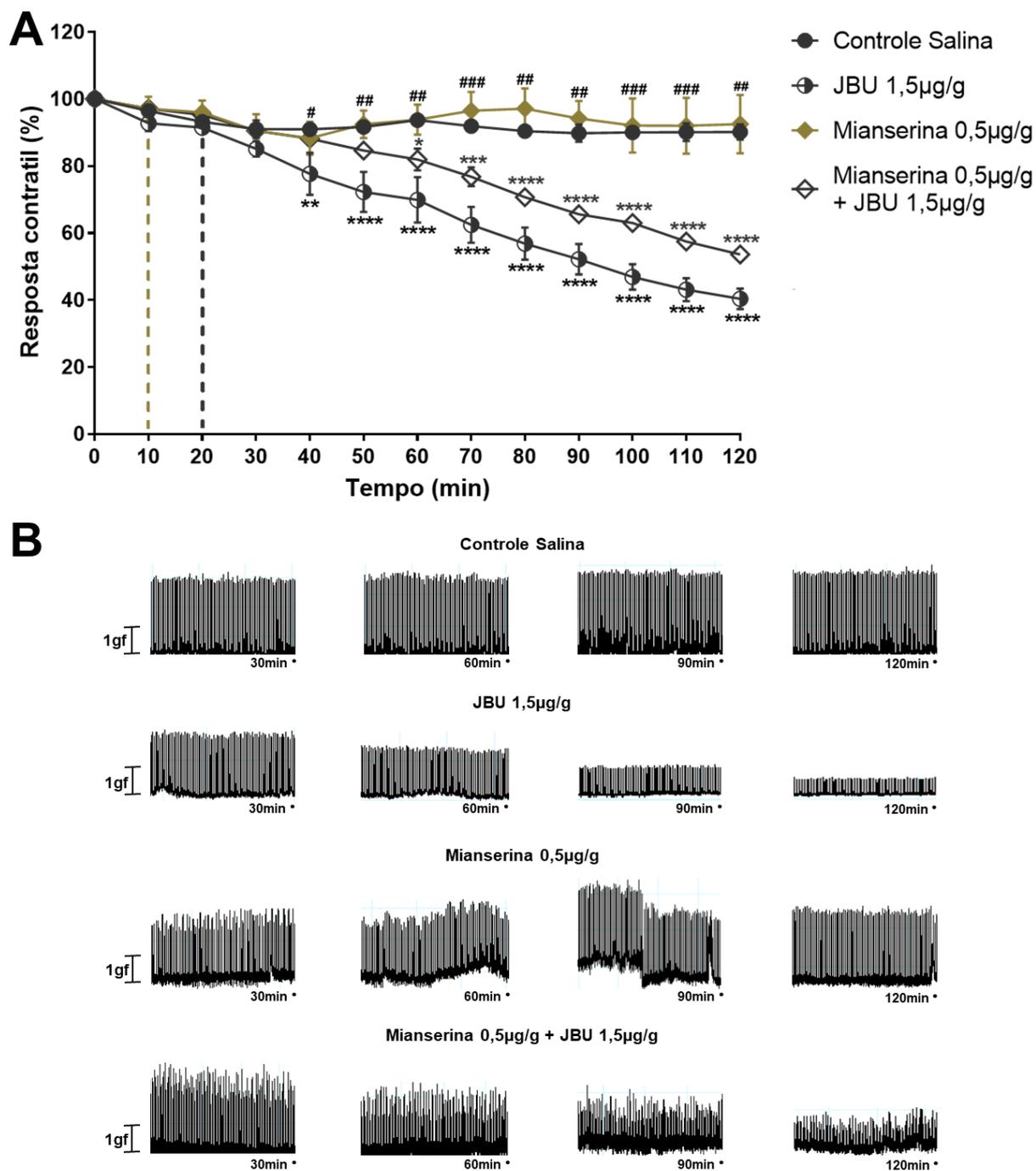


Figura 20 – Resposta neuromuscular induzida com tratamentos controle salina, JBU e Mianserina em preparações NMCAM *in vivo* em baratas. A) Gráfico da preparação NMCAM. B) Traços representativos dos registros neuromusculares, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, com a barra representando 1 grama força. Os pontos no gráfico foram expressos como Média \pm EPM através de análise *Two-way ANOVA*, seguida por *Tukey* (“#” representa a comparação entre JBU 1,5µg/g e Mianserina + JBU,5µg/g onde, ### é igual $p < 0,0009$) ($n = 6$). Fonte: Autor.

4.2.4 Modulação monoaminérgica na preparação NMCAM na presença de JBU

Na preparação NMCAM os ensaios com controle salina para insetos não induziram alteração na resposta contrátil nos 120 minutos de registro ($n = 6$). A administração de JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$ resultou em bloqueio neuromuscular tempo dependente de 60 %, reduzindo a resposta contrátil para 40 ± 8 % aos 120 minutos ($p < 0,0001$). O controle reserpina 0,3 $\mu\text{g/g}$ diminuiu de forma oscilante, mas progressiva a resposta contrátil até os 70 minutos de registro, chegando a 73 ± 9 % ($p < 0,0001$), em seguida a resposta motora passou a aumentar progressivamente. O grupo pré tratado com reser e posteriormente injetado com JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$ produziu um efeito semelhante ao controle salina (Figura 21A).

Para confirmar se houve Inibição do efeito bloqueador da JBU na junção neuromuscular pelo tratamento prévio com reserpina, comparamos o controle JBU 1,5 μg *versus* o grupo pré tratado com reser 0,5 $\mu\text{g/g}$ seguido pela injeção de JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa com $p < 0,0001$, portanto o tratamento prévio com reserpina impediu a redução da resposta contrátil causada pela JBU (Figura 21A).

