Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Fisiologia Geral
Programa de Pós Graduação em Ciências
(Mestrado - Fisiologia Geral)

VERSÃO CORRIGIDA

Luca Mantovanelli

ATIVIDADE DA FITOECDISONA DO
GINSENG BRASILEIRO (*Pfaffia paniculata*) NO
CONTROLE DA MUDA EM *Artemia salina*.

PHYTOECDYSONE ACTIVITY OF BRAZILIAN
GINSENG (*Pfaffia paniculata*) ON MOULT
CONTROL IN *Artemia salina*.

São Paulo

2013

Luca Mantovanelli

ATIVIDADE DA FITOECDISONA DO
GINSENG BRASILEIRO (*Pfaffia paniculata*) NO
CONTROLE DA MUDA EM *Artemia salina*.

PHYTOECDYSONE ACTIVITY OF BRAZILIAN
GINSENG (*Pfaffia paniculata*) ON MOULT
CONTROL IN *Artemia salina*.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador(a): Dra. Flávia Pinheiro
Zanotto

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Mantovanelli, Luca.

Atividade da Fitoecdisona do Ginseng brasileiro (*Pfaffia paniculata*) no controle da muda em *Artemia salina*

67 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia Geral.

1. Ecdisona 2. Fitoecdisona 3. Ciclo da
muda.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedicatória

...para Vinícius e Alice, com muita
felicidade.

Epígrafe

“Vamos ensiná-los (os Filhos) que existem tantas palavras como cores, que há tantos pensamentos em si mesmo, porque o mundo está a nascer com ele nas palavras. A existência de diferentes pensamentos e que temos de respeitá-los...e ensiná-los a falar com a verdade, isto é, com o coração.”

Subcomandante Marcos
(Exército Zapatista de Libertación Nacional - EZLN)

Agradecimentos

Agradeço a minha corajosa orientadora Dra. Flávia Pinheiro Zanotto, que mesmo diante de um desafio e tanto, entendeu minha proposta inicial e bancou todos os momentos direcionando meus passos.

Ao Professor Dr. Márcio Reis Custódio, apresentado a mim em momento oportuno. As conversas tímidas no início ganharam grande importância em todo o trabalho. Obrigado pela estrutura disponibilizada e pela confiança depositada.

Ao Dr. Enrique Rozas, que desde o início de meus experimentos me acolheu como aprendiz, e transmitiu de forma tão espontânea e natural ensinamentos fisiológicos únicos que me levaram a concluir esse projeto.

Ao Professor Dr. René Lafont, grande colaborador deste trabalho. Foram muitas informações, artigos, material e muita atenção. Uma pessoa especial por estar tão longe e tão disponível.

Ao Professor Dr. José Guilherme Chaui-Berlinck (ZeGui), coordenador do Programa durante o percurso deste trabalho. A sua atenção e honestidade aumentou a minha vontade de trabalhar com empenho e em busca de superação.

À Secretária do Programa de Fisiologia Geral Roseli Silva Santos, que me ajudou muito em vários momentos deste trabalho, esclarecendo informações importantes da Pós-Graduação. Um forte abraço.

Ao Projeto de Orientação e Atualização Profissional, PROAP, pelo apoio financeiro desde o início com os tanques marinhos e no COLACMAR/2011 onde tudo se consolidou.

Ao Professor Dr. Marcelo Pena por ensinar os primeiros passos desse trabalho no laboratório de química.

Aos grandes colegas técnicos do Instituto Presbiteriano Mackenzie, Natália e Carlos Eduardo. Foram tempos de muito aprendizado com vocês. Obrigado por toda a ajuda, esclarecimento, problemas solucionados e amizade; vocês certamente foram muito importantes.

Ao técnico de laboratório Vágner Alberto do Instituto de Biociências que me auxiliou a preparar o extrato seco.

Aos amigos da FZEA/USP de Pirassununga, Dra. Carmen Fávaro-Trindade, Mirelle Dogenski, Marcelo Thomazini, onde uma importante etapa foi realizada. Espero encontrá-los em projetos futuros.

Aos meus coordenadores do Instituto Presbiteriano Mackenzie: Dra. Silvana Maria Blascovi, Dra. Denise Loureiro Vianna e Dr. Rone Paiano. É difícil agradecer quando o concedido foi além do permitido. Ao final desta etapa me dedicarei para recuperar o tempo perdido em nosso laboratório.

Alice Pitteri e Vinicius P. Mantovanelli, minha família, vocês foram maravilhosos, foram meu combustível. Agradeço a paciência por terem tido três duros anos de algumas privações importantes em prol da conclusão desta empreitada. Não existo sem vocês!

Meus Pais Rogério Mantovanelli e Sonia Vieira Mantovanelli, pela inspiração de vida. Ensinarão-me a nunca desistir e acredito que estou aprendendo.

Ao eterno São Paulino Sr. Vieira e à Dona Carminha Vieira, que com carinho, sensibilidade e pouca noção do que seria um mestrado, me levaram muito a sério e compartilharam minhas vontades sempre.

Aos meus amigos e familiares que me acompanham em todos os momentos: Bruno, Paula, Raquel, Pedro, Rafaela, Tia Nenê, Wanderley, Pi, Mari, Dette, Galvão, Junecca, Fabíola, Mateus, Carlos, Ana, Cal, Maria Fê, Tia Ná, Roberto, Rebeca, Caio, Fernanda, Rafael,

Enrico, Bela, Camila, Leko, Gabriel, Manú, Tia Sandra, Andrea, Yago, Natasha, Leandro, Daniel, Thalita, Gigi, Nina, Tathiana, Lú, Rai, Márcio, Bia, Marilda, Rômulo, Marcel, Joice, Filipe, Pri, Guguinha, Marcão.

Patricia Lacouth, Suelen Félix Pereira, Popetar, Leopoldo, Rudney Almeida, Marina Granado e Sá, Priscila Ortega, Camila Simões, Léo Crisóstomo, Herman Ludwig Meyer, Julia Mourão de Castro, Wilken Rocha, e muitos outros colegas que merecem parte dos louros pela conclusão deste trabalho.

Este foi um trabalho onde as portas foram se abrindo naturalmente, portanto agradeço a todas as pessoas que de alguma forma se relacionaram com este trabalho e comigo nesses últimos três anos.

Índice

Resumo	10
<i>Abstract</i>	11
I. Introdução	12
1. <i>Artemia salina</i>	14
2. Muda ou Ecdise	16
2.1. Interação neuro-humoral	16
3. Ecdisona	18
4. Mecanismos celulares da ação do MIH	19
4.1. Responsividade do órgão Y ao MIH	19
5. Vias de sinalização	21
6. Determinação dos estágios da muda (A-B-C-D-E)	23
6.1. Estágios do ciclo da muda em náuplios de <i>Artemia salina</i>	23
6.1.1. Estágio A: Pós-muda	23
6.1.2. Estágio B: Pós-muda tardia	24
6.1.3. Estágio C: Intermuda	25
6.1.4. Estágio D ₀ : Pré-muda recente	26
6.1.5. Estágio D ₃ : Pré-muda tardia	27
6.1.6. Estágio E: Ecdise	28
7. Fitoecdisonas	30
7.1. Efeitos anabólicos	32
II. Objetivos	33
III. Materiais e Métodos	34
1. Modelo de estudo	34
2. Extrato vegetal	35
2.1. Análise por CLAE)	36

2.2. <i>Pfaffia Paniculata</i>	37
2.2.1. Validação e quantificação do conteúdo de 20HE	37
2.2.2. Teste de letalidade	38
3. Exposição à fitoecdisona	38
4. Exposição à ecdisona sintética	40
5. Microscopia	40
IV. Resultados	41
1. Teste de letalidade	41
2. Exposição à ecdisona sintética	42
3. Exposição à fitoecdisona	45
4. Morfometria (fitoecdisona)	48
V. Discussão	50
1. Exposição à ecdisona sintética	50
2. Exposição à fitoecdisona	51
3. Morfometria	53
VI. Conclusões	55
VII. Referências Bibliográficas	56

Resumo

O consumo de produtos marinhos vem aumentando nos últimos anos. A aquicultura foi responsável por 47 % de todo alimento de origem marinha em 2010. A ecdise é importante para a aquicultura, pois os cultivos de Siri-mole (*Callinectes sapidus*) utilizam o animal no estágio pós-muda, para agregar valor ao produto. O evento da ecdise é a troca do exoesqueleto antigo para permitir o crescimento nos artrópodes, sendo coordenado por uma interação neuro-humoral entre dois órgãos, o complexo órgão X/glândula do seio (que produz o hormônio inibidor da muda HIM) e o órgão Y (que produz a ecdisona). As fitoecdisonas são metabólitos secundários dos vegetais e esses compostos são análogos aos hormônios da muda dos Artrópodes. Neste trabalho, a fitoecdisona de *Pfaffia paniculata* foi extraída, contendo no final 32% de fitoecdisona. A fitoecdisona e a ecdisona sintética em concentração de 30% foram testadas como indutores de muda, utilizando náuplios de *Artemia Salina* como modelo de estudo (N=60/ concentração de 0,01 – 0,3 mg/mL). Os náuplios expostos a fitoecdisona foram fotografados e mensurados para comparação no incremento de tamanho após a primeira muda. Os resultados foram negativos para antecipação ou atraso da ecdise nos náuplios experimentados com fitoecdisona. Para os experimentos com ecdisona sintética, os resultados mostraram, por outro lado, um efeito deterrente ou de atraso da ecdise em relação aos animais controle. A morfometria mostra que apesar da fitoecdisona não estimular a ecdise, os animais expostos a este tiveram incremento de tamanho após a primeira ecdise em relação aos animais controle.

