

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**MARIA EDUARDA ROSA**

**EFEITO NEUROTÓXICO DO EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) EM  
*Nauphoeta cinerea*: COMPARAÇÃO COM O ORGANOFOSFORADO TRICLORFON**

**São Gabriel - RS**

**2018**

**MARIA EDUARDA ROSA**

**EFEITO NEUROTÓXICO DO EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) EM  
*Nauphoeta cinerea*: COMPARAÇÃO COM O ORGANOFOSFORADO TRICLORFON**

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

Orientador: Cháriston André dal Belo

Coorientadora: Lúcia Helena do Canto Vinadé

**São Gabriel - RS**

**2018**

### Ficha catalográfica

R788 Rosa, Maria Eduarda

Efeito neurotóxico do extrato contendo Anatoxina-a(s) em *Nauphoeta cinerea*: comparação com o organofosforado Triclorfon / Maria Eduarda Rosa.

42 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Federal do Pampa, BIOTECNOLOGIA, 2018.

“Orientação: Cháriston André dal Belo”.

1. Cianotoxina. 2. Anticolinesterásico. 3. Triclorfon. 4. Baratas. I. Título.

**MARIA EDUARDA ROSA**

**EFEITO NEUROTÓXICO DO EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) EM  
*Nauphoeta cinerea*: COMPARAÇÃO COM O ORGANOFOSFORADO TRICLORFON**

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

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 07 de dezembro de 2018.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Cháriston André dal Belo

(Orientador)

UNIPAMPA



Thais Posser  
Professora do Magistério Superior  
Universidade Federal do Pampa  
Campus São Gabriel  
Slape 1805527

Prof. Dr.<sup>a</sup> Thais Posser

UNIPAMPA



Me. Leandro A. Lissner

UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais Marli e João, a minha irmã Maria Gabriela, ao meu amor Leonam e aos meus gatos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cháriston André dal Belo, por todo o incentivo e orientação, que foram fundamentais para que eu concluísse este trabalho.

Ao professor Dr. Velci Queiroz de Souza pela bolsa de iniciação científica.

Às professoras Lúcia Vinadé e Patrícia Brum por todo apoio e coorientação.

Aos amigos que fiz no LANETOX, Angélica, Bruna, Lana, Raquel e em especial o Yuri (“querido, foi uma tortura conviver todos esses semestres contigo, mas, muito obrigada pelo seu senso crítico científico”), que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram a limpar as caixas das baratas.

À UNIPAMPA por ter sido minha segunda casa durante esses anos e por ter me permitido encontrar o que eu nasci para fazer, amo muito meu trabalho e agradeço por isso.

E principalmente agradeço aos meus pais, minha mãe Marli que mesmo longe nunca deixou de estar comigo, sempre me orientando e ouvindo meus desabafos, com certeza foi a minha maior incentivadora, nunca deixou de lutar para que eu pudesse estudar. Meu pai João, que sempre se preocupou com o meu bem-estar e sempre esteve disposto a contribuir com meus estudos e pescaria nas férias. Vocês são eternos para mim.

À minha irmã Maria Gabriela, nunca conheci uma pessoa mais esforçada e de bom coração em minha vida. Apesar de parecer que não somos próximas, o amor que existe entre nós é maior do que tudo. Espero ter seu amor para sempre comigo.

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

- Martin Luther King Jr.

## RESUMO

Ações antrópicas são responsáveis pelo processo de eutrofização nos ecossistemas aquáticos, aumentando a probabilidade da ocorrência de floração de cianobactérias potencialmente tóxicas. A Anatoxina-a(s) é uma cianotoxina neurotóxica considerada o único organofosforado natural, por possuir atividade inibidora sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE). Neste trabalho propomo-nos utilizar baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* como biomarcador para a determinação dos efeitos da Anatoxina-a(s), comparando com o organofosforado Triclorfon (Tn), em ensaios *in vivo*, *in situ*, *ex vivo* e *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato contendo Anatoxina-a(s) (ECATAS) inibiu a atividade da AChE, cujos efeitos foram equivalentes aos do Tn. Além disso, ECATAS e Tn diminuíram significativamente a resposta contrátil da perna de *N. cinerea* assim como induziram um efeito cronotrópico negativo sobre o sistema cardiovascular desses insetos. Também foi possível observar que o comportamento locomotor exploratório e a atividade de *grooming* sofreram alterações relevantes com a administração do ECATAS e Tn, afetando o comportamento do animal. Registros eletrofisiológicos da perna de *N. cinerea* também demonstraram que o ECATAS e Tn diminuem a geração de potenciais de ação compostos neurais espontâneos (PACNE). Portanto, este trabalho demonstra que baratas podem ser utilizadas como modelo biológico para a detecção da contaminação por Anatoxina-a(s) assim como, de outros organofosforados, auxiliando nos processos de descontaminação e determinação precoce dos efeitos antrópicos.

Palavras-chave: Cianotoxina; Anticolinesterásico; Triclorfon; Baratas.

## ABSTRACT

Anthropogenic actions are responsible for the process of eutrophication in aquatic ecosystems, increasing the probability of the occurrence of potentially toxic cyanobacteria blooming. Anatoxin-a (s) is a neurotoxic cyanotoxin considered to be the only natural organophosphate because of its inhibitory activity on the enzyme acetylcholinesterase (AChE). The aim of this work was to use *Nauphoeta cinerea* cockroaches as a biomarker for the determination of the effects of Anatoxin-a(s), comparing with the organophosphate Trichlorfon (Tn) in *in vivo*, *in situ*, *ex vivo* and *in vitro*. The results obtained showed that the extract containing Anatoxin-a(s) (ECATAS) inhibited the activity of AChE, whose effects were equivalent to those of Tn. In addition, ECATAS and Tn significantly decreased *N. cinerea* leg twitch tension as well as induced a negative chronotropic effect on the cardiovascular system of these insects. It was also possible to observe that the exploratory locomotory behavior and grooming activity underwent relevant changes with the administration of ECATAS and Tn, thereby affecting the behavior of the animals. Electrophysiological recordings of *N. cinerea* leg also demonstrated that ECATAS and Tn decreased the generation of spontaneous neural compound action potentials (PACNE). Hence, this work demonstrates that cockroaches can be used as biological model for the detection of the contamination by Anatoxin-a(s) as well as of other organophosphates, helping in the processes of decontamination and early determination of the anthropic effects.

Keywords: Cyanotoxin; Anticholinesterase; Trichlorfon; Cockroaches.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - Diferença entre o ambiente aquático equilibrado e o ambiente eutrofizado pela ação antrópica.....	13
<b>FIGURA 2</b> - Ambiente aquático eutrofizado.....	14
<b>FIGURA 3</b> – Estrutura molecular da Anatoxina-a(s).....	15
<b>FIGURA 4</b> – Estrutura química do Triclorfon.....	16
<b>FIGURA 5</b> – Barata da espécie <i>Nauphoeta cinerea</i> .....	18
<b>FIGURA 6</b> - Esquema do sistema nervoso de barata localizado ventralmente no inseto, composto por gânglios que inervam o SNC e SNP.....	18
<b>FIGURA 7</b> – Imagem ilustrativa da injeção na hemocele de <i>Nauphoeta cinerea</i> utilizando seringa Hamilton.....	21
<b>FIGURA 8</b> - Imagem representativa da caixa de poliestireno utilizada para a manutenção de baratas <i>N. cinerea</i> , mantidas em condições de laboratório.....	22
<b>FIGURA 9</b> – Representação do protocolo <i>Locomotion</i> com baratas <i>N. cinerea</i> .....	22
<b>FIGURA 10</b> – Atividade de <i>grooming</i> de <i>N. cinerea</i> ( <b>A</b> ) perna; ( <b>B</b> ) antenas.....	23
<b>FIGURA 11</b> – Representação esquemática do protocolo PNMCMAM utilizando baratas.....	25
<b>FIGURA 12</b> – Comportamento locomotor de <i>N. cinerea</i> em ensaios <i>in vivo</i> com tratamento ECATAS e Tn.....	28
<b>FIGURA 13</b> – Comportamento de <i>grooming</i> induzido por ECATAS e Tn.....	29
<b>FIGURA 14</b> – Efeitos do tratamento com ECATAS e Tn na junção neuromuscular da perna de barata.....	30
<b>FIGURA 15</b> – Registro do número de eventos dos potenciais de ação compostos da perna de <i>N. cinerea</i> .....	31
<b>FIGURA 16</b> – Efeito cronotrópico negativo na frequência cardíaca de <i>N. cinerea</i> .....	32
<b>FIGURA 17</b> – Efeitos induzidos na atividade da AChE em homogeneizado do cérebro de <i>N. cinerea</i> .....	33
<b>FIGURA 18</b> – Representação esquemática das alterações induzidas pelo tratamento com ECATAS e Tn em baratas <i>N. cinerea</i> .....	36

## LISTA DE ABREVIACOES

**ACh** - Acetilcolina

**AChE** – Acetilcolinesterase

**ECATAS** – Extrato contendo Anatoxina-a(s)

**DTNB** – Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico

**GLU**- Glutamato

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico

**HEPES** - Ácido etanossulfônico hidroxietilpiperazina

**Kpi** – Tampão fosfato

**SNCAP** - Spontaneous neural compound action potentials

**SNC** – Sistema nervoso central

**SNP** – Sistema nervoso periférico

**PACNE** – Preparação *ex vivo* dos registros dos potenciais de ação compostos neurais espontâneos

**PNMCAM** – Preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico

**Tn** - Triclorfon

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Atividade antrópica e eutrofização .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Cianobactérias .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Anatoxina-a(s) .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Triclorfon (Tn).....</b>	<b>17</b>
<b>1.5 Sistema colinérgico.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.6 <i>Nauphoeta cinerea</i> como modelo neurobiológico.....</b>	<b>18</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>20</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Extrato contendo Anatoxina-a(s) (ECATAS).....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Reagentes .....</b>	<b>22</b>
<b>4.3 SSI.....</b>	<b>22</b>
<b>4.4 Animais modelo .....</b>	<b>22</b>
<b>4.5.1 <i>Locomotion</i>: comportamento locomotor e exploratório.....</b>	<b>23</b>
<b>4.5.2 <i>Grooming</i>: comportamento de limpeza .....</b>	<b>24</b>
<b>4.6 Experimentos biológicos em preparações de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>4.6.1 Registros eletromiográficos .....</b>	<b>25</b>
<b>4.6.2 Registros eletrofisiológicos .....</b>	<b>26</b>
<b>4.6.3 Preparação de coração semi-isolado de <i>Nauphoeta cinerea</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7 Experimentos bioquímicos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7.1 Ensaio para a medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) .....</b>	<b>27</b>
<b>4.8 Análise estatística .....</b>	<b>28</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Alteração no comportamento locomotor e exploratório de <i>N. cinerea</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Efeito induzido pela administração do ECATAS na atividade de <i>grooming</i> de <i>N. cinerea</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>5.3 Bloqueio neuromuscular induzido pelo ECATAS na PNMCM.....</b>	<b>31</b>
<b>5.4 Efeito do ECATAS e Tn sobre potenciais de ação compostos neurais espontâneos (PACNE) .....</b>	<b>31</b>

