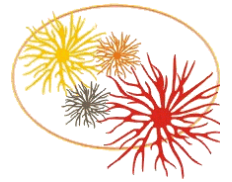




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



**ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS:  
UM ESTUDO EM *GRYLLUS ASSIMILIS***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aline Maciel Bueno Zacouteguy

Rio Grande - RS, Brasil

Agosto de 2020

**ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS:  
UM ESTUDO EM *GRYLLUS ASSIMILIS***

Aline Maciel Bueno Zacouteguy

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Daniela Martí Barros

**Coorientador:** Prof. Dr. Duane Barros da Fonseca

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Gisele Eva Bruch

**DEDICO:**

*À minha avó Eva Maciel Bueno (em memória) por todo amor e incentivo ao “casamento com os livros”.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e toda espiritualidade pela força, luz e proteção que me foi concedida em cada segundo da minha caminhada.

Às minhas orientadoras Dra. Daniela Martí Barros e Dra. Gisele Eva Bruch por todas nossas reuniões, *skypes*, mensagens, ligações e todo o tempo dedicado a este trabalho, foi uma honra aprender com mulheres fortes e inteligentes como vocês. Obrigada por terem topado o desafio de trabalhar com grilos e pelas infindáveis contribuições para o surgimento dessa dissertação.

Ao meu orientador Dr. Duane Barros da Fonseca por ter me “resgatado” no corredor do ICB quando eu estava em busca de orientadores e tentando entender como funcionava a pós graduação. Obrigada é uma palavra pequena para expressar minha gratidão por toda tua ajuda, dedicação e principalmente tua infinita paciência e compreensão com as minhas inseguranças e falhas. Deixo registrado aqui minha sincera admiração, não somente pelo orientador, mas também pelo excelente professor e pessoa que és!

Ao meu anjo acadêmico Guilherme Limberger por estar comigo nas bancadas dos laboratórios, nas frustrações e comemorações dos experimentos, nas ideias, na escrita, nas angustias e risadas durante o nosso trabalho. Obrigada pelo apoio e incentivo nas nossas extensas trocas de áudios quase diárias. Sempre foi muito inspirador ver teu brilho nos olhos ao falar de ciência e sobre o vasto mundo dos insetos e eu te agradeço muito por ter compartilhado todo esse conhecimento e experiência de forma tão genuína.

À professora Dra. Ana Paula Horn e ao professor Dr. Marcos Freitas Cordeiro por aceitarem fazer parte da banca e proporcionado uma excelente manhã de aprendizados no dia da defesa com todas as suas colocações e sugestões.

À minha família pelo amor incondicional, incentivo e amparo nos momentos mais difíceis. Em especial à minha mãe Vera Bueno, por ser a principal responsável por todas as minhas conquistas, sempre fazendo o possível e o impossível por mim em todos os momentos e à minha irmã Karina Bueno, por nunca me deixar esquecer o lado bom das coisas e sempre me recordar que tudo melhora. Amo vocês!

Às minhas amigas e segunda família Anike, Gabriela, Giselle (não teve um dia sequer que eu não senti o cuidado e preocupação em cada gesto teu comigo, foi fundamental) e Paloma pelos mais de doze anos de amizade e por tanto amor e carinho mesmo com a nossa distância. Obrigada por torcerem por mim e por serem um porto seguro pra onde eu sempre posso correr.

Aos queridos colegas da sala 3 por nossa bagunça diária, risos, trocas de

conhecimentos e confraternizações. Em especial, agradeço aqueles que viraram amigos do coração e pra vida: Anieli, Larissa, Camila e Carlos, vocês são presentes que eu ganhei da Fisiologia, obrigada por tanto carinho! Obrigada Tamiris por ser parceira e amiga desde o nosso primeiro ano da graduação e por estarmos mais uma vez lado a lado (literalmente!) em mais esse desafio, compartilhando as dificuldades e medos. Agradeço a minha colega de casa Patrícia e ao vizi Luiz pelas nossas tardes de empoderamento e apoio.

Ao grupo maravilhoso que cuida/cuidou com tanto zelo e responsabilidade do nosso cultivo Kathellen, Diele, Michel e Cindy. Um obrigada mais do que especial a Giovana por ter entrado na minha vida através deles e por dedicar tanta amizade, cuidado e carinho comigo todos os dias desde então, fostes um lindo presente nessa jornada.

Aos seres de luz que Deus colocou no meu caminho, Inês e Marcelinho, eu agradeço pelas horas de conversas, apoio e por toda atenção que sempre tiveram comigo, dentro e fora da FURG, sorte minha ter conhecido vocês! Agradeço de coração a C.E.U Mensageiros do Sr. Do Bonfim por ser um local de paz, aprendizado e acolhimento nos momentos que mais precisei.

Aos caros professores do PPGCF por serem parte fundamental na minha formação. A todos os técnicos ICB bloco 2. Às técnicas do Laboratório de Histologia e Morfologia Mirian Bicho, Sabrina Pereira e Carolina Perry pelas tardes de trabalho e toda disposição e boa vontade.

À Universidade Federal do Rio Grande - FURG - por ser minha segunda casa e acolher com tanto carinho todos os alunos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ - pela concessão da bolsa de estudos.

A todos vocês, minha gratidão!

# SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
1.1. Grilo jamaicano ( <i>Gryllus assimilis</i> ).....	4
1.2. Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas Funcionalizado (f-MWCNT).....	6
1.3. Comportamento: aprendizado e memória associativa.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Objetivo geral .....	12
2.2. Objetivos específicos .....	12
<b>DELETERIOUS EFFECTS OF f-MWCNT ON BRAIN OF THE <i>GRYLLUS ASSIMILIS</i></b>	
Abstract .....	14
1. Introduction.....	15
2. Material and Methods .....	16
2.1. Experimental animals.....	16
2.2. Preparation of Multi-walled Carbon Nanotubes Dispersion .....	16
2.3. Characterization of f-MWCNT.....	17
2.4. f-MWCNT and Fipronil toxicity.....	17
2.5. Statistics.....	18
3. Results.....	18
3.1. Characterization of f-MWCNT.....	18
3.2. Toxicity of f-MWCNT and fipronil.....	20
4. Discussion .....	22
Acknowledgments .....	26
5. References .....	26
<b>OLFACTORY LEARNING IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES OF <i>GRYLLUS ASSIMILIS</i></b>	
Abstract .....	33
1. Introduction.....	34
2. Material and Methods .....	35
2.1. Experimental animals.....	35
2.2. Olfactory preference and conditioning .....	35
2.3. Memory retention.....	37

3. Results.....	37
3.1. Exploratory behaviour during preference tests .....	37
3.2. Behaviour during conditioning training.....	37
3.3. Olfactory preference .....	38
3.4. Conditioning experiments using denatonium benzoate .....	38
3.5. Conditioning experiments using salted solution (20%) .....	38
4. Discussion .....	38
Acknowledgments .....	42
5. References .....	42
<b>3. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>50</b>
3.1. Efeitos do f-MWCNT no sistema nervoso.....	50
3.2. Mortalidade.....	50
3.3. <i>Pars intercerebralis</i> .....	51
3.4. Corpos fungiformes.....	52
3.5. Paradigma olfatório.....	53
3.6. Aprendizado olfatório em adultos.....	54
3.7. Aprendizado olfatório em ninfas.....	55
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>57</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## RESUMO

*Gryllus assimilis* é uma espécie comumente encontrada em países da América Central e América do Sul, popularmente conhecido como grilo Jamaicano ou grilo preto do campo. Ao longo de todo ano é possível encontrar essa espécie em campos abertos, assim como em ambientes urbanos. Sua relevância vem se mostrando cada vez maior, por se destacar como um organismo modelo entre os insetos. Além disso, o grilo possui um sistema nervoso relativamente simples, organizado em gânglios, o que facilita o estudo de aspectos relacionados a comportamento e toxicologia. Sobre o aspecto toxicológico, o presente trabalho buscou observar os efeitos de um nanomaterial no grilo. A nanotecnologia vem desenvolvendo novos materiais que são aplicados para aperfeiçoar diferentes setores. Estes materiais, caracterizados por seu tamanho em escala nanométrica e que possuem propriedades físico-químicas diferenciadas, estão frequentemente presentes em fármacos, tecidos, baterias, produtos antimicrobianos, ferramentas de diagnóstico médico, entre tantas outras utilizações. Tendo em vista o exponencial crescimento das diversas formas de nanomateriais, cada vez mais surge a preocupação de conhecer as interações que estes compostos têm quando entram em contato com o meio ambiente e com os organismos que nele vivem. Muitos estudos trazem aspectos toxicológicos desta interação em ambientes e animais aquáticos, mostrando que os nanomateriais podem interferir no desenvolvimento das espécies estudadas, causando má formação estrutural e neural. Buscando abranger o ambiente terrestre nestes estudos, o presente trabalho verificou o efeito do nanotubo de carbono de parede múltipla funcionalizado (f- MWCNT) no sistema nervoso do grilo Jamaicano *Gryllus assimilis*. Para compreender os impactos deste nanomaterial, uma exposição a três concentrações diferentes de f- MWCNT em ninfas foi realizada, avaliando a mortalidade e efeitos deletérios através da análise histológica de duas importantes regiões do cérebro do animal, *pars intercerebralis* e corpos fungiformes, verificando a presença de núcleos picnóticos. Não foi observada mortalidade em nenhuma das concentrações testadas. Na região de *pars intercerebralis* um aumento significativo de núcleos picnóticos na concentração intermediária testada foi encontrado, enquanto a menor e maior concentração não demonstraram efeito aparente. Na região dos corpos fungiformes, não houve diferença na quantidade de núcleos picnóticos em nenhuma das concentrações testadas. Sugere-se que estas diferentes respostas no cérebro possam ser atribuídas a especificidades do nanomaterial, como seu grau de aglomeração e dispersão e também as características do grilo relacionadas ao sistema circulatório e anatomia do seu sistema nervoso, assim como sua capacidade de realizar neurogênese na região dos corpos fungiformes. O objetivo inicial do presente estudo foi investigar a influência do nanomaterial também no comportamento do grilo, utilizando um paradigma olfatório até então inédito para esta espécie. Diante da impossibilidade de validar este novo protocolo em tempo hábil, optou-se por uma análise direcionada aos mecanismos de aprendizado e memória, utilizando um protocolo modificado de comportamento olfatório associativo, sem a presença do nanomaterial, utilizando odores (menta e baunilha) pareados com reforços positivos (água) e negativos (solução salina e amarga), com objetivo de aprofundar os conhecimentos sobre o comportamento olfatório de *G. assimilis*. Foram testados machos e fêmeas no quinto ínstar de desenvolvimento e adultos machos e fêmeas. Foi encontrada em todos os grupos uma preferência natural pela baunilha. Após condicionamento, não foi constatado aprendizado nos animais adultos, no entanto, ninfas demonstraram aprendizado ao inverter sua preferência inicial de baunilha por menta. Propõe-se que estas diferentes respostas estejam associadas ao tipo de condicionamento utilizado, estímulo aversivo e a ontogenia do animal.

