

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jaburetox, peptídeo derivado de ureases: Efeitos sobre as vias enzimáticas da barata *Nauphoeta cinerea*

Dissertação de Mestrado

Ana Paula Perin

Porto Alegre, Agosto de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jaburetox, peptídeo derivado de ureases: Efeitos sobre as vias enzimáticas da barata *Nauphoeta*

cinerea

Ana Paula Perin

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, Agosto de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jaburetox, peptídeo derivado de ureases: Efeitos sobre as vias enzimáticas da barata *Nauphoeta cinerea*

Ana Paula Perin

Orientação:

Prof^a. Dra. Fernanda Stanisçuaski
Centro de Biotecnologia (CBIOT) – UFRGS

Co-orientação:

Dr. Leonardo Luis Fruttero
Departamento de Bioquímica Clínica, Universidad Nacional de Córdoba

Porto Alegre, Agosto de 2018

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Proteínas Tóxicas, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot/UFRGS), sob orientação da Prof^a. Dra. Fernanda Stanisquaski e co-orientação do Dr. Leonardo Luis Fruttero. Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Banca de avaliação

Prof. Dr. Alexandre José Macedo
Departamento de Produção de Matéria-Prima – UFRGS

Prof^ª. Dra. Guendalina Turcato Oliveira
Departamento de Ciências Morfofisiológicas – PUCRS

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo
Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia, LANETOX - UNIPAMPA

Dra. Fernanda Cortez Lopes
(Revisora da dissertação e membro suplente)
Centro de Biotecnologia (CBIOT) – UFRGS

Porto Alegre, Agosto de 2018

Agradecimentos

Agradeço muito aos meus orientadores. Dra. Fernanda Stanisçuaski que me aceitou como orientada em meio ao processo e me deu suporte a auxílio ao longo do mestrado. Ao meu co-orientador Dr. Leonardo Fruttero, que mesmo sendo argentino é muito gente boa (brincadeira interna). Obrigada pela orientação nesse período e que mesmo quando voltou para a Argentina se fez presente quando precisei. Obrigada pelos ensinamentos, confiança e dedicação. Sou grata por terem me concedido a oportunidade de aprender e crescer com vocês.

Agradeço também a Dra. Célia Carlini, que foi quem aceitou ser minha orientadora quando entrei no programa, no entanto processos burocráticos impediram a continuidade dessa orientação.

Agradeço ao meu vizinho de bancada, Matheus Grahl. Que se tornou muito mais do que um amigo, sempre me auxiliando no que precisei, tanto no laboratório como fora dele. Obrigada por sempre me animar nos períodos “complicados” que eu dava “piti” por tudo, até mesmo pela tampa da centrífuga não abrir. Te amo.

Aos colegas de laboratório Fernanda Lopes e Anne Helene, que sempre me ajudavam a achar coisas no laboratório, preparar soluções e principalmente a mexer no temido Akta. Natália Moyetta, que me ensinou muito quando entrei no laboratório. Mila, que esteve comigo durante esse período me auxiliando nos ensaios, cuidando da colônia e dissecando milhares de gânglios, também conhecida como Mila Maria, a chefe dos ICs. Aos colegas Rodrigo Braun, Valquíria Broll, Augusto Uberti, Natália Callai e Jozi Estanislau que de alguma forma, contribuíram para a realização desse mestrado, seja no laboratório com ideias para o projeto ou nas conversas divertidas na hora do bolo com café.

Aos professores Dr. Cháriston A. Dal Belo, Dr. Rogério Margis por acompanharem o andamento desta dissertação, como comissão de acompanhamento. Silvinha, a melhor secretária que um PPG pode ter, prestativa e ágil em todos os momentos e sempre com muita alegria.

Aos meus familiares, meu irmão Mauricio, que mesmo nesse amor de mula que vivemos, sempre estamos prontos para ajudar um ao outro. Minha mãe Nadir, que é um exemplo de pessoa para mim. É em quem me espelho e digo: “Quero crescer na vida como minha mãe fez”. Pessoa guerreira, que mesmo sem suporte familiar, saiu de casa decidida a estudar e se tornar professora.

Ao meu pai, Claudino (*in memoriam*), que infelizmente partiu cedo, mas que foi um excelente pai, deixando-me ensinamentos que são importantes até hoje e seus valiosos genes, os quais me orgulho de ter herdado. Aos meus padrinhos, Elair e Osmar, que sempre estiveram presentes na minha vida, sendo realmente segundos pais e anjos da guarda. Vocês são minha base sólida de apoio que me faz crescer. Amo e admiro vocês!

E a Deus pelas boas surpresas e oportunidades.

Índice

Lista de abreviaturas	10
Resumo.....	12
Abstract.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Jaburetox.....	14
1.2 Enzimas	16
1.2.1 UDP-N-Acetilglicosamina pirofosforilase.....	16
1.2.2 Acetilcolinesterase.....	19
1.2.3 Óxido nítrico sintase	21
1.2.4 Fosfatases ácidas	22
1.3 <i>Nauphoeta cinerea</i>	23
1.3.1 Sistema nervoso central de baratas	25
2. OBJETIVO GERAL	28
2.1 Objetivos específicos	28
3. MANUSCRITO	29
Abstract.....	31
1. Introduction.....	32
2. Materials and methods	34
2.1. Chemicals	34
2.2. Animals	35
2.3. Jaburetox production.....	35
2.4. Dissection and tissue collection.....	37
2.5. Jbtx insecticidal assay	37
2.6. Determination of enzymatic activities.....	38
2.7. NOS protein expression.....	41
2.8. UAP protein expression.....	42
2.9. Statistical Analysis.....	42
3. Results	43
3.1. Insecticidal effect of Jbtx on adult cockroaches	43
3.2. Jbtx affects the nitrinergic pathway	44

3.3. Jbtx has no effects on ACP activity.....	46
3.4. Jbtx alters UAP activity	47
3.5. Jbtx modulates AChE activity.....	49
4. Discussion.....	51
5. Conclusion	54
6. Acknowledgements	55
4. DISCUSSÃO GERAL	55
5. CONCLUSÃO GERAL	60
6. REFERÊNCIAS.....	61
Apêndice A.....	72
Apêndice B.....	74
Curriculum Vitae	76

Lista de abreviaturas

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

ACP: Fosfatases ácidas

BgAChE1: Acetilcolinesterase 1 de *Blattella germanica*

BgChE2: Acetilcolinesterase 2 de *Blattella germanica*

CarE: Carboxilesterase

CNTX: Canatoxina

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

FITC: Isotiocianato fluorescente

GMPc: Guanosina monofosfato cíclico

GPI: Glicosilfosfatidilinositol livres

GST: Glutathione S-transferase

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

Jbtx: Jaburetox

JBU: Urease majoritária de *Canavalia ensiformis* (do inglês *Jack bean urease*)

JBURE-II: Isoforma de urease de *Canavalia ensiformis* (do inglês *Jack bean urease II*)

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

PAMP: padrões moleculares associados a patógenos

p-NPA: *p*-nitrofenil acetate esterase

rUAP: UAP recombinante

SN: Sistema nervoso

SNC: Sistema nervoso central

UAP: UDP-*N*-acetilglicosamina pirofosforilase

UDP-GlcNac: UDP-*N*-acetilglicosamina

Resumo

Jaburetox é um peptídeo recombinante (~11 kDa) derivado de uma das isoformas de ureases da planta *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecida como feijão-de-porco. O peptídeo induz efeitos variados em diferentes ordens de insetos, incluindo interferência na contração muscular em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*, ativação do sistema imunitário do vetor da doença de Chagas, *Rhodnius prolixus* e também, modula a atividade da enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UAP) e da óxido nítrico sintase (NOS) no sistema nervoso central de *R. prolixus* e *Triatoma infestans*. Além disso, quando injetado, o Jaburetox é letal para ninfas de *R. prolixus* e insetos adultos de *T. infestans*. No presente trabalho foi avaliado o efeito inseticida do Jaburetox em baratas adultas da espécie *N. cinerea*, assim como, exploramos os efeitos induzidos pelo peptídeo no sistema nervoso central, focando na atividade enzimática das enzimas UAP, NOS, fosfatases ácidas (ACP) e acetilcolinesterase (AChE). Os ensaios enzimáticos foram realizados após tratamentos *in vivo* e *in vitro* com o Jaburetox, utilizando homogenatos de sistema nervoso central. Técnicas espectrofotométricas foram utilizadas para mensurar a atividade enzimática e a expressão proteica foi avaliada através de Western blot. Para o ensaio inseticida, Jaburetox foi administrado via oral e via injeção no inseto, utilizando uma dose de 50 µg de Jaburetox por g de inseto, ou o mesmo volume de tampão como controle. Em *N. cinerea*, ambos os tratamentos, *in vivo* e *in vitro*, inibiram parcialmente a atividade da NOS, sem modificar os níveis proteicos da mesma. Nenhuma alteração foi observada nos níveis da ACP após tratamentos com Jaburetox. A enzima UAP apresentou diminuição da atividade após 18 h de tratamento *in vivo* com o Jaburetox. Além disso, em todos os tratamentos *in vivo* com o peptídeo foi observado um aumento da atividade da AChE, sugerindo um possível mecanismo de resposta aos inseticidas. Contudo, mesmo após injeção e ingestão de Jaburetox as baratas adultas não tiveram taxas de mortalidade significativas, indicando resistência ao efeito inseticida do peptídeo. Em suma nossos resultados sugerem que o Jaburetox afeta as vias nitrinérgica, assim com a atividade da UAP e da AChE na barata. O fato do peptídeo afetar diferentemente as atividades enzimáticas dos *R. prolixus* e da *N. cinerea* podem explicar o porquê as baratas não são susceptíveis ao Jaburetox.

Abstract

Jaburetox is a recombinant peptide (~11 kDa) derived from one of the *Canavalia ensiformis* (Jack bean) urease isoforms. The peptide induces several effects on insects of different orders, including the interference on muscle twitch tension in the cockroach *Nauphoeta cinerea*, the activation of the immune system in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*, and the modulation of the enzyme activities of the UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) and nitric oxide synthase (NOS) in the central nervous system of *R. prolixus* and the related triatomine *Triatoma infestans*. Moreover, when injected, the peptide is lethal for *R. prolixus* nymphs and *T. infestans* adults. Here, we evaluated the insecticidal effect of Jaburetox on *N. cinerea* adult cockroaches and explored the effects induced by Jaburetox on the central nervous system, focusing on the enzymatic activities of UAP, NOS, acid phosphatases (ACP), and acetylcholinesterase (AChE). The enzymatic experiments were performed after *in vitro* and *in vivo* treatments with Jaburetox using central nervous system homogenates from adult cockroaches. Spectrophotometric assays were employed to measure the enzyme activities and the protein expression of UAP and NOS was evaluated by Western blot. The insecticidal assay was conducted by injection and ingestion of 50 µg of Jaburetox per g of insect or the same volume of buffer for the controls. In *N. cinerea*, both *in vivo* and *in vitro* treatments with the peptide partially inhibited the activity of NOS, without modifying the protein levels. No alterations on ACP activity were observed upon Jaburetox treatment. In addition, the enzyme activity of UAP only had its activity affected at 18 h after injection. The peptide increased the AChE activity, suggesting a possible mechanism involved in overcoming the toxic effects of the insecticide. Moreover, the cockroaches did not die after Jaburetox injection and ingestion, indicating resistance to the toxic action of the peptide. Taken together, our findings indicate that Jaburetox alters the nitrinergic signaling as well as the AChE and UAP activities. The fact that Jaburetox affects differently the enzyme activities in *R. prolixus* and *N. cinerea* may explain why the cockroach is not susceptible to the lethal effect of the peptide.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Jaburetox

Jaburetox (Jbtx) é um peptídeo recombinante de aproximadamente 11 kDa, constituído por 93 aminoácidos e expresso de forma heteróloga em *Escherichia coli*. Esse peptídeo foi clonado a partir de uma das isoformas da urease da planta *Canavalia ensiformis*, conhecida popularmente como feijão de porco (MULINARI *et al.*, 2007). As ureases são metaloenzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono e são amplamente sintetizadas por plantas, fungos e bactérias, mas não por animais (BLAKELEY *et al.*, 1969; MOBLEY & HAUSINGER, 1989; HAUSINGER, 1987). Há três isoformas de ureases presentes na *C. ensiformis* que foram descritas: *Jack Bean Urease* (JBU), canatoxina (CNTX) e a JBURE-II (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Essas proteínas são caracterizadas como *moonlighting*, por apresentarem propriedades independentes da sua atividade enzimática (LIGABUE-BRAUN & CARLINI, 2015; CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016).

A CNTX foi a primeira proteína obtida a partir da *C. ensiformis* cujas propriedades tóxicas foram estudadas (CARLINI & GUIMARÃES, 1981). Ao longo dos anos, estudos foram realizados demonstrando os efeitos tóxicos da CNTX e seu mecanismo de ação em mamíferos. Apenas em 1997 foi caracterizada a ação entomotóxica dessa proteína, evidenciando que quando administrada por via oral nos insetos era tóxica apenas para aqueles que possuíam enzimas digestivas do tipo catepsina. Esse tipo de enzima cliva a urease em um sítio específico, liberando um peptídeo de ~10 kDa nocivo para o inseto, denominado pepcanatox. Em 2007 foi desenvolvido um peptídeo recombinante, análogo ao pepcanatox, chamado de Jaburetox-2Ec,

clonado a partir da JBURE-II, resultando em um produto de 270 pares de bases (MULINARI *et al.*, 2007).

Estudos realizados demonstraram que o peptídeo é tóxico para fungos filamentosos, bactérias de importância clínica e para insetos que não eram susceptíveis a ação entomotóxica da CNTX, evidenciando que Jbtx tem um amplo espectro de ação (BECKER-RITT *et al.*, 2017). Além disso, ensaios com ratos neonatos e camundongos demonstraram que a administração de 10 mg/Kg de Jbtx não provocou sintomas de toxicidade ou morte quando fornecido por via oral ou intraperitoneal nesses animais (MULINARI *et al.*, 2007). Também em ensaios realizados com células tumorais de mamíferos o peptídeo não apresentou efeito citotóxico, quando testado em concentrações micromolares (BECKER-RITT *et al.*, 2017). Ensaios realizados com os túbulos de Malpighi de *Rhodnius prolixus*, inseto vetor da doença de Chagas, demonstraram que o Jbtx altera os níveis de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) nesse órgão, resultando na inibição da diurese (STANISÇUASKI *et al.*, 2009). Em 2015, Galvani e colaboradores, demonstraram pela primeira vez a interação física do Jbtx com uma proteína do sistema nervoso central (SNC) do triatomíneo *Triatoma infestans*, identificada como a enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase (UAP). Nesse trabalho também foi demonstrado que quando o inseto é injetado com o peptídeo, Jbtx interage com uma porção específica do cérebro, o lobo antenal, local com grande atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (GALVANI *et al.*, 2015). Portanto neste trabalho foi confirmada a hipótese de que o SNC é um dos alvos do peptídeo, corroborando a observação de que insetos injetados com Jbtx apresentavam paralisia e movimentos descoordenados de antenas e patas (MULINARI *et al.*, 2007).

Posteriormente, um estudo realizado pelo nosso grupo evidenciou a capacidade do Jbtx em interagir com membranas celulares, induzindo a formação de poros e alterando as

propriedades físicas das mesmas (PIOVESAN *et al.*, 2014). Essas características foram reforçadas em trabalhos seguintes, onde foi demonstrada a interação do peptídeo com as membranas celulares de hemócitos de *R. prolixus*, assim como com o cérebro do mesmo inseto e também com o cordão nervoso da barata *N. cinerea* (BROLL *et al.*, 2017; FRUTTERO *et al.*, 2017; MOYETTA *et al.*, 2017). Quando Jbtx é separado em suas porções N e C-terminais, ambos fragmentos do peptídeo se mostraram igualmente ativos em relação ao peptídeo intacto, sendo capazes de interagir e romper membranas lipídicas, reduzir a força de contração do músculo coxal de barata, assim como, causar mortalidade em *R. prolixus* e no Hemíptero *Oncopeltus fasciatus* (MARTINELLI *et al.*, 2014).

Jbtx foi classificado como um peptídeo intrinsecamente desordenado, apresentando pouca estrutura secundária e nenhuma conformação terciária, apenas formado por *coils*, exibindo cinco confôrmeros distintos em solução (LOPES *et al.*, 2015 PDB 2MM8). Essa estrutura tão versátil e flexível é o que, muito provavelmente, possibilita o peptídeo ter tantos efeitos e interagir de forma variável nos sistemas biológicos testados até o momento.

1.2 Enzimas

1.2.1 UDP-N-Acetilglicosamina pirofosforilase

A UAP, (E.C. 2.7.7.23) é uma proteína amplamente distribuída entre eucariontes e procariontes. Essa enzima é responsável pela metabolização da molécula UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNAc), que por sua vez é um substrato envolvido em muitos processos fisiológicos dos seres vivos. O UDP-GlcNAc é necessário para a formação das âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), glicosilação de proteínas extracelulares, síntese de quitina e

também possui participação na estrutura e função de matrizes celulares (ARAKANE *et al.*, 2011; COHEN, 2001; MIO *et al.*, 1998).