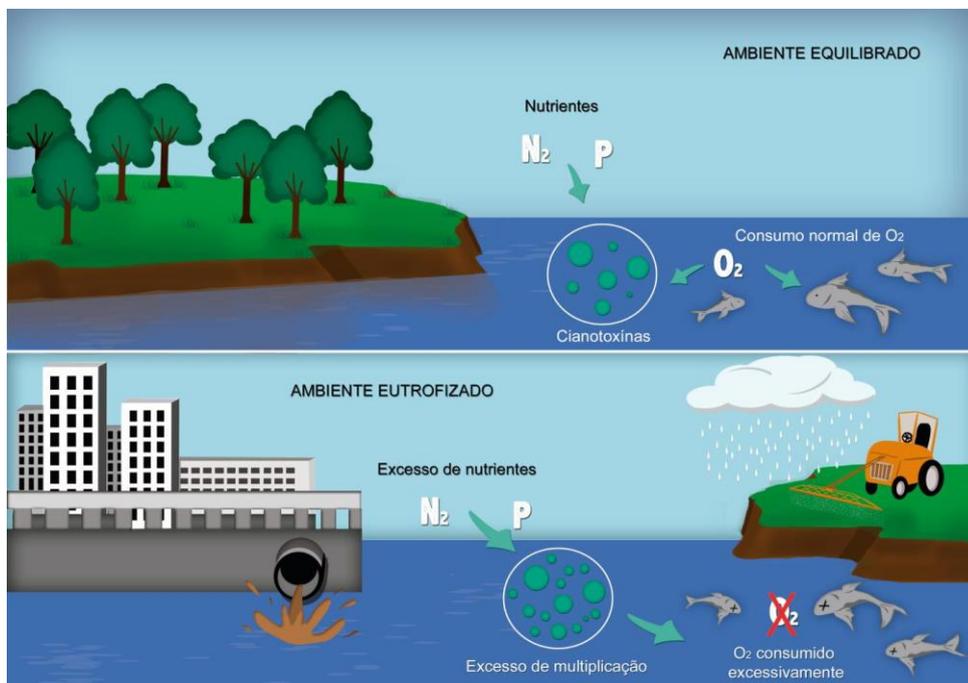
5.5	Efeito cronotrópico na frequência cardíaca de <i>N. cinerea</i> causado pela administração do ECATAS .....	32
5.6	Análise da atividade da AChE em homogeneizado de cérebro de baratas tratados com ECATAS.....	33
6	DISCUSSÃO.....	34
7	CONCLUSÃO .....	37
8	REFERÊNCIAS .....	38

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Atividade antrópica e eutrofização

Os sistemas lânticos de água parada como, lagoas, lagos e reservatórios, assim como sistemas lóticos de água corrente como, rios e riachos, formam o ecossistema de água doce (PEDROZO; KAPUSTA, 2010). O crescimento populacional e conseqüentemente o aumento das atividades humanas têm sido os maiores responsáveis pela poluição desses sistemas aquáticos (CHELLAPPA et al., 2009). Grande parte dos rejeitos produzidos pela atividade do homem como, esgoto doméstico, industrial, resíduos de adubos e fertilizantes da agricultura não possuem descartes adequados. Na maioria dos países em desenvolvimento, como o Brasil, esses rejeitos da atividade antrópica são despejados sem tratamento nos cursos d'água (NETO; FERREIRA, 2007). A grande quantidade de matéria orgânica, compostos sintéticos e elementos químicos depositados nos ambientes aquáticos são os responsáveis pelo processo de eutrofização desses meios (NETO; FERREIRA, 2007; ZANINI, 2009).

A eutrofização é um processo natural de produção biológica excessiva que ocorre em sistemas aquáticos. Isso ocorre devido ao aumento da concentração de nutrientes, geralmente macronutrientes (fósforo e nitrogênio), associados às boas condições de luminosidade, pH e temperatura (Figura 1) (SMITH; SCHINDLER, 2009).



**Figura1.** Diferença entre o ambiente aquático equilibrado e o ambiente eutrofizado pela ação antrópica. Fonte: Doutorado Bruna Borges, Unipampa.

Ambientes aquáticos podem ser classificados como: oligotróficos (que apresentam baixa produtividade biológica), mesotróficos (que apresentam média produtividade

biológica), eutróficos (onde a produção biológica se mostra elevada e acima do natural) e hipereutróficos (quando o material orgânico se encontra muito acima do natural) (MONTEIRO et al., 2004). A aceleração no processo de eutrofização resulta na ausência de oxigênio devido ao crescimento biológico excessivo, ocasionando a morte de animais aquáticos e principalmente aumentando a probabilidade da floração de cianobactérias, nas quais algumas espécies potencialmente tóxicas, são prejudiciais à saúde humana e responsáveis pelo envenenamento e exício de animais. Há registros da ocorrência de cianobactérias tóxicas em reservatórios de abastecimento, lagoas e rios em diversos estados do Brasil, tornando-se um problema de saúde pública (VEIGA, 2008).

## 1.2 Cianobactérias

As cianobactérias também chamadas de cianofíceas (algas azuis) devido a presença do pigmento ficocianina presente no protoplasma da célula, são organismos procariontes pois não apresentam material genético organizado em um núcleo (GRAHAM; WILCOX, 2000). Além disso, são autotróficos, fotossintetizantes e fixadores de nitrogênio (MOLICA; AZEVEDO, 2009). Morfologicamente podem ser unicelulares ou pluricelulares, podendo apresentar células especializadas, os heterocistos (GRAHAM; WILCOX, 2000). Geralmente crescem formando grandes colônias chamadas de florações ou *blooms* (Figura 2) (CALIJURI et al., 2006).



**Figura 2.** Ambiente aquático eutrofizado. O excesso de matéria orgânica contribui para a ocorrência de floração de cianobactérias. Fonte: Helivania Sardinha dos Santos – Biologianet.

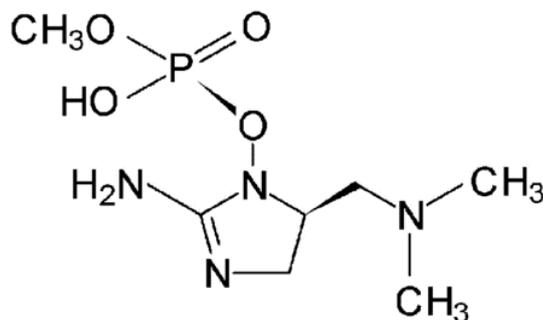
Atualmente, existem cerca de 150 gêneros de cianobactérias descritos, dentre os quais, 40 estão relacionados com a produção de toxinas, conhecidas como cianotoxinas. Os principais gêneros produtores de cianotoxinas encontrados no Brasil são, *Anabaena*,

*Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Planktothrix*, *Radiocystis* e *Cylindrospermopsis* (SANT'ANNA; AZEVEDO, 2000). As cianotoxinas são compostos não essenciais para o metabolismo primário, possuindo estruturas químicas diversas e cuja síntese tem início com o cessar do crescimento celular (SILVONEN; JONES, 1998). Estes compostos são liberados por meio da lise de células senescentes ou por influência do meio externo (CYBIS et al., 2006).

De acordo com seus efeitos biológicos as cianotoxinas são classificadas em hepatotoxinas (Microcistinas, Nodularinas e Cylindrospermopsinas), dermatotoxinas (Debromoaplisiatoxina e Lingbiatoxina) e neurotoxinas (Saxitoxinas, Anatoxina-a e Anatoxina-a(s)) (CHORUS; BARTRAM, 1999). As anatoxinas podem ser produzidas por várias espécies de cianobactérias, seja de forma isoladas ou concomitante à produção de hepatotoxinas. São o primeiro grupo de neurotoxinas alcaloídicas e de baixo peso molecular a serem descritas na literatura, podendo, de acordo com o seu mecanismo de toxicidade, serem classificadas em Anatoxina-a, que possui atividade agonista nicotínica e Anatoxina-a(s), que possui atividade inibitória sobre a enzima Acetilcolinesterase (AChE). Esta última possui a letra "s" correspondente ao sintoma característico de salivação causada em vertebrados, principalmente em doses próximas aos níveis de DL50 (20-40 $\mu$ g/kg<sup>1</sup>) (GORHAM et al., 1964; MATSUNAGA et al., 1989).

### 1.3 Anatoxina-a(s)

Atualmente no Brasil somente a Anatoxina-a(s) (N-hidroxiguanidina fosfato de metila) foi documentada dentre o grupo de anatoxinas (Figura 3). A primeira foi descrita no reservatório de Tapacurá-PE e mais recentemente, no reservatório Faxinal de Caxias do Sul-RS (MOLICA et al., 2005; BECKER et al., 2009).



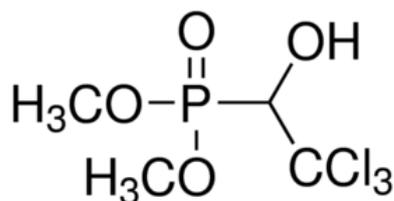
**Figura 3.** Estrutura molecular da Anatoxina-a(s), uma cianotoxina produzida por cianobactérias dos gêneros, *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Lyngbya*. Fonte: Carmichael, W. W. (1991).

A Anatoxina-a(s) é considerada o único organofosforado natural, originada como um metabólito secundário de cianobactérias como a espécie *Sphaerospermopsis torques-reginae* (antes chamada *Anabaena spiroides*) (MAHMOOD; CARMICHAEL, 1987). Possui um mecanismo semelhante ao de inseticidas organofosfatos e carbamatos, tais como: Triclorfon (Tn), Paraoxon, Fisostigmina e Piridostigmina (COOK et al., 1988).

#### 1.4 Triclorfon (Tn)

Entre os anos de 1930 a 1940 o ácido fosfórico foi utilizado no desenvolvimento de compostos sintéticos orgânicos como inseticidas (CASARETT; DOULL, 2008). Estes compostos reagem no sítio esterásico da enzima Acetilcolinesterase (AChE) inibindo-a de maneira irreversível, sendo extremamente tóxicos para os sistemas biológicos, tornando-os inseticidas potentes (SANTOS et al., 2007). Em geral, são muito menos seletivos que os carbamatos, inibindo muitas enzimas que contém uma molécula de serina em um centro ativo, por exemplo: a bunitilcolinesterase e a carboxilesterase (CRAIG; STIZEL, 2004). Por tais características, os organofosforados são amplamente utilizados contra pragas da agricultura e parasitas de animais não-alvo (LOPES et al., 2006). Devido seu amplo uso pela população, esses compostos tornam-se um problema ambiental à longo prazo e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de três milhões de casos de envenenamento humano e mais de duzentas mil mortes por ano são causadas pelo uso de compostos organofosforados (SAADEH et al., 1996).

Um exemplo de organofosforado é o Triclorfon (dimetil 2,2,2, tricloro-1-hidroximetil fosfonato) (Figura 4), um composto solúvel em água e amplamente utilizado como inseticida e acaricida (LOPES et al., 2006). Sua atividade entomotóxica está ligada principalmente à sua capacidade de inibir a enzima AChE em insetos por consequência da intoxicação colinérgica (SANTOS et al., 2011).



**Figura 4.** Estrutura química do organofosforado Triclorfon. Fonte: modificado de Lopes (2006).

Sua atividade entomotóxica está ligada principalmente à sua capacidade de inibir a enzima AChE em insetos por consequência da intoxicação colinérgica (SANTOS et al., 2011). Este composto pertence a lista dos mais tóxicos já utilizados. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de três milhões de casos de envenenamento humano e mais de duzentas mil mortes por ano são causadas pelo uso de compostos organofosforados (SAADEH et al., 1996).