Palavras-chave: *Gryllus assimilis*, Nanomaterial; Toxicologia; Histopatologia; Aprendizado olfatório; Comportamento.



## **ABSTRACT**

*Gryllus assimilis* is a cricket species commonly found in countries from Central and South America, also known as Jamaican field cricket or black field cricket. Throughout the year it is possible to find this crickets in open fields as well as in urban environments. Its relevance has been shown to be increasing, as it stands out as a model organism among insects. In addition, the cricket has a relatively simple nervous system, organized in ganglia, which facilitates the wide study of aspects related to toxicology and behavior approached in this work. Nanotechnology has been developing new materials that are applied to improve different sectors. These materials, characterized by their size in nanometric scale and due its physical-chemical properties are frequently present in drugs, tissues, batteries, antimicrobial products, medical diagnostic tools, among other uses. In view of the exponential growth of different forms of nanomaterials, increasingly concern to know the interactions that these compounds have when they come into contact with the environment and with the organisms that live in it. Highly studies bring toxicological aspects of this interaction, in aquatic environments and animals, showing that nanomaterials can interfere in the development of species studied, causing structural and neural malformation. Seeking reach the environment in these studies, the present work verified the effect of the carbon nanotube multiple-wall (f- MWCNT) in the nervous system of the Jamaican cricket *Gryllus assimilis*. To understand the impacts of this nanomaterial, an exposure to three different concentrations of f-MWCNT in nymphs was performed, evaluating the mortality and deleterious effects through histological analysis of two important regions of insect brain, pars intercerebralis and mushroom bodies, checking the presence of pycnotic nuclei. Mortality was not observed in none of the tested concentrations. In pars intercerebralis region a significant increase in pycnotic nuclei in the tested intermediate concentration was found, while the lowest and highest concentration showed no apparent effect. In the region of the mushroom bodies, there was not statistical difference in the amount of pycnotic nuclei in any of the concentrations tested. It is suggested that these different responses in the brain can be attributed to specificities of the nanomaterial, such as degree of agglomeration and dispersion and also the characteristics of cricket related to the circulatory system and anatomy of nervous system, as well as ability to perform neurogenesis in the region of the mushroom bodies. The initial objective of the present study was to investigate the influence of nanomaterial also on the behavior of the cricket, using an olfactory paradigm until the moment unprecedented for this species. In view of the impossibility of validating this new protocol in a timely manner, an analysis directed to memory and memory mechanisms was chosen, using a modified protocol of associative olfactory behavior, without the presence of nanomaterial, using odors (mint and vanilla) paired with positive reinforcements (water) and negative reinforcements (saline and bitter solution), in order to deepen the knowledge about the olfactory behavior of *G. assimilis*. Males and females were tested in the fifth development stage and also adult males and females. It was found in all groups a natural preference for vanilla. After conditioning, no learning have been found in adult animals, however, nymphs demonstrated ability to learn by reversing your initial preference for vanilla to mint. It's proposed that these different responses could be associated with the type of conditioning used, aversive stimulus and the animals ontogeny.

**Keywords:** *Gryllus assimilis*, Nanomaterial; Toxicology; Histopathology; Olfactory learning; Behavior.

## **LISTA DE FIGURAS**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

Figura 1 - Principais estruturas do sistema nervoso de insetos.

Figura 2 - Estrutura dos nanotubos de carbono de parede simples e de parede múltipla.

### **MANUSCRITO: DELETERIOUS EFFECTS OF f-MWCNT ON BRAIN OF THE CRICKET GRYLLUS ASSIMILIS.**

Figure 1- TGA curve of f-MWCNT.

Figure 2 - Transmission electron microcopy images (120 kV) of f-MWCNT at different magnifications.

Figure 3 - Brain of *G. assimilis*.

Figure 4 - Mean percentage of pyknotic cells at two regions of the brain of *Gryllus assimilis*.

### **MANUSCRITO: OLFATORY LEARNING IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES OF GRYLLUS ASSIMILIS.**

Figure 1 - Longitudinal section showing a half brain of *Gryllus assimilis*.

Figure 2 - Schematic drawing of the arena utilized for preference and memory retention tests.

Figure 3 - Odor preference for *Gryllus assimilis*.