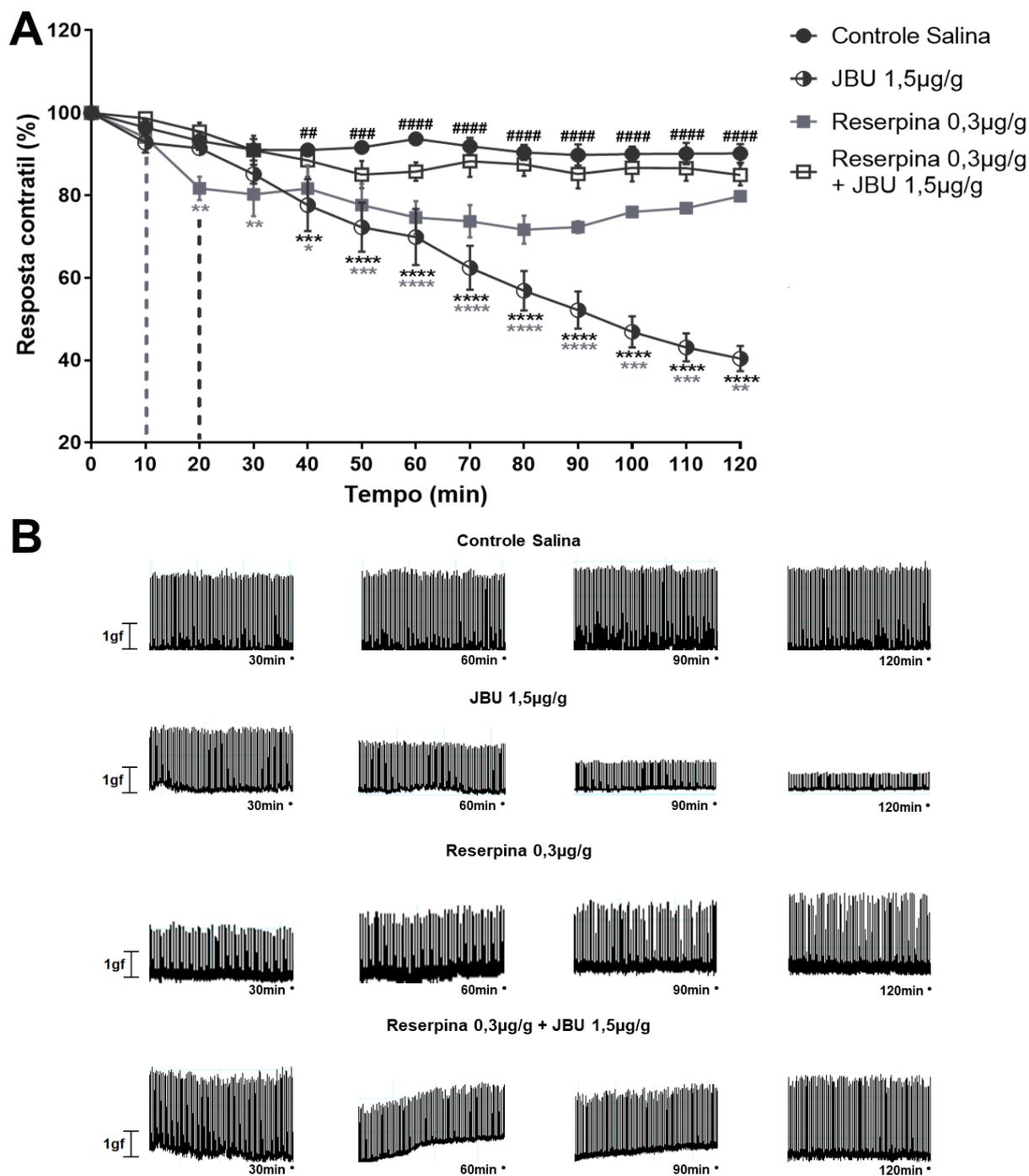


Figura 21 – Resposta neuromuscular induzida com tratamentos controle salina, JBU e Reserpina em preparações NMCAM *in vivo* em baratas. A) Gráfico da preparação NMCAM. B) Traços representativos dos registros neuromusculares, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, com a barra representando 1 grama força. Os pontos no gráfico foram expressos como Média \pm EPM através de análise *Two-way ANOVA*, seguida por *Tukey* (“#” representa a comparação entre JBU 1,5µg/g e Reserpina + JBU,5µg/g onde, ##### é igual $p < 0,0001$) (n = 6). Fonte: Autor.

4.3 Alterações induzidas por JBU nos PACNE de *N. cinerea*

No trabalho de Carrazoni et al. (2016) foi investigado o efeito da JBU em registros de PACNE e comprovado a diminuição na frequência desses causada pela JBU 6 $\mu\text{g/g}$ (única dose testada). Contudo, nesse trabalho, investigamos o efeito das três doses de JBU sobre os PACNE. Os eventos, dado em número de *Spike*, resultantes da perna de *N. cinerea* no grupo controle salina foram de 3145 ± 110 ($n = 12$). Quando administrada JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$ a frequência dos eventos caiu para 1726 ± 57 ($p < 0,0001$). Entretanto, as doses de 3 e 6 $\mu\text{g/g}$ não alteraram a quantidade de *spikes* em relação ao controle salina (Figura 22A). A amplitude dos potenciais de ação do grupo controle salina alcançou $114,9 \pm 10,8$ Milivolts (mV). No tratamento com JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$ a amplitude baixou para $64,6 \pm 11,5$ mV ($p < 0,02$) (Figura 22B). Nos animais do controle salina a duração dos potenciais de ação foi em média $1,03 \pm 0,10$ milissegundos (ms), enquanto nos injetados com JBU 1,5 $\mu\text{g/g}$ o tempo foi $1,53 \pm 0,12$ ms ($p < 0,002$) (Figura 22C). Tanto a dose de 3 $\mu\text{g/g}$ quanto a de 6 $\mu\text{g/g}$ não provocaram qualquer mudança significativa na biofísica dos potenciais.