Palavras-chave: 1. Ecdisona, 2. Fitoecdisona, 3. Ciclo da muda.

Abstract

The consumption of marine products is increasing in recent years. Aquaculture was responsible for 47% of all food from marine origin in 2010. Ecdysis is important for aquaculture because soft crab culture (*Callinectes sapidus*) uses animals in postmolt period to increase value to the final product. The event of ecdysis is the change of the old exoskeleton, so that arthropods increase in growth. This event is regulated by a neurohumoral interaction by two endocrine organs: X organ complex (producing the molt inhibiting hormone MIH) and Y organ (producing the ecdysone). Phytoecdysones are secondary metabolites of plants and are analogues to moult hormones of arthropods. In this work, phytoecdysone was extracted from *Pfaffia paniculata* showing a final content of 32% of pure phytoecdysone. This phytoecdysone and a synthetic ecdysone at 30% concentration were utilized as molting inducers using *Artemia salina* nauplii as a study model (N=60/ concentration range 0.01mg/mL – 0.3mg/mL). The nauplii exposed to phytoecdysone was photographed and measured to compare growth after first moulting. The results showed no stimulation of ecdyses in the nauplii exposed to phytoecdysone. The experiment with synthetic ecdysone, on the other hand, showed a deterrent effect and/or ecdyses delay. The morphometry showed that the nauplii exposed to phytoecdysone had increased growth increment after first ecdysis when compared with control nauplii.

Key words: 1. Ecdysone, 2. Phytoecdysone, 3. Moulting cycle.

I. Introdução

O consumo de produtos marinhos vem aumentando nos últimos anos, e os estoques de pesca de muitos países estão sendo comprometidos por uma demanda desenfreada pelo consumo de alimentos marinhos. A pesca e a aquicultura supriram o mercado de pescado com aproximadamente 117,8 milhões de toneladas de peixes para consumo em 2009, correspondendo a 17,2 kg per capita (equivalente em peso vivo), o que está entre os maiores valores já observados (FAO, 2011). Deste total, a aquicultura foi responsável por 47%, e esta contribuição foi verificada pela primeira vez em 40 anos, refletindo tanto a vitalidade do setor aquícola quanto o crescimento econômico global e o desenvolvimento contínuo no processamento e comercialização de pescados (FAO, 2011).

O que era uma tendência no mundo inteiro, hoje já está estabelecido. A aquicultura, nos últimos anos vem crescendo, e junto a ela, novas tecnologias estão sendo desenvolvidas para melhorar as produções, gerar mais lucros, preservar o meio ambiente e as culturas locais, aproveitando os recursos humanos e beneficiando as comunidades. Aquicultura é a produção de organismos com habitat predominantemente aquático, em cativeiro, em qualquer um de seus estágios de desenvolvimento. A atividade se caracteriza por três componentes: o organismo utilizado deve ser aquático, deve existir um manejo para a produção e a criação deve ter um proprietário, ou seja, não é um bem coletivo como são as populações exploradas pela pesca (Rana, 1997). Por outro lado, entende-se por sustentabilidade, o gerenciamento e conservação da base de recursos naturais e orientação tecnológica e

institucional, de modo que assegure a contínua satisfação das necessidades humanas para gerações presentes e futuras (Valenti, 2002).

A aquicultura utiliza recursos naturais, manufaturados e humanos, tais como: terra, água, energia, ração, fertilizantes, equipamentos e mão de obra. Estes devem ser usados de forma racional para que a atividade seja perene e lucrativa. A aquicultura moderna envolve três componentes: a produção lucrativa, a preservação do meio ambiente e o desenvolvimento social (Valenti, 2002).

A pesca e a aquicultura, além da geração direta de alimentos e de renda, desempenham um importante papel social por meio da geração de empregos. Direta ou indiretamente, o setor de recursos pesqueiros é essencial para a sobrevivência de milhões de pessoas no mundo inteiro: em 2008, 44,9 milhões de pessoas estavam diretamente ligadas na produção primária de peixes (captura e aquicultura) (FAO, 2011).

A produtividade natural das massas de água mundial, água doce, estuarinas e marinhas, é enorme, porém, finita (Lucas e Southgate, 2012). A média da produção dos oceanos que pode ser obtida para consumo humano, ou processada para obter carne de peixe, é de 2.5 kg por hectare de superfície oceânica por ano. Apesar disso, essa enorme, porém finita quantidade de produção está dentro da capacidade pesqueira atual (Lucas e Southgate, 2012). Porém, a maioria das capturas mundiais de peixe tem sido duramente sobrexploradas, e a produção de peixe tem alcançado o patamar de 90 milhões de toneladas/ano. A produção global pela captura de peixes atingiu 93 milhões de toneladas em 1994 e desde então há uma flutuação entre 89 e 97 milhões de toneladas/ano, com uma média de aumento anual de 1% (Lucas e Southgate, 2012).

Em contraste a esse cenário, a produção de animais e plantas pela aquicultura cresceu em uma média de 8,1% no mesmo período. Esse

aumento no suprimento global de animais e plantas vem em sua grande maioria, da aquicultura.

O rápido aumento na produção nos anos 90 alavancou a aquicultura e novas tecnologias vêm revolucionando e transformando a produtividade de alimentos de origem marinha. Esse fenômeno é conhecido como “Revolução Azul” (Entis, 1997). Esta forma de enfrentar a revolução na produtividade é similar à “Revolução Verde” ocorrida nos anos que se seguiram após a segunda Guerra Mundial. A Revolução Verde, na ocasião, ocorreu quando pesquisas concentradas desenvolveram a base para as práticas agrícolas usadas hoje em dia (mecanização, pesadas fertilizações, uso de pesticidas, irrigação, técnicas de genética, avanços nas formulações das sementes) (Hopkins, 1996).

Neste cenário atual da aquicultura, este trabalho propõe a aplicação do estudo fisiológico do ciclo da muda de *Artemia salina* exposto a fitoecdisona, visando estudar o efeito deste na antecipação da muda. Como objetivo final, esse trabalho visa a uma provável aplicação na aquicultura e na produção de siri-mole.

1. *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda).

Figura 1: *Artemia salina*

Modelos experimentais com *Artemia salina* (Figura 1) (Brachiopoda: Anostraca) são comumente utilizados para análise fisiológica comparativa entre crustáceos de ordens diferentes. Por serem facilmente manipuláveis em laboratório, fornecem possibilidades de estudo em diversos estágios do desenvolvimento, desde náuplios até adultos. *Artemias* são consideradas um modelo confortável e confiável para testes e experimentos. Em 1956, Michael *et al.* publicaram na Science o artigo “*Artemia como organismo de bioteste*”, alavancando as pesquisas e os testes com esses animais.

Artemia salina é um invertebrado componente da fauna de ecossistemas altamente salinos. Desempenha um importante papel na corrente de energia da cadeia alimentar (Sanchez *et al.*, 1995) e pode ser utilizada em ensaios de laboratório para determinar toxicidade de alguma substância através da estimativa da concentração média letal (valores de CL₅₀) (Parra *et al.*, 1992).

Animais dessa ordem são artrópodes primitivos que pouco se modificaram desde o período Triássico. Com um corpo segmentado e ligado a apêndices que parecem folhas, variam de tamanho entre 8-10 mm nos adultos machos e 10-12 mm nas fêmeas. O exoesqueleto é trocado periodicamente e nas fêmeas a muda precede todas as ovulações. Especificamente, a cutícula é dividida entre uma cutícula externa, a epicutícula (Figura 15), e uma interna fibrosa denominada procutícula, sem diferenciação entre endocutícula e exocutícula. Os náuplios são diecdísicos, tipo de ciclo da muda com estágio de pré-muda predominantemente maior do que a intermuda (Freeman, 1990), enquanto em adultos o período predominante do ciclo da muda é a intermuda (Criel e Walgrave, 1989).

Artemia salina produz cistos (Figura 2) que flutuam na água e são levados pelo vento e pela maré. Esses cistos são metabolicamente

inativos e não se desenvolvem se forem mantidos secos. Depois de imersos em água do mar, os cistos, de formato bicôncavo, tornam-se esféricos, e dentro da casca, um embrião retoma as atividades metabólicas. Depois de 20 horas aproximadamente (varia com temperatura e fotoperíodo), o cisto é rompido e um embrião aparece. Enquanto embrião, ele permanece embaixo da casca do cisto vazio e o desenvolvimento do náuplio é completo em um período curto após a eclosão do cisto (FAO, 1996).