Figure 4 - Preference after conditioning of 5th instar males of *Gryllus assimilis* when Denatonium benzoate was used as aversive stimulus

Figure 5 - Preference after conditioning of (A) adult males and (B) adult females of *Gryllus assimilis* when Denatonium benzoate used as aversive stimulus

Figure 6 - Preference after conditioning of 5th instar (A) males and (B) females of *Gryllus assimilis* when salted solution was used as aversive stimulus

Figure 7 - Preference after conditioning of adult females of *Gryllus assimilis* when salted solution was used as aversive stimulus.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Grilo jamaicano (*Gryllus assimilis*)

*Gryllus assimilis*, também conhecido como grilo jamaicano ou grilo preto do campo é uma espécie amplamente encontrada em países da América do Sul e América Central (Zera et al., 1998), assim como na Flórida (Alexander e Walker, 1962) e região oeste dos Estados Unidos (Weissman et al., 1980). Podem habitar campos abertos, diferentes tipos de vegetação, assim como ambientes urbanos, sendo encontrados indivíduos desta espécie ao longo de todo o ano (Weissman et al., 2009). Em cultivo no Biotério de Invertebrados Terrestres da Universidade Federal do Rio Grande - FURG foi observado um ciclo de vida de aproximadamente cinco meses, passando por cinco estágios de desenvolvimento (ínstars, ecdises ou mudas), nos quais quatro instares caracterizam seu estágio ninfal (juvenil), antes de sua muda final para um indivíduo adulto (alado e reprodutivamente ativo) (Limberger et. al., 2017). Os grilos são considerados modelos relevantes em estudos de memória e aprendizado, por possuírem um sistema nervoso relativamente simples (Matsumoto et al., 2018).

O grilo jamaicano, assim como os demais insetos, possui o sistema nervoso dividido em gânglios segmentados, os quais estão distribuídos ao longo de seu corpo e unidos através de conectivos, formando um cordão nervoso ventral (Fig 1). Neste sistema, identifica-se facilmente um gânglio supraesofágico e um gânglio subesofágico. Este gânglio supraesofágico, conhecido também como cérebro, é um sistema de integração de estímulos e informações, possuindo três principais divisões: protocérebro, deutocérebro e tritocérebro (Krishna e Weesner, 1969).

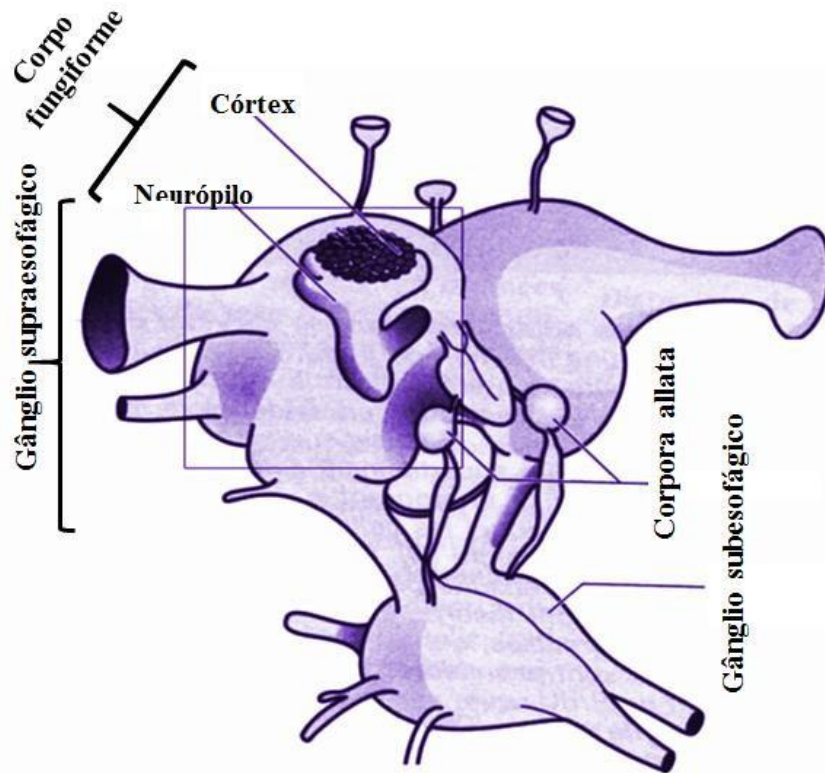


Figura 1 - Principais estruturas do sistema nervoso de insetos, modificado de Cayre et al., 2007.

O tritocérebro é a terceira e menor porção do cérebro dos insetos, estando localizado atrás do deutocérebro (Strausfeld, 2009). É um neurópilo integrador, constituído por neurônios motores e interneurônios, ligados a diferentes regiões do cérebro e ao cordão nervoso ventral, que integra as informações oriundas dos dois lobos do cérebro (Aubele e Klemm, 1977). Já o deutocérebro forma a segunda porção do cérebro, constituindo-se em uma neurópila conhecida como lobo antenal e um neurópilo direcionado para as funções motoras das antenas (Homberg e Hildebrand, 1989). O lobo antenal recebe informações sensoriais das antenas, através de neurônios receptores olfatórios que têm seus corpos celulares em sensilas olfatórias, com dendritos contendo as proteínas receptoras olfatórias e com axônios projetando-se para o lobo antenal.

Estímulos de neurônios motores são identificados em regiões diferentes do deutocérebro, formando o centro mecanossensorial e motor das antenas (Homberg, 1999). Por fim, a maior região do gânglio supraesofágico dos insetos, o protocérebro, possui diferentes regiões de neurópilos. Os lobos ópticos, importante região que recebe aferência dos olhos compostos e informações visuais dos mesmos, estão localizados em uma região ântero-lateral do protocérebro (Reichert e Boyle, 1997). Além dos lobos ópticos, encontram-se no protocérebro o corpo central, constituído de duas calotas de massa filamentosa, sendo estas compostas de uma compacta massa de fibras e uma

região conhecida como *pars intracerebralis*, composta de neurônios volumosos, em que seus neuritos são dirigidos para o corpo central e para os corpos fungiformes, além de constituir uma importante região neurosecretora de hormônios, incluindo os responsáveis pelo crescimento dos insetos (Krishna & Weesner, 1969).