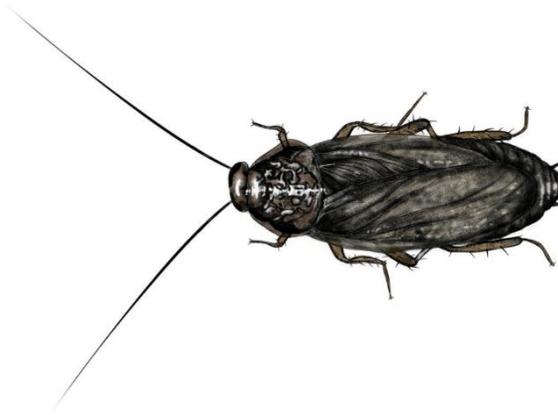
## 1.5 Sistema colinérgico

O sistema colinérgico é um dos mais importantes sistemas de neurotransmissão encontrados em humanos e insetos. Esse sistema tem como principal neurotransmissor a Acetilcolina (ACh) que possui função direta sobre a transmissão de impulsos nervosos (LÓPEZ; PASCUAL-VILLALOBOS, 2010). Em insetos, as sinapses colinérgicas podem ocorrer através de receptores nicotínicos e muscarínicos (BREER; SATTELLE, 1987) encontrados no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) desses animais (OSBOURNE, 1996).

A enzima AChE é responsável pela catalise da reação de hidrólise da ACh em acetato e colina. Esta enzima, quando inibida por organofosforados, gera um acúmulo de ACh nas terminações nervosas e junções neuromusculares. Como consequência disto, há uma exacerbação colinérgica que afeta o sistema nervoso autonômico parassimpático (estimulando os receptores nicotínicos), o sistema nervoso autonômico simpático e o sistema nervoso central (SNC) (ECOBICHON, 2001).

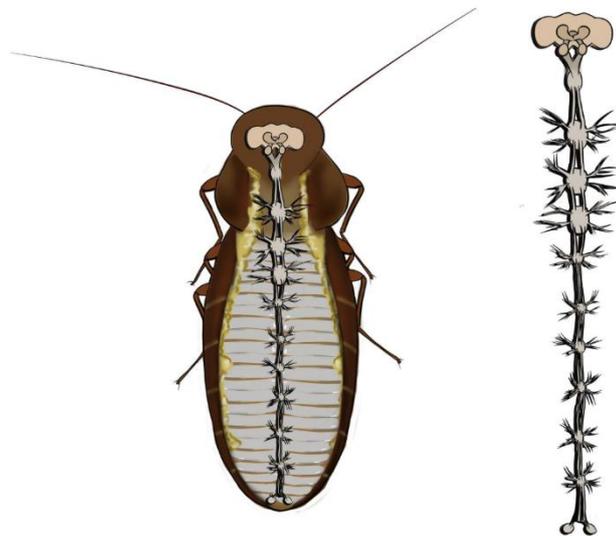
### 1.5.6 *Nauphoeta cinerea* como modelo neurobiológico

Devido aos insetos possuírem muitos neurotransmissores em comum com os vertebrados, estes têm sido cada vez mais utilizados em pesquisas neurobiológicas. Mais de duzentos neurotransmissores encontrados nas baratas estão presentes em mamíferos, incluindo o homem (HUBER, MASLER; RAO, 1990). Baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* possuem coloração marrom-acinzentada e corpo dividido em cabeça, tórax e abdome (Figura 5). Seus órgãos internos são revestidos por tecido conjuntivo, e estão dispostos na hemocele (cavidade corporal), juntamente com a hemolinfa, que é responsável pela dispersão de nutrientes e remoção de metabólitos (GULLAN; CRANSTON, 2014).



**Figura 5.** Barata da espécie *Nauphoeta cinerea*. Fonte: Doutoranda Bruna Borges, Unipampa.

O SNC desses insetos é constituído pelos gânglios: supraesofágico e subesofágico (ligados ao cérebro), protorácico, mesotorácico e metatorácico (conectados ao sistema nervoso periférico (SNP) que enervam as pernas do inseto) e seis gânglios abdominais (responsáveis pelo sistema estomatogástrico) (Figura 6) (RANDALL; BURGGREN; FRENCH, 1998).



**Figura 6.** Esquema do sistema nervoso de barata localizado ventralmente no inseto, composto por gânglios que inervam o SNC e SNP. Fonte: Doutoranda Bruna Borges, Unipampa.

A espécie *Nauphoeta cinerea* tem sido utilizada em estudos de neurotoxicidade com a finalidade de investigar o efeito de diversos compostos como: metilmercúrio (ADEDARA et al., 2015), urease de *Canavalia ensiformes* (CARRAZONI et al., 2016), peçonha de *Bothriurus bonariensis* (SANTOS et al., 2016), entre outros. Alguns dados da literatura

demonstram que esta espécie é um modelo viável para o estudo do sistema colinérgico, indicando que alterações na atividade da AChE e, conseqüentemente, o aumento na concentração de ACh modularam a função locomotora e exploratória desses insetos (ADEDARA et al., 2015). Além disso, estudos anteriores com a espécie também indicam uma relação do sistema colinérgico e de anticolinesterásicos com modulações do sistema cardiovascular e a liberação de outros neurotransmissores, como dopamina e octopamina (STURMER et al., 2014). Os resultados obtidos com essas pesquisas demonstram a importância da espécie *N. cinerea* como modelo biológico, seja para compreensão do mecanismo de ação de compostos sobre o sistema nervoso de invertebrados, quanto para a elucidação do envolvimento de diversas vias de sinalização no comportamento e fisiologia desses animais.

## **2 JUSTIFICATIVA**

O uso de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* como modelo biológico pode contribuir como um importante marcador ambiental para obtenção de dados sobre os mecanismos de ação da Anatoxina-a(s), cujo efeitos ainda são pouco conhecidos pela carência de estudos, especialmente em sistemas biológicos. Para isso, a comparação com doses subletais do organofosforado Triclorfon, já reconhecido por sua ação entomotóxica, são essenciais para validar este inseto como modelo biológico.

## **3 OBJETIVO**

### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o mecanismo de ação do extrato de *Sphaerospermopsis torques-reginae* (antes chamada *Anabaena spiroides*) contendo Anatoxina-a(s) (ECATAS) sobre o sistema nervoso central e periférico de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*, comparando com os efeitos induzidos pelo organofosforado Triclorfon (Tn).

### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar se o ECATAS e o organofosforado Tn exercem atividade direta sobre a junção neuromuscular de insetos por meio da preparação eletromiográfica *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico de *N. cinerea*;

- Verificar se o mecanismo de atividade do ECATAS e do organofosforado Tn envolve a modulação da frequência de potenciais de ação neurais usando-se a preparação eletrofisiológica *ex situ* para aquisição de potenciais de ação compostos espontâneos neurais (*SPIKER*) da perna de *N. cinerea*;
- Avaliar se o ECATAS e o organofosforado Tn exercem atividade cardiotoxicidade em insetos usando-se a preparação *in situ* coração semi-isolado de *Nauphoeta cinerea* para a medida da frequência cardíaca de barata;
- Avaliar se o ECATAS e o organofosforado Tn em doses subletais alteram o comportamento exploratório de *Nauphoeta cinerea* por meio de ensaios de locomoção em campo aberto;
- Avaliar se o ECATAS e o organofosforado Tn exercem atividade sobre o sistema dopaminérgico e octopaminérgico de *Nauphoeta cinerea* por meio de experimentos comportamentais para a medida da atividade de *grooming*;
- Avaliar se o ECATAS e organofosforado Tn sobre parâmetros bioquímicos relacionados à quantificação da atividade da enzima acetilcolinesterase do inseto.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Extrato contendo Anatoxina-a(s) (ECATAS)

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens (ITEP24, ITPE25 e ITE26) de cianobactérias, classificadas como *Sphaerospermopsis torques-reginae* (antes *Anabaena spiroides*), isoladas do reservatório Tapacurá-PE, Brasil (MOLICA et al., 2005) e cedidas pelo professor Dr. Ernani Pinto, do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo USP, São Paulo, Brasil. O isolamento e identificação da Anatoxina-a(s) foi realizado através de ensaios com LC-MS/MS (DÖRR et al., 2010; MOLICA et al., 2005) e a atividade biológica confirmada por meio de bioensaios *in vitro* para a inibição da AChE usando-se sangue de camundongos da linhagem *Swiss*.

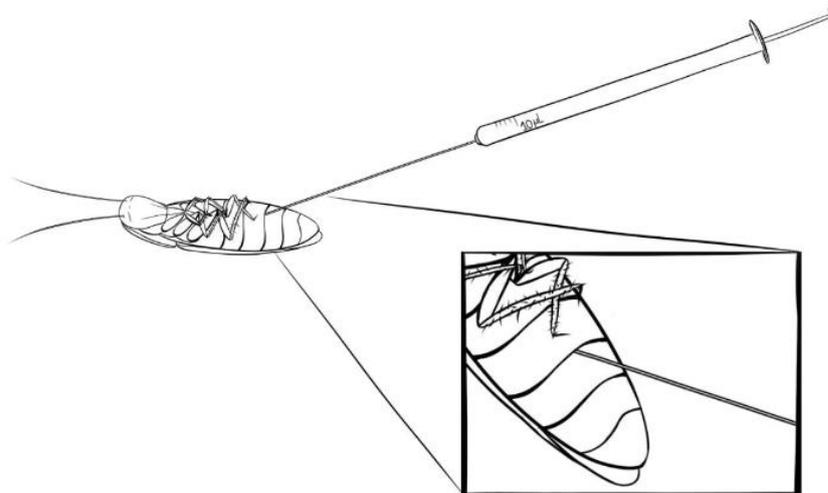
A utilização do extrato contendo Anatoxina-a(s) foi realizada a partir de diluições do extrato bruto de cianobactérias contendo a cianotoxina dissolvido em solução salina de insetos (SSI) resultando nas seguintes concentrações: 5; 25 e 50 µg/g de animal.

## 4.2 Reagentes

O reagente Tn, juntamente com os outros produtos químicos e reagentes utilizados são de elevada pureza e foram obtidos da empresa Sigma Aldrich. A preparação do reagente Tn foi realizada a partir de diluições do mesmo em solução salina de insetos (SSI) resultando nas seguintes concentrações: 0,3; 5; 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal.

## 4.3 SSI

A SSI é uma solução tamponada de carbonato e foi preparada conforme a seguinte composição: NaCl-214mM; KCl-3,1mM; CaCl<sub>2</sub>-9mM; Sacarose-50mM; tampão HEPES, pH 7,2 e 5,0 (STÜRMER et al., 2014). Exceto quando indicado em contrário, todos os tratamentos foram injetados na hemocele (3ª porção) abdominal dos insetos (Figura 7), em volumes de 10 $\mu\text{l}$ , utilizando seringa Hamilton.

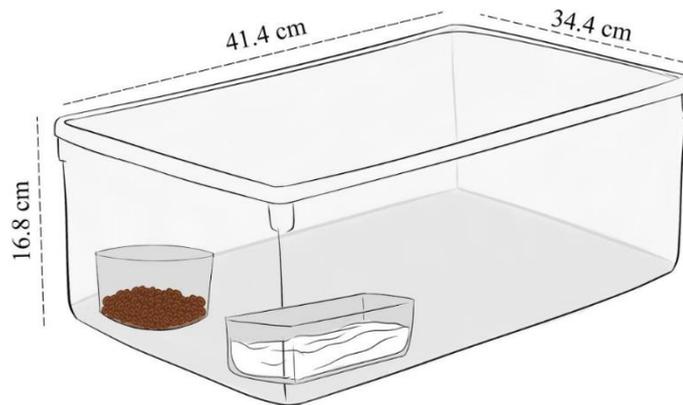


**Figura 7.** Imagem ilustrativa da injeção na hemocele de *Nauphoeta cinerea* utilizando seringa Hamilton. Fonte: Doutoranda Bruna Borges, Unipampa.