Figura 2: Cistos de *Artemia salina*

2. Muda ou Ecdise

2.1. Interação neuro-humoral

O termo ecdise ou muda é essencialmente o evento de troca do exoesqueleto. Isso permite que o animal cresça após livrar-se do confinamento da carapaça antiga. O evento da muda é coordenado por uma interação neuro-humoral entre dois órgãos que atuam de forma

antagônica. Enquanto o complexo órgão X/glândula do seio (Figura 3), localizados no pedúnculo ocular dos crustáceos sintetiza e libera o hormônio inibidor da muda (HIM), o órgão Y, um par de glândulas localizadas no cefalotórax (Figura 2), produz e libera ecdisona (Ruppert, Fox e Barnes, 2003).

Baldwin *et al.* (2009), após expor *Daphnia magna* a concentrações na água maiores que 260mM do fitoecdisteróide ponasterona A, extraído de *Podocarpus nakaii*, observaram que existe afinidade desse composto vegetal com os receptores intracelulares de ecdisteróides após notar morte precoce e mudas incompletas nos animais.

Figura 3: Controle endócrino da ecdise em crustáceos. XO: órgão X, SG: glândula do seio, MIH: hormônio inibidor da muda, YO: órgão Y, ECD: ecdisona, T: tecido.

3. Ecdisona

O principal hormônio esteróide relacionado com os eventos fisiológicos da muda é a ecdisona (Figura 4), isolada inicialmente a partir de milhares de quilos de pupas de mariposa (Buternard e Karlson, 1984).

Figura 4: Fórmula química da Ecdisona (Zooecdisona).

Estudos seguintes caracterizaram a 20-hidroxiecdisona (20E) como sendo a forma fisiologicamente ativa da ecdisona (uma classe de hormônios esteróides da muda relatados como 20E) na maioria das espécies (Hubber e Hoppe, 1965). Estudos paralelos com crustáceos levaram às observações de que o principal ecdisteróide dos crustáceos, também é o 20E (Hapshire e Horne, 1966).

A ecdisona é um hormônio esteróide polihidroxilado denominado ecdisteróide (Skinner, 1985), e é convertido nos tecidos periféricos (dermais) em sua forma ativa, a 20-hidroxiecdisona. Esta é diretamente responsável por regular os processos de modulação da expressão dos genes relacionados ao ciclo da muda (Shechter *et al.*, 2007).

4. Mecanismos celulares da ação do HIM.

O modelo hipotético proposto por Kim *et al.* (2004) representado na figura 5 demonstra a ação inibitória do HIM no órgão Y e a maquinaria celular envolvida na expressão gênica das células glandulares.

Figura 5: O (HIM), liga-se na membrana da célula do órgão Y através de uma proteína G associada. A adenilato ciclase (AC) fosforila a ATP formada liberando monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), esta ativa a PKA (proteína quinase dependente de AMPc), inativa os canais de cálcio da membrana, não permitindo que este sinalizador intracelular desencadeie a maquinaria que expressará a ecdisteroidogênese.

4.1. Responsividade do órgão Y ao HIM

A ecdisteroidogênese é influenciada não apenas pelo HIM, mas também pelo estágio específico de mudança de responsividade do órgão Y ao HIM. Os experimentos de Sefiane *et al.*, (1996) mostraram um marcante declínio na sensibilidade do órgão Y de *Penaeus vannamei* na presença de células da glândula do seio durante a pré-muda, nas fases D2 e D3.

Chung e Webster (2003) observaram um declínio na responsividade do órgão Y ao HIM durante a pré-muda D₂ e na pré-muda tardia (D₃), aquela que precede a muda, em caranguejos e lagostas.

Observações em experimentos mostram o 3-isobutil-1-meilxantina (IBMX), um inibidor não seletivo da fosfodiesterase (PDE), suprimindo a secreção de ecdisteróides do órgão Y (Mattson e Spaziani, 1985). A enzima PDE é dependente da cálcio/calmodulina, e cataliza a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos (MCA e MCG); essas moléculas são reconhecidas como enzimas chaves envolvidas em uma complexa interação entre nucleotídeos cíclicos e o sistema de cálcio como segundo mensageiro (Kakkar *et al.*, 1999).

A responsividade do órgão Y ao HIM é alta durante a intermuda, declina na premuda recente, e é baixa durante a premuda tardia. Isso confirma dados anteriores sobre estágios específicos de mudanças de responsividade (Nakatsuji, Lee e Watson, 2009). Quando IBMX (inibidor da PDE) foi adicionado ao meio incubado com HIM, a responsividade do órgão Y ao HIM na pré-muda retornou aos níveis similares que são observados durante a intermuda (Nakatsuji, Lee e Watson, 2009).

Os resultados combinados são consistentes em sustentar a hipótese de que a atividade da PDE no órgão Y tem um papel central em determinar a responsividade do órgão ao HIM (Figura 6).

Figura 6: Regulação hormonal da muda em *Gecarcinus lateralis*. O diagrama mostra a relação entre os estágios da muda e o estado de responsividade do

órgão Y ao HIM. A responsividade do órgão Y é a capacidade de resposta ao HIM durante o ciclo da muda. Os níveis de ecdisona são altos na hemolinfa. É neste momento que os hormônios exógenos podem causar algum efeito de soma, a partir da premuda tardia, onde os altos níveis de ecdisona sinalizam o órgão Y a suprimir a ecdisteroidogênese (Chang e Mykles, 2011)

5. Vias de sinalização

Dados existentes indicam que as vias de sinalização envolvem AMPc, GMPc, ou ambos, e exercem papel importante na mediação do HIM na regulação da ecdisteroidogênese. Spaziani *et al.* (1999) mostraram que adicionando extrato de pedúnculo ocular, que contém HIM ativo, incubados com órgãos Y de *Cancer antennarius*, resultou em um aumento de quatro vezes do AMPc.

O modelo para via de sinalização do HIM no órgão Y é mostrado na Figura 7. Esse modelo credita à ativação de mais canais captadores de colesterol (precursor da ecdisona) para aumentar a ecdisteroidogênese. O HIM atua indiretamente na inativação deste precursor via nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc (Spaziani *et al.* 1999).

Figura 7: Colesterol de alta densidade (C); receptores captadores de colesterol (R), receptores de membrana para HIM (R_{him}). Após a ligação, liberação do nucleotídeo monofosfato cíclico de adenosina (cAMP)

Tratamentos com fármacos que induzem o acúmulo de AMPc no órgão Y de duas espécies de caranguejos mostrou uma inibição significativa na ecdisteroidogênese pela ativação da adenilato ciclase (Mattson and Spaziani, 1986; Nakatsuji *et al.*, 2006). Esse efeito aparentemente não ocorre no órgão Y de *Callinectes sapidus* (Han and

Watson, 2005). Em *Callinectes sapidus* a GMPc está envolvida na inibição da ecdisteroidogênese e não a AMPc (Nakatsuji, Lee e Watson, 2009).

Outras moléculas sinalizadoras além dos nucleotídeos cíclicos estão associadas direta ou indiretamente na ação do HIM. Entre essas moléculas, o cálcio aparenta ter um papel crítico. Segundo Mattson e Spaziani (1986), células do órgão Y, dispersas e carregadas com $^{45}\text{Ca}^+$, junto com a adição de células do pedúnculo ocular (HIM ativo), mostram um significativo efluxo do cálcio radiomarcado no meio em que foi incubado. Esses autores sustentam a hipótese de que a diminuição do cálcio intracelular deve estar envolvida na indução da supressão da ecdisteroidogênese. Porém, é necessário desenvolver mais experimentos para quantificar as concentrações de cálcio intracelular em células do órgão Y na presença e ausência do HIM (Nakatsuji e Watson, 2009).

Aplicações no órgão Y de *Cancer antennarius* utilizando o ionóforo de cálcio A23287 (este aumenta o Ca^+ intracelular) estimulou a produção de ecdisteróides em dose dependente (Mattson e Spaziani, 1986). Essa e outras descobertas direcionam para a hipótese de que o aumento do cálcio intracelular estimule um surto na ecdisteroidogênese que resulta no pico de concentração de ecdisteróides na hemolinfa durante a pré-muda (Mattson e Spaziani, 1986). O aumento de cálcio intracelular natural dos animais pode ser consequência de um aumento geral de Ca^+ na hemolinfa que ocorre durante a pré-muda, quando o cálcio começa a ser mobilizado do antigo exoesqueleto (Greenaway, 1985).

A elevação do cálcio intracelular está fortemente ligada à ativação de pelo menos duas enzimas intracelulares, a proteína quinase C (PKC) e o nucleotídeo cíclico fosfodiesterase (PDE) (Mattson e Spaziani, 1987). A respeito da PDE, os resultados mostram que o cálcio ativa uma enzima

cálcio dependente (calmodulina) e esta, ativa a PDE, e seu efeito diminui os níveis de nucleotídeos cíclicos intracelulares e reforçam a ecdisteroidogênese.