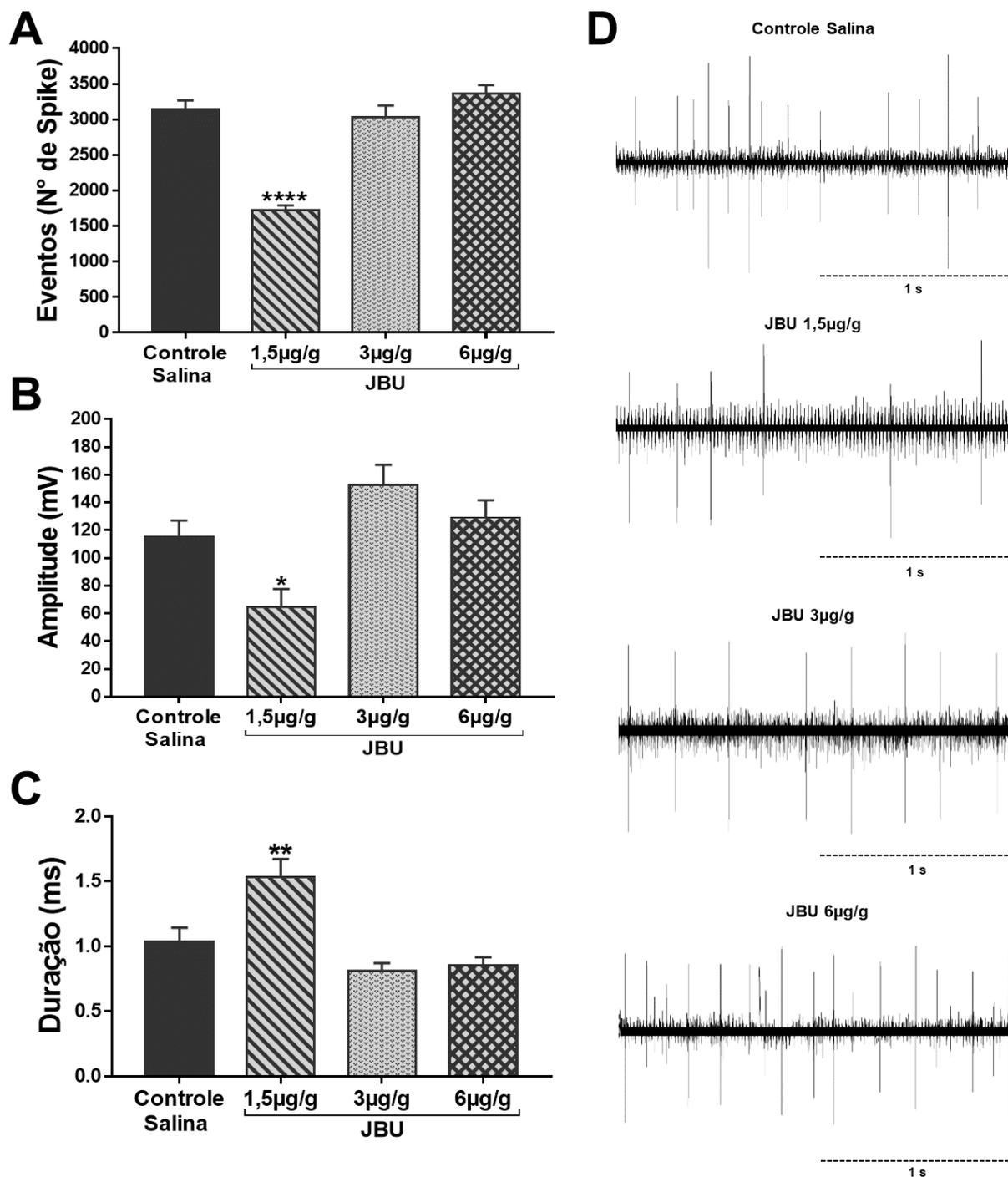


Figura 22 – Registro dos PACNE da perna de *N. cinerea* e análise da cinética dos potenciais com tratamentos controle salina e JBU. A) Eventos (número de *Spike*). B) Amplitude (mV). C) Duração (ms). D) Representação dos registros dos PACNE de *N. cinerea* onde, a linha tracejada representa o intervalo de 1 segundo. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnnett* ($n = 12$). Fonte: Autor.

4.3.1 Modulação octopaminérgica nos PACNE de *N. cinerea* na presença de JBU

Os eventos observados nesses ensaios, foram calculados como número de *spikes* registradas pela ativação de sensila das cerdas das pernas de *N. cinerea*. Assim, o grupo controle salina apresentou 3145 ± 110 eventos, em 60min de registros ($n = 12$). Quando a JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ foi administrada houve uma redução significativa no número de eventos para 1726 ± 57 ($p < 0,0001$). No controle fentolamina $0,6 \mu\text{g/g}$ e no grupo pré tratado com fento e posteriormente injetado com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$, não houve diferença estatística em relação ao grupo salina (Figura 23A). A amplitude média dos potenciais de ação do grupo controle salina foi de $114,9 \pm 10,8$ mV. Quando JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ foi ensaiado a amplitude dos potenciais foi reduzida para $64,6 \pm 11,5$ mV. Nos grupos fento $0,6 \mu\text{g/g}$ e fento + JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ não houve redução significativa da amplitude dos potenciais (Figura 23B). Nos animais do grupo controle salina a duração dos potenciais de ação foi em média $1,03 \pm 0,10$ ms, enquanto nos injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo foi $1,53 \pm 0,12$ ms ($p < 0,002$). Tanto no grupo fento $0,6 \mu\text{g/g}$ quanto fento + JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ não houve alteração na duração dos potenciais (Figura 23C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU na cinética dos potenciais de ação compostos, pelo tratamento prévio com fentolamina, foi comparado o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ com o grupo pré tratado com fento $0,6 \mu\text{g/g}$, seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa em relação ao parâmetro número de eventos ($p < 0,0001$). No entanto, não houve diferença quanto ao parâmetro amplitude. A duração foi menor nos potenciais do segundo grupo ($1,16 \pm 0,13$ ms), sendo significante em relação ao controle JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ com $p < 0,03$ (Figura 23).

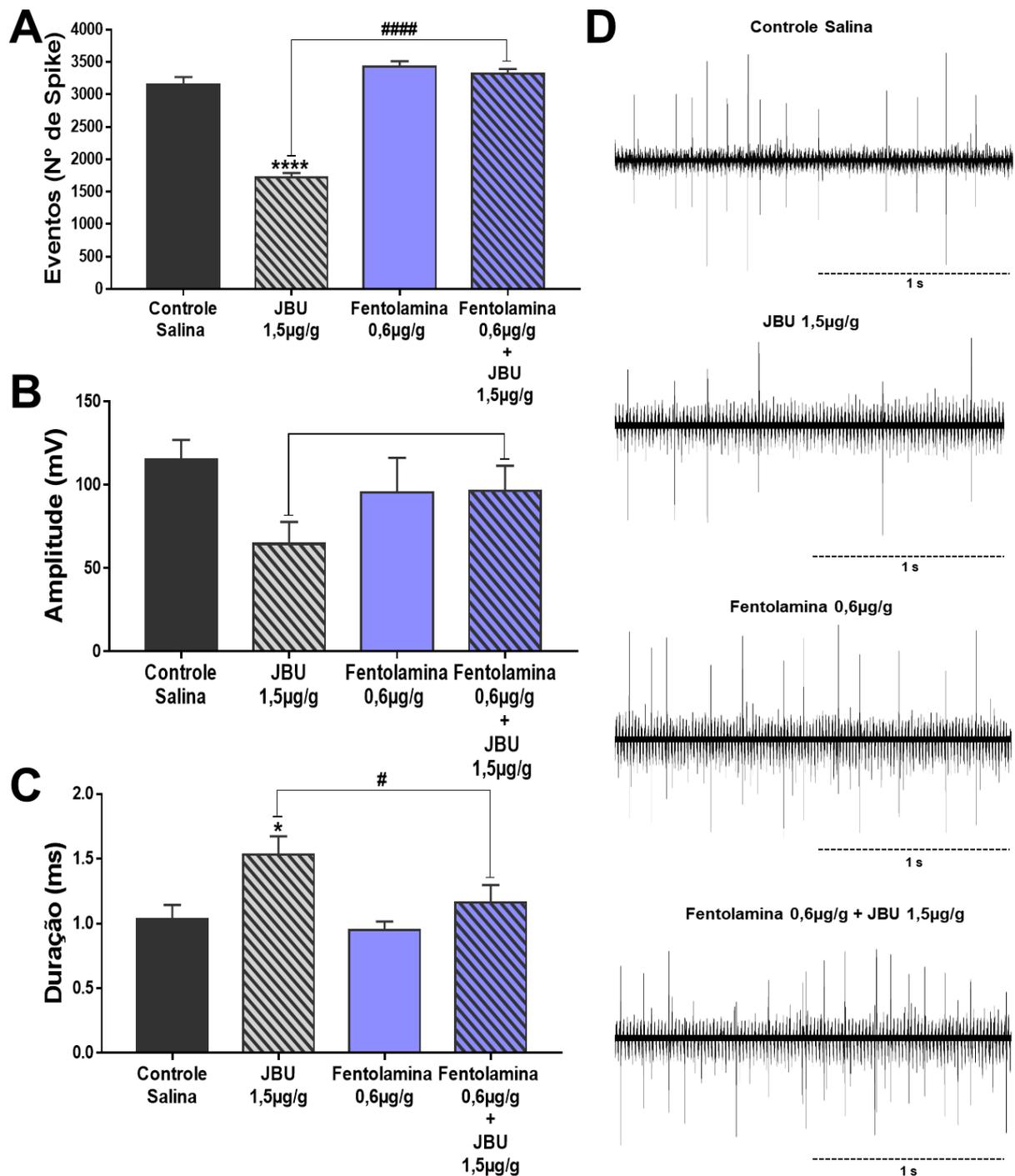


Figura 23 – Registro dos PACNE da perna de *N. cinerea* e cinética dos potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Fentolamina. A) Eventos (número de *Spike*). B) Amplitude (mV). C) Duração (ms). D) Representação dos registros dos PACNE de *N. cinerea* onde, a linha tracejada representa o intervalo de 1 segundo. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnett* e *Sidak* ($\#$ representa $p < 0,05$ e $####$ $p < 0,0001$) ($n = 12$). Fonte: Autor.

