

ATIVIDADE NEUROTÓXICA DO PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO JABURETOX (JBTX) EM BARATAS NAUPHOETA CINEREA E PERIPLANETA AMERICANA

Ana Paula Zanatta ¹

Anne Helene Martinelli ²

Alessandra Selinger Magnusson ³

Célia Regina Carlini ⁴

Chariston Andre Dal Belo ⁵

Resumo:

A demanda por pesticidas químicos é uma necessidade crescente uma vez que produção em massa de alimentos precisa atender uma população cada vez maior em nosso planeta. Entretanto, o uso contínuo desses agentes químicos causa alterações antrópicas colocando em risco seres humanos e animais. As ureases são metaloenzimas, dependentes de níquel, que possuem atividade entomotóxica. Em parte, essa toxicidade aos insetos se dá pela clivagem das proteínas catepsinas, presentes no sistema digestório de algumas espécies favorecendo a liberação do peptídeo tóxico jaburetox (Jbtx). Apesar de se conhecer o potencial entomotóxico do Jbtx seu mecanismo de ação em diferentes insetos-praga ainda não foi elucidado. O objetivo desse trabalho foi avaliar o neurotoxicidade induzida por doses subletais de Jbtx sobre a neurotransmissão de baratas Nauphoeta cinerea e Periplaneta americana. Para isso, foram realizados registros eletrofisiológicos ex situ dos potenciais de ação espontâneos de sensila (SNCAP) e de células de neurônios DUM durante 60min. Os resultados foram expressos como número de eventos $\pm$ E.P.M/ regressão, correlação de Dunnet como post-hoc. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p

Palavras-chave: potenciais de ação; inseticidas naturais; baratas; jaburetox, jack bean urease

Modalidade de Participação: Pós-Graduação

ATIVIDADE NEUROTÓXICA DO PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO JABURETOX (JBTX) EM BARATAS NAUPHOETA CINEREA E PERIPLANETA AMERICANA

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

² Colaborador Externo. ahsmartinelli@yahoo.com.br. Co-autor

³ Técnica de Laboratório . alessandra.magnusson@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. celia.carlini@puccs.br. Co-autor

⁵ Docente. charistondalbelo@gmail.com. Orientador

ATIVIDADE NEUROTÓXICA DO PEPTÍDEO ENTOMOTÓXICO JABURETOX (JBTX) em baratas *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana*

1 INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas tem se mostrado necessário uma vez que as demandas pela produção em massa de alimentos têm aumentado enormemente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), (ISMAN, 2007). O uso contínuo de pesticidas químicos, por outro lado, causa alterações antrópicas, gerando efeitos nocivos a saúde humana e dos animais (DEVINE; FURLONG, 2007; CASIDA; DURKIN, 2013). Assim, a procura por novas moléculas de origem natural com potencial inseticida tornou-se não mais uma alternativa, mas sim, uma necessidade (CARRAZONI et al., 2016). Um grande grupo de plantas terrestres é conhecido pela sua habilidade de produzir metabólitos secundários com potencial entomotóxico bastante seletivos, desenvolvidos evolutivamente como ferramentas no combate à herbivoria (ISMAN, 2007). Essas moléculas naturais com potencial entomotóxico têm sido alvo de profunda investigação científica.

As ureases, são metaloenzimas responsáveis pela clivagem da ureia em amônia, revelando-se uma alternativa de grande potencial biotecnológico como inseticidas naturais, através de ação entomotóxica independente da ação enzimática. (DIXON; GAZZOLA; WATTERS, 1926; CARRAZONI et al., 2016). A *Canavalia ensiformis* possui em abundância diversas isoformas ureolíticas, destacando-se a Jack Bean Urease (JBU), de 270 KDa. Em insetos como o barbeiro (*Rhodinus prolixus*) a ação entomotóxica via oral da JBU é condicionada à sua clivagem por enzimas digestivas do tipo catepsinas, dando origem ao peptídeo tóxico de aproximadamente 10 KDa, nomeado Jaburetox (Jbtx). Esses peptídeos circulam pela hemolinfa e levam o animal à letalidade (CARLINI; POLACCO, 2008). Todavia, o mecanismo de ação entomotóxico do Jbtx ainda não foi totalmente esclarecido (STANISÇUASKI; CARLINI, 2012).