## 4.4 Animais modelo

Todos os experimentos foram realizados em baratas adultas da espécie *Nauphoeta cinerea* de ambos os sexos (3-4 meses após a muda adulta). Os animais foram criados e mantidos em condições de laboratório, com água e alimento (Composição básica da ração: farinha de carne e osso, farinha de víscera, lipídios de origem animal, milho moído, farelo de trigo, cloreto de sódio, aromatizante, antioxidante, ácido fólico, ferro, sulfato de cobre, sulfato de zinco, iodo, selênio, cloreto de colina, potássio, magnésio, niacina, ácido pantotênico,

vitamina E, vitamina B6, vitamina A, vitamina D3, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2 e vitamina B12) *ad libitum* (Figura 8), temperatura e iluminação controladas ( $\pm 24^{\circ}\text{C}$  e ciclos claro/escuro de 12 horas). Todos os protocolos utilizados nesse trabalho estão de acordo com as normas vigentes junto a Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA UNIPAMPA sob número de protocolo 043/2015 com vigência de 01/2016 a 01/2019.



**Figura 8.** Imagem representativa da caixa de poliestireno utilizada para a manutenção de baratas *N. cinerea*, mantidas em condições de laboratório. Fonte: Doutoranda Bruna Borges, Unipampa.

## 4.5 Experimentos comportamentais

### 4.5.1 *Locomotion*: comportamento locomotor e exploratório

A avaliação do comportamento exploratório dos insetos foi realizada a partir de ensaios descritos por Leal et al. (2018). Baratas foram selecionadas aleatoriamente e colocadas em uma caixa de poliestireno branco (15cm de largura x 15cm de comprimento x 7cm de altura) (Figura 9), sendo que as mesmas não sofreram contato prévio com a superfície da caixa.



**Figura 9.** Representação do protocolo *Locomotion* com baratas *N. cinerea*. Fonte: Bruna Borges, Unipampa.

O comportamento foi registrado durante 10 minutos utilizando uma câmera Logitech® HD WEBCAM, acoplada sobre o aparato experimental e conectada a um computador Desktop (Dell, São Paulo, Brasil). Os parâmetros comportamentais foram automaticamente calculados a uma taxa de 30 frames/s usando o software de monitoramento de vídeo IDtracker (Stoelting, CO, USA). A transferência dos animais para o ambiente de análise se deu de maneira a proporcionar o mínimo de estresse possível. A atividade locomotora do grupo controle (salina) e do grupo tratado (ECATAS: 5, 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal e Tn 0,3  $\mu\text{g/g}$  de animal) foi avaliada usando-se os seguintes parâmetros: distância total percorrida, episódios de imobilidade e porcentagem do tempo de parada. A análise computacional dos dados foi realizada usando o software Matlab®. Para garantir que as condições experimentais fossem padronizadas, todas os ensaios foram realizados durante o período diurno (entre 10:00h e 16:00h). Para este protocolo foram utilizados 30 insetos por tratamento.

#### 4.5.2 *Grooming*: comportamento de limpeza

Para ensaios comportamentais de *grooming*, os animais foram colocados em uma arena de campo aberto “*open-field*” (30cm x 30cm) com uma câmera de vídeo (Panasonic acoplada a uma objetiva de 50mm Karl-Zeiz) montada como descrito por Sturmer et al. (2014). A atividade de *grooming* (Figura 10) foi monitorada durante 30 minutos e os registros de vídeo foram posteriormente analisados usando o software HD Writer AE 2.6T (Panasonic). As baratas foram avaliadas imediatamente após a administração dos tratamentos (ECATAS: 5, 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal e Tn 0,3  $\mu\text{g/g}$  de animal) em tempo contínuo de “*grooming*” (em segundos) ao longo do período total do experimento.



**Figura 10.** Atividade de *grooming* de *N. cinerea*: (A) perna; (B) antena. Fonte: Doutoranda Bruna Borges, Unipampa.

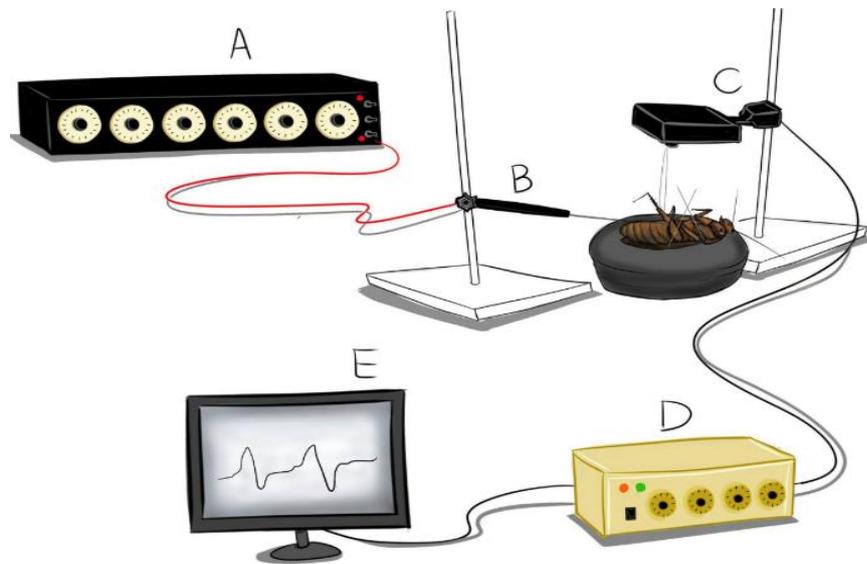
Os animais utilizados nesses ensaios não haviam tido contato prévio com ambiente experimental. Para garantir que as condições experimentais fossem padronizadas, todos os ensaios foram realizados durante o período diurno (entre 10:00h e 16:00h). Para este protocolo foram utilizados 30 insetos por tratamento.

## **4.6 Experimentos biológicos em preparações de *Nauphoeta cinerea***

### **4.6.1 Registros eletromiográficos**

#### **4.6.1.1 Preparação *in vivo* nervo-músculo coxal-abdutor metatorácico (PNMCAM) de baratas**

Para verificar a susceptibilidade do sistema nervoso periférico de insetos aos compostos tóxicos organofosforados foi empregada a preparação nervo-músculo coxal abdutor metatorácico de *Nauphoeta cinerea*, como descrito por Martinelli et al. (2014) (Figura 11). Os animais foram anestesiados por arrefecimento à 5°C durante 8 minutos e posteriormente afixados com agulhas entomológicas em uma placa de dissecação em decúbito dorsal. Uma das pernas pertencentes ao terceiro par de pernas, correspondente ao grupamento metatorácico, foi amarrada em sua articulação medial (fêmur) com uma linha de sutura e conectada a um transdutor isométrico de força de 1g (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). O Nervo 5, que inclui o axônio motor do músculo coxal, foi exposto e um eletrodo bipolar de platina inserido, permitindo a estimulação elétrica. O nervo foi estimulado a uma taxa de 0,5Hz/5ms e os registros foram realizados durante 120 minutos de tratamento (ECATAS: 5, 25 e 50 µg/g de animal e Tn 0,3 µg/g de animal), tendo um período prévio de 10 minutos para registro do controle (salina). Os registros isométricos de contração muscular foram adquiridos por meio de um amplificador de sinais modelo AECAD 04 (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil), sendo digitalizados e armazenados pelo software AQCAD (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). Os dados foram posteriormente analisados usando o software ANCAD (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brasil). Para este protocolo foram utilizados 9 insetos para cada tratamento.



**Figura 11.** Representação esquemática do protocolo PNMCM utilizando baratas. Fonte: Doutorado Bruna Borges, Unipampa.

## 4.6.2 Registros eletrofisiológicos

### 4.6.2.1 Preparação *in vitro* dos registros dos potenciais de ação compostos neurais espontâneos (PACNE) da perna de *N. cinerea*

Para os registros do PACNE, preparações foram realizadas conforme descrito por Leal et al. (2018). A perna do inseto foi cuidadosamente retirada e fixada sob uma placa de cortiça do aparelho SpikerBox (Backyard Brains, EUA) com um par de eletrodos. Um dos eletrodos foi conectado ao conector de terra do amplificador e o outro ao seu conector indiferente (-). O terceiro eletrodo foi colocado no fêmur como eletrodo de registro ativo (+). Os sinais foram gravados a uma taxa de amostragem de 1,0kHz e digitalizados pelo Neuron SpikerBox. Os potenciais de ação foram visualizados, registrados e recuperados para posterior análise no software BYB Spike Recorder (Backyard Brains, EUA) e a análise foi feita pelo software WinWCP (John Dempster, Universidade de Strathclyde, Scotland). Neste protocolo, os animais foram injetados com as concentrações (ECATAS: 5, 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal e Tn 0,3  $\mu\text{g/g}$  de animal) e após 10 minutos de ação dos tratamentos foi retirada a perna do animal, dando sequência ao experimento. O fêmur, a tíbia e o tarso permaneceram intactos. Usando as condições descritas, a preparação pode ser usada por 1 hora sem mudanças nas características dos potenciais. Para este protocolo foram utilizados 9 insetos para cada tratamento.

### **4.6.3 Preparação de coração semi-isolado de *Nauphoeta cinerea***

O ensaio para a medida da frequência cardíaca em preparação de coração semi-isolado de barata foi montado como descrito por Rodríguez et al. (2012). Insetos adultos foram anestesiados por arrefecimento à 5°C por 8 minutos e posteriormente afixados em decúbito dorsal em uma placa de dissecação. Com auxílio de tesoura e pinça a cutícula ventral foi removida e as vísceras foram afastadas cuidadosamente para que as câmaras do coração fossem expostas. O sistema foi “lavado” com SSI e um registro inicial dos batimentos foi realizado durante 5 minutos, com a inserção de 200µl de SSI sobre o sistema cardíaco dos insetos. Em seguida, os tratamentos (ECATAS: 5, 25 e 50 µg/g de animal e Tn 0,3 µg/g de animal) foram adicionados sobre o sistema cardíaco, juntamente com o volume final de SSI (200 µl). A média dos batimentos dos 5 primeiros minutos foi tomada como referência. A frequência dos batimentos cardíacos foi monitorada durante 30 minutos sob um microscópio estereoscópico. No grupo controle, apenas SSI foi utilizada para banhar o coração. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente (21-24°C). Para este protocolo foram utilizados 9 insetos para cada tratamento.