6. Determinação dos estágios da muda (A-B-C-D-E)

6.1. Estágios do ciclo da muda em náuplios de *Artemia salina*

Os estágios da muda foram determinados por Drach (1939), e divididos em: A (Pós-muda A), B (Pós-muda B), C₁₋₃ (intermuda), D₀₋₃ (pré-muda) e E (Ecdise), e demonstra como identificar todas as etapas do ciclo da muda em crustáceos. Esse método foi adaptado para outras ordens e Freeman (1987) o utilizou para determinar os estágios de intermuda em *Callinectes sapidus*, com o propósito de estagiar animais para tratamento hormonal. Criel e Walgrave (1989) adaptaram o método de Drach (1939) para ensaios mais precisos e avaliação da fisiologia no ciclo da muda. A partir da análise dos exopoditos de *Artemia salina*, Criel e Walgrave (1989) estagiaram o ciclo da muda nessas a partir de microscopia óptica simples. O desenvolvimento da nova matriz celular que compõe os exopoditos pode ser observado com bastante distinção durante todo o ciclo da muda.

Cada estágio é marcado pelo desenvolvimento da nova matriz celular que vai compor o exopodito (Criel e Walgrave, 1989). Após a eclosão dos náuplios, já é possível identificar os estágios de muda.

6.1.1. Estágio A: Pós-muda

É o estágio imediatamente após a muda, o exoesqueleto é flexível e possível de observar pelas dobras do exopodito. A matriz celular está solta dentro de um envelope cuticular. A cutícula é fina e consiste em

uma epicutícula lamelada e uma exocutícula mais grossa. Fluídos da muda remanescente aderem à nova epicutícula. O estágio pós-muda A dura apenas alguns minutos em adultos de *Artemia* (Criel e Walgrave, 1989) e em náuplios esse tempo não foi estimado.

6.1.2. Estágio B: Pós-muda tardia

Durante a pós-muda B (Figura 8) o exoesqueleto se torna mais rígido, e a matriz celular mais delimitada e alinhada. A matriz se expande dentro do exopodito, porém continua com a presença de muitos vacúolos (Criel e Walgrave, 1989).

Figura 8: Estágio Pós-muda B. Vacúolos enzimáticos (Vac) Matriz celular (MC).
Foto: Luca Mantovanelli

6.1.3. Estágio C: Intermuda

O estágio C é dividido em três subestágios de amplitudes diferentes de duração compreendidos em C_1 , C_2 , C_3 (Criel e Walgrave, 1989). No estágio de intermuda, a matriz celular se condensa gradualmente: no estágio C_1 (Figura 10) é possível visualizar os vacúolos que depositam as enzimas que sintetizarão a matriz celular, porém, ficam confinados na base do exopodito; no estágio C_3 , já é possível observar a matriz levemente granular ou estriada. O estágio C_3 (Figura 9 e 10) é marcado pela perda de aderência entre as células epidermais e a endocutícula e é o primeiro sinal de uma apólise visível (Criel e Walgrave, 1989). Esse estágio é descrito por alguns autores como o estágio $C_{3/4}$ (Freeman, 1987).

Figura 9: Vacúolos enzimáticos bem desenvolvidos (Vac) consolidando a matriz celular (MC). Estágio C_1 . Foto: Luca Mantovanelli

Figura 10: Estágio C₃ (intermuda). (MC) granular ou levemente estriada, vacúolos (vac) menos desenvolvidos. Foto: Luca Mantovanelli

6.1.4. Estágio D₀: Pré-muda recente

Neste estágio a apólise (Figura 11) é visível em microscopia simples (Jenkin e Hinton, 1966). Entretanto, a matriz celular, com a perda de aderência da cutícula, se condensa dando forma a uma estrutura com aparência de uma “auto-estrada”. O estágio D₀ é curto e transitório (Criel e Walgrave, 1989).

Figura 11: Exopodito de náuplio de *Artemia* na pré-muda recente (D_0). Note a menor quantidade de vacúolos, MC (matriz celular) mais consolidada aparência de “auto-estrada” e discreto sinal de apólise. Foto: Luca Mantovanelli

6.1.5. Estágio D_3 : Pré-muda tardia

Em microscopia simples, a base da nova matriz celular é agora visível, em contraste com os estágios anteriores de pré-muda (D_1 , D_2). Ocorre a delimitação da nova cutícula (Figura 12), tornando-se um tubo mais espesso e a apólise agora é bem pronunciada (Figura13) (Criel e Walgrave, 1989).

Figura 12: Linha de delimitação (LD). Estágio (D₃). Foto: Luca Mantovanelli

Figura 13: Sinal de apólise bem pronunciada, estágio (D₃). Foto: Luca Mantovanelli

6.1.6. Estágio E: Ecdise

Ocasionalmente é possível ver o exopodito invertido abaixo da cutícula antiga. Essa inversão procede como os dedos de uma luva assim que a mão é retirada. A muda atual da antiga carapaça (Figura 14) é um processo difícil de acompanhar em *Artemia salina*: alguns animais executam essa troca em poucos minutos, enquanto outros nadam por

alguns minutos com a carapaça remanescente presa em seus apêndices (Criel e Walgrave, 1989).

Figura 14: Ecdise. Perda da aderência entre organismo e o exoesqueleto antigo.

Foto: Luca Mantovanelli

O primeiro estágio larval (instar I; 400 a 500um) em *Artemia salina* tem cor marrom alaranjado, um olho de náuplio vermelho na região da cabeça e três pares de apêndices. A larva no Instar I não se alimenta porque o sistema digestório ainda não é funcional; o animal prospera consumindo suas próprias reservas. Depois de aproximadamente oito horas, o animal muda para o segundo estágio larval (instar II) (FAO, 1996).

7. Fitoecdisonas

Os fitoecdisteróides são metabólitos secundários sintetizados por vegetais e esses compostos são análogos aos hormônios da muda (Figura 15) dos Artrópodes. Dentre os fitoecdisteróides, a 20-hidroxiecdisona é a mais abundantemente encontrada.

Desde a descoberta dos análogos vegetais dos ecdisteróides, tem sido conveniente designar essas substâncias como fitoecdisteróides para diferenciá-las das isoladas de insetos, crustáceos e outras fontes - os zooecdisteróides (Dinan, 2001). Desde sua descoberta, mais de 300 ecdisteróides diferentes vem sendo identificados tanto nos animais quanto nas plantas (as estruturas desses compostos vegetais podem ser encontradas na base de dados Ecdybase, <http://ecdibase.org>).

Todos os ecdisteróides têm estrutura básica de um esteróide (Figura 15) contendo uma ligação Cis na junção do anel A/B, um ene-6-chromoforo e um grupo 14 α -hidroxila. A maioria das variações entre os ecdisteróides se devem ao tamanho da estrutura, à estrutura da cadeia de carbono na posição C17 e ao número de grupos de hidroxilas. O total do número de carbonos deve ser entre 19 e 29 (Lafont e Horn, 1989).

Em insetos os efeitos dos fitoecdisteróides são conhecidos por romperem certas vias de sinalização, levando o organismo a um colapso e morte, e por isso são amplamente utilizados como inseticidas. Em artrópodes, os ecdisteróides expressam suas características principalmente através do receptor nuclear de ecdisona (EcR) (Laudet, 1997). A resposta requer um parceiro, um receptor nuclear, o “ultraespicle” (USP), para dimerizar com EcR e ser ativado pelos ecdisteróides.

Figura 15: Estrutura da 20-hidroxicdisona (fitoecdisona). Note longa cadeia alquil na posição C17, sítios de hidroxilação na posição C14.

Lafont (2003) aplicou fitoecdisteróides extraídos de *Ajuga iva* em larvas de mariposas *Ploidea interpunctella* e os resultados mostraram que os fitoecdisteróides tiveram efeitos negativos na evolução do peso das larvas nos primeiros dias. Com o passar dos dias as larvas foram perdendo peso e 10 dias após o tratamento a perda de peso foi de 30% a 40% em larvas alimentadas com fitoecdisteróides. A função dos fitoecdisteróides nas plantas ainda não é muito evidente, mas fortes indícios apontam para algum grau de proteção contra insetos fitófagos não adaptados e/ou nematóides do solo (Sun *et al.*, 2010). Além disso, a concentração e a natureza química das fitoecdisonas podem variar de acordo com a parte da planta, o seu habitat, com a estação do ano, período vegetativo e estágio de desenvolvimento (Dinan, 1992).

Cho e Itami (2004) substituíram o suprimento de colesterol na ração de camarões *Marsupenaeus japonicus* por extrato de *Achirantes* (*Amaranthacea*). Notaram que os animais que receberam extrato na alimentação cresceram 29% a mais que os animais controle, concluindo que o extrato da planta *Achirantes*, que contém fitoecdisona, tem potencial para substituir suplementos naturais de colesterol e servir como estimulante natural do crescimento em ração para camarão.

7.1. Efeitos anabólicos

Fitoecdisteróides são conhecidamente benéficos em tratamento terapêutico em mamíferos, e suas propriedades medicinais incluem bioatividades anabólicas. Syrov e Kurkamov (1976) observaram ganho de massa em músculos de ratos após administração de fitoecdisteróides durante 10 dias, e aumento no total de proteínas nos fígados desses ratos, indicando atividade anabólica.