4.3.2 Modulação dopaminérgica nos PACNE de *N. cinerea* na presença de JBU

Os eventos observados nesses ensaios, foram calculados como número de *spikes* registradas pela ativação de sensila das cerdas das pernas de *N. cinerea*. Assim, no grupo controle salina, o número de eventos foi de 3145 ± 110 ($n = 12$). Quando a JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ foi administrada o número de eventos caiu para 1726 ± 57 ($p < 0,0001$). No controle SCH23390 $0,2 \mu\text{g/g}$ e no grupo pré tratado com SCH e posteriormente injetado com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ houve uma redução parcial do número de eventos para 2747 ± 114 ($p < 0,01$) e 2676 ± 83 ($p < 0,005$), respectivamente (Figura 24A). A amplitude dos potenciais de ação do grupo controle salina alcançou a $114,9 \pm 10,8$ mV. No tratamento com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ a amplitude foi reduzida para $64,6 \pm 11,5$ mV, já nos grupos SCH $0,2 \mu\text{g/g}$ e o SCH mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ não houve redução da amplitude dos potenciais (Figura 24B). Nos animais do controle salina a duração dos potenciais de ação foi em média $1,03 \pm 0,10$ ms, enquanto nos injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo foi $1,53 \pm 0,12$ ms ($p < 0,005$). Tanto SCH $0,2 \mu\text{g/g}$ quanto SCH mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ a duração não foi alterada de forma significativa (Figura 24C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU sobre parâmetros cinéticos dos potenciais de ação compostos, com o tratamento prévio por SCH23390, comparou-se o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ com o grupo pré tratado com SCH $0,2 \mu\text{g/g}$, seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi altamente significativa quando o número de eventos foi comparado ($p < 0,0001$). No entanto, a diferença na amplitude não foi significativa. A duração dos potenciais foi menor no segundo grupo ($1,21 \pm 0,06$ ms), sendo ainda significativa em relação ao controle JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ com $p < 0,04$ (Figura 24).

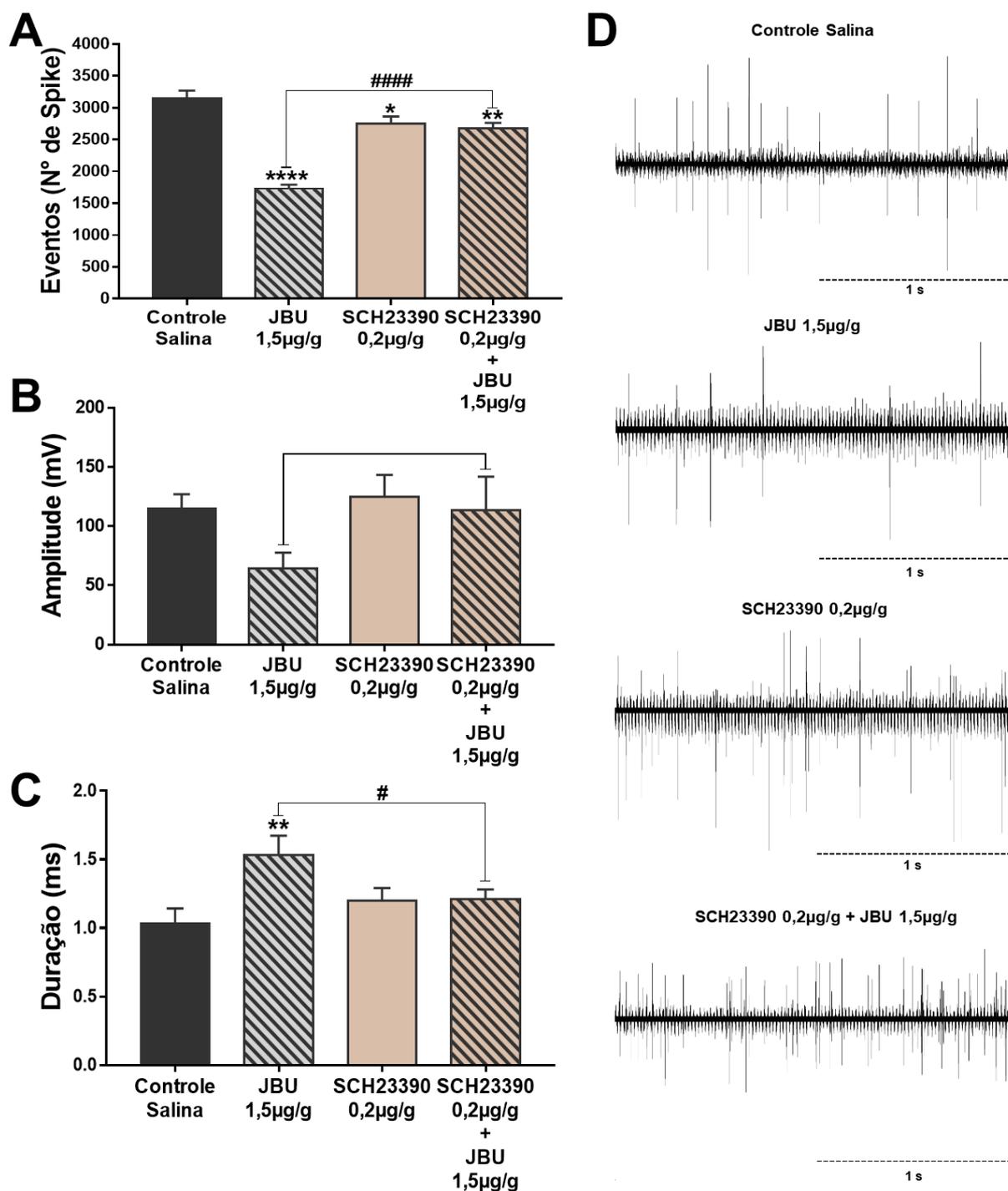


Figura 24 – Registro dos PACNE da perna de *N. cinerea* e cinética dos potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e SCH23390. A) Eventos (número de *Spike*). B) Amplitude (mV). C) Duração (ms). D) Representação dos registros dos PACNE de *N. cinerea* onde, a linha tracejada representa o intervalo de 1 segundo. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnnett* e *Sidak* (# representa $p < 0,05$ e #### $p < 0,0001$) ($n = 12$). Fonte: Autor.