Ensaios com diferentes insetos-praga, como as baratas, revelam-se importantes modelos para o estudo do mecanismos de ação de drogas e xenobióticos. A ordem Blattodea compreende espécies amplamente distribuídas no globo e são consideradas resistentes à ação de inseticidas (CARRAZONI et al., 2016). A utilização de baratas como modelo experimental torna-se atraente aos olhos da neurotoxinologia: além de seu sistema nervoso primitivo já ser caracterizado e apresentar grande similaridade ao de outros insetos (CARRAZONI et al., 2016), é uma animal de fácil criação e manutenção (STURMER et al., 2014). Assim, ensaios elaborados para monitorar o comportamento, a fisiologia e as interações bioquímicas e moleculares são de grande importância no esclarecimento do mecanismo de ação de compostos químicos sobre o sistema nervoso de insetos.

Em insetos, mecanorreceptores são responsáveis pela percepção de ruídos do ambiente. Neurônios, presentes nas sensilas (pelos) das pernas, enviam ao sistema nervoso central do animal, as mensagens responsáveis pela modulação de comportamentos de postura e locomoção, recebidas por gânglios situados no cordão nervoso ventral (ZILL, 2000). Muitos mecanorreceptores realizam sinapses com células DUM (*Dorsal Unpaired Median*) (POLLACK; RITZMANN; WESTIN, 1988). Estas, estão presentes principalmente em parcelas bastante inervadas dos gânglios abdominais do inseto e desempenham papel fundamental na transmissão de sinais elétricos para o sistema nervoso central (ACHENBACH; WALTHER; WICHER, 1997). Portanto, as disfunções na recepção e transmissão dos sinais elétricos externos, como as derivadas de efeito de inseticidas, podem aumentar a vulnerabilidade desses animais ao ataque de predadores.

Nesse sentido, é indiscutível a relevância de pesquisas cujo alvo principal se detenha na busca de novas alternativas ao uso de inseticidas químicos convencionais. O presente

trabalho tem como objetivo esclarecer o efeito neurotóxico induzido por doses subletais de jaburetox sobre a neurotransmissão sensorial em baratas *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana*.

2 METODOLOGIA

Foram utilizados machos adultos das espécies *Nauphoeta cinerea* e *Periplaneta americana*, criados em insetário com temperatura e luminosidade controlada, água e alimento *ad libitum*.

Registros *ex situ* dos potenciais de ação compostos (SNCAP) foram feitos essencialmente como descrito por (LEAL et al., 2018). Após os tratamentos os animais foram anestesiados por resfriamento a -8°C por 5 min, a perna pertencente ao terceiro par metatorácico foi removida. A perna foi afixada na plataforma de registro de cortiça edois eletrodos bipolares em agulha de Ag/ AgCl foram inseridos. Os sinais elétricos dos potenciais de ação aferentes foram adquiridos utilizando o sistema Spikerbox (Backyard brains, USA). Os registros foram armazenados em comoutador Dell Vostro (São Paulo, Brasil) e recuperados para posterior análise no software WinWCP (John Dempster, Universidade de Strathclyde, UK). O tempo de experimento foi de 60 min, 15 animais foram usados para cada tratamento. Os tratamentos foram administrados com uma seringa de Hamilton em um volume fixo de $5\mu\text{L}$, entre a cutícula e o músculo da coxa de uma das pernas pertencentes ao terceiro par. Os resultados foram expressos como número de eventos $\pm$ EPM.

