UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Douglas Silva dos Santos

IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENTOMOTOXICOS DE DOIS COMPOSTOS INSETICIDAS NATURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO DE INSETOS: EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) E JABURETOX

Santa Maria, RS
2019

Douglas Silva dos Santos

IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENTOMOTOXICOS DE DOIS COMPOSTOS INSETICIDAS NATURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO DE INSETOS: EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) E JABURETOX

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Dr. Chariston André Dal Belo
Universidade Federal do Pampa (Orientador)

Dr. Ian Orchard
University of Toronto- Mississauga (Coorientador no Exterior)

Dra. Angela Lange
University of Toronto- Mississauga (Coorientadora no Exterior)

Santa Maria, RS
2019

Santos, Douglas Silva dos
IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENTOMOTOXICOS DE DOIS COMPOSTOS INSETICIDAS NATURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO DE INSETOS: EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) E JABURETOX / Douglas Silva dos Santos.- 2019.
120 p.; 30 cm

Orientador: Chariston André Dal Belo
Coorientadores: Ian Orchard, Angela Lange
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2019

1. Xenobióticos 2. Extrato contendo anatoxina-a(s) 3. Jaburetox I. Dal Belo, Chariston André II. Orchard, Ian III. Lange, Angela IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Douglas Silva dos Santos

IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENTOMOTOXICOS DE DOIS COMPOSTOS INSETICIDAS NATURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO DE INSETOS: EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) E JABURETOX

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Aprovado em 29 de março de 2019:

Prof. Dr. Chariston André Dal Belo (UNIPAMPA)
(Presidente/ Orientador)

Prof. Dra. Daiana Silva de Ávila (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Jeferson Luís Franco (UFSM)

Prof. Dra. Maribel Antonello Rubin (UFSM)

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva (UCS)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Dedico todo esforço que depositei nesse trabalho aos meus amados pais Angela e Ariovaldo Santos; ao meu amor, melhor amigo, companheiro e marido Gustavo Fabri Borges e também aos meus amados tios Sônia e Luiz Somavilla (*in memorian*), pois sem vocês nada disso seria possível, a todos vocês o meu amor eterno e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por todas oportunidades concedidas ao longo dessa trajetória até aqui e principalmente agradecer pela fé e pela força de seguir dia após dia, pois sem elas eu não teria chegado até aqui. Obrigado papai do céu!

Aos meus amados pais Angela e Ariovaldo Santos, por sempre serem minha base, minha força e meus amores incondicionais. Tudo o que faço é por vocês! Amo demais vocês!

Aos meus amados tios (*in memorian*) Sônia e Luiz Somavilla por todo apoio, força e amor desde o início da minha trajetória lá no começo da faculdade em 2008. Todas as minhas conquistas sempre serão dedicadas a vocês, pois sei que aonde quer que estejam estão felizes por mais essa vitória. Amarei e serei grato a vocês eternamente!

Aos meus amados (*in memorian*) tio/dindo Paulo Sergio Freitas e minha vó Neusa Freitas por todo incentivo e amor ao longo desses anos todos. Sei que vocês estão felizes por mais essa conquista. Amarei vocês eternamente!

Ao melhor presente que o Canadá, a vida e papai do céu poderia me dar, o meu melhor amigo, meu marido, meu companheiro e o grande amor da minha vida Gustavo Fabri Borges. Obrigado por acreditar em mim e ser essa força linda que sempre me dá ânimo de seguir em frente em busca de evoluir e ser uma pessoa melhor a cada dia! Te amarei de janeiro a janeiro até o mundo acabar! Obrigado por tudo, te amo demais!

Ao meu orientador professor Chariston André Dal Belo, amigo e parceiro dessa longa jornada acadêmica, desde a graduação, mestrado até o doutorado. Muito obrigado pela confiança e principalmente por não desistir de mim até mesmo quando desacreditei de mim mesmo. Obrigado por todos os conhecimentos, momentos compartilhados e principalmente pelo exemplo de ser humano e profissional. Lhe serei eternamente grato por tudo grande mestre!

A professora Célia Carlini, pela oportunidade de representar a PUC (Laneurotox), Unipampa (Lanetox) e a UFSM fora do país e principalmente pela oportunidade de ter feito parte de um grupo tão conceituado quanto todo esse nosso grupo de pesquisa! Lhe serei eternamente grato por essa oportunidade.

Aos meus orientadores da Universidade de Toronto- Mississauga (UTM), professores Ian Orchard e Angela Lange pela oportunidade de trabalhar num grupo tão íntegro e maravilhoso em todos os sentidos que se possa imaginar. Orchard & Lange lab the best group ever. Obrigado pela convivência e por todos os ensinamentos durante os sete meses mais maravilhosos da minha vida. Serei eternamente grato a vocês! I Love you both!

Eu gostaria de agradecer a minha grande amiga Sara da Silva, a canadense mais portuguesa que conheci em Toronto. Obrigado por todos os teus ensinamentos, pela acolhida, pela amizade e todos os momentos de descontração após o laboratório. Escrevi em português, pois sei que tu irás entender. Ah, só mais uma coisa: you are the best coach ever!!! I love you so much!

I would like to thank the brother from another mother that Canada gave me, Hussain Mark Alkawi. Thank you for being this incredible friend that you are, more so for being this simple person with such a good and beautiful heart. Thank you brother, for always being by my side, be it Toronto or here. I miss our coffees always with lots of good and relaxed conversation at UTM. You're amazing! I love you, brother!

I would like to thank the most beautiful and wonderful ribbon in the world, my sister from another mother that Canada gave me, my ribbon Shirin Mollayeva. Thank you for all the wonderful moments that we spent together and especially for our friendship. Thank you for always being with me my love, for keeping this contact almost daily. You are the purest and beautiful person who has this beautiful heart that I have ever known. I am grateful for being your friend and being close to you, even though I am far away. I love you infinitely! I'm counting the days to see you here in Brazil.

Aos meus amigos, companheiros de viagem, de Canadá, aventuras e trabalho, Raquel Soares e Fabricio Souto, o casal mais querido e parceiro desse mundo. Obrigado pela amizade, pela força e por serem essas pessoas sensacionais que vocês são! Amo vocês!

Ao meu amigão Carlos Almeida, também conhecido como "tio Carlos" por todos os momentos de aprendizados ao lado desse grande amigo que a vida me deu. Obrigado por estar no meu lado em todos os momentos bons e difíceis dessa luta. Você é o irmão que a vida me deu! Te amo cara!

A Diuli Santos, minha prima, irmã, confidente, a melhor amiga que eu poderia ter nessa vida. Obrigado por todos os momentos compartilhados e por estar sempre ao meu lado. Te amo demais!

A Veridiana Carvalho e Aline Portela, amigas e irmãs, presentes que a vida me deu. Obrigado por compartilharem comigo as alegrias e as dores da vida, mas principalmente por sempre estarem por perto. Por sempre me mostrarem que por mais difícil que sejam as coisas, que sempre vale a pena insistir nos nossos sonhos e objetivos. Amo vocês!

Aos meus fiéis companheiros de São Gabriel e de apartamento 204, aos meus amigões Felipe Benchimol e Maikon Marks por compartilharem comigo não só a convivência, mas a vida e por sempre fazerem qualquer momento ruim, tornarem-se bons, alegres e felizes após um bom e belo café passado na hora, regado a uma conversa boa. Amo vocês!

A Litiele Cruz, minha colega e grande amiga de graduação, a principal incentivadora de eu ir atrás dos meus sonhos. Te amo demais. Muito obrigado por tudo!

Aos meus bebês de quatro patas Sophie (*in memorian*), Negão, Hope, Dhara, Tyson e Perri pelos momentos de descontração após aquele cansaço diário de escrever, revisar e ler muito. Meus anjinhos de quatro patas amo vocês!

Aos meus sogros Sandra e Celso Borges pela acolhida em Curitiba, apoio, carinho e por me fazer sentir em casa junto de vocês. Muito obrigado por tudo que fazem por mim e pelo Gustavo, amamos vocês!!

À UNIPAMPA pela possibilidade de realizar minha pesquisa de doutorado junto ao laboratório Lanetox- campus São Gabriel.

À Elvandir Guimarães, "Dica" secretária do PPGBTox pela atenção e disposição em sempre me ajudar. Muito obrigado por tudo!

À comissão examinadora desse trabalho pela disponibilidade e disposição em contribuir com esse trabalho. A vocês meu muito obrigado!

Agradeço à UFSM e ao PPGBTox pela possibilidade de realização deste curso e à CAPES de bolsa de doutorado e também pela oportunidade de realizar meu doutorado sanduíche na Universidade de Toronto-Mississauga.

But man is a part of nature, and his war against nature is inevitably a war against himself."

Rachel Carson

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS ENTOMOTOXICOS DE DOIS COMPOSTOS INSETICIDAS NATURAIS EM MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO DE INSETOS: EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) E JABURETOX

Autor: Douglas Silva dos Santos
Orientador: Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

A avaliação de risco é uma etapa que tem por alvo a avaliação e caracterização das propriedades tóxicas de compostos xenobióticos, condições de exposição a humanos e ao meio ambiente. O objetivo desse trabalho foi contribuir para a avaliação do potencial de risco dos compostos xenobióticos de origem natural, Anatoxina-a(s) e Jaburetox, por meio da investigação dos mecanismos de entomotoxicidade em modelos alternativos de insetos. Nos homogeneizados cerebrais das baratas, tanto o extrato contendo anatoxina-a(s) (CECA), quanto o triclorfon (Tn) inibiu a atividade da acetilcolinesterase (AChE). Além disso, o CECA provocou mudança no padrão locomotor de baratas caracterizado pela diminuição na distância percorrida, aumentando a frequência e a duração dos episódios de imobilidade de maneira similar ao observado com o organofosforado triclorfon (Tn). O CECA também induziu o aumento na atividade de *grooming* de pernas, mas não na atividade de *grooming* de antenas, similarmente ao efeito do Tn. O CECA e Tn induziram cronotropismo negativo no coração do inseto. Também foi constatado que o CECA, Tn e neostigmina induziram bloqueio neuromuscular em preparações *in vivo* da barata da espécie *Nauphoeta cinerea*. Por outro lado, o jaburetox (Jbtx), um peptídeo inseticida derivado da urease de *Canavalia ensiformis*, não possui mecanismo de ação elucidado, apesar de interagir com o sistema nervoso de insetos. Nesse trabalho foram empregados protocolos comportamentais, eletromiográficos e eletrofisiológicos para identificar os alvos celulares e moleculares envolvidos na entomotoxicidade do Jbtx em baratas e gafanhotos. O Jbtx causou alteração no comportamento locomotor dos insetos caracterizado por uma diminuição significativa na distância percorrida, seguida por um aumento no tempo de imobilidade em *N. cinerea*. O Jbtx aumentou a atividade de *grooming* de pernas e antenas. Jbtx também induziu bloqueio neuromuscular *in vivo* e cardiotoxicidade em *N. cinerea* caracterizado pela diminuição da frequência cardíaca das baratas. Registros dos potenciais de ação do músculo e do nervo periférico de gafanhotos da espécie *Locusta migratoria* demonstraram que o Jbtx aumenta a amplitude dos potenciais de ação do nervo, sem alterar o perfil muscular. Análises de *voltage clamp* em *Xenopus laevis* heterologamente expressados com canais de sódio voltagem-dependentes de *Blatella germanica* do tipo $BgNa_V$ 1.1, demonstraram que o Jbtx aumenta a amplitude das correntes de sódio. O conjunto de dados inéditos obtidos nesse trabalho deverá contribuir de maneira decisiva melhorando a efetividade da análise dentro da avaliação de risco ambiental para os compostos estudados, contribuindo com a otimização dos processos de detecção e descontaminação ambiental. Não obstante, devido ao inerente contexto biotecnológico desse trabalho, as toxinas aqui estudadas poderão em um futuro próximo serem empregadas como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas ou pesticidas de origem natural.

Palavras-chave: Xenobióticos, extrato contendo anatoxina-a(s), jaburetox, neurotoxicidade, octopamina, dopamina, doses subletais.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF THE ENTOMOTOXIC MECHANISMS OF TWO NATURAL INSECTICIDES IN EXTERIMENTAL ALTERNATIVE INSECT MODEL: EXTRACT CONTAINING ANATOXIN-A (S) AND JABURETOX

Author: Douglas Silva dos Santos
Advisor: Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

The risk assessment is a stage that aims at the evaluation and characterization of the toxic properties of xenobiotic compounds, conditions of exposure to humans and the environment. The aim of this work was to contribute to the evaluation of the risk potential of natural xenobiotic compounds as Anatoxin-a (s) and Jaburetox, by investigating the mechanisms of entomotoxicity in alternative insect models. In the cerebral homogenates of cockroaches, both extract containing anatoxin-a(s) CECA and trichlorfon (Tn) inhibited acetylcholinesterase activity (AChE). In addition, CECA caused a change in the locomotor pattern of cockroaches characterized by a decrease in distance travelled, increasing the frequency and duration of immobility episodes in a manner similar to that observed with trichlorfon (Tn) organophosphate. CECA also induced an increase in leg *grooming* activity, but not in antenna *grooming* activity, similar to the effect of Tn. The CECA and Tn induced negative chronotropism in the insect's heart. It was also found that CECA, Tn, and neostigmine induced a neuromuscular block *in vivo* preparations of the cockroaches of the species *Nauphoeta cinerea*. On the other hand, jaburetox (Jbtx), an insecticidal peptide derived from the *Canavalia ensiformis* urease, has no elucidated mechanism of action, despite interacting with the nervous system of insects. In this work, behavioral, electromyographic and electrophysiological protocols were used to identify the cellular and molecular targets involved in the entomotoxicity of Jbtx in cockroaches and locusts. Jbtx caused a change in the locomotor behavior of the insects characterized by a significant decrease in the distance travelled, followed by an increase in the immobility time in *N. cinerea*. Jbtx also increased the grooming activity of legs and antennae. Jbtx induced a neuromuscular block *in vivo* and cardiotoxicity in *N. cinerea* characterized by the decrease in heart rate of cockroaches. Records of muscle and peripheral nerve potentials of the locusts of the species *Locusta migratoria* demonstrated that Jbtx increases the amplitude of nerve action potentials without altering the muscle profile. Analysis of *voltage clamp* in *Xenopus laevis* heterologously expressed with voltage-dependent sodium channels of *Blatella germanica* of type $BgNa_V$ 1.1, demonstrated that Jbtx increases the amplitude of the sodium currents. The set of unpublished data obtained in this work should contribute in a decisive way improving the effectiveness of the analysis within the environmental risk assessment for the studied compounds, contributing with the optimization of the environmental detection and decontamination processes. Nevertheless, due to the inherent biotechnological context of this work, the toxins studied here may in the near future be used as prototypes for the development of new drugs or pesticides of natural origin.

Keywords: Xenobiotics, extract containing anatoxin-a (s), jaburetox, neurotoxic octopamine, dopamine, sublethal doses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química básica dos compostos organofosforados 27
Figura 2. Estrutura química do triclorfon (dimetil 2,2,2 tricloro-l-hidroxi-etilfosfanato) 28
Figura 3. Mecanismo de intoxicação do triclorfon 29
Figura 4. Tipos de anatoxinas produzidas por cianobactérias 32
Figura 5. Extrato contendo anatoxina-a(s) (CECA) 34
Figura 6. Estrutura tridimensional do peptídeo tóxico Jbtx obtida a partir da análise FLEXIBLE MECCANO/ SSP 35
Figura 7. Propriedades moleculares e biológicas do peptídeo tóxico Jbtx 37
Figura 8. Imagem representativa de *Locusta migratoria* 48
Figura 9. Imagem representativa de *Nauphoeta cinerea* 50
Figura 10. Imagem representativa de *Blatella germanica* 51
Figura 11. Modelo de inter-relação do sistema nervoso de insetos 52
Figura 12. Organização do Sistema Nervoso Central (SNC) em insetos 53
Figura 13. Arco reflexo monossináptico de um inseto 54
Figura 14. Excitabilidade elétrica da membrana plasmática 55
Figura 15. Neurotransmissão em sinapse colinérgica 57
Figura 16. Comportamento de *grooming* em baratas 59
Figura 17. Receptores de octopamina acoplados à proteína G como alvos inseticidas 60
Figura 18. Proposta do mecanismo de ação do CECA e do Jbtx sobre o Sistema nervoso de insetos 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das cianotoxinas e seu mecanismo de toxicidade 31

.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh- Neurotransmissor de acetilcolina

AChE- Enzima acetilcolinesterase

ACGIH- Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais

CECA- Extrato contendo anatoxina-a(s)

CL_{50}- Concentração letal

CNTX- Canatoxina

CYP- Superfamília de enzimas monooxigenase do citocromo P450

DL_{50}- Dose letal

EUA- Estados Unidos da América

FDA- Administração de Comidas e Remédios

GABA- Neurotransmissor ácido γ-amino butírico

GLU- Neurotransmissor de glutamato

GPCRs- Receptores da octopamina acoplados à proteína G

GST- Glutationa S-transferase

HA- Neurotransmissor de histamina

Jbtx- Peptídeo tóxico jaburetox

JBU- Jack bean urease

LmCYPs-Superfamília de genes de monooxigenase do citocromo P450 de *Locusta migratoria*

OA- Neurotransmissor de octopamina

OECD- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS- Organização Mundial da Saúde

SAR- Relação estrutura-atividade

SNAP- Sistema Nervoso Autonômico Parassimpático

SNAS- Sistema Nervoso Autonômico Simpático

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

TEPP-Tetraetil pirofosfato

Tn- Organofosforado triclorfon

5-HT- Neurotransmissor de serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 26
1.1 CONSIDERAÇÃO SOBRE OS AGENTES TÓXICOS ESTUDADOS 26
1.1.1 Compostos organofosforados- Triclorfon (Tn) 26
1.1.2 Extrato contendo anatoxina-a(s) (CECA) 30
1.1.3 Jaburetox (Jbtx) 34
1.2 AVALIAÇÃO DE RISCO E TOXICIDADE DOS PRODUTOS QUÍMICOS 38
1.3 EFEITOS TÓXICOS DE DOSES SUBLETAIS 42
1.4 INSETOS COMO MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO PARA O ESTUDO DE TOXICIDADE 44
1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS E A NEUROFISIOLOGIA DE INSETOS 46
1.5.1 *Locusta migratoria* (Linneaus, 1758) 46
1.5.2 *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789) 48
1.5.3 *Blatella germanica* (Linneaus, 1767) 50
1.5.4 Neurofisiologia de insetos 52
2. OBJETIVOS 64
3. RESULTADOS 66
3.1 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO -ECOTOXICOLOY AND ENVIRONMENTAL SAFETY (EES) 66
3.1.1 Material Suplementar 74
3.1.2 Resumo Gráfico 78
3.2 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO -PESTICIDE BIOCHEMESTRY AND PHYSIOLOGY (PBP) 79
3.2.1 Material Suplementar 89
3.2.2 Resumo Gráfico 93
4. DISCUSSÃO GERAL 94
5. CONCLUSÕES 100
6. PROPOSTA DO MECANISMO DE AÇÃO DO CECA E DO JBTX SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE INSETOS 102
7. PERSPECTIVAS 106

8. REFERÊNCIAS 108

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, consta uma revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta tese. A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte deste trabalho estão apresentados sob a forma de dois artigos científicos, que se encontram no item **ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO**. No item **DISCUSSÃO GERAL**, é apresentada uma discussão relativa ao conjunto dos resultados presentes na sessão "Artigos Científicos Publicados". O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta tese, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados dos artigos científicos presentes neste trabalho. Em **PERSPECTIVAS** são elencados protocolos futuros para dar continuidade na elucidação dos mecanismos de toxicidade dos compostos estudados nesse trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO GERAL** desta Tese.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÃO SOBRE OS AGENTES TÓXICOS ESTUDADOS

1.1.1 Compostos organofosforados- Triclorfon (Tn)

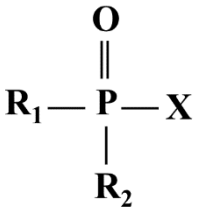
Em 1937, Shrader foi responsável pelas primeiras descobertas acerca das propriedades inseticidas dos organofosforados, no qual em 1941, desenvolveu o inseticida sistêmico OMPA (Shadran) e, consequentemente em 1944, o primeiro inseticida organofosforado a ser comercializado, cujo princípio ativo era o tetraetil pirofosfato (TEPP). Em seguida foram sintetizados compostos com maior estabilidade, como o paration e paraoxon, e compostos de menor toxicidade, como o fention, o clortion e o malation. Na década de 1950, foram sintetizados os compostos heterocíclicos, aromáticos e naftilcarbamatos, com potente ação anticolinesterase e maior seletividade contra os insetos (ALONZO & CORRÊA, 2008).

Os inseticidas organofosforados são ésteres amido ou tiol-derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosforotióico e fosfonotióico. São inseticidas rapidamente hidrolisados, tanto no meio ambiente, como nos meios biológicos, e altamente lipossolúveis, com alto coeficiente de partição óleo/água (ALONZO & CORRÊA, 2008). Podemos dizer que dos inseticidas utilizados atualmente, os compostos organofosforados são os mais amplamente difundidos, com mais de 35.000 formulações diferentes e os que mais causam intoxicações e mortes. Esse último dado torna relevante a sua utilização racional e controlada, visando a máxima eficácia e o menor prejuízo ao meio ambiente e as pessoas (SANTOS *et al.*, 2015).

Compostos organofosforados são um grupo químico de substâncias derivadas do ácido fosfórico, podendo ser de origem natural ou sintética, sendo amplamente conhecidos por sua atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE) (E.C. 3.1.1.7) (e.g. inibidores de colinesterase, ou agentes colinérgicos de ação indireta) (FIKES, 1990; ROCHA & SPINOSA, 1992). Os compostos organofosforados reagem no sítio esterásico da acetilcolinesterase inibindo essa enzima de maneira irreversível, sendo extremamente tóxicos para os sistemas biológicos, tornando-os inseticidas potentes (DOS SANTOS *et al.*, 2007) (Figura 1). Em geral, são muito menos seletivos que os carbamatos, inibindo muitas enzimas que contém uma molécula de serina em um centro ativo, por exemplo, a butirilcolinesterase e a carboxilesterase (CRAIG & STIZEL, 2004). A AChE catalisa a reação de hidrólise do neurotransmissor acetilcolina em ácido acético e colina, a sua inibição pelos organofosforados leva ao acumulo de acetilcolina nas terminações nervosas, incluindo as junções neuromusculares

(ECOBICHON, 2001). Essa exacerbação colinérgica, em última análise, afeta o Sistema Nervoso Autonômico Parassimpático (SNAP), seguido por estimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos, que atinge o Sistema Nervoso Autonômico Simpático (SNAS) e o Sistema Nervoso Central (SNC) (ECOBICHON, 2001). Por estas razões, compostos organofosforados são amplamente utilizados no controle de pragas em diversos tipos de culturas e estão entre os compostos mais tóxicos atualmente utilizados na agricultura. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorra cerca de um milhão de casos de envenenamentos envolvendo humanos com compostos organofosforados e mais de trezentas mil mortes por ano, em todo mundo (SAADEH *et al*., 1996; JOKANOVIĆ, 2017).

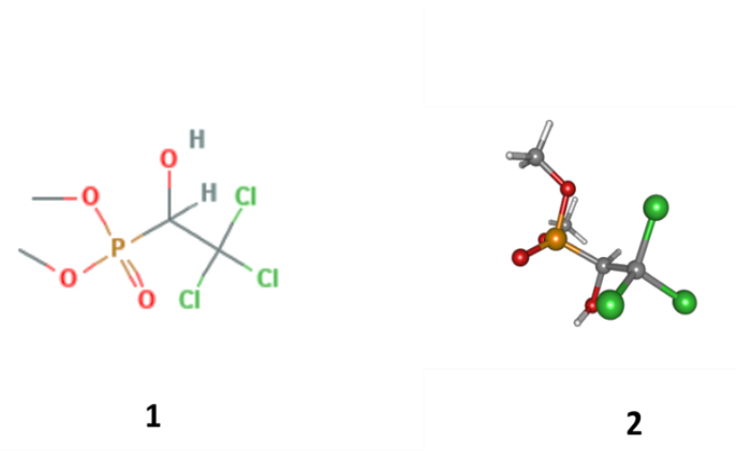
Figura 1. Estrutura química básica dos compostos organofosforados. X é chamado "grupo de saída", que é deslocado quando o organofosforado fosforila a acetilcolinesterase (AChE), sendo a mais sensível a hidrólise, geralmente representado por halogênio, alquil, aril ou heterocicíclos. O R1 e o R2 são geralmente representados pelos grupos alquil, ou grupos alcoxi (isto é, OCH3 ou OC2H5).



Fonte: FAUSTMAN & OMENN, 2008.

O triclorfon (dimetil 2,2,2 tricloro-l-hidroxi-etilfosfanato ou Metrifonato) (Figura 2) é um inseticida e acaricida organofosforado de classe II (altamente tóxico), solúvel em água, amplamente utilizado no controle de várias pragas em campos, lares, plantas e contra parasitas em animais domésticos e comerciais (LOPES *et al*., 2006; ANVISA, 2008).

Figura 2. Estrutura química do triclorfon (dimetil 2,2, 2 tricloro-l-hidroxi-etilfosfanato). 1. Representação da estrutura química em 2D; 2. Conformação da estrutura química em 3D.

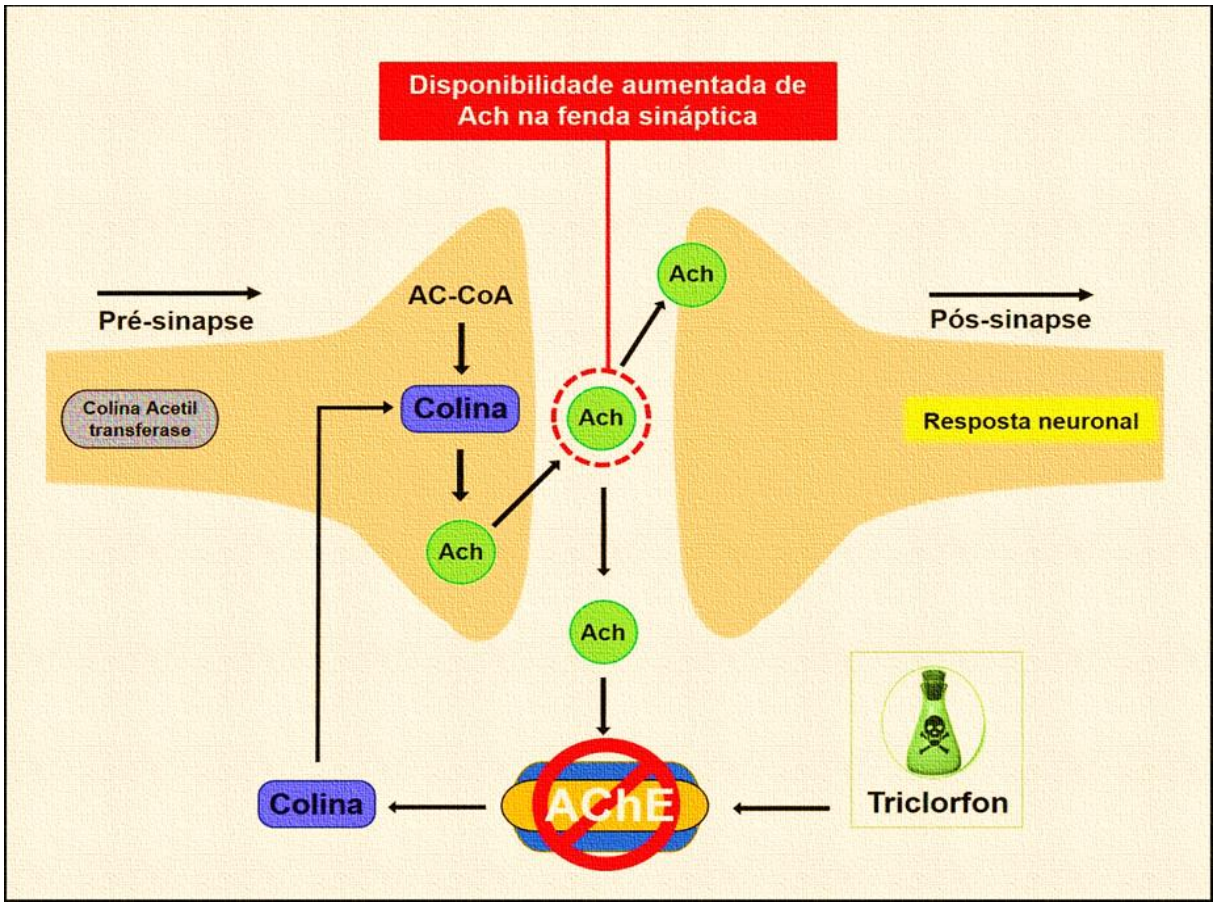


Fonte: NCBI, 2019.

A hidrólise do Tn é um processo rápido e acaba gerando um metabólito chamado diclorvós, que é um agente organofosforado altamente tóxico em função da atividade anticolinesterásica. Por essa razão, o agente potencialmente tóxico é o diclorvós e não o triclorfon (HIRATA *et al*., 2003). O Tn foi utilizado durante muito tempo na medicina veterinária no controle de endo e ectoparasitas e também na aquicultura no controle de lêndea de salmão (ANVISA, 2008).

A neurotoxicidade do Tn é caracterizada pelo mecanismo da inibição da enzima acetilcolinesterase, fundamental e essencial para o processo de transmissão do impulso nervoso (Figura 3). Pesquisas científicas mostraram que a ação do Tn sobre a acetilcolinesterase de mamíferos tem manifestação clínica mais lenta, devido a biotransformação em diclorvós (ANVISA, 2008).

Figura 3. Mecanismo de intoxicação do triclorfon. Assim como os demais organofosforados, o triclorfon se liga de forma bastante estável e forte ao centro esterásico da enzima acetilcolinesterase causando a inibição da sua ação por impedimento espacial. Com isso, a AchE não consegue se ligar a acetilcolina (que sofre ataque nucleofílico da serina), que por sua vez acumula-se nas fendas sinápticas, desencadeando todos os vários sinais característicos da intoxicação colinérgica.



Fonte: Adaptado de RANG & DALE, 2011.

Em 2008, após passar por uma reavaliação toxicológica pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, o Tn foi proibido no Brasil devido seu potencial teratogênico e de distúrbio hormonal. O banimento do Tn no Brasil ocorreu devido a inúmeras pesquisas que apontaram seu efeito de toxicidade alta, principalmente com efeitos adversos sobre a reprodução e o sistema hormonal (desregulação endócrina), efeitos genotóxicos, imunotóxicos, teratogênicos, neurotóxicos, provocando hipoplasia cerebelar, assim como o fato de ser um agrotóxico com potencial de provocar danos neurológicos maiores para os seres humanos do que para os animais, como demonstrado pela neuropatia retardada (ANVISA, 2008).

Nesse trabalho o Tn foi usado apenas como um controle positivo dos efeitos induzidos por um composto anticolinesterásico clássico, cujo o mecanismo de ação sobre as colinesterases do inseto é conhecido (STÜRMER *et al.*, 2014).

1.1.2 Extrato contendo anatoxina-a(s) (CECA)

A contaminação dos recursos hídricos e dos mananciais de abastecimento público por rejeitos oriundos das atividades humanas têm sido um dos maiores fatores de risco para a saúde humana. Os impactos antrópicos nos ecossistemas aquáticos, aceleram a ocorrência de processos de eutrofização. As principais fontes desse enriquecimento têm sido identificadas como sendo as descargas de esgotos domésticos e industriais dos centros urbanos e das regiões agricultáveis (ROCHA, LOUGON & GARCIA, 2009). A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água é a capacidade desses microrganismos produzirem e liberarem para o meio líquido, toxinas (cianotoxinas). As cianotoxinas podem afetar a saúde humana, tanto pela ingestão de água como por contato em atividades de recreação no ambiente, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado. Entretanto, a principal via de intoxicação é pelo consumo oral da água sem um tratamento adequado para remoção dessas toxinas (VEIGA *et al.*, 2008). De acordo com seus efeitos biológicos, as cianotoxinas são classificadas em hepatotoxinas (*Microcistinas, Nodularinas e Cilindrospermopsinas*), dermatotoxinas (*Debromoaplisiatoxina* e *Lingbiatoxina*) e neurotoxinas (*Saxitoxinas, Anatoxina-a, Anatoxina-a(s), homoanatoxina-a e β-N-metil-L-alanina (BMMA)*) (CHORUS & BARTRAM, 1999; FREITAS, PRINTES & ROCHA, 2016; LORENZI *et al.*, 2018) (Tabela 1). As anatoxinas são o primeiro grupo de neurotoxinas alcaloídicas e de baixo peso molecular a serem descritas na literatura, sendo classificadas de acordo com seu mecanismo de toxicidade em: anatoxina-a e homoanatoxina-a (agonistas nicotínicos) e anatoxina-a(s) (inibidor da colinesterase), em que "s" corresponde ao sintoma característico de salivação causada em vertebrados, principalmente em doses próximas aos 2 níveis de DL50 (20-40μg kg^{-1}) (GORHAM *et al.*, 1964; MATSUNAGA, MOORE & NIEMCZURA, 1989; CHORUS & BARTRAM, 1999) (Figura 4).

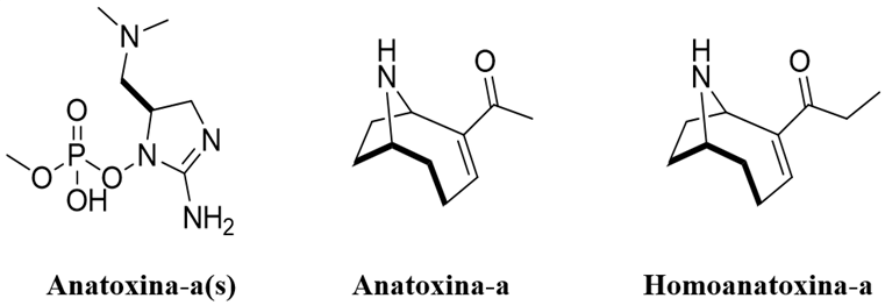
Tabela 1. Classificação das cianotoxinas e seu mecanismo de toxicidade.

Classificação da Toxina	DL_{50} ($\mu g.kg^{-1}$) via i.p (camundongo)	Cianobactéria produtora	Mecanismo de toxicidade
HEPATOXINAS			
Microcistina-LR	50	*Microcystis, Nostoc, Anabaena, Oscillatoria*	Promotor de tumor hepático e inibidor das fosfatases
Nodularina-R	50	*Nodularia*	Promotor de tumor hepático e inibidor das fosfatases
Cilandrospermopsina	2.10^3	*Aphanizomenon, Cylindropermopsis*	Inibidor da síntese proteica
DERMATOTOXINAS			
Debromoaplisiatoxina	Não definida	*Lyngybia, Schizothrix, Planktothrix*	Inflamação da pele e promotor de tumor
Lingbiatoxina	Não definida	*Lyngybia*	Inflamação da pele e do trato gastrointestinal
NEUROTOXINAS			
Saxitoxina	10	*Aphanizomenon*	Bloqueador de canais de sódio
Anatoxina-a(s)	20	*Anabaena, Sphaerospermopsis*	Inibidor de colinesterase
Anatoxina	375	*Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria*	Agonista nicotínico
Homoanatoxina-a	-	*Oscillatoria Anabaena, Raphidiopsis Phormidium*	Agonista nicotínico

β-N-metil-L-alanina (BMMA)	Não definida	*Nostoc*	Agonista glutamatérgico

Fonte: Adaptado de CHORUS & BARTMAN, 1999; MOLICA *et al*., 2005; WERNER *et al*., 2012.

Figura 4. Tipos de anatoxinas produzidas por cianobactérias.



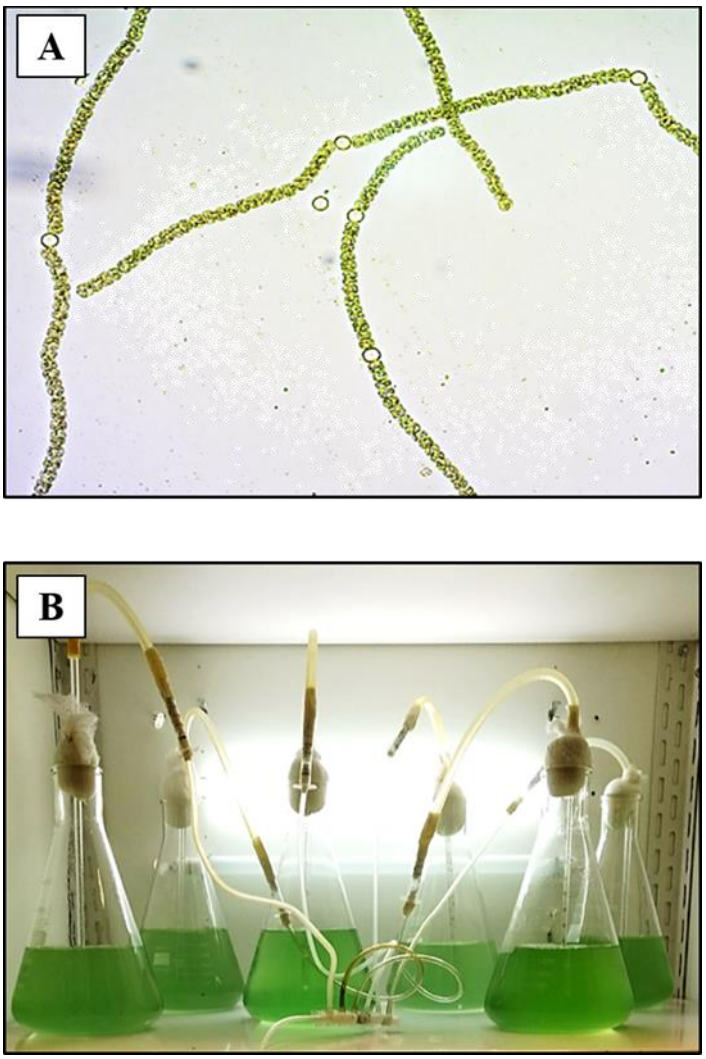
Fonte*:* CHORUS & BARTRAM, 1999.