Uma das mais interessantes propriedades dos ecdisteróides é a habilidade em incrementar tamanho, conteúdo de proteínas e massa muscular, também conhecido como atividade anabólica (Syrov *et al.*, 1996).

II. Objetivos

- Extração da fitoecdisona de *Pfaffia paniculata* e determinação da pureza do extrato.
- Testar a bioatividade do extrato de *Pfaffia paniculata* (fitoecdisona) na indução da muda em *Artemia salina* como sistema modelo experimental.
- Comparar o extrato de fitoecdisona com a ecdisona sintética produzida comercialmente na indução da muda em *Artemia salina*.

III. Materiais e Métodos

1. Modelo de Estudo

Para todos os experimentos, os náuplios foram obtidos a partir da eclosão de cistos comercializados pela marca INVE. Foi utilizado um vaso de vidro com 2L (Figura 16) de água deionizada com sal marinho artificial (Red Sea Salt, pH 8,3). Foi utilizado uma concentração de 40 ppm para evitar fungos no meio, a aeração artificial constante, fotoperíodo (24D – 0N) para induzir a eclosão dos cistos e temperatura em 26°C, para obter eclosões sempre com o mesmo período de duração, 20h. Após a eclosão, 250 ml da água do aquário foi filtrada a vácuo com película de celulose (Milipore) para posteriormente ser utilizada nos poços experimentais e não causar nenhum tipo de estresse osmótico aos náuplios.

Figura 16: Vaso para eclosão dos cistos de *Artemia salina*. Sistema composto por: vaso de vidro 2l, termostato (26°), suprimento de oxigênio e iluminação constante.

2. Extrato vegetal

A *Pfaffia paniculata* (Amaranthacea) é um vegetal nativo brasileiro conhecido como Ginseng Brasileiro (Figura 17). O extrato vegetal foi preparado inicialmente no laboratório de produtos naturais do Instituto Mackenzie junto com o Professor Marcelo Penna a partir das raízes secas e rasuradas de *Pfaffia paniculata*, adquiridas da empresa de fitofármacos Santos Flora. A metodologia para extração e purificação de fitoecdisona a seguir, foi proposta por Barthori (1998).

Figura 17: *Pfaffia paniculata*. Detalhe aponta para as raízes, parte utilizada para extração de fitoecdisona.

O método se inicia com a extração metanólica (MeOH) em Soxhlet por 4 horas das raízes de *Pfaffia paniculata*. O extrato metanólico foi evaporado em baixa pressão em Rotavap (BUCHI Fisaton F250) e ressuspenso em água+NaCl (2:1). Nessa solução, foi adicionado acetato de isobutila para particionar os componentes de menor polaridade

contidos na fase orgânica. A solução resultante foi extraída com n-butanol (n-BuOH) para isolamento dos ecdisteróides. O solvente (n-BuOH) foi separado e evaporado em 20 alíquotas diferentes em Speedvac (Eppendorf Concentrator Plus) evidenciando um extrato sólido de cor marrom escura de odor intenso. A partir dessa fase, uma pequena amostra foi preparada para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para análise e validação da amostra. Outra amostra foi enviada para o Professor colaborador René Lafont para quantificação dos ecdisteróides contidos no extrato.

2.1. Análise por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência)

A análise cromatográfica do extrato foi realizada no Laboratório de Química do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

Uma amostra de 1mg/mL^{-1} de fase em n-BuOH foi submetida à análise por CLAE empregando-se uma coluna de fase reversa (coluna Dionex C18, 5 μm , 120 $^{\circ}\text{A}$, 4,6x250 mm) e detector UVD340U. A eluição cromatográfica foi iniciada com $\text{H}_2\text{O}:\text{HAc}:\text{MeOH}$ (70:2:30) terminando com 100% de MeOH em 45min. sob fluxo de $0,7\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e detecção nos comprimentos de onda de 225, 250, 280 e 300nm. O resultado da análise pode ser verificado no tempo de retenção do pico majoritário da fase em n-BuOH (esq.) e da fitoecdisona padrão (dir.) (Figura 18).

Fig. 18 Cromatograma da fase em n-BuOH de *Pfaffia paniculata* (esq.) da fitoecdisona padrão (dir.).

2.2. *Pfaffia paniculata*

O extrato de *Pfaffia* foi quantificado e determinada sua concentração de fitoecdisona no Laboratório do Professor René Lafont na Universidade de Paris “Pierre et Marie Curie” por CLAE, indicando que o extrato contém 32% de fitoecdisona (ver abaixo). Todo o experimento com aplicação do extrato de *Pfaffia paniculata* em *Artemia* foi desenvolvido e realizado no laboratório de Biologia Celular de Invertebrados Marinhos do Instituto de Biociências da USP (Universidade de São Paulo). Os experimentos utilizaram concentrações diferentes do extrato, definidas após teste de toxicidade e determinação da concentração letal.

2.2.1. Validação e quantificação do conteúdo de 20HE

Uma amostra de 22.7mg de extrato foi processada no laboratório BIOSIPE (ER3) na Universidade de Paris “*Pierre et Marie Curie*” por René Lafont em março de 2011, e dissolvida em 0,5ml de Ethanol. Uma diluição de 100x foi preparada e 50ul foi injetado no HPLC em coluna ACE C18 150mm de comprimento, 4,6mm i.d. Fase móvel: Acetonitrila-

isopropanol (5:2) / água contendo 0.1% de ácido trifluoracético [17:83 v/v]. A análise determinou que o extrato, contém 32% de 20E e identificou também a presença de outros seis compostos (não determinados).

2.2.2. Teste de letalidade

O teste de letalidade (Figura 19) do extrato *Pfaffia paniculata* em náuplios de *Artemia* foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular de Invertebrados Marinhos da USP para definir quais doses resultariam em mortes por intoxicação e padronizar concentrações de baixa toxicidade (Sthephan, 1977). Os 16 náuplios selecionados logo após a eclosão foram triados com pipeta Pasteur para uma placa de petri. A partir dessa etapa, foram transferidos para as placas de cultura contendo água do mar e extrato vegetal (fitoecdisona) completando 1ml em cada poço. As placas continham diferentes concentrações do extrato (0,01 - 0,7mg/ml) (Figura 20) e um grupo controle onde nada foi aplicado. Os animais foram mantidos em uma incubadora a 30°C, em fotoperíodo (0D – 24N). Após 24h, os náuplios mortos foram contabilizados e calculada a porcentagem que matou 50% da população experimental.

1	2	3	4	5	6	7	8
0,00	0,01	0,05	0,1	0,15	0,3	0,6	0,7

Figura 19: Tabela de concentrações. Modelo da placa de cultura com as concentrações utilizadas no teste de letalidade.

3. Exposição à fitoecdisona

Três placas de 24 poços foram preparadas com água do mar e extrato vegetal completando 1ml em cada poço. Inicialmente foram

triados 96 náuplios e dispostos em uma placa de cultura para observação do estágio certo para aplicação do extrato (D_0). No momento que 50% (48 náuplios) estavam nos estágios C_3 e D_0 , foram transferidos do aquário (vaso) novos náuplios experimentais. Foram triados cinco náuplios por concentração e levados à incubadora até o momento da primeira ecdise. Os náuplios concluem sua primeira muda em aproximadamente 10 horas, e as placas foram deixadas na incubadora por 15 horas, tempo confortável para permitir o maior número de ecdises (Figura 20). Após esse período, os animais foram levados à temperatura de -4°C para serem anestesiados e posteriormente fixados com álcool 70°.

	1	2	3	4	5	6
A	0,00	0,01	0,05	0,10	0,15	0,3
B	0,3	0,15	0,10	0,05	0,01	0,00
C	0,00	0,01	0,05	0,10	0,15	0,3
D	0,3	0,15	0,10	0,05	0,01	0,00

Figura 20: Concentrações de extrato. As concentrações foram distribuídas de forma casualizada em uma placa de cultura de 24 poços.

4. Exposição à ecdisona sintética

A ecdisona sintética foi cedida pelo Professor René Lafont da Universidade de Paris “*Pierre et Marie Curie*”. Foi diluída em água do mar a 40ppm a 30% e utilizado o mesmo modelo e as mesmas concentrações do experimento com a fitoecdisona.

5. Microscopia

Os náuplios, após fixados, foram colocados em placas de cultura, tiveram os estágios da muda determinados e foram fotografados para morfometria (Figura 21). A microscopia óptica simples foi realizada em microscópio invertido NIKON (Eclipse TE300).

Figura 21: Náuplios de *Artemia* em aumento de 100x. Animais foram mensurados através do cálculo da área de cada animal. Foto: Luca Mantovanelli

IV. Resultados

1. Teste de letalidade

O teste de letalidade (Figura 22) determinou a concentração capaz de matar 50% de uma população experimental em 24h a CL_{50} (Stephan, 1977). Após determinada a CL_{50} por teste de correlação (relação de interação entre as concentrações e o número de animais mortos) realizado no programa Graphpad 5.01 (95% IC), foram determinadas também as concentrações 0,01- 0,3(mg/ml) que foram utilizadas nos náuplios para garantir a eficácia do extrato sem interferir na sobrevivência dos animais.