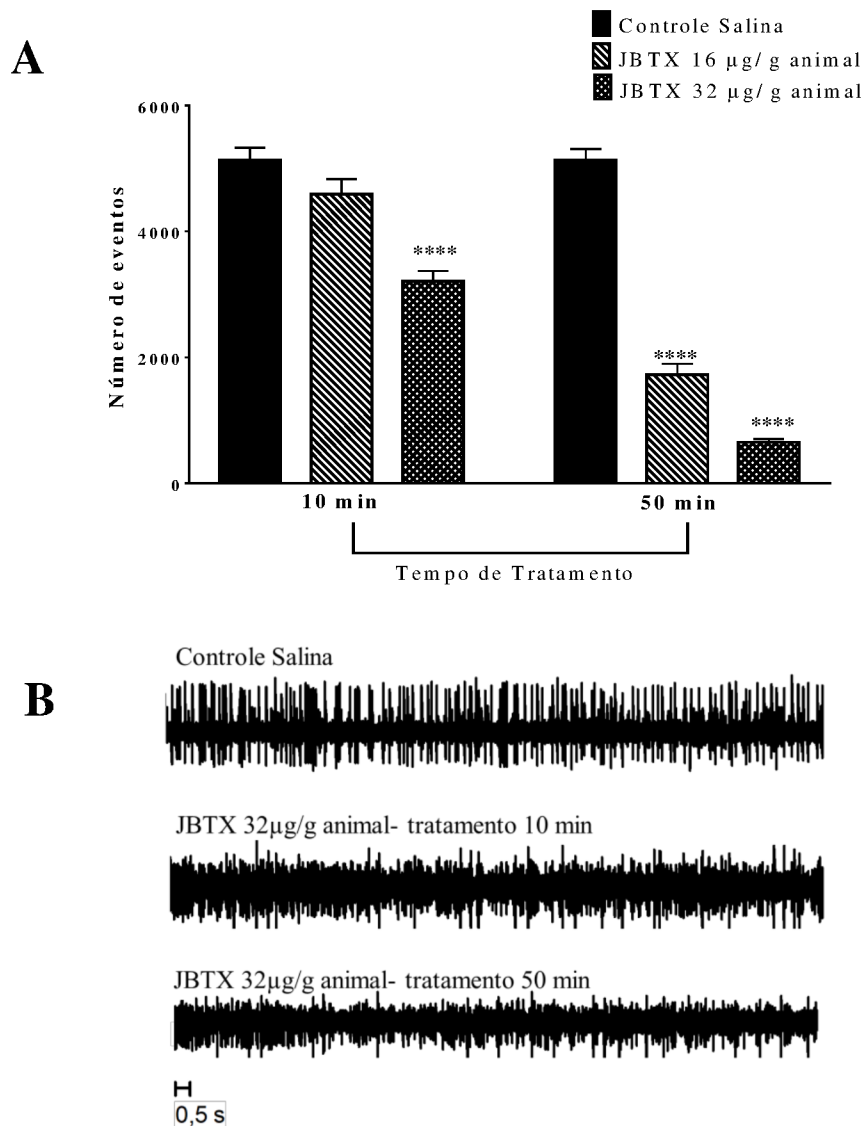
A atividade espontânea de células DUM foi registada a partir de grupamentos presentes no último gânglio abdominal do cordão nervoso ventral de *Periplaneta americana*. Os animais foram imobilizados em decúbito ventral e a cutícula removida. O último gânglio abdominal foi exposto, dissecado e alocado na cuba de registros contendo solução salina. A atividade elétrica foi registrada a partir da inserção de um eletrodo de *patch clamp* em grupamentos de células DUM. A viabilidade da preparação, bem como os registros tiveram duração de 60 min. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM em forma de regressão.

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 $p < 0.05$. Os experimentos foram feitos de forma casual e as repetições randomizadas.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

O peptídeo tóxico Jbtx ($16\mu\text{g/g}$ animal e $32\mu\text{g/g}$ animal) induziu diminuição no número de *spikes* tempo e dose-dependentes (Fig. 1). Em experimentos controle, os números de eventos em 10 min e 50 min de tratamento não diferiram significativamente ($5131\pm196,4$ e $5134\pm174,7$, respectivamente; $n=15$). Em tratamento de 10 minutos de duração, o JBTX $16\mu\text{g/g}$ de animal não induziu alterações ($4591\pm241,4$). Nesse mesmo tempo de tratamento, a dose de $32\mu\text{g/g}$ animal, provocou diminuição de 37% no número de *spikes* registrados na preparação ($3209\pm162,2$; $n=15$). Após 50 minutos, as doses induziram progressivamente a diminuição número de *spikes* ($1723\pm173,9$ na dose $16\mu\text{g/g}$ animal e $651,8\pm51,75$ na dose de $32\mu\text{g/g}$ animal, respectivamente; $n=15$).

