

ENTOMOTOXICIDADE DO VENENO DE SAPO (RHINELLA ICTERICA) EM BARATAS (NAUPHOETA CINEREA)

Yuri Correia Barreto ¹

Raquel Soares Oliveira ²

Lúcia Vinadé ³

Cháriston André Dal Belo ⁴

Allan Pinto Leal ⁵

Resumo:

INTRODUÇÃO: Os sapos são animais venenosos de interesse biotecnológico devido aos compostos bioativos presentes no seu veneno. *Rhinella icterica* é uma espécie de anuro venenoso comum no Brasil, no qual a atividade biológica de seu veneno nunca foi descrita anteriormente. Este trabalho investigou os mecanismos da atividade entomotóxica do veneno do sapo *R. icterica* (VSRI). **METODOLOGIA:** O veneno foi extraído de sapos coletados no município de Derrubadas (RS), com autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) licença de coletor n°: 24041-2. Baratas adultas *Nauphoeta cinerea* foram utilizadas como modelo experimental. A atividade neuromuscular do VSRI foi avaliada usando a preparação músculo coxal adutor metatorácico (MCAM) segundo descrito por Martinelli et al. (2014). A Cardiotoxicidade foi avaliada utilizando a preparação coração semi-isolada (CSI) de barata in vivo de acordo com Rodrigues et al., (2012), frequência cardíaca foi contabilizada visualmente durante 30 min. O comportamento de higienização (grooming) foi medido conforme descrito em (Carrazoni et al., 2016). Para avaliar a atividade locomotora in vivo, quatro insetos foram filmados durante 10 min e os filmes analisados utilizando softwares conforme Adedara et al. (2015). Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro (E.P.M), sendo os mesmos analisados pelo teste two-way ANOVA, seguido dos testes Tukey ou Dunnett, sendo considerado significativos quando P

Palavras-chave: Neurotoxidade; Bloqueio Neuromucular; *Rhinella icterica*; Atividade inseticida; Biotecnologia

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

ENTOMOTOXICIDADE DO VENENO DE SAPO (RHINELLA ICTERICA) EM BARATAS (NAUPHOETA CINEREA)

¹ Aluno de graduação. y.barreto9507@gmail.com. Autor principal

² Aluno de pós-graduação. raquelsoaresoliveira@yahoo.com.br. Co-autor

³ Docente. luciavinade@unipampa.edu.br. Co-autor

⁴ Docente. charistondalbelo@gmail.com. Orientador

⁵ Aluno de pós-graduação. bioallanleal@gmail.com. Co-orientador



ENTOMOTOXICIDADE DO VENENO DE SAPO (*Rhinella icterica*) EM BARATAS (*Nauphoeta cinerea*)

1. INTRODUÇÃO

Muitas espécies do globo secretam, ingerem e/ou armazenam substâncias que são utilizadas como ferramenta na defesa contra predadores e microrganismos patogênicos. Dentre elas a ordem dos *Anuros* apresenta ampla variedade de biomoléculas em seus venenos, como aminas, alcaloides, peptídeos, proteínas e esteroides, as quais apresentam uma série de atividades importantes para biotecnologia industrial. Essas moléculas apresentam toxicidade variada, desde irritante até neurotóxica, agindo por exemplo, no bloqueio de canais iônicos do sistema nervoso central e periférico e do sistema neuromuscular relacionados à ação de alcaloides. Além de alterações das vias neuro-hormonais e neuromoduladoras induzidas por peptídeos e proteínas (CUNHA-FILHO et al., 2010; SIANO et al., 2014).

