

NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE BARATA

Maria Eduarda Rosa ¹

Douglas Silva dos Santos ²

Kelly Fernandes ³

Ernani Pinto ⁴

Cháriston André Dal Belo ⁵

Lúcia Helena do Canto Vinadé ⁶

Resumo:

INTRODUÇÃO: Anatoxina-a(s) é uma cianotoxina neurotóxica considerada o único organofosforado natural que compartilha com outros organofosforados a mesma atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase. **OBJETIVO:** Investigar o mecanismo de interação entre o extrato de *Anabaena* sp. contendo anatoxina-a(s) (ECATAS) sobre o sistema nervoso central e periférico de *Nauphoeta cinerea* em ensaios in vivo e in vitro. **METODOLOGIA:** O extrato contendo anatoxina-a(s) utilizado foi gentilmente doado pelo Dr. Ernani Pinto, da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, Brasil. Foram utilizadas baratas adultas da espécie *Nauphoeta cinerea* de ambos sexos, mantidas em insetário com temperatura (25-27°C) e luminosidade controladas, com água e alimento ad libitum. Todos os ensaios envolvendo animais foram previamente aceitos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIPAMPA-CEUA, sob número de protocolo 043/2015, com vigência até 01/2019. A atividade in vitro da AChE foi avaliada utilizando uma metodologia convencional. A preparação nervo-músculo coxal-adutor metatorácico foi montada como descrito por Martinelli et al. (2014). Os ensaios para medida da frequência cardíaca foram realizados como descrito por Rodrigues et al. (2012). A avaliação do comportamento de grooming foi realizada de acordo com Sturmer et al. (2014). Os ensaios de locomoção foram realizados como descrito por Adedara et al. (2015). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada através da análise de variância One Way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett, utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (Software Inc., San Diego, CA), e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p

Palavras-chave: Anatoxina(a)s, anticolinesterásico, neurotoxicidade, barata

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE BARATA

¹ Aluno de graduação. rosaedumaria@gmail.com. Autor principal

² Outro. douglasbio@yahoo.com.br. Co-autor

³ Outro. kelly.af@usp.br. Co-autor

⁴ Docente. ernani@usp.br. Co-autor

⁵ Docente. charistondalbelo@gmail.com. Orientador

⁶ Docente. luvinade@gmail.com. Co-orientador



NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO EXTRATO CONTENDO ANATOXINA-A(S) SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE BARATAS DA ESPÉCIE *Nauphoeta cinerea*

1. INTRODUÇÃO

O volume de rejeitos produzido pela atividade humana aumenta a cada ano, sendo o esgoto doméstico e industrial a principal fonte desses compostos, que são despejados nos recursos hídricos, sujeitando-os cada vez mais ao processo de eutrofização (ROCHA et al., 2009). Este processo de enriquecimento dos cursos d'água com compostos nitrogenados e fosfatados, favorece o crescimento biológico, aumentando a preocupação com a ocorrência de florações de cianobactérias. Estes microrganismos são capazes de sintetizarem e liberarem cianotoxinas, que podem trazer malefícios à saúde humana através do consumo de água e pescado contaminado (VEIGA et al., 2008).

A anatoxina-a(s) é uma cianotoxina neurotóxica, sendo considerada o único organofosforado natural, que compartilha com os outros compostos organofosforados, como por exemplo o Triclorfon, a mesma atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase (CHORUS et al., 1999; STURMER et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo investigar o mecanismo de interação entre o extrato de *Anabaena sp.* contendo anatoxina-a(s) (ECATAS) sobre o sistema nervoso central e periférico de *Nauphoeta cinerea* em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

2. METODOLOGIA

O extrato contendo anatoxina-a(s) utilizado foi gentilmente doado pelo Dr. Ernani Pinto, da Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, Brasil. Como modelo biológico, foram utilizadas baratas adultas da espécie *Nauphoeta cinerea* de ambos sexos, mantidas em insetário com temperatura (25-27°C) e luminosidade controladas, com água e alimento *ad libitum*. Todos os ensaios envolvendo animais foram previamente aceitos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIPAMPA-CEUA, sob número de protocolo 043/2015, com vigência até 01/2019.