A primeira ocorrência a ser documentada da anatoxina-a(s) foi analisada a partir da cepa de *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17 presente no lago *Buffalo Pound* na província de Saskatchewan - Canadá em 1965 (CARMICHAEL & GORHAM, 1978). Já nos Estados Unidos, a anatoxina-a(s) foi responsável de morte de nove cães que viviam nas proximidades do lago *Richmond*, no Estado Dakota do Sul (MAHMOOD, CARMICHAEL & PFAHLER, 1988). A Dinamarca também documentou florações da cianobactéria ocorridas no lago *Knud* no período compreendido entre 1993 a 1995 durante o verão. Nas análises cromatográficas dessas amostras não foram detectadas as toxinas anatoxina-a e saxitoxinas, mas um perfil cromatográfico semelhante ao da anatoxina-a(s) com um potente teor neurotóxico (HENRIKSEN *et al*., 1997).

As anatoxinas podem ser produzidas por várias espécies de cianobactérias, isoladas ou concomitante à produção de hepatotoxinas. No Brasil até o momento, somente a anatoxina-a(s) foi documentada dentre o grupo de anatoxinas, a primeira foi descrita no reservatório de Tapacurá-PE (MOLICA *et al*., 2005). A anatoxina-a(s) é um organofosforado natural, originado como um metabólito secundário de cianobactérias *Anabaena spiroides*, recentemente reclassificada como *Sphaerospermopsis torques-reginae* (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1987; MOLICA *et al*., 2005; WERNER *et al*., 2012) (Figura 5). Por conseguinte, a anatoxina-

a(s) compartilha com os outros compostos organofosforados quimicamente relacionados (como por exemplo, o triclorfon (Tn)) a mesma atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase (STÜRMER *et al*., 2014). A inibição da AChE faz com que o neurotransmissor de acetilcolina não seja mais hidrolisado durante a sinapse e com isso a membrana pós-sináptica não pode ser repolarizada, fazendo com que o influxo nervoso seja bloqueado (DEVIC *et al*., 2002; METCALF & BRUNO, 2017). A anatoxina-a(s) tem um mecanismo semelhante ao de inseticidas organofosforados e carbamatos, tais como, por exemplo, paraoxon, fisostigmina e piridostigmina (COOK *et al*., 1988; METCALF & BRUNO, 2017). Dessa forma, destaca-se a necessidade de identificar sistemas biológicos relevantes para ensaios de neurotoxicidade que envolvam compostos xenobióticos ambientalmente relevantes. Com isso, o modelo biológico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* poderá contribuir como um importante marcador ambiental para obtenção de dados potencialmente relevantes para a otimização dos processos de identificação, tratamento e descontaminação ambiental. Além disso, estudos de neurobiologia associados ao CECA poderão contribuir para o desenvolvimento de novos compostos naturais com aplicabilidade biotecnológica.

Figura 5. Extrato contendo anatoxina-a(s) (CECA). (A) Cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae*. (B) Cultivo da cepa ITEP24 da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae*.



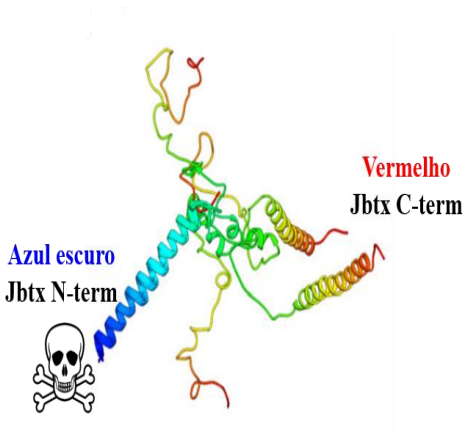
Fonte: Kelly Afonsina Fernandes- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP), 2018.

1.1.3 Jaburetox (Jbtx)

As ureases (EC 3.5.1.5, ureia amidohidrolase) são metaloenzimas níquel-dependentes que catalisam a conversão da ureia em duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (DIXON *et al*., 1926). As ureases são amplamente distribuídas em plantas, fungos e bactérias, porém não são sintetizadas por animais (MOBLEY& HAUSINGER, 1989). A partir de estudos com a *Canavalia ensiformes*, conhecida popularmente como Jack bean urease (JBU), foi isolada uma isoforma chamada Canatoxina (CNTX), uma proteína neurotóxica de 185.000 kDa que é parte da família relacionada ao gene da urease JBU (FOLLMER *et al*., 2001, 2004; PIRES-

ALVES *et al*., 2003). Apesar do seu papel relacionado à atividade ureolítica, essas ureases demonstraram ação tóxica direta contra insetos e fungos, independentemente de sua atividade enzimática (STANISÇUASKI & CARLINI, 2012). Contudo, o efeito entomotóxico da CNTX é em parte devido a liberação de um peptídeo interno de 10kDa (Pepcanatox), sendo este liberado a partir da hidrólise da CNTX por enzimas do tipo catepsina no sistema digestório de insetos como *Rhodnius prolixus*, *Callosobruchus maculatus*, *Dysdercus peruvianus*, *Nezara viridula* e *Oncopeltus fasciatus* (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; DEFFERRARI *et al*., 2011; FERREIRA-DASILVA *et al*., 2000; PIOVESAN *et al*., 2008; STANISÇUASKI *et al*., 2005). O peptídeo derivado da urease exibe um potente efeito inseticida também em insetos com digestão a base de tripsina como a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e para barata alemã (*Blatella germanica),* que não são susceptíveis pela ingestão de ureases nativas (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). O peptídeo recombinante Jaburetox (11.04 kDa) foi obtido a partir da sequência N-terminal do peptídeo Pepcanatox, utilizando como molde o cDNA da isoforma JABURE-II através da expressão heteróloga em *Escherichia coli* (MULINARI *et al*., 2007) (Figura 6).

Figura 6. Estrutura tridimensional do peptídeo tóxico Jbtx obtida a partir da análise FLEXIBLE MECCANO/ SSP. A porção N-terminal do Jbtx, representada pela cor azul escuro apresenta o domínio entomotóxico mais importante em insetos.

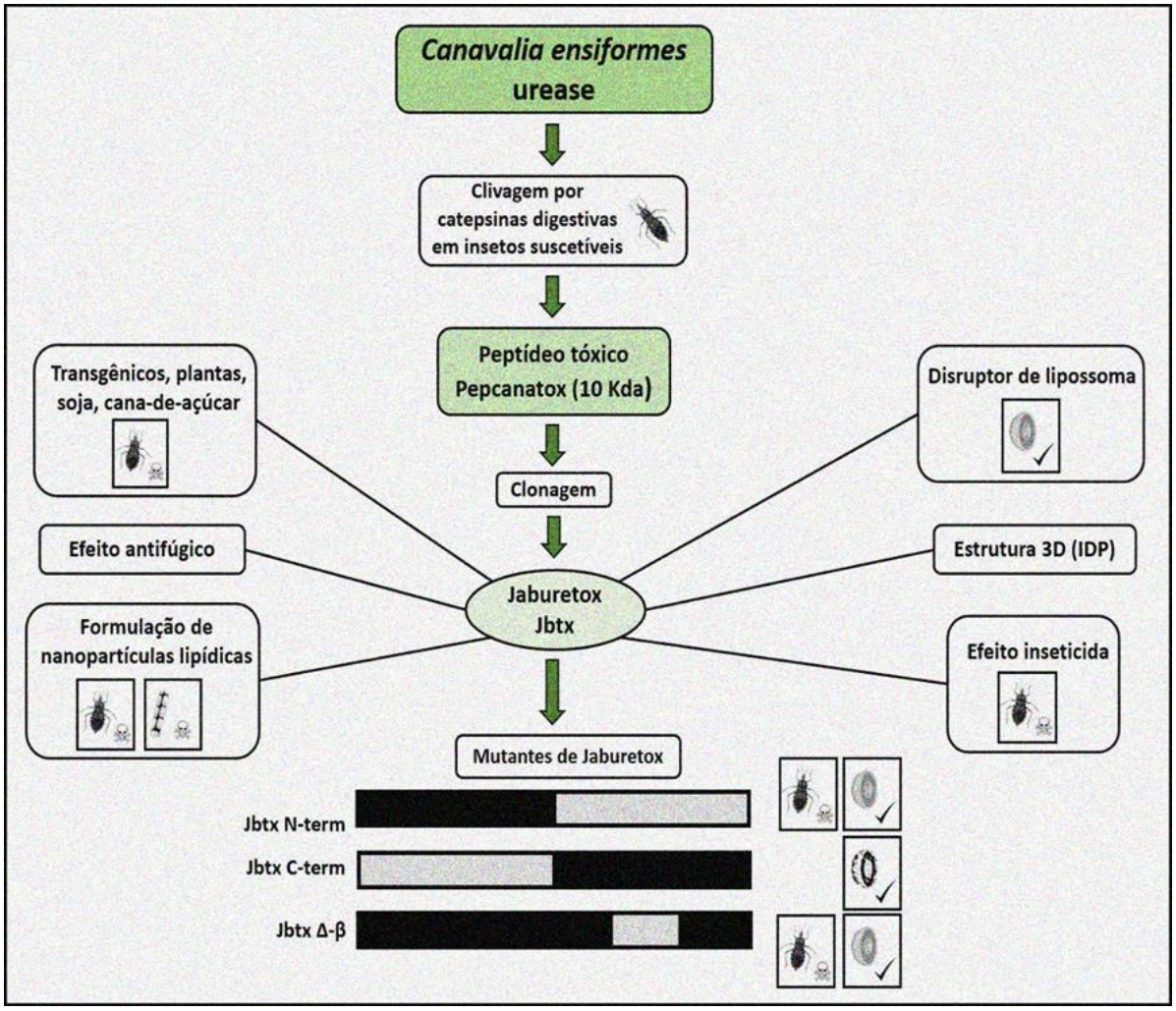


Fonte: Adaptado de LOPES *et al*., 2015.

A modelagem molecular do Jaburetox, e posteriormente os estudos sobre a estrutura cristalográfica da JBU, mostrou a presença de um motivo β-hairpin na porção C-terminal do peptídeo, consistente com um mecanismo de ação baseado na neurotoxicidade ou na formação de poros (BALASUBRAMANIAN & PONNURAJ, 2010; BARROS *et al*., 2009; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016; MULINARI *et al*., 2007). Para melhor entender a importância do

motivo o β-harpin, três mutantes do peptídeo Jaburetox foram construídos afim de confirmar experimentalmente a importância desse motivo: Jbtx Δ-β (mutante com deleção do motivo β), Jbtx N-ter (mutante correspondente à metade N-terminal do peptídeo) e Jbtx C-ter (mutante correspondente à metade C-terminal do peptídeo, e que contêm o motivo β) (Figura 7) (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016; MARTINELLI *et al*., 2014).

Figura 7. Propriedades moleculares e biológicas do peptídeo tóxico Jbtx. Nesse esquema é possível observar a produção do peptídeo entomotóxico Jbtx a partir da urease de Jack bean Urease (JBU), através da clivagem por digestão realizada por catepsinas em insetos (pepcanatox), ou então por expressão heteróloga em *E. coli* (Jaburetox). O Jbtx é capaz de se inserir nas membranas, alterando a permeabilidade dos lipossomas, além de ser capaz de formar canais iônicos, podendo exibir efeitos inseticidas e antifúngicos. O Jbtx pode apresentar importantes aplicações biotecnológicas nas quais podemos incluir as formulações em nanopartículas lipídicas e além de plantas transgênicas que expressam esse peptídeo tóxico. A mutagênese do Jbtx demonstrou que o motivo β-hairpin não é um fator relevante para determinar suas propriedades entomotóxicas e que metade N-terminal do peptídeo possui seu domínio entomotóxico mais importante (Adaptado de CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).



Fonte: Adaptado de CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016.

O peptídeo Jbtx Δ-β que exibe a deleção do motivo β apresentou todas as propriedades entomotóxicas semelhantes ao peptídeo inteiro, demonstrando que o motivo β não é um determinante dessas atividades biológicas. Em experimentos realizados por meio de injeção utilizando modelos de insetos como *O. fasciatus* e *R. prolixus*, apenas o peptídeo mutante que corresponde à metade N-terminal apresentou uma atividade entomotóxica, sendo os dois outros peptídeos incapazes de reproduzir a mesma atividade. A forma como o experimento é

conduzido e administrado, também pode interferir no mecanismo de ação desses compostos, uma vez que a Jbtx C-terminal e Jbtx N-terminal são ainda funcionais quando ingeridos pelos insetos. Estudos mostraram também que esses peptídeos causaram o bloqueio da junção neuromuscular em baratas da espécie *Phoetalia pallida*, além de inibirem a secreção em túbulos de Malpighi em *R. prolixus* (STANISÇUASKI *et al*., 2009; MARTINELLI *et al*., 2014). A região C-terminal do Jaburetox também pode contribuir para que ocorra a interação do peptídeo com membranas celulares, porém essa porção foi menos ativa ou inativa quando ensaiada em diferentes preparações de insetos. O motivo β-harpin não é um determinante essencial para as propriedades entomotóxicas do Jaburetox, embora provavelmente possa estar envolvido na interação com membranas de insetos. Contudo, esses dados inferem que a porção N-terminal do jaburetox é a responsável pela atividade entomotóxica mais importante (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016; MARTINELLI *et al*., 2014).

O Jaburetox demonstrou a capacidade de causar a diminuição da diurese em *R. prolixus* através de um mecanismo que envolve o GMP cíclico e o distúrbio do potencial de transmembrana dos túbulos de Malpighi (além da capacidade de atuar como permeabilizante de lipossomas unilamelares contendo carboxifluoresceína) (BARROS *et al*., 2009; STANISÇUASKI *et al*., 2009). Além disso, a neurotoxicidade do Jbtx sobre o sistema nervoso de insetos em estudos realizados com Triatomíneos demonstrou importantes sintomas neurotóxicos como paralisia transitória, movimentos não-coordenados dos membros e antenas procedido de morte, os quais ainda carecem de uma investigação aprofundada (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar, através de experimentos eletromiográficos e eletrofisiológicos, as alterações que regem o efeito neurotóxico induzido pelo Jbtx no sistema nervoso periférico e central dos insetos. Esse estudo se justifica não só no sentido do entendimento dos mecanismos tóxicos desse inseticida natural, mas também na investigação do seu potencial tóxico em diferentes modelos biológicos, garantindo a segurança da sua utilização em larga escala como biocida natural.

1.2 AVALIAÇÃO DE RISCO E TOXICIDADE DOS PRODUTOS QUÍMICOS

A pesquisa toxicológica envolvendo ensaios de toxicidade constitui o núcleo científico de uma importante atividade conhecida como avaliação de risco, fundamentalmente utilizada para a avaliação de possíveis impactos adversos à saúde de humanos e animais, decorrentes de exposições químicas (FAUSTMAN & OMENN, 2008). Em outras palavras, a avaliação de

risco pode ser definida como processo de estimar o potencial inerente a uma determinada substância química ou conjunto de substâncias em causar efeitos adversos a uma determinada população, sob condições específicas de exposição, o que possibilita o fornecimento de uma base racional para decisões e ações de saúde pública ou ambientais, destinadas a reduzir ou eliminar o risco em questão (PAUMGARTTEN, 1993).

O processo de avaliação de risco na toxicologia agrega várias áreas. Seus componentes são qualitativos e quantitativos, consistindo em quatro etapas gerais: identificação de perigos, avaliação da dose-resposta, avaliação da exposição e caracterização do risco (NRC 1983, 1994, 2007).

Etapa 1: Na **identificação de perigos** é primordial a identificação dos contaminantes suspeitos que possam representar riscos à saúde. Dessa forma, faz-se necessário a quantificação das concentrações presentes no ambiente, para que assim seja possível descrever as formas específicas de toxicidade (neurotoxicidade, carcinogenicidade, etc.), bem como avaliar as possíveis causas e condições sob as quais essas formas de toxicidade possam ser expressas em seres humanos expostos.

Etapa 2: Na **avaliação da dose-resposta** é necessária uma avaliação mais profunda das condições sob as quais as propriedades tóxicas de um produto químico podem se manifestar em pessoas e animais expostos, tendo como ênfase particular a relação quantitativa entre a dose e a resposta tóxica. O desenvolvimento dessa relação quase sempre envolve o uso de modelos matemáticos. Essa etapa pode incluir uma avaliação das variações na resposta. Como por exemplo, diferenças na suscetibilidade entre jovens e idosos.

Etapa 3: Na **avaliação da exposição** é necessário a especificação da população que pode estar exposta ao agente em questão, bem como a identificação das rotas pelas quais a exposição pode ocorrer para que se possa estimar a magnitude, a duração e o momento em que as pessoas poderão receber as doses como resultado de sua exposição.

Etapa 4: Na **caracterização do risco** ocorre a integração das informações das três primeiras etapas, para que assim seja possível desenvolver uma estimativa qualitativa ou quantitativa da probabilidade de que qualquer um dos riscos associados ao agente em questão ser detectável em pessoas expostas. Desse modo, após todo esse processo os resultados da avaliação de risco serão expressos. A caracterização do risco também deve incluir uma

discussão completa das incertezas associadas às estimativas de risco (NRC, 1994; FAUSTMAN & OMENN, 2008).

Dessa forma, avaliar a toxicidade dos produtos químicos, são utilizadas informações de quatro tipos de estudos: relações estrutura-atividade, estudos *in vitro* ou de curta duração, bioensaios *in vivo* com animais e informações de estudos epidemiológicos humanos. Em muitos casos, a informação de toxicidade de compostos é limitada.

Relações estrutura/ atividade: é um método utilizado para avaliação de misturas complexas. Baseia-se no estudo de um composto-protótipo e seus análogos, o que auxilia na compreensão da determinação de quais partes da molécula são responsáveis pela atividade biológica, ou seja, o grupo farmacóforo (THOMAS, 2000). Normalmente as relações estrutura/ atividade são organizadas com base na alteração em parte da estrutura química do protótipo, levando em conta a influência na atividade com enfoque qualitativo e quantitativo. Modelos computadorizados que utilizam o mapeamento farmacofórico com enfoque no desenho molecular e 3D, têm sido bem-sucedidos na busca para estabelecer as relações quantitativas (THOMAS, 2000; FAUSTMAN & OMENN, 2008).

Testes *in vitro* ou de curta duração: essa abordagem apresenta um enfoque no desenvolvimento de marcadores moleculares afim de se detectarem efeitos adversos em níveis de exposição mais baixos, podendo assim observar clinicamente os efeitos que causariam a resposta patológica. Podendo avaliar desde o desenvolvimento, reprodução, neurotoxicidade até mesmo a imunotoxicidade. Os testes *in vitro* ainda não conseguem acessar a complexidade fisiológica de um organismo vivo. Contudo, esses estudos têm sido aprimorados e futuramente poderão auxiliar na compreensão do mecanismo de ação tóxica de substâncias químicas, bem como na etiologia das doenças (JARDIM & CALDAS, 2009; FAUSTMAN & OMENN, 2008).

Bioensaios *in vivo* com animais: essa abordagem traz dados que são componentes essenciais para o processo de identificação do risco e ainda constituem uma das principais fontes de informação para identificar e caracterizar o dano aos seres humanos e ao meio ambiente. Após 1980, foram apresentados protocolos mais harmonizados como os da OECD[1] (*Organization for Economic Cooperation and Development*), com a finalidade de inseri-los

[1] É uma organização internacional que envolve 37 países que aceitam os princípios da democracia representativa e da economia de mercado, com vistas a fornecer dados em uma plataforma para comparar políticas econômicas, solucionar problemas comuns e coordenar políticas domésticas e internacionais. Os membros são compostos em maioria por economias com um elevado PIB (Produto Interno Bruto) e Índice de Desenvolvimento Humano (IDH).

como padrões em nível internacional (OECD, 1993; FAUSTMAN & OMENN, 2008). Desde então, esses protocolos têm sido constantemente reavaliados com o objetivo de diminuir o número de animais envolvidos em experimentos. Permitindo assim, o uso de modelos alternativos ao uso de vertebrados, o que garante uma maior humanização do processo de análise toxicológica, ao mesmo tempo em que busca a obtenção de um maior número de informações possíveis sobre a toxicidade do composto (JARDIM & CALDAS, 2009).

Segundo Jardim e Caldas (2009), o uso de novas tecnologias, como a genômica e a proteômica, além do uso de animais transgênicos, tem proporcionado o desenvolvimento de diversos estudos, principalmente para testes de carcinogenicidade de curta duração. Além disso, contribui para a importância de *endpoints*[2] que atualmente não totalmente acessados, como efeitos neuropsicológicos, à resposta imunológica e alterações endócrinas. Dessa forma, antes de qualquer estudo toxicológico com animais é necessário extrair o máximo em relação ao conhecimento existente sobre a natureza química da substância, o mecanismo de ação e toxicocinética, obtidos em estudos com SAR (Relação estrutura-atividade) e de testes *in vitro*.

Informações de estudos epidemiológicos humanos na avaliação de risco: essa abordagem apresenta um valor importante, uma vez que reduz a incerteza relacionada às descobertas em ensaios com animais. Esses dados são principalmente derivados de estudos com desenho experimental ou epidemiológico observacional, apresentando ferramentas disponíveis para o uso de indicadores biológicos representativos da exposição à substância de interesse (BUCHANAN *et al*., 2017). Os principais tipos de desenhos de estudos epidemiológicos disponíveis são: estudos transversais, estudos de coorte e estudos caso-controle. Os estudos transversais analisam e avaliam grupos de pessoas para identificar fatores de risco (exposição) e doenças, porém não são tão úteis no que se refere o estabelecimento de relação causa e efeito. Os estudos de corte avaliam indivíduos selecionados levando em conta a exposição a um agente em estudo. Já nos estudos caso-controle, o status da toxicidade é o principal fator nos indivíduos selecionados, pois levam em consideração os casos de indivíduos doentes e não-doentes. O avanço obtido com estudos do projeto genoma, proporcionou a sofisticação de biomarcadores moleculares e consequentemente a melhoria na compreensão do entendimento da plausibilidade biológica (FAUSTMAN & OMENN, 2008).

[2] Termo em inglês que significa pontos de extremidade, apresentando uma conotação de término ou conclusão.

1.3 EFEITOS TÓXICOS DE DOSES SUBLETAIS

Nas últimas décadas diversos métodos foram desenvolvidos para avaliar os efeitos colaterais tóxicos dos inseticidas nas avaliações de controle de insetos. Durante muito tempo, o método clássico de laboratório para estimar os efeitos colaterais de inseticidas em pragas de insetos, inimigos naturais e artrópodes benéficos foi determinar a dose letal (DL_{50}) ou a concentração letal (CL_{50}) (DESNEUX *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2015). A avaliação da dose e/ou concentrações letais é uma ferramenta muito útil para comparar as toxicidades de diferentes princípios ativos e diferentes formulações de inseticidas contendo o mesmo princípio ativo. As estimativas letais também podem ser uma informação importante ao avaliar o desenvolvimento de populações de pragas resistentes a inseticidas (FRANÇA *et al.*, 2017). Os efeitos subletais são definidos como efeitos (fisiológicos ou comportamentais) em indivíduos que sobrevivem à exposição a um inseticida (a dose pode ser subletal ou letal). Uma dose subletal é definida como induzindo nenhuma mortalidade aparente na população experimental (DESNEUX *et al.*, 2007).

Os principais inseticidas utilizados no manejo de pragas de lepidópteros são inibidores da biossíntese de quitina (Teflubenzuron); bloqueadores dos canais de sódio dependentes de voltagem (Indoxacarb); e os disruptores microbianos da membrana mesentérica (*Bacillus thuringiensis*) (RODRIGUES *et al.*, 2018). Efeitos subletais tem sido avaliado em diversas ordens de insetos, analisando diferentes aspectos biológicos, fisiológicos e comportamentais, como por exemplo, o efeito do extrato aquoso de *Trichilla spp*. em *Spodoptera frugiperda* sobre sobrevivência, desenvolvimento e peso de larvas e pupas (BORGONI & VENDRAMIM, 2005). As doses subletais de permetrina e fipronil apresentaram efeitos fisiológicos e comportamentais em *Aphis melífera* caracterizados por níveis menores de resposta sobre o aprendizado. Contudo, após a degradação do inseticida, as abelhas recuperaram a habilidade normal de aprendizado com o passar do tempo (EL HASSANI *et al.*, 2005). Todas as classes de inseticidas podem afetar a reprodução dos insetos através de efeitos adversos subletais em parâmetros fisiológicos, como: ovulação, a fertilização do óvulo, espermatogênese e motilidade espermática (LEE, 2000). Nos mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, a postura de ovos foi reduzida com doses subletais de dieldrin, d-fenotrina e d-Aletrina (LEE, 2000). Pesquisas com neonicotinóides (agonistas do receptor da acetilcolina) alteraram a transdução do sinal colinérgico neuronal e demonstram que o tiaclopride, o imidacloprido e a clotianidina também podem afetar o sistema imunológico e a viabilidade dos espermatozoides em abelhas (FISCHER *et al.*, 2014; DOUBLET *et al.*, 2015).

Múltiplos efeitos biológicos são descritos na literatura devido ao uso de doses subletais de inseticidas, por exemplo, os efeitos subletais dos inseticidas lufenuron, metoxifenozida e tebufenozida sobre *Anticarsia gemmatalis*, reduzindo o peso das pupas, a longevidade dos adultos e a fertilidade (SILVA *et al.*, 2003). Vários estudos também relatam os efeitos subletais de inseticidas de origem natural, como por exemplo, óleos essenciais (terpenos, fenólicos e alcalóides) e seus compostos sobre a biologia de insetos. O óleo essencial de cravo-da-índia demonstrou a atividade dessa substância em diversos parâmetros biológicos de *Spodopetra frugiperda* apresentando redução do tempo de sobrevivência, alterações no peso e tempo de larvas e pupas, além de causar a diminuição da longevidade, fecundidade e fertilidade (LIMA *et al.*, 2009; CRUZ *et al.*, 2016). Além disso, doses subletais de ciantraniliprole, um novo inseticida com foco nos receptores de rianodina, diminuíram a velocidade de crescimento e a reprodução populacional de *Agrotis ipsilon* (BANTZ *et al.*, 2018).

Uma das dificuldades quando se estuda os efeitos subletais de um inseticida pode ser a exposição aguda a altas concentrações de um produto químico que pode resultar na seleção de insetos menos sensíveis a ação do inseticida testado. Dessa forma, os insetos resistentes podem fornecer respostas que não são representativas da população em geral. Por esta razão, deve-se ter muito cuidado quando o assunto são os efeitos subletais dos inseticidas, uma vez que erros na avaliação da escolha das doses (subletais e letais) ensaiadas podem fornecer resultados enganosos (DESNEUX *et al.*, 2007). Além disso, um dos problemas enfrentados em relação a exposição de uma dose subletal de inseticidas é a indução de produção de enzimas que desintoxicam os inseticidas, fazendo com que seus efeitos possam participar no desenvolvimento de tolerância a inseticidas ou resistência em insetos-praga. Existem vários mecanismos de desintoxicação em insetos, como as monooxigenases do citocromo P450 (CYP), glutationa S-transferase (GST) e esterases (ZHAO *et al.*, 2018). Um exemplo, foi o aumento da fecundidade do mosquito *Bradysia odoriphaga*, induzido por uma dose subletal de clorfenapir, tendo tal efeito correlacionado com o aumento da atividade da GST (BANTZ *et al.*, 2018).

O estudo dos efeitos subletais de inseticidas sobre insetos é de grande importância quando se tem acesso ao efeito total de um agente tóxico. Contudo, os testes de mortalidade ainda são considerados a melhor escolha entre vários inseticidas em um contexto de manejo integrado de pragas, principalmente quando o assunto são os efeitos subletais de inseticidas em relação a inimigos naturais (DESNEUX *et al.*, 2007; BANTZ *et al.*, 2018). Nesse contexto, a avaliação dos efeitos subletais em inimigos naturais permitirá o desenvolvimento de programas

integrados no controle de pragas, com uso mais seguro e eficaz de controle químico e biológico (FRANÇA *et al*., 2017). Quando se estuda compostos potenciais inseticidas deve ser levado em conta o risco, pois é crucial estabelecer uma conexão entre a toxicidade de um determinado produto em ensaios laboratoriais e o risco associado à exposição em condições de campo (incluindo efeitos letais e subletais) (DESNEUX *et al*., 2007).

O uso de insetos em bioensaios para avaliar os efeitos subletais de um inseticida ou potencial agente inseticida sobre insetos benéficos podem ajudar na análise da avaliação do risco de um composto xenobiótico de forma mais completa, incluindo a avaliação dos efeitos desses componentes em processos comportamentais e fisiológicos, ao invés de apenas considerar a mortalidade como um ponto final (STÜRMER *et al*., 2014). Embora esses ensaios sejam mais trabalhosos em relação a estimativas de concentração letal, os dados obtidos auxiliarão os pesquisadores a avaliar os impactos não-objetivos dos inseticidas e assim promover a descoberta de efeitos colaterais ecológicos cruciais antes do registro de inseticidas no mercado (DESNEUX *et al*., 2007).

1.4 INSETOS COMO MODELO EXPERIMENTAL ALTERNATIVO PARA O ESTUDO DE TOXICIDADE

Nos últimos anos, o uso de métodos alternativos na experimentação animal tem chamado atenção da comunidade cientifica. Esse interesse surgiu em grande parte devido à preocupação com o bem-estar animal e os custos crescentes com os cuidados e a aquisição dos modelos animais tradicionais (GAD, 2016). Sabe-se que dados experimentais obtidos a partir de estudos toxicológicos com animais são muito importantes, principalmente em relação à compreensão dos efeitos adversos, nos quadros de manifestação da exposição à uma certa substância química, seja ela um medicamento, um inseticida, ou outros compostos (DOKE & DHAWALE, 2015).

O uso de animais em pesquisas cientificas, principalmente mamíferos tem gerado discussões consideráveis, principalmente no que diz respeito ao caráter ético, devido o emprego de grande número de animais e do sofrimento causado durante alguns tipos de procedimentos (LIGUORE *et al*., 2017). Com isso, a reavaliação da utilização dos modelos animais tradicionais em ensaios experimentais na área de biomedicina tem se tornado uma tendência mundial. Diversas instituições objetivam desenvolver e validar novos métodos de

implementação regulatória de testes alternativos em diversos países, a fim de legalizar e harmonizar o uso dos mesmos (GAD, 2016).

Segundo Morales (2008), o termo "modelos experimentais alternativos" quanto a utilização de animais em pesquisa cientifica tem causado certa confusão, uma vez que passa a ideia de que a ciência deixará de utilizar animais ou substituí-los em grande parte dos experimentos, por outros métodos. Ainda são poucos os casos onde simulações computacionais, experimentos *in vitro* e outros métodos são capazes de substituir completamente o uso de animais. A comunidade científica mundial tem trabalhado de modo a diminuir o uso de animais para um número mínimo possível. Contudo, o conceito de "métodos alternativos" deveria ser compreendido em um contexto mais amplo considerando por exemplo a substituição de mamíferos por outras espécies (invertebrados, anfíbios, répteis, bactérias, leveduras, vírus, etc).

Entre os invertebrados, os insetos são os representantes mais significativos, cujo número de pesquisas realizadas a partir do uso de diferentes espécies tem contribuído substancialmente para a compreensão dos diversos mecanismos biológicos existentes em quase todos os seres vivos. Os estudos com invertebrados trouxeram importantes achados, como por exemplo, no caso de pesquisas realizadas em axônios gigantes de lulas que forneceram as bases do conceito da participação de íons durante o potencial de ação na transmissão dos impulsos elétricos nervosos (HODGKIN & HUXLEY, 1952; HIRSCH, 1965). Outro exemplo de pesquisa realizada com invertebrados, porém nesse caso com insetos, diz respeito a pigmentação dos olhos da *Drosophila meloganaster* (mosca da banana), que forneceu à hipótese de que cada gene controla uma única enzima, importante marco fundamental e conceitual da biologia molecular (HODGKIN & HUXLEY, 1952; EPHRUSSI, 1942; MORALES, 2008; PARAMASIVAM & SELVI, 2017).

O sistema nervoso de insetos serve também como um alvo principal para estudos no controle convencional de insetos, que atualmente depende de produtos químicos extremamente tóxicos e que são divididos em quatro grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (ANVISA, 2008). Um dos principais problemas enfrentados atualmente no uso de inseticidas, é o seu emprego em quantidades acima do desejável, propiciando aos insetos resistência a estes compostos. Além disso, a poluição do meio ambiente, causada pelo uso indiscriminado de produtos químicos e a baixa seletividade, acaba prejudicando a diversidade ecológica, levando à morte de inúmeros animais/ insetos que são susceptíveis a esses tóxicos assim como os insetos-praga. O grande desafio da indústria química moderna é desenvolver

novas alternativas mais seguras no controle de pragas, como compostos mais seletivos e com menor impacto ao meio ambiente. Nesse sentido, o uso de peptídeos e toxinas de origem natural como moléculas protótipo, associado ao emprego de modelos biológicos adequados, como o modelo alternativo de insetos, tem aumentado as chances de descoberta de novos compostos químicos seletivos para o sistema nervoso dos insetos-praga (MANZOLI-PALMA *et al*., 2003; SANTOS *et al*., 2014; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

Além disso, insetos como libélulas, borboletas e gafanhotos são ecologicamente bons indicadores, pois são altamente sensíveis a mudanças ambientais. Por exemplo, a presença da libélula em qualquer massa de água, confirma um ambiente aquático livre de contaminação (MONDAL *et al*., 2015). A importância da presença dos insetos nos ambientes aquáticos está sendo reconhecida como um importante marcador de controle ambiental, uma vez que se tornam uma ferramenta extremamente útil para testar paradigmas ecológicos (BATZER & WISSINGER, 1996; GIRGIN *et al*., 2010; RODRIGUEZ *et al*., 2012).

1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ESPÉCIES ESTUDADAS E A NEUROFISIOLOGIA DE INSETOS

1.5.1 *Locusta migratória* (Linneaus, 1758)

Os gafanhotos migratórios (Ordem: Orthoptera, Família: Acrididae), como são conhecidos, é a única espécie do gênero Locusta e apresentam uma distribuição geográfica que compreende desde a África, Ásia, Austrália, Nova Zelândia até Europa (em casos mais raros). O comprimento do corpo varia em média de 3,5 a 5 cm para machos e de 4,5 a 5,5 cm para fêmeas. A coloração do corpo pode variar entre verde, marrom, verde amarelado ou cinza. O comprimento do fêmur posterior é característico nessa espécie, apresentando de 2,2 a 2,6 cm (machos) e 2 a 3,2 cm (fêmeas). Os gafanhotos dessa espécie geralmente se reproduzem apenas uma vez por ano, podendo variar em zonas tropicais sob condições altamente adequadas. A oviposição ocorre entre os meses de agosto-setembro e os ovos durante o inverno. As fêmeas ovopositam de 1 a 3 ootecas, com uma média de 60-80 ovos cada. Solos arenosos e leves são favoráveis para a postura de ovos. A eclosão dos ovos normalmente ocorre entre o início de maio e início de junho. Existem 5 instares de desenvolvimento que dura em torno de 35-40 dias (7-8 dias para cada instar). Os primeiros indivíduos adultos surgem entre os meses de junho a início de julho, permanecendo às vezes até novembro em regiões mais quentes. Gafanhotos

migratórios são herbívoros e se alimentam principalmente de grama e pastos. A dinâmica populacional está intimamente ligada a mudanças no balanço hídrico em áreas de reprodução, alternância de inundações sazonais e períodos de seca em canaviais, causando redução ou disseminação de locais de abastecimento de alimentos e de oviposição (FAO, 2019).

Os gafanhotos da espécie *Locusta migratoria* representam uma das mais visíveis pragas de insetos de todos os tempos, sendo abundantes em pastagens secas e deserto. As populações desses insetos podem exibir comportamento migratório, levando à formação de espetaculares enxames que conseguem voar centenas de quilômetros por dia, e até mesmo atravessar oceanos (ABDELLAOUI *et al*., 2013; WANG *et al*., 2014). *L. migratoria* é uma das espécies mais difundidas de gafanhotos e durante muito tempo serviu como organismo modelo para estudos de morfologia, comportamento e pesquisa fisiológica de insetos (WANG *et al*., 2014). A sequência do genoma de *L. migratoria* ofereceu novos *insights*[3] sobre a biologia e o manejo sustentável dessas espécies de insetos consideradas pragas, promovendo-a como animal modelo para estudos comportamentais e fisiológicos (WANG *et al*., 2014). Estudos recentes com transcriptoma de *L. migratoria*, mais especificamente a superfamília de genes LmCYPs forneceram a base para a compreensão das funções fisiológicas, diversidade funcional, evolução e mecanismos reguladores que controlam a expressão da superfamília do gene CYP nos gafanhotos dessa espécie. CYPs de insetos desempenham papéis-chave na biotransformação de inseticidas e produtos químicos de plantas, nos quais estão implicados na resistência a inseticidas e na adaptação de insetos (ZHANG *et al*., 2018).

[3] Termo em inglês que significa, clareza, discernimento, etc. Apresenta conotação de compreensão ou solução de algo.

Figura 8. Imagem representativa de *Locusta migratoria*.