Após todos os animais serem estagiados por meio de microscopia óptica e comparados ao grupo controle, os dados brutos dos estágios da muda de cada animal foram analisados no programa Prism Graphpad 5.01. Foi realizado uma ANOVA de 2 vias para calcular a diferença entre os dois fatores analisados, concentração de fitoecdisona e número de mortes.

Figura 22: Teste de letalidade. Relação da concentração do extrato e a porcentagem de náuplios mortos após 24h. N=16 por concentração.

2. Exposição à ecdisona sintética

No experimento com a ecdisona sintética (Figura 23) existe uma clara diferença entre os fatores (concentração e número de ecdises). Comparando as concentrações com o grupo controle, observa-se uma diferença significativa entre a quantidade de animais que realizaram a primeira muda e continuaram o segundo ciclo da muda (instar II), e a quantidade de animais que não realizaram a muda ou estavam na ecdise quando expostos à ecdisona sintética.

Figura 23: Relação entre as concentrações da ecdisona sintética (mg/ml) e número de animais em cada estágio de muda (N experimental). As barras demonstram as médias dos animais em cada estágio da muda e os erros padrões. Significância* ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$) e * ($P < 0,001$).**

Número de animais
(*Artemia salina*)

Estágios do ciclo da
muda

- Pré-muda - D0
- Pré-muda - D3
- Ecdise - E
- Pós-muda - A
- Pós-muda - B
- Intermuda - C1

Comparando o grupo controle com as diferentes concentrações, nenhuma concentração mostrou atividade de estímulo sobre o estágio da muda. Todas as concentrações apresentaram efeito inibitório nos diferentes estágios da muda (Figuras 23). A concentração de ecdisona a 0,01mg/ml quase não apresentou náuplios que concluíram a primeira ecdise, enquanto no grupo controle um número significativo (ANOVA $P < 0,05$) de animais já estavam no estágio seguinte (instar II), na intermuda, mostrando que a presença da ecdisona sintética atrasou o ciclo da muda em algumas concentrações. A concentração de 0,1mg/ml (Figura 23) apresentou maior atividade inibitória dentre todas as concentrações, enquanto a concentração de 0,15mg/ml foi a que menos retardou o ciclo de muda.

3. Exposição à fitoeecdisona

O gráfico de interação entre a fitoeecdisona e os estágios da muda (Figura 24) mostram que não houve interação significativa entre os dois fatores avaliados. Nenhuma concentração exerceu algum efeito biológico evidente em relação ao controle. Os dados apresentaram muita variação em torno da média.

Figura 24: Número de animais nos diferentes estágios de muda (N experimental) em relação as diferentes concentrações de fitoecdisona (mg/ml). As barras apresentam as médias e os erros padrões dos indivíduos em cada estágio de muda.

4. Morfometria (fitoecdisona)

A análise morfométrica dos náuplios utilizou todos os animais experimentados que realizaram a muda (Estágios: E-A-B-C) e foram expostos à fitoecdisona. Foram mensurados 24 animais em cada concentração no Java ImageJ utilizando uma escala de 50 micrômetros. Os animais foram mensurados por área através das fotos registradas na câmera digital (NIKON Eclipse TE300).

Foi observado um sensível, porém significativo, ganho de tamanho em quatro concentrações em que os náuplios expostos à fitoecdisona. Após lançar os dados brutos no Prism Graphpad, foi realizado ANOVA de 1 via para calcular a diferença do tamanho dos animais experimentados com fitoecdisona e analisar se houve incremento de tamanho após a 1ª ecdise (Figura 25).

Figura 25: Relação entre concentrações de fitoecdisona (mg/ml) e o tamanho dos náuplios após a primeira muda (micrômetros). Barras verticais são as médias de tamanho com erro padrão, C+, grupo controle, N=24 por concentração. (*) indica significância do incremento ($P < 0,05$), (**) $P < 0,01$, (***), $P < 0,001$

Nas concentrações 0,01mg/ml e 0,05mg/ml o ganho de tamanho foi significativo (Figura 25; $P < 0.001$) em relação ao controle. Na análise estatística gerada é possível notar que existe uma significativa diferença, principalmente quando comparamos o crescimento dos náuplios submetidos a concentrações de 0,01mg/ml e 0,05mg/ml, e também nas concentrações 0,1 e 0,15 mg/ml ($P < 0,01$). A concentração de 0,3mg/ml não foi significativa para incremento de tamanho em relação ao controle.

V. Discussão

1. Exposição à ecdisona sintética

No experimento com ecdisona sintética, houve efeito significativo em relação ao número de animais que fizeram a muda, sendo esse efeito inibitório ou de atraso da muda. Todas as concentrações mostraram que a presença da ecdisona sintética retardou a primeira ecdise dos náuplios. Houve interação significativa entre a ecdisona e os diferentes estágios da muda, principalmente nos estágios compreendidos entre a ecdise (E) e a intermuda (C_1). A pré-muda recente (D_0), estágio em que o extrato foi adicionado, e pós-muda tardia (D_3), são estágios onde as alterações de responsividade na resposta do órgão Y ao HIM (hormônio inibidor da muda) determinam o “timing” da muda (Chang e Mykles, 2011). De acordo com a literatura, o estágio pré-muda (D_0) inicia-se com uma redução da concentração do HIM, levando o órgão Y, que possui receptores específicos para HIM, a transitar entre o estado basal para o estado ativado. Dessa forma, ocorre um aumento da concentração de ecdisteróides na hemolinfa, iniciando a apólise (Chang e Mykles, 2011).

A ativação do órgão Y no estágio D_0 (momento correto para aplicação exógena de ecdisteróides) é o gatilho para o decréscimo na liberação de HIM pela glândula do seio. Essa repressão do órgão Y pela inativação dos componentes de sinalização do HIM (receptores associados à proteína G) resulta em aumento da capacidade de biossíntese de ecdisteróides (ecdisteroidogênese). O NOS (óxido nítrico), um mensageiro secundário, é fosforilado e inativado na ausência de MIH, diminuindo assim a afinidade do órgão Y ao HIM (Lee et al., 2007).

2. Exposição a fitoecdisona

A resposta negativa para estímulo da muda pela fitoecdisona pode estar relacionada com a responsividade do órgão Y ao HIM. A capacidade do órgão Y em responder às concentrações de HIM durante o ciclo da muda, principalmente na pré-muda, pode ser o caminho para entender a bioatividade do extrato de fitoecdisona. Na pré-muda recente, um aumento nos níveis de ecdisona na hemolinfa ocorre devido a uma diminuição da sensibilidade do órgão Y ao HIM (Webster, 1998). É neste estágio do ciclo da muda que uma adição exógena de ecdisteróides pode causar algum efeito sobre o ciclo da muda, pois a repressão do órgão Y na pré-muda tardia envolve uma inibição por retroalimentação negativa pelos ecdisteróides. Ao final da pré-muda ocorre um súbito decréscimo nos ecdisteróides da hemolinfa logo antes da ecdise (Skinner 1985). Essa queda aparenta determinar o “timing” da ecdise, ou seja, se ocorre uma elevação artificial de ecdisona durante a pré-muda tardia, isso pode alterar a ecdise. Resulta, desse modo, em aumento da excreção de ecdisteróides e em diminuição da produção do mesmo (Chang e Mykles, 2011). Após os experimentos com aplicação de fitoecdisona, é possível entender que, apesar de tomada a precaução em aplicar o extrato no momento certo, na pré-muda (D_0), é possível que nem todos os animais estivessem no mesmo estágio da muda e a resposta ao extrato pode ter sido diferente em alguns animais.

Chung e Webster, (2003) observaram um declínio na responsividade do órgão Y ao HIM durante a pré-muda D_2 e na pré-muda tardia, aquela que precede a muda, em caranguejos e lagostas. Observações em experimentos mostram que inibindo a PDE (fosfodiesterase), a ecdisteroidogênese também é suprimida, sugerindo que a atividade intracelular da PDE pode estar envolvida na responsividade do órgão Y (Mattson e Spaziani, 1985).