A atividade *in vitro* da AChE foi avaliada utilizando uma metodologia convencional. A preparação nervo-músculo coxal-adutor metatorácico foi montada como descrito por Martinelli et al. (2014). Os ensaios para medida da frequência cardíaca foram realizados como descrito por Rodrigues et al. (2012). A avaliação do comportamento de *grooming* foi realizada de acordo com Sturmer et al. (2014). Os ensaios de locomoção foram realizados como descrito por Adedara et al. (2015). Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada através da análise de variância One Way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett, utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (Software Inc., San Diego, CA), e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A inibição da colinesterase de insetos por organofosforados naturais pode resultar em modificações neurofisiológicas importantes que resultam em alterações comportamentais (ALONZO et al., 2008). A análise da atividade da AChE em homogeneizado de cérebro de *Nauphoeta cinerea* após o tratamento com ECATAS (2.5, 5 e 50 $\mu\text{g/g}$ de animal), induziu uma inibição não-dependente da dose (Figura 1).

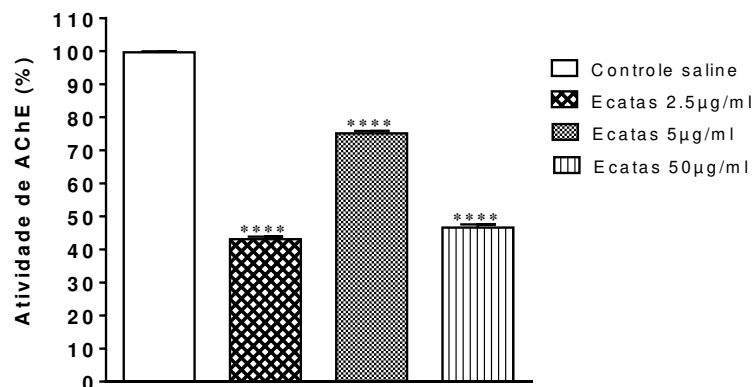


Figura 1. Análise da atividade da enzima acetilcolinesterase com tratamento *in vivo* de ECATAS em homogeneizados de cérebro de *N. cinerea*, **** $p < 0.01$, (n=6).

Após um período de seis horas de incubação com 2.5 µg/g de ECATAS observou-se uma inibição da atividade da AChE de ($56.88 \pm 2.6\%$). A dose de 5µg/g induziu inibição significativa da atividade da AChE, quando comparado ao controle salina. Na dose de 50µg/g houve uma inibição da atividade da AChE ($53.39 \pm 1.65\%$) (n=6, respectivamente).

Quando ECATAS (5, 25 e 50µg/g de animal) foi administrado em preparação nervo-músculo coxal-adutor metatorácico de *N. cinerea* (Figura 2), houve indução de bloqueio neuromuscular não-dependente da dose. Assim, com a menor dose do ECATAS (5µg/g) observou-se aproximadamente 100% de bloqueio da resposta contrátil, em 90 minutos de registro. Quando a dose de 25µg/g foi incubada houve também uma inibição significativa da resposta contrátil que foi máxima ($43.35 \pm 1\%$), após 70 minutos. Com a dose mais elevada (50µg/g), houve um efeito facilitador transitório ($10.6 \pm 0.2\%$), nos primeiros 10 minutos de registro, seguido por um bloqueio neuromuscular irreversível e progressivo ($45.64 \pm 0.05\%$), após 90 minutos de experimento.

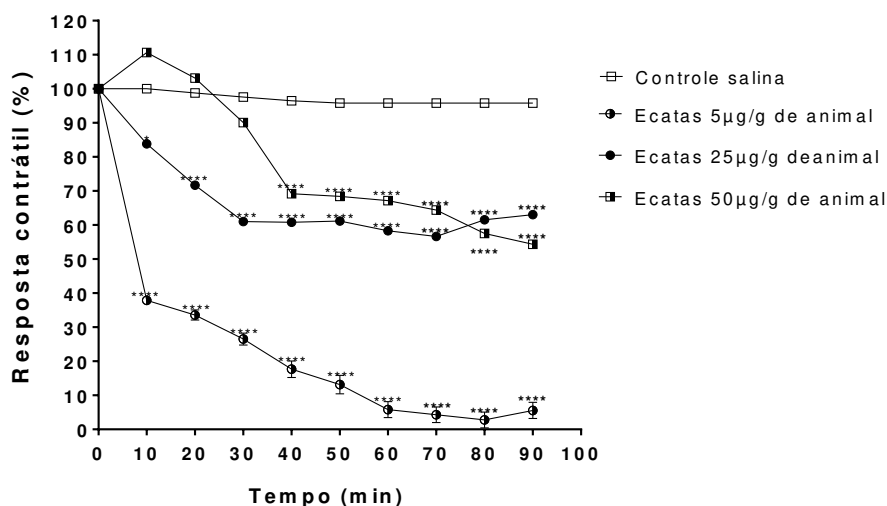


Figura 2. Bloqueio neuromuscular induzido pelo ECATAS em preparação *in vivo* de baratas da espécie *N. cinerea*, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, (n=10).