Ainda na região do protocérebro, encontra-se uma região de extrema importância para os insetos: os corpos fungiformes (Figura 1). Os mecanismos de memória associativa e preferência estão ligados a esta estrutura típica (Strausfeld, 2001), a qual constitui-se em uma área associativa que recebe aferência de neurópilas primárias olfatória e visual (lobo antenal e lobo óptico, respectivamente) (Schildberger, 1984). Estruturalmente, o corpo fungiforme possui uma grande quantidade de interneurônios (aproximadamente 50 mil em grilos) (Malaterre et al., 2002), denominados células de Kenyon. Estas células têm o corpo celular localizado nos cálices do corpo fungiforme. Os cálices, por sua vez, são formados pelos processos dendríticos das próprias células de Kenyon e são justamente estas regiões que recebem aferências sensoriais multimodais (Strausfeld, 2001). No caso de grilos, existe um cálice anterior e um cálice posterior (Malaterre et al., 2002). Os axônios das células de Kenyon projetam-se posteriormente para formar os pedúnculos da estrutura, razão pela qual os corpos fungiformes também são denominados *corpora pedunculata*. Estes terminais axônicos constituem eferência do corpo fungiforme com outras regiões do protocérebro, tais como o complexo central, que é uma estrutura importante para a coordenação motora (Strausfeld, 2001).

Os insetos formam um grupo que tem a maior contribuição para a biodiversidade do planeta, com variados habitats, principalmente em ambientes terrestres (Stork et al., 2015). O sucesso de sua irradiação se dá, entre outros fatores, por sua capacidade de reconhecer locais seguros para se estabelecer e procurar alimentos, detectando possíveis predadores (Barnes, 2005). Considerando a importância da utilização de modelo terrestre, o conhecimento prévio de parâmetros anatômicos, histológicos e comportamentais do grilo jamaicano, julgamos ser esse um modelo animal de grande valia para avaliação de toxicidade e parâmetros mnemônicos frente a exposição de nanomateriais de carbono.

## **1.2. Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas Funcionalizado (f-MWCNT)**

O aumento em potencial do uso dos nanomateriais (NMs) em novas tecnologias,

tais como em tecidos, medicamentos, equipamentos eletrônicos e purificação de água, pode levar, cada vez mais, à presença destes nos ambientes terrestres e aquáticos (Klaine et al., 2008; Zhao et al., 2020). A grande utilização dos nanomateriais se dá por suas propriedades físico-químicas peculiares decorrentes, principalmente, de sua escala de tamanho reduzida, onde ao menos uma de suas dimensões externas é menor que 100 nm (Lidén, 2011).

Estes materiais podem compor nanopartículas, nanotubos, nanofilmes, nanofios, entre outros, sendo obtidos a partir de compostos como carbono, óxido de zinco, óxido de cobre e prata. Nanotubos de carbono (CNTs) formam estruturas tubulares, possuindo um diâmetro nanométrico, tendo sido identificados pela primeira vez na década de 1990 (Iijima, 1991). Os CNTs podem ser descritos, esquematicamente, tendo como base o enrolamento de folhas de grafeno e podem ser classificados quanto ao número de folhas de grafeno presentes em sua estrutura. Os nanotubos de parede única são compostos por uma única camada de grafeno, enquanto os de paredes múltiplas são constituídos de duas ou mais camadas concêntricas de cilindros de grafeno (Figura 2) (Bethune et al., 1993). Tendo em vista a utilização diária de produtos contendo este material, como em eletrônicos e construção civil, ocorre um potencial aumento da sua entrada na natureza, que é proporcional ao seu uso (Alshehri et al., 2016).

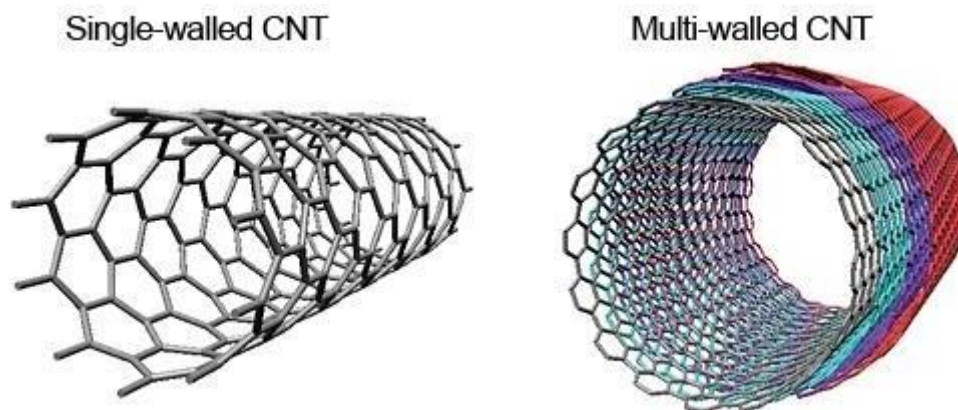


Figura 2: Estrutura dos nanotubos de carbono de parede simples e de parede múltipla