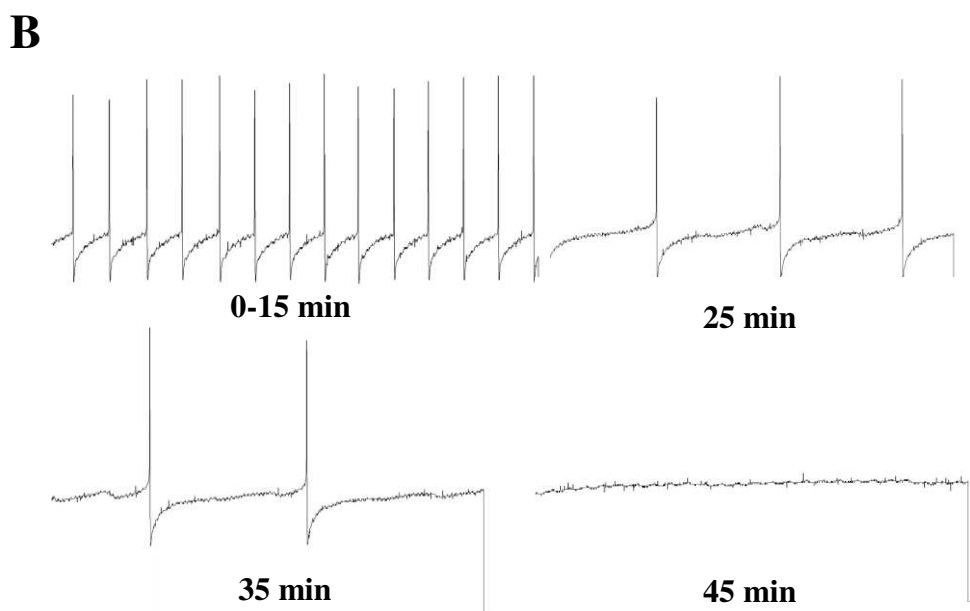
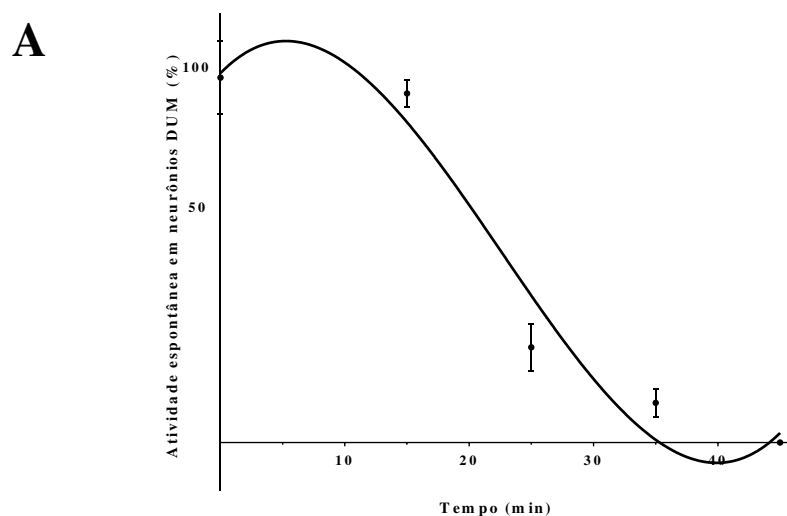
Figura 1. Número total eventos (*spikes*) na preparação SNCAP e registro da atividade modulada por diferentes doses de JBTX



Fonte: Ana Paula Zanatta, 2018

Já nos ensaios de atividade espontânea de células DUM presentes no último gânglio abdominal de *Periplaneta americana*, o JBTX (16µg/300µL) induziu tardiamente o silenciamento da atividade. Durante os primeiros 15 minutos, nenhuma resposta foi observada em relação ao controle. A partir de 25 min de registro, houve diminuição da atividade das células neuronais ocorrendo silenciamento das respostas (Fig. 2).