## **4.7 Experimentos bioquímicos**

### **4.7.1 Ensaio para a medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)**

A medida *in vitro* da atividade da AChE foi realizada de acordo como descrito por Ellman et al. (1961), modificado por Sturmer et al. (2014). A quantidade de proteína total foi medida de acordo com Bradford (1976). Para realizar os protocolos, os animais foram tratados com ECATAS: 5, 25 e 50 µg/g de animal e Tn 0,3 µg/g de animal e após 6 horas da realização do tratamento os animais foram anestesiados por arrefecimento à 5°C e seus cérebros recolhidos imediatamente após a remoção da cutícula. O material coletado foi adicionado à 1500µl de tampão fosfato (Kpi: pH 7.0), centrifugado (500 rpm/ 5 minutos/ 4°C) e um volume de 1100 µl de sobrenadante foi recolhido. Deste sobrenadante, um volume de 50µl foi adicionado em 50 µl de DTNB 50mM, 500 µl de tampão fosfato (Kpi: pH 8.0) e 2,5 µl acetiltiocolina. A reação foi medida em espectrofotômetro UV-Visível ( $\lambda= 412\text{nm}$ , durante 1 minuto) (modelo de evolução 60S, Thermoscientific, New Hampshire, EUA). Os resultados foram analisados pelo software VISION Lite (Thermoscientific). Para este protocolo foram utilizados 6 insetos para cada tratamento.

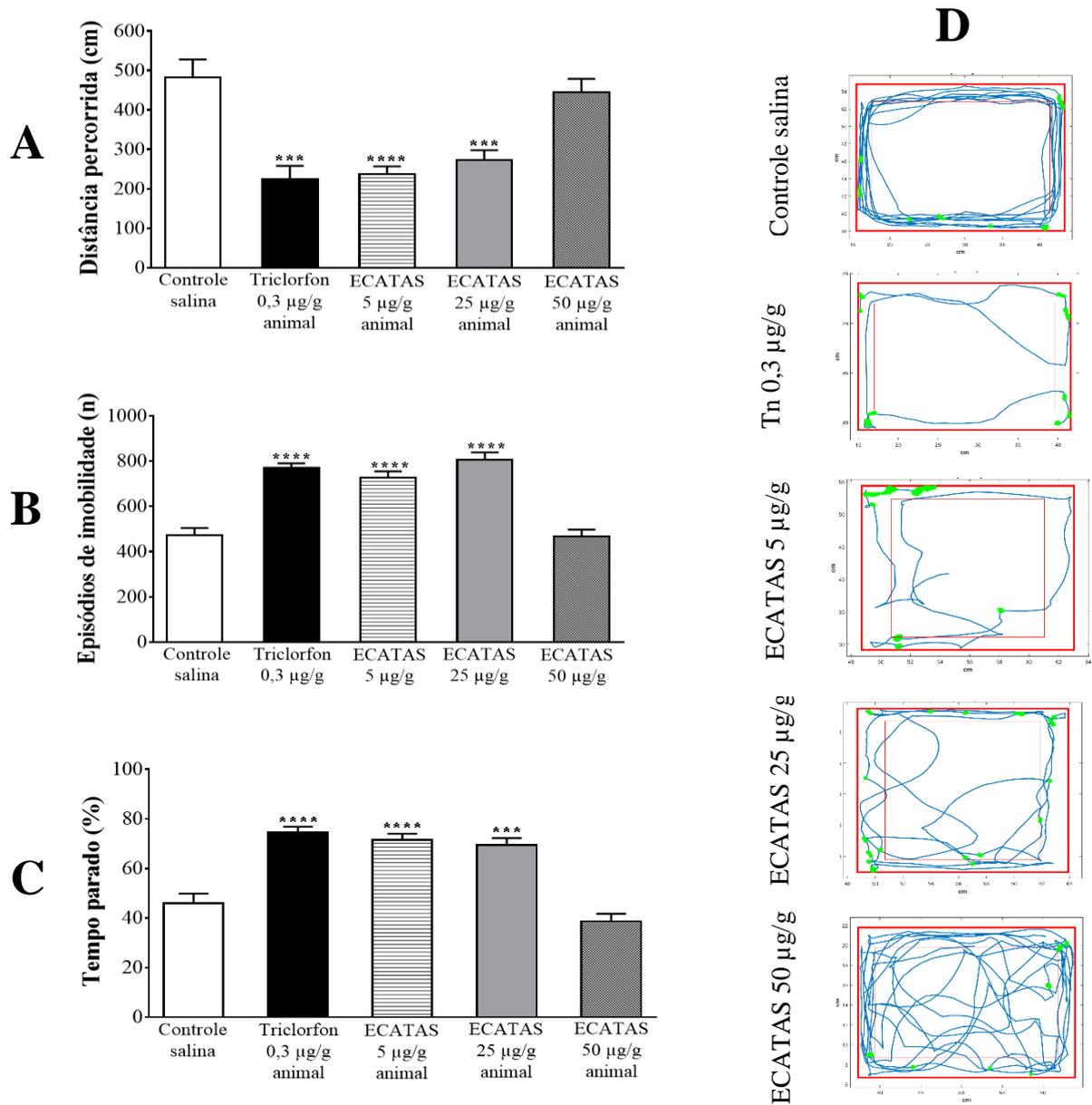
#### 4.8 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média. A análise estatística foi realizada através da análise de variância (One / Two) way- ANOVA seguida pelo teste de *Bonferroni* ou *Dunnett* como *post hoc*, quando necessário. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 7.0 (Software Inc., San Diego, CA), e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 5 RESULTADOS

#### 5.1 Alteração no comportamento locomotor e exploratório de *N. cinerea*

A administração do ECATAS (5, 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal) em *N. cinerea* induziu alterações significativas no comportamento locomotor e exploratório dos insetos (Figura 12). Os valores de controle para os parâmetros de distância percorrida, episódios de imobilidade e porcentagem do tempo parado (%) foram: 481,6cm, 471,6s e 45,9%, respectivamente. A administração de 0,3  $\mu\text{g/g}$  de animal de Tn induziu a diminuição máxima na distância percorrida, efeito também observado com a administração do ECATAS (5>25>50  $\mu\text{g/g}$  de animal) de forma dose-dependente ( $n = 30$ ,  $p < 0,05$ ). Também observou-se aumento no número de episódios de imobilidade, cujo o aumento máximo foi obtido com a administração de 25  $\mu\text{g/g}$  animal do ECATAS, equivalente à extensão obtida com Tn (0,3  $\mu\text{g/g}$  animal), enquanto que com 50  $\mu\text{g/g}$  animal do ECATAS não houve alteração ( $n = 30$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente para Tn e ECATAS 25  $\mu\text{g/g}$  e 5  $\mu\text{g/g}$  animal). Da mesma forma, o aumento máximo observado no parâmetro tempo parado (%) foi obtido com 5 e 25  $\mu\text{g/g}$  animal do ECATAS, com a mesma extensão da administração de 0,3  $\mu\text{g/g}$  animal de Tn, enquanto que com a concentração de 50  $\mu\text{g/g}$  animal não houve alteração ( $n = 30$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente para Tn e ECATAS 5 e 25  $\mu\text{g/g}$ ). Sendo assim, foi possível observar que alterações no comportamento locomotor de baratas foram obtidas com as menores doses do ECATAS e que seus efeitos são proporcionais ao induzido pelo Tn.

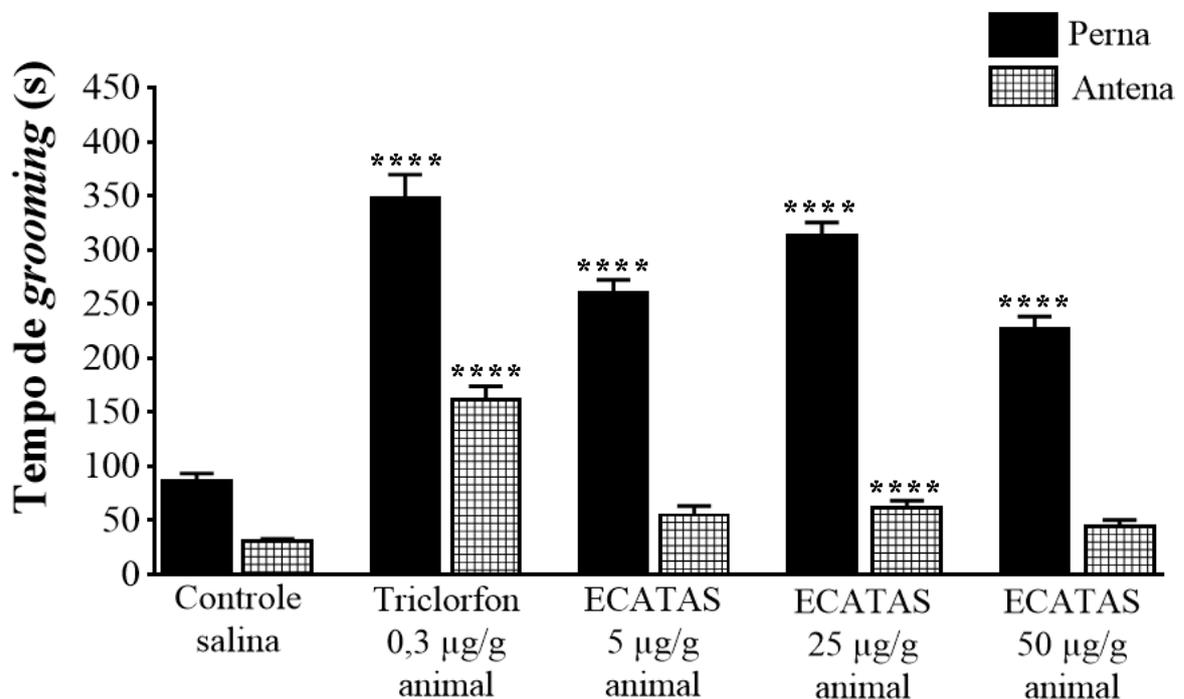


**Figura 12.** Comportamento locomotor de *N. cinerea* em ensaios *in vivo* com tratamento ECATAS e Tn. Os parâmetros observados foram: (A) distância percorrida, (B) Tempo parado (%), (C) episódios de imobilidade e (D) trajetória. A figura demonstra que ambos tratamentos induziram alterações significativas no comportamento dos insetos. O experimento foi registrado durante 10 minutos e os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM através de análise One-way ANOVA, seguida pelo teste *Dunnnett*, \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ;  $n = 30$ , respectivamente.