Normalmente os inseticidas exercem três efeitos principais sobre o sobre insetos, dos quais (1) neuroexcitação resultando em hiperatividade, (2) movimentos espontâneos, descoordenados e paralisia e (3) bloqueio neuromuscular (RATTAN,

2010), são os mais observados. No sistema nervoso de insetos existe uma intrínseca relação entre interneurônios colinérgicos e outros que se utilizam de monoaminas, como a octopamina, além de glutamato e gaba (CARRAZONI et al., 2016). Dessa forma, o bloqueio neuromuscular induzido por ECATAS em *N. cinerea* pode estar ocorrendo devido a uma interação entre interneurônios colinérgicos e GABAérgicos.

Em preparação coração semi-isolado de *N. cinerea* foi possível observar que o tratamento com ECATAS nas doses (5, 25 e 50µg/g de animal) induziu alterações significativas na frequência cardíaca. Nessa preparação, a menor dose (5µg/g animal), reduziu significativamente a frequência cardíaca ($74\% \pm 3$), em relação ao controle salina nos primeiros cinco minutos de ensaio. Com a dose intermediária (25µg/g animal) foi possível observar também diminuição da frequência cardíaca aos oito minutos de ensaio que se sucedeu até os vinte minutos do ensaio ($84\% \pm 1$), seguida de recobro da frequência cardíaca controle. Já com a dose de (50µg/g animal) houve a maior diminuição da frequência cardíaca com diminuição máxima de ($52\% \pm 3$), aos trinta minutos do ensaio (Figura 3).

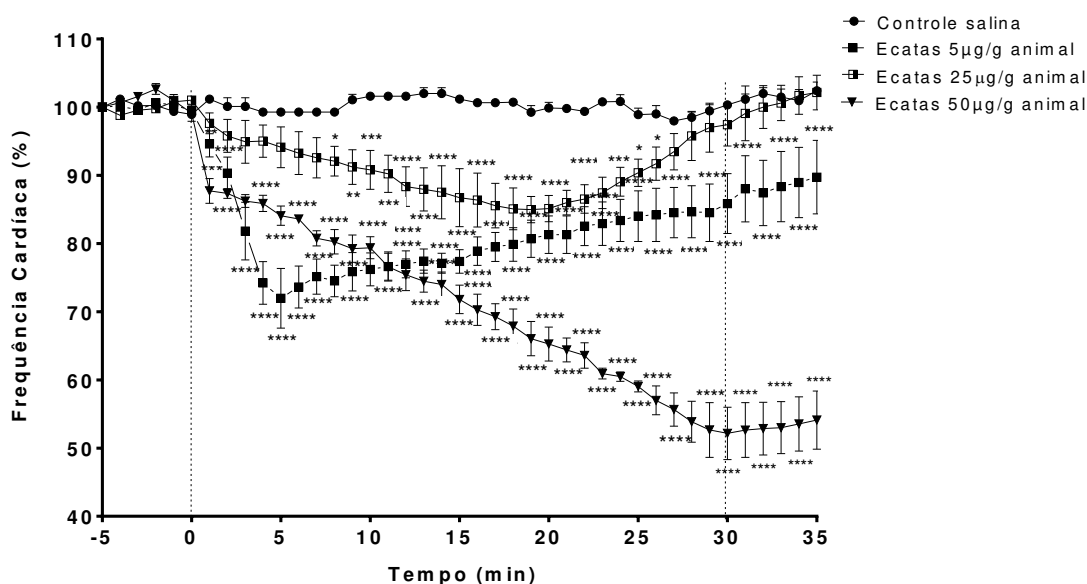


Figura 3. Efeito do ECATAS sobre o cronotropismo do sistema cardiovascular de baratas, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ($n = 9$).