A quitina é um componente essencial da parede celular de fungos, na cutícula e trato intestinal dos insetos funcionando como revestimento protetor (HEGEDUS *et al.*, 2009). Os insetos têm a necessidade constante de sintetizar e degradar quitina, a fim de permitir a ecdise e a regeneração da cutícula, acomodando assim o novo tamanho do corpo. A rota da formação da quitina é complexa e envolve várias enzimas, no entanto a quitina sintase e a UAP são duas enzimas muito importantes nesse processo (MERZENDORFER, 2003). A via da formação da quitina pode iniciar com a trealose, glicose ou glicogênio seguido por sucessivas biotransformações, incluindo fosforilação e aaminação até chegar no produto UDP-GlcNAc (Fig. 1), catabolizado pela enzima UAP, seguindo pela posterior conversão desse açúcar em polímeros de quitina, pela quitina sintase (COHEN, 2001).

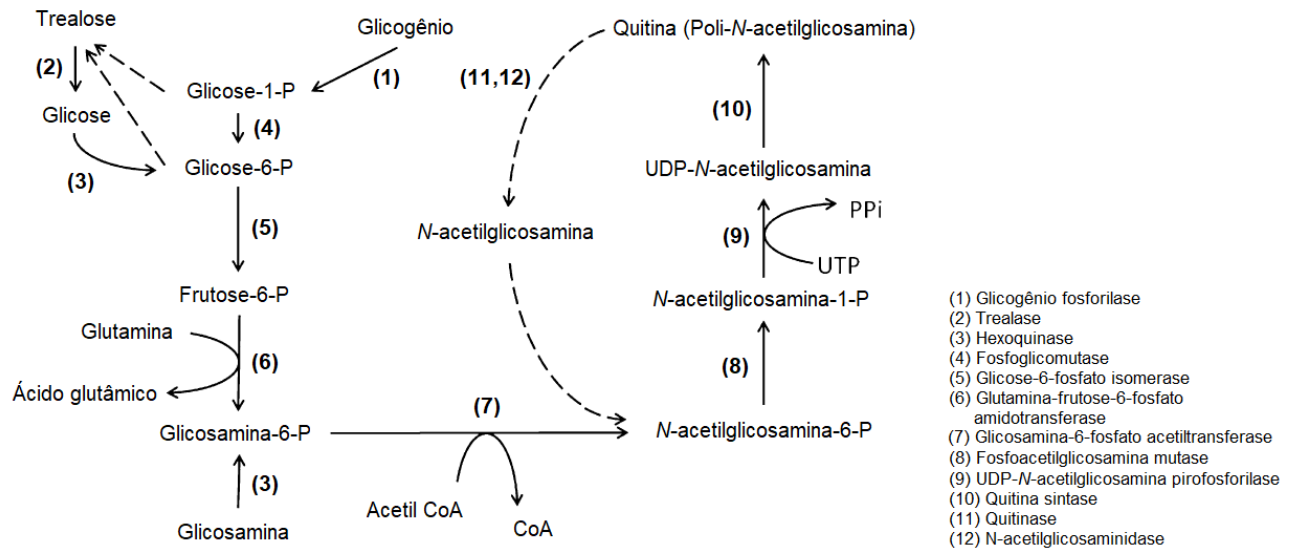


Figura 1. A rota da síntese de quitina. A imagem apresenta os metabólitos produzidos pelas enzimas, representadas por números, e ao lado da rota há o nome de cada enzima. Figura adaptada de MERZENDORFER, 2011.

Devido ao fato do produto da UAP estar intimamente relacionado com funções vitais de fungos, bactérias e insetos, houve o aumento de estudos sobre essa via metabólica envolvendo a tentativa de se desenvolver inibidores, visando o controle de pragas e de organismos causadores de doenças (FANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2018; RANI & KHAN, 2016). Os estudos realizados visam o bloqueio da enzima UAP, inviabilizando as funções fisiológicas da enzima, acarretando na mortalidade do organismo alvo.

Âncoras de GPIs são moléculas compostas por fosfato de etanolamina, trimanosídeo, glicosamina e um inositol. Estão anexadas na membrana plasmática e covalentemente ligadas às proteínas pelas suas porções carboxi-terminais, sendo um mediador entre essas duas estruturas (FERGUSON & WILLIAMS, 1988). A grande maioria das proteínas ancoradas por GPI encontram-se na superfície externa da membrana celular, no entanto também podem existir algumas na porção interna (FERGUSON & WILLIAMS, 1988). As âncoras de GPIs são amplamente encontradas em protozoários, leveduras, fungos, plantas, insetos e nos vertebrados, no entanto não estão presentes nas bactérias (IKEZAWA, 2002). As funções das proteínas ancoradas por GPI são as mais variadas, desempenhando papel na transdução de sinal, resposta imune, invasão e metástase de células tumorais e na patofisiologia de parasitas (NOSJEAN *et al.*, 1997). Relatos na literatura evidenciaram que GPIs de *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária, tem função de padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *pathogen-associated molecular pattern* – PAMP) e toxina durante o processo de infecção do patógeno (SCHOFIELD & GRAU, 2005; SCHOFIELD & HACKETT, 1993). Também há evidências que as proteínas ancoradas por GPI podem ser utilizadas pelos patógenos como receptores para a invasão do hospedeiro, como observado em *Streptococcus agalactiae*, *Clostridium septicum* e também em vírus (BREINIG *et al.*, 2002; GORDON *et al.*, 1999; LANG & PALMER, 2003).

A glicosilação é uma das modificações de biomoléculas mais frequentes, realizada através da adição de sacarídeos em sítios específicos de proteínas e lipídeos. Este processo é essencial para a formação das proteínas de membrana, secretórias, e também é responsável pelo dobramento correto das mesmas (ZHANG *et al.*, 2012). Os tipos mais comuns de glicosilação são nitrogênio-glicosilação (*N*-glicosilação), que ocorre no nitrogênio da amida de cadeias laterais de asparagina, e a oxigênio-glicosilação (*O*-glicosilação), que ocorre no hidróxi oxigênio da serina, tirosina e treonina (SPIRO, 2002). Além das funções básicas da glicosilação, há trabalhos demonstrando que esse processo também está envolvido na resposta imune dos insetos (HERRERO *et al.*, 2007; MORTIMER *et al.*, 2012), bem como no funcionamento do sistema nervoso (SN) e no controle dos movimentos (REPNIKOVA *et al.* 2010; SARKAR *et al.* 2006).

1.2.2 Acetilcolinesterase

Presente nos invertebrados e nos vertebrados, a acetilcolinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) é uma enzima do grupo das serina hidrolases, essencial para o bom funcionamento dos terminais sinápticos (CYGLER *et al.*, 1993). Tem como função a hidrólise da acetilcolina em acetato e colina, resultando na finalização do estímulo sináptico (FOURNIER *et al.*, 1992).

Muitos estudos delineavam que os insetos possuíam apenas um tipo de AChE (TOUTANT, 1989), no entanto estudos mais recentes demonstraram que alguns insetos possuem duas enzimas, dentre eles o pulgão do algodão, *Aphis gossypii*, o pulgão dos cereais, *Schizaphis graminum*, a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* e a barata *Blattella germânica* (KIM *et al.*, 2006). Na barata, as enzimas são nomeadas BgAChE1 e BgChE2, sendo a BgChE1 mais abundante e associada a sinalização sináptica e a BgChE2 coexistindo com a forma 1, no entanto

sua função fisiológica não foi bem caracterizada. Sabe-se também que a localização predominante dessas enzimas é o SNC, especificamente nos gânglios da cabeça e torácicos (KIM *et al.*, 2006; TAYLOR & NEWBURGH, 1979).

Pelo fato de desempenhar um papel fundamental no SNC dos insetos, muitos inseticidas anticolinesterásicos vêm sendo utilizados, dentre eles os organofosforados e os carbamatos. O mecanismo de ação de agroquímicos se baseia na interação com a enzima como um substrato, ligando-se covalentemente e carbamitando ou fosforilando a serina do sítio ativo, resultando no bloqueio irreversível da enzima, acarretando na morte do inseto (ALDRIDGE, 1950; COLOVIC *et al.*, 2013). No entanto, muitos estudos relatam a relação íntima entre a AChE com a resistência de alguns insetos em relação aos pesticidas orgânicos (CHEN *et al.*, 2001; HSU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011), uma vez que a AChE faz parte do grupo das enzimas conhecidas como detoxificadoras, as quais ajudam a minimizar ou neutralizar as alterações fisiológicas causadas pelos compostos nocivos. Algumas das enzimas detoxificadoras conhecidas são a AChE, glutationa S-transferase (GST), carboxilesterase (CarE) e *p*-nitrofenil acetate esterase (*p*-NPA) dentre outras (LI *et al.*, 2016; LIAO *et al.*, 2016; MOHAMED *et al.*, 2016).

Estudos que correlacionam essas enzimas com a resistência aos pesticidas, demonstram que o aumento da atividade das GSTs, CarE, e da AChE são os grandes responsáveis por essa resposta (BARRIOS *et al.*, 2010; PETHUAN *et al.*, 2007). Também há estudos que evidenciam a existência de AChEs insensíveis aos organofosforados e carbamatos, inviabilizando o bloqueio da enzima por esses pesticidas (YANG *et al.*, 2008; YU, 2006). Kim e colaboradores (2012), evidenciaram a presença de duas isoformas de AChEs em *Apis mellifera* com funções diferentes, uma envolvida na transmissão sináptica e a outra forma nas funções não neuronais, incluindo defesa contra agentes tóxicos (KIM *et al.*, 2012).

1.2.3 Óxido nítrico sintase

A NOS (E.C. 1.14.13.39) é a enzima envolvida na produção do óxido nítrico (NO), o qual está envolvido em diferentes processos, como mediador no SN e da resposta imunológica dos insetos (ELPHICK *et al.*, 1993; STEFANO & OTTAVIANI, 2002). O NO é sintetizado na reação catalítica, na qual a L-arginina é convertida em NO e L-citrulina, com o auxílio do cofator NADPH e O₂ como doador de oxigênio. Três tipos de NOS em mamíferos estão descritas na literatura: neuronal (nNOS ou tipo 1), induzível (iNOS ou tipo 2) e endotelial (eNOS ou tipo 3), sendo os tipos 1 e 3 constitutivos. Em insetos, essa subdivisão não é feita (DAVIES, 2000). Nos insetos a NOS foi descrita no cérebro da abelha *A. mellifera*, na *Drosophila melanogaster* e no gafanhoto *Schistocerca gregaria* (ELPHICK *et al.*, 1995, 1993; MÜLLER, 1994), bem como nas glândulas salivares de *R. prolixus* (RIBEIRO & NUSSENZVEIG, 1993), entre outras espécies não mencionadas acima.

Quando uma infecção é detectada no organismo dos mamíferos, o sistema imunitário é logo ativado para o combate e remoção desses corpos estranhos. Nos insetos isso não é diferente, havendo um sistema responsável por esse trabalho, ativado por várias formas de mediadores, como aminas biogênicas, citocinas, eicosanóides e NO (BAINES & DOWNER, 1994; GEUN *et al.*, 2009; SADEKUZZAMAN *et al.*, 2018; STANLEY *et al.*, 2009). Sadekuzzaman e colaboradores evidenciaram a relação direta entre a infecção por bactéria em larvas de *Spodoptera exigua* e o aumento da concentração de NO nos hemócitos e no corpo gorduroso do inseto. Esse processo resulta na ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂) e biossíntese de eicosanóides, desencadeando assim a resposta imune (SADEKUZZAMAN *et al.*, 2018). Além de desencadear a resposta imunitária o NO por si, tem ação contra patógenos, induzindo a oxidação e a

nitrosilação de resíduos de aminoácidos, resultando na alteração da estrutura secundária das proteínas, culminando na inviabilidade do parasita (RADI, 2004).

O NO está envolvido em diversos mecanismos de sinalização do SN como no processo da memória, visão, olfato, sistema mecanossensorial e quimiossensorial, assim como na orientação axonal (BICKER, 2001; DAVIES, 2000; MÜLLER & HILDEBRANDT, 1995; OTT & BURROWS, 1998). Também é importante durante o desenvolvimento do inseto, regulando a proliferação celular, crescimento axonal e maturação sináptica, sendo a presença do NO juntamente com o cGMP essencial para a boa formação do SNC do inseto durante o desenvolvimento (SEIDEL & BICKER, 2000; WANG *et al.*, 1995; WILDEMANN & BICKER, 1999). Wright e colaboradores (1998), demonstraram que a inibição da NOS e guanilato ciclase solúvel (sGC) durante o desenvolvimento de larvas de *Manduca sexta* tem efeitos significativos na maturação de várias classes de neurônios do SN entérico. Um dos efeitos apresentados é a diminuição da formação dos dendritos sinápticos em uma população de neurônios migratórios e também a redução do crescimento de sinapses maduras pelos neurônios pós-migratórios no músculo visceral adjacente (WRIGHT *et al.*, 1998).

1.2.4 Fosfatases ácidas

A fosforilação/desfosforilação é um dos principais mecanismos de regulação da atividade proteica. Nesse processo a enzima quinase desempenha um papel fundamental no processo, no entanto as fosfatases ácidas (ACP, E.C.3.1.3.2) também são importantes. ACP são enzimas que preferencialmente trabalham em pH ácido (pH 4-7), daí vem a referência à nomenclatura (VINCENT *et al.*, 1992). São amplamente presentes nos seres vivos e realizam a hidrólise de

uma gama de monoésteres fosforilados, liberando uma molécula de fosfato (PANARA *et al.*, 1989). Relatos na literatura evidenciam que a fosforilação de resíduos específicos (serina) da NOS, podem resultar na regulação da atividade dessa enzima (ALDERTON *et al.*, 2001).

Estudos prévios demonstraram que as ACP podem estar envolvidas no processo de regulação da atividade da NOS (GAZOS-LOPES *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2006). No trabalho realizado por Gazos-Lopes e colaboradores, realizado com as glândulas salivares de *R. prolixus*, foi demonstrado que no mesmo período que houve o aumento da atividade das ACP correspondeu com o aumento do NO (GAZOS-LOPES *et al.*, 2012). Lalitha e colaboradores, descreveram que após a infecção das larvas de *Spodoptera litura* por um nematoide os níveis de ACP são alterados, indicando resposta do hospedeiro ao patógeno (LALITHA *et al.*, 2018). Também há relatos que a atividade das ACP é alterada em resposta à exposição do inseto aos xenobióticos (SALEEM & SHAKOORI, 1996).

1.3 *Nauphoeta cinerea*

N. cinerea são insetos da ordem Blattodea e família Blaberidae. Assim como os outros insetos da sua ordem, são encontradas em todas as partes do planeta, em diversos habitats. As baratas são hemimetábolos, passam pelos estágios de ovo, ninfa e adulto. A maioria das baratas são ovíparas (depositam seus ovos no ambiente), como é o caso da *Periplaneta americana*, e os ovos são envolvidos por uma ooteca, que os protege do ambiente. No entanto, também há espécies ovovivíparas, como a *Battella germanica*, que tem a formação de uma carioteca membranosa envolvendo os ovos. A fêmea carrega os ovos até o momento da eclosão, contudo a membrana isola os ovos da mãe, não havendo troca de nutrientes. E por fim as espécies que são

vivíparas, possuem a carioteca membranosa incompleta, permitindo assim a troca de nutrientes entre a fêmea e os ovos, grupo ao qual pertence a barata utilizada nesse trabalho, *N. cinerea* (Fig. 2) (BELL *et al.*, 2008).

O corpo das baratas é dividido em cabeça, tórax e abdômen, possuem três pares de pernas saindo do tórax. As pernas são compostas por coxa, fêmur, tíbia e tarso, recobertas por pelos sensoriais. Assim como nas pernas as baratas possuem no fim do abdômen estruturas sensoriais táteis, chamadas de cerco, sensíveis a vibração e deslocamento de ar, alertando o inseto da possível presença de predadores, e necessidade de fuga. Como um artrópode, as baratas possuem o corpo recoberto por quitina, formando uma cutícula protetora (MONGEAU *et al.*, 2015; WEIHMANN *et al.*, 2015).



Figura 2. Foto ilustrativa do organismo modelo utilizado nos experimentos, barata adulta da espécie *Nauphoeta cinerea*. Fonte: Do autor.

As baratas são pragas urbanas preocupantes à saúde pública, pelo fato de transmitir agentes causadores de doenças, como bactérias, protozoários e vírus, também podendo causar

reações alérgicas em alguns indivíduos (GOVINDARAJ *et al.*, 2016). No entanto, por mais peculiar que pareça, no oriente, especificamente na China, o extrato de baratas da espécie *P. americana* é utilizado na medicina alternativa, aplicado especialmente para a cicatrização de feridas e úlceras (WANG *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2017, 2018). Na ciência, a utilização de baratas como organismo modelo já é bem estabelecida, amplamente aplicada em estudos de toxicologia e neurobiologia, devido ao seu SN ser relativamente simples e bem caracterizado. Também a não necessidade de fatores éticos para a utilização dos invertebrados nos ensaios laboratoriais é um fator estimulante. No campo da toxinologia, a utilização das baratas como organismo modelo é vantajoso, pois a gama de possibilidades de investigar a ação desses compostos no organismo são grandes (HUBER *et al.*, 1990). As possibilidades variam, desde ensaios bioquímicos, para avaliação das atividades enzimáticas, ensaios eletrofisiológicos, como as preparações nervo-musculares que nesses casos podem ser realizadas *in vivo*, *in situ* ou *in vitro*, como também os ensaios comportamentais, conhecido como *grooming*. Focando especificamente nos estudos neurobiológicos, a simplicidade do SN das baratas e o fato de possuírem axônios gigantes é a combinação desejada que facilita as preparações de ensaios nessa área, assim como a resposta desse sistema aos tratamentos testados (STANKIEWICZ *et al.*, 2012).

