

Efeitos de diferentes condições ambientais na resposta imune de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae).

Luana da Silva Nascimento¹, Wellington Oliveira da Cruz², Marcela Barbosa de Figueiredo³, Emerson Guedes Pontes⁴

1 Aluna do curso de ciências biológicas UFRRJ; 2 Pós-graduando em Química/UFRRJ; 3 Pós-doutorando PNPd-CAPES/UFRRJ; 4. Professor adjunto no Departamento de Química – ICE/UFRRJ

Palavras-chave: inseto, óxido nítrico, profenoloxidase, imunidade

Introdução

Os *Alphitobius diaperinus* são causadores de problemas sanitários, comumente infestando sistemas de produção de aves. Quando associados ao agroecossistema, alimentam - se de aves moribundas, das carcaças, fezes e ração das aves (Leschen & Steelman 1988). Associado a isso ocorre um incremento da umidade produzida pela cama aviária, proveniente tanto das excretas das aves, como da água dos bebedouros, fazendo do *Alphitobius diaperinus* um vinculador de diversos patógenos, destacando - se bactérias, protozoários e vírus que causam imunossupressão das aves, (Chernaki *et al* 2001). Embora não possuam mecanismos de defesa sofisticados, como a imunidade adquirida encontrados em vertebrados, os insetos possuem um sistema imune inato bem desenvolvido, subdividido em humoral e celular (Lavine e Strand, 2002). Esta característica confere aos insetos a capacidade de distinguir entre células próprias (“self”) de células não próprias (“non-self”). A fenoloxidase, presente na forma precursora, profenoloxidase, pode ser encontrada na fração plasmática da hemolinfa ou nos hemócitos sendo considerada um importante mediador no sistema de defesa dos insetos contra patógenos e parasitóide (Leonard *et al.*, 1985). Apresenta duas atividades, catecol oxidase (E.C. 1.10.3.1) e monofenol oxidase (E.C. 1.14.18.1). Constitui a principal enzima responsável pelas reações de melanização nos insetos, fundamentais para esclerotização de uma nova cutícula após a ecdise. A ativação do sistema profenoloxidase sinaliza para as respostas imune celulares nos insetos. Dependendo do tamanho da partícula, ocorre a fagocitose ou nodulação, e no caso de parasitas maiores, a encapsulação. Além disso, há a produção de quinonas tóxicas capazes de atuar diretamente sobre o patógeno invasor matando-o. Óxido Nítrico Sintase (NOS) está envolvida na neurotransmissão, neuromodulação, a atividade do músculo liso, e mecanismos de defesa imunológicas (Colasanti e Venturini 1998). Em insetos, a atividade NOS foi encontrada em corpo gorduroso e tubos de Malpighi. NOS catalisa a biossíntese de NO que envolve uma oxidação em dois passos de L-arginina a L-citrulina, com a produção concomitante de NO. Esse trabalho tem como objetivo, avaliar os sistemas de profenoloxidase e óxido nítrico sintase no sistema imune de *A. diaperinus* em condições ambientais distintas.

Material e métodos

Na determinação da atividade profenoloxidase, larvas de *A. diaperinus* foram mantidas a 30° C, umidade relativa de 60 ± 10%. Quinze larvas de último instar foram dissecadas em NaCl 150 mM com o auxílio de pinças e um estereoscópio, de modo que todo o corpo gorduroso das larvas fosse removido. O corpo gorduroso foi diluído em 250 µL de tampão cacodilato 0,01 M, CaCl₂ 0,01M. pH 7,4. O Homogenato foi centrifugado por 1 minuto a 8200 x g a 4°C. A quantidade de proteínas utilizada nos experimentos foram determinadas pelo método de Lowry, 1951, utilizando como padrão uma curva com diferentes concentrações de Albumina Sérica bovina. As reações foram iniciadas por adição de 15 µl de solução saturada de L-DOPA (Sigma Chemical Company) (4 mg / ml) na presença e ausência de tripsina (0,01M) (Genta *et al.*, 2010). A formação de dopachroma a temperatura ambiente foi quantificada em placa de Elisa a 490 nm utilizando espectrofotômetro – Bio-Rad, Microplate Reader.