Substâncias isoladas de *Rhinella* sp. demonstraram ação contra *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*, atividade anestésica, antiviral, antibacteriana, inseticida e um importante efeito digitálico. A espécie *R. icterica* é nativa da América do Sul e, no Rio Grande do Sul, está presente principalmente em regiões de mata Atlântica. A característica mais marcante desses animais são as grandes glândulas paratoides, localizadas em sua cabeça. Vários estudos ecológicos são encontrados na literatura, no entanto, a toxicidade e a farmacologia do veneno nunca foram estudadas, sendo o nosso grupo de pesquisa pioneiro na investigação de sua atividade biológica (MARTINS et al., 2011; ROSTELATO-FERREIRA et al., 2011; SOARES, 2016; TEMPONE et al., 2008; YANG et al., 2015).

Nesse estudo investigou-se o mecanismo de atividade do veneno do sapo *Rhinella icterica* (VSRI) sobre o sistema nervoso periférico, cardiovascular e comportamental de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

2. METODOLOGIA

Veneno de *Rhinella icterica* (VRI): o VRI foi extraído de sapos coletados no município de Derrubadas (RS), com autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) licença de coletor n°: 24041-2. O veneno foi extraído por compressão manual das glândulas paratoides e os animais foram tombados em coleção. Após a coleta, o veneno foi dissolvido em metanol para a retirada de aminas biogênicas e submetido à liofilização. O material resultante foi dissolvido em solução salina para insetos (SSI). Neste estudo foram utilizadas baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* de ambos os sexos. As baratas foram anestesiadas por resfriamento a 8°C (7 min) e afixadas em placa de dissecação para posterior montagem das preparações. A avaliação da cardiotoxicidade foi realizada em preparações de coração semi-isolado, a qual foi preparada de acordo com Rodrigues et al. (2012). A cutícula que recobre o abdome do inseto foi removida a fim de expor as vísceras do animal, as quais foram afastadas, permitindo a perfeita visualização do sistema vascular. O veneno foi adicionado à preparação e os batimentos cardíacos contabilizados visualmente durante 30 min.

O efeito do veneno de *R. icterica* em junção neuromuscular de baratas foi avaliado em preparação músculo coxal adutor metatorácico segundo descrito por Martinelli et al. (2014). Após a fixação do animal em decúbito dorsal, foi feita a dissecação da quitina da região metatorácica que compreende o último par de pernas, para a exposição do nervo 05. Foi inserido um par de eletrodos de Ag/AgCl em

alfinetes, pelos quais foram aplicados os estímulos elétricos (2-5V, 0.5 Hz, 0.5ms). A perna do animal foi amarrada com linha de costura que foi conectada a um transdutor isométrico acoplado a um sistema para registros eletromiográficos (AVS, São Carlos, Brasil). Os registros neuromusculares foram feitos durante 120 min. Para avaliar a atividade locomotora *in vivo*, quatro insetos foram filmados durante 10 min e os filmes analisados utilizando os IDtracker® e Matlab®, conforme Adedara et al. (2015).

A atividade de *grooming* foi medida conforme descrito por Carrazoni et al. (2016). Os tratamentos foram feitos por meio de injeções na terceira porção abdominal dos animais. A contagem do tempo de *grooming* (em segundos) foi realizada durante 30min. Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro (E.P.M), sendo os mesmos analisados pelo teste two-way ANOVA, seguido dos testes Tukey ou Dunnett, sendo considerado significativos quando $P < 0.05$.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Em ensaios de preparações de coração semi-isolado, em animais incubados apenas com salina, a frequência cardíaca foi de 90 ± 5 batimentos/min (Figura 1). Quando o VSRI foi ensaiado nas concentrações de 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 $\mu\text{g}/200\mu\text{L}$ na mesma preparação, observou-se uma diminuição da frequência cardíaca máxima na maior dose, a qual foi 50 ± 4 batimentos/min ($n=6$, $P < 0.05$), demonstrando um efeito dose-dependente na frequência cardíaca. Mesmo após lavagem das preparações com salina não foi observado a recuperação da frequência cardíaca.