1.3.1 Sistema nervoso central de baratas

O funcionamento adequado do SN requer um isolamento distinto dos sinais elétricos demandando um alto nível de regulação. O controle dessa complexa função inicia-se no nível dos canais iônicos e é mantido posteriormente pelo efeito desses canais sobre a atividade de

redes neurais altamente organizadas (CAVALHEIRO *et al.*, 1991). O SNC das baratas é formado basicamente por dois elementos morfológicos, gânglios e conectivos, sendo gânglios agregados de neurônios e os conectivos estruturas que unem um gânglio ao outro, constituindo assim o caminho neural. Esse sistema é composto por onze gânglios sendo dois gânglios presentes na cabeça (o supra e subesofágico), três gânglios no tórax (o pró-, meso- e metatorácico) e por fim os seis últimos gânglios localizados no abdômen (Fig. 3) (FOURTNER & KAARS, 1990). O gânglio supraesofágico é o local de recebimento das informações sensoriais, compreendendo a interação sináptica sensorial-motora, iniciação dos comandos para a ação locomotora e também integração dos reflexos neuroendócrinos. Esse gânglio é composto por três regiões, o protocérebro, deutocérebro e o tritocérebro, sendo cada porção responsável pelo controle de diversas partes do inseto, como por exemplo, pela parte sensorial e motora das antenas, parte motora dos corpos cardíacos e sensorial dos ocelos e componentes oculares. Em contribuição para o controle motor do inseto, o gânglio subesofágico tem por função controlar os músculos do aparelho bucal do animal (mandíbula, maxila e lábio) e o controle locomotor comportamental. Os três gânglios torácicos são responsáveis pelo controle motor e sensorial da musculatura do pescoço, torácica, coxal, femoral e das asas. Os seis últimos gânglios abdominais inervam os espiráculos e a musculatura abdominal (OSBOURE, 1996; FOURTNER & KAARS, 1990). As ramificações que partem principalmente do gânglio mesotorácico e inervam as regiões periféricas constituem o sistema nervoso periférico (SNP) do inseto (FOURTNER & KAARS, 1990).

Para o efetivo funcionamento do SN os neurotransmissores são importantes assim como as enzimas envolvidas nesse processo, seja na produção ou hidrólise do neurotransmissor. Como o principal neurotransmissor do SNC dos insetos é a ACh, a enzima AChE é igualmente

importante. Um estudo feito com *B. germanica* demonstrou a caracterização histológica de duas AChEs. Vários tecidos do corpo da barata foram ensaiados, confirmando a presença da AChE em todo o SNC do inseto, em altas concentrações, seguido pela cabeça (excluindo o cérebro). Também foi demonstrada a ausência dessa enzima na hemolinfa e intestino do inseto (KIM *et al.*, 2006). Assim com a ACh, o NO também está muito presente no SNC dos insetos sendo responsável pela mediação dos sinais recebidos (SATTELLE & BREERT, 1990; ELPHICK *et al.*, 1995).

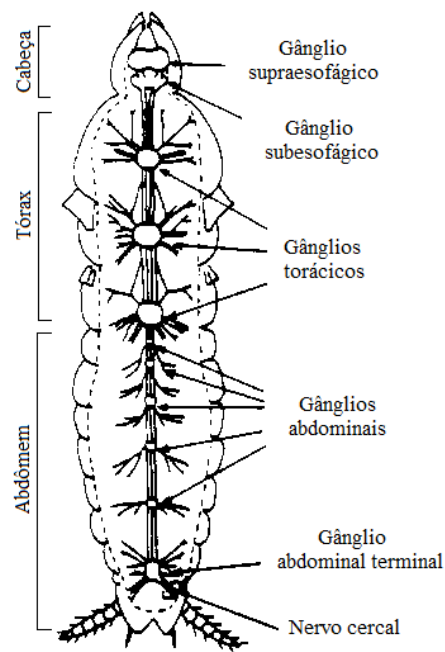


Figura 3. Desenho esquemático do sistema nervoso central da barata. Fonte: modificado de LEARN ZOOLOGY, 2013.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é determinar o efeito inseticida do Jaburetox, bem como a ação do mesmo sobre a atividade das enzimas presentes no sistema nervoso central de *N. cinerea*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a mortalidade de *N. cinerea* adultas injetadas e alimentadas com Jaburetox.
- Avaliar o efeito do tratamento *in vivo* com Jaburetox sobre a atividade enzimática da UAP, AChE, ACP e NOS;
- Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com Jaburetox sobre a atividade enzimática da UAP, AChE, ACP e NOS;
- Avaliar a expressão proteica das enzimas UAP e NOS pós - tratamento com Jaburetox;

3. MANUSCRITO

Os Materiais, métodos e Resultados dessa dissertação estão dispostos na forma de manuscrito, o qual será submetido para o Periódico Toxicology (ISSN: 0300-483X) intitulado “Jaburetox, an Urease-derived peptide: Effects on enzymatic pathways of the cockroach *Nauphoeta cinerea*”.

Jaburetox, a Urease-derived peptide: Effects on enzymatic pathways of the cockroach
Nauphoeta cinerea

Ana Paula A. Perin^a, Mila Severo Noronha^b, Natalia R. Moyetta^{b,*}, Matheus V. Coste Grahl^a,
Celia R. Carlini^b, Leonardo L. Fruttero^{b,*,**}, Fernanda Stanisçuaski^{a,c}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Building 43431, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Brain Institute (Instituto do Cérebro-INSCER), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, Building 63, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Building 43431, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author:

Leonardo L. Fruttero

Instituto do Cérebro (InsCer) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, Building 63, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: leonardofruttero@gmail.com or lfruttero@fcq.unc.edu.ar

Co-authors e-mail addresses: anaperin.app@gmail.com (APAP), nataliarmoyetta@gmail.com (NRM), mila.noronha@live.com (MSN), matheusgrahl@hotmail.com (MVCG), fernanda.stanisçuaski@ufgrs.br (FS), celia.carlini@puers.br or ccarlini@ufrgs.br (CRC).

* Current address: Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Córdoba, Argentina.

Abstract

Jaburetox is a recombinant peptide derived from one of the *Canavalia ensiformis* (Jack bean) urease isoforms. The peptide induces several toxic effects on insects of different orders, including the interference on muscle contractility in the cockroach *Nauphoeta cinerea*, activation of the immune system in *Rhodnius prolixus*, and modulates the enzyme activities of the UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) and nitric oxide synthase (NOS) in the central nervous system of *R. prolixus* and *Triatoma infestans*. When injected, the peptide is lethal for *R. prolixus* nymphs and *T. infestans* adults. Here, we evaluated the insecticidal effect of Jaburetox on *N. cinerea* adult cockroaches. To explore the effects induced by Jaburetox on the central nervous system, we investigated the enzymatic activities of UAP, NOS, acid phosphatases (ACP), and acetylcholinesterase (AChE). The enzymatic experiments were performed after *in vitro* and *in vivo* treatments with Jaburetox. Spectrophotometric assays were employed to measure the enzyme activities. The protein expression of UAP and NOS was evaluated by Western blot. The insecticidal assay was conducted by injection and ingestion of Jaburetox. In result, *N. cinerea* is not susceptible to the lethal effect of the peptide. Moreover, both *in vivo* and *in vitro* treatments with the peptide inhibited the activity of NOS, without modifying the protein levels. No alterations on ACP activity were observed. In addition, the enzyme activity of UAP only had its activity affected at 18 h after injection. The peptide increased the AChE activity,

suggesting a possible mechanism involved in overcoming the toxic effects of insecticides. Our findings indicate that Jaburetox affects the nitrinergic signaling as well as the AChE and UAP activities.

Keywords

Central nervous system, action mechanism, UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase, nitric oxide synthase, acetylcholinesterase.

1. Introduction

Ureases are enzymes that catalyze the hydrolysis of urea into carbon dioxide and ammonia, and they are widespread in plants, fungi and bacteria but are not synthesized by animals (Ligabue-Braun et al., 2013; Mobley and Hausinger, 1989). The ureases from *Canavalia ensiformis* have been described as moonlighting proteins, presenting fungi- and entomotoxic properties that are not related with their enzymatic functions (Carlini and Ligabue-Braun, 2016). The entomotoxic effects of the *C. ensiformis* ureases are explained in part by the release of a specific peptide upon enzymatic hydrolysis by cathepsin-like peptidases present in the digestive system of some insect species (Carlini et al., 1997; Ferreira-DaSilva et al., 2000). This urease-derived peptide, called pepcanatox, has been isolated and expressed in *Escherichia coli*. This recombinant peptide, named Jaburetox (Jbtx) was also reported as toxic for filamentous fungi and yeasts (Mulinari et al., 2007; Postal et al., 2012). In addition, Jbtx induces several toxic effects on insects from different orders, including those not affected by the whole urease (Mulinari et al., 2007; Stanisçuaski and Carlini, 2012). The effects include the interference on muscle contractility in the cockroach *Nauphoeta cinerea* (Martinelli et al., 2014), the activation

of the immune system (Fruttero et al., 2016) and the inhibition of diuresis in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* (Stanisçuaski et al., 2009). Moreover, when injected, the peptide is lethal to *R. prolixus* nymphs (Martinelli et al., 2014). Previous data from our group demonstrated that the central nervous system (CNS) of the triatomines *Triatoma infestans* and *R. prolixus* is a target organ for Jbtx, and a recent work reported that Jbtx interacts with the CNS of *N. cinerea* upon *in vitro* incubation (Broll et al., 2017). Using an immunoproteomic approach with the CNS of *T. infestans*, Galvani et al., (2015) demonstrated a physical interaction between Jbtx and the enzyme UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP). This enzyme produces the sugar nucleotide UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), essential for chitin synthesis, protein glycosylation and production of glycosphosphatidylinositol (GPI) anchors (Merzendorfer, 2011; Moussian, 2008). Similarly, when Jbtx was injected in *T. infestans*, the peptide was detected at the antennal lobe and the subesophageal ganglion, sites where nitric oxide synthase (NOS) is present (Galvani et al., 2015). This enzyme is involved in nitrinergic signaling, immune response, sense of location and search for food (Muller, 1997; Stefano and Ottaviani, 2002). In addition, Fruttero et al. (2017) reported in *R. prolixus*' CNS that Jbtx modulates the enzyme activities of UAP and NOS. Acetylcholine (ACh) is an important neurotransmitter essential for the function of the insects' CNS (Wächtler, 1988), and acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme responsible for the breakdown of ACh into choline and acetate. The reaction is necessary to reduce the ACh concentration in the junction, preventing continuous stimulation of the nerve endings (Sattelle and Breert, 1990; Lionetto et al., 2013). The enzyme is the target of some organophosphate and carbamate insecticides, and the signs of intoxication include restlessness, hyperexcitability, tremors and paralysis leading to death (Fukuto, 1990; Lionetto et al., 2013).

Cockroaches are being used more frequently as alternative model organisms for physiological and neurobiological experiments (Blankenburg et al., 2015), being a great non-mammalian complementary model for tests involving toxic agents (Stankiewicz et al., 2012; Zemolin et al., 2014). This species has already shown resistance to Jack bean urease (JBU), an isoform of urease from *C. ensiformis*, when administrated by injection (Carrazoni et al., 2016).

High doses of Jbtx, administered to mice and neonate rats by oral route and intraperitoneal injection, did not induce any symptoms of intoxication (Mulinari et al., 2007). This characteristic reinforces the biotechnological application of Jbtx as a potential bioinsecticide. Since the Jbtx mechanism of action is not widely studied in cockroaches nor even completely understood in other models, we employed *N. cinerea* cockroaches to explore the effects induced by the peptide on the CNS, focusing on the enzymatic pathways. In addition, we evaluated the insecticidal effect of Jbtx on *N. cinerea* adult cockroaches.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Rabbit polyclonal universal nitric oxide synthase (uNOS) antibody (Thermo Scientific - Pierce, IL, USA); rabbit polyclonal anti-UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) antibody (the antibody was produced against *R. prolixus*' rUAP by Célula B – Serviço de Produção de Anticorpos, Porto Alegre, Brazil, <http://www.ufrgs.br/celulab/index.htm>); anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK); enhanced chemiluminescence (ECL) Luminata Classico Western HRP substrate (Merck, Darmstadt, Germany) were obtained from the indicated commercial sources. The rabbit

polyclonal anti-actin antibody and all the remaining reagents were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Animals

The experiments were performed on *N. cinerea* adult cockroaches. The animals were kept under laboratory conditions with controlled temperature (22–25 °C) on a 12:12 h L:D cycle. The cockroaches were provided with water and food *ad libitum* (Birbo Premium Meat & Vegetables: Crude protein 210g/kg (21%), crude fat 100g/kg (10%), crude fiber 40g/kg (4%), ash 100g/kg (10%), calcium 10g/kg (1,0%), phosphorus 8000mg/kg (0,8%), sodium 2000mg/kg (0,2%), omega 3 1000mg/kg (0,1%), omega 6 10g/kg (1%), moisture 100g/kg (10%)).

2.3. Jaburetox production

Escherichia coli BL21(DE3) RIL (Novagen, Madison, WI, USA) cells were transformed by heat shock with the pET23a-*Jaburetox* vector that expressed a protein containing a six-histidine tag at the C terminus as described in Postal et al., (2012). The recombinant peptide used in this study was expressed and purified as described by Lopes et al., (2015) with modifications. *E. coli* BL21 (DE3) RIL cells were cultured in 20 mL LB (Luria Bertani) Broth, with 100 µg/mL ampicillin and 40 µg/mL chloramphenicol. The culture was grown overnight at 37 °C under agitation (180 rpm). All the content was inoculated in 1 L of auto induction medium (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 5 g/L glycerol, 3.3 g/L (NH₄)₂SO₄, 6.8 g/L KH₂PO₄, 7.1 g/L Na₂HPO₄, 0.5 g/L glucose and 2 g/L lactose, with 100 µg/mL ampicillin and 40 µg/mL chloramphenicol) and cultured at 37 °C, 180 rpm, until the culture absorbance (A₆₀₀) reached 0.6.

The induction conditions were overnight, at 20 °C, 180 rpm and a reinforced dose of 200 µg/mL ampicillin was added before the induction period. Then, the culture was centrifuged at 8,000 × g for 10 min at 4 °C. The cells were resuspended in 50 mL buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl and 20 mM imidazole) and 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, to removal the cell debris. The supernatant was submitted onto a Ni(II)-loaded 5 mL Chelating Sepharose (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) previously equilibrated in buffer A. The supernatant was subjected to three passages through the column and then, the affinity resin was washed more than 20 column volumes with buffer A. After that, to remove weakly bound contaminants, the imidazole concentration was increased up to 70 mM (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl and 70 mM imidazole) and the column was washed exhaustively. Elution of Jaburetox was performed using 500 mM imidazole (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl and 500 mM imidazole) and in this step the flow through was collected in fractions of 5 mL. Then, the protein content was measured in each fraction by Bradford (1976), the fractions with more protein were pooled and submitted to a size exclusion chromatography. The eluted protein was loaded onto a HiLoad Superdex 200 pg 26/600 column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK,) pre-equilibrated with buffer B (50 mM phosphate pH 7.5, 1 mM EDTA and 1 mM TCEP (tris (2-carboxyethyl) phosphine)). The protein eluted in each fraction were measured and the sample purity was assessed by SDS-PAGE 12 % (Laemmli, 1970). Fractions containing Jbtx were pooled, concentrated using 3 kDa Amicon Ultra Centrifugal Filters (Merk Millipore, Darmstadt, Germany) and stored at -20 or -80 °C. After the purification, Jbtx was extensively dialyzed against Tris buffer (500 mM Tris-HCl 100 mM MgCl₂, 0.02 % sodium azide), pH 7.5.

2.4. Dissection and tissue collection

The CNS (composed by ganglia and connective tissues) were dissected from treated (injected with Jbtx in buffer B or Tris-HCl buffer) or non-treated insects (non-injected), under cold phosphate buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) pH 7.5 or Tris buffer, plus protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Tissues were stored at -20 °C until use. The tissues that were used to assay that detect phosphate, the tris buffer were used to avoid phosphate contamination.

2.5. Jbtx insecticidal assay

2.5.1. Feeding experiment

Adult cockroaches were separated from the colony and for three days before the assay they only receive dog food and no water. The treated group, each cockroach received a solution drop with 25 µg of Jbtx (dose 50 µg of Jbtx per g of body weight), the control group received the same volume of vehicle saline (buffer B) and the positive control group received a 2 % azide solution drop. Each group had five insects and the experiments were performed in triplicate. After the treatment, the insects received food and water as stated in 2.2. Survival rate was followed up for 10 days.

2.5.2. Injection experiment

Adult cockroaches, weighting an average of 500 mg, received abdominal injections of 50 µg of Jbtx per g of body weight or the same volume of buffer B for the controls. Five groups with four insects were used to test each condition. The insects received water and food throughout the experiment and the survival rate was followed up for 10 days.