Revisões recentes têm alertado sobre as implicações do descarte de NMs (nanomateriais) em sistemas aquáticos (e.g, Freixa, et al., 2018). Embora os nanomateriais de carbono (NMC) não demonstrem toxicidade aos organismos nas concentrações atualmente encontradas no ambiente (ng /L), estudos utilizando

concentrações mais altas (mg /L) demonstram efeitos tóxicos em organismos aquáticos (Freixa et al., 2018). Dentre estes, Weber et al. (2014) mostraram que houve mudanças no sistema nervoso central do peixe zebrafish (*Danio rerio*), quando exposto a nanotubos de carbono funcionalizados de parede simples (*Single-walled carbon nanotubes functionalized with polyethylene glycol* - SWNT-PEG). Outros estudos que utilizaram SWNT-PEG demonstraram mortalidade significativa em larvas do peixe zebrafish, além da redução do comprimento das larvas, má formação dos embriões, danos ao DNA e aumento na produção das espécies reativas de oxigênio nas concentrações mais altas testadas (Girardi et al., 2017; Cordeiro et al., 2018). Injeções peritoneais (10µL de 1mg/mL) resultaram em aumento significativo na atividade locomotora. Histopatologicamente, houve um aumento dose-dependente do nível de lesão e inflamação do tecido intestinal e nervoso. Em outro estudo com a mesma espécie (Souza et al., 2017), a exposição a concentrações subletais de óxido de grafeno resultou em acúmulo do NMC nas brânquias e no fígado, gerando necrose e apoptose celular, bem como um aumento na produção de espécies ativas de oxigênio em ensaios utilizando suspensão de células branquiais. Em relação ao fulereno, outro NMC, a exposição de zebrafish resultou em danos no desenvolvimento larval dos peixes testados, o que levou à má formação da nadadeira caudal e barbatana peitoral, além de edemas no saco vitelínico e pericárdico (Usenko et al., 2007).

Em invertebrados, um estudo com bivalves (*Ruditapes philippinarum*) expostos a MWCNT demonstrou um aumento concentração-dependente da peroxidação lipídica e uma inibição concentração-dependente da enzima colinesterase (De Marchi et al., 2017a). Outro estudo de toxicidade, empregando o microcrustáceo *Daphnia magna*, ao utilizar doses subletais de MWCNT demonstrou que os nanotubos afetaram de forma significativa a motilidade destes animais nos tratamentos de maiores concentrações (6,9 mg/L e 22,5 mg/L), além disso, houve um aumento na taxa de alimentação e subsequente aumento na taxa de partículas deste nanomaterial no intestino de *Daphnia* na concentração de 3,9 mg/L de MWCNT (Stanley et al., 2015). Outros invertebrados aquáticos foram investigados frente sua resposta a toxicidade de MWCNT. Mwnangi et al. (2012) demonstraram que anfípodas, oligoquetos, mexilhões e mosquitos (estágio larval) apresentam taxa de mortalidade significativa quando expostos a MWCNT, devido ao acúmulo deste nanomaterial no intestino destes animais, provocando bloqueio no trato digestório. Além disto, metais dissolvidos na água, provenientes da síntese de MWCNT, também contribuíram para a mortalidade significativa dentre os organismos

estudados, quando comparados ao grupo controle. Poliquetas (*Diopatra neapolitana* e *Hediste diversicolor*) apresentaram diminuição na capacidade de regeneração de danos celulares marcados por peroxidação lipídica, aumento no estresse oxidativo e inibição da enzima acetilcolinesterase, indicando neurotoxicidade proveniente da exposição a maiores concentrações de MWCNT com base neste biomarcador enzimático (De Marchi et al., 2017b). Com relação a parâmetros moleculares avaliados em larvas aquáticas de diptera *Chironomus riparius* (macroinvertebrado) expostas a MWCNT houve diminuição na atividade transcricional de genes associados aos mecanismos de reparo do DNA (XRCC1 e ATM), com redução ao reparo de danos de DNA. Outro efeito encontrado associado ao nanotubo em questão foi a infraregulação de hsp27 e hsp70, proteínas de choque térmico envolvidas nos processos de ativação da morte celular programada, resultando no aumento da ativação de genes responsáveis pelo apoptose (Martinez-Paz et al., 2019).

Como exposto acima, os trabalhos avaliando a segurança/toxicidade de nanomateriais em organismos aquáticos são mais frequentes, no entanto, há uma clara necessidade de avaliar os efeitos desses materiais em animais do ambiente terrestre.

Para isso, o presente trabalho busca avaliar as ações do MWCNT oxidado (MWCNTox) em um modelo de macroinvertebrado terrestre, o grilo Jamaicano *Gryllus assimilis*. Justifica-se a escolha desse material, uma vez que esse material tem sido extensamente testado na produção de eletroeletrônicos, de plásticos, de polímeros (policarbonatos) e de cimento Portland, com o intuito de melhorar propriedades eletrônicas e mecânicas desses compostos. (De Volder et al., 2013, Zeng et al., 2014, Gdoutos et al., 2016). Segundo o Market Research Report, desde 2014 os MWCNTs são um dos nanomateriais mais utilizados para pesquisa e desenvolvimento. Estima-se que a produção de nanomateriais de carbono pode chegar a 20.000 toneladas em 2022 (Carbon Nanotubes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (SWNT, MWNT), By Application (Polymers, Energy, Electrical & Electronics, And Segment Forecasts, 2015 – 2022. Grand View Research. Abril/2015. Disponível em <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/carbon-nanotubes-cnt-market>). Devido ao uso do f-MWCNT exposto acima, torna-se cada vez mais importante buscar conhecer a toxicidade deste nanomaterial em organismos terrestres, visto o potencial deste material vir a entrar em contato com o meio terrestre.