4.3.3 Modulação serotoninérgica nos PACNE de *N. cinerea* na presença de JBU

Os eventos observados nesses ensaios, foram calculados como número de *spikes* registrados pela ativação de sensila das cerdas das pernas de *N. cinerea*. Nesse ensaio, o valor do número de eventos no grupo controle salina foi de 3145 ± 110 ($n = 12$). Quando a JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ foi administrada o número de eventos caiu para 1726 ± 57 ($p < 0,0001$). No controle mianserina $0,5 \mu\text{g/g}$ e no grupo pré tratado com mian e posteriormente injetado com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ houve redução dos números de eventos para 2490 ± 66 ($p < 0,0001$) e 1751 ± 88 ($p < 0,0001$) respectivamente, sendo que o último mostrou-se semelhante ao controle JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ (Figura 25A). A amplitude dos potenciais de ação do grupo controle salina alcançou a $114,9 \pm 10,8$ mV. No tratamento com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ a amplitude foi reduzida para $64,6 \pm 11,5$ mV, já no grupo mian $0,5 \mu\text{g/g}$ não houve redução da amplitude dos potenciais. Entretanto, no tratamento mian mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ a amplitude baixou para $52,8 \pm 14,2$ mV ($p < 0,01$) (Figura 25B). Nos animais do controle salina a duração dos potenciais de ação foi em média $1,03 \pm 0,10$ ms, enquanto nos injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo foi $1,53 \pm 0,12$ ms ($p < 0,01$). No grupo mian $0,5 \mu\text{g/g}$ a duração não foi alterada de forma significativa, enquanto no grupo tratado com mian mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ ocorreu um aumento no tempo de duração para $1,70 \pm 0,05$ ms ($p < 0,0008$), sendo superior ao aumento causado pelo controle JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ (Figura 25C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU quanto a parâmetros cinéticos dos potenciais de ação compostos, pelo tratamento prévio com mianserina, comparou-se o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ com o grupo pré tratado com mian $0,5 \mu\text{g/g}$, seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. Não houve diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 25).

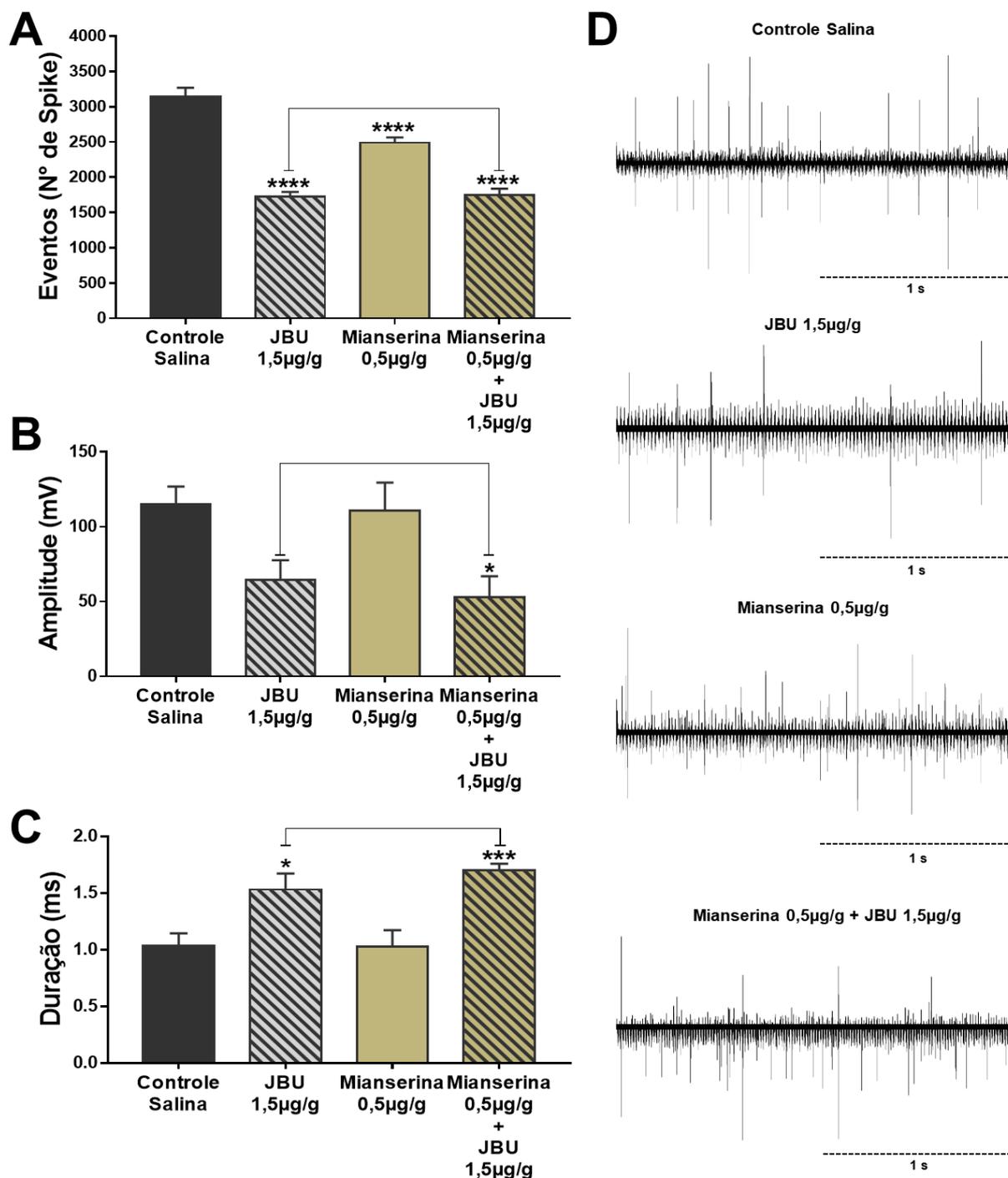


Figura 25 – Registro dos PACNE da perna de *N. cinerea* e cinética dos potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Mianserina. A) Eventos (número de Spike). B) Amplitude (mV). C) Duração (ms). D) Representação dos registros dos PACNE de *N. cinerea* onde, a linha tracejada representa o intervalo de 1 segundo. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnett* e *Sidak* ($n = 12$). Fonte: Autor.

4.3.4 Modulação monoaminérgica nos PACNE de *N. cinerea* na presença de JBU

Os eventos observados nesses ensaios, foram calculados como número de *spikes* registrados pela ativação da sensila das cerdas das pernas de *N. cinerea*. Nesses ensaios, o grupo controle salina apresentou 3145 ± 110 eventos ($n = 12$). Quando a JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ foi administrada a frequência dos eventos diminuiu para 1726 ± 57 ($p < 0,0001$). No controle reserpina $0,3 \mu\text{g/g}$ e no grupo pré tratado com reser e posteriormente injetado com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$, não houve diferença estatística em relação ao controle salina (Figura 26A). A amplitude dos potenciais de ação do grupo controle salina alcançou a $114,9 \pm 10,8$ mV. No tratamento com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$, a amplitude foi reduzida para $64,6 \pm 11,5$ mV ($p < 0,04$) e no grupo reser $0,3 \mu\text{g/g}$ baixou para $65,0 \pm 17,9$ mV ($p < 0,04$). No tratamento reser mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ não houve redução da amplitude dos potenciais (Figura 26B). Nos animais do controle salina, a duração dos potenciais de ação foi em média $1,03 \pm 0,10$ ms, enquanto nos injetados com JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ o tempo foi $1,53 \pm 0,12$ ms ($p < 0,01$). Tanto nos animais tratados reser $0,3 \mu\text{g/g}$ quanto os tratados com reser mais JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ a duração não foi alterada (Figura 26C).