Não houve interação bioativa significativa nos experimentos com fitoecdisona nos estágios da muda, mas é possível afirmar que houve reconhecimento da fitoecdisona pelos náuplios experimentados. Isso poderá ser mais claramente explicado na morfometria. Baldwin *et al.* (2009) utilizaram ponasterona A (fitoecdisteróide extraído do *Podocarpus Nakaii*) em *Daphnia* para observar os efeitos na reprodução, ciclo da muda e vitelogênese. Observaram que em concentração de 260nM, o fitoecdisteróide da ponasterona possui afinidade com receptores celulares causando morte prematura e mudas incompletas. Os resultados são difíceis de interpretar aqui, mas é provável que os receptores para a ecdisona tenham sido sensibilizados pela fitoecdisona de *Pfaffia paniculata*, mas não exerceram efeito de estímulo a uma ecdise precoce. Cho e Itami (2004) utilizaram um extrato de *Achirantes* contendo fitoecdisona e observaram um aumento no tamanho de camarões. É provável que a fitoecdisona da *Pfaffia paniculata* aqui utilizada possa não ter nenhuma atividade bioativa ou alguma outra que esteja relacionada no controle ou na sincronização do ciclo da muda, pois os gráficos não mostram efeito dose resposta significativa nos estágios de muda. De acordo com Dinan (2001), a natureza química das fitoecdisonas pode variar, de acordo com a parte da planta, com a estação do ano e o habitat dessa planta. As características próprias da *Pfaffia paniculata*, a natureza química desta fitoecdisona, podem estar interferindo na interação do extrato e na resposta dos crustáceos. Não foi encontrada uma literatura que pudesse confirmar a diferença da ação de diferentes extratos com fitoecdisonas em crustáceos. Deve-se também levar em conta o fato desse extrato estar somente com 32% de fitoecdisona e não se sabe do que é composto o restante de 68% que foi extraído da planta e que poderiam ter um efeito sobre os náuplios.

Desde 1992, Lafont, armazena fórmulas de fitoecdisteróides no site *ecdibase.org* para reunir e classificar uma grande diversidade desses compostos. Os vegetais sintetizam esses metabólitos de formas diferentes para cada tipo de organismo relacionado. As diferentes formas das fitoecdisonas, segundo Dinan (2006), podem ser o resultado da coevolução entre os vegetais e os insetos terrestres, que a princípio não têm ligação com os crustáceos. Porém, é pouco provável que essa coevolução inseto-planta seja o motivo da resposta negativa para o estímulo do ciclo da muda, pois houve efeito de atividade na *Artemia* pela fitoecdisona (causando um aumento no tamanho dos animais após a ecdise). Outros fatores podem estar relacionados com essa atividade. Lewontin (2000) afirma que a evolução dos insetos e das plantas não é apenas uma série de adaptações passivas, e sim, uma evolução como uma construção ativa na qual o ambiente e organismos interagem e transformam-se reciprocamente, caracterizando a coevolução.

É necessário uma análise mais detalhada do extrato de *Pfaffia paniculata* para entender sua ação em crustáceos. Assim como sua ação como inibidor da alimentação em organismos fitófagos, os metabólitos secundários sintetizados pelos vegetais têm como sua função principal atingir insetos fitófagos de forma eficiente, muitas vezes modificando as características do animal, ou agindo diretamente as vias de sinalização celular (sinalização hormonal) do organismo relacionado. Podem também agir como disruptor de maneira geral, retardando funções do metabolismo normal do inseto (Lovatto *et al.*, 2012).

3. Morfometria

A análise da morfometria dos animais expostos à fitoecdisona que realizaram a ecdise, mostra que é possível formular a hipótese sobre a sensibilização da fitoecdisona de *Pfaffia paniculata* sobre os náuplios,

pois foi observado significativo incremento no tamanho dos náuplios em quatro concentrações diferentes de fitoecdisona. Aparentemente o extrato causou um efeito de atraso sobre o ciclo da muda (Dinan, 2006). Pelo fato dos animais atrasarem a ecdise em relação ao controle, provavelmente esse atraso levou a um aumento no acúmulo de reservas nos animais, exatamente porque ficaram mais horas para fazer a ecdise e consequentemente maior tempo utilizando as reservas energéticas, levando a uma ecdise atrasada e com um maior aumento de tamanho. É provável que a fitoecdisona tenha promovido uma maior síntese de proteínas, pois se sabe que a administração de 0,5 – 50mg/kg induz um efeito anabólico em mamíferos (Syrov *et al.*, 2003). O incremento de tamanho pode ser devido ao ganho de massa. Chermnykh *et al.* (1988) observaram os efeitos anabólicos em ratos, administrados com 0,25mg/kg de 20HE (intraperitoneal). Os ratos foram submetidos à natação forçada, levando ao incremento na síntese de proteínas miofibrilares.

Assim como no trabalho de Cho e Itami (2004), onde foi observado ganho de peso em camarões *Marsupanaeus japonicus*, o incremento de tamanho em relação aos animais controle foi notável nesse experimento. Se esse ganho de tamanho for confirmado em testes futuros, o extrato de *Pfaffia paniculata* pode ser uma ferramenta para ser aplicada em cultivo de crustáceos, mostrando na prática a importância da nossa flora em relação a compostos complexos, muitas vezes endêmicos, e a importância e aplicabilidade da Fisiologia Comparada na solução dos desafios da sustentabilidade.

VI. Conclusões

1. O preparo do extrato atingiu o seu objetivo. Foi extraído das raízes e apresentou 32% de 20-hidroxiecdisona, composto análogo ao hormônio da muda dos artrópodes.
2. O extrato vegetal de *Pfaffia paniculata* não apresentou a eficiência esperada em relação ao estímulo da muda, mas foi capaz de sensibilizar os náuplios de *Artemia*, causando um importante incremento no tamanho dos animais.
3. A ecdisona sintética a 32% como padrão de comparação com a fitoecdisona extraída de *Pfaffia* mostrou efeito sobre os náuplios, atrasando a ecdise.
4. O extrato de *Pfaffia paniculata* pode exercer efeitos semelhantes em organismos de outros grupos como em Siri-azul (*Callinectes sapidus*), podendo contribuir para o desenvolvimento da produção de Siri-mole (“soft crab”) através do aumento de tamanho desses animais após a ecdise.

VII. Referências Bibliográficas

Baldwin, W. S., Bailey, R., Long, Kristen, E., Klaine, S. Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteoid exposure in *Daphnia*. **Environmental Toxicology**, 2009, vol. 20, Issue 7, pag. 1567-1569.

Barthori, M. Purification and characterization of plants ecdysone of *Silene* species. **Trends in Analytical Chemistry**, 1998, vol. 17. 324-381.

Boschi, E. E. Los crustáceos decapodas brachyura del litoral bonaerense. **Boletim do Instituto de Biologia Marina (Mar del Plata)**, (1964) 164pp, 1-34.

Butenandt, A., Karlson, P. Pheromones (ectohormones) in insects. **Annual Review of Entomology**, 1959 vol. 4: 39-58.

Chang, E. S. Invertebrate hormones and behavior. **Encyclopedia of Animal Behavior**. Academic Press, Oxford, 2010, p.209-215.

Chang, E. S., Mykles, L.D., Regulation of crustacean moult: a review and our perspectives. **General and Comparative Endocrinology**, 2011, vol. 172, issue 3, pag, 323-330.

Chung, S., Webster, S. G., Moulting cycle-related changes in biological activity of Moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. **European Journal of Biochemistry**, 2003. Vol. 270, issue 15, p. 3280-3288.

Criel, G. R. J., Walgrave, H. R. M. A. Moulting in *Artemia salina* according to Drach's system. **Journal of Morphology**, 1989, vol. 199 (1) pag. 41-52.

Dinan, L. The analyses of phytoecdysteroids in single (preflowering stage) specimens of fat hen *Chenopodium -Album*. **Phytochemical Analysis**, 1992, vol. 3, pag. 132-138

Dinan, L., Savchenko, T., Whiting, P. On distribution of phytoecdysteroids in plants; **Cellular and Molecular Life Science**, 2001, vol. 58, pag. 1121-1132.

Dinan, L., Lafont, R., Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals, **Journal of Endocrinology**, 2006, vol. 191, pag. 1-8.

Drach, P., Mue et cycle d'intermue chez les crustacés **Decápodes** annuels. **Institute Oceanographie Paris**, 1939, vol. 19, pag. 103-391.

Entis, E. Aquabiotech: a blue Revolution? **World Aquaculture**, 1997, vol. 28, pag. 12-15.

FAO - Figis – Fisheries and aquaculture Information and statistics service – 29/06/2011. (<http://fao.org> acessado em [15/07/2012](http://fao.org)).

FAO - State of World Aquaculture, 2006. **FAO technical paper 500, Food and Agriculture organization of the United Nations, ROME (<http://fao.org> acessado em 15/07/2012).**

Freeman, J. A., Kilgus, G., Laurendeau, D., Perry, H. M., Postmoult and intermoult stages of *Callinectes sapidus*. **Aquaculture**, 1987, vol.61, Issues 3-4, pag. 201-209.

Freeman, J. A., Molt increment, molt cycle duration, and tissue growth in *Palaemonetes pugio* Holthuis larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1990, vol. 143, Issues 1-2, pag, 47-61.

Glen Cho, D. V. M., Itami, T. Plant extract as cholesterol substitute in shrimp. **Aqua Feeds: Formulation & Beyond**, 2004 Vol. 1, Issue 2.

Greenaway, P., Calcium balance and moulting in the crustacean. **Biological Reviews**, 1985, vol. 60, Issue 3, Pag. 425-454.

Han, D. W., Watson, R. D. Trimeric G proteins in crustacean (*Callinectes sapidus*) Y-organ: occurrence and functional link to protein synthesis. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, 2005, vol. 303A, Issue 6, pag. 441-447.