Na determinação da atividade NOS, quinze larvas de último instar foram dissecadas em água Milli-Q com o auxílio de pinças e um estereoscópio, de modo que todo o corpo gorduroso das larvas fosse removido. O corpo gorduroso foi diluído em 250 µL de água Milli-Q e homogeneizado. As reações foram iniciadas com adição dos substratos Sulfamida e NED - Promega. A formação de Nitrito foi quantificada em placas de Elisa a 550nm no espectrofotômetro – Bio-Rad, Microplate Reader.

Resultado e Discussão

A atividade espontânea foi determinada em ensaios de profenoloxidase na presença de L-DOPA e a atividade total foi determinada *in vitro* através da pré-incubação com tripsina. Ensaios de atividade com a enzima pré-incubada com tripsina apresentou uma atividade superior aos ensaios realizados na ausência de tripsina. As larvas utilizadas nos experimentos foram retiradas e submetidas a diferentes condições. Primeiro grupo foi retirado da colônia mantida no laboratório, o segundo retirado de seu ambiente de origem, um terceiro grupo retirado da colônia do laboratório e submetido a um material de campo (cama aviária) autoclavado por 6 e 24 horas e um quarto grupo retirado da colônia do laboratório e submetido ao material de campo não autoclavado por 6 e 24 horas. Na determinação da atividade profenoloxidase, foi observado que a atividade nos animais de laboratório foi maior do que a dos animais do campo. Não foi observada diferença entre animais de laboratório mantidos por 6 horas em material do campo (cama de aviário) e animais de laboratório mantidos na ração de laboratório. Quando mantidos em material de campo por 24 horas, a atividade profenoloxidase diminuiu em relação aos animais mantidos em material de campo por 6 horas. Quando os animais de laboratório foram mantidos em material de campo autoclavado por 6 e 24 horas, foi observado uma diminuição na atividade profenoloxidase em relação ao material de campo que não foi autoclavado. Esses resultados mostram que esse animal é capaz de ativar o sistema profenoloxidase quando submetidos a diferentes condições ambientais. Nesse sentido fomos avaliar se esse animal era capaz de ativar o sistema NOS. Os resultados mostram que a atividade NOS não mostrou diferença entre animais do campo e do laboratório. Quando os animais de laboratório são mantidos em material de campo autoclavado por 6 horas a atividade NOS diminuiu, aumentando em 24 horas de exposição ao material autoclavado. Os dados sugerem que quando submetidos a tratamentos por 24 horas a NOS apresenta um leve aumento compensando a atividade profenoloxidase que diminui nessas mesmas condições.

Conclusão

Os resultados mostram que o *A. diaperinus* apresenta atividades profenoloxidase e NOS e que essas atividades respondem a mudanças no ambiente.

Agradecimento e Auxílio financeiro

Professor Mario Geraldo de Carvalho, professor titular ICE, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Entomologia Molecular/CNPq, CAPES.

Referências Bibliográficas

- CHERNAKI-LEFFER, A.M.; LAZZARI, F. A.; LAZZARI, S. M. N.; ALMEIDA, L. M. Controle do cascudinho. *Avicultura Industrial*: 1094: p. 22-25, (2001).
- GENTA, F.A. ; SOUZA, R.S. ; GARCIA, E.S. ; AZAMBUJA, P. (2010) Phenol oxidases from *Rhodnius prolixus*: Temporal and tissue expression pattern and regulation by ecdysone. *Journal of Insect Physiology*, p. 1253-1259, 2010.
- LAVINE, M. D. e M. R. STRAND (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol* 32(10) 1295-309.
- LEONARD, C., SO"DERHA"LL, K., RATCLIFFE, N.A., 1985. Studies on profenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochemistry* 15, 803–810.
- LESCHEN, R. A. B.; STEELMAN, C. D. *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larve and adult mouthparts. *Entomological ews*: v. 99, n. 4, p. 221- 224, (1988).
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR A. R. & RANDALL R. J. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- COLASANTI, M., VENTURINI, G., 1998. Nitric Oxide in Invertebrates. *Molecular Neurobiology*, p. 157-177, vol.17.