A medida da atividade de *grooming* foi feita por meio da observação dos animais dentro de um Open Field, durante 30 minutos após os tratamentos. Quando o ECATAS foi administrado em diferentes concentrações (5, 25 e 50µg/g animal), houve um efeito dose-independente (Figura 4). Com a menor dose (5µg/g animal) observou-se um aumento significativo do tempo de *grooming* de perna ($252 \pm 10s$) e antena ($46 \pm 8s$). A dose intermediária induziu o maior aumento no tempo de *grooming* de pernas e antenas em comparação com as outras doses, respectivamente ($312 \pm 12s$ e $62 \pm 6s$). Quando a maior dose (50µg/g animal) foi administrada, observou-se um aumento significativo do *grooming* de perna em comparação ao controle, porém, menor em comparação com as outras doses ($226 \pm 6s$). O nosso grupo já demonstrou que compostos com atividade anticolinesterásica induzem aumento da taxa de *grooming* em *N. cinerea* (STURMER et. al., 2014).

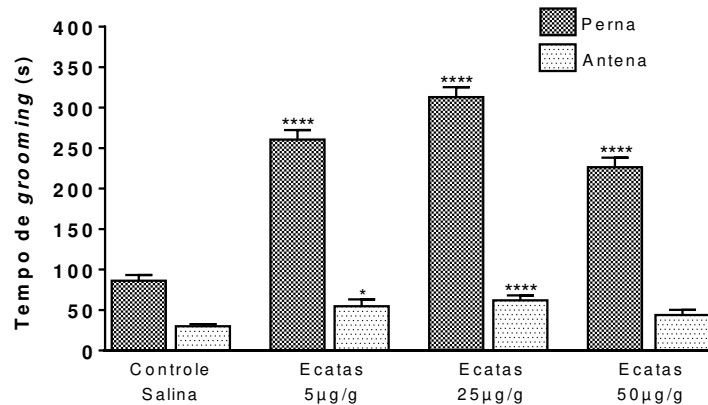


Figura 4. Modulação do tempo de *grooming* pela administração do ECATAS, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, (n=30).

Os ensaios de locomoção foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito do ECATAS (2.5, 5 e 50µg/g de animal) sobre o comportamento exploratório dos animais (Figura 5). Nesse estudo foram medidas a distância total percorrida, episódios em que o animal se manteve imóvel e porcentagem de tempo em que se manteve parado.