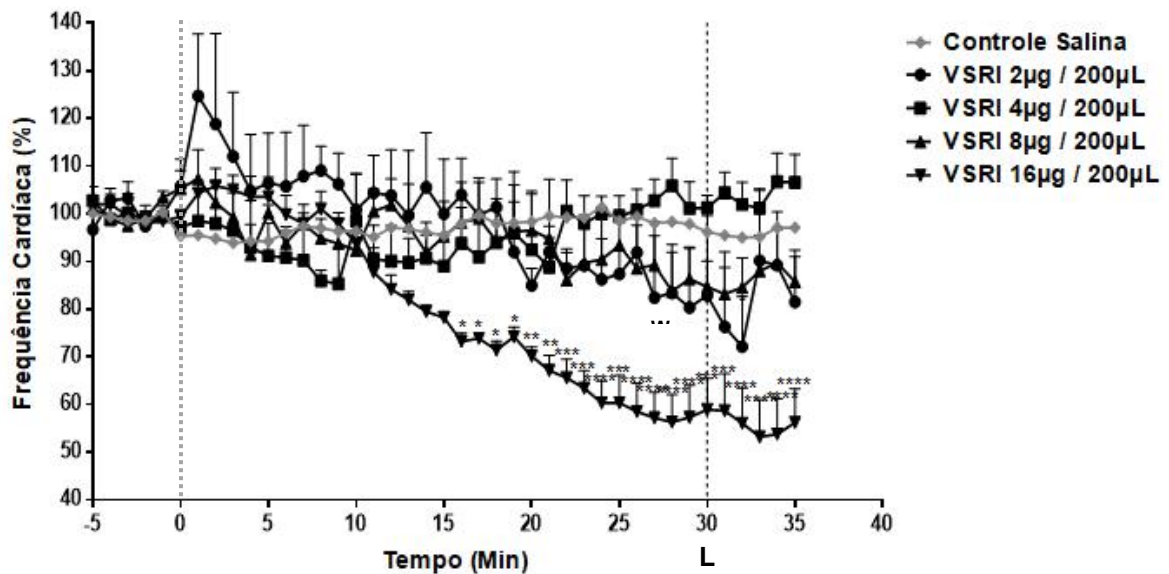


Figura 1. Efeito cronotrópico negativo induzido por VSRI em preparações CSI *in vivo* de *Nauphoeta cinerea*. (L) Lavagem com SSI.

Em registros eletromiográficos para a determinação da atividade do VSRI sob a junção neuromuscular de baratas, a aplicação das doses 20, 50, e 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de animal, induziu diminuição progressiva e dose-dependente na resposta contrátil, em 120 min ($n=6$) (Figura 2). Nesses ensaios, a inibição completa da resposta contrátil foi observada na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de animal aos 110 min de registro ($n=6$, $P < 0.05$).