2.6. Determination of enzymatic activities

2.6.1. Determination of NOS activity

For the *in vivo* treatment, adult cockroaches received abdominal injections of Jbtx (4, 8 and 16 µg of Jbtx per g of body weight) or the same volume of buffer B. Then, 2, 6 and 18 h after injection, CNSs were dissected and the organs were homogenized in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.32 M sucrose, 2 mM Na₂ EDTA, 2 mM dithiothreitol (DTT) and protease inhibitors. The homogenates were centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4 °C and the protein concentration was measured in the supernatant according to Bradford (1976). NOS activity was determined as described in Galvani et al. (2015) with a reaction mixture containing 50 mM phosphate buffer (PB) pH 7.0, 1 mM CaCl₂, 1 mM L-arginine, 100 µM NADPH, 10 µM DTT, 0.1 µM catalase, 4 µM superoxide dismutase (SOD), 5 µM oxyhemoglobin and 15 µg of protein, at 37 °C. The formation of methemoglobin was registered at 401 nm in a SpectraMax[®]M3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). In order to confirm that the oxidation occurred only by NO production, reaction controls were carried out using the specific NOS inhibitor, NG-methyl-L-arginine (L-NMMA, 1 mM). The experiments designed to

evaluate the *in vitro* effect of Jbtx on NOS activity were conducted preincubating the supernatant of tissues from non-treated insects (pools of 3 organs) with 1, 50 and 100 nM Jbtx or with the same volume of vehicle buffer (controls) for 1 h at 4 °C. Afterwards, the NOS activity was determined as described above.

2.6.2. Determination of acid phosphatase activity

The *in vivo* effect of Jbtx upon ACP activity was carried out with adult cockroaches by abdominal injections of Jbtx (4, 8 and 16 µg of Jbtx per g of body weight) or the same volume of buffer B. Then, 2, 6 and 18 h after injection, CNS were dissected. The organs were homogenized in 20 mM sodium acetate buffer pH 4.0 containing 10 mM DTT, 10 mM Na₂EDTA with protease inhibitors and centrifuged at 14,000 × g for 5 min at 4 °C. The ACP activity was measured following the hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) to *p*-nitrophenol (*p*NP) as described previously (Leyria et al., 2015). The assays were conducted incubating 5 mM *p*NPP as substrate and 2.5 µg of protein homogenates as enzyme source for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped with 1 M NaOH and the amount of *p*NP released into the medium was registered at 405 nm. Specific activity was expressed as nmol of *p*NP/mg protein/min. The *in vitro* effect of Jbtx on AP activity was carried out preincubating the supernatant of non-treated insects (pools of 3 organs) with different concentrations of Jbtx (1, 50 and 100 nM) or with the same volume of buffer B (controls) for 1 h at room temperature. Afterwards, the AP activity was determined as described above.

2.6.3. Determination of UAP activity

The *in vivo* treatment was performed with adult cockroaches by abdominal injection of different doses of Jbtx (4, 8 and 16 µg of Jbtx per g of body weight) or the same volume of Tris buffer. After, 2, 6 and 18 h of injection, CNS were dissected. The organs were homogenized in 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.5) with protease inhibitors and centrifuged (10,000 × g, 10 min, 4 °C). The UAP activity was determined following the methodology described by Mio et al. (1998) with slight modifications (Galvani et al., 2015). The assays were carried out in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 25 µM UTP, 20 µM N-acetyl-α-d -glucosamine 1-phosphate, 10 % (v/v) glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.4 units/mL pyrophosphatase and 5 µg of supernatant protein as enzyme source. The reaction mixture was incubated for 15 min at 37 °C and 100 µL of color reagent comprising 0.03 % (w/v) malachite green, 0.2 % (w/v) ammonium molybdate, 0.05 % (v/v) Triton X-100 in 0.7 M HCl were added. The color was developed for 5 min at 37 °C and then absorbance readings were registered at 655 nm. Specific activity was expressed as the absorbance (A₆₅₅) per mg of protein. The experiments designed to assess the *in vitro* effect of Jbtx on UAP activity were carried out preincubating the supernatant of non-treated insects (pools of 3 organs) with different concentrations of Jbtx (1, 50 and 100 nM) or with the same volume of Tris buffer (controls) for 1 h at room temperature. Afterwards, the UAP activity was determined as above.

2.6.4. Determination of acetylcholinesterase activity

To assess the effect of the *in vivo* treatment, different doses of Jbtx (4, 8 and 16 µg of Jbtx per g of body weight) or the same volume of buffer B were administrated by abdominal

injections in adult cockroaches. Then, 2, 6 and 18 h after injection, CNSs were dissected, the organs homogenized in 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT (pH 7.5) with protease inhibitors and centrifuged (1,000 × g, 5 min, 4 °C). AChE activity was determined following the methodology described by Ellman et al. (1961) and Stürmer et al. (2014) with some modifications. Briefly, the assays were carried out in 200 µL potassium phosphate (KPi) buffer pH 8.0 (0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M K₂HPO₄), 20 µL of a 5 mM DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)), 25 µL of a 7.25 mM acetylthiocholine iodide and 15 µg of protein homogenates. The rate of the hydrolysis was measured through the release of thiocholine, whose free sulphhydryl group reacted with DTNB to produce the yellow compound thionitro-benzoic acid (TNB). The reaction was followed at room temperature during 2 min at 412 nm. The results were expressed as 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 TNB per min under the specified conditions.

2.7. NOS protein expression

CNS from control and Jbtx-injected insects (pools of 3 insects each) were collected 6 h post-injection in PB and protease inhibitors, homogenized and centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4 °C. Forty µg of protein samples were subjected to 8 % SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes, blocked and incubated with the anti-uNOS antibody overnight (1:1000) followed by the incubation with the anti-rabbit HRP-conjugated antibody (1:5000) (Galvani et al., 2015). The bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL) and loading control was evaluated using a polyclonal anti-actin antibody (1:500).

2.8. UAP protein expression

CNS from control and Jbtx -injected insects (pools of 3 insects each) were collected 6 h post-injection in PB and protease inhibitors, homogenized and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. Twenty μg of protein samples were subjected to 12 % SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes, blocked and incubated with the anti-UAP antibody (1:30,000) 1 h at room temperature (25 °C), followed by the incubation with the anti-rabbit HRP-conjugated antibody (1:15,000) (Galvani et al., 2015). The bands were detected by ECL as described and the loading control performed as described in 2.7.

2.9. Statistical Analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). For comparison between two different experimental groups, the Student “t” test was employed. ANOVA followed by Dunnett as post hoc test was employed when data from more than two experimental groups were analyzed. All the experiments were performed at least four times in triplicates. The statistical analyses were carried out using the Graphpad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA) software. The data was considered statistically significant when P value < 0.05 .

3. Results

3.1. Insecticidal effect of Jbtx on adult cockroaches

We tested the insecticidal effect of Jbtx by injection into *N. cinerea* adult. Jbtx (50 $\mu\text{g/g}$ of insect weight) did not cause a significant mortality after ten days (Fig. 1A). Moreover, after the feeding assay with adult cockroaches, no mortality was detected on Jbtx group (50 $\mu\text{g/g}$), on the other hand after the ingestion of 2 % of azide all the insects died (Fig. 1B). The azide control was performed to attest that they, in fact, ingested the drop that we gave to them. These results indicate that *N. cinerea* is not susceptible to insecticidal effects of the peptide, at least in the conditions tested.

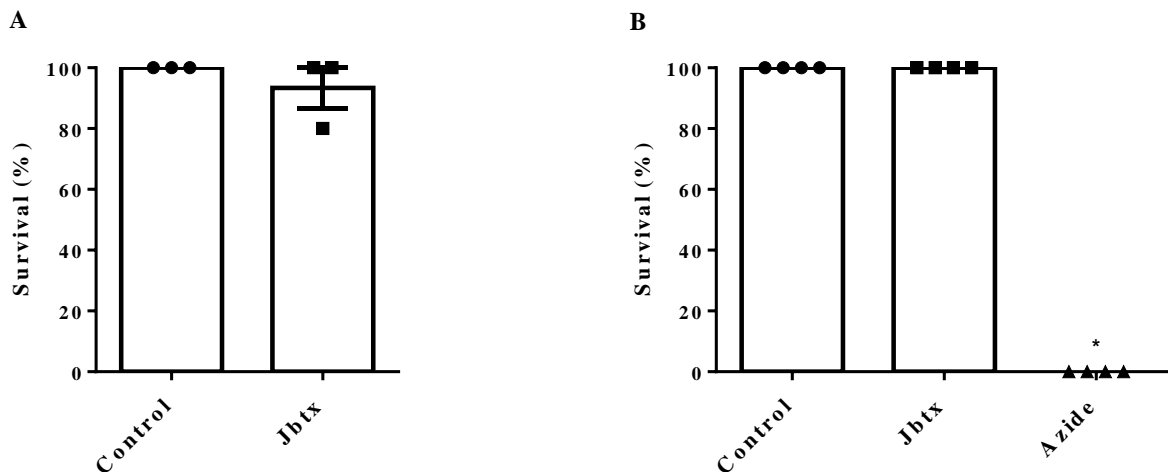
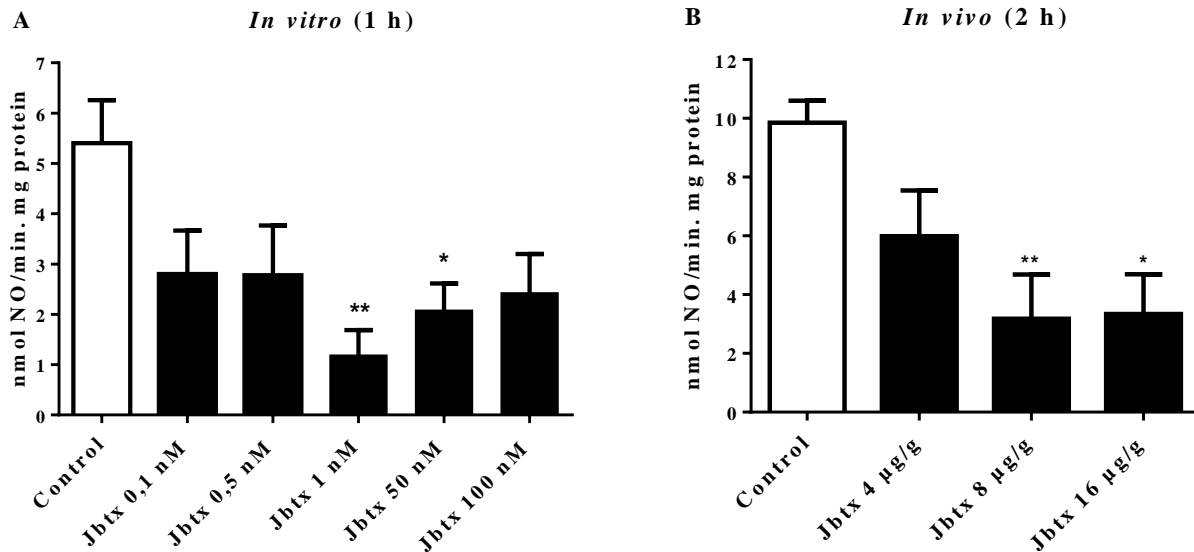


Figure 1. Insecticidal effect of Jbtx on adult *N. cinerea*. (A) The insects were injected with 50 μg per g of body weight of Jbtx or the same volume of vehicle buffer for the controls. (B) The treated group received a solution drop with 25 μg of Jbtx (dose 50 μg of Jbtx per g of body weight), the control group received the same volume of vehicle saline (buffer B) and the positive control group receive a 2 % azide solution drop. Both treatments the mortality was recorded after 10 days. Each group had five insects and the experiments were performed in triplicate. Results shown are the means \pm SEM ($n = 5$). Student's t-test.

3.2. Jbtx affects the nitrinergic pathway

After *in vitro* and *in vivo* treatment with Jbtx it was observed that Jbtx partially inhibited NOS activity. Regarding the *in vitro* treatment, the enzyme activity was significantly diminished when 1 and 50 nM of Jbtx were assayed (Fig. 2A). *In vivo*, a significant decrease occurred after 2 and 6 h of treatment with Jbtx (Fig. 2B and C). After 18 h no significant changes were observed (Fig. 2D). However, the protein expression was not significantly modified after Jbtx injection (Fig. 2E).



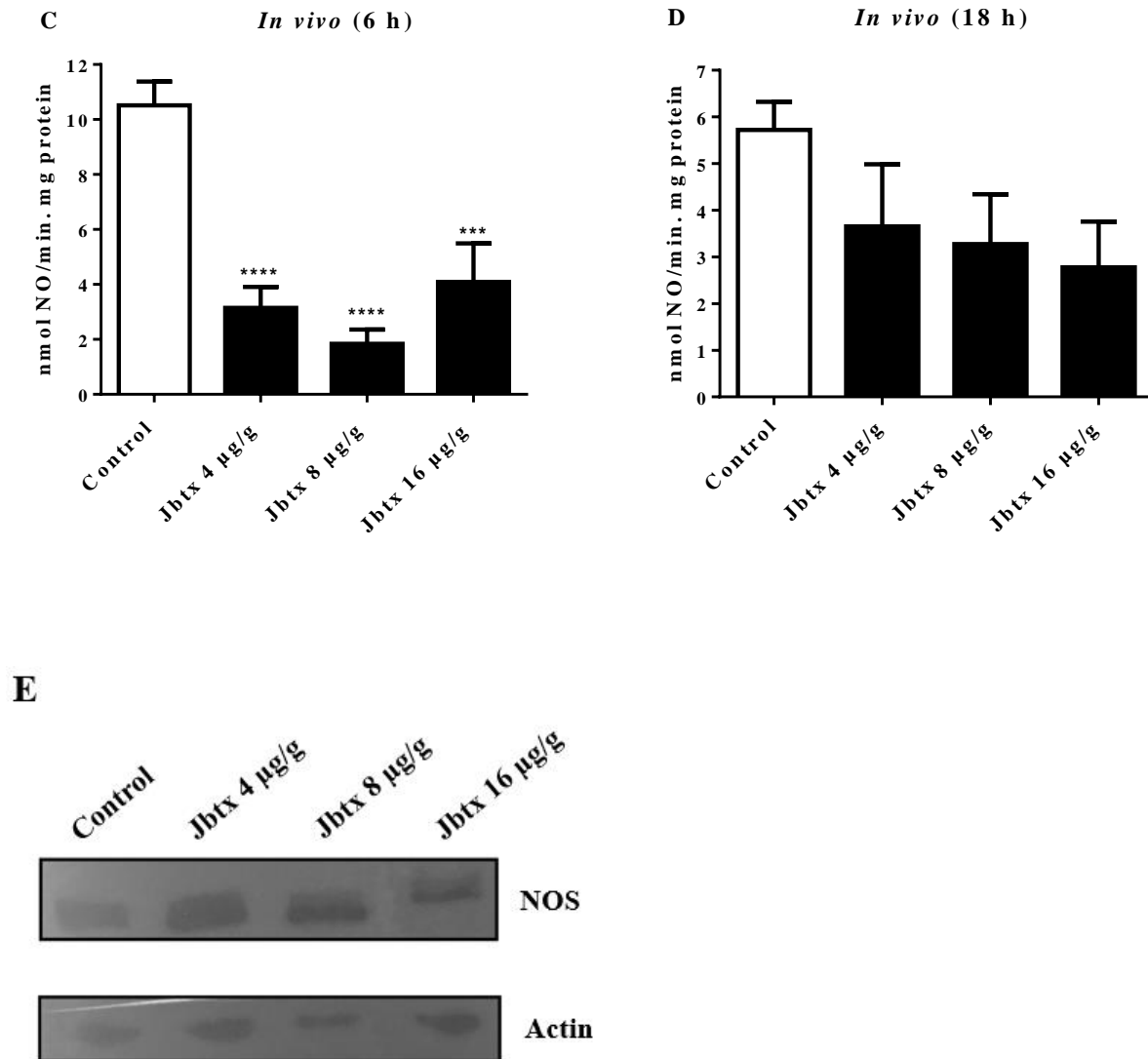
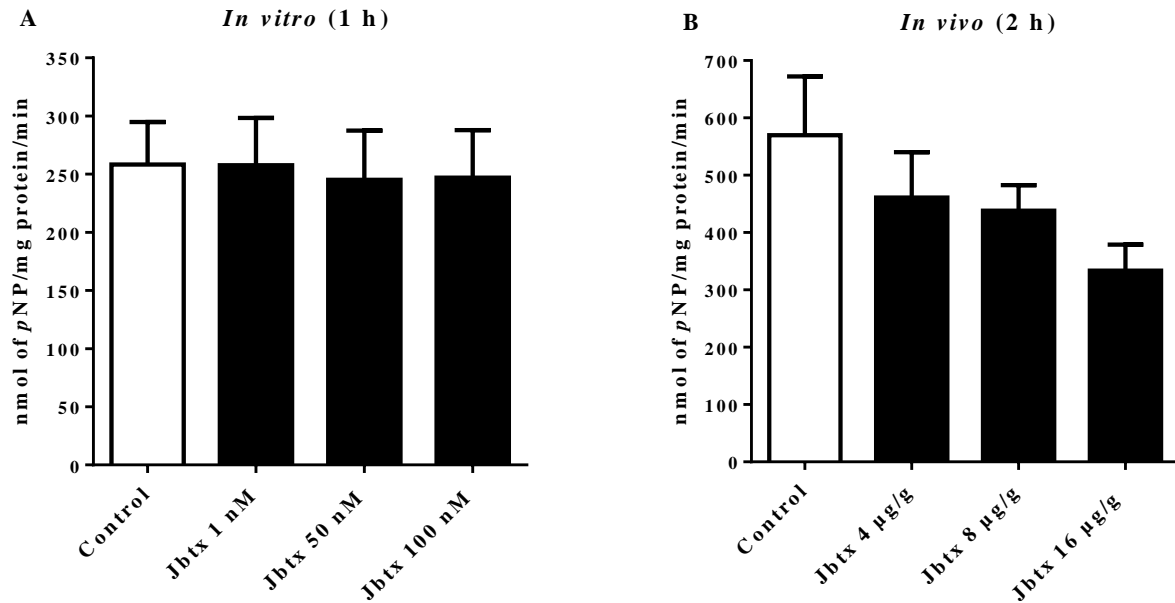


Figure 2. Effect of Jaburetox on Nitric Oxide Synthase (NOS) activity after *in vitro* and *in vivo* treatments. (A) NOS activity in the CNS of *N. cinerea* cockroaches after 1 h of *in vitro* incubation with Jbtx. NOS activity in the CNS, after (B) 2 h, (C) 6 h, (D) 18 h of *in vivo* treatment with Jbtx (injection). Results are expressed as nmol of NO produced/min.mg protein and are means \pm SEM (n= 4-8). One-way parametric ANOVA, Dunnett. * $P < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.005 . CNS: central nervous system. (E) Effect of the *in vivo* Jbtx treatment on NOS protein expression as determined by Western blot. The samples were processed as described in materials and methods and subjected to SDS-PAGE and Western blot employing an anti-uNOS antibody and an anti-actin antibody as loading control. The immunoreactive bands for NOS and actin presented the expected molecular weights (~132 kDa and ~40 kDa, respectively).