Figura 2. Silenciamento da atividade espontânea de neurônios do tipo DUM, modulada por JBTX, em gânglio abdominal de *Periplaneta americana*



Fonte: Ana Paula Zanatta, 2018

Os resultados sugerem que o Jbtx exerce modulação tempo e dose- dependente em células nervosas de insetos. A atividade do peptídeo pode estar correlacionada com canais de Na^+ voltagem dependentes, através da inativação desses canais e consequente cessação do potencial de ação (STANKIEWICZ; DBROWSKI; DE LIMA, 2012). Essas e outras alterações podem estar diretamente correlacionadas com efeito agonista tóxico do Jbtx sobre neurotransmissores como octopamina, (ACHENBACH; WALTHER; WICHER, 1997), acetilcolina (BARBAS et al., 2002), serotonina e dopamina (JUST et al., 1996).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos pelo nosso grupo contribuem para elucidação dos mecanismos entomotóxicos do peptídeo tóxico Jaburetox. Tais resultados reforçam seu potencial biotecnológico como inseticida natural. Entretanto, mais investigações mostram-se necessárias, principalmente usando-se insetos benéficos como abelhas melíferas, para se entender o potencial tóxico em espécies não-alvo.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; WALTHER, C.; WICHER, D. **Octopamine modulates ionic currents and spiking in dorsal unpaired median (DUM) neurons**. *Neuroreport*, [s. l.], v. 8, n. 17, p. 3737–3741, 1997.
- BARBAS, Demian et al. **Functional characterization of a novel serotonin receptor (5-HT ap2) expressed in the CNS of Aplysia californica**. [s. l.], p. 335–345, 2002.
- CARLINI, Célia R.; POLACCO, Joe C. **Toxic properties of urease**. *Crop Science*, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 1665–1672, 2008.
- CARRAZONI, Thiago et al. **Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in Nauphoeta cinerea cockroaches**. *Toxicology*, [s. l.], 2016.
- CASIDA, John E.; DURKIN, Kathleen A. **Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects**. *Annual Review of Entomology*, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 99–117, 2013.
- DEVINE, Gregor J.; FURLONG, Michael J. **Insecticide use : Contexts and ecological consequences**. [s. l.], p. 281–306, 2007.
- DIXON, Nicholas E.; GAZZOLA, Carlo; WATTERS, James J. **also form complexes with hydroxamic acids² and hydroxy- urea²² The present work indicates that phosphoramidate may also be a useful reversible probe of the sites**. [s. l.], v. 1, p. 4131–4133, 1926.
- ISMAN, Murray B. **Insecticides Design Using Advanced Technologies**. [s. l.], n. January, 2007.
- JUST, Frank et al. **THE EFFECTS OF SEROTONIN AND DOPAMINE ON SALIVARY SECRETION BY ISOLATED COCKROACH SALIVARY GLANDS**. [s. l.], v. 413, p. 407–413, 1996.
- LEAL, Allan Pinto et al. **Entomotoxic activity of Rhinella icterica (Spix, 1824) toad skin secretion in Nauphoeta cinerea cockroaches: An octopamine-like modulation**. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, [s. l.], v. 148, n. April, p. 175–181, 2018.
- POLLACK, Alan J.; RITZMANN, Roy E.; WESTIN, Joanne. **Activation of DUM cell interneurons by ventral giant interneurons in the cockroach, periplaneta americana**. *Journal of Neurobiology*, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 489–497, 1988.
- STANISÇUASKI, Fernanda; CARLINI, Célia R. **Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties**. *Toxins*, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 55–67, 2012.
- STANKIEWICZ, Maria; DBROWSKI, Marcin; DE LIMA, Maria Elena. **Nervous system of Periplaneta americana cockroach as a model in toxinological studies: A short historical and actual view**. *Journal of Toxicology*, [s. l.], v. 2012, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WORLD HEALTH STATISTICS - MONITORING HEALTH FOR THE SDGs**. World Health Organization, [s. l.], p. 1.121, 2016.
- ZILL, S. N. **Encoding of forces by cockroach tibial campaniform sensilla : implications in dynamic control of posture and locomotion**. [s. l.], p. 359–374, 2000.