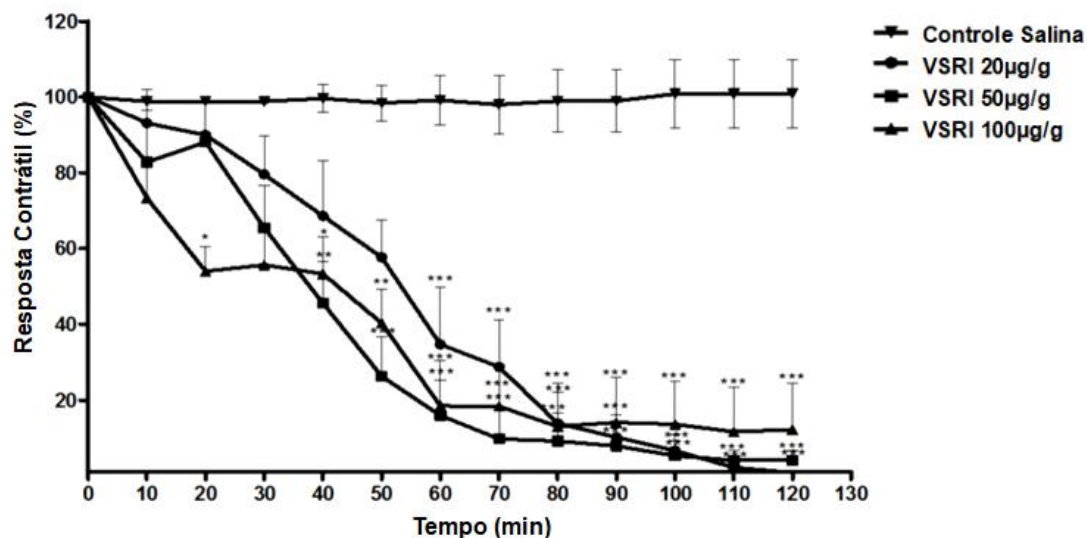


Figura 2. Bloqueio neuromuscular induzido pelo VSRI em preparações de MCAM *in vivo* em baratas.

No registro de locomoção ($n = 33$, $P < 0,05$), as doses 2,0, 10 e 20 $\mu\text{g/g}$ animal diminuíram significativamente a atividade locomotora das baratas (Figura 3A), aumentando o número de episódios de imobilidade (Figura 3B) e aumento do tempo de parada dos animais para $75\% \pm 3$ (Figura 3C).