Hopkins, J. S. Aquaculture sustainability: avoiding the pitfalls of the Green Revolution. **World Aquaculture**, 1996, vol. 27, pag. 13-15.

Huber R., Hoppe W. Die Kristall and molekulstrukturanalyse des insektenverpuppungs hormones ecdyson mit der mit der automatisierten

faltmolekulmethode. **Chemysche Barische**, 1965, vol. 98, pag. 2403 – 2404.

Hampahire, F., Horn, D., Structure of crustecdysone, a crustacean moulting hormone. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 1966, vol. 33, Issue 12, pag. 1327-1338.

Jenkin, P. M., Hinton, H. E. Apolysis in arthropods Moulting cycle. **Nature**, 1966, vol. 211, Issue 5051, pag. 871.

Kakkar, R., Raiu, R. V. S., Shaarma, R. K. Calmodulina-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1). **Cellular and Molecular Life Sciences**, 1999, vol. 55, issue 8-9. P. 1164-1186.

Kang, B. K., Spaziani, D. Uptake of High-density lipoprotein by Y-organ of the crab, *Cancer antennarius*. I. characterization *in vitro* and inhibitory and stimulatory effects. **Arquives of Insect Biochemistry and Physiology**, 1995, vol. 30, issue 1, pag. 61-75.

Kim, H. W., Batista, L. A., Hoppes, L. J., Lee, K. J., Mykles, D. L. A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*. **The Journal of Experimental Biology**, 2004, vol. 207, p. 2845-2857.

Lachaise, F., Meister, Marie-F., Hétru, C., Lafont, R., Studies on the biosynthesis of ecdysone by the Y-organs of *Carcinus maenas*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 1986, vol. 45, issue 2-3, p. 253-261.

Lafont, R., Horn, D. H. S. Phytoecdysteroids: structures and occurrence. In **Ecdysone: from chemistry to mode of action**, G Thieme Verlag, New York, 1989. Pag. 39-64

Lafont, R. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. **The Journal of Insect Science**, 2003. Vol. 3, pag. 7.

Laudet, V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral organ receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, 1997, vol. 19, pag. 207-226.

Lee, S. G., kim, H. Y., Mykles, D. L., Guanylyl cyclases in the land crab *Gecarcinus lateralis*: cloning of soluble (NO-sensitive and intensive) and membrane receptor forms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2007, pag. 332-344.

Lewontin, R., **Evolution**. Digital Library, Perseus Books Cambridge, MA, USA, 2000 ISBN: 0-7382-0049-2.

Lovatto, P. B., Schiedeck, G., Mello-Garcia, F. R. A Interação co-evolutiva entre insetos e plantas como estratégia ao manejo agro-ecológico em agrossistemas sustentáveis. **Interciência**, 2012, vol. 37 n° 9, pag. 657-663.

Lucas, J. S., Southgate, P. C., **Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants**, 2º second edition. Wiley-Blackwell 2012.

Martinez, C., Bianchini, A. Metallothionein-like proteins in the blue crab: Effect of water salinity and ions. **Comparative Biochemistry**

and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2012, vol. 152, issue 3, pages 366-371.

Mattson, M. P., Spaziani, E. Cyclic AMP mediates the negative regulation of Y-organ ecdysteroid production. **Molecular and Cellular Endocrinology, 1985, vol. 42 issue 2. p. 185-189.**

Mattson, M. P., Spaziani, E. Regulation of crab Y-organ steroidogenesis *in vitro*: evidence that ecdysteroid production increase through activation of cAMP phosphodiesterase by calcium-calmodulin. **Molecular and Cellular Endocrinology, 1986, vol. 48, 135-151.**

Mattson, M. P., Spaziani, E. Demonstration of Kinase C activity in crustacean Y-organs, and partial definition of its role in regulation of ecdysteroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology, 1987, vol. 49, Issue 2-3, pag. 159-171.**

McLaughlin P.A, Camp D.K, Eldredge L.G, Felder D.L. Goy J.W, Hobbs III H.H, Kensley B., Lemaitre R., Martin J.W. Common and scientific names of Aquatic invertebrates from the United States and Canada: Crustacean. Order Decapoda. **American Fisheries Society Special Publication 31, 2005, Bethesda Maryland, 545pp.**

Michael, A. S., Thompson C. G., Abramovitz, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. **Science 1956, vol. 123, 464-468.**

Nakatsuji, T., Sonobe, H. Watson, R. D. Molt-inhibiting hormone-mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): involvement of cyclic GMP and cyclic

nucleotide phosphodiesterase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2006, vol. 253, 76-82.

Nakatsuji, T., Lee, C., Watson, R. D. Crustacean molt-inhibiting hormone: Structure, functions, and cellular mode of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2009, part A, 1532 p. 139-148.

Parra, A.L., Comparative study of the assay of *Artemia salina* and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, 2001, vol.8., 395-400

Rathbun, M. J. The genus *Callinectes sapidus*. RATHBUN, 1896. **Proceedings of the United States National Museum**, 1896, vol. 18 (1070): 349-375, 17pls.

Ruppert E. E., R.S.Fox, R.D. Barnes. **Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach**. Brooks Cole, Belmont CA., (2003). 963pp.

Sanchez-Fortún, S., Sanz-Barrera, F., Barahona-Gomariz, M. V. Acute toxicities of selected insecticides to the aquatic arthropod *Artemia salina*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 1995, vol. 54, Issue 1, 76-82.

Sefiani, M.; Le Caer, J.; Sovez, D. Characterization of hyperglycemic hormone on molting inhibiting activity from sinus gland of the peaneid shrimp *Penaeus vannamei*. **General Comparative Endocrinology**, 1996, vol. 103, 41-53.

Shechter, A., Tom, M., Yudlovki, Y., Weil, S., Chang, S. A., Chang, E. S., Chalifa-Caspi, V., Berman, A., Sagi, A. Search for hepatopancreatic ecdysteroid-responsive genes during the crayfish moult cycle: from a single gene to multigenicity. **Journal of Experimental Biology**, 2007, vol. 210, 3525-3537.

Skinner, D. Interacting Factors in the control of the crustacean moulting cycle. **American Society of Zoologists**, 1985. Vol. 25, issue 1, 275-284.

Spaziani, E., Havel, R.J., Hamilton, R. L., Hamilton, D. A., Hardman, D. A., Stoudemire, J. B., Watson, R. D. Properties of serum high-density lipoprotein in the crab, *Cancer antennarium*, Stimpson. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1986, vol. 85b: 307-314.

Spaziani, E., Mattson, M.P., Wang, W. L., McDougall, H. E. Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in crustacean Y-organs. **American Zoologist**, 1999, vol. 39 p 495-512.

Stephan, C. E. Methods for calculations of LC₅₀, Aquatic toxicology and hazard evaluation, ASTM STP 634, F.L. Mayer and J.L. Hamelink. **American society for testing and materials**, 1977, pp. 65-84.

Sun, H., Dinan, L., Lafont, R., Suksamram, A., Griesinger, C., Reinscheid, G., Lapenna, Silva. Absolute configuration and docking study of canescensterone, a potent phytoecdysteroid, with non-lepidopteran ecdysteroid receptor selectivity. **European Journal of Organ Chemistry**, 2010, issue 30, 5791 – 5799.

Syrov, V. N., Kurmukov, A. G., Anabolic activity of phytoecdysone-ecdysterone isolated from *Rhaponticum carthamoides*. **Farmakologiya I Toksikologiya**. 1976, vol.39, issue 6, pag: 690-693.

Syrov, V. N., On Adaptogenic Properties of Phytoecdysteroids. **Proceedings of the Uzbek Academy of Science**, 1996. Vol. 11, 61-64.

Syrov V. N., Saiitkulov A. M., Khushbaktova Z. A., Saatov Z. Isolation of phytoecdysteroids from *Ajuga turkestanica* and their interferon-inducing activity. **O'zbekiston Respublikasi Fanlar Akademiyasining Ma'ruzalari**, 2003, vol. 2, 53-57.

Taylor, H.H., Taylor, E.W., 1992. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. In: Harrison, W.F., Humes, A.G. (Eds.), Microscopic Anatomy of Invertebrates. **Decapod Crustacea**, vol. 10. **Wiley-Liss, New York**, pp. 203–293.

Valenti, W. C. Aquicultura sustentavel. In: Congresso de Zootecnia, n° 12, Vila Real, Portugal, 2002: **Anais da Associação Portuguesa dos Engenheiros Zootécnicos**, pag. 111-118.

Watson, R. D., Spaziani, E., Synthesis of ecdysteroids from cholesterol by crab Y-organs and eyestalk suppression of cholesterol uptake and secretory activity, *in vitro*. **General and Comparative Endocrinology**, 1985, vol.59, Issue 1, 140-148.

Webster, S. G., Neuropeptides inhibiting growth and reproduction in crustaceans. In: Coast, G. M., Webster, S. G., (Eds), Recent Advances

in Arthropod Endocrinology. **Cambridge University Press, Cambridge,**
1998, pag. 33-52