Fonte: Wageningen Academic Publishers ©

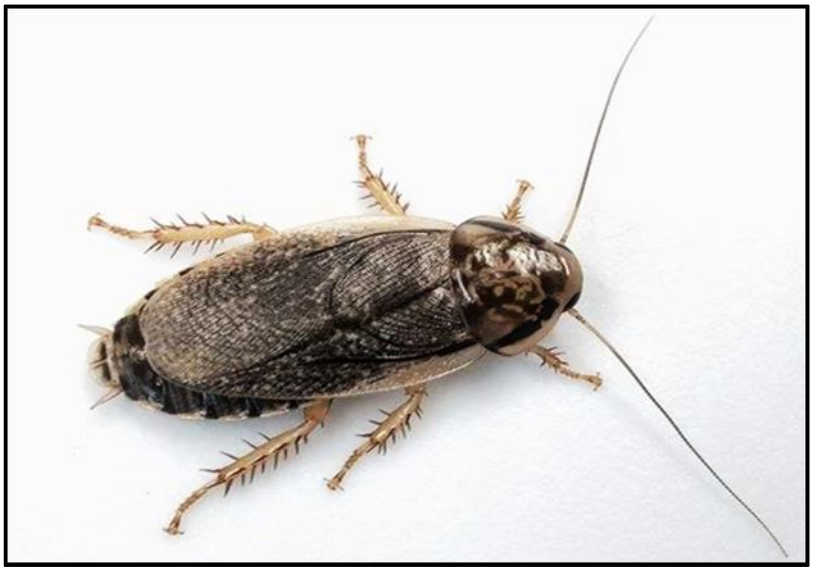
1.5.2 *Nauphoeta cinerea* (Olivier, 1789)

Barata salpicada ou Barata lagosta (Ordem: Blattodea, Família: Blaberidae) como popularmente é conhecida são originarias da África apresentando ampla distribuição geográfica devido sua fácil associação com seres humanos. Os indivíduos adultos apresentam uma coloração que varia do cinza matizado ao marrom claro, medindo em média de 2,5 a 2,9 cm de comprimento, apresentando um peso corporal entre 0,5 ± 0,03g (SANTOS *et al*., 2016). O pronoto (segmento torácico) apresenta um desenho característico. As asas são manchadas e não cobrem o abdômen. Vivem aproximadamente 1 ano e realizam 8 ecdises em média nesse período, estando aptas para reprodução em torno de 150 dias. Apresentam metamorfose incompleta, passando pelos estágios de ovo, ninfa e adulto, com a ausência do estágio imóvel (pupa). São onívoras e aceitam tanto alimento animal quanto o vegetal, embora deem preferência aos vegetais. São ovovivíparas na qual algumas fêmeas são capazes de mudar de um modo de reprodução sexual para um modo assexual quando isoladas dos machos. A partenogênese facultativa pode ocorrer em algumas fêmeas. Dessa forma, essa barata é um importante modelo no que tange as restrições ao desenvolvimento na manutenção do sexo (CORLEY *et al*., 1999). A ooteca tem cerca de 1,5 a 1,8 cm de comprimento apresentando coloração marrom clara ou branca, com marcações mostrando a posição dos ovos. Cada capsula de ooteca apresenta entre 26 a 40 ovos e é incubada por 36 dias até a eclosão, onde são

diferenciados pela presença ou não de estilos na placa subgenital. O dimorfismo sexual é característico, no qual machos apresentam estilos e as fêmeas não. É muito comum as fêmeas terem o abdômen mais desenvolvido e arredondado que os machos. Os filhotes quando nascem apresentam uma coloração esbranquiçada, que escurece adquirindo uma tonalidade marrom escura após 24 horas. Os filhotes ficam debaixo do abdômen da fêmea por algumas horas após o nascimento (NUTRINSECTA, 2019).

As baratas são um dos mais antigos e primitivos insetos alados, que existiram com sucesso e permaneceram praticamente inalterados na morfologia do corpo por aproximadamente 350 milhões de anos, desde o Carbonífero até o presente. Existem cerca de 3.500 espécies conhecidas de baratas em todo o mundo, apenas trinta são consideradas pragas domésticas (APPEL, 1995; ZHOU *et al*., 2014). Dentre as espécies, temos *Nauphoeta cinerea* que se apresentam como um modelo alternativo potencial em substituição aos ensaios com mamíferos quando se precisa avaliar a toxicidade e os efeitos farmacológicos de xenobióticos e de toxinas naturais (ADERARA *et al*., 2015; CARRAZONI *et al*., 2016; SANTOS *et al*., 2016). As baratas dessa espécie se reproduzem facilmente em cativeiro e é frequentemente usada como alimento na manutenção de outros invertebrados objetos de estudos toxinológicos, como por exemplo, escorpiões (SANTOS *et al*., 2016). As baratas são amplamente reconhecidas como um modelo significativo e extremamente útil em estudos neurobiológicos, uma vez que vários métodos eletrofisiológicos, moleculares e bioquímicos usando preparações de baratas tem contribuído para o desenvolvimento da toxinologia e da toxicologia (STANKIEWICZ *et al*., 2012; RODRIGUES *et al*., 2013; STÜRMER *et al*., 2014). Os princípios biofísicos de seu sistema nervoso, além de seus neurotransmissores são praticamente os mesmos aos de vertebrados, embora a distribuição varie (STANKIEWICZ *et al*., 2012). Além da similaridade biofísica nas funções do sistema nervoso entre insetos e mamíferos, as baratas representam ainda um modelo satisfatório devido ao seu tamanho, facilidade de manutenção e modelo animal altamente fértil (ADERARA *et al*., 2015).

Figura 9. Imagem representativa de *Nauphoeta cinerea*.



Fonte: Do autor

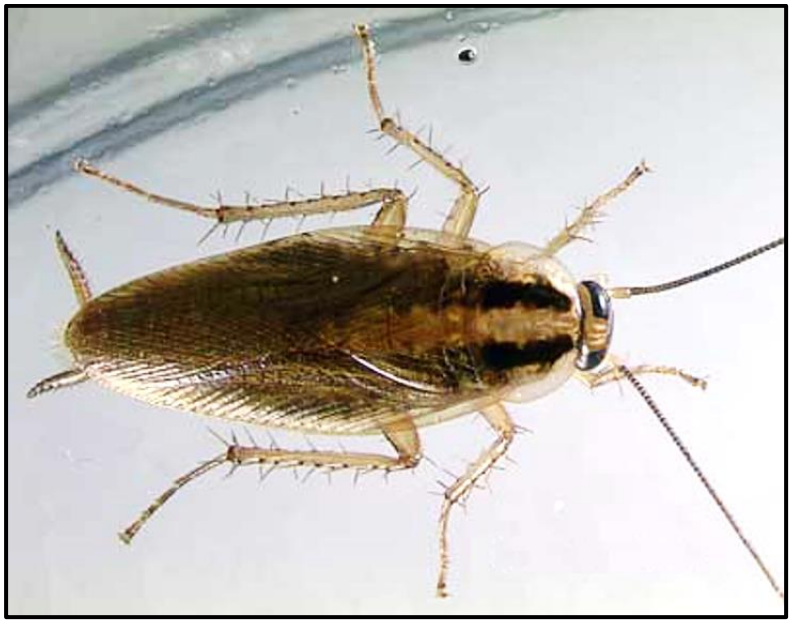
1.5.3 *Blatella germanica* (Linneaus, 1767)

Barata-germânica ou baratinha (Ordem: Blattodea, Família: Blattellidae) como é popularmente conhecida são originarias da Ásia e medem de 1 a 1,5 cm de comprimento. A coloração do corpo varia do castanho a castanho escuro, com duas bandas paralelas distintas ao longo do pronoto. Os machos são mais delgados e com abdômen posterior cônico, enquanto as fêmeas são mais robustas e com abdômen posterior arredondado. A barata germânica tem três estágios de vida típicos de insetos com metamorfose incompleta: o ovo, a ninfa e o adulto. Todo o ciclo de vida é concluído em cerca de 100 dias. No entanto, fatores como temperatura e estado nutricional podem influenciar o tempo necessário para completar o ciclo de vida. As baratas dessa espécie se reproduzem continuamente com muitas gerações e em condições ideais, o crescimento populacional tem se mostrado exponencial. A *Blatella germanica* é onívora, ou seja, com capacidade para metabolização de diferentes classes alimentícias, tendo assim uma dieta alimentar menos restrita. Uma ooteca típica contém de 30 a 40 ovos. A ooteca nessa espécie de baratas é uma pequena cápsula marrom em forma de bolsa apresentando cerca de 8 mm de comprimento, 3 mm de altura e 2 mm de largura (VALLES, 2008).

A *B. germanica* é uma das pragas de insetos mais importantes relacionadas à saúde pública, podendo transmitir vários vírus patogênicos, fungos, helmintos e bactérias (ZHOU *et*

al., 2014). Essa espécie se tornou um importante modelo para estudos científicos sobre reprodução, metamorfose, neurofisiologia, ecologia comportamental e química, biologia alergênica, metabolismo nutricional e resistência a inseticidas (APPEL, 1995; NIU *et al*., 2016). Estudos com o transcriptoma de *B. germanica* forneceu recursos de dados genéticos útil para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionado a imunidade das baratas, resistência a inseticidas, quimiorrecepção e regulação gênica (ZHOU *et al*., 2014; NIU *et al*., 2016). Sabe-se que inseticidas piretróides alteram o controle normal dos canais de sódio dependentes de voltagem no sistema nervoso. Mutações nos canais de sódio foram identificadas em populações de *B. germanica* resistentes a piretróides. Essas mutações no gene do canal de sódio de *B. germanica* demonstrou a redução da sensibilidade dos canais expressos à deltametrina, mostrando que a mutação diminuiu a sensibilidade do canal de sódio a deltametrina em cinco vezes utilizando oócitos de Xenopus (TAN *et al*., 2002). Além disso, essa espécie tem sido um importante modelo para avaliação farmacológica e toxicológica na descoberta de toxinas naturais seletivas para insetos, como por exemplo, no caso toxina escorpiônica BjαIT (ARNON *et al*., 2005).

Figura 10. Imagem representativa de *Blatella germanica*.

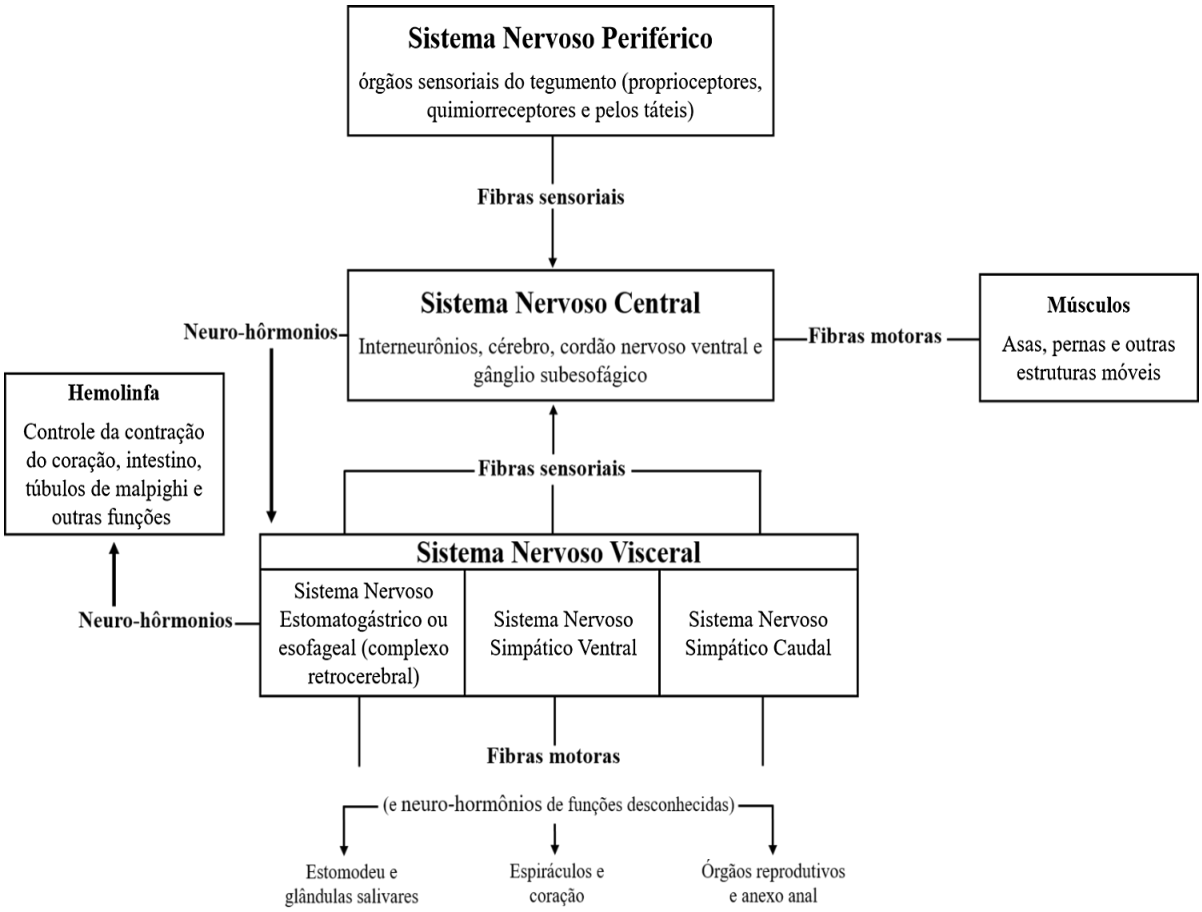


Fonte: P.G. Koehler, Universidade da Florida.

1.5.4 Neurofisiologia de insetos

O sistema nervoso de insetos é formado pelo sistema nervoso central (SNC), apresentando gânglios segmentares pareados, organizado em forma de um cordão nervoso ventral e pelo sistema nervoso periférico (SNP), que inclui o sistema digestivo do animal (Figura 11). Os gânglios do SNC são fusionados formando uma massa ganglionar supraesofágica ou cérebro como também é conhecido. O cérebro de insetos é composto por três estruturas: protocérebro e deuterocérebro, ambos evolvidos nos centros de processamento de informações sensoriais dos olhos e antenas, enquanto o tritocérebro, está ligado ao sistema digestivo e no controle dos músculos do intestino (OSBORNE, 1996; NATION, 2016; SMARANDACHE-WELLMANN, 2016).

Figura 11. Modelo de inter-relação do sistema nervoso de insetos.

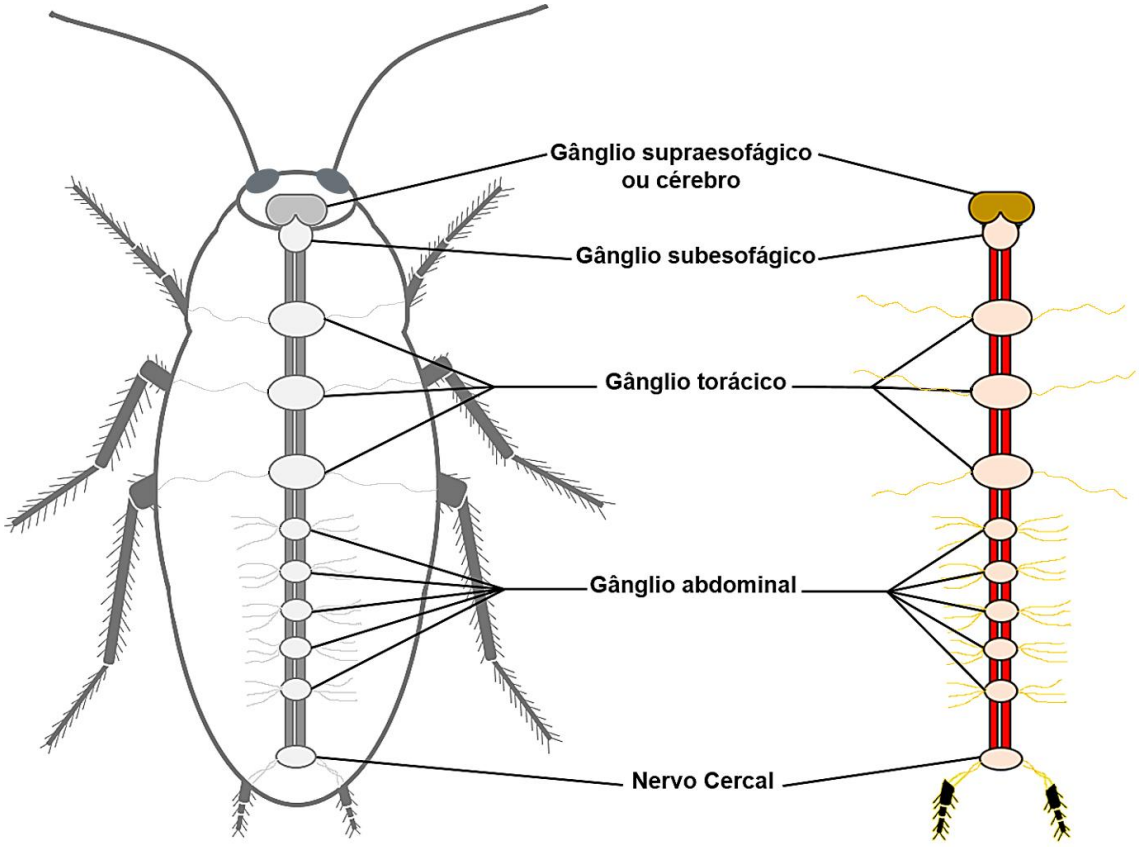


Fonte: Adaptado de ROMOSER & STOFFOLANO, 1998.

Os axônios dos neurônios do gânglio subesofágico são projetados ao cérebro e posteriormente para os gânglios torácicos, apresentando uma influência direta sobre os padrões

motores dos insetos (Figura 12). Os gânglios torácicos são divididos em: protorácico, mesotorácico e metatorácico. Cada gânglio torácico envia axônios motores para os músculos da perna de seu segmento e recebe os axônios sensoriais dos receptores sensoriais de articulações do tarso e da perna (NATION, 2016; SMARANDACHE-WELLMANN, 2016).

Figura 12. Organização do Sistema Nervoso Central (SNC) em insetos. Os gânglios da cabeça são fusionados formando o gânglio supraesofágico ou cérebro. Os demais gânglios são pareados em um cordão nervoso ventral ligados por conectivos de axônios.



Fonte: Do autor

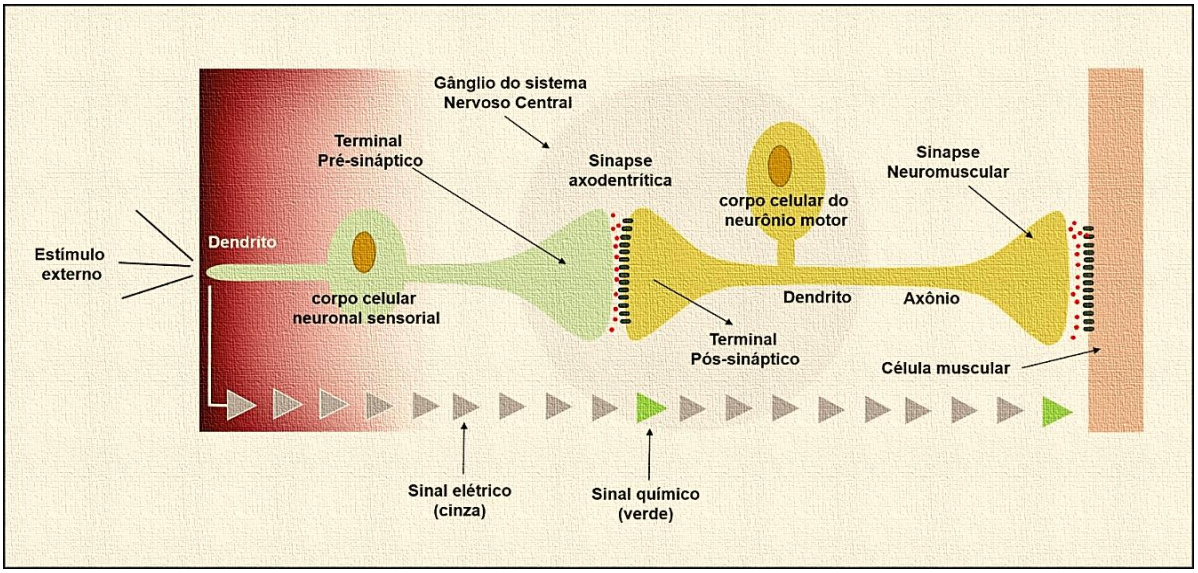
O cérebro, o cordão nervoso ventral, os gânglios e nervos ventrais são protegidos do contato direto com a hemolinfa por uma barreira seletivamente permeável, a barreira hematoencefálica. A barreira hematoencefálica evoluiu nos insetos de modo a preservar as células neuronais altamente excitáveis, garantindo assim a geração e propagação do potencial de ação (BANERJEE & BHAT, 2007, NATION, 2016).

A maioria dos inseticidas altamente eficazes atuam sobre o sistema nervoso dos insetos, sistema responsável pelo controle do corpo e dos músculos e consequentemente o

comportamento do animal. A neurotransmissão é um processo caracterizado pela regulação de inúmeras moléculas ativas que são liberadas devido a resposta a estímulos específicos de diferentes tipos de células neuronais ou afins. A base da neurotransmissão é a exocitose controlada, que proporciona de forma precisa a secreção de neurotransmissores a partir de neurônios pré-sinápticos e consequentemente a liberação de neurotransmissores rápidos, como os de acetilcolina liberadas a partir de sinapses centrais e periféricas. Além da secreção de polipeptídios lentos de ação de neurônios centrais e periféricos e células neuroendócrinas (LANGLEY& GRANT, 1997; SANTOS, 2014).

Por outro lado, podemos compreender os componentes essenciais envolvidos no modo de ação de um composto inseticida, através do arco reflexo monossináptico que ilustra quando um neurônio sensorial recebe um estímulo externo (Figura 13). Tudo começa com um estímulo elétrico gerado, que por sua vez se desloca para baixo do dendrito ou ao lado de entrada da célula, passando pelo corpo celular do neurônio sensorial e depois ao longo do axônio até o seu término na sinapse. Na sinapse, o sinal elétrico é convertido em um sinal químico que é transmitido através do espaço sináptico para a célula pós-sináptica. Dessa forma, o neurotransmissor é emitido a partir do terminal pré-sináptico para ativar os receptores na célula pós-sináptica, através de um neurônio motor. O sinal no neurônio motor viaja para a sinapse neuromuscular, onde desencadeia a liberação de um neurotransmissor químico, que ativa a contração do músculo (HESS & BÜSCHGES, 1997; BASF, 2013).

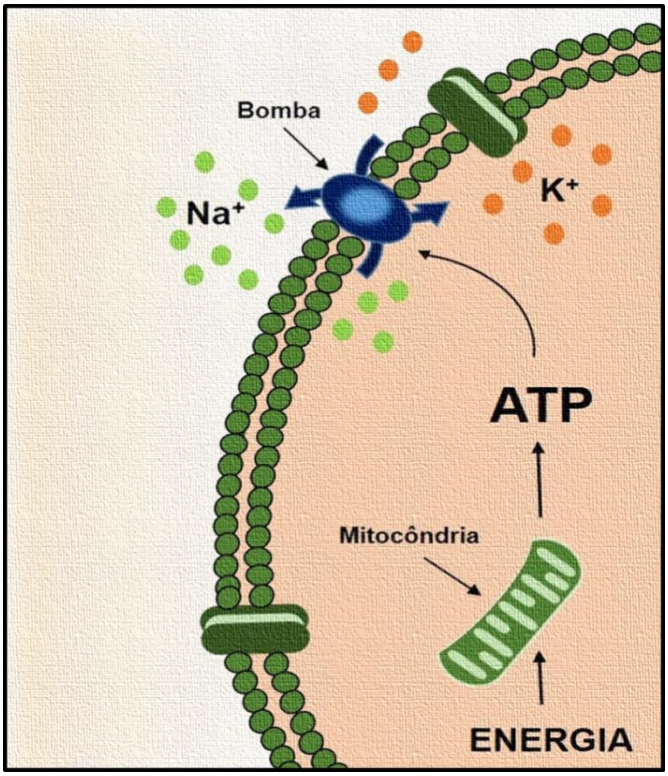
Figura 13. Arco reflexo monossináptico de um inseto.



Fonte: Adaptado de BASF, 2013.

A excitabilidade elétrica é uma propriedade essencial e característica dos neurônios, a qual é responsável pela manutenção dos gradientes iônicos através da membrana plasmática. Por esta razão, o meio intracelular apresenta uma alta concentração de íons de potássio em relação ao meio extracelular, o qual apresenta uma baixa concentração de íons sódio e cálcio. As terminações nervosas e musculares se tornam excitáveis em função dos canais iônicos (seletivos para Na^+, K^+ ou Ca^{2+}) sensíveis à voltagem na membrana superficial. A diferença de voltagem da membrana faz com que esses canais se abram ou fechem em função dos gradientes de concentração (Figura 14). Com isso, ocorre a despolarização ou hiperpolarização da membrana, onde os canais para sódio, potássio e cálcio são responsáveis pela geração e condução do potencial de ação através da membrana (MARCUSSI *et al.*, 2011; SANTOS, 2014).

Figura 14. Excitabilidade elétrica da membrana plasmática.



Fonte: Adaptado de RANG & DALE, 2011.

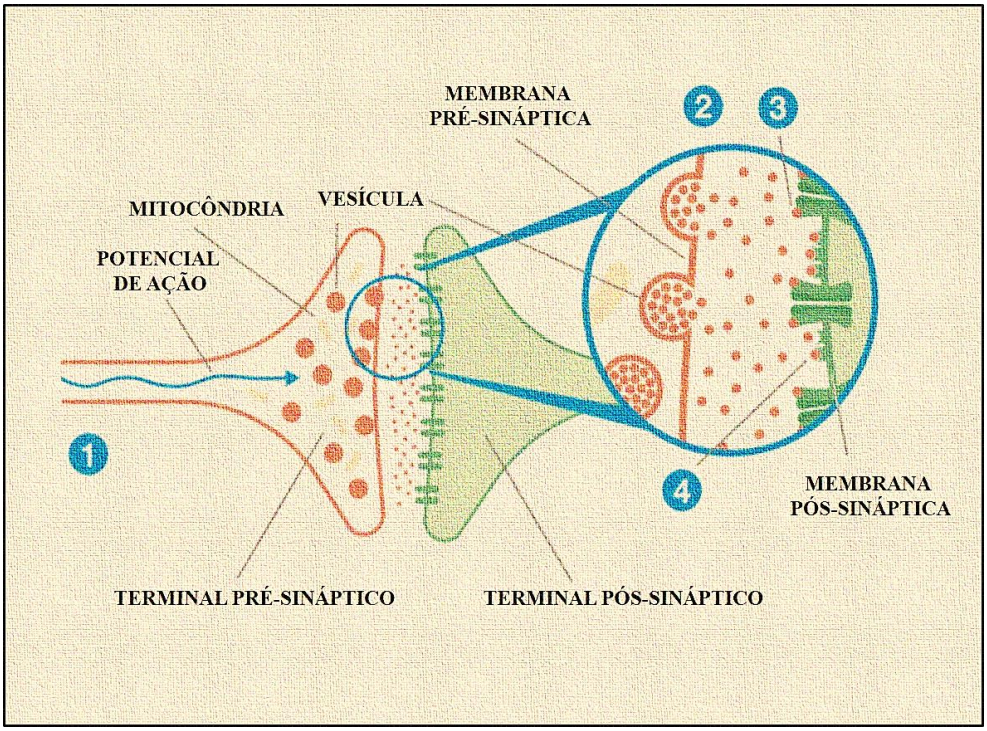
Segundo Santos (2014) a condução dos potenciais de ação ocorre através do axônio até o terminal nervoso ocasionando a despolarização da terminação pré-sináptica e

consequentemente causando a abertura transitória de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem. A concentração de Ca^{2+} no fluido intersticial da terminação do axônio causa o aumento da concentração interna de Ca^{2+}, gerando a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática e a consequente liberação de neurotransmissor na fenda sináptica por exocitose. Dessa forma, o neurotransmissor se difunde pela fenda sináptica onde se liga aos receptores específicos na superfície externa do neurônio seguinte ou de células efetoras tais como as de músculo esquelético.

Os receptores de rianodina tem sido alvo de estudos para novos inseticidas há décadas e recebeu o nome de inseticida natural derivado de estudos com plantas (alcalóides), a Rianodina. Por esta razão se tornou uma ferramenta única na caracterização desses receptores devido à sua alta especificidade de ligação e afinidade por insetos (NAUEN, 2006). Os receptores de rianodina são uma classe distinta de canais de cálcio dependentes de ligantes, na qual controlam a liberação de cálcio de reservas intracelulares. Estes receptores estão localizados no retículo sarcoplasmático do músculo e no retículo endoplasmático de neurônios e em muitos outros tipos de células (SATTELLE *et al*., 2008). Com isso, duas classes de produtos químicos sintéticos deram origem a inseticidas comerciais que visam os receptores de rianodina de insetos. A classe de diamida do ácido ftálico produziu a flubendiamida, o primeiro inseticida sintético do receptor de rianodina a ser comercializado. Logo em seguida, ocorreu a descoberta das diamidas antranílicas, produzindo inseticidas Rynaxypyr® e Cyazypyr™ (NAUEN, 2006; SATTELLE *et al*., 2008).

O sistema neuromuscular dos insetos apresenta inúmeros neurotransmissores conhecidos. A acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central do inseto (SNC), cujas sinapses colinérgicas são responsáveis por transmitir um sinal excitatório de uma célula pré-sináptica para a célula pós-sináptica. As sinapses colinérgicas são extremamente importantes em termos de ação inseticida, como também as sinapses de GABA, glutamato e octopamina (RATTAN, 2010) (Figura 15).

Figura 15. Neurotransmissão em sinapse colinérgica. 1) Um sinal nervoso (ação potencial) flui para baixo axônio do nervo e atinge o terminal pré-sináptico. 2) Uma vez estimulado pelo sinal do nervo, as vesículas sinápticas se fundem com a pré-sináptica da membrana e liberam as moléculas de neurotransmissores. 3) Os neurotransmissores se ligam e ativam os receptores na membrana pós-sináptica e um novo impulso é gerado. 4) Para encerrar o sinal, a acetilcolinesterase degrada o neurotransmissor.



Fonte: Adaptado de BASF, 2013.

O Glutamato (GLU) é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de insetos. Numerosos estudos foram realizados ao longo dos anos com o objetivo de avaliar a evidência do glutamato como um neurotransmissor na junção neuromuscular de insetos. Esse objetivo só foi alcançado em pesquisas que demostraram sua ação como receptor neuromuscular, liberado nos terminais nervosos, tendo uma relação farmacológica pré-sináptica semelhante com o neurotransmissor de acetilcolina na junção neuromuscular de mamíferos (FONNUN, 1984). Por essa razão, diversas pesquisas envolvendo o sistema nervoso de insetos, como por exemplo, estudos com junção neuromuscular, têm sido objeto para a compreensão da funcionalidade dos receptores e canais iônicos, bem como na modulação das respostas contrácteis dos músculos básicos ativados (SANTOS, 2014; SANTOS *et al*., 2016).

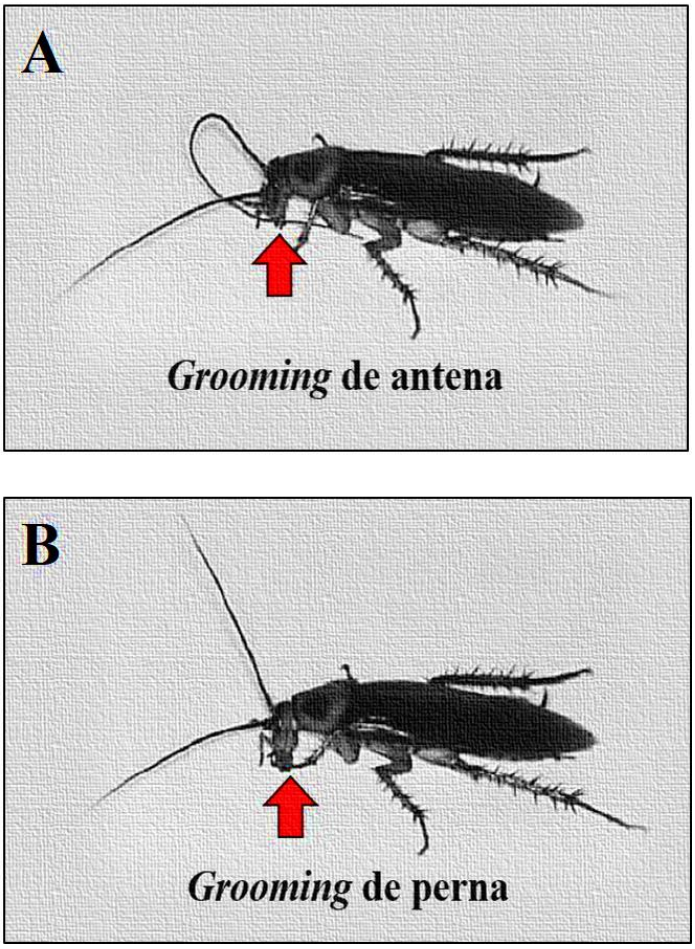
O GABA (ácido γ-aminobutírico) é um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, que se liga a receptores específicos atuando como inibidor

neurossináptico (DELOREY *et al*., 1993). O GABA atua ativando os receptores que bloqueiam os canais de cloro, e o influxo de íons cloreto carregados negativamente tem um efeito inibitório sobre a célula pós-sináptica, o que acaba neutralizando o efeito da entrada excitatória (BUCKINGHAM *et al*., 2005). Pesquisas realizadas com o neurotransmissor GABA em motoneurônio coxal de baratas, com objetivo de demonstrar efeitos inibitórios, confirmaram esse efeito no qual o mesmo é ativado por canais de cloreto em nível pré ou pós-sináptico (OSBORNE, 1996; MOORE *et al*., 2006). Dessa forma, o uso de preparações sinápticas em modelos de insetos é uma excelente opção de modelo experimental para o auxílio da compreensão farmacológica e toxicológica de compostos xenobióticos (O'SHEA *et al*. 1985; RODRIGUEZ *et al*, 2012; SANTOS *et al*., 2016).

Diversos estudos ao longo dos anos demonstram que a acetilcolina, a dopamina, a octopamina (OA), a serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) e a histamina (HA) são os principais neurotransmissores do sistema nervoso ganglionar e central dos insetos. A dopamina (DA) e seus receptores são extensivamente distribuídos e encontrados em altas concentrações em todo o sistema nervoso de insetos (OSBORNE, 1996; HAMANAKA *et al*., 2016). Neurônios do tipo imunorreativos ao sistema dopaminérgico foram identificados nos cérebros de diversas espécies de insetos como por exemplo: *Locusta migratoria* (VIELLEMARINGE *et al*., 1984), em *Schistocerca gregaria* (WENDT& HOMBERG, 1992), em *Drosophila melanogaster* (BUDNIK& WHITE, 1988), e na abelha *Apis mellifera* (SCHAFER& REHDER, 1989). A dopamina é um importante neuromodulador responsável pela atividade locomotora em insetos (KUME *et al*., 2005). Dessa forma, a DA pode atuar em diversos locais influenciando diretamente o comportamento locomotor, como por exemplo a junção neuromuscular, além dos níveis gerais de excitação, afetando assim a informação sensorial na periferia, bem como a regulação dos geradores de padrão central e/ou processamento de ordem superior de informação no cérebro (MUSTARD *et al*., 2010). O *grooming* em insetos tem como principal função a limpeza da superfície exterior do corpo, podendo apresentar outras funções como: comportamento de corte, sinalização social, atividade de deslocamento e de excitação (SPRUIJT *et al*., 1992; STÜRMER *et* al., 2014) (Figura 16). Estudos comportamentais com baratas mostraram que a atividade de *grooming* está relacionada com a estimulação dos receptores de DA e OA sobre o SNC de insetos (GAL & LIBERSAT, 2008; STÜRMER *et al*., 2014). Dessa forma, alguns estudos mostram que atividade de *grooming* de pernas em insetos seria modulada principalmente pelo neurotransmissor OA (WEISEL-EICHLER *et al*., 1999; GAL & LIBERSAT, 2008; CARRAZONI *et al*., 2016). Enquanto que atividade de *grooming*

de antenas seria coordenada principalmente pelo neurotransmissor de DA (STÜRMER *et al.*, 2014).

Figura 16. Comportamento de *grooming* em baratas. (A) comportamento de *grooming* em antena e (B) comportamento de *grooming* em perna.

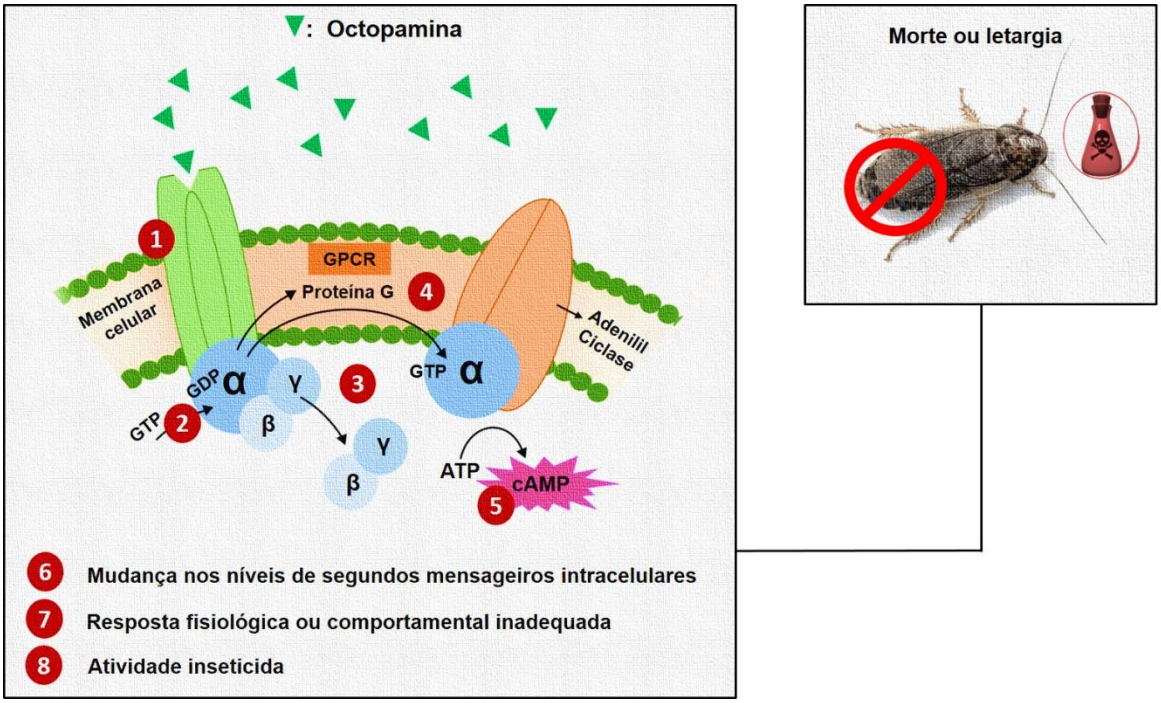


Fonte: Adaptado de WEISEL-EICHLER *et al.*, 1999.