3.3. Jbtx has no effects on ACP activity

Since protein phosphorylation-dephosphorylation is an important mechanism of regulation of NOS activity (Alderton et al., 2001), we evaluated if Jbtx would induce modifications on ACP activity. As shown in Fig. 3, the *in vitro* and *in vivo* treatment did not significantly affect the enzyme(s) activity.



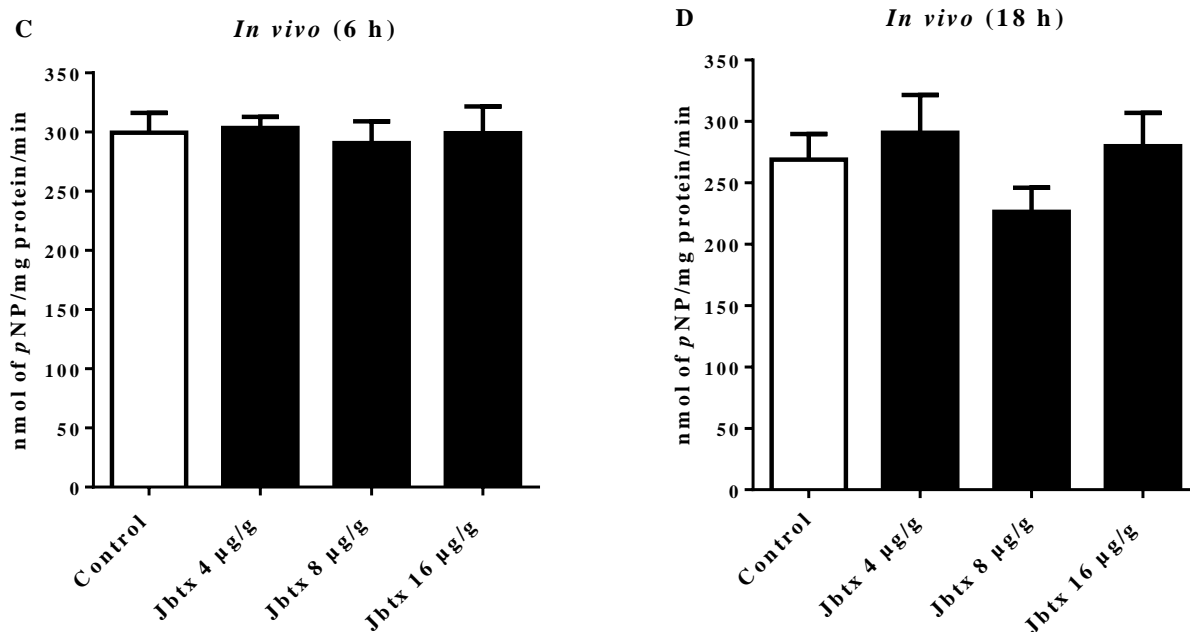
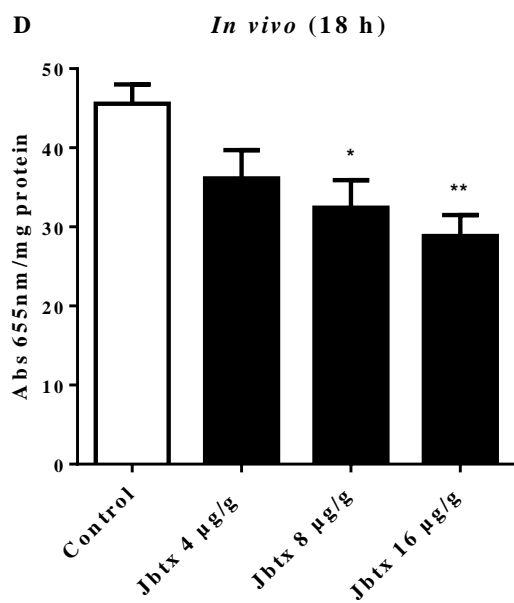
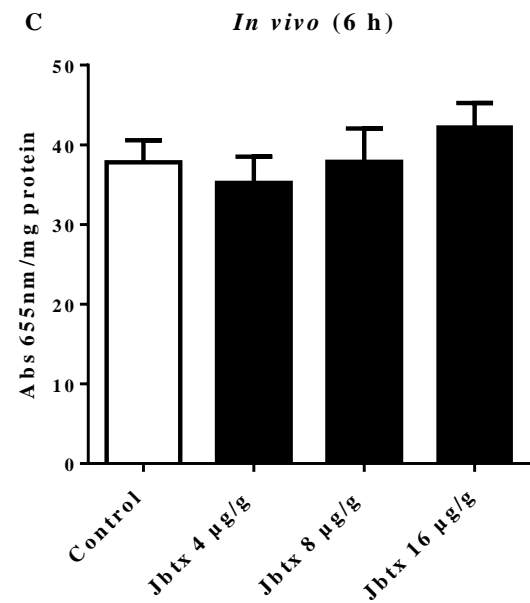
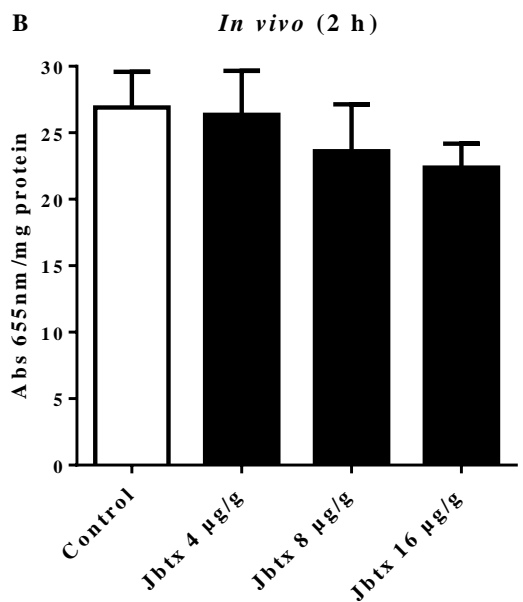
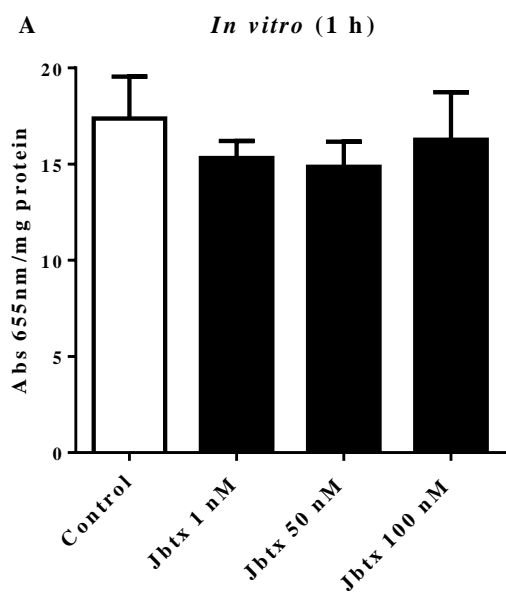


Figure 3. Effect of Jaburetox on Acid Phosphatases (ACP) activity after *in vitro* and *in vivo* treatments. (A) ACP activity in the CNS of *N. cinerea* cockroach after *in vitro* incubation of homogenates with the toxin. ACP activity in the CNS, after (B) 2 h, (C) 6 h, (D) 18 h of *in vivo* treatment (Jbtx injections). Results are expressed as nmol of pNP/mg protein/min and are means \pm SEM (n= 5-6). One-way parametric ANOVA, Dunnett. CNS: central nervous system.

3.4. Jbtx alters UAP activity

In order to study the effects of Jbtx upon UAP activity, we performed *in vitro* and *in vivo* treatments with the peptide. The results demonstrated that Jbtx promoted no significant effects upon the enzyme activity after *in vitro* incubation of CNS homogenates (Fig. 4A) and at 2 and 6 h after injection (Fig. 4B e C). However, 18 h after the *in vivo* treatment with Jbtx, the activity significantly diminished for 8 and 16 µg of Jbtx/g doses (Fig. 4D). Regarding protein expression, no significant alterations were noticed when Jbtx-treated and control tissues were compared (Fig. 4E).



E

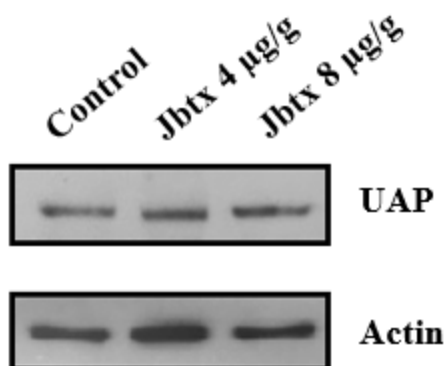


Figure 4. Effect of Jaburetox on UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP) activity after *in vitro* and *in vivo* treatments. **(A)** UAP activity in the CNS of *N. cinerea* cockroach after *in vitro* incubation with the toxic peptide. UAP activity in the CNS, after **(B)** 2 h, **(C)** 6 h, **(D)** 18 h after Jbtx injection. Results are expressed as specific activity (A_{655} nm/mg protein) and are means \pm SEM (n= 4-7). One-way parametric ANOVA, Dunnett. * $P < 0.05$, ** < 0.01 . CNS: central nervous system. **(E)** Effect of the *in vivo* Jbtx treatment on UAP protein expression as determined by Western blot. The samples were processed as described in materials and methods and subjected to SDS-PAGE and Western blot employing an anti-UAP antibody and an anti-actin antibody as loading control. The immunoreactive bands for UAP and actin presented the expected molecular weights (~54 kDa and ~40 kDa, respectively).

3.5. Jbtx modulates AChE activity

The analysis of AChE activity on the CNS of the adult *N. cinerea* after *in vitro* treatment revealed no effects on the enzyme activity. On the other hand, the enzyme activity increased after 2, 6 and 18 h after Jbtx injections, at the dose of 16 $\mu\text{g/g}$ (Fig. 5).

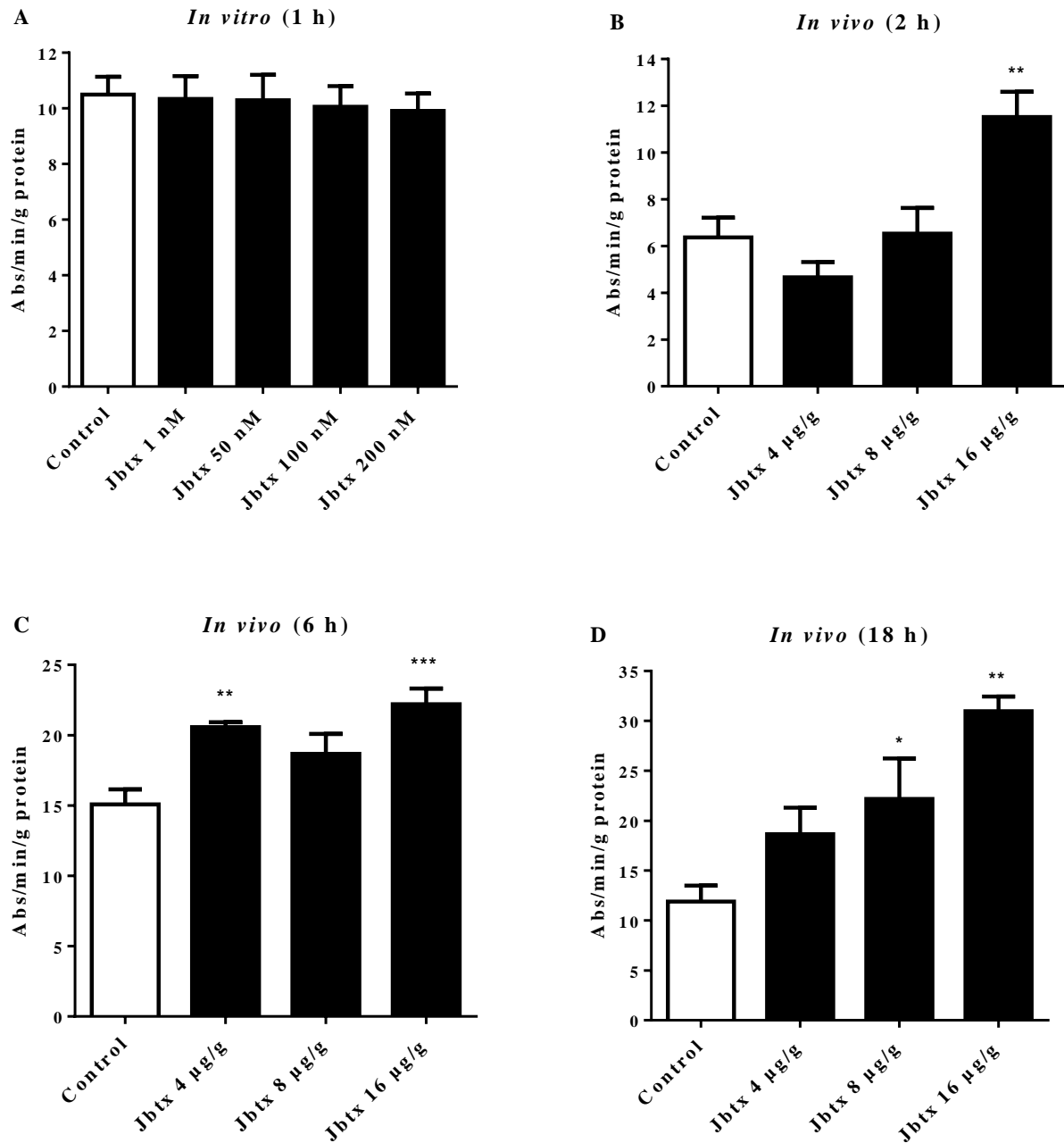


Figure 5. Effect of Jaburetox on Acetylcholinesterase (AChE) activity after *in vitro* and *in vivo* treatments. (A) AChE activity in the CNS of *N. cinerea* cockroach after *in vitro* incubation with Jbtx. AChE in the CNS, after (B) 2 h, (C) 6 h, (D) 18 h of *in vivo* treatment with Jbtx. Results are expressed as moles of substrate hydrolyzed/min/mg protein and are means \pm SEM (n = 5-6). One-way parametric ANOVA, Dunnett. * $P < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.005 . CNS: central nervous system.

4. Discussion

A number of reports from our group have shown that Jbtx display entomotoxic effects on several insect species, while it is not toxic to mammals (Carlini and Ligabue-Braun, 2016), a desirable characteristic for a potential bioinsecticide. To boost such applications, it is important to have a comprehensive knowledge of its toxic mechanism in different animal models, including different insect orders. In this work, we have evaluated the insecticidal properties of Jbtx upon *N. cinerea*, as well as its effects on the enzymatic pathways in the CNS of those insects.