Para confirmar se houve inibição do efeito entomotóxico da JBU sobre parâmetros cinéticos dos potenciais de ação compostos, pelo tratamento prévio com reserpina, comparou-se o controle JBU $1,5 \mu\text{g}$ com o grupo pré tratado com reser $0,3 \mu\text{g/g}$ seguido pela injeção de JBU $1,5 \mu\text{g/g}$. A diferença estatística foi significativa em relação ao parâmetro número de eventos ($p < 0,0001$). No entanto, a diferença na amplitude não foi significativa. A duração foi menor nos potenciais do segundo grupo ($1,04 \pm 0,10$ ms), sendo significativa em relação ao controle JBU $1,5 \mu\text{g/g}$ com $p < 0,006$ (Figura 26).

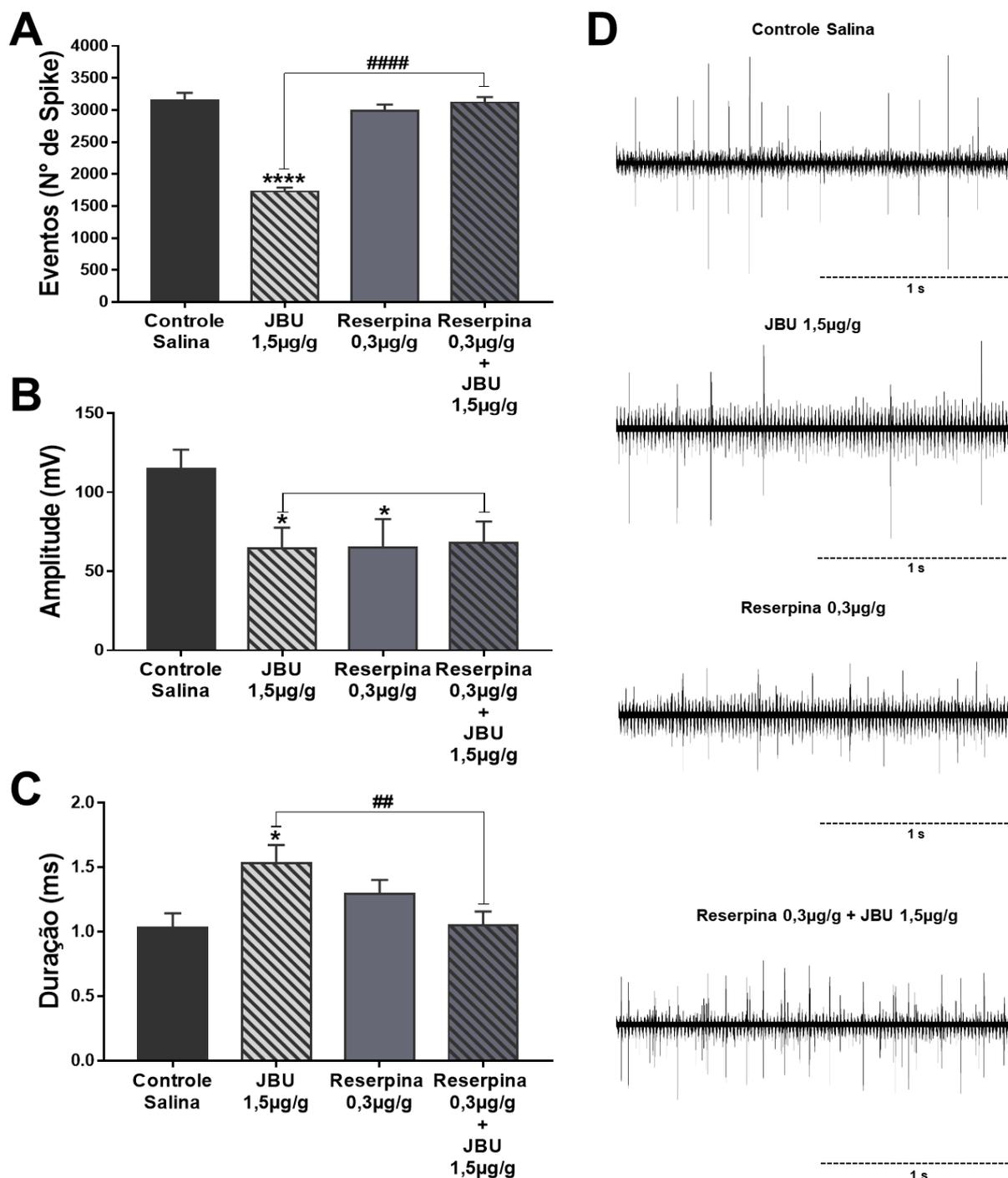


Figura 26 – Registro dos PACNE da perna de *N. cinerea* e cinética e potenciais finais avaliados com tratamentos controle salina, JBU e Reserpina. A) Eventos (número de *Spike*). B) Amplitude (mV). C) Duração (ms). D) Representação dos registros dos PACNE de *N. cinerea* onde, a linha tracejada representa o intervalo de 1 segundo. Os resultados foram expressos como Média \pm EPM através de análise *One-way ANOVA*, seguida por *Dunnett* e *Sidak* (## representa $p < 0,03$ e #### $p < 0,0001$) ($n = 12$). Fonte: Autor.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho investigou-se o efeito entomotóxico periférico e o mecanismo de ação da urease de *Canavalia ensiformis*. Para isso, utilizamos ureases isoladas no laboratório parceiro, Inscer. Os cristais produzidos contêm mais unidades ureolíticas (dados não mostrados) em comparação, por exemplo, com a urease utilizada por Carrazoni et al. (2016). Esse fato reflete nos resultados obtidos nesse trabalho, no qual podemos observar que as doses mais baixas demonstraram serem mais efetivas na ação entomotóxica. Na verdade, a forma em U na curva dose-respostas, já foi observada em outros trabalhos com JBU. Por exemplo, menor dose (1,5µg/g) mimetizou os efeitos da dose de 6µg/g observados no trabalho supracitado. Muitos trabalhos investigaram o comportamento de oligomerização da JBU e como isso se relaciona às suas propriedades catalíticas e entomotóxicas. Acredita-se que a parcial ou transitória exposição de aglomerados hidrofóbicos na superfície da proteína é responsável por esse fenômeno. Foi demonstrado que o processo de oligomerização de JBU é, principalmente, concentração-dependente, resultando em redução ou inibição na atividade da proteína (FOLLMER et al., 2004b; STANISÇUASKI et al., 2009).

Neste trabalho, foi demonstrado que a administração da JBU induz hipocinesia dose-dependente em baratas, caracterizada pela diminuição significativa no parâmetro distância percorrida, e conseqüentemente o aumento significativo nos parâmetros episódios de imobilidade e tempo de parada. Possivelmente, essa alteração esteja ocorrendo pela mudança na modulação de serotonina, uma vez que testes com fluoxetina (um agonista de receptores de serotoninérgicos) mimetizaram o efeito da JBU, reduzindo significativamente o comportamento locomotor de *N. cinerea* (dados não mostrados). Um resultado semelhante foi observado por Neckameyer et al. (2007) em *Drosophila melanogaster* com receptores 5-HTs mutados, no qual o comportamento locomotor foi alterado de forma drástica. Outra possibilidade, é que a redução da atividade locomotora seja um efeito secundário, resultante do aumento do comportamento de *grooming* (higienização das pernas e antenas) causado por JBU, observado por Carrazoni et al. (2016). O aumento visto no número de episódios de imobilidade, pode reforçar essa hipótese.