A OA é uma das aminas biogênicas mais abundantes no sistema nervoso dos invertebrados (VERLINDEN *et al.*, 2010). É um importante neurotransmissor, neuro-hôrmonio e neuromodulador presente em todo SNC e SNP de insetos, desempenhando um papel similar ao neurotransmissor de adrenalina nos mamíferos, com uma infinidade de efeitos que aumentam o nível geral de excitação (ORCHARD,1992; FAROOQUI, 2012). Neurônios octopaminérgicos liberam octopamina nos neurônios do SNC e em muitos tecidos periféricos, fazendo com que ao invés de abrir canais iônicos, se tornem receptores de octopamina ativando vias bioquímicas de sinalização que modulam a função das células pós-sinápticas. A OA é o primeiro hormônio a ser liberado na hemolinfa durante a atividade motora (PFLÜGER &

DUCH, 2011). Os receptores de OA são receptores acoplados à proteína G, ou GPCRs e são responsáveis por induzir os padrões motores de voo por ações diretas nos GPCRs (AUDSLEY & DOWN, 2015; PFLÜGER & DUCH, 2011). Na indústria farmacêutica, os GPCRs são um dos alvos mais explorados para a descoberta de novas drogas, pois cerca de 40-50% de todos os medicamentos no mercado exercem seus efeitos através dessa família de proteínas. Acredita-se que tenha um enorme espaço para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas com o auxílio dos GPCRs (GARLAND, 2013) (Figura 17).

Figura 17. Receptores de octopamina acoplados à proteína G como alvos inseticidas :1) A octopamina se liga ao receptor; 2) O GTP substitui o GDP; 3) A proteína G dissocia-se em GTP-α, β e γ; 4) O GTP-a se liga à adenilil ciclase e 5) O cAMP é produzido a partir de ATP; 6) E então ocorre a mudança nos níveis dos segundos mensageiros intracelulares; 7) Causando uma resposta comportamental inadequada e 8) E consequentemente a atividade inseticida.



Fonte: Adaptado de BASF, 2013; AUDSLEY& DOWN 2015.

No Sistema Nervoso Periférico (SNP), a OA modula a atividade dos músculos do voo dos órgãos periféricos e da maioria dos órgãos dos sentidos. Já no SNC é essencial na regulação da motivação, dessensibilização de estímulos sensoriais, excitação, iniciação e manutenção de vários comportamentos rítmicos, comportamentos de higiene e comportamentos sociais complexos, incluindo o estabelecimento do trabalho de parto, bem como aprendizado e memória (ROSENBERG *et al.* 2007, FAROOQUI, 2012). Além disso, como neurotransmissor,

a OA é responsável pela regulação da atividade das glândulas endócrinas, controlando, por exemplo, a emissão de luz no vagalume (AMARAL *et al*., 2017). Como neuro-hormônio, a octopamina é liberada na hemolinfa, onde é transportada para tecidos-alvo induzindo a mobilização de lipídios e carboidratos, preparando assim os insetos para um período de atividade prolongada ou então auxiliando na recuperação de um período de maior demanda de energia (GALLO *et al*., 2016). Quanto a sua atuação como neuromodulador periférico, a OA é responsável pela regulação das atividades dos músculos esqueléticos e viscerais, além de outros órgãos-alvo periféricos, incluindo o tecido adiposo, oviduto, coração e órgãos sensoriais (VERLINDEN *et al*., 2010; GALLO *et al*., 2016). O sistema octopaminérgico está relacionado com o comportamento fisiológico e comportamental em invertebrados, e estas vias oferecem alvos para estudos de propostas para candidatos no desenvolvimento de inseticidas potencialmente seletivos para insetos (VERLINDEN *et al*., 2010; ARACANBIA *et al*., 2019).

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um neurotransmissor monoaminérgico, encontrado tanto em vertebrados quanto invertebrados e está envolvida nos processos de aprendizagem e memória e, portanto, é crucial para certos comportamentos em todo o reino animal. Está presente em todo corpo dos animais, sendo mais abundante no trato gastrointestinal, podendo ser encontrada também em plantas e fungos (VLEUGELS *et al*., 2015). Nos insetos, a 5-HT funciona como um neurotransmissor e como um hormônio sistêmico (FRENCH *et al*., 2014). Estudos de imuno-histoquímica revelaram que nervos serotoninérgicos inervam as partes bucais da barata *Periplaneta americana* e larvas estáveis (*Stomoxys calcitrans*), indicando que a 5-HT modula a ingestão de alimentos em insetos (FRENCH *et al*., 2014). Em *Rhodnius. prolixus,* foi demonstrado que a 5-HT é liberada diretamente na hemolinfa durante a refeição de sangue, preparando assim a fisiologia do inseto para o processo rápido de diurese e digestão do sangue (LANGE *et al*., 1989; ORCHARD, 2006).

A histamina (HA) é um importante mensageiro químico que regula vários processos biológicos importantes em vertebrados e invertebrados, tais como inflamação e secreção de ácido gástrico. Por esta razão, é um importante neurotransmissor que atua regulando processos fisiológicos vitais em insetos (XU *et al*., 2015). A HA não é apenas o neurotransmissor de fotorreceptores, mas também apresenta papéis importantes na recepção mecanossensorial, preferência de temperatura, sono e processamento olfativo em insetos (KITA *et al*., 2017). O mapeamento imuno-histoquímico realizado no sistema nervoso de gafanhoto e barata mostraram a capacidade do tecido nervoso em sintetizar e metabolizar HA, estando presente em altos níveis sobre a retina e lâmina do neurópilo do lobo óptico (ELIAS & EVANS, 1983;

OSBORNE, 1996; KITA *et al*., 2017). O sistema visual da Drosophila usa a HA como neurotransmissor nas sinapses dos fotorreceptores e fornece um bom modelo genético para o estudo da histamina (HARDIE, 1989; XU *et al*., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a avaliação do potencial de risco dos compostos xenobióticos de origem natural, Anatoxina-a(s) e Jaburetox, por meio da investigação dos mecanismos de entomotoxicidade em modelos alternativos de insetos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar a atividade entomotóxica do extrato contendo anatoxina-a(s) (CECA), obtida a partir de cianobactérias da espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae*, em diferentes sistemas neurobiológicos de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*;

2.2.1.1Comparar os efeitos neurotóxicos do CECA com os efeitos provocados por doses subletais do organofosforado triclorfon (Tn);

2.2.2 Determinar a atividade entomotóxica do peptídeo tóxico Jaburetox (Jbtx), derivado da urease de *Canavalia ensiformes*, sobre o sistema nervoso central e periférico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* e sobre o sistema nervoso periférico do gafanhoto da espécie *Locusta migratoria*;

2.2.2.1 Investigar a interação do Jbtx na modulação de canais de sódio voltagem dependentes de baratas da espécie *Blatella germanica* co-expressados em *Xenopus laevis*;

2.2.3 Demonstrar a sensibilidade dos modelos de baratas *Nauphoeta cinerea*, *Blatella germanica* e do gafanhoto *Locusta migratória*, como alternativa para os ensaios de neurotoxicidade em estudos com doses subletais de xenobióticos;

2.2.3.1 Reforçar por meio de análises bioquímicas, celulares e moleculares o potencial biotecnológico dos compostos anatoxina-a(s) e jaburetox.

3. RESULTADOS

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

-ECOTOXICOLOY AND ENVIRONMENTAL SAFETY (EES)

Ecotoxicology and Environmental Safety 171 (2019) 138–145

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

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

Neurotoxic effects of sublethal concentrations of cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) on *Nauphoeta cinerea* cockroaches

Douglas Silva dos Santos[a,b,c], Maria Eduarda Rosa[a], Ana Paula Zanatta[a], Raquel Soares Oliveira[a], Carlos Gabriel Moreira de Almeida[a,c], Allan Pinto Leal[a], Miriam Sanz[d], Kelly Afonsina Fernandes[d], Velci Queiroz de Souza[a], Denis Reis de Assis[e], Ernani Pinto[d], Chárístón André Dal Belo[a,b,c,*]

[a] *LANETOX, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Av. Antônio Trilha 1847, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil*
[b] *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, (PPGBTox), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil*
[c] *Instituto do Cérebro (INSCER), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, RS, Brazil*
[d] *Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), Brazil*
[e] *Inserm U1253 "Imaging and Brain", Team Neurogenomics and Neuronal physiopathology, University of Tours, Faculty of Medicine, 10 Bd Tonnellé, 37032 Tours Cedex 1, France*

ARTICLE INFO

Keywords:
Organophosphate compounds
Anatoxin-a(s)
Trichlorfon
Anticholinesterase activity
Central nervous system neurotoxicity
Neuromuscular blockade

ABSTRACT

The detection of cyanotoxins, such as the anatoxin-a(s), is essential to ensure the biological safety of water environments. Here, we propose the use of *Nauphoeta cinerea* cockroaches as an alternative biological model for the biomonitoring of the activity of anatoxin-a(s) in aquatic systems. In order to validate our proposed model, we compared the effects of a cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) (CECA) with those of the organophosphate trichlorfon (Tn) on biochemical and physiological parameters of the nervous system of *Nauphoeta cinerea* cockroaches. In brain homogenates from cockroaches, CECA (5 and 50 μg/g) inhibited acetylcholinesterase (AChE) activity by 53 ± 2% and 51 ± 7%, respectively, while Tn (5 and 50 μg/g) inhibited AChE activity by 35 ± 4% and 80 ± 9%, respectively ($p < 0.05$; n = 6). Moreover, CECA at concentrations of 5, 25, and 50 μg/g decreased the locomotor activity of the cockroaches, diminishing the distance travelled and increasing the frequency and duration of immobile episodes similarly to Tn (0.3 μg/g) ($p < 0.05$, n = 40, respectively). CECA (5, 25 and 50 μg/g) induced an increase in the leg grooming behavior, but not in the movement of antennae, similarly to the effect of Tn (0.3 μg/g). In addition, both CECA (50 μg/200 μl) and Tn (0.3 μg/200 μl) induced a negative chronotropism in the insect heart (37 ± 1 and 47 ± 8 beats/min in 30 min, respectively) (n = 9, $p > 0.05$). Finally, CECA (50 μg/g), Tn (0.3 μg/g) and neostigmine (50 μg/g) caused significant neuromuscular failure, as indicated by the monitoring of the *in vivo* neuromuscular function of the cockroaches, during 100 min (n = 6, $p < 0.05$, respectively). In conclusion, sublethal doses of CECA provoked entomotoxicity. The Tn-like effects of CECA on *Nauphoeta cinerea* cockroaches encompass both the central and peripheral nervous systems in our insect model. The inhibitory activity of CECA on AChE boosts a cascade of signaling events involving octopaminergic/dopaminergic neurotransmission. Therefore, this study indicates that this insect model could potentially be used as a powerful, practical, and inexpensive tool to understand the impacts of eutrophication and for orientating decontamination processes.

1. Introduction

Cyanobacteria are primitive photosynthetic microorganisms present in fresh and salt water and moist land environments, playing an important role in the oxygenation of the Earth's atmosphere (Dismukes et al., 2001). Cyanobacteria have attracted tremendous interest due to the increase in its occurrence, its wide distribution and the number of toxicity reports through the spread of their harmful secondary

Abbreviations: OPs, Organophosphate compounds; WHO, World Health Organization; CECA, cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s); Tn, Trichlorfon; ACh, Acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; GLU, Glutamate; GABA, gamaaminobutiric acid

* Correspondence to: CIPBiotec, Campus São Gabriel, Universidade Federal do Pampa, Av. Antônio Trilha, 1847, 97300000 São Gabriel, Brazil.
E-mail address: charistonbelo@unipampa.edu.br (C.A.D. Belo).

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.068
Received 26 August 2018; Received in revised form 8 December 2018; Accepted 21 December 2018
0147-6513/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

metabolites, especially in aquatic environments (Chorus and Bartram, 1999; Falconer, 1996). In addition to the hepatotoxic microcystins and the neurotoxic saxitoxins, cyanobacteria also produce anatoxins (Rastogi et al., 2015). These latter compounds are subdivided into two major groups: type A anatoxins (which are analogs of the neurotransmitter acetylcholine) and anatoxins-a(s), the only naturally-occurring anticholinesterase organophosphate compound (Carmichael et al., 1990).

Organophosphate compounds (OPs) are a group of several chemicals derived from phosphoric acid, of natural or synthetic origin, which are either inhibitors of the enzymes acetylcholinesterase and cholinesterase, or have indirect cholinergic actions (Fikes, 1990; Rocha and Spinosa, 1992). Synthetic OPs include parathion, malathion, diazinon, fenthion, chlorpyrifos (Fest and Schmidt, 1982; Mdegela et al., 2010; Nishizawa, 1960), and trichlorfon (Tn) among others. Because of the irreversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), OPs are extremely toxic to biological systems, making them potent insecticides. Since AChE is responsible for the hydrolysis of the acetylcholine (ACh), its inhibition by OPs leads to the accumulation of this neurotransmitter at the nerve endings, including the neuromuscular junctions (Ecobichon, 2001). This cholinergic exacerbation ultimately disturbs the autonomic parasympathetic nervous system, followed by stimulation of the nicotinic receptors, affecting the sympathetic and the central nervous systems (Ecobichon, 2001). The main factors involved in the poisoning by OP are related to excessive exposure as well as the inappropriate use of these toxic chemicals (Molica, 2005). For example, on soil the dissipation rates of Tn are about 90% within five days, suggesting that Tn is safe when applied at the recommended dosage. Despite synthetic OPs present high rates of dissipation and degradation, the potential effect of residual amounts of these insecticides in the surrounding environment is still a matter of concern. In this way, sublethal concentrations of these insecticides present in the environment are amenable to induce complex long-term behavioral alterations in insects. In this way, response to insecticides can be characterized into two major classes: physiological resistance and behavioral avoidance (Chareonviriyaphap et al., 1997). Physiological resistance is the ability of an insect population to survive exposure to a concentration of insecticide that would normally result in complete kill. Alteration of target site nerve receptors (e.g., kdr, Rdl and Ace.1R) and detoxification by modifying the activity of non-specific esterases, glutathione S-transferases and P-450 mediated monooxygenases (mixed function oxidases), are examples of physiological resistance. Such alterations may affect for example, the development, longevity, fecundity, and behavioral locomotory changes altering mating (De Castro et al., 2013), or interfering with feeding behavior (He et al., 2013). On the contrary, behavioral avoidance (deterrence) is defined as the ability of an insect to move away (escape) from an insecticide-treated area, often without lethal consequence (Chareonviriyaphap et al., 2013).

The anatoxin-a(s) is a secondary metabolite from cyanobacteria of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya* (Mahmood and Carmichael, 1987), and Sphaerospermopsis. Chemically related organophosphate compounds (e.g Tn), present similar inhibitory activity on the enzyme acetylcholinesterase (Stürmer et al., 2014). Interestingly, anatoxin-a(s) shares a similar mechanism of action with organophosphate and carbamate insecticides such as paraoxon, physostigmine, and pyridostigmine (Cook et al., 1988). However, data related to laboratory conducted assays aiming to compare the biological activity of anatoxin-a(s) and related organophosphate compounds in insects, avian and mammalian systems are scarce (Rodríguez et al., 2012).

Moreover, in recent years eutrophication of aquatic systems by tailings from human activities has increased outcrops of cyanobacteria, making it a major environmental problem. Despite its obvious environmental and clinical relevance, the mechanisms of action of anatoxin-a (s) in biological systems is still poorly understood, especially in neurobiological models. Besides, the use of biological models of neurotoxicity could provide a practical, inexpensive, and rapid way to identify the presence of anatoxin-a(s) in contaminated aquatic environments. In this work, we investigated the entomotoxic activity of cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) (CECA) obtained from *Sphaerospermopsis torques-reginae* (formerly, *Anabaena sp.*). In addition, we compared the neurotoxic effects of CECA with the effects provoked by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon (Tn) on *Nauphoeta cinerea* cockroaches, in order to validate this biological model.

2. Material and methods

2.1. Reagents and solutions

Trichlorfon (2,2,2 tricloro methyl-1-hydroxymethyl phosphonate, C4H8CL3O4P), was purchased under the trademark Triclorvet - Allvet ®. All chemicals used in this work were purchased from Sigma-Aldrich, Merck, Roche, Life Technologies or BioRad. Test-solutions were prepared daily by dilution in insect saline (Stürmer et al., 2014) immediately before use. The insect saline is a carbonate-buffered solution freshly prepared with the following composition in mM: NaCl, 214; KCl, 3.1; $CaCl_2$, 9; sucrose, 50; HEPES buffer, 5 and pH 7.2. All drugs were injected into the third abdominal hemocoel segment of the cockroaches at a final volume of 20 µl, using a Hamilton syringe.

2.2. Cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) preparation

In this work, the strain ITEP24 of the cyanobacterium *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Molica et al., 2005) was used. *S. torques-reginae* was isolated from the Tapacurá reservoir – Pernambuco Estate, Brazil, and currently has been under cultivation at Prof. Ernani Pinto's lab (School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo). The presence of anatoxin-a(s) was previously confirmed by bioassays in mice and *in vitro* AChE inhibition test, as well as by LC-MS/MS, according to Dörr et al. (2010) and Molica et al. (2005). The strain ITEP24 was cultivated using the ASM1 medium under a light/ dark photoperiod of 12:12 h and irradiance of 66560 E m^{-2} s^{-1}. 100 mg of lyophilized cyanobacteria were resuspended in 5 mL of ethanol/acetic acid 0.1 M (20:80), sonicated for 3 min in ice, and centrifuged at 6300 g for 15 min. The supernatant was applied to a pre-conditioned (5 mL of methanol followed by 5 mL of ethanol/acetic acid 0.1 M 20:80) C18 cartridge (Sep-Pack, Waters, MA, USA) to retain the pigments. Eluates were dried in a SPD121P Speed Vac system (Thermo Scientific, MA, USA) and resuspended in 1 mL of acidified methanol. The pre-purified extract was dried under N2 flow and resuspended in saline solution (NaCl 0.15 M) for the assays, as described by Rodriguez et al. (2012) and the presence of the cyanotoxin was confirmed by LC-MS (Fig. S1, supplementary material section).

2.3. Experimental animals

The experiments were performed using adult *Nauphoeta cinerea* cockroaches of both sexes. The animals were reared at laboratory conditions of controlled temperature (22–26 °C) on a 12 h:12 h L: D cycle. All cockroaches were provided with water and dog chow *ad libitum*.

2.4. Acetylcholinesterase activity assay

Acetylcholinesterase activity was evaluated according to the method of Ellman et al. (1961), modified by Stürmer et al. (2014). To explore the effects of anatoxin-a(s) on cockroaches´AChE activity, six animals were treated with Tn or CECA at the concentrations of 5, 25 and 50 µg/g. The amount of protein in the samples was measured according to the method of Bradford (1976). The results were expressed as percentage of milliunits of AChE per milligram of protein (mU/mg protein). One milliunit of AChE was defined as the amount of enzyme

able to produce 1 nmol of the yellow compound thionitrobenzoic acid (TNB) per min under the specified conditions. Control cockroaches were injected only with insect saline.

2.5. Locomotor activity measurements

The locomotor activity of *Nauphoeta cinerea* was assessed essentially as described by Leal et al. (2018), using behavioral endpoints including the travelled distance, immobile episodes (number of times that the animal remained immobile during the experiment) and percentage of stopped time (percentage of the total experimental time in which the animal stopped its walking path during the whole experiment). Control cockroaches were injected only with insect saline.

2.6. Grooming activity

The grooming behavior of cockroaches was assessed essentially as described in Stürmer et al. (2014). The assays were performed 2–8 h after the start of the light cycle, taking into account the average cleaning time in seconds of the legs and antennae during the established standard time of 30 min. Control cockroaches were injected only with saline.

2.7. Semi-isolated cockroach heart preparation

An *in vivo* semi-isolated cockroach heart bioassay was carried out according to Rodríguez et al. (2012). In this set of protocols, nine cockroaches were used for each experimental group. In the control group, only saline solution was applyed.

2.8. In vivo cockroach metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation

To analyze the effect induced by CECA at insect neuromuscular junctions, *in vivo* cockroach metathoracic-coxal adductor muscle preparations were used, as previously described by Martinelli et al. (2014). Data were further analyzed using the software ANCAD (AVS Instruments, São Carlos, SP, Brazil).

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± S.E.M. All experiments were repeated according to each particular protocol. When data from more than two experimental groups were analyzed, One-Way ANOVA or Two-way ANOVA were performed followed by Tukey´s (all groups were compared with each other) or Dunnet's (the groups were compared with a positive control or saline) *post-hoc* tests. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 7.0 (Software Inc., San Diego, CA). The values were considered significantly different when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. AChE activity in brain homogenates from Nauphoeta cinerea cockroaches

The analysis of AChE activity from cockroach brain homogenates before and after injecting different concentrations of CECA and Tn shows a non-dose-dependent inhibitory effect. The enzyme activity of the controls prior to the injection of CECA and Tn treatments were 98 ± 2% and 96 ± 4%, respectively (Fig. 1). The incubation of CECA (5, 25, and 50 μg/g) significantly inhibited AChE activity by 53 ± 2%, 23 ± 2% and 51 ± 7%, respectively ($p < 0.5$; n = 6) (Fig. 1A). In order to gauge the effects of CECA on the AChE activity, we incubated the brain homogenates with the organophosphate trichlorfon (Tn), since its inhibitory effect on this enzyme activity in insects is already well established (Stürmer et al., 2014). As expected, when Tn doses were incubated (5 and 50 μg/g), there was a significant inhibition of the enzymatic activity by 35 ± 4% and 80 ± 9%, respectively (Fig. 1B). When 25 μg/g Tn was incubated, there was an inhibition of enzymatic activity by 20 ± 8%. The enzyme assays showed that CECA is a potent inhibitor of the AChE activity, confirming its natural organophosphate-like effect in the insect central nervous system.

3.2. Disruption of locomotory function induced by CECA in Nauphoeta cinerea cockroaches

Overall the administration of CECA (5, 25, and 50 μg/g) in *Nauphoeta cinerea* induced a series of significant alterations on the normal locomotor behavior in cockroaches. Thus, the control values for distance travelled, immobile episodes, and stopped time were 481.6 cm, 471.6 s and 45.9%, respectively (Fig. 2; Table 1). In this protocol, the maximum decrease in the distance travelled was obtained with 0.3 μg/g Tn, while CECA inhibited this parameter in an inversely proportional fashion, in which the effect of 5 > 25 > 50 μg/g CECA (n = 40, $p < 0.05$) (Fig. 2A). However, the maximum increase of immobile episodes was obtained with 25 and 5 μg/g of CECA, being at the same extension of 0.3 μg/g Tn, whilst 50 μg/g CECA did not alter this parameter (n = 40, $p < 0.05$, respectively to Tn and CECA 5 and 25 μg/g) (Fig. 2B). Similarly, the maximum increase of the stopped time was obtained with 5 and 25 μg/g (both at the same extension of 0.3 μg/g Tn), while the concentration of 50 μg/g of CECA did not change the stop time and (n = 40, $p < 0.05$, respectively to Tn and CECA 5 and 25 μg/g) (Fig. 2A). Therefore, the lower doses of CECA caused the most intense damage to the locomotor-related behavior of cockroaches.

3.3. Effect of CECA on the grooming activity of Nauphoeta cinerea cockroaches

The effect of CECA (5, 25, and 50 μg/g) on *Nauphoeta cinerea* grooming activity was characterized by a significant alteration in leg movements rather than in the antennae grooming. In saline-injected cockroaches, the mean time of continuous leg grooming was 86.16 s/30 min and for antennae grooming was 30.06 s/30 min (n = 40, respectively) (Fig. 3). However, when CECA was injected in different concentrations (5, 25, and 50 μg/g of animal weight), a significant dose-dependent decrease in antennae and leg grooming activity was observed. In insects, it has been previously reported that Tn is responsible for modulating dopaminergic neurotransmission in grooming activity in cockroaches (Stürmer et al., 2014). Thus, the effect of Tn was tested as a positive standard of drug affecting dopaminergic transmission in comparison to the neurotoxic effect elicited by CECA. When Tn (0.3 μg/g) was injected in the cockroaches, the time spent in leg grooming increased to 261.77 s/30 min, and the time spent in antennae grooming was prolonged to 131 s/30 min (n = 40; $p < 0.05$ compared to saline-injected controls for both parameters) (Fig. 3). The lower dose of CECA (5 μg/g) induced an increase in the time of legs grooming, whilst the time of antennae grooming was not significantly altered (174.44 s/30 min and 24.57 s/30 min, respectively). Surprisingly, the intermediate concentration of CECA tested (25 μg/g) induced an even more intense increase in the time spent in legs and antennae grooming to up to 226.8 s/30 min, and 32.04 s/30 min, respectively. When the highest concentration of CECA (50 μg/g) was assayed, the time spent with legs grooming was significantly increased (140.24 s/30 min), however the time spent for antennae was not altered as compared to controls. The results with CECA showed a significant effect on both leg and antennae cleaning activity, suggesting a strong involvement of octopaminergic and dopaminergic modulation of this extract in insects.

3.4. Effect of CECA on the heart rate of Nauphoeta cinerea cockroaches

The addition of different concentrations of CECA (5, 25, and 50 μg/200 μl) on the cardiovascular system of *N. cinerea* cockroaches induced

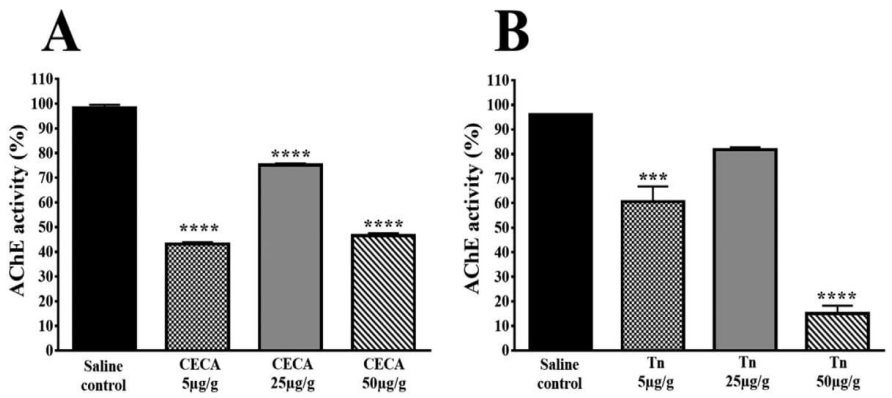


Fig. 1. Effects of *in vitro* treatment with Tn or CECA on the activity of the enzyme acetylcholinesterase in brain homogenates from *Nauphoeta cinerea* cockroaches. The results were expressed as mean ± SEM of the percentage of the enzymatic activity in relation to the control group. Statistical analyzes were performed by One-way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test. $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$; n = 6, respectively.

a dose-dependent negative chronotropic activity (Fig. 4). Thus, in time-matched control experiments, in which only insect saline was used, the mean frequency of heart beats was 100 ± 3 beats/min at the end of 30 min recordings (n = 9). When Tn (0.3 µg/200 µl) was added to the preparation there was a significant decrease in the chronotropic responses of 37 ± 1 beats/min compared to the control saline ($p < 0.05$, n = 9) in 30 min experiment. The addition of 5 µg/200 µl of CECA decreased the heart rate in 14 ± 1 beats/min (n = 9; $p < 0.05$). On the other hand, when the highest concentration of CECA (50 µg/200 µl) was assayed, there was a significant decrease in the chronotropic activity of 47 ± 8 beats/min, in 30 min recordings (n = 9, $p < 0.05$). In all treatments, the washout of the preparation with insect saline partially reversed the effects induced by the treatments (Fig. 4).

3.5. Neuromuscular blockade induced by CECA on nerve-muscle preparation from Nauphoeta cinerea cockroaches

The activity of CECA (5 and 50 µg/g) on insect neuromuscular junctions was evaluated by the measurement of twitch tension responses in coxal-adductor nerve-muscle preparations. The administration of insect saline alone did not interfere with neuromuscular responses during 90 min recordings (n = 6) (Fig. 5). The injection of different concentrations of CECA induced a non-dose-dependent blockade in 90 min recordings. Then, the well-known inhibitors of acetylcholinesterase neostigmine (NEO) and Tn were used as reference compounds to compare the effect of different concentrations of CECA on twitch tension responses. Surprisingly, the lowest concentration of CECA (5 µg/g) provoked the most intense blockade of twitch tension (97.23% after 80 min) (n = 6, $p < 0.05$) (Fig. 5AB). Interestingly, the highest concentration of CECA tested (50 µg/g) displayed a similar effect of NEO (50 µg/g), inducing a slight increase in the muscular strength in the first 10 min (10% and 7%, respectively), followed by an irreversible neuromuscular blockade after 90 min (41.44% and 50%, respectively, n = 6, $p < 0.05$). These results suggest a potent detrimental effect of CECA on the neuromuscular junction of insects, especially at the lowest concentration tested (5 µg/g). Thus, the results presented above confirmed that, similarly to neostigmine or Tn, CECA also interfere directly with the insect neuromuscular junctions.

4. Discussion

This work brings novel information about the mechanisms involved in the effects of sublethal concentrations of CECA, unveiling important aspects related to its biological interaction with insects, by comparison with the well-known organophosphorus compound trichlorfon. The alterations in biochemical and cellular parameters that culminate in neurotoxicity, resulting in profound alterations in the insect behavior will be discussed in detail therein.

The effects of cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) (CECA) in *N. cinerea*, particularly the negative cardiac chronotropism and behavioral alterations, are consistent with an inhibition of the AChE activity in the brain of the cockroaches (Rodríguez et al., 2012; Stürmer et al., 2014). In cockroaches, acetylcholine (ACh) binds to the cholinergic receptors present not only in the heart, but also in the nerves of the paired cardiac system (Collins and Miller, 1977; Fox, 1981). Inconsistencies regarding the effect of ACh on the rate of the cockroach heartbeat have been noticed in the literature, demonstrating both an increase (Collins and Miller, 1977; Naidu, 1955), or a slowing of the insect heart rate (at concentrations between 10^{-2} and 10^{-6} M) (Richards, 1966; Schaefer and Miles, 1970). Hence, the precise molecular mechanism for this anti-AChE-like effect of CECA remains unknown. However, the purity of the extract for anatoxin a(s), excluding the presence of other nicotinic agonists, such as anatoxin-a or homoantoxin-a, was confirmed by LC-MS ESI QTOF reanalysis of CECA. Hence, the anti-AChE of CECA is therefore stated, as the only cholinergic potential of this compound. The prominent inhibition of the cholinesterase activity by natural organophosphorus agents, that results in important neurophysiological changes, may result in relevant behavioral alterations (Alonzo and Corrêa, 2008).

Indeed, in our experimental conditions, both CECA and Tn induced profound alterations in the locomotor patterns of the cockroaches, characterized by a significant decrease in the distance travelled and a consequent increase in the number of immobile episodes and stopped times in these insects. Exploratory and other behavioral parameters in cockroaches are complex, and represent defensive strategies employed to avoid the approach and escape from predators (Adedara et al., 2015). The notorious modulation of the insect behavior induced by CECA and the chemical organophosphorus compound Tn may reflect the importance of the cholinergic systems in coordinating both central and peripheral insect physiological patterns. In addition to that, these protocols demonstrate the suitability of the cockroach biological model as a sensitive system to detect the presence of sublethal concentrations of both organophosphorus compounds and anatoxin-a(s) in the environment (Thany and Tricoire-Leignel, 2011).

Accordingly, the modulation of the locomotor pattern induced by CECA and Tn in our cockroach model has a strikingly connection to the observed increase of grooming activity in the insects. Despite the diversity of taxonomic groups of insects involved, the main functions of

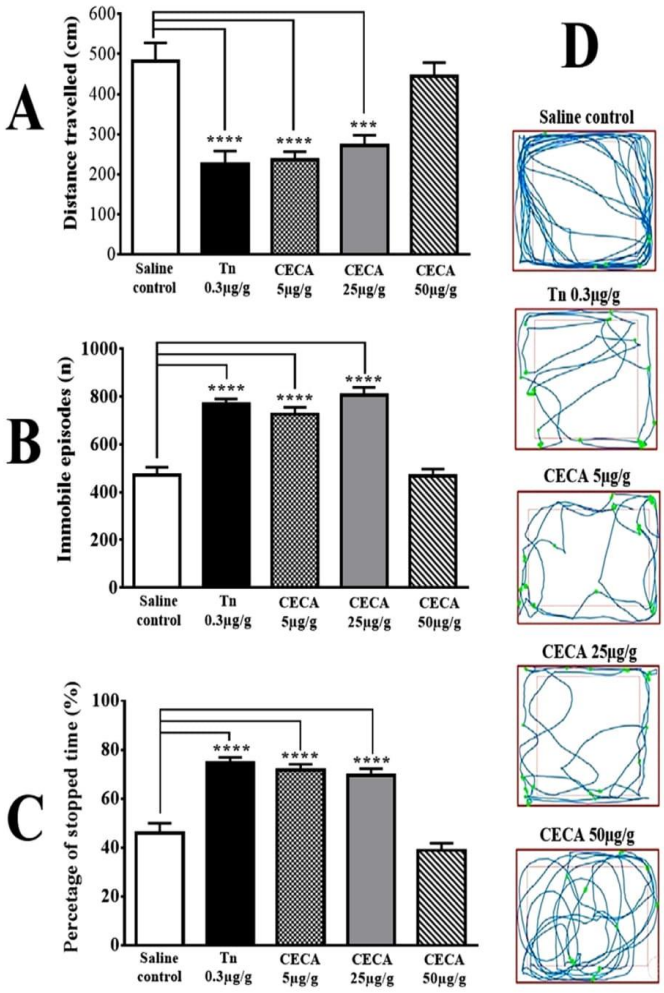


Fig. 2. Effects of *in vivo* treatment with Tn or CECA on locomotion and motor endpoints in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. The figure shows the effects of CECA on different parameters of locomotion, including distance travelled (**A**), number of immobile episodes (**B**), percentage of stopped time (**C**) and representative trajectory traces of cockroaches from each different experimental group (**D**), during a 10 min test. Data are expressed as mean ± S.E.M for 40 animals per group. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA followed by the Tukey's post-hoc test. $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$; n = 40, respectively.

Table 1
Effects of CECA on locomotor behavior in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. The disruption of locomotor behavior induced by different concentrations of CECA shown in Fig. 2 was compared to the organophosphorus trichlorfon (Tn). The parameters analyzed were the travelled distance (cm), the number of immobile episodes (s) and the stopped time (%). Note that treatment with CECA induced a decrease in the distance travelled followed by an increase in the number of immobile episodes and immobilization time. A similar effect was observed when the animals were treated with Tn. Data are expressed as mean ± S.E.M for 40 animals per group. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test.

	CONTROL	Tn 0.3 µg/g	CECA 5 µg/g	CECA 25 µg/g	CECA 50 µg/g
Distance travelled (cm)	481.6	224.6*	237.2*	272.2*	444.4
Immobile episodes (s)	471.6	769.6*	726.2*	806.6*	466.4
Percentage of stopped time (%)	45.9	74.6*	71.6*	69.4*	38.7

* $p < 0.05$, n = 6 significance.

grooming are quite similar among all species. In fact, other behavioral parameters, such as removal of foreign objects from the body surface, distribution of substances across the body surface, displacement behavior in stressful conditions, social courtship behavior, social signaling and de-arousal also share common molecular mechanisms among several insect species (Spruijt et al., 1992; Zhukovskaya et al., 2013). The type of neurotransmission mostly involved in the initiation of locomotor behavior is the monoaminergic system (Weisel-eichler et al., 1999). To date, octopaminergic and dopaminergic systems are known to directly affect the initiation of locomotion in insects (Gal and Libersat, 2008). Previous studies conducted by our research group, using sublethal doses of the organophosphate trichlorfon, demonstrated

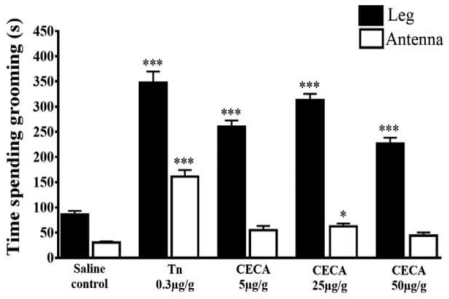


Fig. 3. Effects of *in vivo* treatment with Tn or CECA on grooming behavior in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. The cockroaches were injected with CECA (5, 25 and 50 µg/g) and tested for grooming activity immediately after the injections. To verify the octopaminergic modulation on the grooming time in cockroaches, Tn (0.3 µg/g) was assayed. The grooming activity was recorded during 30 min and the results are expressed as mean ± S.E.M. of the total time of grooms (min. 30 min^{-1}). The data were analyzed by One-way ANOVA followed by the Dunnett's post-hoc test. $^{*}p < 0.05$; $^{***}p < 0.001$; n = 40, respectively.

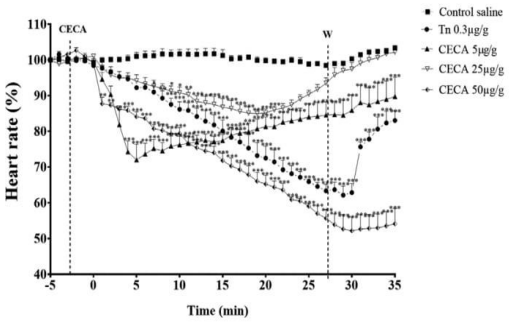


Fig. 4. Effects of *in vivo* treatment with Tn or CECA on heart rate in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. In the graph, each point corresponds to the mean ± S.E.M. of the insect heart rate relative to the initial state (−5 min), measured during 30 min after exposition to CECA or Tn. Note that CECA (50 µg/g) induced a cardioinhibitory response during 30 min of the experiment. The statistical analyses were performed by Two-way ANOVA followed by the Tukey's post-hoc test. $^{*}p < 0.05$ (n = 9); $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; (n = 9).

that cholinergic intoxication leads to an increase in the dopaminergic response, characterized by the improvement of the antennae grooming activity (Mahmood and Carmichael, 1987; Stürmer et al., 2014). From the environmental point of view, any change in insect behavior resulting from intoxication by sublethal doses of organophosphate compounds may indirectly influence processes that are essential for the maintenance of the species, such as longevity, fecundity, reproduction, development time, behavior (mobility, demand, foraging and feeding), predation and/or parasitism, emergency rates and/ or sex ratio (Cloyd, 2012; França et al., 2017).