## 5.2 Efeito induzido pela administração do ECATAS na atividade de *grooming* de *N. cinerea*

O efeito da administração do ECATAS (5, 25 e 50 µg/g de animal) na atividade de *grooming* de *N. cinerea* foi caracterizada por uma alteração significativa nos movimentos de limpeza das pernas e alterações no movimento de limpeza das antenas. O grupo controle

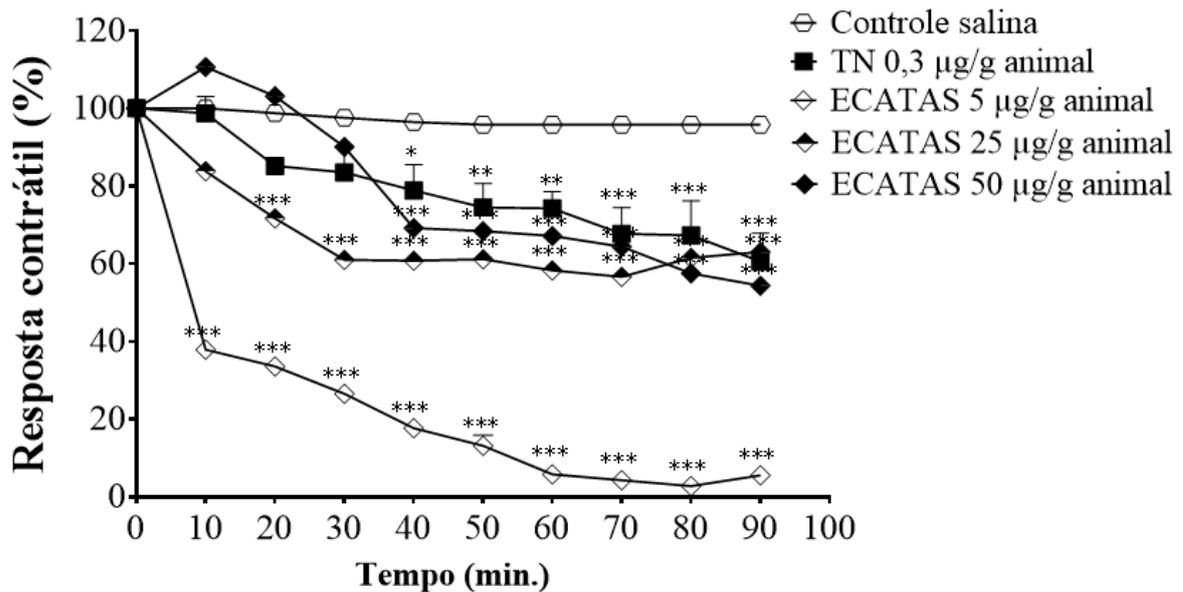
apresentou tempo médio de 86,16s/30min na limpeza das pernas, e 30,06s/30min para antenas (n= 30). Um aumento significativo dose-independente no tempo de limpeza de pernas foi observada com a administração do ECATAS (5, 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal). Quando Tn (0,3  $\mu\text{g/g}$  de animal) foi administrado, houve aumento máximo no tempo gasto na limpeza das pernas para 349,89s/30 min, e o tempo gasto em antenas teve aumento para 161s/30 min (n = 30;  $p < 0,05$  em comparação com o controle. A menor concentração do ECATAS (5  $\mu\text{g/g}$  de animal) induziu um aumento no tempo de limpeza de pernas (174,44s/30 min). Com a concentração intermediária (ECATAS 25  $\mu\text{g/g}$  de animal) observou um aumento maior no tempo gasto na limpeza de pernas e antenas em comparação com a menor dose (312,7s/30 min e 72,04s/30 min) respectivamente. A maior concentração (50  $\mu\text{g/g}$  de animal) avaliada, induziu aumento significativo no tempo gasto para limpeza de pernas (234,24s/30 min), porém inferior as demais concentrações utilizadas (Figura 13). Portanto, os resultados demonstram que o ECATAS exerce um efeito significativo na atividade de *grooming* de baratas, sugerindo um envolvimento com a modulação octopaminérgica responsável pelo *grooming* de perna e dopaminérgica responsável pelo *grooming* de antenas em insetos.



**Figura 13.** Comportamento de *grooming* induzido por ECATAS e Tn. Os efeitos do tratamento com ECATAS e Tn induziram aumento significativo no comportamento de limpeza de *N. cinerea*. O experimento foi registrado durante 30 minutos e os resultados foram expressos como Média  $\pm$  EPM através da análise One-way ANOVA, seguida pelo teste *Dunnnett*, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; n = 30, respectivamente.

### 5.3 Bloqueio neuromuscular induzido pelo ECATAS na PNMCM

O ECATAS (5, 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal) foi avaliado na PNMCM para avaliação da medida na resposta contrátil de insetos. A administração de salina não interferiu na resposta neuromuscular dos insetos durante os 90 minutos de registro ( $n = 9$ ). Porém, as diferentes concentrações do ECATAS induziram alterações na resposta contrátil de *N. cinerea*, dose-independente, onde foi possível observar que a menor (5  $\mu\text{g/g}$  de animal) provocou bloqueio neuromuscular acentuado (97,23% após 80 min de registro) ( $n = 6, p < 0,05$ ). Enquanto que, a concentração intermediária do ECATAS (25  $\mu\text{g/g}$  de animal) induziu bloqueio neuromuscular semelhante ao observado com a administração de Tn (0,3  $\mu\text{g/g}$  de animal) (32,7% e 35,2% respectivamente) (Figura 14). Os resultados sugerem um efeito prejudicial na contração muscular de *N. cinerea* causada pela menor concentração do ECATAS, que se assemelha ao bloqueio neuromuscular causado pelo Tn, um composto inibidor da enzima AChE.

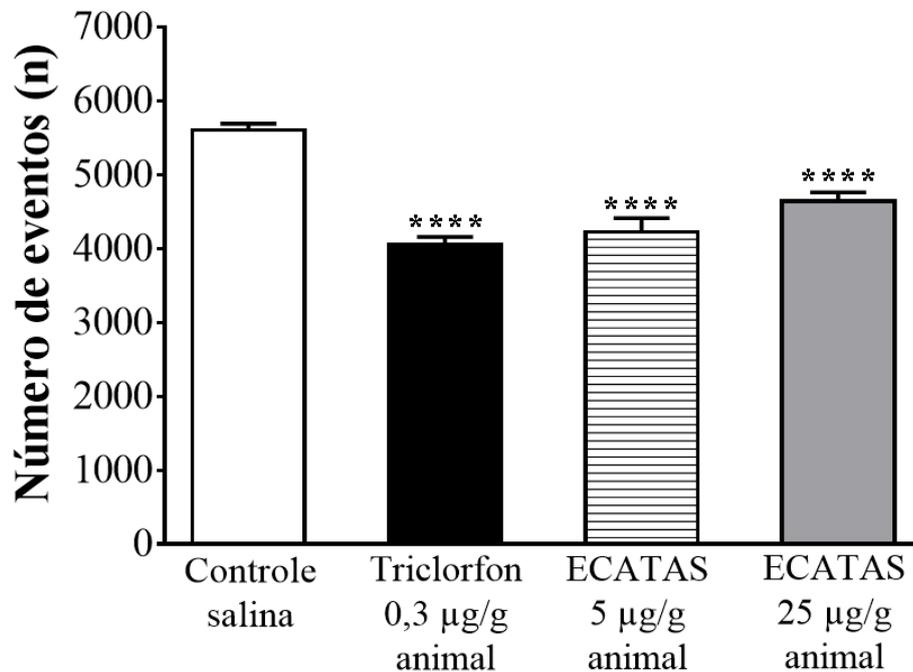


**Figura 14.** Efeitos do tratamento com ECATAS e Tn na junção neuromuscular da perna de barata. Os pontos no gráfico representam a Média  $\pm$  EPM da percentagem da resposta contrátil em relação ao controle. As análises foram realizadas por Two-way ANOVA, seguido pelo teste *Bonferroni*; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $n = 9$  respectivamente.

### 5.4 Efeito do ECATAS e Tn sobre potenciais de ação compostos neurais espontâneos (PACNE)

Nos registros de PACNE o número de eventos de potenciais de ação compostos da perna de *N. cinerea* para o grupo controle (salina) foi de  $5608 \pm 85$ . Os grupos tratados com Tn (0,3  $\mu\text{g/g}$  de animal) e ECATAS (5  $\mu\text{g/g}$  de animal) foram caracterizados por uma diminuição significativa de mesma paridade no número de eventos para  $4054 \pm 103$  e  $4228 \pm$

180, respectivamente. Uma diminuição também significativa no número de eventos de PACNE foi observada com a administração do ECATAS (25  $\mu\text{g/g}$  de animal) para  $4641 \pm 122$  (Figura 15).

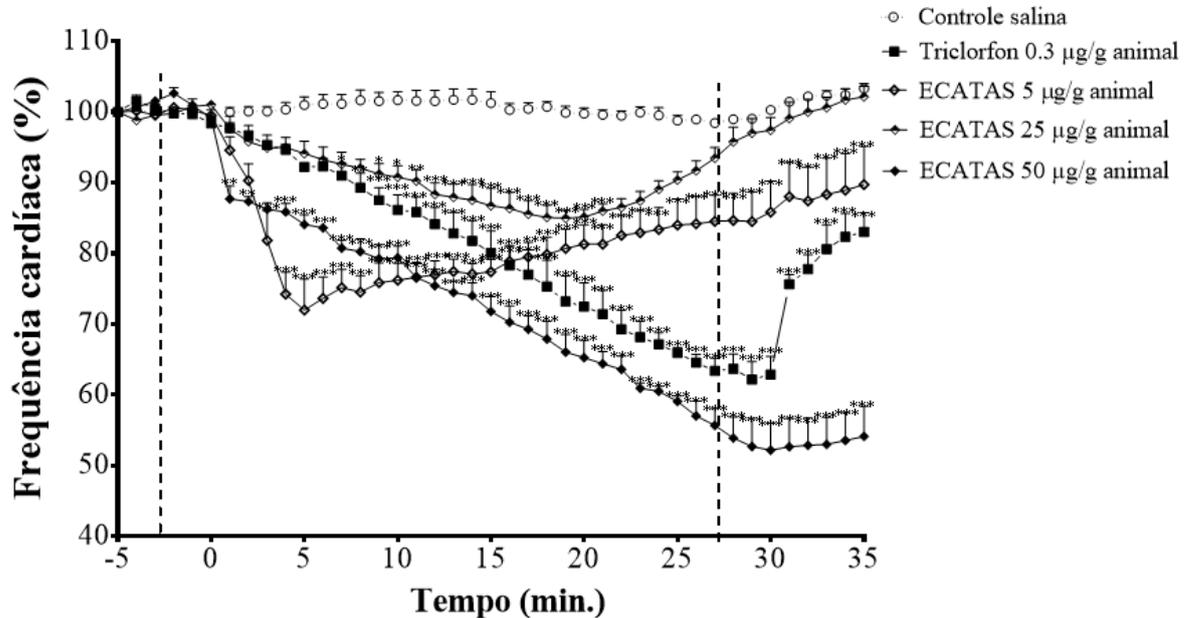


**Figura 15.** Registro do número de eventos dos potenciais de ação compostos da perna de *N. cinerea*. Os tratamentos com ECATAS e Tn demonstraram diminuição significativa no número de *spikes* da perna de barata em 1 hora de registro. As análises foram realizadas por One-way ANOVA, seguida pelo teste *Dunnnett*, \*\*\*\* $p < 0,0001$ ;  $n = 10$ , respectivamente.