Our findings demonstrated that after ingestion and injection of 50µg of Jbtx the cockroaches did not show signs of intoxication or mortality (Fig. 1A, B). These data is in line with a previous report demonstrating that abdominal injections of JBU did not cause the death of adult cockroaches (Carrazoni et al., 2016). On the contrary, when *R. prolixus* and *T. infestans* were tested under similar doses, the triatomines had 100 % of mortality after 72 h or less (Fruttero et al., 2016, Galvani et al., 2015), confirming that they are susceptible to the Jbtx effects and *N. cinerea* is resistant. Jbtx causes harmful effects and death on several insect species, belonging to the orders Hemiptera (*Oncopeltus fasciatus*, *Dysdercus peruvianus*), Diptera (*Aedes aegypti*), Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa armigera*) (Becker-Ritt et al., 2017) and Blattodea (*B. germanica*) (Carlini and Ligabue-Braun, 2016). Species-specific selectivity effects within the Blattodea order were already described for the spider venom tested on *B. germanica* and *P. americana* (Bende et al., 2015; Herzig et al., 2016). In addition, different reports showed higher resistance of *N. cinerea* against nematode infection and spider venom when compared to other cockroach species, including *B. germanica* (Cutler et al., 2017; Wullschleger and Nentwig, 2002).

In relation to the effect of Jbtx upon enzymatic activity, our data evidenced that both treatment conditions (*in vivo* and *in vitro*) partially inhibited the activity of NOS (Fig. 2A-C) and a similar inhibition profile was previously observed in the triatomines *R. prolixus* and *T. infestans* (Fruttero et al., 2017; Galvani et al., 2015). These data show that the inhibition of nitrinergic pathway as a consequence of Jbtx treatment is not restricted to the Hemiptera order. Taking into account the *in vitro* incubation with Jbtx resulted in enzymatic inhibition (Fig. 2A) together with the fact that the protein expression of NOS after treatment was not altered (Fig. 2E), indicate a possible direct effect of the peptide on the enzyme. Since NOS had its activity affected, and considering that this enzyme could be regulated by phosphorylation and dephosphorylation (Gazos-Lopes et al., 2012), we decided to investigate the effect of the toxic peptide on activity of ACP. However, after *in vivo* and *in vitro* treatments with Jbtx, no significant alterations in the enzymatic activity were observed (Fig. 3A-D), at least in our experimental conditions. Similar findings were reported by Fruttero et al. (2017) in the CNS of *R. prolixus* after *in vivo* and *in vitro* treatments with Jbtx.

The present work demonstrated a significant increase in AChE activity after the *in vivo* treatment with Jbtx (Fig. 5B-D). Since the *in vitro* incubation with Jbtx did not modify the enzyme activity (Fig. 5A), it supports the idea of an indirect mechanism of action, i.e., the peptide could be acting on the protein or the transcript expression levels. Previous works have demonstrated a connection between increased AChE activity and insect resistance to organic pesticides (Chen et al., 2001; Hsu et al., 2008; Zhang et al., 2011). In addition, this enzyme was described as part of the detoxifying enzymes group, which are responsible for metabolizing and reducing the effects of toxic compounds (Li et al., 2016; Liao et al., 2016). In view of this data, it is plausible that the cockroaches are responding to Jbtx with a higher enzyme activity in order to

reduce its toxic effects. This result was not expected, since generally insecticides have an inhibitory effect on AChE activity (Fukuto, 1990; Jankowska et al., 2018; Sarkar et al., 2018). After the injection, the cockroaches did not show signs of AChE inhibition such as restlessness, hyperexcitability, tremors and paralysis leading frequently to death (Fukuto, 1990; Lionetto et al., 2013), so the phenotypic characteristics observed are compatible with the enzyme activity levels observed. Nevertheless, when the cockroaches were injected with JBU, the AChE enzymatic activity on the whole head of the insect decreased (Carrazoni et al., 2016). Since the authors did not use CNS, the results are not completely comparable with those of the present work, however, a differential response on AChE activity upon JBU and Jbtx cannot be ruled out. JBU and Jbtx have different mechanisms of action on other tissues, such as the Malpighian tubules of *R. prolixus* (Stanisçuaski et al., 2009).

A previous work with *T. infestans* demonstrated the physical interaction between Jbtx and the enzyme UAP, concomitant with an increment in the activity of the enzyme (Galvani et al., 2015). This enzyme activation was similarly observed in the CNS of *R. prolixus* upon *in vivo* (feeding) and *in vitro* treatments with Jbtx. However, when the recombinant UAP (rUAP) of *R. prolixus* was tested *in vitro*, the activity of rUAP treated with Jbtx remained at the same levels of the control (only vehicle buffer) (Fruttero et al., 2017). These results suggest that there are another component(s) present in the *R. prolixus*' CNS homogenates, which are not included in the rUAP reaction mix, that are required to activate this enzyme. When the UAP of *N. cinerea* was tested, no activation or inhibition was observed after *in vivo* (2 and 6 h) (Fig. 4B,C) and *in vitro* treatments (Fig. 4A). However, 18 h after injection, an inhibition in the activity was displayed for the doses 8 and 16 μg Jbtx/g of body weight (Fig. 4D). Thus, compared to the

triatomines, an inverse profile of activity was observed in *N. cinerea* indicating a species-specific effect.

Furthermore, it is important to highlight that cockroaches are insects that live in unsanitary areas, which makes them more resistant to several stressors. In these places, insects are in contact with many microbes and pathogens, forcing their immune system to be more developed to fight against infections (Li et al., 2018). Also, in response to these extreme conditions in which cockroaches usually live, it was evidenced the upregulation of several genes in the CYP3 and CYP4 clans, which can be induced by xenobiotics (David et al., 2010; Ffrench-Constant, 2013). The work that sequenced the American cockroach (*P. americana*) genome identified 178 cytochrome P450s, 90 carboxyl/choline esterases, 39 glutathione transferases, and 115 ATP-binding cassette transporters (Li et al., 2018). Those genes are likely part of the detoxification system and are crucial for insects to overcome the deleterious effects of numerous toxins. Further experiments are needed to affirm that Jbtx activates this system in the *N. cinerea* cockroach, although the activation of AChE (Fig. 5B-D) points to that direction. The differences of life style and environments could make the cockroach prepared to withstand the effects of Jbtx, in contrast to the other insects tested.

5. Conclusion

In this work, we have provided evidence that the ingestion and the injection of Jbtx in adult cockroaches did not result in mortality, showing that the toxin is not lethal to this insect. On the other hand, our data shows that Jbtx affects the nitrinergic signaling in a non-hemipteran species, altering enzyme activity without modifying the protein expression. Also, we

demonstrated for the first time that a urease-derived peptide increases AChE activity. Additionally, Jbtx diminished UAP activity and exerted no effect on ACP. These data establish the *N. cinerea* cockroach as a Jbtx-resistant model that can be employed in future comparative studies to elucidate Jaburetox's entomotoxic mechanism of action.

6. Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant 446052/2014-1 and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Edital Toxinologia 63/2010, grant 1205/2011. LLF received a Young Talent Fellowship from the Science without Borders Program (CNPq grant 400189/2014-3). APAP received a master fellowship from CNPq.

4. DISCUSSÃO GERAL

Ao longo dos anos que o nosso grupo vem trabalhando com a caracterização do efeito do Jbtx, os dados obtidos demonstram que esse peptídeo possui propriedades de caráter entomotóxico para muitas espécies de insetos. Contudo, quando administrado em mamíferos, esses animais não apresentaram sinais de toxicidade, ponto muito favorável que reforça a possível utilização do peptídeo como um bioinseticida ou na construção de uma planta transgênica (CARLINI & LIGABUE-BRAUN, 2016). Para uma completa compreensão dos efeitos desse peptídeo e possível utilização do mesmo para o controle racional de insetos, faz-se necessário o entendimento dos mecanismos de ação do peptídeo em diferentes modelos de

animais, incluindo insetos de diferentes ordens. Nesse trabalho, foi avaliado o efeito inseticida do Jbtx nas baratas da espécie *N. cinerea*, assim como os efeitos do mesmo sobre a atividade enzimática de enzimas presentes no SNC do inseto.

Os tratamentos de 50 µg de Jbtx por g de inseto que foi administrada por via oral e por injeção abdominal não resultou em mortalidade nos insetos tratados (Fig. 1A, B). Esses dados corroboram com estudos prévios, onde demonstram que injeções abdominais de JBU não causam a morte de *N. cinerea* adultas (CARRAZONI *et al.*, 2016). Por outro lado, quando *R. prolixus* e *T. infestans* foram testados com doses semelhantes de Jbtx, os triatomíneos tiveram 100 % de mortalidade em menos de 72 h (FRUTTERO *et al.*, 2016, GALVANI *et al.*, 2015), confirmando que são insetos susceptíveis aos efeitos do peptídeo e a *N. cinerea* é resistente. Trabalhos anteriores já demonstraram que o Jbtx causa efeitos danosos e mortalidade em outros insetos, da ordem Hemiptera (*Dysdercus peruvianus*), Diptera (*Aedes aegypti*), Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera*) (BECKER-RITT *et al.*, 2017) e Blattodea (*B. germanica*) (MULINARI *et al.*, 2007). O curioso fato do Jbtx ter causado mortalidade em *B. germanica* mas não em *N. cinerea*, pode ser explicado de duas maneiras, pela ação seletiva do peptídeo e pela maior resistência da *N. cinerea*. O efeito da ação seletiva espécie-específica de venenos já foi descrito em trabalhos onde a peçonha de aranha demonstrou perfis diferentes entre duas espécies de baratas, *B. germanica* e *P. americana*, sendo letal para apenas uma delas (BENDE *et al.*, 2015; HERZIG *et al.*, 2016). Além disso, existem trabalhos onde espécies diferentes de baratas foram utilizadas como organismo modelo, incluindo a *N. cinerea*, para ensaios de infecção por nematoides e com peçonha de aranhas. Nesses ensaios foi evidenciado que as *N. cinerea* foram mais resistentes às infecções e que também suportam doses mais altas de venenos de aranhas do

que outras baratas, incluindo *B. germanica* (CUTLER *et al.*, 2017; WULLSCHLEGER & NENTWIG, 2002).

Após realizar os tratamentos (*in vivo* e *in vitro*) com o Jbtx, demonstramos que o peptídeo tem ação inibitória sobre a atividade da NOS (Fig. 1A-C), efeito também observado nos triatomíneos *R. prolixus* e *T. infestans* (FRUTTERO *et al.*, 2017; GALVANI *et al.*, 2015), evidenciando que a inibição da via nitrinérgica pelo Jbtx não é restrita à ordem Hemiptera. Sendo a NOS uma enzima envolvida no sistema imunitário dos insetos, assim como nas transmissões nervosas que envolvem visão, olfato, sistema mecano- e quimiossensorial, assim como na orientação axonal (BICKER, 2001; DAVIES, 2000; MÜLLER & HILDEBRANDT, 1995; ELPHICK *et al.*, 1993; STEFANO & OTTAVIANI, 2002), sua inibição, e consequente diminuição do NO, esses sistemas do inseto podem estar afetados, tornando-o um alvo fácil para predadores, bem como mais susceptível a ação de patógenos e toxinas. Em decorrência da parcial inibição enzimática ocasionada pelo tratamento *in vitro* com Jbtx e concomitante ausência de alterações na expressão proteica da NOS (Fig. 1E), nossos dados sugerem uma atuação direta do peptídeo sobre a enzima. Tendo como base que a atividade da NOS foi alterada e considerando que essa enzima pode ser regulada por fosforilação/desfosforilação (GAZOS-LOPES *et al.*, 2012), decidiu-se investigar o efeito do peptídeo sobre a atividade das fosfatases ácidas. No entanto, após os tratamentos *in vivo* e *in vitro* com Jbtx, nenhuma alteração enzimática foi observada nessas enzimas, nas condições testadas nesse trabalho (Fig. 2). Achados similares foram reportados por Fruttero e colaboradores, quando a atividade das fosfatases ácidas foram avaliadas no SNC de *R. prolixus* após tratamentos *in vivo* e *in vitro* com Jbtx (FRUTTERO *et al.*, 2017).

No presente trabalho demonstramos que a atividade da AChE aumentou após tratamento *in vivo* com Jbtx (Fig. 4B-D). Tendo em mente que a incubação *in vitro* com o Jbtx não resultou em nenhuma alteração na atividade da enzima (Fig. 4A), essa informação reforça a ideia de que o aumento na atividade está acontecendo por meio indireto. Informações da literatura têm demonstrado que há conexão entre o aumento da atividade da AChE e a resistências dos insetos aos pesticidas orgânicos (CHEN *et al.*, 2001; HSU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2011). Também já foi evidenciado que a AChE faz parte do grupo de enzimas conhecidas com detoxificadoras, as quais são responsáveis por metabolizar e reduzir os efeitos de compostos tóxicos (LI *et al.*, 2016; LIAO *et al.*, 2016). Nesse contexto, é plausível a hipótese de que as baratas estejam respondendo aos efeitos do Jbtx com o aumento da atividade dessa enzima, tentando reduzir os efeitos negativos causados pelo peptídeo. É válido ressaltar que esses resultados não foram esperados, pois geralmente compostos com propriedades inseticidas tendem a resultar na inibição da atividade da AChE (FUKUTO, 1990; JANKOWSKA *et al.*, 2018; SARKAR *et al.*, 2018). No entanto, após a injeção com o Jbtx as baratas não apresentaram sinais característicos de inibição da AChE, como, hiperexcitabilidade, tremores nas patas, paralisia e posterior morte do inseto (FUKUTO, 1990; LIONETTO *et al.*, 2013). As manifestações assintomáticas são compatíveis com os níveis da atividade enzimática obtida. Contudo, trabalhos prévios demonstraram que injeções de JBU em *N. cinerea* resultaram na inibição da atividade enzimática da AChE (CARRAZONI *et al.*, 2016). Levando em consideração que o ensaio não foi realizado com todo o SNC do inseto, os resultados não podem ser totalmente equiparados. Por outro lado, divergências na resposta da atividade enzimática da AChE em relação ao tratamento com a JBU e o Jbtx não podem ser descartadas. Além disso, já foi demonstrado que a JBU e o Jbtx podem

apresentar diferentes mecanismos de ação em outros tecidos, como foi o caso dos túbulos de Malpighi em *R. prolixus* (STANISÇUASKI *et al.*, 2009).

Trabalhos prévios com *T. infestans* evidenciaram uma interação física entre o Jbtx e a enzima UAP, concomitantemente com o aumento da atividade dessa enzima (GALVANI *et al.*, 2015). Ademais, essa ativação enzimática também foi observada no SNC de *R. prolixus* após tratamento *in vivo* (alimentação) e *in vitro* com Jbtx. No entanto, quando a UAP recombinante (UAPr) de *R. prolixus* foi incubada *in vitro* com Jbtx a atividade da enzima se manteve nos mesmos níveis do controle (tampão) (FRUTTERO *et al.*, 2017). Esses resultados sugerem que existem componentes presentes no homogenato do SNC de *R. prolixus*, os quais não estão presentes na reação enzimática da UAPr, e são necessários para a ativação dessa enzima na presença do Jbtx. Quando a UAP de *N. cinerea* foi testada, a atividade da enzima não foi alterada após tratamento *in vivo* (2 e 6 h) e *in vitro* (Fig. 3A-C). Contudo, após 18 h de injeção, uma inibição da atividade enzimática nas doses de 8 e 16 µg Jbtx/g de peso corporal foi detectada (Fig. 3D). Em relação aos triatomíneos um perfil inverso foi observado, podendo indicar um efeito seletivo do Jbtx sobre as UAPs dos insetos. Há evidências na literatura da interação física entre o Jbtx e a enzima UAP de *T. infestans*, comprovada por um ensaio de imunoprecipitação (GALVANI *et al.*, 2015). Em relação a UAP de *R. prolixus*, técnicas de atracamento molecular, preliminarmente sugerem que o Jbtx ancora no sítio ativo da enzima (GRAHL *et al.*, dados não publicados). Tendo em vista que em *N. cinerea* a atividade enzimática nas primeiras horas ensaiadas (2 e 6 h) não sofreu alteração, mas com 18 h teve sua atividade reduzida, há a possibilidade de o peptídeo estar se ligando em um outro sítio da enzima, ou também que não esteja interagindo fisicamente, apenas deturpando o sistema e provocando essa resposta enzimática.

É válido ressaltar que as baratas são insetos que habitam lugares com baixa sanidade, o que propicia maior resistência a elas. Esses locais fazem com que o inseto esteja em contato direto com micróbios e patógenos, forçando o sistema imune a ser mais preparado para combater infecções (LI *et al.*, 2018). Também, em resposta às extremas condições que as baratas vivem, foi evidenciado que há uma superexpressão de genes dos clãs CYP3 e CYP4, os quais são induzidos por xenobióticos (DAVID *et al.*, 2010; FFRENCH-CONSTANT, 2013). O trabalho sobre o sequenciamento do genoma da *P. americana* identificou 178 citocromos P450, 90 carboxil/colina esterases, 39 glutatona transferases e 115 ATP-binding cassette transporters (LI *et al.*, 2018). Esses genes, muito provavelmente, fazem parte do sistema de detoxificação, sendo cruciais para os insetos sobrepujarem os efeitos nocivos de inúmeras toxinas. A reversão da inibição da enzima NOS pelo Jbtx, após 18 h de tratamento *in vivo* (Fig. 1D), pode ser um indicativo de que a barata consegue combater os efeitos deletérios do peptídeo, adquirindo tolerância ou eliminando o composto do seu sistema. No entanto, mais experimentos serão necessários para confirmar que o Jbtx realmente ativa esses sistemas nas baratas, contudo a ativação da AChE nos indica essa direção (Fig. 4B-D). A diferença de estilo de vida e ambiente possivelmente são grandes influenciadores que tornam a barata mais preparada para atenuar os efeitos do Jbtx, em relação aos outros insetos.