CECA,Tn and the carbamate neostigmine also induced a progressive blockage of muscle contractions in *N. cinerea in vivo*. To our knowledge, this is the first time that sublethal doses of CECA are tested on insect neuromuscular function. The neuromuscular junction in insects essentially performs the communication of the electrical impulse of the motor neurons with the skeletal muscle, signaling the muscular contraction (Hughes et al., 2006). In insect neuromuscular junctions, it is currently accepted that glutamate (GLU) is the major excitatory neurotransmitter, whereas gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter (Fest and Schmidt, 1982; Osborne, 1996). Thus, the release of GLU or GABA into the synaptic cleft may induce

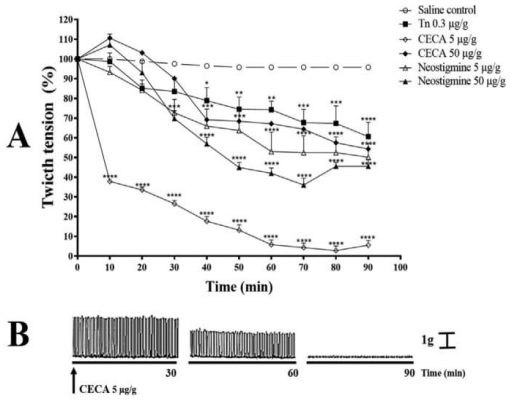


Fig. 5. Effects of *in vivo* treatment with Tn, neostigmine or CECA on leg evoked contractile responses in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. In (**A**) each point of the graph represents a mean ± SEM of the percentage of the contractile response in relation to the control group, measured during 90 min after exposition to Tn, CECA, or NEO. Panel (**B**) shows the representative record of the effect of CECA 5 µg/g on the contractile response of the cockroaches. Statistical analyses were performed by Two-way ANOVA followed by Tukeys's post-hoc test. $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$; $^{****}p < 0.0001$; n = 6, respectively.

both an increase and a decrease of muscle twitch tension, depending on the type of muscle and the corresponding synaptic cleft at the neuromuscular junctions (Chapman, 2013). In our cockroach model, CECA caused a preliminary and transient facilitation of the neuromuscular activity, and an ultimate blocking activity, suggesting that both glutamatergic and GABA-ergic synaptic transmissions may be activated. A reasonable explanation for this unspecific activity is that, in our experimental model, the stimulation to conduct muscle contractions was delivered through a cholinergic nerve called nerve 5 (Carr and Fourtner, 1980), from which at least two branchs of GABAergic inhibitory interneurons depart (Watson, 1986). Thus, it is suggested that, at least in part, both CECA and Tn may induce a neuromuscular blockage in *N. cinerea* due to an interaction between cholinergic and GABA-ergic interneurons. On the contrary, the preliminary increase in the cockroach muscle twitch tension induced by CECA, would be a result of a positive quantal modulation of the glutamatergic neurotransmisstion (Fulton, 1982), in the onset of the anti-AChE activity induced by the organophosphorus compound (Beranek and Miller, 1968; Wolf, 2014).

Finally, this study highlights the influence of sublethal concentrations of organophosphate compounds in modulating insect behaviors. This reinforces the problem of freshwater toxins that, even at sublethal concentrations, can cause disturbance of important ecosystems. Moreover, here we provided evidence that the biological model of *Nauphoeta cinerea* cockroaches may be useful as a sensitive, practical, and inexpensive tool to monitor the presence of anatoxin-a(s) in aquatic environments, and to optimize the monitoring of environmental treatments and decontamination processes.

5. Conclusion

The present results indicate that sublethal concentrations of organophosphorus compounds, natural or not, cause relevant alterations in the insect nervous system leading to profound alterations in behavior. The initial cholinergic intoxication begins by the inhibition of the insect AChE, inducing the activation of dopaminergic and octopaminergic neurotransmission, directly impacting the insect locomotion. These changes in the locomotor pattern of insects are connected not only to

the increase of the grooming activity, but also to an indirect negative rather than positive modulation of the insect neuromuscular junctions. Moreover, here we propose that measuring alterations in these behavioral and biochemical parameters in cockroaches could provide a sensitive, rapid, and inexpensive strategy to detect the presence of anatoxin-a(s) and organophosphate contamination, as well as to follow-up decontamination processes in different environments.

Acknowledgments

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES Edital Toxinologia 063/2010. D.S. dos Santos was granted by CAPES fellowships. CAPEX/ PROEX Process n°: 23038.005848/2018-31; Support n°: 0737/2018. D.S dos Santos would like to thank Dr. Jeferson Luis Franco and Nathane Rodrigues for technical assistance related to the acetylcholinesterase activity analyses. Ernani Pinto received grants from FAPESP (2014/50420-9), University of São Paulo Foundation (FUSP) (Project #1979) and CNPq (311048/2016-1) for this work. Dr. Velci Queiroz has a fellowship of research productivity (PQ2) from CNPq. Dr. Denis Reis de Assis is a Senior Scientist granted by a Le Studium Loire Valley Institute for Advanced Studies Research Fellowship (Tours and Orléans, France).

Conflict of interests

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

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2018.12.068.

References

Adedara, I.A., Rosemberg, D.B., Souza, D.O., Kamdem, J.P., Farombi, E.O., Aschner, M., Rocha, J.B.T., 2015. Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. Toxicol. Res. 4, 442–451. https://doi.org/10.1039/C4TX00231H.

Alonzo, H.G.A., Corrêa, C.L., 2008. Praguicidas. In: Oga, S., Camargo, M.A., Batistuzzo, J.A. (Eds.), Fundamentos de Toxicologia. Atheneu, São Paulo, pp. 696.

Beranek, R., Miller, P.L., 1968. The action of iontophoretically applied glutamate on insect muscle fibres. J. Exp. Biol. 49, 83–93.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Carmichael, W.W., Mahmood, N.A., Hyde, E.G., 1990. Natural toxins from cyanobacteria. In: Sherwood, H., Strichartz, G. (Eds.), Marine Toxins- Origin, Structure and Molecular Pharmacology. American Chemical Society, pp. 87–106.

Carr, C.E., Fourtner, C.R., 1980. Pharmacological analysis of a monosynaptic reflex in the cockroach, *Periplaneta americana*. J. Exp. Biol. 86, 259–273.

Chapman, R.F., 2013. The insects, Structure and Function. Cambridge University Press.

Chareonviriyaphap, T., Roberts, D.R., Andre, R.G., Harlan, H.J., Manguin, S., Bangs, M.J., 1997. Pesticide avoidance behavior in Anopheles albimanus, a malaria vector in the Americas. J. Am. Mosq. Control Assoc. 13, 171–183.

Chareonviriyaphap, T., Bangs, M.J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V., Ngoen-Klan, J., 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. Parasites Vectors 6 (280), 1–28.

Chorus, I., Bartram, J., 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management. WHOhttps://doi.org/10.4324/9780203478073.

Cloyd, R.A., 2012. Indirect effects of pesticides on natural enemies. In: Soundararajan, R. (Ed.), Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides. InTech, pp. 127–150. https://doi.org/10.5772/48649.

Collins, C., Miller, T., 1977. Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. J. Exp. Biol. 67, 1–15.

Cook, W.O., Beasley, V.R., Dahlem, A.M., Dellinger, J.A., Harlin, K.S., Carmichael, W.W., 1988. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. Toxicon 26, 750–753. https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90282-6.

De Castro, A.A., Corrêa, A.S., Legaspi, J.C., Guedes, R.N.C., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed *predators podisus nigrispinus* and *supputius cincticeps* (Heteroptera: pentatomidae). Chemosphere 93, 1043–1050. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.075.

Dismukes, G.C., Klimov, V.V., Baranov, S.V., Kozlov, Y.N., DasGupta, J., Tyryshkin, A., 2001. The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 2170–2175. https://doi.org/10.1073/pnas.061514798.

Dörr, F.A., Rodríguez, V., Molica, R., Henriksen, P., Krock, B., Pinto, E., 2010. Methods for detection of anatoxin-a(s) by liquid chromatography coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Toxicon 55, 92–99. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.017.

Ecobichon, D.J., 2001. Toxic effects of pesticides. In: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doll's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York, pp. 769–784.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95. https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9.

Falconer, I.R., 1996. Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. Phycologia 35, 6–11. https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-6.1.

Fest, C., Schmidt, K.-J., 1982. The Chemistry of Organophosphorus Pesticides, Second Rev. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1982.

Fikes, J.D., 1990. Organophosphorus and carbamate insecticides. Veter-. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 20, 353–367. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091304-6.50091-4.

Fox, P.M., 1981. Circulatory system. In: Bell, W.J., Adiyodi, K.G. (Eds.), The American Cockroach. Springer, Dordrecht.

França, S.M., Breda, M.O., Barbosa, D.R.S., Araujo, A.M.N., Guedes, A.G., 2017. The sublethal dffects of insecticides in insects. In: Biological Control of Pest and VectorInsects. InTech, pp. 23–39. https://doi.org/10.5772/66461.

Fulton, B.P., 1982. Recptors acettylcholine receptors at the excitatory amino acid synapse in locust muscle. Neuroscience 7 (2124–1982).

Gal, R., Libersat, F., 2008. A parasitoid wasp manipulates the drive for walking of its cockroach prey. Curr. Biol. 18, 877–882. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.076.

He, Y., Zhao, J., Zheng, Y., Weng, Q., Biondi, A., Desneux, N., Wu, K., 2013. Assessment of potential sublethal effects of various insecticides on key biological traits of the tobacco whitefly, Bemisia tabaci. Int. J. Biol. Sci. 9, 246–255. https://doi.org/10.7150/ijbs.5762.

Hughes, B.W., Kusner, L.L., Kaminski, H.J., 2006. Molecular architecture of the neuromuscular junction. Muscle Nerve 33, 445–461. https://doi.org/10.1002/mus.20440.

Leal, A.P., Oliveira, R.S., Perin, A.P.A., Borges, B.T., De Brum Vieira, P., Dos Santos, T.G., Vinadé, L., Valsecchi, C., Dal Belo, C.A., 2018. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in Nauphoeta cinerea cockroaches: an octopamine-like modulation. Pestic. Biochem. Physiol. 0–1. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.016.

Mahmood, N.A., Carmichael, W.W., 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. Toxicon 25, 1221–1227. https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90140-1.

Martinelli, A.H.S., Kappaun, K., Ligabue-Braun, R., Defferrari, M.S., Piovesan, A.R., Stanisçuaski, F., Demartini, D.R., Dal Belo, C.A., Almeida, C.G.M., Follmer, C., Verli, H., Carlini, C.R., Pasquali, G., 2014. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1840, 935–944. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.010.

Mdegela, R.H., Mosha, R.D., Sandvik, M., Skaare, J.U., 2010. Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. Ecotoxicology 19, 855–863. https://doi.org/10.1007/s10646-010-0466-3.

Molica, R.J.R., Oliveira, E.J.A., Carvalho, P.V.V.C., Costa, A.N.S.F., Cunha, M.C.C., Melo, G.L., Azevedo, S.M.F.O., 2005. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. Harmful Algae 4, 743–753. https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.001.

Naidu, M.B., 1955. Physiological action of drugs and insecticides on insects. Bull. Entomol. Res. 46, 205. https://doi.org/10.1017/S0007485300030856.

Nishizawa, Y., 1960. New low toxic organophosphorous insecticides. Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn. 24, 744–745. https://doi.org/10.1080/03758397.1960.10857746.

Osborne, R.H., 1996. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. Pharmacol. Ther. 69, 117–142.

Rastogi, R.P., Madamwar, D., Incharoensakdi, A., 2015. Bloom dynamics of cyanobacteria and their toxins: environmental health impacts and mitigation strategies. Front. Microbiol. 6, 1–22. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01254.

Richards, A.G., 1966. The effect of temperature on recombination frequency in Neurosporacrassa. Ins. Physiol. 9, 597–606.

Rocha, L.C.S., Spinosa, H.S., 1992. Praguicidas Organofosforados e Carbamatos: Algumas Considerações. Comun. Científicas da Fac. Med. Veterinária e Zootec. da Univ. São Paulo, pp. 41–44.

Rodríguez, V., Mori, B., Dörr, F.A., Dal Belo, C.A., Pinto, E., 2012. Effects of a cyanobacterial extract containing anatoxin-a (s) on the cardiac rhythm of *Leurolestes circumvagans*. Braz. J. Pharmacogn. 22, 775–781.

Schaefer, C.W., Miles, J., 1970. Inhibition by acetylcholine of cockroach heart (*Gromphadorhina portentosa*). Comp. Gen. Pharmacol. 1, 426–430. https://doi.org/10.1016/0010-4035(70)90066-2.

Spruijt, B., Hol, T., Rousseau, J., 1992. Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique. Physiol. Behav. 51, 747–752.

Stürmer, G.D., De Freitas, T.C., Heberle, M., de, A., Assis, D.R., Vinadé, L., Pereira, A.B., Franco, J.L., Dal Belo, C.A., 2014. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. Ecotoxicol. Environ. Saf. 109, 56–62. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.006.

Thany, S.H., Tricoire-Leignel, H., 2011. Emerging pharmacological properties of cholinergic synaptic transmission: comparison between mammalian and insect synaptic and extrasynaptic nicotinic receptors. Curr. Neuropharmacol. 9, 706–714. https://doi.org/10.2174/157015911798376343.

Watson, D.A.H.D., 1986. The distribution of GABA-like immunoreactivity in the thoracic nervous system of the locust *Schistocerca gregaria*. Cell Tissue Res. 246, 331–341. https://doi.org/10.1007/BF00215895.

Weisel-eichler, A., Haspel, G.A.L., Libersat, F., 1999. Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. J. Exp. Biol. 202, 957–964.

Wolf, H., 2014. Inhibitory motoneurons in arthropod motor control: organisation, function, evolution. J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol. 200, 693–710. https://doi.org/10.1007/s00359-014-0922-2.

Zhukovskaya, M., Yanagawa, A., Forschler, B.T., 2013. Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. Insects 609–630. https://doi.org/10.3390/insects4040609.

3.1.1 Material Suplementar

Supplementary Material

Confirmation of anatoxin-a(s) by Q/TOF

1. Experimental-1

Chromatographic separation was performed on a Nexera *XR* LC system using a 150 x 2.1 mm, 5µm, 200 Å, SeQuant ZIC-HILIC column (Merck, Darmstadt, Germany). Mobile phase A consisting of a solution of 10 mM ammonium formate, 0.01% formic acid and mobile phase B of acetonitrile was delivered at a flow rate of 0.2 mL/min using a gradient of 90-40% of B in 14 min. MS detection was performed using a compact^{TM} Q/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The instrument was operated in ESI negative mode acquiring MS full scan and autoMS/MS data at 2 Hz acquisition speed. The ESI source conditions were set as follows: capillary voltage 4000 V, nebulizer pressure 40 psi, drying gas flow and temperature 6 l/min and 200 C. The accurate mass data were processed using Data Analysis 4.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) which provided a ranking of possible elemental formulae (EF) by using the Smart Formula EditortTM.

2. Results-1

2.1.Identification of ***anatoxin-a(s)***

Identification of **anatoxin-a(s)** was based on accurate mass measurement, isotopic pattern and fragmentation spectrum. Mass accuracy and mSigma of this toxin were within the tolerance values (**Table 1**).

Table 1. Theoretical and experimental *m/z* value of anatoxin-a(s).

Chemical formulae	***m/z* value**		**Δ*m*/ppm**	**mσ**
	Measured	**Calculated**		
C7H18N4O4P	253.1059	253.1060	0.4	3.9

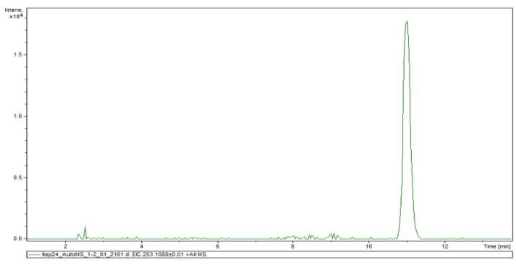


Figure 1. Extract Ion Chromatogram at *m/z* 253 of the aqueous extract of ITEP 24.

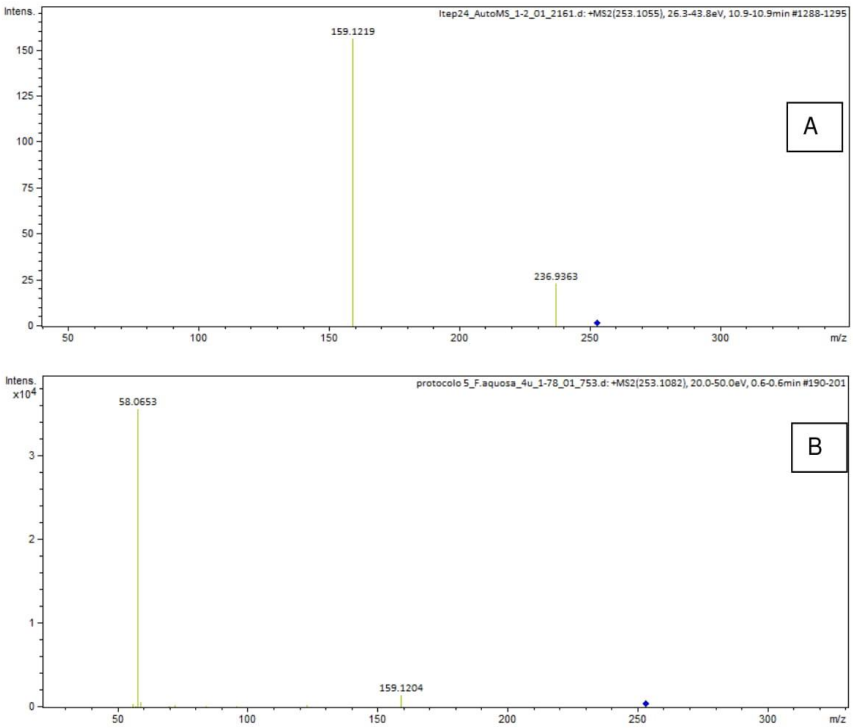


Figure 2. MS/MS fragmentation spectra of *m/z* 253 at collision energies (CE) of a) 20-40 and b) 20-50 eV.

3. Experimental-2

The toxic strain of Sphaerospermopsis torques-reginae (ITEP-24) is known as an anatoxin-a(s) producer (Dorr et al 2006 and Rodriguez et al 2012). Concerning the possible presence of anatoxin-a and homoanatoxin-a in ITEP 24 extract, extra analyses were carried out by LC-MS ESI QTOF in order to search for these two toxins that are nicotinic agonist compounds (Wonnacott et al 1992) and structurally different when compared to anatoxin-a(s) (**Figure 3**).

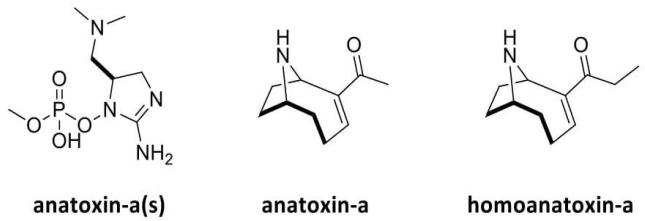


Figure 3. Types of anatoxins produced by cyanobacteria.

4. Results-2

For these re-analyses, cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) (CECA), was prepared according to section 2.2 described in the manuscript and analyzed by LC-MS ESI QTOF. As reported previously, anatoxin-a(s) is present in CECA as shown in **Figure 4**, where (**a**) is an Extract Ion Chromatogram (EIC) of anatoxin-a(s) (253.10 m/z) and (**b**) a ESI-MS/MS QTOF spectrum of anatoxin-a(s) in the positive mode (error ppm = 0.4, milisigma 3.9).

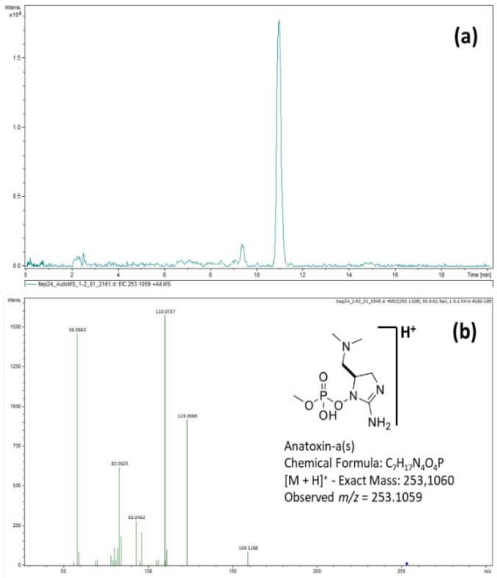


Figure 4. (**a**) Extract Ion Chromatogram (EIC) of anatoxin-a(S) (253.10 m/z), column 2.1x150mm ZIC HILIC (3.5 um) (Sequant,Merck), flow 0.2 mL/min, A: water 0.1% formic acid and 5mM ammonium formiate; B: acetonitrile. (**b**) ESI-MS/MS QTOF spectrum of anatoxin-a(s) in the positive mode (error ppm = 0.4, milisigma 3.9).

Also, in order to check the possible presence of anatoxin-a and homoanatoxin-a, CECA was injected in same conditions and an extract ion chromatogram (EIC) of 166 m/z and 180 m/z (possible anatoxin-a and homoanatoxin-a m/z in positive mode, respectively) was obtained as shown in **Figure 5 (a)**. A peak was detected at 5.2 min for the m/z 166. **Figure 5 (b)** shows an MS/MS spectrum of peak 5.2 min (m/z 166) and not typical of anatoxin-a product ions obtained in positive mode for this toxin (Dimitrakopoulos et al 2010). Since phenylalanine is an anatoxin-a isobar, misidentification of phenylalanine as anatoxin-a has been reported in forensic investigations (Dimitrakopoulos et al 2010). As shown in **Figure 5(b)**, phenyalanine was confirmed with an error of 2.6 ppm and consequently, we concluded that ECATAS does not present these toxin analogues.

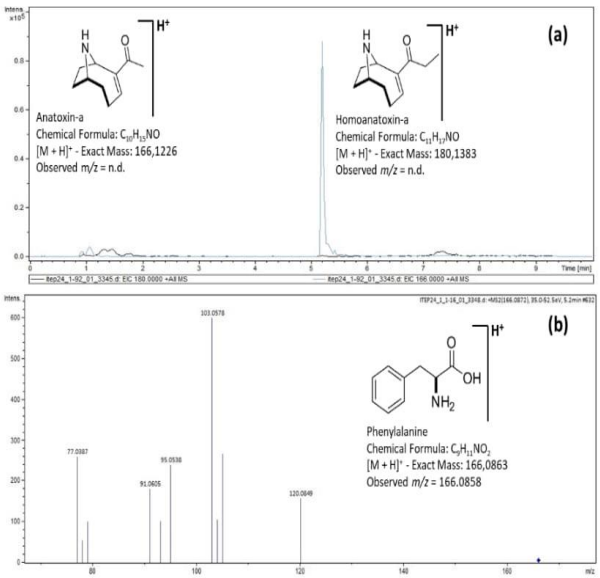
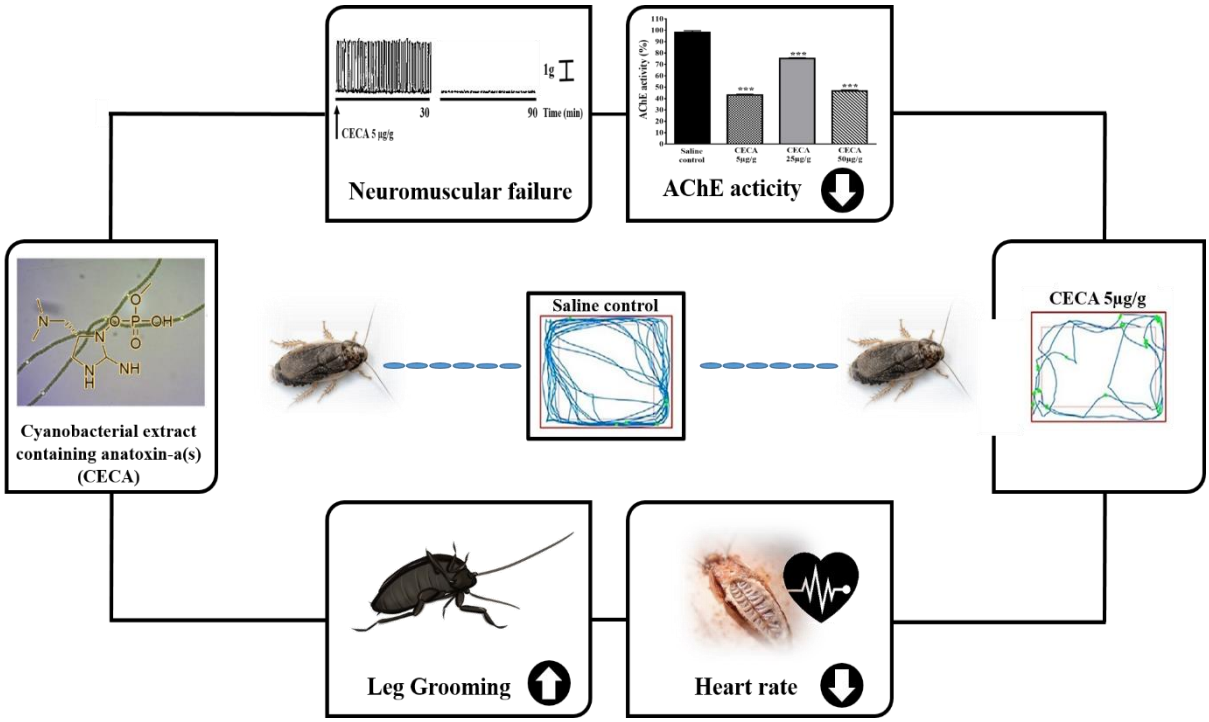


Figure 5. (**a**) Extract Ion Chromatogram (EIC) of 166 m/z and 180 m/z. (**b**) ESI-MS/MS QTOF spectra of peak at 5.2 min: determined as phenylalanine in positive mode (error in ppm 2.6, milisigma 12.4).

References

Rodriguez et al 2012 http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000073
Dorr et al 2006 https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.07.017
Wonnacott et al 1992 https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90558-Z
Dimitrakopoulos et al 2010 https://doi.org/10.1007/s00216-010-3727-3

3.1.2 Resumo Gráfico



3.2 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

-PESTICIDE BIOCHEMESTRY AND PHYSIOLOGY (PBP)

Pesticide Biochemistry and Physiology 153 (2019) 67–76

Contents lists available at ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

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

Jaburetox, a natural insecticide derived from Jack Bean Urease, activates voltage-gated sodium channels to modulate insect behavior

Douglas Silva dos Santos[a,e], Ana Paula Zanatta[b], Anne Helene Souza Martinelli[c], Maria Eduarda Rosa[b], Raquel Soares de Oliveira[b,e], Paulo Marcos Pinto[b,d], Steve Peigneur[d], Jan Tytgat[d], Ian Orchard[e], Angela B. Lange[e], Celia R. Carlini[f], Chárlston A. Dal Belo[a,b,*]

[a] Graduate Program in Biological Sciences: Biochemical Toxicology, Federal University of Santa Maria-UFSM, Santa Maria, RS, Brazil
[b] Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Pampa-UNIPAMPA, São Gabriel, RS, Brazil
[c] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil
[d] Toxicology and Pharmacology, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium
[e] University of Toronto Mississauga-UTM, Department of Biology. Mississauga, ON, Canada
[f] Laboratory of Neurotoxins, Brain Institute of Rio Grande do Sul, InsCer, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

ARTICLE INFO

Keywords:
Plant ureases
Entomotoxicity
Central neurotoxicity
Neuromuscular blockage
Voltage-gated sodium channels

ABSTRACT

Jaburetox (Jbtx) is an insecticidal peptide derived from *Canavalia ensiformis* urease, whose mechanism of action is not completely elucidated. We employed behavioral, electromyographical and electrophysiological protocols to identify the cellular and molecular targets involved in the Jbtx entomotoxicity in cockroaches and locusts. In *Nauphoeta cinerea*, Jbtx (32 μg/g) altered the locomotory behaviour inducing a significative decrease in the distance travelled followed by a significant increase in stopped time (52 ± 85 cm and 2573 ± 89 s, $p < .05$, $n = 40$). Jbtx (8 to 32 μg/g body weight, respectively) also increased the leg and antennae grooming activities ($p < .05$, n = 40, respectively). Jbtx (8 to 16 μg/g) induced a maximum neuromuscular blockade of 80.72% ($n = 6$, $p < .05$) and was cardiotoxic, decreasing the cockroach heart rate. The electrophysiological profiles of both muscle and nerve of *L. migratoria* showed that Jbtx (2.5×10^{-7} and 2.5×10^{-3} μg/ body weight) induced a significant increase in the amplitude of nerve action potentials ($n = 5$, $p < .05$). Voltage clamp analysis of Jbtx (200 nM) applied in *Xenopus laevis* oocytes heterologously expressed with Nav 1.1 channels showed a significant increase in the sodium currents. In conclusion, this work revealed that the entomotoxic activity of Jbtx involves complex behavioral alterations that begins with an initial activation of voltage-gated sodium channels.

1. Introduction

Chemical insecticides have long been used in a variety of situations, in our houses to kill domestic flies, cockroaches and other urban insects, in governmental programs to control insect-born diseases such as yellow fever, malaria and dengue or in agriculture to protect plants from herbivorous pests aiming to improve crop yield and food production (Zhu et al., 2016; Parween et al., 2016). In all these cases, there is an inherent concern related to the toxicity and bioaccumulation of these compounds, not only directly related to humans and domestic animals, but also in the environment (Damalas and Eleftherohorinos, 2011; Maurya and Malik, 2016). In 2007 about 3.5 million tons of chemical insecticides were used worldwide, mainly in developing countries, such as Brazil (EPA, 2017).These usages contribute to environmental threat affecting non-target beneficial species, therefore studies aiming to validate and/or elucidate the entomotoxic mechanisms of natural promising insecticide compounds are desirable.

Ureases (EC 3.5.1.5, urea amidohydrolase) are metalloenzymes that catalyze the hydrolysis of urea into ammonia and carbamate (Dixon et al., 1975). Ureases are natural insecticides widespread in plants and generally regarded as biosafe, since these proteins are present in large quantities in many edible species, particularly in legumes (Carlini &

Abbreviations: Jbtx, Jaburetox; JBU, Jack Bean Urease; CNTX, canatoxin; NCPS, *Nauphoeta cinerea* physiological saline; LMPS, *Locusta migratoria* physiological saline; Nav, voltage-gated sodium channel; BgNav1.1, *Blatella germanica* voltage-gated sodium channel; OA, octopamine; GABA, gamma-aminobutyric acid; SEG, sub-esophageal ganglion; GLU, glutamate; IGRs, insect growth regulator; mAPs, muscle action potentials; nAPs, nerve action potentials

* Corresponding author at: CIPBiotec, Campus São Gabriel, Federal University of Pampa, Av. Antônio Trilha, 1847, 97300000 São Gabriel, Brazil.
E-mail address: charistonbelo@unipampa.edu.br (C.A. Dal Belo).

https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.11.003
Received 16 June 2018; Received in revised form 30 September 2018; Accepted 3 November 2018
Available online 05 November 2018
0048-3575/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Ligabue-Braun, 2016). Jaburetox (Jbtx) is a recombinant peptide (91 aminoacids) representing an internal sequence of an isoform of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease (Mulinari et al., 2007; Postal et al., 2012). The entomotoxic effect of Jbtx was demonstrated using the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), the kissing bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduvidae). For a review on the entomotoxic effects of jaburetox, refer to (Stanisçuaski & Carlini, 2012; Carlini & Ligabue-Braun, 2016).

The mechanisms involved in the insecticidal activity of plant ureases or derived peptides have not been fully elucidated so far. *R. prolixus* and *T. infestans* fed on meals containing jaburetox exhibit impairment of diuresis and symptoms suggestive of neurotoxicities, such as uncoordinated movements of limbs and antenna and reversible paralysis in sub-lethal doses (Mulinari et al., 2007; Galvani et al., 2015). After injection into *T. infestans* hemocoell, the peptide was immunolocalized in the insect's central nervous system, where it caused pronounced inhibition of NO synthase and decreased NO levels (Galvani et al., 2015). In the *in vivo* cockroach (*Nauphoeta cinerea*) metathoracic coxal-adductor nerve–muscle preparation, a two-hour treatment with the peptide led to a complete neuromuscular blockade (Martinelli et al., 2014).

Studies on the behavioral effects of neurotoxicants are important not only to elucidate the modes of action of both novel or traditional insecticides, but also to understand how beneficial insects would be potentially affected by these compounds (Haynes, 1988). The evolution of behavioral resistance to insecticides is another important consideration, since selection may favor the target insects to avoid exposition to toxic compounds (Chareonviriyaphap et al., 2013; Dang et al., 2017). In this respect, cockroaches are primitive insects, easy to breed and maintain, and together locusts have been used in a wide range of studies of pharmacology and toxicology to understand the physiological aspects between insect and chemical compounds (Stanisçuaski & Carlini, 2012; Rodríguez et al., 2012; Stürmer et al., 2014; Carrazoni et al., 2018). In this work, we investigated, through a range of behavioral and electrophysiological protocols, the mechanism associated to the neurotoxic activity of the insecticide peptide Jbtx on the central and peripheral nervous system of two model insects, the cockroach *N. cinerea* (Blaberidae) and in the locust *Locusta migratoria* (Acrididae). We have identified possible functional cellular and molecular targets involved in the entomotoxic activity that could account for the lethal effect of this peptide.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

All experiments were performed using both sexes of adult *Nauphoeta cinerea* cockroaches (3–4 month after adult molt) and *Locusta migratoria* (adult 7-weeks-old). The cockroaches were reared under laboratory conditions of controlled temperature (22–25 °C) on a 12 h: 12 h light: dark cycle, with water and dog chow *ad libitum*. *Locusta migratoria* were reared under crowded conditions at 30 °C and 50% humidity, with a12h:12 h light: dark regimen, and fed on a diet of fresh wheat seedlings supplemented with bran. Complete description of animal nutrition and care is found at the supplementary material file of this manuscript.

2.2. Expression of the recombinant peptide Jaburetox (Jbtx)

The recombinant peptide Jaburetox was expressed and purified as previously described (Broll et al., 2017; Fruttero et al., 2016), with modifications. Briefly, *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL harboring the plasmid pET-23a:Jaburetox was cultured in 20 mL LB (Luria Bertani) Broth, supplemented with 1% glucose, 100 μg/mL ampicillin and 40 μg/mL chloramphenicol. The culture was grown overnight at 37 °C and 200 rpm. The pre-inoculum was inoculated in 1 L of autoinduction medium (10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l glycerol, 3.3 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 6.8 g/l KH_2PO_4, 7.1 g/l Na_2HPO_4, 0.5 g/l glucose and 2 g/l lactose, with 100 μg/mL ampicillin and 40 μg/mL chloramphenicol). The inoculated medium was cultured at 37 °C, 200 rpm, until absorbance reached 0.7 at 600 nm, then the temperature was lowered to 20 °C, and maintained under stirring at 200 rpm overnight. The culture was centrifuged at 8000 × *g* for 10 min. The cells were resuspended in 100 mL buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl and 20 mM imidazole), the cell suspension was sonicated (20 cycles of 1 min, 20 kHz frequency). The final cell lysate was centrifuged at 14,000 × *g* for 40 min at 4 °C and the supernatant was submitted to affinity chromatography (Broll et al., 2017). As last step of purification, Jbtx was submitted to a size exclusion chromatography using Superdex 200 26/600 (GE Healthcare) in 50 mM sodium phosphate pH 7.5, 1 mM EDTA and 1 mM TCEP. The fractions were pooled and concentrated in 3 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filter (Merk Milllipore) and stored at −20 °C. Before its use for incubations or injections, the peptide (Mr ~11 kDa) was dialyzed in 20 mM sodium phosphate buffer pH 7.4 using 3 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filter.

2.3. Reagents and solutions

All chemicals and reagents used were of the highest purity and were obtained from Sigma-Aldrich, Merck, Roche, Life Technologies or BioRad. Test solutions were prepared daily by dilution in a physiological saline for *Nauphoeta cinerea* (NCPS) or *Locusta migratoria* (LMPS), immediately before use. The NCPS or LMPS were carbonate-buffered solutions prepared with the following composition in mM, respectively: NCPS - NaCl, 214; KCl, 3.1; $CaCl_2$, 9; sucrose, 50; HEPES buffer, 5 and pH 7.2 (Stürmer et al., 2014); LMPS -NaCl 150; $CaCl_2$ 10; KCl 4; $MgCl_2$ 2; $NaHCO_3$ 4; HEPES 5; Sucrose 90 and Trehalose 5 (Orchard & Lange, 1986).

2.4. Biological assays

2.4.1. Behavioral assays

2.4.1.1. Experimental design for behavioral assays. All animals used on behavioral assays were chosen randomly and had no previous exposition to the environment until tests. The standard protocol for animal manipulation was followed strictly. The animals were only handled by an experimenter wearing gloves. The insects were taken one by one, right before the begging of experiments to avoid stressful conditions to be far from the insectary. Before the beginning of assays there was a five-minute round for exploratory time for each individual. The experiments were performed by a double blind to avoid tendentious results. Treatments were codified by numbers and randomly arrayed during the exploratory time of the first animal of the repetition. The injections were applied after exploratory time. All experiments were performed under controlled conditions of temperature and luminosity, during light time from 9:00 a.m. to 6 p.m. Right after each experiment, the experimental chambers were cleaned with ethanol 70% and distilled water. In locomotory activity assays it was taken 20 min recordings divided in cleaning, exploratory and observation time, using four animals placed individually in each chamber. For the grooming behavior activity, one repetition was taken as the observation of one animal, during 40 min long (cleaning, exploratory and observation time).

2.4.1.2. Locomotory activity. The locomotory activity of *N. cinerea* was measured by the analysis of behavioral endpoints such as travelled distance, immobile episodes (number of times that the animal remained immobile during the experiment) and rate of stopped times (interval of time the animal interrupted its locomotion path during the experiment). The experiments were carried out essentially as describe in (Leal et al., 2018). The behavioral parameters from the control insects (treated with saline) and Jbtx-treated individuals were

measured during 10 min. All treatment groups were tested in a repetition. The recording groups for each repetition comprised four animals of the same treatment group. The complete experimental time was of 20 min (5 min of cleaning, 5 min of exploratory behavior and 10 min of locomotion recordings). Experiments were recorded by IDTracker (Software, Polavieja lab, Cajal Institute,M, Spain) and analyzed by Matlab (Natick, MA, USA).

2.4.2. Grooming behavior recordings

Grooming behavior was monitored in *N. cinerea* cockroaches using an opaque plastic box (29 cm × 18 cm × 13 cm), with a clear plastic cover and was recorded with a camera for posterior analysis essentially as described by (StuïRmer et al., 2014). The data were collected manually and analyzed by Graphpad Prism 7.0 (Software, San Diego, CA, USA).