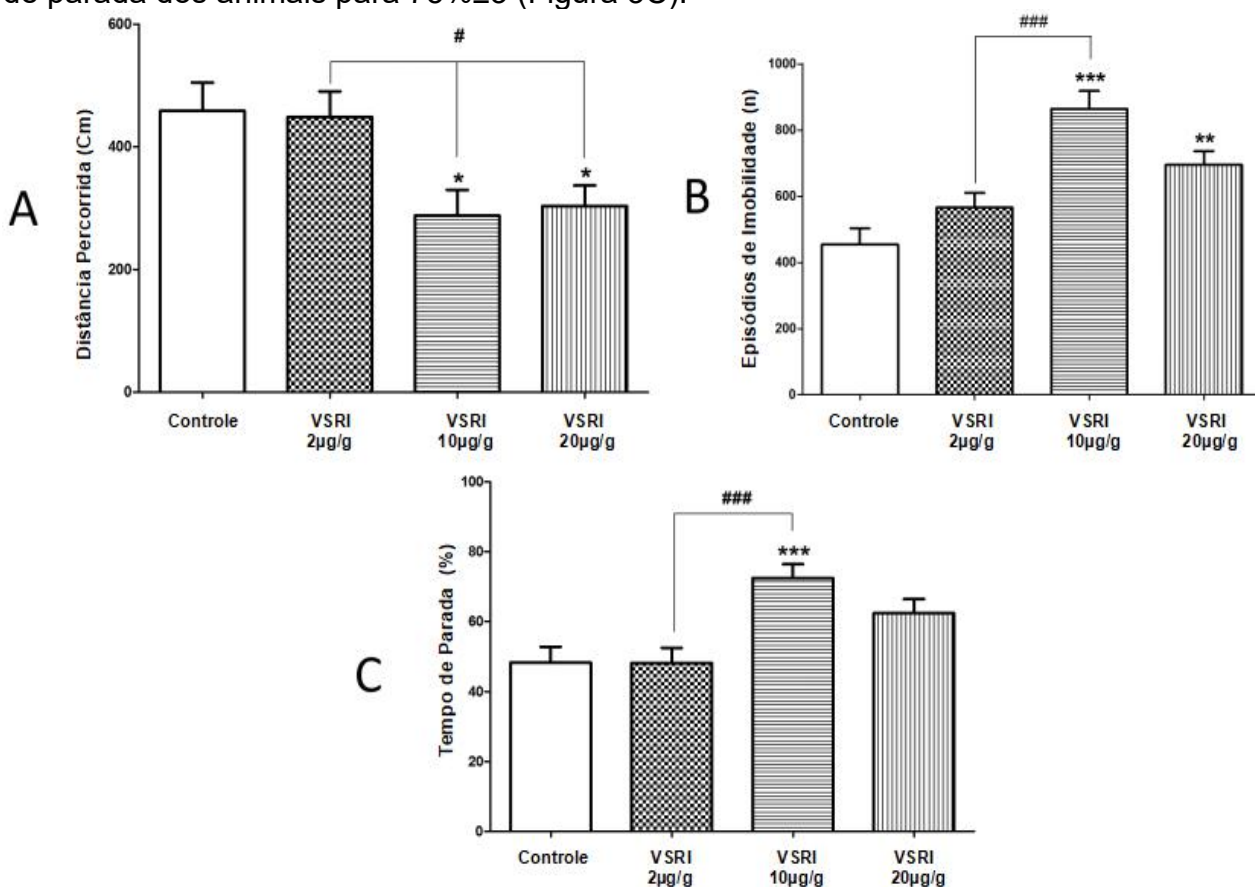


Figura 3. Locomoção e pontos finais motores avaliados em controle e tratamento VSRI. A) Distância percorrida. B) Episódios de imobilidade. C) Tempo de parada em porcentagem.

As doses 2,0, 10 e 20 $\mu\text{g/g}$ de animal provocaram um aumento significativo na atividade de *grooming* (Figura 4A), esse aumento foi evitado nas baratas com tratamento prévio com fentolamina, um inibidor seletivo dos receptores octopaminérgicos (figura 4B).

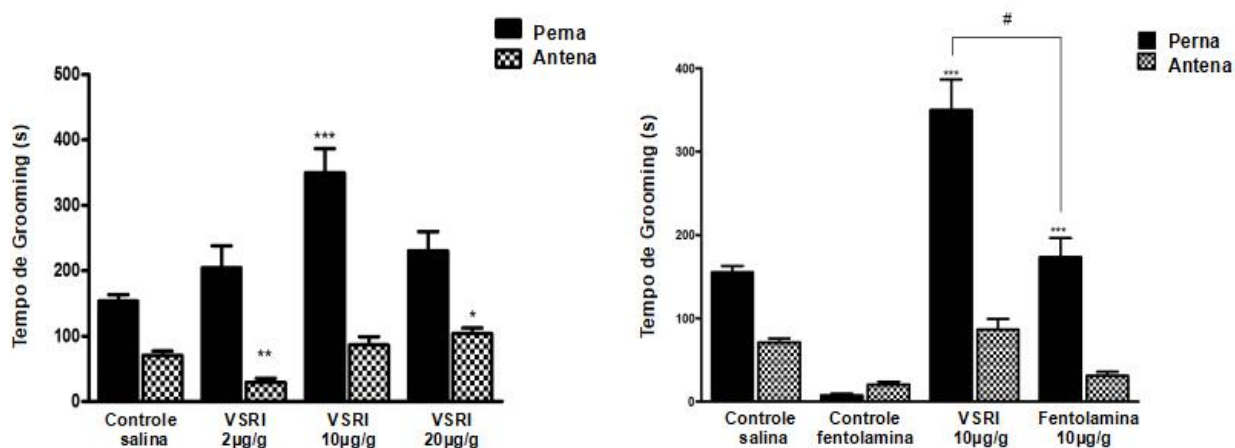


Figura 4. Atividade de *grooming* em *Nauphoeta cinerea*. A) Aumento na atividade induzida pelo VSRI. B) Tratamento com Fentolamina.

Nossos resultados demonstraram que o veneno de sapo de *R. icterica* (VSRI) induz alterações na frequência cardíaca de baratas, bloqueio neuromuscular irreversível, alteração da atividade de locomoção, bem como e aumento da atividade de grooming de baratas da espécie *N. cinerea*. Octopamina é uma amina biogênica que, em invertebrados, atua como neurohormônio, neuromodulador e neurotransmissor, sendo responsável pela regulação de vários processos fisiológicos, como modulação da frequência cardíaca e atividade de *grooming*. O VSRI reduziu a frequência cardíaca de *N. cinerea*, neste sentido, sugere-se a ação do veneno na via octopaminérgica.