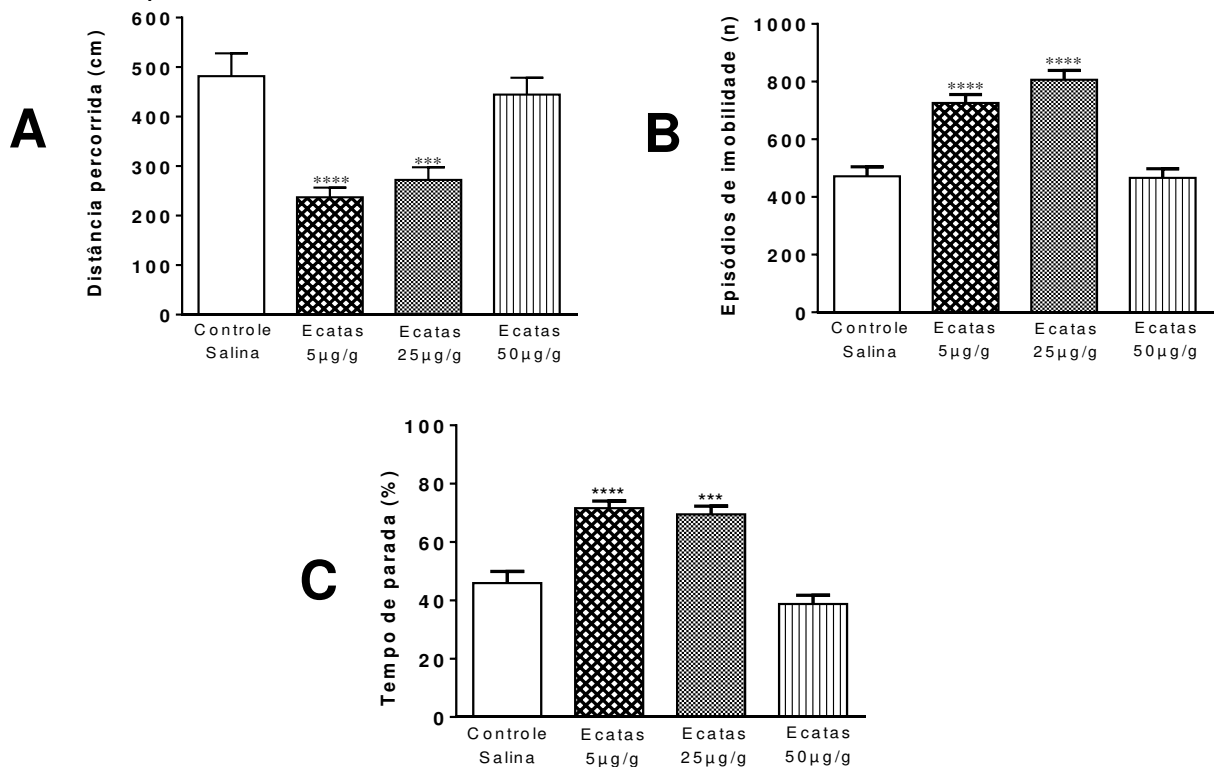


Figura 5. Efeito de ECATAS sobre o comportamento exploratório de *Nauphoeta cinerea*. (A) distância total percorrida, (B) número de episódios de imobilidade e (C) tempo de parada em porcentagem, **** $p < 0.0001$, (n=30).

Nesse tipo de ensaio, as doses (5 e 25µg/g animal) foram as que induziram alterações significativas no comportamento de locomoção dos animais. Ambas diminuíram a distância percorrida (237 ± 20 cm e 272 ± 26 cm), respectivamente. Também induziram aumento significativo dos episódios de imobilidade e

porcentagem de tempo de parada ($726 \pm 28n$ e $806 \pm 32n$) e ($71 \pm 2\%$ e $69 \pm 2\%$), respectivamente.

Nesse sentido, os ensaios de comportamento de *grooming* e locomoção demonstraram que o tratamento com ECATAS produziu letargia nos animais. Isso sugere que o ECATAS tem ação sobre o gânglio subesofágico, que é supostamente o principal ativador das respostas cinéticas das pernas dianteiras (LIBERSAT et al., 1999).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios demonstraram que baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* são susceptíveis ao efeito tóxico induzido por ECATAS. O efeito do extrato foi caracterizado por alterações comportamentais importantes sobre os sistemas cardiovascular, nervoso central e periférico dos animais. Os dados obtidos poderão contribuir não somente com o tratamento e descontaminação ambiental, mas, também com o potencial desenvolvimento de compostos naturais com aplicabilidade biotecnológica, como por exemplo, inseticidas naturais e medicamentos para doenças neurodegenerativas.

5. REFERÊNCIAS

- ADEDARA, A. I., ROSEMBERG B. D., SOUZA O. D., KAMDEM P. J., FAROMBI O. E., ASCHNER M., et al., Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. *Toxicol. Res.*, 4, 442-451, 2015.
- ALONZO, H.G.A., CORRÊA, C.L. Praguicidas, in: Oga, S., Camargo, M. de A., Batistuzzo, J.A. de O. (Eds.), *Fundamentos de Toxicologia*. Atheneu Editora, São Paulo, p. 696, 2008.
- CARRAZONI T., HEBERLE A. M., PERIN A. P. A., ZANATTA P. A., RODRIGUES V. P., et al., Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Toxicology* 368, 162–171, 2016.
- CHORUS, I., BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, First edit. ed. E & FN Spon, an imprint of Routledge 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE, London, 1999.
- LIBERSAT F., WEISEL-EICHLERA., HASPEL G. Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *The Journal of Experimental Biology*. 202: 957-964. 1999.
- MARTINELLI, A.H.S., et al. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Bioch. Biophys. Acta* 1840, 935–944, 2014.
- RATTAN, R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot.* 29, 913–920, 2010.
- ROCHA, S.A.; LOUGON, M.S.; GARCIA, G.O. Influência de diferentes fontes de poluição no processo de eutrofização. *Revista Verde* 4, 1-6, 2009.
- RODRIGUES, V., et al. Effects of a cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) on the cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans*. *Revista Bras. De farmacognosia* 22, 775-78, 2012.
- STÜRMER, G.D., et al. Modulation of dopaminergic neurotransmission induced by sublethal Doses of the organophosphate trichlorfon in cockroaches. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 109, 56–62, 2014.
- VEIGA, N.C.A.R. Cianobactéria tóxica na água para consumo humano. *Faculdades Integradas Vianna Junior*. 2008.