2.5. Semi-isolated cockroach heart preparation

An *in vivo* semi-isolated cockroach heart bioassay was mounted essentially as described by (De Freitas et al., 2016). Heartbeat frequency was monitored for 30 min under a stereoscopic microscope. Nine cockroaches were used for each group. In the control group, the hearts were bathed in saline solution only.

2.6. Electromyographical recordings

2.6.1. In vivo cockroach metathoracic coxal-adductor nerve-muscle preparation

The *in vivo* cockroach metathoracic-coxal adductor muscle preparation was used to analyze the effect induced by Jbtx at insect neuromuscular junctions as previously described in (Martinelli et al., 2014) and by (De Freitas et al., 2016). A protocol using chloral hydrate as a pharmacological tool was also carried out. Chloral hydrate is a mild sedative and hypnotic drug which directly activates gama-aminobutyric acid (GABA) receptors (Garrett & Gan, 1998).

2.7. Electrophysiological recordings

2.7.1. Measurement of muscle and nerve potentials

To record and understand the process of neuromuscular paralysis induced by Jbtx, the conduction of muscle potentials was analyzed using *L. migratoria* leg preparation as described by (Carrazoni et al., 2018), with some modifications. The muscle potentials of the tarsal muscles of the leg were recorded from an isolated leg. One leg of an adult animal was removed and placed on a platform with attached electrodes. The stimulation electrodes were positioned in the femur and the recording electrodes were connected near the tarsus (foot) with a ground electrode inserted in between. The different treatments were administered through a small incision in the cuticle of the femur using a Hamilton syringe in a final volume of 2.5 µl. Five concentrations of Jbtx were assayed 2.5×10^{-7} to 2.5×10^{-3} µg/body weight and controls were injected with LMPS. All preparations were recorded for 15 min prior to injection of Jbtx, to verify the integrity of the signals. Each group consisted of 5 animals ($n = 5$). Muscle potentials were evoked by electrical stimulation of the nerve using a Grass SD stimulator at a voltage of 5 V, frequency of 0.2 PPS and a duration of 0.5 ms. Action potentials from the nerve in the leg preparation of the locust can also be evoked by placing the stimulating electrode in the tibia near the tarsus and the recording electrodes in the femur. In this way, the larger muscle potential does not interfere with the recording of the nerve action potentials. In this modification, the action potentials are evoked in the axon near the tarsus and travel anteriorly to the femur where they are recorded. The potentials were recorded using an AM Systems model 1700 differential amplifier to amplify the signal with a high-pass filter of 1000 Hz and a low pass filter of 100 Hz. The signal conversion was done using an 8-channel Powerlab IDE converter and the signals were recorded using Chart software version 4 and later analyzed in Chart version 8. The amplitude of the muscle and nerve potentials was measured by averaging 6 muscles and nerve potentials every 5 min during the 60 min of recording.

2.7.2. Sodium channel expression and two-microelectrode voltage-clamp

For the expression of the voltage-gated sodium (Nav) channel of the cockroach *Blattella germanica* ($BgNa_V$ 1.1), the cRNAs were synthesized from linearized plasmids using the large-scale T7 mMESSAGE mMACHINE transcription kit (Ambion, Carlsbad, CA, USA). The resected oocytes lobes from female *Xenopus laevis* frogs were used to obtain the stages V-VI oocytes. The frog surgery was performed in the Aquatic Facility at the KU Leuven University and the usage of the frogs was in accordance with the license number LA1210239. To induce anaesthesia the animals were immersed in Tricaine (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) solution (1 g/L). The isolation procedure was described previously by (Koren et al., 1990; Liman et al., 1992). Oocytes (stages V-VI) were injected with 50 nL of the $BgNa_V$ 1.1cRNA using a micro-injector (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA). ND-96 solution was used for the oocytes incubation (in mM): 96 NaCl, 2 KCl, 2 $MgCl_2$, 1.8 $CaCl_2$, 5 HEPES (pH 7.4), supplemented with 50 mg/L gentamicin sulfate (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) and 180 mg/L theophylline (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA).

Sodium currents were recorded using the two-microelectrode voltage-clamp technique at room temperature (18–22 °C). The recordings were processed by a Gene Clamp 500 amplifier (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) and controlled by a pClamp data acquisition system (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Whole-cell currents from oocytes were recorded 1–7 days after injection. Current and voltage electrodes had resistances from 0.7 to 1.5 MΩ and were filled with 3 M KCl. Currents were sampled at 20 kHz and filtered at 1 Hz using a four-pole low-pass Bessel filter. Leak subtraction was performed using a -P/4 protocol.

For the assays, 200 nM of Jbtx was added directly to the recording chamber. For the activation protocols, 100 ms test depolarization, ranging from −90 mV to +70 mV, were applied from a holding potential of −90 mV, in 5 mV increments at 5 s intervals. For the inactivation protocols, double pulses were employed, with a conditioning pulse applied from a holding potential of −100 mV to a range of potentials from −90 mV to +60 mV, in 5 mV increments for 100 ms, immediately followed by a test pulse to 0 mV (or − 5 mV).

Each experiment was performed 5-times. Data were analyzed using Clampfit 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA, 2010) and OriginPro 9.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA, 2012).

2.8. Statistical analysis

Data were expressed as mean ± S.E.M. The experimental groups were analyzed by one-way/ two-way ANOVA and MANOVA, followed by Tukey's or Dunnet test as *post hoc*. Testing of variance-homogeneity and normal distribution were accomplished by using Shapiro-Wilk test. All the statistical analyses were performed by using GraphPad Prism 7.0. (Software, San Diego, CA, USA). The values were considered significant when $p \leq .05$.

3. Results

3.1. Locomotor behavior alteration induced by Jbtx in cockroaches

Overall the administration of Jbtx in different doses (8, 16 and 32 µg/g) caused an impairment of *Nauphoeta cinerea* natural exploratory behavior, during the 10 min trials (Fig. 1A–C). In this set of protocols, the values for the control saline group of total distance travelled, immobile episodes and stopped times were 267 ± 18 cm, 884 ± 84 and 78 ± 8 s, respectively ($n = 40$). When Jbtx 16 and

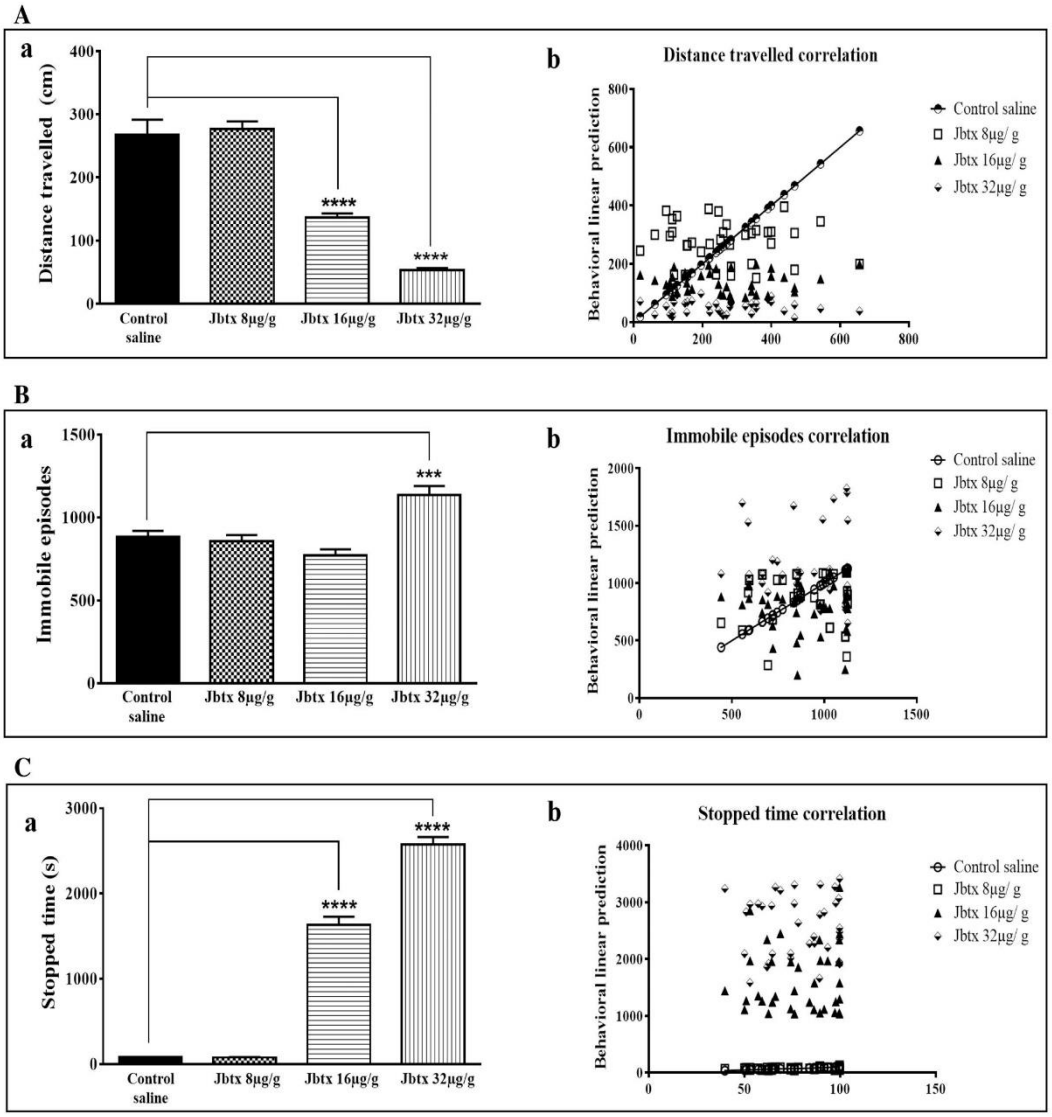


Fig. 1. Influence of Jbtx on the locomotory pattern of *Nauphoeta cinerea*. Figure shows the graphs related to the analysis of different parameters of the insect exploratory activity. (Aa) significant decrease in the distance travelled of cockroaches treated with Jbtx 16 µg/g and 32 µg/g body weight, respectively. (Ab) shows the MANOVA behavioral linear prediction for distance travelled interaction indicating a correlation between the highest doses of treatments staying below average when compared to the control. (Ba) shows a decrease in the parameters of immobile episodes of cockroaches treated with the highest dose. Bb: shows the MANOVA behavior linear prediction for immobile episodes indicating a significance only for the highest dose. (Ca) shows a decrease in the parameter of stopped time on cockroaches. Cb, MANOVA behavioral linear prediction for stopped time interactions indicating a significant effect for the highest dose of Jbtx. Data were expressed as mean ± S.E.M of recordings conducted with 40 animals per group. Statistical analysis was performed by One-Way ANOVA and MANOVA followed by the Tukey's test and a Shapiro-Wilk test, respectively. ***$p < .001$; ****$p < .0001$.

32 µg/g was administered, there was a maximum decrease in the animal distance travelled of 52 ± 85 cm and 136 ± 62 cm, respectively, in comparison with the control saline group (n = 40, $p < .05$) (Fig. 1Aa). The analysis of the number of immobile episodes and the stopped times also revealed a significant increase of 1135 ± 67and 2573 ± 89 s, with Jbtx 32 µg/g (Fig. 1Ba and Ca) (n = 40, $p < .05$, respectively). The figures 1Ab, 1Bb and 1Cb show the individual behavioral correlation events between treatments in all analyzed behavioral variables.

3.2. Effect of Jbtx on the cockroach heart rate

The addition of Jbtx (8, 16 and 32 µg/ 200 µl saline) to the cardiovascular preparations of *N. cinerea* induced cardiotoxicity, showing a dose-dependent negative chronotropic effect. In the control saline group the mean value for heart rate was 76.81 ± 5 beats/min, in 30 min recordings ($n = 9$) (Fig. 2). While no effect was seen at the lower dose, treatment with Jbtx 16 µg/ 200 µl induced a decrease of 30 ± 3% in chronotropic responses ($p < .05$ compared to the control

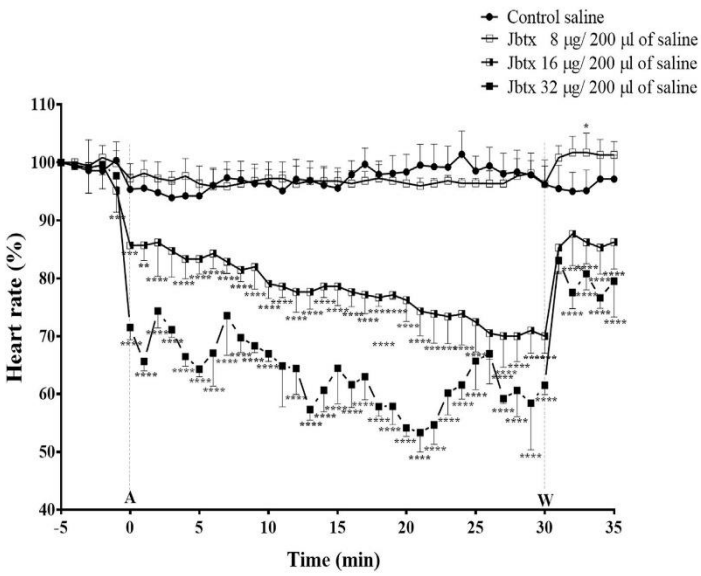


Fig. 2. Negative chronotropic effect induced by Jbtx on *Nauphoeta cinerea* hearts. In the graph, each point corresponds to the mean ± S.E.M. of the insect heart rate relative to the initial state (−5 min), measured during 30 min after exposition to Jbtx (8-32 µg/ 200 µl of control saline). Note that Jbtx (16 and 32 µg/ 200 µl) slows cardiac rhythm in 30 min of the experiment. The statistical analyses were performed by Two-way ANOVA followed by the Tukey's test. $^{*}p < .05$ ($n = 9$); $^{**}p < .01$; $^{***}p < .001$; $^{****}p < .0001$, (n = 9).

saline, n = 9), in 30 min recordings (Fig. 2A). The highest concentration of Jbtx (32 µg/200 µl) decreased even further the chronotropic response to reach 52.5 ± 2% at the end of the 30 min recordings compared to the saline control (n = 9, $p < .05$). For all treatments, the washout of the preparation with saline solution partially reversed the effects induced by the peptide.

3.3. Effect of Jbtx on grooming activity of N. cinerea

The effect of Jbtx on the insect grooming activity of antennae and legs were evaluated. In saline-injected cockroaches, the mean time of continuous leg grooming was 153.46 s/30 min and 70.63 s/30 min, for the antennae ($n = 32$, respectively) (Fig. 3). An increase of about 2.5 fold in the time spent on leg grooming activity was observed for all the tested Jbtx doses (8, 16 and 32 µg/g of body weight), but no difference among the tested doses was seen. The administration of Jbtx increased the time (~50%) spent on antennae grooming as well, seen at the doses of 8 µg and 32 µg peptide/g insect body weight, respectively. In insects, octopamine is a neurotransmitter responsible for modulating the leg grooming activity. As expected, treating the insects with octopamine increased the time spent on leg grooming to 198.4 s/30 min ($n = 32$; $p < .05$ compared to saline control) but did not alter the grooming activity of antennae (Fig. 3). These results have shown that Jbtx (8 µg/g) alters the leg grooming activity mimicking octopamine (15 µg/g), thereby suggesting that this peptide is interfering centrally on the octopaminergic signaling.

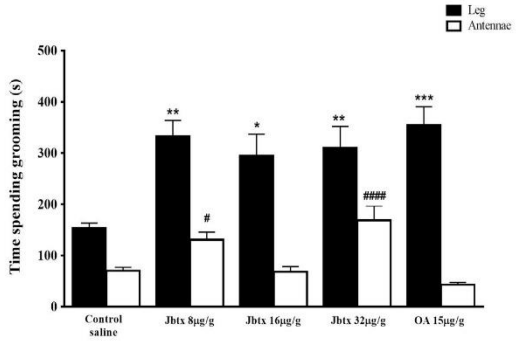


Fig. 3. Modulation of *Nauphoeta cinerea* grooming behavior by Jbtx. The cockroaches were injected with Jbtx (8, 16 and 32 µg/g body weight) and examined for grooming activity immediately after injection. To verify the octopaminergic interaction with grooming, octopamine (OA, 15 µg/g), was assayed. The grooming activity was recorded during 30 min and the results were expressed as mean ± S.E.M. of the total time of grooms (s) in 30 min. The data were analyzed by One-way ANOVA followed by the Dunnett's test. * comparison of leg grooming with the control; # compares antennae grooming with the control. $^{*}p < .05$; $^{**}p < .01$; $^{***}p < .001$; $^{\#}p < .05$; $^{\#\#\#\#}p < .0001$, $n = 32$, respectively.

3.4. Neuromuscular blockade induced by Jbtx at in vivo cockroach nerve-muscle preparation

Jbtx was bioassayed on coxal-adductor nerve-muscle preparations. The administration of saline solution alone did not interfere with neuromuscular responses during 120 min recordings ($n = 6$) (Fig. 4A). The injection of Jbtx induced a dose-dependent inhibition of the twitch tension in 120 min of recording. At 8 and 16 µg/g insect body weight, there were 80.72% and 75.66% (n = 6 each dose, $p < .05$ compared to controls) blockade of the twitch tension, respectively. Co-treatment of the insects with Chloral hydrate (40 µg/g) and Jbtx (8 µg/g) induced 91.89% inhibition of the twitches ($p < .05$, n = 6) (Fig. 4B).

3.5. Jbtx effect on the muscle and nerve action potentials in tarsal muscle of Locusta migratoria

When Jbtx (2.5×10^{-7} µg/ body weight) was assayed, there was a gradual decrease in the muscle action potential amplitude reaching a significant decrease of approximately 20% at 15 min ($n = 5$, $p < .05$) (Fig. 5A–C). The muscle potential amplitude returned to pre-injection parameters after 20 min and then remained unchanged for the rest of the recording period. When the nerve action potentials were recorded, in the presence of Jbtx (2.5×10^{-3} µg/body weight) (Fig. 6A), there was a biphasic effect on the amplitude of the potentials, characterized by a significant decrease of about 20% and 30%, respectively (Fig. 6B). After 30 min the amplitude of the potentials returned to the resting parameters. The same biphasic effect was observed with Jbtx

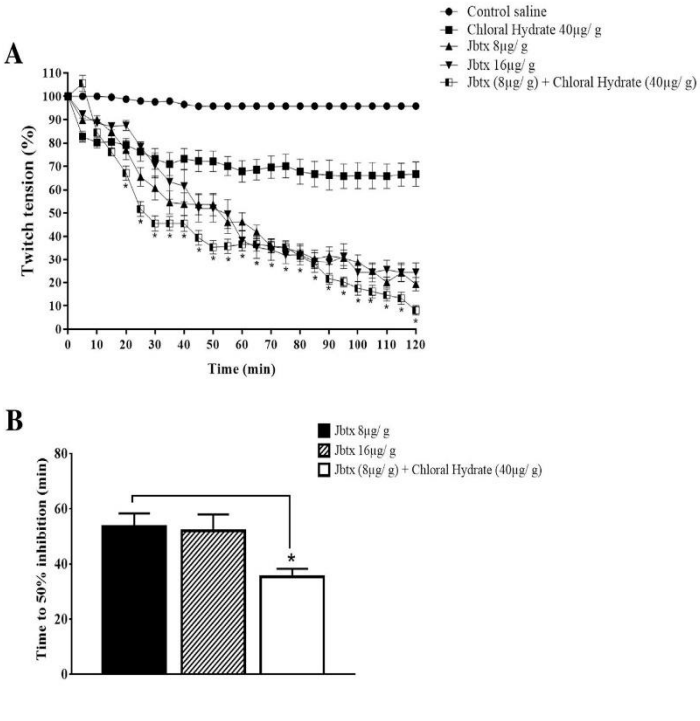


Fig. 4. *In vivo* neuromuscular blockade induced by Jbtx in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. (A), shows the means ± S.E.M of the dose-response effect of Jbtx (8 and 16 µg/ g of body weight), and the treatment with Chloral Hydrate (40 µg/ g), in 120 min recordings. Statistics was performed by Student test. * $p < .05$ ($n = 5$). Panel (B) shows the time to 50% inhibition of the muscle twitches. Student test. * $p < .05$ ($n = 6$).

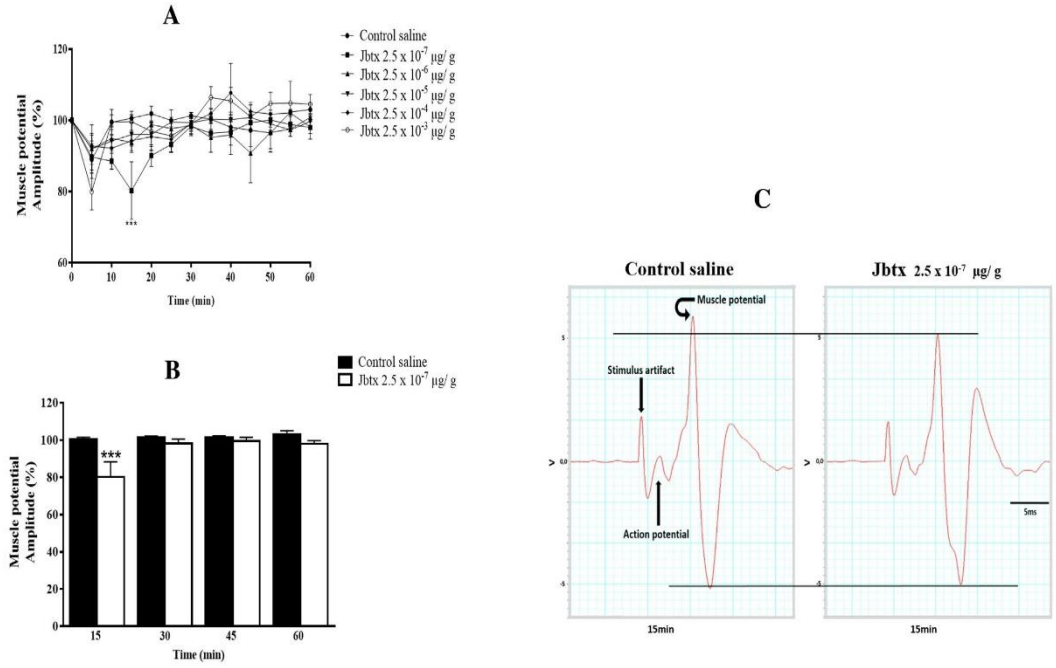


Fig. 5. Effect of Jbtx on the amplitude of the muscle action potentials (mAPs) in the leg of *Locusta migratoria*. Panel (A) shows the mean ± S.E.M of the percentage of the APs under Jbtx (2.5×10^{-7} to 2.5×10^{-3} µg/ body weight) treatment and control saline, during 60 min recordings. Statistics were performed by Two-way ANOVA, followed by the Tukey test as *post hoc*; *** $p < .01$ (n = 5). (B), 20% reduction on mAPs amplitude after 15 min of Jbtx (2.5×10^{-7} µg/ body weight) administration. Statistics were performed by One-way ANOVA, followed by the Tukey test. *** $p < .01$ (n = 5). Panel (C) shows representative recordings of mAPs from *L. migratoria* leg preparations in presence of Jbtx (2.5×10^{-7} µg / body weight) and saline, at 15 min.

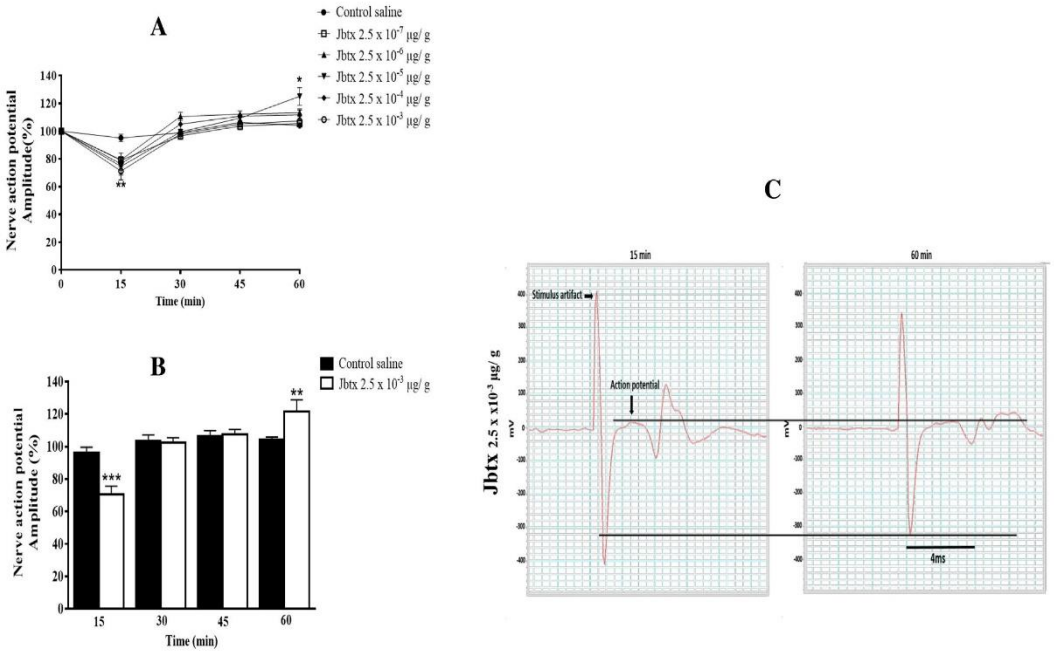


Fig. 6. Effect of Jbtx on the amplitude of the nerve action potentials (nAPs) from *Locusta migratoria* legs. On panel (A), each point represents the mean ± S.E.M of the percentage of the amplitude of the APs under the effects of Jbtx (2.5×10^{-7} to 2.5×10^{-3} µg/ body weight), in 60 min recordings. Statistics were done by Two-way ANOVA, followed by the Tukey test. *** $p < .01$ (n = 5). On (B), 30% reduction in the nAPs amplitude at the first 15 min after Jbtx (2.5×10^{-3} µg/ body weight), followed by a 20% increase in 60 min. Statistics with One-way ANOVA, followed by Tukey test. *** $p < .01$ (n = 5). Panel (C), shows representative traces illustrating the effects of Jbtx (2.5×10^{-3} µg/ body weight) on nerve action potentials recorded from *L. migratoria* leg preparations at 15 and 60 min.

(2.5×10^{-3} µg/body weight), in 60 min recordings (n = 5, $p < .05$). In these experiments it was worth to be noticed that the tarsus stopped twitching, even though the nerve and muscle action potentials were not greatly affected.

3.6. Jbtx effect on the Nav channel of the cockroach Blattella germanica ($BgNa_V$ 1.1)

In order to evaluate the interaction of Jbtx with insect voltage-gated sodium channels, electrophysiological recordings of voltage clamp, using *X. laevis* oocytes co-expressed with *Blattella germanica* $BgNa_V$ 1.1 were carried out (Fig. 7). The application of 200 nM of Jbtx resulted in a significant increase of about 50% in the peak current (Fig. 7A, B and C). The analysis of the I/V curves showed no alteration in the kinetic of activation, since no shift in the midpoint of the curves was observed in the presence of Jbtx (Fig. 7D).

4. Discussion

In this work, we have brought to light novel information about the mechanisms involved in the entomotoxic activity of Jbtx, a toxic peptide derived from *C. ensiformis* urease. The insect models *N. cinerea*, a cockroach, and the locust *L. migratoria* were chosen for this study. In sublethal doses, Jbtx caused profound alterations in the insect behavior and in the electrophysiological parameters that will be discussed in detail therein.

The importance of studying sublethal concentrations of an insecticide relies on the interference those compounds may cause on the chemical communication systems of an insect thereby promoting behavioral alterations that could disrupt reproduction, host-finding, feeding, locomotion and dispersal (Haynes, 1988). Although not lethal to *N. cinerea* (De Freitas et al., 2016) in our experimental approaches, treatment with Jbtx affected the insect's locomotory activity by decreasing the distance travelled and concomitantly altering immobile episodes and the stopped time parameters. We have previously shown that Jbtx and the jack bean urease (JBU), from which Jbtx is derived, interfere negatively on insect muscle twitch tensions (Martinelli et al., 2014; De Freitas et al., 2016). These effects suggested that Jbtx, besides acting directly on the insect nervous system, also targets insect neuromuscular junctions, thus confirming its neurotoxic nature.

Treatment with Jbtx increased the grooming behavior of *N. cinerea*, affecting more intensively grooming of the legs than of the antennae. Grooming in insects has the function of cleansing the external surface of the body as well as other functions which include cutting behavior, social signaling, displacement, and excitation activity (Spruijt et al., 1992; Zhukovskaya et al., 2013). The monoaminergic system is involved on insect's grooming behavior. This system controls locomotion, processing of sensory information in the periphery, central pattern generators, and processing of information within the brain (Zhukovskaya et al., 2013; Mustard et al., 2010). Although grooming behavior in insects is not fully elucidated, it has been shown that the neurotransmitter dopamine is more associated with antennae grooming activity, whereas octopamine is associated with prothoracic leg grooming (Fruttero et al., 2016; Orchard & Lange, 1986; Zhukovskaya et al., 2013; Mustard et al., 2010). In our experimental conditions, treatment of the animals with Jbtx mimicked the increase in leg grooming promoted by octopamine, suggesting an influence of Jbtx on octopaminergic signaling within the central nervous system. In this study the grooming of antennae was also significantly increased upon treatment with Jbtx, at certain doses. Recently, our research group has demonstrated that the antennae grooming was not altered by the treatment of *N. cinerea* with JBU, the urease from which Jbtx derives

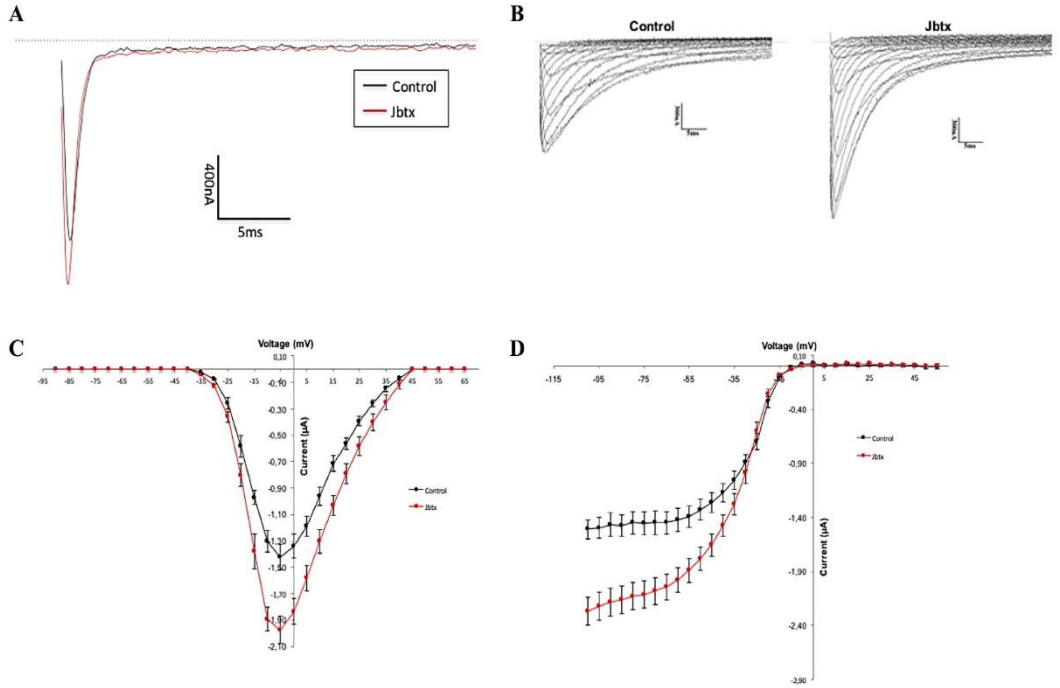


Fig. 7. Effect of Jbtx on sodium currents from *Xenopus oocytes* expressing BgNaV 1.1 channels using two electrode voltage clamp. (A), representative whole-cell current traces of BgNaV 1.1 in control (black trace) and in 200 nM Jbtx treatment. (B), current traces were evoked by 100 ms depolarizations stepping from a holding potential of −90 to +10 mV in 5 mV increments. Traces of a representative experiment are shown in control (left panel) and in 200 nM Jbtx-treated (right panel). (C), activation parameters; (D), inactivation parameters. The peak currents are plotted as a function of the test voltage in the absence (black trace) and the presence (red trace) of 200 nM Jbtx. Representative traces of five independent experiments (n = 5). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(De Freitas et al., 2016). A possible explanation for this discrepant result is the much higher molecular mass of JBU (540 kDa) as compared to that of Jbtx (11.04 kDa), which could potentially prevent or reduce considerably the traversing of JBU into the insect brain to reach the sub-esophageal ganglion, which is likely to be involved with antennae grooming (Zhukovskaya et al., 2013; Gal & Libersat, 2010).

Jbtx is cardiotoxic to *N. cinerea* cockroaches, inducing a negative chronotropic effect. The heart of insects is essentially myogenic and its electrical activity is generated by striated muscle cells submitted to chronotropic and inotropic modulation by hormones, neurotransmitters and other cardioactive peptides (Feliciano et al., 2011). The cardiotoxic effect of Jbtx on *N. cinerea*'s heart is similar to those induced by the antidepressant mianserin and the alpha-adrenergic blocker phentolamine (Papaefthimiou & Theophilidis, 2011). Octopamine, a neuromodulator (Farooqui, 2012), is also involved in the regulation of heart beats in insects, since octopamine-containing axons have nerve endings in the pericardial organs (Enan, 2001; Evans, 1980). Besides the effect seen on grooming behavior, the alteration on the insect cardiac rhythm also suggests that Jbtx may specifically alter the octopaminergic neurotransmission (Papaefthimiou & Theophilidis, 2011). Our goal here did not include to explore in depth the pharmacology of Jbtx's effects on the heart of *N. cinerea*. However, at this point, it is possible to conclude that the insect heart (and possibly other pulsatile organs) is involved in the entomotoxic activity of Jbtx as a direct target of the peptide's effects.

Jbtx induced a progressive blockage of the muscle twitches in *N. cinerea*. This neuromuscular blocking effect of Jbtx was previously demonstrated in *Phoetalia pallida* cockroaches (Martinelli et al., 2014). Insect neuromuscular junctions work with two main neurotransmitters, glutamate (GLU), the main excitatory neurotransmitter and gamma-aminobutyric acid (GABA), the main inhibitory neurotransmitter, whose receptors appear to be spread throughout the muscle fiber (Enan, 2001; Evans, 1980). Here, treatment of cockroaches with chloral hydrate, reinforced the neuromuscular blocking effect of Jbtx. This result suggests a direct activity of Jbtx at the cockroach neuromuscular junctions, potentially by activation of GABA neurons (Garrett & Gan, 1998).

Our results also demonstrated that Jbtx caused a significant decrease in the amplitude of muscle and nerve action potentials in a *L. migratoria* leg preparation, to block muscle twitch. Alterations in the amplitude of a muscle or neuron action potential can be achieved not exclusively, but in part, by the interaction of neurotoxins with six different binding sites of sodium channels (Cestèle & Catterall, 2000; Dong, 2007; dos Santos et al., 2016; Wang & Wang, 2003). Blocking the sodium conductance, a negative shift in the voltage-dependence of activation, slowing down of inactivation or an alteration of ion selectivity are the most common results of the binding of neurotoxins to sodium channels (Stevens et al., 2011). Inhibition of activation is another mechanism involved in the effect of neurotoxins on sodium channels, as do brevetoxins on the binding site five of sodium channels (Stevens et al., 2011).

In this study, Jbtx induced a significant increase in the amplitude of sodium currents, evoked in *X. laevis* oocytes overexpressing BgNaV 1.1 channels from *Blattella germanica*. Therefore, the decrease in the amplitude of action potentials seen in the *L. migratoria* leg preparations can be a result of an increased sodium influx in excitable membranes (Stevens et al., 2011). These data offer a key for understanding the effects of Jbtx on the amplitude of action potentials and the peptide's

effects on the insect's central and peripheral nervous systems. However, since Jbtx did not induce any facilitatory effect on *Phoetalia pallida* and *N. cinerea* muscle twitch tensions nor an increase of the action potentials amplitude in *L. migratoria*, the effects of the peptide on voltage-gated sodium channels appear elusive. Because the electrophysiological techniques employed were not sophisticated, the increasing phase of the action potential in *in situ* preparations could be masked making only the secondary run down apparent.

Jbtx was previously shown to cause leakage of carboxy fluorescein entrapped inside liposomes but without lysing them (Barros et al., 2009). Later on we described that JBU and Jbtx form cation-selective ion channels in planar lipid bilayers with conductances in the range found for physiological potassium channels (Piovesan et al., 2014). Moreover, JBU and Jbtx are able to insert themselves into the lipid bilayers of multilamellar liposomes, thereby affecting physicochemical properties such as the number of lamellae and the membrane's fluidity (Micheletto et al., 2017). Our data showing the absence of a fast decrease in the resting membrane potential during the voltage clamp protocols suggest that, even if a pore forming activity could be involved in Jbtx's entomotoxicity, the main component to its neurotoxicity appears to involve alteration of the gating properties of sodium channels. Combining voltage clamp techniques and studies to explore pharmacologically sodium channels in the presence of Jbtx could pave the way to reveal the molecular site targeted by Jbtx's activity on insect sodium channels.

5. Conclusion

Our results indicate that the entomotoxic activity of Jaburetox involves significant changes in the behavioral patterns of insects and alterations in both central and peripheral nervous systems. The toxic effect begins with an initial depolarization of the metathoracic ganglion as a result of activation of voltage-gated sodium channels. Following depolarization of the ganglion there is a signal transmission to peripheral and central nerves that is orchestrated by the release of the association neurotransmitter octopamine. The alterations in behavior may be reinforced by a cardiotoxic activity. This initial electrophysiological alteration boosts the octopaminergic modulation resulting in a dopaminergic exacerbation, at the insect central nervous system and a concomitant GABAergic signaling at the insect neuromuscular junctions. Further biochemical, electrophysiological and molecular attempts are required to further elucidate the complexity of actions of Jbtx on the insect nervous system.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, and by means of the Edital 063/2010 Toxinologia. This work was conducted during a scholarship supported by the International Cooperation Program CAPES/DFATD at the University of Toronto Mississauga, ON, Canada. D. S. dos Santos would like to thank Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES for the fellowship CAPES/PROEX number 88882.182151/2018-01.