Todas as funções motoras dos insetos são moduladas por monoaminas nos *central pattern generators*, principalmente octopamina e serotonina. No

comportamento locomotor notamos que os tratamentos com os compostos farmacológicos geraram uma redução na locomoção e este efeito foi potencializado pela administração de Reserpina (controle positivo). Demonstrando assim, a importância das aminas no processo de locomoção, que corroboram com dados encontrados na literatura (MARDER et al., 2005). A mianserina (antagonista serotoninérgico), por outro lado, não causou nenhuma redução na distância percorrida pelos animais, confirmando a regulação de *feedback* negativo dessa amina junto as funções motoras (VLEUGELS; VERLINDEN; BROECK, 2015). O pré tratamento com fentolamina, SCH23390 e reserpina preveniram a hipocinesa causada por JBU, o contrário aconteceu no grupo dos animais pré tratados com Mianserina. Nesse sentido, reforça-se a hipótese que esse é um efeito secundário, pois tanto a octopamina quanto a dopamina são moduladores centrais no *grooming*, portanto quando seus respectivos receptores estão bloqueados, esse comportamento não ocorre, permitindo que os animais se locomovam (CARRAZONI et al., 2016; WEISEL-EICHLER; HASPEL; LIBERSAT, 1999).

A JBU induz bloqueio neuromuscular irreversível em *N. cinerea*, como demonstrado por Carrazoni et al. (2016). Nos nossos experimentos, a dose 1,5µg/g reproduziu a redução da resposta contrátil causada pela maior dose testada na avaliação citada acima. Em inseto, sabe-se que na junção neuromuscular o glutamato atua como o principal neurotransmissor excitatório e o GABA como o principal neurotransmissor inibitório. Além disso, na placa motora de insetos, a liberação do glutamato ou do GABA pode induzir tanto o aumento quanto a diminuição na força de contração muscular, dependendo do tipo de músculo ou da sinapse correspondente a junção neuromuscular. Em ensaios imunológicos da região metatorácica em gafanhoto *Schistocerca gregaria*, foram reveladas pelo menos duas inervações de neurônios inibitórios (GABAérgicos) que partem do nervo 5 para o gânglio metatorácico. Ao longo do nervo 5 a atividade é conduzida centralmente (vindo de sinais aferentes dos órgãos sensoriais) ou periféricamente, para o gânglio metatorácico através do motoneurônio monossináptico conectado à via de sinapses colinérgicas (CARR; FOURTNER, 1980; CARRAZONI et al., 2016; WATSON, 1986). Erber et al. (1993) mostraram através de experimentos comportamentais que a modulação de serotonina afeta os interneurônios periféricos e o controle dos músculos, além de respostas sensitivas. Além disso, recentemente Alekseyenko et al. (2019) demonstraram que a serotonina regula a agressividade em

D. melanogaster via modulação de receptores GABAérgicos e colinérgicos. No músculo de *S. gregaria* a serotonina causa redução na força de contração. Provavelmente, a redução parcial observada na junção neuromuscular dos animais pré tratados com mianserina, e posteriormente injetados com JBU, se deve pelo bloqueio dos receptores serotoninérgicos e, conseqüentemente, a impossibilidade de concretização da regulação negativa sobre a contração muscular gerada por essa amina. A presença de octopamina na junção neuromuscular de *N. cinerea* produziu um efeito de redução tempo-dependente e irreversível como relatado por Carrazoni et al. (2016). Corroborando com o exposto, a administração de Fentolamina não alterou a resposta contrátil de *N. cinerea* e preveniu o bloqueio causado por JBU. Cooper & Neckameyer (1999) mostraram que a dopamina altera a neurotransmissão na junção neuromuscular de *D. melanogaster*. Além disso, foi demonstrado em Ayali et al. (1998) que a dopamina reduz a capacidade de resposta do glutamato em alguns neurônios pós-sinápticos, enquanto em neurônios pré-sinápticos altera a resistência de entrada, causando um aumento da liberação do mesmo. Em nossos resultados verificamos uma pequena facilitação na força de contração no registro controle SCH23390, enquanto no grupo dos animais pré tratados com esse antagonista a força da resposta contrátil vista no controle persiste por todo tempo do registro. Carrazoni et al. (2018) sugeriram que a neurotoxicidade da JBU poderia envolver alterações na liberação de neurotransmissores na conexão da junção neuromuscular em *D. melanogaster*.

A JBU induziu alterações na biofísica e na frequência dos PACNE em *N. cinerea*. Recentemente, Zanatta et al. (2018) mostraram que o peptídeo recombinante derivado da JBU, Jaburetox, causa diminuição dose e tempo dependente nos potenciais espontâneos de *N. cinerea*, sendo sugerido que o fator principal desse efeito seja a interferência do peptídeo nos canais de sódio voltagem-dependentes (Navs). Além disso, experimentos de *current* e *voltage clamp* realizados com neurônio de *Periplaneta americana* reforçam esta hipótese, demonstrando que a modulação esteja ocorrendo via células DUM (*dorsal unpaired median*). Sabe-se que os Navs são proteínas transmembranas responsáveis pelo rápido aumento dos potenciais de ação, enquanto que os canais de potássio voltagem dependentes são responsáveis pela fase de decaimento dos potenciais de ação, estando envolvidos na repolarização da membrana. A redução da amplitude observada em nossos resultados sugere que a porção do Jaburetox presente na

JBU pode influenciar os efeitos da urease no sistema nervoso. Além disso, o aumento no tempo de duração do potencial, resultante da administração de JBU, corrobora com hipótese de retardo na abertura dos Navs. Algumas propriedades biológicas de JBU e Jaburetox são compartilhadas (Martinelli et al., 2014; Zanatta et al., 2018 (em submissão)).

Tanto no SNC de insetos quanto nos neurônios DUM, há evidências que incluem a neurotransmissão octopaminérgica nos disparos de potenciais de ação espontâneos em neurônios. Apesar disso, nesse trabalho, a injeção de fentolamina não resultou em decréscimo de nenhum dos parâmetros biofísicos avaliados. No entanto, o pré tratamento com fentolamina resultou em prevenção das alterações induzidas por JBU. Ayali et al. (1998) demonstraram que a dopamina mudou a amplitude dos potenciais de ação espontâneos inibitórios evocados, alterando a resistência de entrada de células pós-sinápticas em *Panulirus interruptus*. Visto que, apesar de reduzir a frequência o SCH23390 não causou alterações biofísicas nos PACNE de *N. cinerea*, portanto podemos considerar que este mecanismo seja comum aos invertebrados. Sollai et al. (2012) revelou que a serotonina não altera a geração de *spikes* nos receptores de *Protophormia terraenovae*. Em contrapartida, o resultado obtido nesse trabalho mostra que a administração de mianserina reduz significativamente a geração de *spikes*. No entanto, o pré tratamento com esse antagonista não impediu o efeito de JBU, nos parâmetros avaliados, sugerindo que a regulação serotoninérgica é menos relevante do que as alterações causadas pela urease.