5. CONCLUSÃO GERAL

Nesse trabalho foi evidenciado através do ensaio inseticida feito por ingestão e injeção de Jbtx, foi evidenciado que as baratas *N. cinerea* não são susceptíveis ao peptídeo. Também se demonstrou que o Jbtx afeta a sinalização nitrinérgica em espécies não-hemípteras e que esse

bloqueio pode ser reversível, sendo que a alteração da atividade enzimática não está relacionada com a modificação da expressão proteica da NOS. No entanto atividade das ACP não sofreram alterações nas condições testadas. Também, demonstramos pela primeira vez que o peptídeo tóxico aumentou a atividade da AChE. Além disso, o Jbtx diminuiu a atividade da enzima UAP, mas a expressão proteica não foi alterada. Os dados obtidos nesse trabalho estabelecem que a *N. cinerea* é um inseto resistente ao Jbtx e que pode ser utilizado para futuros ensaios comparativos.

6. REFERÊNCIAS

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical journal**, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001.

ALDRIDGE, W. N. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. **The Biochemical journal**, v. 46, n. 4, p. 451–60, 1950.

ARAKANE, Y.; BAGUINON, M. C.; JASRAPURIA, S.; CHAUDHARI, S.; DOYUNGAN, A.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S.; BEEMAN, R. W. Both UDP N-acetylglucosamine pyrophosphorylases of *Tribolium castaneum* are critical for molting, survival and fecundity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 42–50, 2011.

BAINES, D.; DOWNER, R. G. H. Octopamine enhances phagocytosis in cockroach hemocytes: Involvement of inositol trisphosphate. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 1994.

BARRIOS, S.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. I.; AUDINO, P. G. Activity of increased specific and non-specific esterases and glutathione transferases associated with resistance to permethrin in *pediculus humanus capitis* (phthiraptera: Pediculidae) from Argentina. **Parasitology Research**, v. 106, n. 2, p. 415–421, 2010.

BECKER-RITT, A. B.; PORTUGAL, C. S.; CARLINI, C. R. Jaburetox: update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 32, 2017.

BELL, W. J.; ROTH, L.M.; NALEPA, C. A. Cockroaches: Ecology, Behavior, and Natural History. **Integrative and Comparative Biology**, v. 48, Issue 4, p. 541–543, 2008.

BENDE, N. S.; DZIEMBOROWICZ, S.; MOBIL, M.; HERZIG, V.; GILCHRIST, J.; WAGNER, J.; NICHOLSON, G. M.; KING, G. F.; BOSMANS, F. insect selectivity of the spider toxin Dc1a. **Nature Communication**, p. 1–23, 2015.

BICKER, G. Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. **Cell and Tissue Research**, v. 303, n. 2, p. 137–146, 2001.

BLANKENBURG, S.; BALFANZ, S.; HAYASHI, Y.; SHIGENOBU, S.; MIURA, T.; BAUMANN, O.; BAUMANN, A.; BLENAU, W. Cockroach GABAB receptor subtypes: Molecular characterization, pharmacological properties and tissue distribution. **Neuropharmacology**, v. 88, p. 134–144, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BREINIG, F.; TIPPER, D. J.; SCHMITT, M. J. Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. **Cell**, v. 108, n. 3, p. 395–405, 2002.

BROLL, V.; MARTINELLI, A. H. S.; LOPES, F. C.; FRUTTERO, L. L.; ZAMBELLI, B.; SALLADINI, E.; DOBROVOLSKA, O.; CIURLI, S.; CARLINI, C. R. Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 849–860, 2017.

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

CARRAZONI, T.; DE AVILA HEBERLE, M.; PERIN, A. P. A.; ZANATTA, A. P.; RODRIGUES, P. V.; DOS SANTOS, F. D. M.; DE ALMEIDA, C. G. M.; VAZ BREDA, R.; DOS SANTOS, D. S.; PINTO, P. M.; DA COSTA, J. C.; CARLINI, C. R.; DAL BELO, C. A. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Toxicology**, v. 368–369, p. 162–171, 2016.

CHEN, Z.; NEWCOMB, R.; FORBES, E.; MCKENZIE, J.; BATTERHAM, P. The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 8, p. 805–816, 2001.

COHEN, E. Chitin synthesis and inhibition: A revisit. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 946–950, 2001.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

CUTLER, J.; HUGHES, K.; RAE, R. Susceptibility of cockroaches (*Gromphadorhina portentosa*, *Nauphoeta cinerea* and *Blattella germanica*) exposed to entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 4, p. 556–564, 2017.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D.; SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY, M. K.; DOCTOR, B. P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. **Protein Science**, v. 2, n. 066/6, p. 366–382, 1993.

DAVID, J.-P.; COISSAC, E.; MELODELIMA, C.; POUPARDIN, R.; RIAZ, M. A.; CHANDOR-PROUST, A.; REYNAUD, S. Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. **BMC Genomics** **2010 11:1**, v. 11, n. 1, p. 216, 2010.

DAVIES, S. A. Nitric oxide signalling in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 12, p. 1123–1138, 2000.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961.

ELPHICK, M. R.; GREEN, I. C.; O'SHEA, M. Nitric oxide synthesis and action in an invertebrate brain. **Brain Research**, v. 619, n. 1–2, p. 344–346, 1993.

ELPHICK, M.; RAYNE, R.; RIVEROS-MORENO, V.; MONCADA, S.; SHEA, M. Nitric oxide synthesis in locust olfactory interneurons. **The Journal of experimental biology**, v. 198, n. Pt 3, p. 821–9, 1995.

FANG, W.; DU, T.; RAIMI, O. G.; HURTADO-GUERRERO, R.; URBANIAK, M. D.; IBRAHIM, A. F. M.; FERGUSON, M. A. J.; JIN, C.; VAN AALTEN, D. M. F. Genetic and structural validation of *Aspergillus fumigatus* UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase as an antifungal target. **Molecular Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 479–493, 2013.

FERGUSON, M. J.; WILLIAMS, F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 285–320, 1988.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. The molecular genetics of insecticide resistance. **Genetics**, v. 194, n. 4, p. 807–815, 2013.

FOURNIER, D.; BRIDE, J. M.; HOFFMANN, F.; KARCH, F. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 20, p. 14270–14274, 1992.

FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; KRUG, M. S.; BROLL, V.; GRAHL, M. V. C.; REAL-GUERRA, R.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Jaburetox affects gene expression

and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector. **Acta Tropica**, v. 168, p. 54–63, 2017.

FRUTTERO, L. L.; MOYETTA, N. R.; UBERTI, A. F.; GRAHL, M. V. C.; LOPES, F. C.; BROLL, V.; FEDER, D.; CARLINI, C. R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 412, 2016.

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 245–254, 1990.

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. Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 2, p. 255–262, 2015.

GAZOS-LOPES, F.; MESQUITA, R. D.; SILVA-CARDOSO, L.; SENNA, R.; SILVEIRA, A. B.; JABLONKA, W.; CUDISCHEVITCH, C. O.; CARNEIRO, A. B.; MACHADO, E. A.; LIMA, L. G.; MONTEIRO, R. Q.; NUSSENZVEIG, R. H.; FOLLY, E.; ROMEIRO, A.; VANBESELAERE, J.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M. C.; ATELLA, G. C.; SILVA-NETO, M. A. C. Glycoinositolphospholipids from Trypanosomatids Subvert Nitric Oxide Production in *Rhodnius prolixus* Salivary Glands. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

GEUN, S. K.; NALINI, M.; KIM, Y.; LEE, D. W. Octopamine and 5-hydroxytryptamine mediate hemocytic phagocytosis and nodule formation via eicosanoids in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 3, p. 162–176, 2009.

GORDON, V. M.; NELSON, K. L.; BUCKLEY, J. T.; STEVENS, V. L.; TWETEN, R. K.; ELWOOD, P. C.; LEPLAT, S. H. Clostridium septicum alpha toxin uses glycosylphosphatidylinositol- anchored protein receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 27274–27280, 1999.

GOVINDARAJ, D.; SHARMA, S.; GAUR, S. N.; LAVASA, S.; PRASAD, N.; ARORA, N. Immunogenic peptides: B & T Cell Epitopes of Per a 10 Allergen of *Periplaneta americana*. **Molecular Immunology**, v. 80, p. 24–32, 2016.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 285–302, 2009.

HERRERO, S.; ANSEMS, M.; VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M.; BAKKER, P. L.; DE MAAGD, R. A. REPAT, a new family of proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 11, p.

1109–1118, 2007.

HERZIG, V.; IKONOMOPOULOU, M.; SMITH, J. J.; DZIEMBOROWICZ, S.; GILCHRIST, J.; KUHN-NENTWIG, L.; REZENDE, F. O.; MOREIRA, L. A.; NICHOLSON, G. M.; BOSMANS, F.; KING, G. F. Molecular basis of the remarkable species selectivity of an insecticidal sodium channel toxin from the African spider *Augacephalus ezendami*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.

HSU, J. C.; WU, W. J.; HAYMER, D. S.; LIAO, H. Y.; FENG, H. T. Alterations of the acetylcholinesterase enzyme in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* are correlated with resistance to the organophosphate insecticide fenitrothion. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 146–154, 2008.

HUBER, I.; MASLER, E. P.; RAO, B. R. Eds. Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research. **CRC Press**, Boca Raton, Fla, USA, 1990.

IKEZAWA, H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 4, p. 409–417, 2002.

JANKOWSKA, M.; ROGALSKA, J.; WYSZKOWSKA, J.; STANKIEWICZ, M. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1–20, 2018.

KIM, J. I.; JUNG, C. S.; KOH, Y. H.; LEE, S. H. Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica*. **Insect Molecular Biology**, v. 15, n. 4, p. 513–522, 2006.

KIM, Y. H.; CHA, D. J.; JUNG, J. W.; KWON, H. W.; LEE, S. H. Molecular and Kinetic Properties of Two Acetylcholinesterases from the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 17–19, 2012.

LALITHA, K.; KARTHI, S.; VENGATESWARI, G.; KARTHIKRAJA, R.; PERUMAL, P.; SHIVAKUMAR, M. S. Effect of entomopathogenic nematode of *Heterorhabditis indica* infection on immune and antioxidant system in lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Parasitic Diseases**, v. 42, n. 2, p. 204–211, 2018.

LANG, S.; PALMER, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p. 38167–38173, 2003.

LEARN ZOOLOGY. *Nervous system of *Periplaneta americana**. Disponível em: <Acesso em 10 jun. 2018>.

LEYRIA, J.; FRUTTERO, L. L.; NAZAR, M.; CANAVOSO, L. E. The role of DmCatD, a cathepsin D-like peptidase, and acid phosphatase in the process of follicular atresia in *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas' disease. **PLoS ONE**, v. 10,

n. 6, p. 1–25, 2015.

LI, S.; ZHU, S.; JIA, Q.; YUAN, D.; REN, C.; LI, K.; LIU, S.; CUI, Y.; ZHAO, H.; CAO, Y.; FANG, G.; LI, D.; ZHAO, X.; ZHANG, J.; YUE, Q.; FAN, Y.; YU, X.; FENG, Q.; ZHAN, S. The genomic and functional landscapes of developmental plasticity in the American cockroach. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

LI, X.; LIU, Q.; LEWIS, E. E.; TARASCO, E. Activity changes of antioxidant and detoxifying enzymes in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae infected by the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis beicherriana* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Parasitology Research**, v. 115, n. 12, p. 4485–4494, 2016.

LIAO, M.; XIAO, J. J.; ZHOU, L. J.; LIU, Y.; WU, X. W.; HUA, R. M.; WANG, G. R.; CAO, H. Q. Insecticidal activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and RNA-Seq analysis of *Sitophilus zeamais* transcriptome in response to oil fumigation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–19, 2016.

LIGABUE-BRAUN, R.; ANDREIS, F. C.; VERLI, H.; CARLINI, C. R. 3-to-1: Unraveling structural transitions in ureases. **Naturwissenschaften**, v. 100, n. 5, p. 459–467, 2013.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; CALISI, A.; GIORDANO, M. E.; SCHETTINO, T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: New insights and future perspectives. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

LIU, X. J.; SUN, Y. W.; LI, D. Q.; LI, S.; MA, E. B.; ZHANG, J. Z. Identification of *LmUAP1* as a 20-hydroxyecdysone response gene in the chitin biosynthesis pathway from the migratory locust, *Locusta migratoria*. **Insect Science**, v. 25, n. 2, p. 211–221, 2018.

LOPES, F. C.; DOBROVOLSKA, O.; REAL-GUERRA, R.; BROLL, V.; ZAMBELLI, B.; MUSIANI, F.; UVERSKY, V. N.; CARLINI, C. R.; CIURLI, S. Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **FEBS Journal**, v. 282, n. 6, p. 1043–1064, 2015.

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M. S.; PIOVESAN, A. R.; STANISÇUASKI, F.; DEMARTINI, D. R.; DAL BELO, C. A.; ALMEIDA, C. G. M.; FOLLMER, C.; VERLI, H.; CARLINI, C. R.; PASQUALI, G. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935–944, 2014.

MERZENDORFER, H. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4393–4412, 2003.

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects:

Common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759–769, 2011.

MIO, T.; YABE, T.; ARISAWA, M.; YAMADA-OKABE, H. The Eukaryotic UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylases. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 273, n. 23, p. 14392–14397, 1998.

MOBLEY, H. L.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological reviews**, v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.

MOHAMED, M. A.; MAHDY, E. S. M. E.; GHAZY, A. E. H. M.; IBRAHIM, N. M.; EL-MEZAYEN, H. A.; GHANEM, M. M. E. The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of Heterorhabditis bacteriophora strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 180, p. 11–22, 2016.

MONGEAU, J.-M.; SPONBERG, S. N.; MILLER, J. P.; FULL, R. J. Sensory processing within cockroach antenna enables rapid implementation of feedback control for high-speed running maneuvers. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 15, p. 2344–2354, 2015.

MORTIMER, N. T.; KACSOH, B. Z.; KEEBAUGH, E. S.; SCHLENKE, T. A. Mgat1-dependent N-glycosylation of membrane components primes drosophila melanogaster blood cells for the cellular encapsulation response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, p. 31, 2012.

MOUSSIAN, B. The role of GlcNAc in formation and function of extracellular matrices. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 149, n. 2, p. 215–226, 2008.

MOYETTA, N. R.; BROLL, V.; PERIN, A. P. A.; UBERTI, A. F.; COSTE GRAHL, M. V.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R.; FRUTTERO, L. L. Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 200, p. 17–26, 2017.

MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; BERTHOLDO-VARGAS, L. R.; POSTAL, M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; RIGDEN, D. J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CARLINI, C. R. Jaburetox-2Ec: An insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042–2050, 2007.

MULLER, U. The nitric oxide system in insects. **Progress in Neurobiology**, v. 51, n. 3, p. 363–381, 1997.

MÜLLER, U. Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. **The European journal of neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 1362–70, 1994.

MÜLLER, U.; HILDEBRANDT, H. The Nitric Oxide/cGMP System in the Antennal Lobe of *Apis mellifera* is Implicated in Integrative Processing of Chemosensory Stimuli.

European Journal of Neuroscience, v. 7, n. 11, p. 2240–2248, 1995.

NOSJEAN, O.; BRIOLAY, A.; ROUX, B. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 1331, n. 2, p. 153–186, 1997.

OTT, S. R.; BURROWS, M. Nitric oxide synthase in the thoracic ganglia of the locust: Distribution in the neuropiles and morphology of neurones. **Journal of Comparative Neurology**, v. 395, n. 2, p. 217–230, 1998.

PANARA, F.; PASCOLINI, R. Acid Phosphatases From Liver of *Cyprinus carpio*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 4, p. 751–754, 1989.

PATEL, B.; SHARIFI, M.; MILWARD, A. D.; OBERPRIELER, N. G.; GIBBINS, J. M.; PARKIN, S.; NASEEM, K. M. Platelet nitric oxide synthase is activated by tyrosine dephosphorylation: Possible role for SHP-1 phosphatase. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 11, p. 2423–2432, 2006.

PETHUAN, S.; JIRAKANJANAKIT, N.; SAENGTHARATIP, S.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; KAEWPA, D.; RONGNOPARUT, P. Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. **Tropical biomedicine**, v. 24, n. 1, p. 7–15, 2007.

PIOVESAN, A. R.; MARTINELLI, A. H. S.; LIGABUE-BRAUN, R.; SCHWARTZ, J. L.; CARLINI, C. R. Canavalia ensiformis urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 547, p. 6–17, 2014.

POSTAL, M.; MARTINELLI, A. H. S.; BECKER-RITT, A. B.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEMARTINI, D. R.; RIBEIRO, S. F. F.; PASQUALI, G.; GOMES, V. M.; CARLINI, C. R. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012.

RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4003–8, 2004.

RANI, C.; KHAN, I. A. UDP-GlcNAc pathway: Potential target for inhibitor discovery against *M. tuberculosis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 62–70, 2016.

REPNIKOVA, E.; KOLES, K.; NAKAMURA, M.; PITTS, J.; LI, H.; AMBAVANE, A.; ZORAN, M. J.; PANIN, V. M. Sialyltransferase regulates nervous system function in *Drosophila*. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 18, p. 6466–76, 2010.

RIBEIRO, J. M.; NUSSENZVEIG, R. H. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. **FEBS Letters**, v. 330, n. 2, p. 165–168, 1993.