Conflict of interests

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

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.11.003.

References

Barros, P.R., Stassen, H., Freitas, M.S., Carlini, C.R., Nascimento, M.A.C., Follmer, C., 2009. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 1794, 1848–1854. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.001.

Broll, V., Martinelli, A.H.S., Lopes, F.C., Fruttero, L.L., Zambelli, B., Salladini, E., Dobrovolska, O., Ciurli, S., Carlini, C.R., 2017. Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 159, 849–860. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.053.

Carlini, C.R., Ligabue-Braun, R., 2016. Ureases as multifunctional toxic proteins: a review. Toxicon 110, 90–109. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.020.

Carrazoni, T., Nguyen, C., Maciel, L.F., Delgado-Cañedo, A., Stewart, B.A., Lange, A.B., Dal Belo, C.A., Carlini, C.R., Orchard, I., 2018. Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions. Pestic. Biochem. Physiol. 146, 63–70. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.009.

Cestèle, S., Catterall, W.A., 2000. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. Biochimie 82, 883–892. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01174-3.

Chareonviriyaphap, T., Bangs, M.J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V., Ngoen-Klan, R., 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. Parasit. Vectors 6, 1–28.

Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. Int. J. Environ. Res. Public Heal. 8, 1402–1419. https://doi.org/10.3390/ijerph8051402.

Dang, H.Q., Zhou, Q., Rowlett, V.W., Hu, H., Lee, K.J., Margolin, W., Li, Z., 2017. Proximity interactions among basal body components in *Trypanosoma brucei* identify novel regulators of basal body biogenesis and inheritance hung. Am. Soc. Microbiol. 8, 1–15.

De Freitas, T.C., de Heberle, M.Á., Perin, A.P., Zanatta, A.P., Rodrigues, P.V., Dos Santos, F.D.M., Almeida, C.G.M., Santos, D.S., Pinto, P.M., Da Costa, J.C., Carlini, C.R., Dal, 2016. Central and peripheral neurotoxicity Induced by the Jack Bean Urease (JBU) in Nauphoeta cinerea cockroaches. Toxicolofy. 368–369, 162–171. https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.09.007.

Dixon, N.E., Gazzola, T.C., Blakeley, R.L., Zermer, B., 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. J. Am. Chem. Soc. 97, 4131–4133.

Dong, K., 2007. Insect sodium channels and insecticide resistance. Invertebr. Neurosci. 7, 17–30. https://doi.org/10.1007/s10158-006-0036-9. (Insect).

dos Santos, D.S., Carvalho, E.L., De Lima, J.C., Breda, R.V., Oliveira, R.S., De Freitas, T.C., Salamoni, D., Domingues, M.F., Piovesan, A.R., Boldo, T., De Assis, D.R., Costa, J., Dal Belo, C.A., 2016. Bothriurus bonariensis scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems. Chem. Biol. Interact. 256, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.08.008.This.

Enan, E., 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comp. Biochem. Physiol. Part C. 130, 325–337.

EPA, 2017. Pesticide news story: EPA releases report containing latest estimates of pesticide use in the United States. US Enviromental Prot. Agency.

Evans, P.D., 1980. Biogenic arnines in the insect nervous system. Adv. In Insect Phys. 15, 317–473.

Farooqui, T., 2012. Review of octopamine in insect nervous systems. Open Access Insect Physiol. 4, 1–17. https://doi.org/10.2147/OAIP.S20911.

Feliciano, D.F., Bassani, R.A., Oliveira, P.X., Bassani, J.W.M., 2011. Pacemaker activity in the insect (T. molitor) heart: role of the sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 301, 1838–1845. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00089.2011.

Fruttero, L.L., Moyetta, N.R., Uberti, A.F., Grahl, M.V.C., Lopes, F.C., Broll, V., Feder, D., Carlini, C.R., 2016. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. Parasit. Vectors 9, 1–14. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1710-3.

Gal, R., Libersat, F., 2010. On predatory wasps and zombie cockroaches. Commun. Integr. Biol. 3, 458–461. https://doi.org/10.4161/cib.3.5.12472.

Galvani, G.L., Fruttero, L.L., Coronel, M.F., Nowicki, S., Demartini, D.R., Defferrari, M.S., Postal, M., Canavoso, L.E., Carlini, C.R., Settembrini, B.P., 2015. Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1850, 255–262. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.008.

Garrett, K.M., Gan, J., 1998. Enhancement of gaba-aminobutyric acid a receptor activity by alfa-chlorase. J. Pharmacol. Exp. Ther. 285, 680–686.

Haynes, K.F., 1988. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. Annu. Rev. Entomol. 33, 149–168. https://doi.org/10.1146/annurev.en.33.010188.001053.

Koren, G., Liman, E.R., Logothetis, D.E., Nadal-Ginard, B., Hess, P., 1990. Gating mechanism of a cloned potassium channel expressed in frog oocytes and mammalian cells. Neuron 4, 39–51. https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90442-I.

Leal, A.P., Oliveira, R.S., Perin, A.P.A., Borges, B.T., De Brum Vieira, P., Dos Santos, T.G., Vinadé, L., Valsecchi, C., Dal Belo, C.A., 2018. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in Nauphoeta cinerea cockroaches: an octopamine-like modulation. Pestic. Biochem. Physiol. 0–1. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.016.

Liman, E.R., Tytgat, J., Hess, P., 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K+ channel determined by construction of multimeric cDNAs. Neuron 9, 861–871. https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90239-A.

Martinelli, A.H.S., Kappaun, K., Ligabue-Braun, R., Defferrari, M.S., Piovesan, A.R., Stanisçuaski, F., Demartini, D.R., Dal Belo, C.A., Almeida, C.G.M., Follmer, C., Verli, H., Carlini, C.R., Pasquali, G., 2014. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1840, 935–944. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.010.

Maurya, P.K., Malik, D.S., 2016. Bioaccumulation of xenobiotics compound of pesticides in riverine system and its control technique: a critical review. Jr. Ind. Pollut. Control. 32, 580–594.

Micheletto, Y.M.S., Da Silveira, N.P., Dalbó, A.G., Giacomelli, F.C., Filho, N.L.D., Frizon, T.E.A., Marques, C.M., Schroder, A.P., 2017. Study on the application of electric field to giant vesicles comprised of 1, 2-dilauroyl- Sn - glycero-3-phosphatidylcholine using optical fluorescence microscopy. Mater. Res. 20, 34–35.

Mulinari, F., Stanisçuaski, F., Bertholdo-Vargas, L.R., Postal, M., Oliveira-Neto, O.B., Rigden, D.J., Grossi-De-Sá, M.F., Carlini, C.R., 2007. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. Peptides 28, 2042–2050. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.009.

Mustard, J.A., Pham, P.M., Smith, B.H., 2010. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee Julie. J. Insect Physiol. 56, 422–430. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.018.Modulation.

Orchard, I., Lange, A.B., 1986. Neuromuscular transmission in an insect visceral muscle. J. Neurobiol. 17, 359–372. https://doi.org/10.1002/neu.480170502.

Papaefthimiou, C., Theophilidis, G., 2011. Octopamine — a single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): acceleration vs. inhibition. J. Insect Physiol. 57, 316–325. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.11.022.

Parween, T., Jan, S., Mahmooduzzafar, S., Fatma, T., Siddiqui, Z.H., 2016. Selective effect of pesticides on plant-a review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 56, 160–179. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.787969.

Piovesan, A.R., Martinelli, A.H.S., Ligabue-Braun, R., Schwartz, J., Carlini, C.R., 2014. Canavalia ensiformis urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. Arch. Biochem. Biophys. 547, 6–17. https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.006.

Postal, M., Martinelli, A.H.S., Becker-Ritt, A.B., Ligabue-Braun, R., Demartini, D.R., Ribeiro, S.F.F., Pasquali, G., Gomes, V.M., Carlini, C.R., 2012. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. Peptides 38, 22–32. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010.

Rodríguez, V., Mori, B., Dörr, F.A., Dal Belo, C.A., Pinto, E., 2012. Effects of a cyanobacterial extract containing anatoxin-a (s) on the cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans*. Brazilian J. Pharmacogn. 22, 775–781.

Spruijt, B., Hol, T., Rousseau, J., 1992. Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique. Physiol. Behav. 51, 747–752.

Stanisçuaski, F., Carlini, C.R., 2012. Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. Toxins (Basel). 4, 55–67. https://doi.org/10.3390/toxins4020055.

Stevens, M., Peigneur, S., Tytgat, J., 2011. Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels. Front. Pharmacol. 2, 1–13. https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00071.

Stürmer, G.D., De Freitas, T.C., Heberle, M. de A., Assis, D.R., Vinadé, L., Pereira, A.B., Franco, J.L., Dal Belo, C.A., 2014. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. Ecotoxicol. Environ. Saf. 109, 56–62. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.006.

Wang, G.K., Wang, S.-Y., 2003. Veratridine block of rat skeletal muscle Nav1.4 sodium channels in the inner vestibule. J. Physiol. 548, 667–675. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.035469.

F. Zhu, L. Lavine, S. O'Neal, M. Lavine, C. Foss, D. Walsh, Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems, Insects. 7 (2016) 1–30. doi:https://doi.org/10.3390/insects7010002.

Zhukovskaya, M., Yanagawa, A., Forschler, B.T., 2013. Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. pp. 609–630. https://doi.org/10.3390/insects4040609.

3.2.1Material Suplementar

1. Maintenance conditions for *Locusta migratoria*

Locusts were reared at aluminum framework cages (40 x 46 x 30 cm / width x height x depth), perforated sides and floor (Fig. 1). Sliding acrylic front. Egg-laying plastic tubes (10 cm deep 3 cm wide) sand filled. Top heater bulb with on-off switch 60 W.

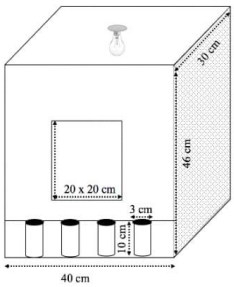


Figure 1. The representative illustration of the Locust's cage.

Approximately 40 pairs of locusts were maintained in each cage under crowded conditions (0.001 animal/cm^3) on a 12 h light: l2 h dark regime, 50% of Humidity and fed on freshly grown wheat supplemented with bran (Belanger and Orchard, 1992; Carrazoni et al., 2018; Hamilton, 2009; Kennedy, 1937; Lange and Orchard, 1984, 1986; Lange et al., 1995; Orchard and Lange, 1984) Table 1.

Table 1. The nutrient content of wheatgrass depends on the proportion in the plant (Padalia et al., 2010) and wheat bran contents per kg of dry matter basis except for water (Oonincx and van der Poel, 2011).

Nutrient	*Wheatgrass*	*Wheat bran*
Water	95 g	110 g
Energy		13 MJ
Protein		180 g
Fat, total	0.06 g	45 g
Carbohydrate	2 g	543 g
Sugars, total	0.8 g	19 g
Fiber, total dietary	<0.01 g	461 g
Calcium	24.2 mg	1.5 g
Copper		13 mg
Iron	0.61 mg	117 mg
Magnesium	24 mg	4.5 g
Phosphorus	75.2 mg	13 g
Potassium	147 mg	15 g
Selenium	<1 ppm	861 mcg
Sodium	10.3 mg	0.3 g
Zinc	0.33	81 mg
Carotene, beta		67 mg
Lutein + zeaxanthin		2,663 mg

2. Maintenance conditions for *Nauphoeta cinerea*

Approximately 500 pairs of cockroaches (0.04 animals/cm^3) were reared under crowded conditions at polypropylene box (41.4 x 16.8 x 34.4 cm - width x height x depth) (Figure 2), with water and food *ad libitum* (Table 2) at controlled temperature and lighting (± 25 °C and 12-hour light/dark cycles) and 30% humidity (Carrazoni et al., 2016, 2018; Leal et al., 2018).

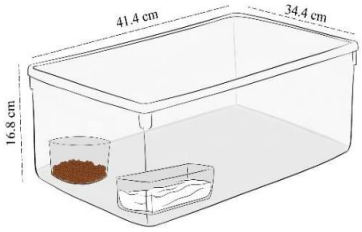


Figure 2. Representative illustration of the cockroach maintenance box.

Table 2. Nutrient content of dog food (Famintus® – MENPET Alimentos) per kg.

Nutrient	*[ ]*
Calcium	*22g/kg*
Ethereal extract	60g/kg
Phosphorus	*9g/kg*
Fibrous matter	60g/kg
Mineral matter	*120g/kg*
Crude protein	180g/kg
Moisture	*120g/kg*
Choline	1200mg/kg
Manganese	*55mg/kg*
Niacin	40mg/kg
Vitamin A	*1000UI/kg*
Selenium	0,1mg/kg
Vitamin K3	*3mg/kg*
Vitamin B12	50mg/kg
Folic acid	*1mg/kg*
Calcium iodate	3mg/kg
Copper sulphate	*25mg/kg*
Vitamin E	45mg/kg
Vitamin D3	*2000UI/kg*
Potassium	6mg/kg
Vitamin B2	*5mg/kg*
Zinc	80mg/kg
Antioxidant	*20mg/kg*
Magnesium	1mg/kg
Iron	*170mg/kg*

Pantothenic acid	15mg/kg
Vitamin B1	*4mg/kg*
Vitamin B6	4,5g/kg

3. Methodology for cockroaches' treatment injections

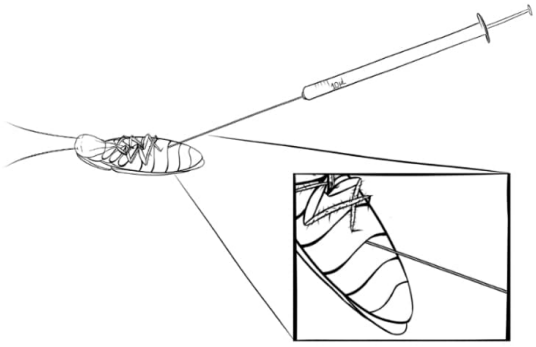


Figure 3. Procedure for cockroaches´ treatment-injection using a Hamilton syringe. The animals were injected into the third abdominal hemocoell segment, at a final volume of 10µl, by means of a Hamilton syringe.

4. Definition of Jbtx concentrations in µmol/g used in the behavioral assays.

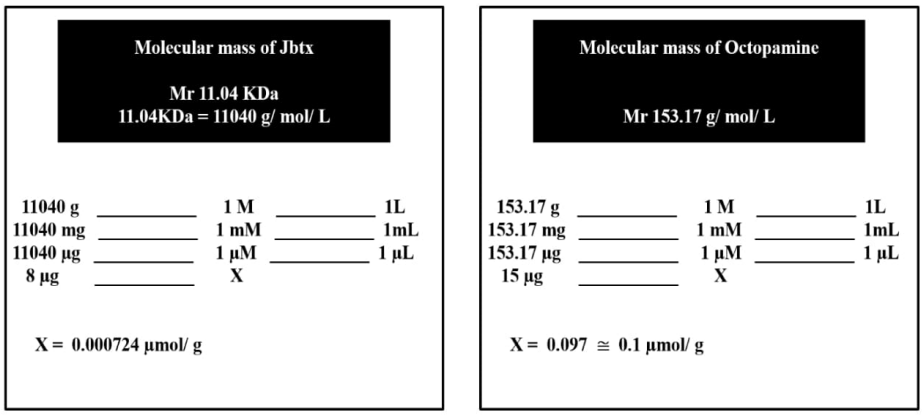


Figure 4. The calculation procedures for determining final Jaburetox concentrations used in the behavioral assays.

References

Belanger, J., and Orchard, I. (1992). The role of sensory input in maintaining output from the locust oviposition digging central pattern generator. Journal of Comparative Physiology A *171*.

Carrazoni, T., de Avila Heberle, M., Perin, A.P.A., Zanatta, A.P., Rodrigues, P.V., dos Santos, F.D.M., de Almeida, C.G.M., Vaz Breda, R., dos Santos, D.S., Pinto, P.M., et al. (2016).

Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. Toxicology *368–369*, 162–171.

Carrazoni, T., Nguyen, C., Maciel, L.F., Delgado-Cañedo, A., Stewart, B.A., Lange, A.B., Dal Belo, C.A., Carlini, C.R., and Orchard, I. (2018). Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions. Pesticide Biochemistry and Physiology *146*, 63–70.

Hamilton, A.G. (2009). The relation of humidity and temperature to the development of three species of african locusts-*Locusta migratoria* migratorioides (R. & F.), *Schistocerca gregaria* (FORSK.), *Nomadacris septemfasciata* (SERV.). Transactions of the Royal Entomological Society of London *85*, 1–60.

Kennedy, J.S. (1937). The Humidity Reactions of the African Migratory Locust, *Locusta migratoria* migratorioides R. & F., Gregarious Phase. Journal of Experimental Biology 187–197.

Lange, A.B., and Orchard, I. (1984). Dorsal unpaired median neurons, and ventral bilaterally paired neurons, project to a visceral muscle in an insect. Journal of Neurobiology *15*, 441–453.

Lange, A.B., and Orchard, I. (1986). Identified octopaminergic neurons modulate contractions of locust visceral muscle via adenosine 3′,5′-monophosphate (cyclic AMP). Brain Research *363*, 340–349.

Lange, A.B., Orchard, I., Wang, Z., and Nachman, R.J. (1995). A nonpeptide agonist of the invertebrate receptor for SchistoFLRFamide (PDVDHVFLRFamide), a member of a subfamily of insect FMRFamide-related peptides. Proceedings of the National Academy of Sciences *92*, 9250–9253.

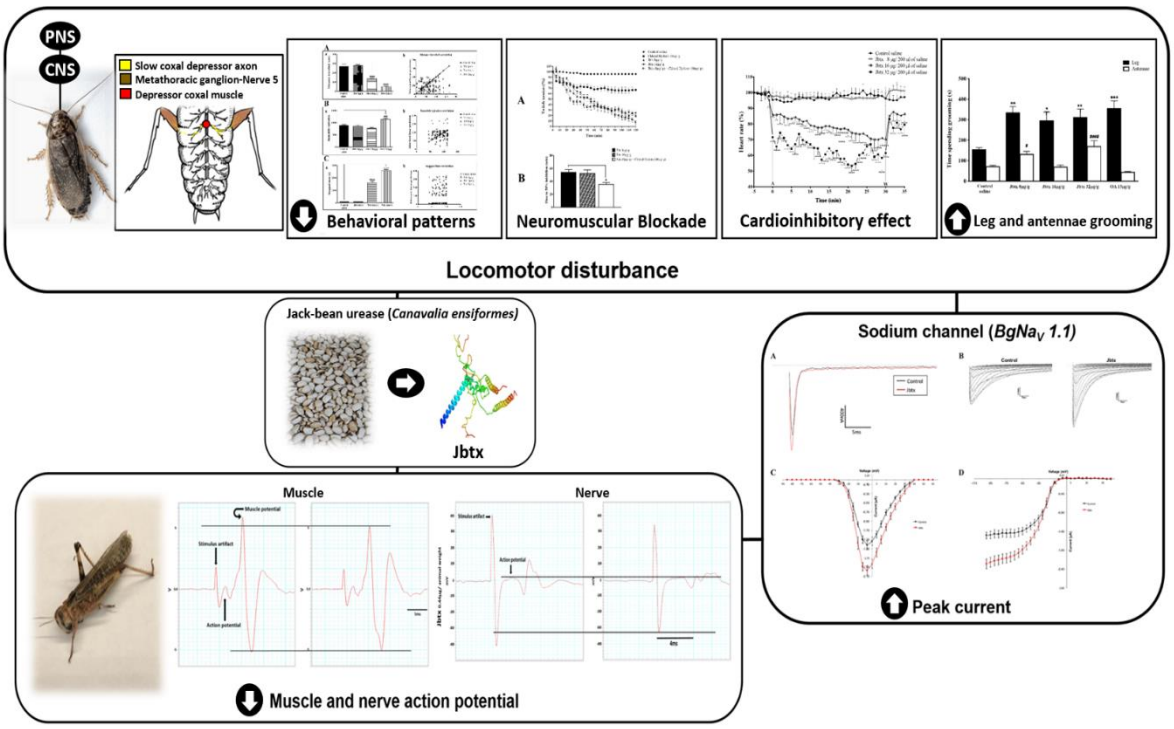
Leal, A.P., Oliveira, R.S., Perin, A.P.A., Borges, B.T., de Brum Vieira, P., dos Santos, T.G., Vinadé, L., Valsecchi, C., and Belo, C.A.D. (2018). Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. Pesticide Biochemistry and Physiology *148*, 175–181.

Oonincx, D.G.A.B., and van der Poel, A.F.B. (2011). Effects of diet on the chemical composition of migratory locusts (*Locusta migratoria*). Zoo Biology *30*, 9–16.

Orchard, I., and Lange, A.B. (1984). Cyclic AMP in locust fat body: Correlation with octopamine and adipokinetic hormones during flight. Journal of Insect Physiology *30*, 901–904.

Padalia, S., Drabu, S., Raheja, I., Gupta, A., and Dhamija, M. (2010). Multitude potential of wheatgrass juice (Green Blood): An overview. Chronicles of Young Scientists 6.

3.2.2 Resumo Gráfico



4. DISCUSSÃO GERAL

Nesse trabalho foram realizados ensaios laboratoriais com diferentes modelos de insetos, com o objetivo de se verificar o potencial de entomotóxico de doses subletais de compostos naturais medindo-se parâmetros bioquímicos, celulares e moleculares comuns à neurotransmissão desses animais. A avaliação de risco tem por objetivo principal a avaliação e caracterização das propriedades tóxicas de compostos xenobióticos, bem como as condições de exposição a humanos e ao meio ambiente. Somente através dessa análise preliminar, é possível determinar, compreender e relacionar a toxicidade, com os efeitos adversos observados em diferentes modelos biológicos (IOVDIJOVÁ & BENCKO, 2010). Com isso, os dados obtidos nesse trabalho contribuirão para o entendimento da sensibilidade dos modelos de inseto aqui empregados, frente aos compostos xenobióticos usados. Além disso, a evidenciação de que doses subletais dos compostos ensaiados produzem alterações severas no comportamento dos insetos, confirma esses modelos animais como ferramentas alternativas práticas e de baixo custo, para o estudo e a compreensão dos impactos ambientais advindos do processo de eutrofização. Nesse sentido, as informações obtidas aqui, poderão em um futuro próximo, permitir o desenvolvimento de moléculas biotecnologicamente ativas, como inseticidas mais seletivos contra insetos-praga.

Do ponto de vista econômico, é inequívoco que os inseticidas ainda sejam instrumentos fundamentais no gerenciamento de pragas. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa, tem se dedicado ao estudo dos efeitos subletais do organofosforado triclorfon (Tn), demonstrando seu potencial na modulação da neurotransmissão dopaminérgica de baratas e consequentemente causando alterações importantes no comportamento dos insetos (STÜRMER *et al.*, 2014). Assim, tem ficado cada vez mais comprovado que avaliação de risco à xenobióticos, deve-se levar em consideração os aspectos da subletatilidade como indutor de efeitos tóxicos, bem como a necessidade do desenvolvimento de técnicas para a medida desses efeitos e dos seus impactos no meio ambiente (DESNEUX *et al.*, 2007). Além disso, uma das principais consequências da exposição de compostos xenobióticos em doses subletais, é o desenvolvimento de resistência, principalmente quando se faz uso de inseticidas químicos industrializados (FRANÇA *et al.*,2017). A resistência ocorre essencialmente devido a uma mudança genética em resposta à seleção por um agente tóxico, no caso o inseticida, entre indivíduos de uma dada espécie, cuja consequência potencial é a diminuição da efetividade tóxica como o consequente aumento progressivo das doses empregadas (GUEDES, WALSE & THRONE, 2017). O uso de insetos em pesquisas para determinar a toxicidade de compostos é bem conhecida e vem se tornando

uma importante alternativa na busca por marcadores ambientais para a compreensão dos mecanismos de toxicidade e exposição dos riscos (RODRIGUES *et al*., 2013; STÜRMER *et al*., 2014; ADERARA *et al*., 2015; AUGUSTYNIAK, GLADYSZ & DZIEWIE˛CKA, 2016).

O extrato contendo anatoxina-a(s) (CECA) cultivado a partir da cepa ITEP24 da cianobactéria *Sphaerospermopsis torques-reginae* induziu cardiotoxicidade caracterizada por cronotropismo cardíaco negativo, além de alterações comportamentais importantes em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*. Esses dados são consistentes com os resultados obtidos preliminarmente em baratas das espécies *Leurolestes circunvagans* e *Phoetallia pallida*, destacando a inibição da AChE no cérebro desses animais (RODRÍGUEZ *et al*., 2012; STÜRMER *et al*., 2014). A pureza química do extrato contendo anatoxina-a (s), permite afirmar a ausência de outros compostos colinérgicos diretos, como a anatoxina-a ou homoanatoxina-a, reforçando a exclusividade do efeito Anti-AChE. Em nossas condições experimentais, tanto o CECA quanto o organofosforado Tn induziram profundas alterações sobre o padrão locomotor das baratas, caracterizadas por uma diminuição significativa na distância percorrida e um consequente aumento no número de episódios imóveis e tempos parados. Tanto o CECA, quanto o Tn induziram uma notória modulação sobre o comportamento de insetos, refletindo a importância dos sistemas colinérgicos na coordenação dos padrões fisiológicos do Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) de insetos. Dessa forma, o conjunto de protocolos empregados para avaliar os parâmetros exploratórios e comportamentais dos insetos demonstram a adequação do modelo biológico de baratas como sensível para detectar alterações sutis revelando a presença de concentrações subletais dos compostos estudados que potencialmente passariam despercebidas usando-se outros modelos de controle ambiental (THANY & TRICOIRE-LEIGNEL, 2011).

A modulação do padrão locomotor dos insetos induzida por CECA e Tn em nosso modelo experimental de *N. cinerea* possui relação direta com o aumento na atividade de *grooming* nesses animais. Até o presente momento, sabe-se que os sistemas octopaminérgico e dopaminérgico afetam diretamente o início da locomoção em insetos (GAL & LIBERSAT, 2008). Estudos recentes utilizando doses subletais do organofosforado triclorfon, demonstraram que a intoxicação colinérgica leva a um aumento da resposta dopaminérgica, caracterizada pelo aumento da atividade de *grooming* de antenas (STÜRMER *et al*., 2014). Do ponto de vista ambiental, qualquer alteração no comportamento dos insetos resultante da intoxicação por doses subletais de compostos organofosforados pode influenciar indiretamente os processos essenciais para a manutenção da espécie, como longevidade, fecundidade, reprodução, tempo

de desenvolvimento, comportamento (mobilidade, demanda, forrageamento e alimentação), predação e/ou parasitismo e/ou parasitismo, taxas de emergência e/ou razão sexual (CLOYD, 2012; FRANÇA *et al*., 2017).

CECA, Tn, neostigmina, Jbtx e Jbtx *plus* Cloral hidratado induziram um bloqueio progressivo sobre a resposta de contração muscular *in vivo* de *N. cinerea*. Em nosso modelo de barata, o CECA causou uma facilitação preliminar e transitória, seguida por uma inibição da função motora, sugerindo que tanto as transmissões sinápticas glutamatérgicas quanto as GABAérgicas podem também estar sendo moduladas. Uma explicação razoável para essa atividade é que em nosso modelo experimental, a estimulação para a evocação das contrações musculares é realizada através de um nervo colinérgico, chamado de nervo 5 (CARR & FOURTNER, 1980), do qual partem pelo menos dois ramos de neurônios inibitórios GABAérgicos (WATSON, 1986). Assim, sugere-se que, pelo menos em parte, CECA e Tn possam induzir um bloqueio neuromuscular em *N. cinerea* devido a uma interação entre interneurônios colinérgicos e GABAérgicos. Já o aumento preliminar na tensão da contração muscular da barata induzida pelo CECA, seria um resultado de uma modulação positiva da neurotransmissão glutamatérgica (FULTON, 1982).

O Jaburetox (Jbtx), um peptídeo tóxico derivado da urease da *Canavalia ensiformes*, em nossas condições experimentais também alterou a atividade locomotora de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*, diminuindo a distância percorrida, reforçando os episódios imóveis e os parâmetros do tempo parados de imobilidade assim como CECA. Em ensaios preliminares com Jbtx e a urease de *Canavalia ensiformis* (JBU), do qual o Jbtx é derivado, foi demonstrado que tanto a urease como o peptídeo Jbtx reduzem a função neuromuscular diminuindo a força de contração do muscular da perna de *Phoetalia pallida* e *Nauphoeta cinerea*, respectivamente (MARTINELLI *et al*., 2014; CARRAZONI *et al*., 2016). Esses achados sugerem que o Jbtx, além de atuar diretamente no sistema nervoso central do inseto, também tem como alvo as junções neuromusculares, confirmando a amplitude da ação neurotóxica.

Em nossas condições experimentais, Jbtx interferiu tanto com o *grooming* de pernas quanto com o de antenas em *N. cinerea*. A modulação do *grooming* de pernas foi mimetizada pela octopamina, sugerindo uma influência do Jbtx sobre a sinalização octopaminérgica no Sistema Nervoso Central (SNC). Neste estudo, a atividade de *grooming* de antenas foi significativamente aumentada pelo tratamento com Jbtx, o que não foi observado em experimentos avaliando a atividade de *grooming* de antenas com o análogo JBU (CARRAZONI

et al., 2016). A possível explicação para este resultado discrepante estaria relacionada com o tamanho da massa molecular, que é menor para o Jbtx (11.04 kDa) em comparação com JBU (540 kDa). Este fato poderia prevenir ou reduzir a travessia de JBU sobre a barreira hematoencefálica do cérebro do inseto para alcançar o gânglio subesofágico, órgão que provavelmente está envolvido com atividade de *grooming* de antenas (ZHUKOVSKAYA *et al*., 2013; GAL & LIBERSAT, 2010).

O Jbtx é cardiotóxico para baratas da espécie *N. cinerea*, induzindo um efeito cronotrópico negativo. O efeito cardiotóxico do Jbtx no coração de *N. cinerea* é similar àqueles induzidos pelo antidepressivo mianserina e pelo bloqueador alfa adrenérgico fentolamina (PAPAEFTHIMIOU & THEOPHILIDIS, 2011). A octopamina, um neuromodulador (FAROOQUI, 2012), também está envolvido na regulação de batimentos cardíacos em insetos, uma vez que os axônios contendo octopamina têm terminações nervosas nos órgãos pericárdicos. Assim, sugere-se que o Jbtx pode alterar especificamente a neurotransmissão octopaminérgica (ENAN, 2001; EVANS, 1980; PAPAEFTHIMIOU & THEOPHILIDIS, 2011), reforçando os outros efeitos sobre esse sistema em nível central. O objetivo desse trabalho não foi explorar em profundidade a farmacologia dos efeitos do Jbtx sobre o coração de *N. cinerea*. No entanto, é possível concluir que o coração do inseto (e possivelmente outros órgãos pulsáteis) esteja envolvido na atividade entomotóxica do Jbtx como um alvo direto dos efeitos do peptídeo.

Em ensaios eletrofisiológicos, Jbtx causou uma diminuição significativa na amplitude dos potenciais de ação músculo e do nervo em preparação de perna de gafanhotos da espécie *L. migratoria*. As alterações na amplitude de um potencial de ação muscular ou neuronal deve-se em parte pela interação de neurotoxinas com canais de sódio (CESTÈLE & CATTERALL, 2000; DONG, 2007; SANTOS *et al*., 2016, WANG & WANG, 2003). A inibição da ativação do canal é outro mecanismo envolvido no efeito das neurotoxinas nos canais de sódio, semelhantemente ao mecanismo de ação de toxinas de dinoflagelados conhecidas como brevetoxinas, cujo sítio de ligação reside em canais de sódio (STEVENS *et al*., 2011). Neste estudo, Jbtx induziu um aumento significativo na amplitude das correntes de sódio, evocadas em oócitos de *Xenopus laevis* superexpressando os canais BgNaV 1.1 de baratas da espécie *Blattella germanica*. Portanto, a diminuição na amplitude dos potenciais de ação observados em preparações de pernas de *L. migratoria* pode ser o resultado do aumento do influxo de sódio nas membranas excitáveis (STEVENS *et al*., 2011), causado pela ação do Jbtx, por exemplo, aumentando o tempo para inativação do canal (RESTREPO-ANGULO, VIZCAYA-RUIZ &

CAMACHO, 2010). Por fim, nossos dados mostram que a ausência de uma diminuição rápida no potencial de membrana em repouso durante os protocolos de *voltage clamp*[4] sugerem a exclusão de outros componentes inotrópicos que não os canais de sódio.

O potencial biotecnológico de pesquisas advindas de metabólitos secundários de cianobactérias com aplicabilidade para produção fármacos vem se intensificando cada vez mais, utilizando não só ensaios *in vitro* com linhas de células tumorais, como também em ensaios do seu potencial na modulação da ação trombolítica, apresentando resultados promissores (LEÃO *et al.*, 2013; SELHEIM *et al.*, 2005). A pesquisa com toxinas naturais proporcionou por exemplo, o desenvolvimento do medicamento captopril, uma droga anti-hipertensiva que só foi descoberta graças a estudos com peptídeos isolados do veneno da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (CUSHMAN & ONDETTI, 1991). Cerca de 50% de todos os medicamentos em uso clínico atualmente são de origem de produtos naturais (PATERSON & ANDERSON, 2005). Outro fator importante é o fato de que muitos dos *top-selling*[5] dos produtos farmacêuticos em todo o mundo são produtos naturais ou análogos sintéticos e semissintéticos de recursos naturais (MYLES, 2003; SANTOS, 2014). Dessa forma, o conjunto de dados inéditos obtidos nessa pesquisa científica apresentam grande potencial biotecnológico na busca da compreensão da efetividade da avaliação de risco desses compostos, bem como para o desenvolvimento de novas drogas ou pesticidas de origem natural.

[4] É um método experimental utilizado na eletrofisiologia para medir as correntes de íons através de uma membrana neuronal, mantendo a tensão da membrana em um nível definido. As membranas neuronais contêm muitos tipos diferentes de canais iônicos, alguns dos quais são portadores de voltagem. Voltage clamp permite que a voltagem da membrana seja manipulada independentemente das correntes iônicas, permitindo que as relações corrente-voltagem dos canais de membrana sejam estudadas.

[5] Termo em inglês que significa mais vendidos ou vendidos em grande número.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos nessa tese, pode-se concluir que:

- ✓ Concentrações subletais de compostos xenobióticos de origem natural ou sintética (CECA, Tn e Jbtx), causam alterações relevantes sobre sistema nervoso de inseto, levando a profundas alterações no comportamento;
- ✓ O CECA causa uma intoxicação colinérgica iniciada pela inibição da AChE no inseto, induzindo a ativação da neurotransmissão dopaminérgica e octopaminérgica, impactando diretamente no padrão locomotor dos insetos;
- ✓ As mudanças no padrão locomotor causada por CECA em insetos estão relacionadas não só pelo o aumento da atividade de *grooming*, mas também a uma modulação indireta negativa sobre as junções neuromusculares dos insetos;
- ✓ A atividade entomotóxica do Jbtx envolve mudanças significativas nos padrões comportamentais e alterações nos SNC e SNP de insetos;
- ✓ O efeito tóxico do Jbtx causa uma despolarização inicial do gânglio metatorácico, resultando na ativação dos canais de sódio dependentes de voltagem. Essa despolarização do gânglio atinge os nervos periféricos e centrais, que é orquestrada pela liberação da associação do neurotransmissor octopamina;
- ✓ As alterações no comportamento induzidas pelo Jbtx podem ser reforçadas por uma atividade cardiotóxica. Essa alteração eletrofisiológica inicial aumenta a modulação octopaminérgica, resultando em exacerbação dopaminérgica, no sistema nervoso central do inseto e na sinalização GABAérgica concomitante nas junções neuromusculares dos insetos;
- ✓ Modelos alternativos de insetos ao uso de mamíferos são importantes ferramentas sensíveis, práticas e baratas para estudos de toxicidade envolvendo a análise de avaliação de riscos de compostos xenobióticos de origem natural ou sintética;
- ✓ O uso de insetos em pesquisas toxicológicas são importantes marcadores ambientais para a avaliação dos mecanismos envolvidos na contaminação de ecossistemas;

6. PROPOSTA DO MECANISMO DE AÇÃO DO CECA E DO JBTX SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE INSETOS

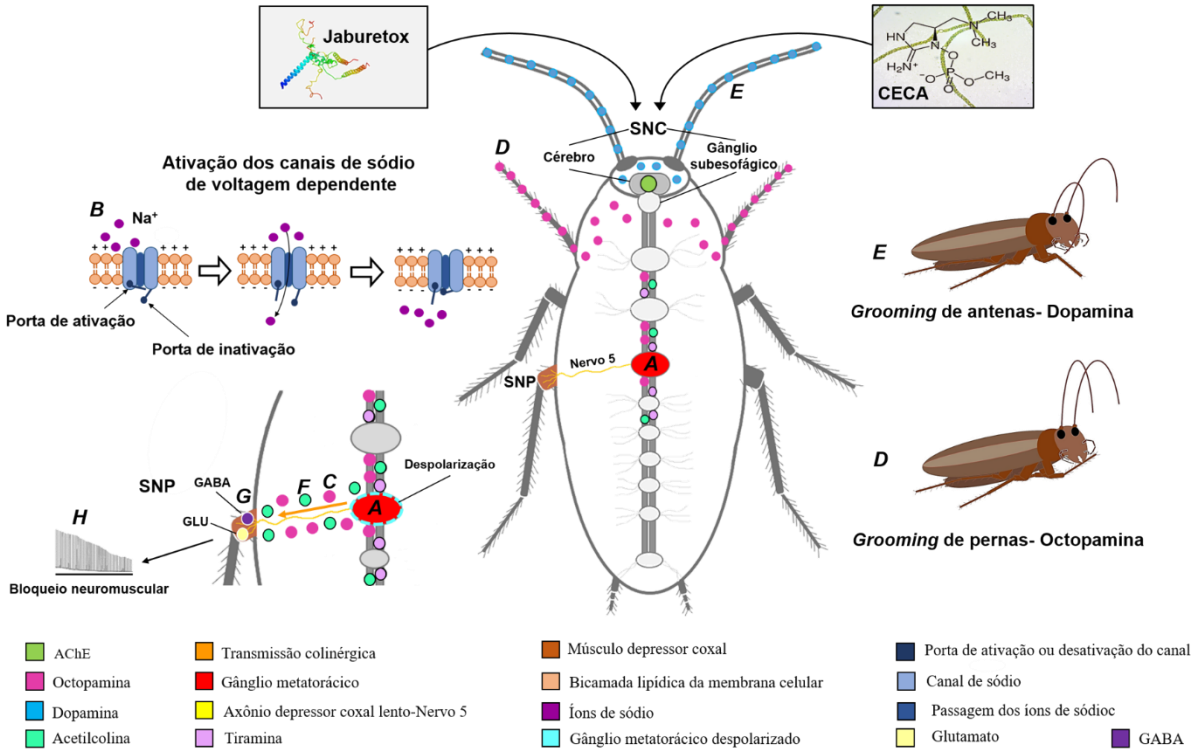
Um dos principais mecanismos possíveis para entomotoxicidade do Jbtx está relacionado à habilidade de se ligar aos canais de sódio de voltagem dependente próximo a bicamada lipídica dos neurônios. Foi demonstrado recentemente que o Jbtx possui a capacidade de se inserir nas membranas dos neurônios e formar poros de canais iônicos seletivos a cátions (PIOVESAN *et al*., 2014, CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Com isso, o Jbtx pode estar envolvido na despolarização do gânglio metatorácico, desencadeando a liberação do neurotransmissor octopaminérgico, no cordão nervoso ventral e dopaminérgico, no gânglio subesofágico (LIGABUE-BRAUN, 2016; CARRAZONI *et al*., 2018). Sabe-se que o Jbtx induz o bloqueio neuromuscular em junção de baratas (MARTINELLI *et al*., 2014). O tratamento com cloral hidrato reforçou o efeito bloqueador neuromuscular do Jbtx em nossos experimentos. A possível explicação para essa hipótese se dá pelo fato de que em nossas condições experimentais as contrações neuromusculares foram obtidas pela estimulação do nervo 5, um nervo colinérgico que parte do gânglio metatorácico. Em baratas, o axônio depressor coxal lento do neurônio motor (Ds), se ramifica a partir do gânglio metatorácico através do nervo 5 inervando o músculo coxal depressor (músculo 177D) (CARR e FOURTNER, 1980). Ensaios de imuno-histoquímica da região metatorácica do gafanhoto *Schistocerca gregaria* revelaram que pelo menos dois ramos de neurônios inibitórios (neurônios GABAérgicos) partem do nervo 5 no gânglio metatorácico (WATSON, 1986). Ao longo do nervo 5, respostas aferentes ou eferentes, seguem em direção ao gânglio metatorácico através de neurônios motores monossinapticamente ligados por sinapses colinérgicas (CARR e FOURTNER, 1980). Assim, sugere-se que, pelo menos em parte, o bloqueio neuromuscular induzido por Jbtx em *Nauphoeta* cinerea ocorra devido a uma interação entre interneurônios colinérgicos e GABérgicos.