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 exposto 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 27). Este mecanismo também explicaria a dificuldade de reprodutibilidade em experimentos realizados com JBU (CARRAZONI et al., 2016, 2018; PIOVESAN et al., 2014).

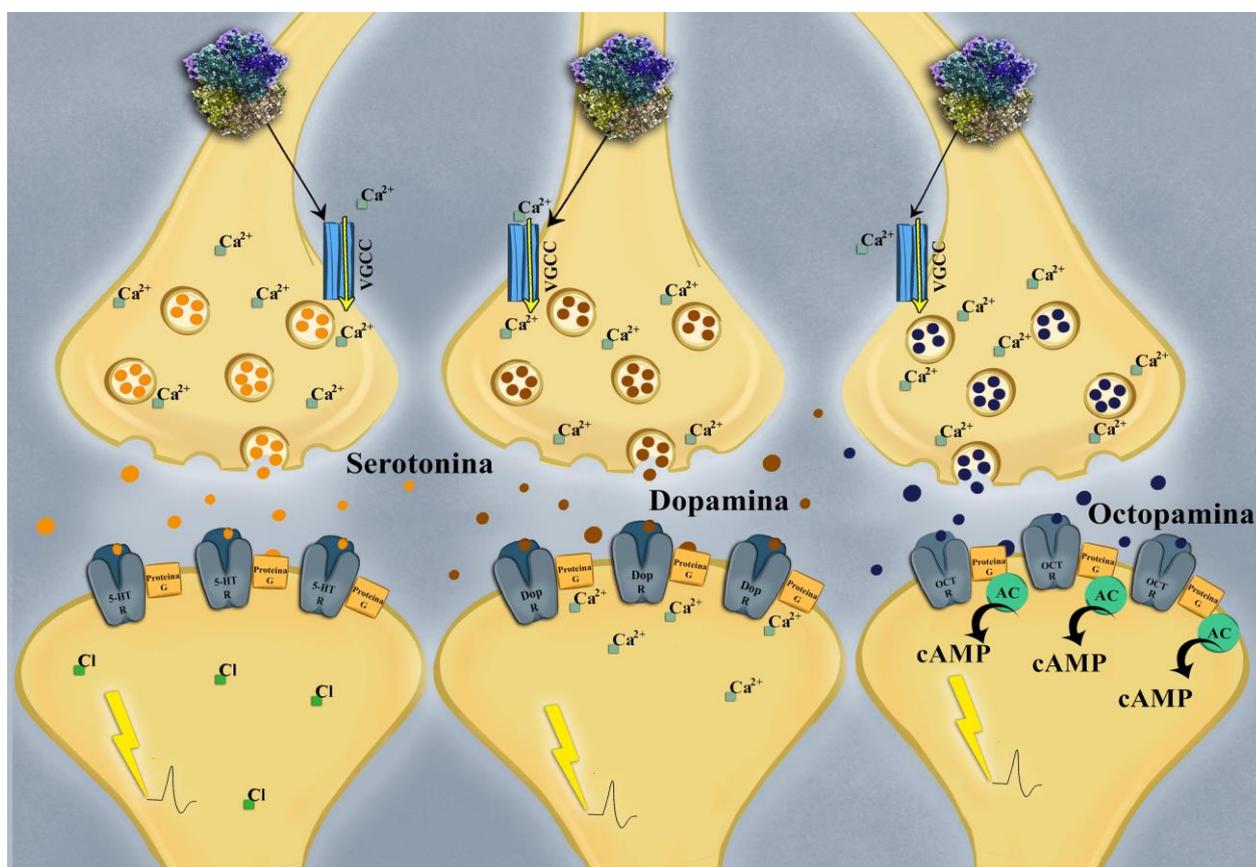


Figura 27: Representação ilustrada do mecanismo de ação primário da entomotoxicidade da JBU sugerido. Resumidamente, a influência da JBU sobre os canais de cálcio voltagem-

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, Ca^{2+} , Cl^- e cAMP. Resultando em alterações fisio-comportamentais. Fonte: MSc. Bruna Trindade Borges.

6 CONCLUSÃO

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

- A JBU induziu hipocinesa e alteração do comportamento exploratório de *N. cinerea*, sugerindo o envolvimento das vias octopaminérgica, serotoninérgica e dopaminérgica, possivelmente como efeito secundário da alteração do *grooming*;
- A JBU induziu alterações na cinética e na frequência dos PACNE em *N. cinerea*, provavelmente pela interferência sobre canais de sódio voltagem-dependentes;
- 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 da neurotransmissão monoaminérgica, via modulação dos canais de cálcio voltagem-dependentes;
- Trabalhos futuros devem ser realizados para compreender de qual forma a JBU produz o influxo de cálcio nos neurônios pré-sinápticos.

7 REFERÊNCIAS

ALEKSEYENKO, O. V. et al. Serotonergic Modulation of Aggression in *Drosophila* Involves GABAergic and Cholinergic Opposing Pathways. **Current Biology**, [s. l.], v. 29, n. 13, p. 2145–2156.e5, 2019.

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.

AYALI, A.; JOHNSON, B. R.; HARRIS-WARRICK, R. M. Dopamine modulates graded and spike-evoked synaptic inhibition independently at single synapses in pyloric network of lobster. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 79, n. 4, p. 2063–2069, 1998.

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.

CARR, C. E.; FOURTNER, C. R. Pharmacological Analysis of a Monosynaptic Reflex in the Cockroach, *Periplaneta Americana*. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 86, n. 1, 1980.

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.

COOPER, R. L.; NECKAMEYER, W. S. Dopaminergic modulation of motor neuron activity and neuromuscular function in *Drosophila melanogaster*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, [s. l.], v. 122, n. 2, p. 199–210, 1999.

CORI, C. F. J. B. Sumner and the chemical nature of enzymes. **Trends in 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.

DOS SANTOS, D. S. et al. *Bothriurus bonariensis* scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 258, p. 1–9, 2016.

ERBER, J.; KLOPPENBURG, P.; SCHEIDLER, A. Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology *Experientia*. **Birkhäuser-Verlag**, 1993.

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.] : **FEPAF**, 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.

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 Clinica 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.

LEAL, A. P. et al. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 148, n. May, p. 175–181, 2018.

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.

MARDER, E. et al. Invertebrate central pattern generation moves along *Current Biology*, 2005.

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.

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.

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.

NECKAMEYER, W. S. et al. Compartmentalization of neuronal and peripheral serotonin synthesis in *Drosophila melanogaster*. **Genes, Brain and Behavior**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 756–769, 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.

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

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.

SOLLAI, G. et al. The spike generator in the labellar taste receptors of the blowfly is differently affected by 4-aminopyridine and 5-hydroxytryptamine. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 58, n. 12, p. 1686–1693, 2012.

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.

WATSON, A. H. D. The distribution of GABA-like immunoreactivity in the thoracic nervous system of the locust *Schistocerca gregaria*. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 246, n. 2, p. 331–341, 1986.

WEISEL-EICHLER, A.; HASPEL, G.; LIBERSAT, F. Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 202, n. 8, p. 957–964, 1999.

ZANATTA, A. P. et al. Inactivation of cockroach voltage-gated sodium channels by the ureased-derived peptide Jabuetos: novel clues to uncover its complex insecticide activity. **(em submissão)**, 2018.

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.