### **1.3. Comportamento: aprendizado e memória associativa**



Sabe-se que o aprendizado associativo é um processo essencial no forrageamento dos insetos e cada vez mais estuda-se estes mecanismos para entender sobre o comportamento e vias neurais que levam a construção destas memórias (Matsumoto e Mizunami, 2002a). Assim como outros insetos, os grilos também utilizam pontos de referência para encontrar seus esconderijos e locais que sejam fontes de alimento (Wessnitzer et al., 2008). Neste caso, uma memória associativa eficiente é importante para o animal, pois considerando a dinamicidade do ambiente natural no qual ele vive, o sucesso na busca por alimento é dependente da memória visual e olfativa, associando locais, odores e dicas visuais com fontes seguras para obtenção de alimento (Matsumoto et al., 2004). Os mecanismos de memória associativa e preferência estão ligados a estrutura do cérebro do grilo conhecida como corpos fungiformes como mencionado anteriormente.

No forrageamento, espécies com corpos fungiformes simples – ou seja, com pequena área e volume, assim como com um menor número de neurônios – têm uma dieta restrita a poucos alimentos, na qual são necessários poucos estímulos multimodais para a localização do alimento. Um exemplo seria o besouro *rola-bosta* (Farris e Roberts, 2005). Por outro lado, maior número de neurônios, maior volume e maior área estão associados a grupos que possuem alimentação generalista, ou seja, necessitam integrar mais estímulos sensoriais para encontrar o alimento. Exemplo similar pode ser observado em formigas. Há uma diferença no comportamento de formigas virgens e formigas rainhas, quanto a preferência por áreas abertas ou fechadas e ambientes claros ou escuros e, esta diferença, acompanha a mudança no tamanho dos corpos fungiformes destes indivíduos – rainhas jovens de uma espécie de formiga, possuem corpos fungiformes significativamente maiores quando comparadas a rainhas mais velhas, as quais possuem preferência inata pelo escuro (Julian e Gronenberg, 2002).

Um grupo que apresenta corpos fungiformes bem desenvolvidos são os Hymenoptera sociais como as abelhas e formigas. Nesses animais, o cálice do corpo fungiforme é dividido em zonas aferentes, onde pode-se observar dendritos originários das células de Kenyon e também de acordo com a entrada de estímulos sensoriais. Essas zonas do cálice do corpo fungiforme são conhecidas por lábio, região de informações olfativas oriundas do lobo antenal, colar, região de informações visuais do lobo óptico e anel basal, região de aferência tanto de informações olfativas quanto informações visuais (Faris e Roberts, 2005). Em um estudo com mamangavas (*Bombus terrestris*), identificou-se que uma maior densidade microglomerular (regiões de conexões neurais)

resulta em sinapses mais funcionais na região de entrada de informações visuais dos corpos fungiformes destes animais, ocasionando desta forma um aprendizado mais rápido e maior retenção de memória visual em abelhas expostas a experimentos com dicas visuais (Li et al., 2017). Além destes aspectos, identificou-se também em estudos com vespas (*Vespidae*) a diferença no tamanho dos corpos fungiformes em relação a espécies sociais, quando comparados a espécies solitárias, sendo este de tamanho relativamente maior em espécies sociais. Também neste grupo foi observado maior volume nesta região em rainhas, quando comparado ao volume dos corpos fungiformes de vespas operárias, indicando desta forma a relação dos corpos fungiformes com o status social desta espécie (O'donnell e Bulova, 2017).

Conforme destacado anteriormente, sabe-se que dicas olfativas são importantes para os insetos como por exemplo na procura por alimentos, parceiros sexuais, esconderijos, fuga de predadores e que estes processos estão intimamente ligados com os processos associativos que ocorrem nos corpos fungiformes. Aumento nas expansões em volume de regiões dos corpos fungiformes, como o cálice, por exemplo, estão intimamente ligados a ações cognitivas dos insetos, como o aprendizado relativo à memória olfativa (Snell-Rood et al., 2009; Eriksson et al., 2019). Desta forma, encontramos nos insetos um sistema olfativo que responde e constrói esta memória associativa seguindo determinadas etapas. Primeiramente, órgãos sensoriais como antenas e peças bucais irão reconhecer moléculas odorantes do ambiente, as quais desencadeiam uma resposta em neurônios receptores olfativos. Estes receptores olfativos realizam aferências destes sinais para regiões glomerulares localizadas no lobo antenal, regiões estas que, através de interneurônios, transmitem a informação recebida para os corpos fungiformes, onde, por fim, ocorre o processamento da percepção dos odores em comportamentos aprendidos e memórias de longo prazo (Jefferis et al., 2007). Somado a isso o mapeamento de genes expressos e envolvidos na formação de memória olfativa, todos atuando na região dos corpos fungiformes, foi estabelecido por Davis em 2005 (Davis, 2005).

Diante do exposto, é possível concluir a importância dos corpos fungiformes para a formação de memória olfativa e sucesso no seu forrageamento. Estudos com a abelha europeia *Apis mellifera* mostram a capacidade destes insetos de reconhecer flores por características como formas e odores, de acordo com a recompensa que elas lhe fornecem, como néctar e pólen, por exemplo (Menzel, 1999). Pesquisas mostram que abelhas condicionadas com estímulos aversivos associados a odores levaram estes

insetos a desenvolver certa aversão por esses cheiros, assim como associações positivas entre um odor e um estímulo condicionante levaram a respostas de preferência da abelha por esse odor (Vergoz et al., 2007).