Relacionando os efeitos do VSRI na atividade de locomoção e de *grooming*, sugere-se que, possivelmente, o mecanismo de ação do veneno seja alteração na sinalização octopaminérgica, pois essa atua como neuromodulador do comportamento de *grooming* de perna nos insetos (WEISEL-EICHLER, 1999). Quando os insetos foram tratados previamente com fentolamina, observou-se a inibição da resposta induzida pelo VSRI, corroborando com os dados prévios, que indicam a participação da via octopaminérgica na ação do veneno.

O bloqueio induzido pelo veneno na resposta contrátil em insetos sugere duas maneiras de ação do veneno. Na primeira, o veneno pode estar interagindo diretamente com os receptores glutamatérgicos, atuando como um antagonista, levando a diminuição dos níveis de glutamato, principal neurotransmissor excitatório em junção neuromuscular (JNM) de insetos (CARRAZONI et al., 2016). Na segunda maneira de ação, pode-se observar um aumento na liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório em JNM. Além disso, considerando que o veneno esteja agindo através da ação na via octopaminérgica, sugere-se a participação da octopamina na orquestração da contração muscular interferindo na liberação excessiva de GABA ou diminuindo a liberação de glutamato.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade entomotóxica apresentada pelo veneno do sapo *R. icterica*, reforça o interesse preservacionista, demonstrando a aplicabilidade biotecnológica de um composto natural oriundo da fauna local.

5. REFERÊNCIAS

- ADEDARA, I. A. *et al.* Biochemical and behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. *Toxicology Research*, v. 4, n. 6, p. 442-451, 2015.
- CARRAZONI, T. *et al.* Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Toxicology*, v. 368, p. 162-171, 2016.
- CUNHA-FILHO, G. A. *et al.* Cytotoxic Profile of Natural and Some Modified Bufadienolides from Toad *Rhinella schneideri* Parotoid Gland Secretion. *Toxicon*, v. 56, n. 3, p. 339-348, 2010.
- MARTINELLI, A. H. *et al.* Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1840, n. 3, March 2014.
- MARTINS, L. A. *et al.* Anfíbios do Rio Grande do Sul: Catálogo, Diagnoses, Distribuição, Iconografia. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2011. 196p.
- RODRIGUES, V. *et al.* Effects of a cyanobacterial extract containing-anatoxin-a(s) um the cardiac rhythm of *Leurolestes circunvagans*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n.4, Curitiba Jul./Agt. 2012 Epub May 29, 2012.
- ROSTELATO-FERREIRA, S. *et al.* Presynaptic Effect of a Methanolic Extract of Toad (*Rhinella schneideri*) Poison in Avian Neuromuscular Preparation. *J. Venom Res*, v. 2, p. 32-36, 2011.
- SIANO, A. *et al.* A Comparative Study of the Biological Activity of Skin and Granular Gland Secretions of *Leptodactylus latrans* and *Hypsiboas pulchellus* from Argentina. *Rec. Nat. Prod.*, v. 8, n. 2, p. 128-135, 2014.
- SOARES, R. O. Atividade biológica do veneno de *Rhinella icterica* (Anura: Bufonidae) sobre o sistema nervoso de vertebrados. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas), Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2016.
- TEMPONE, A. G. *et al.* Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* parotoid macrogland secretion. *Toxicon*, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2008.
- WEISEL-EICHLER, A. *et al.* Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *The Journal of experimental biology*, v. 202, p. 57-64, 1999.
- YANG, Q. *et al.* Angel of Human Health : Current Research Updates in Toad Medicine. *Am J Transl*, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2015.