O principal mecanismo sugerido para o efeito entomotóxico observado com o tratamento do CECA em insetos, está relacionado a inibição da enzima AChE sobre o sistema nervoso central desses animais. Ainda que nossas condições experimentais não permitam inferir precisamente sobre o mecanismo de ação de CECA, podemos sugerir que o extrato esteja induzindo uma hiperexcitação do terminal pré-sináptico colinérgico, ocasionando a liberação octopaminérgica (no gânglio metatorácico) e dopaminérgica (no gânglio subesofágico) (STÜRMER *et al*., 2014). A modulação octopaminérgica e dopaminérgica sobre gânglio

metatorácico e subesofágico respectivamente, levaria a profundas mudanças no padrão de locomoção dos insetos.

Dessa forma, conclui-se que ambos compostos levam a uma despolarização do gânglio metatorácico, porém, por mecanismos diferentes. O aumento do influxo de sódio pelo Jbtx resultaria em uma modulação octopaminérgica e dopaminérgica em nível central. A inibição da AChE, causada pelo CECA, resultaria em uma despolarização de ambos, gânglios metatorácico e nervo 5, produzindo aumento da liberação de octopamina e posteriormente dopamina no sistema nervoso central e GABA no sistema nervoso periférico, induzindo bloqueio neuromuscular. Com isso, conclui-se que o efeito bloqueador neuromuscular induzido por ambas as toxinas em insetos ocorre em última análise pela ativação de terminais colinérgicos pré-sinápticos ocasionados pela octopamina e consequentemente liberação do neurotransmissor GABA (Figura 18).

Figura 18. Proposta do mecanismo de ação do CECA e do Jbtx sobre o Sistema nervoso de insetos. Propõe-se que o mecanismo entomotóxico do Jbtx tem início com despolarização do gânglio metatorácico (***A***) pela ativação de canais de sódio de voltagem dependente (***B***). No caso do extrato contendo anatoxina-a(s) CECA, neurônios colinérgicos presentes no gânglio metatorácico são ativados causando a despolarização local (***A***). Em ambos os casos tanto com o Jbtx quanto com o CECA a despolarização local aumenta a liberação do neurotransmissor octopamina (***C***). O acúmulo desse neurotransmissor gera impulsos aferentes para o sistema nervoso central e periférico. No SNC, a octopamina modula positivamente o comportamento de *grooming* de pernas (***D***) e aumenta a liberação de dopamina alterando o *grooming* de antenas (***E***). No sistema nervoso periférico a octopamina aumenta a liberação do neurotransmissor acetilcolina (***F***) nas sinapses colinérgicas presentes no nervo 5, induzindo a liberação do GABA (***G***) na junção neuromuscular do inseto produzindo inibição motora (***H***).



Fonte: Do autor.

7. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos nessa tese e com o claro potencial crescente de conhecimento acerca das características envolvidas na entomotoxicidade desses compostos, vale ressaltar que são necessários:

- ✓ Ensaios bioquímicos de co-imunoprecipitação para se medir a ligação específica em receptores e canais iônicos, farmacológicos e eletrofisiológicos *in situ* e *in vitro* usando-se cultura de células e protocolos com ligantes específicos na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na complexidade das ações desses compostos sobre o sistema nervoso dos insetos.

8. REFERÊNCIAS

ABDELLAOUI, K., HALIMA-KAMEL, M. B., ACHEUK, F., *et al*. **Biochemical and histological effects of gibberellic acid on *Locusta migratoria migratoria* fifth instar larvae**. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 107 (1), p. 32-37, 2013.

ADERARA, I. A., ROSEMBERG, D. B., SOUZA, D. O., *et al*. **Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure**. Toxicol. Res., v. 4, p. 442-451, 2015.

ALONZO, H. G. A., CORRÊA, C. L. **Praguicidas**. In: OGA, S., CAMARGO, M. A., BATISTUZZO, J.A.O (Org.). Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, p. 696, 2008.

AMARAL, D. T., SILVA, J. R., VIVIANI, V. R. **Transcriptomes from the photogenic and non-photogenetic tissues and life stages of the *Aspisoma lineatum* firefly (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolutionary origins of bioluminescence and its associated light organs**. Gene Reports, v. 8, p. 150-159, 2017.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota técnica-Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Triclorfom**. 2008. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117839/Nota%2Bt%25C3%25A9cnica.pdf/f8b7cecc-95da-47ff-b3fc-6d775cef12cd?version=1.0. Acesso em 28 jan. 2019.

APPEL, A. G. **Blattella and related species**. In: Rust MK, Owens JM, Reierson DA, editors. Understanding and Controlling the German Cockroach. New York: Oxford Press. pp. 1–19, 1995.

AUDSLEY, N., DOWN, R. E. **G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides**. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 67, p. 27-37, 2015.

AUGUSTYNIAK, M., GLADYSZ, M., DZIEWIE˛CKA, M. **The Comet assay in insects—Status, prospects and benefits for Science**. Mutation Research/ Reviews in Mutation Research, v. 767, p. 67-76, 2016.

ARANCIBIA, S., MARAMBIO, M., CAMPUSANO, J. M., *et al*. **Modeling of the binding of octopamine and dopamine in insect monoamine transporters reveals structural and electrostatic differences**. ACS Chemical Neuroscience, 2019. DOI: 10.1021/acschemneuro.8b00631.

ARNON, T., POTIKHA, T., SHER, D., *et al*. **BjαIT: a novel scorpion α-toxin selective for insects—unique pharmacological tool**. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 35, p. 187-195, 2005.

BALASUBRAMANIAN, A., PONNURAJ, K. **Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure**. J. Mol. Biol., v. 400, p. 274-283, 2010.

BARROS, P. R., STASSEN, H., FREITAS, M. S., *et al*. **Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases**. Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics, v. 1794, p. 1848-1854, 2009.

BANTZ, A., CAMON, J., FROGER, J. A., *et al*. **Exposure to sublethal doses of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels**. Current Opinion in Insect Science, v. 30, p. 73-78, 2018.

BATZER, D. P., WISSINGER, S. A. **Ecology of insect communities in nontidal wetlands**. Annu.Ver. Entomol., v. 41, p. 75-100, 1996.

BASF, (The Chemical Company). Crop Protection Division Global Strategic Marketing, Insecticides. **Insecticide Mode of Action Technical Training Manual**. 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/275959530_BASF_Insecticide_Mode_of_Action_Technical_Training_Manual. Acesso em 05 fev. 2019.

BANERJEE, S., BHAT, M. A. **Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation.** Annu. Rev. Neurosci., v. 30, p. 235-258, 2007.

BORGONI, P. C., VENDRAMIM, J. D. **Sublethal effect of aqueous extracts of *Trichilia spp*. on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) development on maize**. Neotrop. Entomol., v. 34(2), p. 311-317, 2005.

BUCHANAN, R. L., GORRIS, L. G. M., HAYMAN, M. M. **A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments**. Food Control, v. 75, p. 1-13, 2017.

BUCKINGHAM, S. D., BIGGIN, P. C., SATTELLE, B. M., *et al*. **Insect GABA Receptors: Splicing, Editing, and Targeting by Antiparasitics and Insecticides**. Mol. Pharmacol., v. 68(4), p. 942-51, 2005.

BUDNIK, V., WHITE, K. **Catecholamine containing neurons in *Drosophila melanogaster*: distribution and development**. J. Comp. Neural., v. 268, p. 400-413, 1988.

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

CARLINI, C. R., LIGABUE-BRAUN, R. **Ureases as multifunctional toxic proteins: A review**. Toxicon, v. 110, p. 90-109, 2016.

CHARNLEY, G., OMENN, G. S. **A summary of the findings and recommendations of the commission on risk assessment and risk management (and accompanying papers prepared for the commission)**. Hum. Ecol. Risk Assess., v. 3, p.701-711, 1997.

CARMICHAEL, W.W., GORHAM, P. R. **Anatoxins from clones of Anabaena flosaquae isolated from lakes of western Canada**. Mitt. Internat. Verein. Limmol., v. 21, p. 285-295, 1978.

CARMICHAEL, G. J. **Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass**. Prog. Fish. Cult., v. 46, p. 11-115, 1984.

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

CARRAZONI, T. F., HEBERLE, M. A., PERIN, A. P. *et al*. **Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches**. Toxicology, v. 368-369, p.162-171, 2016.

CARRAZONI, T. F., NGUYEN, C., MACIEL, L. F., *et al.* **Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions**. Pesticide Biochemistry and Physiology, v.146, p. 63-70, 2018.

CAZARIN, K. C. C., CORRÊA, C. L., ZAMBRONE, F. A. D. **Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 40, n. 3, p. 280-299, 2004.

CESTÈLE, S., CATTERALL, W. A. **Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels**. Biochimie, v. 82, p. 883-892, 2000.

CHORUS, I., BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**, First edit. E & FN Spon, an imprint of Routledge 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE, London, 1999.

CLOYD, R. A. **Indirect effects of pesticides on natural enemies**. In: Soundararajan, R. (Ed.), Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides. InTech, p. 127–150, 2012.

COOK, W. O., BEASLEY, V. R., DAHLEM, A. M., *et al*. **Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity**. Toxicon, v. 26, n. 8, p. 750-753, 1998.

COSTA, L. M., GRELLA, T. C., BARBOSA, R. A., *et al*. **Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae).** Sociobiology, v. 62(4), p. 578-582, 2015.

CORLEY, L. S., BLANKENSHIP, J. R., MOORE, P. J. **Developmental constraints on the mode of reproduction in the facultatively parthenogenetic cockroach *Nauphoeta cinerea***. Evol. Dev., v. 1(2), p. 90-99, 1999.

CRAIG, C.R., STIZEL, R.E. **Modern Pharmacology With Clinical Applications**, Lippincott. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

CRUZ, G. S., WANDERLEY-TEIXEIRA, V., OLIVEIRA, J. V., *et al.* **Sublethal Effects of Essential Oils From *Eucalyptus staigeriana* (Myrtales: Myrtaceae), *Ocimum gratissimum* (Lamiales: Laminaceae), and *Foeniculum vulgare* (Apiales:Apiaceae) on the Biology of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Journal of Economic Entomology, v. 109(2), p. 660-666, 2016.

CUSHMAN, D.W., ONDETTI, M.A. **History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme**. Hypertension, v. 17, p. 589-592, 1991.

DEFFERRARI, M. S., DEMARTINI, D. R., MARCELINO, T. B., *et al.* **Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases**. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 41, p. 388-399, 2011.

DELOREY, T. M.; KISSIN, I., BROWN, P., BROWN, G.B. **Barbiturate-benzodiazepine interactions at the gamma-aminobutyric acid A receptor in rat cerebral cortical synaptoneurosomes**. Anesth. Analg., v. 77(3), p. 598-605, 1993.

DESNEUX, N., DECOURTYE, A., DELPUECH, J. M. **The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods**. Annu. Rev. Entomol., v. 52, p. 81–106, 2007.

DEVIC, E., LI, D., DAUTA, A., *et al*. **Detection of Anatoxin-a(s) in Environmental Samples of Cyanobacteria by Using a Biosensor with Engineered Acetylcholinesterases**. Appl. Environ. Microbiol., v. 68(8), p. 4102-4106, 2002.

DIXON, N.E., GAZZOLA, C., WATTERS, J. J., *et al*. **Jack Bean Urease (EC3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel?** J. Am. Chem. Soc., v. 97, p. 4131-4133. 1926.

DOKE, S. K., DHAWALE, S. C. **Alternatives to animal testing: A review**. Saudi Pharmaceutical Journal, v. 23(3), p. 223-229, 2015.

DONG, K. **Insect sodium channels and insecticide resistance**. Invertebr. Neurosci., v. 7, p. 17-30, 2007.

DOUBLET, V., LABARUSSIAIS, M., MIRANDA, J. R., *et al*. **Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle**. Environmental Microbiology, v. 17(4), p. 969-983, 2015.

DOS SANTOS, V. M. R., DONNICI, C. L., DACOSTA, J. B. N., *et al*. **Compostos organofosforados pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais**. Quimica Nova, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.

ECOBICHON, D.J. **Toxic effects of pesticides**, in: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology- The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, USA, p. 763-810, 2001.

EL HASSANI, A. K., DACHER, M., GAUTHIER, M., *et al*. **Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*)**. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 82, p. 30-39, 2005.

ELIAS, M. S., EVANS, P. D. **Histamine in the Insect Nervous System: Distribution, Synthesis and Metabolism**. J. Neurochem., v. 41(2), p. 562-568, 1983.

ENAN, E. **Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action**. Comp. Biochem. Physiol. Part C., v. 130, p. 325-337, 2001.

EPHRUSSI, B. **Chemistry of eye color hormones of Drosophila**. Q. Rev. Biol., v. 17, p. 327-338, 1942.

EVANS, P. D. **Biogenic arnines in the insect nervous system**. Adv. In Insect Phys., v. 15, p. 317-473, 1980.

FAUSTAMAN, E. M., OMENN, G. S. **Risk Assessment**, in: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology- The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, USA, p. 107-128, 2008.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Migratory Locust**. 2019. Disponível em: http://www.fao.org/ag/locusts-CCA/en/1010/1018/1078/index.html. Acesso em 09 fev. 2019.

FAROOQUI, T. **Review of octopamine in insect nervous systems**. Open Access Insect Physiology, v. 4, p. 1-17, 2012.

FERREIRA-DASILVA, C. T., GOMBAROVITS, M. E., MASUDA, H., *et al*. **Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes**. Arch. Insect Biochem. Physiol., v. 44, p. 162-171, 2000

FIKES, J.D. **Organophosphorus and carbamate insecticides**. Veterinary Clin. North Am. Small Anim. Pract., v. 20, p. 353-367, 1990.

FISCHER, J., MÜLLER, T., SPATZ, A. K., *et al*. **Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees**. Plos One, v. 9(3),| e91364, 2014.

FOLLMER, C., REAL-GUERRA, R., WASSERMAN, G. E., *et al*. J**ackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: Biological effects unrelated to ureolytic activity**. Eur. J. Biochem., v. 271, p. 1357-1363, 2004.

FONNUM, F. **Glutamate a neurotransmitter in mammalian brai**n. J. Neurochem., v. 42, p. 1-11, 1984.

FRANÇA, S. M., BREDA, M. O., BARBOSA, D. R. S., *et al*. **The Sublethal Effects of Insecticides in Insects**. In: Shields, V. D. C (Ed.), Biological Control of Pest and Vector Insects. Intech, p. 23-39, 2017.

EPAFREITAS, E. C., PRINTES, L. B., ROCHA, O. **Use of cholinesterase activity as an ecotoxicological marker to assess anatoxin-a(s) exposure: Responses of two cladoceran species belonging to contrasting geographical regions**. Harmful Algae, v. 55, p. 150-162, 2016.

FRENCH, A. S., SIMCOCK, K. L., ROLKE, D., *et al*. **The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee**. J. Inseto Physiol., v. 61 (100), p. 8-15, 2014.

FULTON, B. P. **Receptors acetylcholine receptors at the excitatory amino acid synapse in locust muscle**. Neuroscience 7, p. 2117-2124, 1982.

GAD, S. **Animal Models in Toxicology**. (Ed.), Gad, S., 3rd Edition, Boca Raton: CRC Press, 1152 pages, 2016.

GAL, R., LIBERSAT, F. **A parasitoid wasp manipulates the drive for walking of its cockroach prey**. Curr. Biol., v. 18, p. 877-882, 2008.

GAL, R., LIBERSAT, F. **On predatory wasps and zombie cockroaches**. Commun. Integr. Biol., v. 3, p. 458-461, 2010.

GALLO, V. P., ACCORDI, F., CHIMENTI, C., *et al*. **Catecholaminergic System of Invertebrates: Comparative and Evolutionary Aspects in Comparison With the Octopaminergic System**. International Review of Cell and Molecular Biology, v. 322, p. 363-394, 2016.

GARLAND, S. L. **Are GPCRs still a source of new targets?**. J. Biomol. Screen., v. 9, p. 947-66, 2013.

GARRETT, K. M., GAN, J. **Enhancement of gaba-aminobutyric acid a receptor activity by alfa-chlorase**. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 285, p. 680–686, 1998.

GIRGIN, S., KAZANCI, N., DUGEL, M. **Relationship between aquatic insects and heavy metals in an urban stream using multivariate techniques**. Int. J. Environ. Sci. Tech., v. 7 (4), p. 653-664, 2010.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U. T., *et al*. **Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Breb**. Verhandlungen- Int. Vereinigung fur Theor. Und. Angew. Limnol., v. 15, p. 796-804, 1964.

GUEDES, R. N., WALSE, S. S., THRONE, J. E. **Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress**. Current Opinion in Insect Science, v. 21, p. 47-53, 2017.

HAMANAKA, Y., MINOURA, R., NISHINO, H., *et al*. **Dopamine- and Tyrosine Hydroxylase-Immunoreactive Neurons in the Brain of the American Cockroach, *Periplaneta Americana***. PLOS ONE, v. 11(8), p. e0160531, 2016.

HARDIE, R. C. **A histamine-activated chloride channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse**. Nature, v. 339, p. 704-706, 1989.

HENRIKSEN, P., CARMICHAEL, W.W., AN, J, *et al*. **Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/ blue-green algae from danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds**. Toxicon, v. 35, p. 901-913, 1997.

HESS, D., BÜSCHGES, A. **Sensorimotor pathways involved in interjoint reflex action of an insect leg**. J. Neurobiol., v.33(7), p. 891-913, 1997.

HIRATA, R., SKORTZARU, B., NARCISO, E. S. **Avaliação da degradação de inseticidas, em função do pH, utilizando *Drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática**. Arq. Inst. Biol., v.70, n.3, p.359-365, 2003.

HIRSCH, H. R. **Squid Giant Axon: Repetitive Responses to Alternating Current Stimulation**. Nature, v. 208 (5016), p. 1218-1219, 1965.

HODGKIN, A.L., HUXLEY, A. F. **A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve**. J. Physiol., v. 117, p. 500-544, 1952.

IOVDIJOVÁ, A., BENCKO, V. **Potential risk of exposure to selected xenobiotic residues and their fate in the food chain – Part I: Classification of Xenobiotics**. Ann. Agric. Environ. Med., v. 17, p. 183-192, 2010.

JARDIM, A. N. O., CALDAS, E. D. **Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para saúde**. Quim. Nova, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JOKANOVIĆ, M. **Ataxia in Patients Poisoned with Organophosphorus Compounds**. J. Neurol. Transl. Neurosci., v. 5(2): 1081, 2017.

KITA, T., IRIE, T., NOMURA, K., *et al*. **Pharmacological characterization of histamine-gated chloride channels from the housefly *Musca domestica***. NeuroToxicology, v. 60, p. 245-253, 2017.

KUME, K., KUME, S., KI-PARK, S., *et al*. **Dopamine is a Regulator of Arousal in the Fruit Fly**.J. Neurosci., v. 25(32), p.7377-7384, 2005.

LANGE A.B., ORCHARD, I., BARRETT, F.M. **Changes in hemolymph serotonin levels associated with feeding in the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus***. J. Insect Physiol., v. 35, p. 393-400, 1989.

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

LEÃO, P. N., COSTA, M., RAMOS, V., *et al*. **Antitumor activity of hierridin B, a cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains**. PloS One, v. 8(9), p. e69562, 2013.

LEE, C. Y. **Sublethal effects of insecticides on longevity, fecundity and behaviour of insect pests: a review**. Journal of Bioscience, v. 11, p. 107-112, 2000.

LIGUORE, G. R., JERONIMUS, B. F., LIGUORI, T. T. A., *et al*. **Ethical Issues in the Use of Animal Models for Tissue Engineering: Reflections on Legal Aspects, Moral Theory, Three Rs Strategies, and Harm–Benefit Analysis**. Tissue Engineering Part C: Methods, v. 23(12), p. 850-862, 2017.

LIMA, R. K., CARDOSO, M. G., MORAES, J. C., *et al*. **Insecticidal activity of Long-pepper essential oil (*Piper hispidinervum* C. DC.) on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).** Acta Amazonica, v. 39(2), p. 377-382, 2009.

LOPES, F. C., DOBROVOLSKA, O., REAL-GUERRA, R., *et al*. **Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease**. The FEBS Journal, v. 282(6), p. 1043-1064, 2015.

LOPES, R. B., PARAIBA, L. C., CECCARELLI, P. S. *et al*. **Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Chemosphere, v. 64, p. 56–62, 2006.

LORENZI, A. S., CORDEIRO-ARAÚJO, M. K., CHIA, M. A. **Cyanotoxin contamination of semiarid drinking water supply reservoirs**. Environmental Earth Sciences, v. 77, p. 595, 2018

MAHMOOD, N.A., CARMICHAEL, W.W. **Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena-Flos-Aquae* NRC-525-17**. Toxicon, v. 25, p. 1221-1227, 1987.

MAHMOOD, N.A., CARMICHAEL, W.W., PFAHLER, D. **Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green-algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae***. Am. J. Vet. Res., v. 49, p. 500-503, 1988.

MANZOLI-PALMA, M. F., GOBBI, N., PALMA, M. S. **Insects as biological models to assay spider and scorpion venom toxicity**. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., v.9, n.2, 2003.

MARTINELLI, A. H. S., KAPPAUN, K., LIGABUE-RAUN, R., *et a*l. **Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease**. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj., v. 1840, p. 935-944, 2014.

MATSUNAGA, S., MOORE, R. E., NIEMCZURA, W. P. **Anatoxin-a(s), a Potent Anticholinesterase from *Anabaena flos -aquae***. J. Am. Chem. Soc., v. 111, p. 8021-8023, 1989.

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

METCALF, J. S., BRUNO, M. **Anatoxin-a(s)**. In: MERILUOTO, J., *et al*. Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom, 2017.

MOBLEY, H. L. T., HAUSINGER, R. P. **Microbial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization**. Microbiol. Rev., v. 53, p. 85-108, 1989.

MOLICA, R. J. R., OLIVEIRA, E J. A., CARVALHO, P. V. V. C., *et al*. **Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply**. Harmful Algae, v. 4, p. 743-753, 2005.

MONDAL, K., KARMAKAR, B., HAQUE, S. **A review on effects of pyrethroids pesticides on fresh water fish behaviour and fish reproduction**. Journal of Global Biosciences, v. 4(6), p.2594-2598, 2015.

MOORE, E. L., HASPEL, G., LIBERSAT, F., *et al*. **Parasitoid wasp sting: A cocktail of GABA, taurine, and β-alanine opens chloride channels for central synaptic block and transient paralysis of a cockroach host**. Journal of Neurobiology, v. 66(8). p. 811-829, 2006

MORALES, M. M. **Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade?**. Cienc. Cult., v.60, n.2, p. 33-36, 2008.

MULINARI, F., STANISÇUASKI, F., BERTHOLDO-VARGAS, L. R., *et al*. **Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis***. Peptides, v. 28, p. 2042-2050, 2007.

MUSTARD, J., PHAM, P., SMITH, B. **Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee**. J. Insect Physiol., v 56(4), p.422-430, 2005.

MYLES, D.C. **Novel biologically active natural and unnatural products**. Current Opinion in Biotechnology, v. 14, p. 627-633, 2003.

NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. 3. ed., Flórida: Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016. Cap. 9, p. 255-281.

NAKANE, K., HAIDARY, A. Sensitivity Analysis of Stream Water Quality and Land Cover Linkage Models Using Monte Carlo Method. Int. J. Environ. Res., v. 4(1), p.121-130, 2010.

NAUEN, R. **Perspectives Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor**. Pest. Manag. Sci., v. 62, p. 690-692, 2006.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Trichlorfon, CID=5853, 2019. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5853. Acesso em 02 abr. 2019.

NIU, D. J., LIU, Y., DONG, X. T., *et al*. **Transcriptome based identification and tissue expression profiles of chemosensory genes in *Blattella germanica* (Blattaria: Blattidae)**. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D, v. 18, p. 30-43, 2016.

NRC, National Research Council. **Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process**. Washington, DC: National Academy Press, 1983. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25032414. Acesso em 24 jan. 2019.

NRC, National Research Council**. Science and Judgement in Risk Assessment**. Washington, DC: National Academy Press, 1994.

NRC, National Research Council. Committee on Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology. **Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and Risk Assessment**. Washington,DC: National Academies Press (US), 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10201/. Acesso em 24 jan. 2019.

NUTRINSECTA, INSETOS COMESTÍVEIS- ALIMENTO NUTRITIVO. **Barata cinerea**. 2019. Disponível em: http://www.nutrinsecta.com.br/artigos/barata-cinerea-nauphoeta-cinerea/. Acesso em 09 fev. 2019.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals**.Volume. 2, section 4, 1993.

ORCHARD, I. **Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator**. Can. J. Zool., v. 60, p. 659- 669, 1982.

ORCHARD, I. **Serotonin: a coordinator of feeding-related physiological events in the blood-gorging bug, *Rhodnius prolixus***. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., v. 144, p. 316-324, 2006.

OSBORNE, R. H. **Insect neurotransmission-neurotransmitters and their receptors.** Pharmacol. Therap., v. 69, p. 117-142, 1996.

O'SHEA M., ADAMS M. E., BISHOP C., *et al*. **Model peptidergic systems at the insect neuromuscular junction**. Peptides, v. 6, p. 417-424, 1985.

PAPAEFTHIMIOU, C., THEOPHILIDIS, G. **Octopamine— a single modulator with double action on the heart of two insect species (*Apis mellifera macedonica* and *Bactrocera oleae*): acceleration vs. inhibition**. J. Insect Physiol., v. 57, p. 316-325, 2011.

PATERSON, I., ANDERSON E. A. **The renaissance of natural products as drug candidates**. Science, v. 310, p. 451-453, 2005.

PARAMASIVAM, M. P., SELVI, C. **Laboratory bioassay methods to assess the insecticide toxicity against insect pests-A review**. Journal of Entomology and Zoology Studies, v. 5(3), p. 1441-1445, 2017.

PAUMGARTTEN, F. J. R. **Risk Assessment for Chemical Substances: The Link Between Toxicology and Public Healt**h. Cad. Saúde Públ., v. 9 (4), p. 439-447, 1993.

PFLÜGER, H. J., DUCH, C. **Dynamic Neural Control of Insect Muscle Metabolism Related to Motor Behavior**. Physiology, v. 26(4), p. 293-303, 2011.

PIOVESAN, A. R., STANISÇUASKI, F., MARCO-SALVADORI, J., *et al*. **Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: Role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease**. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 38, p. 1023-1032, 2008.

PIOVESAN, A. R., MARTINELLI, A. H. S., LIGABUE-BRAUN, R., *et al*. ***Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers**. Arch. Biochem. Biophys, v. 547, p. 6-17, 2014.

PIRES-ALVES, M., GROSSI-DE-SÁ, M. F., BARCELLOS, G. B., *et al*. **Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene Family from jack bean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]**. Plant Cell Physiol., v. 44, p.139-45, 2003.

RANG, H.P., DALLE, M., RITTER, J.M. **Farmacologia**. 7ª edição, Elsevier, 2011.

RATTAN, R. S. **Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin**. Crop Protection (9), p. 913-920, 2010.

RESTREPO-ANGULO, I., VIZCAYA, A., CAMACHO, J. **Ion channels in toxicology**. J. Appl. Toxicol., v. 30, p. 497-512, 2010.

RISK COMMISSION. **The Presidential/Congressional Commission on Risk Assessment and Risk Management**. Washington, DC: Government Printing Office, 1997.

ROBERTSON, H. A., CARLSON, A. D. **Octopamine presence in firefly lanterna suggests a transmitter role**. J. Exp. Zool., v. 195, p. 159-164, 1976.

ROCHA, L. C. S., SPINOSA, H. S. **Praguicidas organofosforados e carbamatos: algumas considerações**. Comun. Científicas da Fac. Med. Veterinária e Zootec. da Univ. São Paulo 16, p. 41-44, 1992.

ROCHA, S. A., LOUGON, M. S., GARCIA, G. O. **Influência de diferentes fontes de poluição no processo de eutrofização**. Revista Verde 4, p. 1-6, 2009.

RODRIGUES, N. R., NUNES, M. E., SILVA, D. G., *et al*. **Is the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* a valuable model for evaluating mercury induced oxidative stress?**. Chemosphere, v. 92(9), p. 1177-1182, 2013

RODRIGUES, R. H. F., SILVA, L. B., RODRIGUES, T. F., *et al*. **Sublethal Doses of Insecticides Affect the Fecundity and Fertility of the *Chrysodeixis includens*?**. American Journal of Plant Sciences, v. 9(3), p.1-12, 2018.

RODRIGUEZ, V., MORI, B., DORR, F. A., *et al*. **Effects of a cyanobacterial extract containing-anatoxin-a(s) on the cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans***. Rev. bras. farmacogn., v. 22, n. 4, 2012.

ROMOSER, W. S., STOFFOLANO, J. G. **The science of entomology**. 4th ed., p. 64, Boston, Massachussetts: WCB McGraw-Hill, 1998.

ROSENBERG, L. A., GLUSMAN, J. G., LIBERSAT, F. **Octopamine partially restores walking in hypokinetic cockroaches stung by the parasitoid wasp *Ampulex compressa***. Journal of Experimental Biology, v. 210, p. 4411-4417, 2007.

SAADEH, A. M., AL-AKI, MK., FARSAKH, N. A. *et al*. **Clinical and Sociodemographic Features of Acute Carbamate and Organophosphate Poisoning: A Study of 70 Adult Patients in North Jordan**. J. Toxicol. Clin. Toxicol., v. 34, 45-51, 1996.

SANTOS, D. S. **Atividade biológica do veneno de *Bothriurus bonariensis* sobre o sistema nervoso de insetos e mamíferos**. 2014. 53 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2014.

SANTOS, A. T. S., SELEGHIM, M. R., NERILO, S. B., *et al*. **Inseticidas organofosforados e intoxicação humana: Uma revisão da produção cientifica sobre o tema**. Revista de Saúde e Biologia, v. 10, n. 2, p. 54-65, 2015.

SANTOS, D. S., CARVALHO, E. L., DE LIMA, J. C. *et al*. ***Bothriurus bonariensis* scorpion venom activates voltage-dependent sodium channels in insect and mammalian nervous systems**. Chem Biol Interact., v. 258, p. 1-9, 2016.

SATTELLE, D. B., CORDOVA, D., CHEEK, T. R. **Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals**. Invert. Neurosci., v. 8, p. 107-119, 2008.

SCHAFER, S., REHDER, V. **Dopamine-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee**. J. Camp. Neural., v. 280, p. 43-58, 1989.

SELHEIM, F., HERFINDAL, L., MARTINS, R., *et al*. **Neuro-apoptogenic and blood platelet targeting toxins in benthic marine cyanobacteria from the Portuguese coast**. Aquatic Toxicology, v. 74(4), p. 294-306, 2005.

SILVA, M. T. B., COSTA, E. C., BOSS, A. **Controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) com reguladores de crescimento de inseto**. Ciência Rural, v. 33(4), p. 601-605, 2003.

SMARANDACHE-WELLMANN, C. R. **Arthropod neurons and nervous system**. Current Biology, v. 26(20), p. R960-R965, 2016.

SPRUIJT, B. M., HOL, T., ROUSSEAU, J. **Approach, Avoidance, and Contact Behavior of Individually Recognized Animals Automatically Quantified with an Imaging Technique**. Physiology & Behavior, v. 51, p. 747-752, 1992.

STANISÇUASKI, F., TE BRUGGE, V., CARLINI, C., *et al*. **In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules**. J. Insect Physiol., v. 55, p. 255-263, 2009.

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

STANKIEWICZ, M., DĄBROWSKI, M., DE LIMA, M. E. **Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxinological Studies: A Short Historical and Actual View**. Journal of Toxicology, v. 2012, p.1-11, 2012.

STÜRMER, G.D., DE FRETAS, T. C., HEBERLE, M. A., *et al*. **Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal Doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches.** Ecotoxicol. Environ. Saf., v. 109, p. 56-62, 2014.

STEVENS, M., PEIGNEUR, S., TYTGAT, J. **Neurotoxins and their binding areas on voltage-gated sodium channels**. Front. Pharmacol., v. 2, p. 1-13, 2011.

TAN, J., LIU, Z., TSAI, T.D., *et al*. **Novel sodium channel gene mutations in *Blattella germanica* reduce the sensitivity of expressed channels to deltamethrin**. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 32(4), p. 445-454, 2002.

THANY, S. H., TRICOIRE-LEIGNEL, H. **Emerging pharmacological properties of cholinergic synaptic transmission: comparison between mammalian and insect synaptic nd extrasynaptic nicotinic receptors**. Curr.Neuropharmacol., v. 9, p. 706-714, 2011.

THOMAS, G. **Medicinal chemistry: an introduction**. Chichester, New York: Wiley and Sons, p.23-48, 2000.

VALLES, S. "**German Cockroach**" (On-line). University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences – Featured Creatures, 2008. Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/roaches/german.htm. Acesso em 10 fev. 2019.

VEIGA, N. C. A. R. **Cianobactéria tóxica na água para consumo humano**. Faculdades Integradas Vianna Junior, 2008.

VERLINDEN, H., VLEUGELS, R., MARCHAL, E., *et al*. **The role of octopamine in locusts and other arthropods**. J. of Insect Physiology, v. 56, p.854-867, 2010.

VIELLEMARINGE, J., DURIS, P., GEFFARD, M., *et al*. **Immunohistochemical localization ofdopamine in the brain of the insect *Locusta migratoria mrigratoroides* in comparison with catecholamine distribution determmed by the histofluorescence technique**. Cell. Tissue Res., v. 237, p. 391-394, 1984.

VLEUGELS, R., VERLINDEN, H., BROECK, J. V. **Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects**. Neurotransmitter, p. 1-4, 2015.

XU, Y., AN, F., BORYCZ, J. A., *et al*.**Histamine Recycling Is Mediated by CarT, a Carcinine Transporter in Drosophila Photoreceptors**.

ZHANG, X., KAN, X., WU, H., *et al*. **Transcriptome-wide survey, gene expression profiling and exogenous chemical-induced transcriptional responses of cytochrome P450 superfamily genes in migratory locust (*Locusta migratoria*)**. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 100, p. 66-77, 2018.

ZHOU, X., QIAN, K., TONG, Y., *et al*. **De Novo Transcriptome of the Hemimetabolous German Cockroach (*Blattella germanica*).** PLOS ONE, v. 9(9), p. e106932, 2014.

ZHUKOVSKAYA, M., YANAGAWA, A., FORSCHLER, B. T. ***Grooming* behavior as a mechanism of insect disease defense**. Insects, v. 4(4), p. 609-630, 2013.

WANG, X., FANG, X., YANG, P., *et al*. **The locust genome provides insight into swarm formation and long-distance flight**. Nature Communications, v. 5 (2957), p. 1-9, 2014.

Wang, G. K., Wang, S. Y. **Veratridine block of rat skeletal muscle Nav1.4 sodium channels in the inner vestibule**. J. Physiol., v. 548, p. 667-675, 2003.

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

WEISEL-EICHLER, A., HASPEL, G., LIBERSAT, F. **Venom of a parasitoid wasp induces prolonged *grooming* in the cockroach**. J. Exp. Biol., v. 202, p. 957-64, 1999.

WENDT, B., HOMBERG, U. **Immunohistochemistry of dopamine in the brain of the locust *Schistocerca gregaria***. J. Comp. Neurol., v. 321, p. 387-403, 1992.

WERNER, V. R., LAUGHINGHOUSE IV, H. D., FIORE, M. F., *et al*. **Morphological and molecular studies of *Sphaerospermopsis torques-reginae* (Cyanobacteria, Nostocales) from South American water blooms**. Phycologia, v. 51(2), p. 228-238.

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