SADEKUZZAMAN, M.; STANLEY, D.; KIM, Y. Nitric Oxide Mediates Insect Cellular Immunity via Phospholipase A2 Activation. **Journal of Innate Immunity**, v. 10, n. 1, p. 70–81, 2018.

SARKAR, M.; LEVENTIS, P. A.; SILVESCU, C. I.; REINHOLD, V. N.; SCHACHTER, H.; BOULIANNE, G. L. Null mutations in *Drosophila* N-acetylglucosaminyltransferase I produce defects in locomotion and a reduced life span. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12776–12785, 2006.

SARKAR, S.; ROY, A.; ROY, S. Flubendiamide affects visual and locomotory activities of *Drosophila melanogaster* for three successive generations (P, F1 and F2). **Invertebrate Neuroscience**, v. 18, n. 2, p. 6, 2018.

SATTELLE, D. B.; BREERT, H. Cholinergic Nerve Terminals in the Central Nervous System of insects. **Journal of neuroendocrinology**, v. 2, n. 3, p. 241–256, 1990.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 9, p. 722–735, 2005.

SCHOFIELD, L.; HACKETT, F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 1, p. 145–53, 1993.

SEIDEL, C.; BICKER, G. Nitric oxide and cGMP influence axonogenesis of antennal pioneer neurons. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 21, p. 4541–4549, 2000.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R–56R, 2002.

STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Plant Ureases and Related Peptides: Understanding Their Entomotoxic Properties. **Toxins**, v. 4, n. 2, p. 55–67, 2012.

STANISÇUASKI, F.; TE BRUGGE, V.; CARLINI, C. R.; ORCHARD, I. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 3, p. 255–263, 2009.

STANKIEWICZ, M.; DBROWSKI, 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, 2012.

STANLEY, D.; MILLER, J.; TUNAZ, H. Eicosanoid actions in insect immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 4, p. 282–290, 2009.

STEFANO, G. B.; OTTAVIANI, E. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. v. 924, p. 82–89, 2002.

STÜRMER, G.D., FREITAS, T.C., HEBERLE, M.A., ASSIS DE, D.R., VINADÉ, L., PEREIRA, A.B., FRANCO, J.L., DAL BELO, C.A. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 109, p. 56–62, 2014.

TAYLOR, D. P.; NEWBURGH, R. W. The synthesis and content of neurotransmitters and their effect on cyclic nucleotide accumulation in the central nervous system of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry**, v. 9, n. 3, p. 265–272, 1979.

TOUTANT, J.-P. Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. **Progress in Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 423–446, 1989.

VINCENT, J. B.; CROWDER, M. W.; AVERILL, B. A. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 105–110, 1992.

WANG, T.; XIE, Z.; LU, B. Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses. **Nature**, v. 374, p. 262–266, 1995.

WANG, X. Y.; HE, Z. C.; SONG, L. Y.; SPENCER, S.; YANG, L. X.; PENG, F.; LIU, G. M.; HU, M. H.; LI, H. B.; WU, X. M.; ZENG, S.; HILGENFELD, R.; STÖCKIGT, J.; ZHAO, Y.; QIAN, J. F. Chemotherapeutic effects of bioassay-guided extracts of the American cockroach, *Periplaneta americana*. **Integrative Cancer Therapies**, v. 10, n. 3, 2011.

WEIHMANN, T.; REINHARDT, L.; WEISSING, K.; SIEBERT, T.; WIPFLER, B. Fast and powerful: Biomechanics and bite forces of the mandibles in the American cockroach *Periplaneta Americana*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–17, 2015.

WILDEMANN, B.; BICKER, G. Developmental Expression of Nitric Oxide / Cyclic GMP Synthesizing Cells in the Nervous System of *Drosophila melanogaster* ABSTRACT : **Journal of Neurobiology**, p. 1–15, 1999.

WRIGHT, J. W.; SCHWINOF, K. M.; SNYDER, M. A.; COPENHAVER, P. F. A delayed role for nitric oxide-sensitive guanylate cyclases in a migratory population of embryonic neurons. **Developmental Biology**, v. 204, n. 1, p. 15–33, 1998.

WULLSCHLEGER, B.; NENTWIG, W. Influence of venom availability on a spider's prey-choice behaviour. **Functional Ecology**, v. 16, n. 6, p. 802–807, 2002.

YAN, Y.-M.; ZHU, H.-J.; XIANG, B.; QI, J.-J.; CHENG, Y.-X. Phenolic derivatives from *Periplaneta americana*. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 11, 2017.

YAN, Y. M.; XIANG, B.; ZHU, H. J.; QI, J. J.; HOU, B.; GENG, F. N.; CHENG, Y. X. N-containing compounds from *Periplaneta americana* and their activities against wound healing. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 6020, p. 1–10, 2018.

YANG, M.; ZHANG, J.; ZHU, K. Y.; XUAN, T.; LIU, X.; GUO, Y.; MA, E. Increased activity and reduced sensitivity of acetylcholinesterase associated with malathion resistance in a field population of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 91, n. 1, p. 32–38, 2008.

YU, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 2, p. 135–142, 2006.

ZEMOLIN, A. P. P.; CRUZ, L. C.; PAULA, M. T.; PEREIRA, B. K.; ALBUQUERQUE, M. P.; VICTORIA, F. C.; PEREIRA, A. B.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Toxicity induced by *prasiola crispa* to fruit fly *drosophila melanogaster* and cockroach *nauphoeta cinerea*: Evidence for bioinsecticide action. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 77, n. 1–3, p. 115–124, 2014.

ZHANG, B.; HELEN, H. S.; WANG, J. jun; LIU, H. Performance and Enzyme Activity of Beet Armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) Under Various Nutritional Conditions. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 5, p. 737–746, 2011.

ZHANG, Y.; YIN, H.; LU, H. Recent progress in quantitative glycoproteomics. **Glycoconjugate Journal**, v. 29, n. 5–6, p. 249–258, 2012.

Apêndice A



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

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

Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae)



Natalia R. Moyetta^a, Valquiria Broll^b, Ana Paula A. Perin^b, Augusto F. Uberti^a,
Matheus V. Coste Grahl^a, Fernanda Staniscuaski^{b,c}, Celia R. Carlini^{a,c}, Leonardo L. Fruttero^{a,*}

^a Brain Institute (Instituto do Cérebro-INSCER), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Molecular Biology and Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hemocytes

Insect control

Jaburetox

Mechanism of action

Rhodnius prolixus

Toxicity

ABSTRACT

Jaburetox is a recombinant peptide derived from a *Canavalia ensiformis* urease that presents toxic effects upon several species of insects, phytopathogenic fungi and yeasts of medical importance. So far, no toxicity of Jaburetox to mammals has been shown. Previous reports have identified biochemical targets of this toxic peptide in insect models, although its mechanism of action is not completely understood. In this work, we aimed to characterize the effects of Jaburetox in hemolymphatic insect cells. For this purpose, the model insect and Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus* was used. *In vivo* and *in vitro* experiments indicated that Jaburetox interacts with a subset of hemocytes and it can be found in various subcellular compartments. In insects injected with Jaburetox there was an increase in the gene expression of the enzymes UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP), chitin synthase and nitric oxide synthase (NOS). Nevertheless, the expression of NOS protein, the enzyme activities of UAP and acid phosphatase (a possible link between UAP and NOS) as well as the phosphorylation state of proteins remained unchanged upon the *in vivo* Jaburetox treatment. Nitric oxide (NO) protein, the enzyme activities of UAP and acid phosphatase (a possible link between UAP and NOS) as well as the phosphorylation state of proteins remained unchanged upon the *in vivo* Jaburetox treatment. Nitric oxide (NO) imaging using fluorescent probes showed that Jaburetox augmented NO production in the hemocyte aggregates when compared to controls. Even though Jaburetox activated the hemocytes, as demonstrated by wheat germ agglutinin binding assays, the peptide did not lead to an increase of their phagocytic behavior. Taken together, these findings contribute to our understanding of toxic effects of Jaburetox, a peptide with biotechnological applications and a prospective tool for rational insect control.

1. Introduction

Jaburetox is a recombinant peptide of ~11 kDa derived from one of the isoforms of urease from *Canavalia ensiformis*, a leguminous plant commonly known as jack bean (Mulinari et al., 2007). The various biological effects of urease isoforms, independent of their enzymatic activity, have been reviewed elsewhere (Real-Guerra et al., 2013; Carlini and Ligabue-Braun, 2016) and include entomo- and fungitoxicity, as well as exocytosis induction in several cell models. Jaburetox was also reported as toxic for several species of phytopathogenic filamentous fungi and yeasts of medical importance (Postal et al., 2012) and to insect species from the orders Lepidoptera (Mulinari et al.,

2007), Blattodea (Mulinari et al., 2007) and Hemiptera (Defferrari et al., 2011; Martinelli et al., 2014; Galvani et al., 2015). Nevertheless, high doses of Jaburetox are not lethal nor caused symptoms of acute toxicity in mice or neonate rats when given orally or *via* injection, indicating that the peptide has potential as an option of a safe insecticide (Mulinari et al., 2007). Moreover, preliminary results with maize, sugarcane and soybean transgenic plants expressing Jaburetox indicated that those crops present higher resistance to the attack of insect pests, making this peptide a prospective tool for rational insect control (Carlini and Ligabue-Braun, 2016).

Due to its physiological characteristics and ease of raising, triatomines (Hemiptera: Reduviidae) have been used as models for

Abbreviations: CNS, central nervous system; NOS, nitric oxide synthase; UAP, UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase; WGA, wheat germ agglutinin; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC, fluorescein isothiocyanate; DAF-FM, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, diaminofluorescein-FM; PB, sodium phosphate buffer; FBS, fetal bovine serum; DTT, dithiothreitol; AP, acid phosphatase; JBU, jack bean urease; NO, nitric oxide; PAMP, pathogen associated molecular pattern; SG, salivary glands; Jbtx, Jaburetox

* Corresponding author at: Instituto do Cérebro (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, prédio 63, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: valbroll@ufrgs.br (V. Broll), fernanda.staniscuaski@ufrgs.br (F. Staniscuaski), celia.carlini@puccs.br (C.R. Carlini), leofruttero@cbiot.ufrgs.br (L.L. Fruttero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.06.001>

Received 1 May 2017; Received in revised form 31 May 2017; Accepted 6 June 2017

Available online 08 June 2017

1532-0456/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Apêndice B



Contents lists available at ScienceDirect

Pesticide Biochemistry and Physiology

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

Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation

Allan Pinto Leal^a, Raquel Soares Oliveira^a, Ana Paula Artusi Perin^b, Bruna Trindade Borges^a, Patrícia de Brum Vieira^a, Tiago Gomes dos Santos^c, Lúcia Vinadé^a, Chiara Valsecchi^a, Cháriston André Dal Belo^{a,b,d,*}

^a Laboratório de Neurobiologia e Toxinologia, LANETOX, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Av. Antônio Trilha 1847, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

^b Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43431, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Estudos em Biodiversidade Pampiana LEBIP, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA-SEDE), Av. Antônio Trilha 1847, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

^d 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

ARTICLE INFO

Keywords:

Anuran secretion
Entomotoxicity
Insect behavior
Neuromuscular blockade
Octopaminergic modulation

ABSTRACT

Rhinella icterica is a poisonous toad whose toxic secretion has never been studied against entomotoxic potential. Sublethal doses of *Rhinella icterica* toxic secretion (RITS) were assayed in *Nauphoeta cinerea* cockroaches, in order to understand the physiological and behavioral parameters, over the insect central and peripheral nervous system. RITS (10 µg/g) injections, induced behavioral impairment as evidenced by a significant decrease (38 ± 14%) in the distance traveled ($p < .05$), followed by an increase (90 ± 6%) of immobile episodes ($p < .001$, $n = 28$, respectively). In cockroaches semi-isolated heart preparations, RITS (16 µg/200 µl) induced a significant irreversible dose-dependent negative chronotropism, reaching ~40% decrease in heart rate in 20 min incubation. In vivo cockroach neuromuscular preparations, RITS (20, 50 and 100 µg/g of animal weight) induced a time-dependent inhibition of twitch tension that was complete for 20 µg/g, in 120 min recordings. RITS (10 µg/g) also induced a significant increase in the insect leg grooming activity (128 ± 10%, $n = 29$, $p < .01$), but not in the antennae counterparts. The RITS increase in leg grooming activity was prevented in 90% by the pretreatment of cockroaches with phentolamine (0.1 µg/g). The electrophysiological recordings of spontaneous neural compound action potentials showed that RITS (20 µg/g) induced a significant increase in the number of events, as well as in the rise time and duration of the potentials. In conclusion, RITS showed to be entomotoxic, being the neuromuscular failure and cardiotoxic activity considered the main deleterious effects. The disturbance of the cockroaches' behavior together with the electrophysiological alterations, may unveil the presence of some toxic components present in the poison with inherent biotechnological potentials.

1. Introduction

Poisonous animals are present worldwide and have representatives from many biological taxa. Animal poisons contain substances with unique biological active molecules that have a variety of molecular targets and biological functions [1]. Among others, anuran amphibians are poisonous animals able to inhabit most regions of our planet, especially tropical areas.

The *Rhinella* genus, which includes *Rhinella icterica* specie, is characterized by the presence of parotoid glands located on the body surface, which are mostly involved in the synthesis and release of a

poisonous secretion, used for defense against predators and pathogens [2]. *Rhinella icterica* has a fairly wide area of occurrence, being found in central, southeastern and southern Brazil, including the Pampa Biome. The Pampa Biome spreads to northeastern Argentina and eastern Paraguay, at altitudes ranging from 0 to 1200 m. Due to their coverage area, this specie is found in a great diversity of habitats, from open forests to tropical seasonal zones such as the Cerrado biome including areas with considerable anthropic alterations [3].

Anurans poison detains a wide variety of biological compounds such as: biological amines, alkaloids, peptides, proteins and steroids [4]. Several studies suggest that most of the alkaloids found in amphibians

* Corresponding author at: 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.pestbp.2018.04.016>

Received 9 February 2018; Received in revised form 21 April 2018; Accepted 25 April 2018
0048-3575/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Ana Paula Perin

Curriculum Vitae

Porto Alegre, Agosto de 2018

CURRICULUM VITAE

PERIN, A.P.A; PERIN, A.P

DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Paula Perin

Local e data de nascimento: Clevelândia-PR, Brasil. 16 de junho de 1992

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia
Av. Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43.431 - Sala 209
Agronomia - Porto Alegre
91501970, RS - Brasil

E-mail: anaperin.app@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016 **Mestrado em Biologia Celular e Molecular**
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Orientadora: Prof^a. Dra. Fernanda Stanisçuaski
Co-orientador: Dr. Leonardo Luis Fruttero
Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2010 - 2016 **Graduação em Biotecnologia**
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, São Gabriel, Brasil
Título: Efeito entomotóxico da urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) e do peptídeo tóxico Jaburetox sobre a junção neuromuscular de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*
Orientador: Cháriston André Dal Belo
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2016 – 2016 Curso em Laboratory in Invertebrate Neurophysiology. (Carga horária: 24h).
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, São Gabriel, Brasil.

ESTÁGIOS

2016 – 2016 Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

- 2015 – 2015** Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2013 - 2014** Iniciação Científica, PIBIC - CNPq, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2013 - 2013** Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2012 - 2012** Iniciação Científica, PBDA Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva.
- 2011 - 2012** Iniciação Científica, Voluntário, Carga horária: 12, Regime: Dedicção exclusiva.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

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. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.1, p.1 - , 2018.

MOYETTA, N. R.; BROLL, V.; **PERIN, A. P. A.**; UBERTI, A. F.; COSTE GRAHL, M. V.; STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R.; FRUTTERO, L. L. Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 200, p. 17–26, 2017.

CARRAZONI, T.; DE AVILA HEBERLE, M.; **PERIN, A. P. A.**; ZANATTA, A. P.; RODRIGUES, P. V.; DOS SANTOS, F. D. M.; DE ALMEIDA, C. G. M.; VAZ BREDA, R.; DOS SANTOS, D. S.; PINTO, P. M.; DA COSTA, J. C.; CARLINI, C. R.; DAL BELO, C. A. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Toxicology**, v. 368–369, p. 162–171, 2016.

RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. Apresentação de Poster no: **II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology**. Jaburetox, a urease-derived peptide: effects on enzymatic pathways of a cockroach, 2018.
2. Apresentação de Poster no: **46º Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology – SBBq**. Neurotoxicity of Jaburetox, a Urease-Derived Peptide: Effects on Enzymes Activities in Tissues of Two Insect Species, 2017
3. Apresentação de Poster no: **Undergraduate Research & Creative Achievements Forum**. Toxicity of Jaburetox, a urease sub-peptide, in fruit fly (*Drosophila melanogaster*) development, 2015.

4. Apresentação de Poster no: **III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**. Atividade Induzida pelo Riluzole sobre a Preparação Neuromuscular de Biventer Cervicis de Pintainho, 2013.

5. Apresentação de Poster no: **IV Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Neuroproteção induzida pelo Extrato Padronizado de Hypericum brasiliense (Choisy) sobre a Neurotoxicidade Central do Veneno de Cascavel Brasileira em Camundongos: Comparação com o flavonóide Quercetina e o anticonvulsivante Riluzole, 2012