### 5.5 Efeito cronotrópico na frequência cardíaca de *N. cinerea* causado pela administração do ECATAS

A administração das diferentes concentrações do ECATAS (5, 25 e 50  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  de salina) induziram um efeito negativo dose-dependente na frequência cardíaca de baratas. O registro do tempo correspondente para o grupo controle foi de  $100 \pm 3$  batimentos cardíacos por minuto durante 30 minutos de experimento. A adição de Tn (0,3  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  de salina) à preparação induziu uma diminuição significativa na resposta cronotrópica ( $37 \pm 1$  batimentos/min em relação ao controle ( $p < 0,05$ ;  $n = 9$ ) durante os 30 minutos de registro. Com a adição de 5  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  de salina, observou-se uma diminuição nos batimentos cardíacos para  $14 \pm 1$  ( $n = 9$ ;  $p < 0,05$ ). Enquanto que, a adição da maior concentração do ECATAS (50  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  de salina) houve um efeito cronotrópico negativo significativo ( $47 \pm 8$  batimentos/min) durante os 30 minutos de registro, em comparação com os controles de

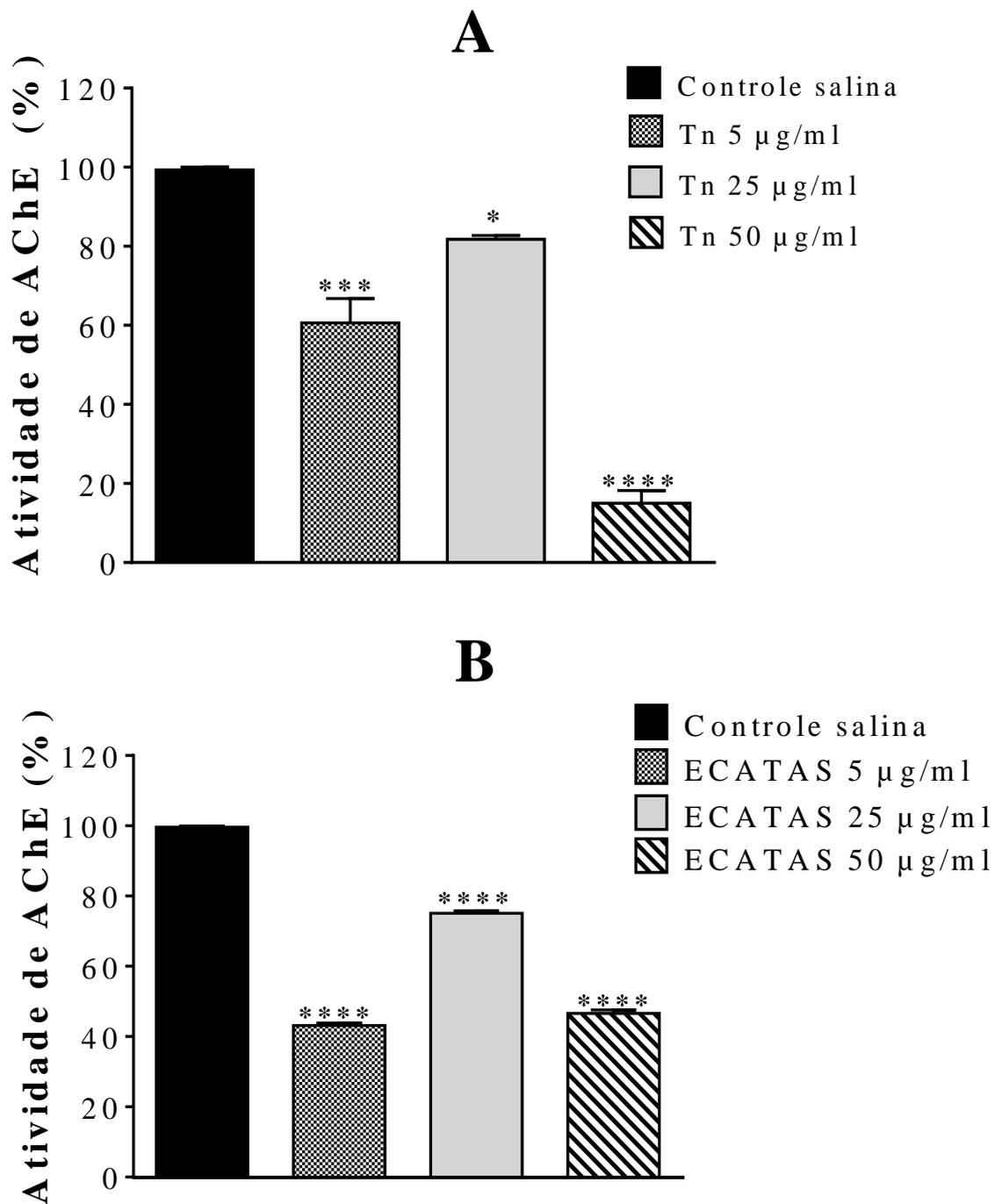
solução salina ( $n = 9$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 16). Em todos os tratamentos, a lavagem com salina de insetos reverteu parcialmente os efeitos observados.



**Figura 16.** Efeito cronotrópico negativo na frequência cardíaca de *N. cinerea*. Os tratamentos com ECATAS e Tn induziram alterações significativas no número de batimentos cardíacos. A análise estatística foi realizada por Two-way ANOVA, seguida pelo teste *Bonferroni*, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 9$  respectivamente.

### 5.6 Análise da atividade da AChE em homogeneizado de cérebro de baratas tratados com ECATAS

A administração do ECATAS e Tn demonstraram um efeito inibitório sobre a AChE dose-independente. Para o grupo controle a atividade enzimática foi de  $100 \pm 2\%$ , a incubação com ECATAS (5, 25 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal) inibiu significativamente a atividade da AChE para  $43,12 \pm 2\%$ ,  $75,11 \pm 2\%$  e  $46,61 \pm 7\%$ , respectivamente ( $p < 0,5$ ;  $n = 6$ ). A fim de avaliar os efeitos observados com ECATAS, foram realizadas incubações utilizando Tn (5 e 50  $\mu\text{g/g}$  de animal), que resultaram em uma inibição significativa da atividade da enzima para  $60,59 \pm 4\%$  e  $15,01 \pm 9\%$ , respectivamente (Figura 17). Quando 25  $\mu\text{g/g}$  de animal de Tn foi incubada, houve uma inibição da atividade para  $15,01 \pm 8\%$ . Os resultados demonstraram que o ECATAS é um potente inibidor da atividade da AChE.



**Figura 17.** Efeitos induzidos na atividade da AChE em homogeneizado do cérebro de *N. cinerea*. Em (A) tratamento com Tn e (B) tratamento com ECATAS, ambos tratamentos induziram diminuição significativa na atividade da enzima. Análises estatísticas foram realizadas através One-way ANOVA, seguida pelo teste *Dunnnett*, \* $p < 0,5$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ;  $n = 6$ , respectivamente.

## 6 DISCUSSÃO

Com este trabalho obteve-se novas informações sobre os mecanismos e efeitos relacionados com a toxicidade da Anatoxina-a(s), e sua interação biológica com insetos em comparação com o organofosforado Triclorfon. De modo geral, todas as concentrações

induziram alterações no padrão comportamental, eletrofisiológico e bioquímico dos animais. De acordo com a literatura, a enzima AChE desempenha um papel fundamental no sistema nervoso de baratas da espécie *N. cinerea*, sendo que a inibição da atividade dessa enzima pode acarretar em diversas mudanças comportamentais nos insetos (STURMER et al., 2014). A indução do efeito cronotrópico negativo e as alterações comportamentais observadas após administração do ECATAS indicam uma relação com a inibição da atividade da enzima AChE desses animais (STURMER et al., 2014). O neurotransmissor ACh pode ser encontrado em receptores colinérgicos no sistema cardíaco das baratas, assim como nos nervos presentes no coração (COLLINS; MILLER, 1977). Na literatura existem informações controversas sobre o efeito da ACh sobre a frequência cardíaca de baratas. Alguns estudos demonstram que esse neurotransmissor aumenta a frequência cardíaca (COLLINS; MILLER, 1977), porém, outros dados sugerem que esse neurotransmissor pode induzir uma diminuição dos batimentos cardíacos (RICHARDS, 1966; SCHAEFER; MILES, 1970).

Considerando que o ECATAS demonstrou uma modulação sobre o sistema colinérgico, é possível que a principal propriedade desse extrato esteja relacionada a: (a): interação do ECATAS com AChE, que acarreta na inibição dessa enzima; (b) interação do ECATAS com receptores de ACh (sugerindo uma atividade agonista); e (c) interação do ECATAS com células nervosas próximas aos receptores de ACh que levaria a ativação desses receptores.

Deste modo, a inibição da AChE pode desencadear diversas alterações neurofisiológicas e comportamentais nesses insetos (ALONZO; CORRÊA, 2008). Baseando-se nesse fato, a modulação do ECATAS sobre o sistema colinérgico possivelmente está relacionada aos dados observados durante este trabalho. Tanto ECATAS quanto Triclorfon induziram alterações no comportamento locomotor e exploratório de baratas, caracterizadas pela diminuição significativa no parâmetro distância percorrida, e consequentemente o aumento significativo nos parâmetros episódios de imobilidade e tempo parado (%). A maior estratégia defensiva utilizada por baratas para evitar e escapar de seus predadores é a locomoção (ADEDARA et al., 2015). Assim, a modulação no comportamento locomotor e exploratório de *N. cinerea* induzida pelo tratamento com ECATAS e Tn podem aumentar a suscetibilidade desses insetos aos predadores (SPRUIJT et al., 1992), indicando que o extrato possui um potencial biotecnológico como bioinseticida que pode ser estudado.

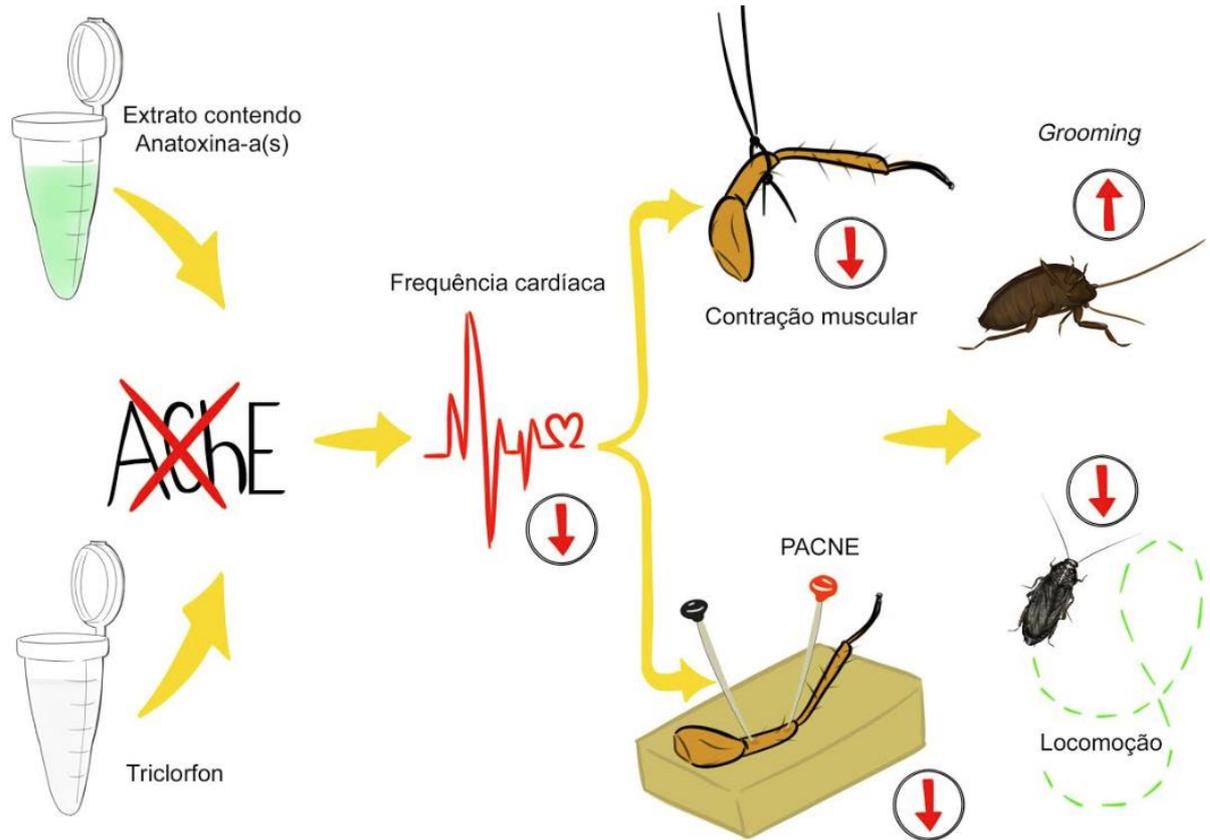
Considerando, ainda, o perfil comportamental dos insetos, o *grooming* é o movimento de limpeza do corpo desses animais sendo relacionado à diversas funções, como: asseio corporal, corte, sinalização social, atividade de deslocamento e de excitação corporal

(SPRUIJT et al., 1992). Sabe-se que os sistemas octopaminérgico e dopaminérgico estão envolvidos no comportamento de *grooming* em insetos (LIBERSAT; PHUEGER, 2004). Doses subletais do organofosforado Tn induziram um aumento no tempo de limpeza de antenas em *N. cinerea*, caracterizando uma modulação da resposta dopaminérgica (STURMER et al., 2014). Tendo em vista que esse comportamento está relacionado à diversos fatores fundamentais para a vida e permanência dos insetos no ambiente, as alterações comportamentais induzidas pelo ECATAS e Tn nesses animais podem influenciar nos processos essenciais para a manutenção da espécie, como: fecundidade e longevidade (FRANÇA et al., 2017).

Durante os ensaios eletrofisiológicos, observou-se que a administração do ECATAS e Tn ocasionou uma diminuição nas contrações musculares de *N. cinerea* e posteriormente, um bloqueio neuromuscular. Na literatura aceita-se que no sistema nervoso de invertebrados, o Glutamato (GLU) é o principal neurotransmissor excitatório, enquanto o ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório (OSBOURNE, 1996). A liberação de um desses neurotransmissores pode induzir aumento ou diminuição da resposta contrátil em junções neuromusculares de insetos (CHAPMAN, 2013).

Em conjunto aos dados anteriores, a administração do ECATAS na PACNE induziu uma facilitação inicial e transitória da resposta contrátil seguida do bloqueio neuromuscular, sugerindo que as sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas estão sendo ativadas durante o processo modulatório do extrato. Uma vez que o nervo 5 encontrado no gânglio metatorácico está relacionado à sinapses colinérgicas (CARR; FOURTNER, 1980), novamente sugere-se que o bloqueio neuromuscular observado com ECATAS e Tn é devido a interação entre interneurônios colinérgicos e GABAérgicos (FULTON et al., 1982).

Portanto, os resultados demonstraram que o ECATAS e Tn induziram significativas alterações no sistema nervoso central e periférico de *N. cinerea* (Figura 18). Iniciando os efeitos entomotóxicos com a inibição da enzima acetilcolinesterase e conseqüentemente provocando um efeito cronotrópico negativo na frequência cardíaca do inseto. Em seguida, observamos que o ECATAS e Tn diminuíram significativamente a força de contração muscular da perna de *N. cinerea*, ocasionando bloqueio neuromuscular e diminuindo significativamente o número de potenciais de ação da perna do animal. Por último observamos que o ECATAS e Tn induzem um aumento significativo no tempo da atividade de *grooming* e conseqüentemente diminuindo a locomoção do animal.



**Figura 18.** Representação esquemática das alterações induzidas pelo tratamento com ECATAS e Tn em baratas *N. cinerea*. Ambos tratamentos agem como anticolinesterásicos inibindo a enzima AChE e consequentemente induzem alterações na frequência cardíaca, na contração muscular, no número de potenciais de ação neuronais espontâneos (PACNE) e por fim, conduzem à alterações relevantes no comportamento dos insetos.

## 7 CONCLUSÃO

Conforme os resultados demonstraram é possível sugerir que concentrações subletais de organofosforados de origem sintética ou natural, causam modificações no sistema nervoso de *N. cinerea* ocasionando alterações relevantes no comportamento. A modulação colinérgica tem início pela inibição da atividade da enzima AChE pelo ECATAS que, além disso, induziu alterações das vias octopaminérgica e dopaminérgica. Essas vias possuem impacto direto na locomoção e contração muscular dos insetos, como demonstraram os ensaios eletrofisiológicos e comportamentais. Também demonstramos que a espécie *N. cinerea* pode ser utilizada como um biomarcador viável para detectar a presença de Anatoxina-a(s) e de organofosforados nos ecossistemas aquáticos, contribuindo para o processo de descontaminação. Além disso, fica evidente o potencial biotecnológico que essa cianotoxina apresenta como, inseticida natural ou fármaco para tratamento de doenças como Alzheimer e Mal de Parkinson.

## 8 REFERÊNCIAS

ADEDARA, I.A., et al. Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. **Toxicology** 4, 430 442–451, 2015.

ALONZO, H.G.A., CORRÊA, C.L. **Praguicidas**, in: Oga, S., Camargo, M.A., Batistuzzo, J.A. (Eds.), *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu, São Paulo, p. 696, 2008.

BECKER, V., et al. Occurrence of anatoxin-a(s) during a bloom of *Anabaena crassa* in a water-supply reservoir in southern Brazil. **Journal Applied Phycology**. 22(3) – 231-241, 2010.

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** 72, 248–254, 1976.

BREER, H.; SATTELLE, D. B. Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. **Journal of Insect Physiology**, v. 33, n. 11, p. 771-790, 1987.

CALIJURI M.C.; ALVES MSA; SANTOS A.A. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**, São Carlos, Ed. Rima, 2006, 109 p., 2006.

CARR, C.E.; FOURTNER, C.R. Pharmacological analysis of a monosynaptic reflex in the cockroach *Periplaneta americana*. **The Journal of Experimental Biology**. 86, 259–273, 1980.

CARRAZONI, T. et al. Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. **Toxicology** p.162–171, 2016.

CASARETT; DOULL'S. **Toxicology: the basic science of poisons**. Curtis D. Klaasen –7th edition. McGraw-Hill. New York. 1309 p. 2008;

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

CHELLAPPA, N.T. et al. Impact of stress and disturbance factors on the phytoplankton communities in Northeastern Brazil reservoir. **Limnologica**, v. 39, p. 273-282, 2009.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. Edited by Ingrid Chorus and Jamie Bertram. Geneva: World Health Organization, 1999.

CYBIS LF, et al. **Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: caso da represa Lomba do Sabão e Lago guaíba, Porto Alegre, rio grande do Sul.** Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2006.

COLLINS, C.; MILLER, T. Studies on the action of biogenic amines on cockroach heart. *The Journal of Experimental Biology* 67, 1–15, 1977.

COOK, W.O. et al. Comparison of effects of anatoxin-a(s) and paraoxon, physostigmine and pyridostigmine on mouse brain cholinesterase activity. *Toxicol* 26, 750–753. 455, 1988.

CRAIG, C.; STITZEL, R. **Modern pharmacology with clinical applications.** 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins. 832p., 2004.

ECOBICHON, D.J. **Toxic Effects of Pesticides**, in: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and *Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.* McGraw-Hill, New York, 470 pp. 769–84, 2001.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7, 88–95, 1961.

FRANÇA, S.M. et al. The sublethal effects of insecticides in insects, in: *Biological Control of Pest and Vector Insects.* **InTech**, p. 23–39, 2017.

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

GORHAM, P.R., et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (*Lyngbia*) de Bréb. **Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie.** Stuttgart, 796-804p, February 1964.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of entomology.** Fifth edition John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, P019 8SQ, UK, 2014.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. M. **Algae.** Prentice Hall, New Jersey, pp. 97-131, 2000.

HELIVANIA S. S. **Eutrofização.** Biologianet. Link < <https://biologianet.uol.com.br/ecologia/eutrofizacao.htm> > acessado em 12 de outubro de 2018.

HUBER, I.; MASLER, E.; RAO, B. **Cockroaches as Models for Neurobiology Applications in Biomedical Research**. CRC Press; 1<sup>a</sup> Edition (February, 28 - 1990).

LEAL, A.P. et al. Entomotoxic activity of *Rhinella icterica* (Spix, 1824) toad skin secretion in *Nauphoeta cinerea* cockroaches: An octopamine-like modulation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 0–1. 499, 2018.

LIBERSAT, F.; PHUEGER, H. J. Monoamines and the Orchestration of Behavior. **Bioscience**, v. 54, p.17-25, 2004.

LOPES, R. et al. Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Chemosphere** 64: p.56–62, 2006.

LÓPEZ, M. D.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. **Industrial Crops and Products**, v.31, n.2, p.284-288, 2010.

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

MARTINELLI, A.H.S. et al. Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta** 1840, p. 935–944, 2014.

MATSUNAGA, S., et al. Anatoxin-a(s), a Potent Anticholinesterase from *Anabaena flos aquae*. **Journal of the American Chemical Society** 111, p. 8021–8023, 1989.

MOLICA, R.J.R., et al. Occurrence of saxitoxins and an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply. **Harmful Algae** 4, p. 743–753, 2005.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.

MONTEIRO, A.J. **Eutrofização**. Instituto Superior Técnico. Departamento de Engenharia e Arquitectura. Secção de Hidráulica e dos Recursos Hídricos e Ambientais Qualidade da água e Controle da Poluição. Portugal, Lisboa, p.1-19, 2004.

NETO, M. L. F.; FERREIRA, A. P. Perspectivas da Sustentabilidade Ambiental Diante da Contaminação Química da Água: Desafios Normativos - **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente** - v.2, n.4, Seção 1, 2007.

OSBORNE, R.H. Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. **Pharmacology & therapeutics** 69, p. 117–142, 1996.

PEDROZO, C.S.; KAPUSTA, S.C. **Indicadores ambientais em ecossistemas aquáticos**. Porto Alegre: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, 2010.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones**. McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 4ª edición, 1998.

RICHARDS, A.G. The effect of temperature on recombination frequency in *Neurospora crassa*. **Journal of Insect Physiology**, 9, 597–606, 1966.

RODRÍGUEZ, V. et al. Effects of a cyanobacterial extract containing anatoxin-a (s) on the cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 22, 775–781, 2012.

SAADEH, A.M., et al. Clinical and Sociodemographic Features of Acute Carbamate and Organophosphate Poisoning: A Study of 70 Adult Patients in North Jordan. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology** 34, 45–51, 1996.

SANT'ANNA C.L.; AZEVEDO, M.T.P. **Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil**. Nova Hedwigia 71: 359-385, 2000.

SANTOS, C. et al. **Efeito do Triclorfon (Masoten ®) sobre as esterases de *Oreochromis niloticus***. Resumo apresentado no II Seminário de Ecotoxicologia aquática. Campos de Goytacaze, 2011.

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

SANTOS, V. et al. Compostos organofosforados penta-valentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova** 30: 159-170, 2007.

SCHAEFER, C.W.; MILES, J. Inhibition by acetylcholine of cockroach heart (*Gromphadorhina portentosa*). **Comparative and General Pharmacology** 1, 426–430, 1970.

SIVONEN K.; JONES J. **Cyanobacterial toxins. In Chorus I. e Bartram J. (eds): Toxic Cyanobacteria In Water: A Guide to Public Health Significance, Monitoring and Management.** Publicado em Representação da OMS por Spon/Champan e Hall, Londres, 1998.

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here? **Trends in Ecology and Evolution** 24: 201-207. 2009.

SPRUIJT, B., HOL, T., ROUSSEAU, J. Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique. **Physiology & Behavior**. 51, 747–52, 1992.

STÜRMER, G.D. et al. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 109, 56–62. 548, 2014.

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

ZANINI, H. L. H. T. **Caracterização liminológica e microbiológica do córrego rico que abastece Jaboticabal (SP).** Jaboticabal, 75 f. 2009. Tese (doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/d/2760.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.