Os grilos também demonstram essa capacidade de memória associativa, podendo retê-la por toda sua vida (Matsumoto e Mizunami, 2002b). Ao associar um odor de preferência do grilo a um estímulo aversivo (por exemplo, oferecimento de solução de NaCl para um animal com sede) e um odor aversivo (ou com menor preferência) para o animal com um estímulo positivo (oferecimento de água para um animal com sede) observou-se, claramente, após sessão de condicionamento, que o grilo *Gryllus bimaculatus* desenvolve repulsa ao odor associado ao estímulo aversivo associado. Após várias sessões de condicionamento, verificou-se que esta memória associativa permaneceu por até quatro dias nesta espécie (Matsumoto et al., 2002a).

Estudos recentes de Matsumoto e colaboradores (2018) propõem um modelo para a formação da memória olfativa em grilo. Em nível molecular, a formação de memória de longa duração - após sessões múltiplas de condicionamento - está relacionada a neurônios com via de síntese de neurotransmissor óxido nítrico. Esse neurotransmissor é uma molécula que permeia a membrana plasmática e atua como um sinalizador intracelular. Neste modelo é possível observar que o estímulo não condicionado (reforço) e o estímulo condicionado (odor) ativam uma cascata bioquímica através da ativação da GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) pela molécula de óxido nítrico. A ativação do óxido nítrico modula o processo de ativação de uma proteína cinase, cálcio calmodulina cinase II (CaMKII), resultando assim na ativação da proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), a qual transcreve e traduz genes necessários para a formação de memória de longo prazo. Estudos histoquímicos demonstraram a ocorrência de neurônios produtores de óxido nítrico – através de marcação da enzima óxido nítrico sintase - tanto no lobo antenal, quanto no corpo fungiforme (Matsumoto et al., 2016). Diante dos estudos prévios e da possibilidade da utilização do modelo animal grilo jamaicano em nossa estrutura de pesquisa no Instituto de Ciências Biológicas da FURG, consideramos importante avaliar os parâmetros comportamentais de aprendizado associativo nesse modelo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Verificar a toxicidade dos nanotubos de carbono de parede múltipla oxidado (f-

MWCNT) nas células do corpo fungiforme e na *pars intercerebralis* de ninfas de grilos, assim como avaliar o aprendizado associativo em diferentes estágios de vida dos animais.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a toxicidade aguda de f-MWCNT em ninfas de quinto ínstar de *Gryllus assimilis*.
- Analisar a presença de núcleos picnóticos do corpo fungiforme e da *pars intercerebralis* dos cérebros de ninfas expostas ao f-MWCNT.
- Testar condicionamento e retenção de memória em animais de quinto ínstar e em animais adultos machos e fêmeas

Manuscrito: **DELETERIOUS EFFECTS OF f-MWCNT ON BRAIN OF THE CRICKET *GRYLLUS ASSIMILIS*.**

Manuscrito a ser submetido ao periódico:

*Chemiosphere*

## DELETERIOUS EFFECTS OF f-MWCNT ON BRAIN OF THE CRICKET *GRYLLUS ASSIMILIS*.

Aline Maciel Bueno Zacouteguy<sup>(1)</sup>; Guilherme Martins Limberger<sup>(1)</sup>; Pedro S. C. de Oliveira<sup>(2)</sup>; Duane Barros Fonseca<sup>(3)</sup>; Gisele Eva Bruch<sup>(4)</sup> and Daniela Martí Barros<sup>(1)(\*)</sup>.

(1) FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas; (2) Departamento de Química/ICEx - Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte - MG, Brazil. (3) FURG, Instituto de Ciências Biológicas; (4) Departamento de Física/ICEx - Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte - MG, Brazil.

(\*) Author for correspondence: [danielamartibarrosgmail.com](mailto:danielamartibarrosgmail.com)

### Abstract

Carbon nanotubes (CNTs) have been increasingly more prevalent due to its use in products technology owing to its physical-chemical characteristics. The potential increase of CNTs in the environment is a concern and studies to assess toxic effects of these nanomaterials (NM) are needed. However, so far most of the studies are focused on aquatic species and much less is understood about the toxic effects of NM in terrestrial organisms. This investigation used a functionalized multi-walled carbon nanotube (f-MWCNT) and the Jamaican cricket *Gryllus assimilis* to assess the effects of this NM. Cricket nymphs (4th stage) were divided in three experimental groups plus a control group. Animals of each experimental groups were injected with 10µm of f-MWCNT suspension — at three different concentrations — and controls animals were injected with insect saline. The insecticide Fipronil was used as a positive control. For each group, survival was observed and histological analysis were performed in the brains. Pyknotic cells were quantified in two brain regions, a neurosecretory called Pars intercerebralis, and an associative region called Mushroom Body (MB) which has a cell cluster composed by Kenyon Cells. No mortality was observed in any f-MWCNT concentration tested. A significant increase in pyknotic cells was observed for the intermediate concentration of f-MWCNT, at *Pars intercerebralis*. No significant change was observed at the Kenyon cells of the MB. These different responses of f-MWCNT are discussed in the context of agglomeration and dispersion of the f-MWCNT at different concentrations, and availability of the f-MWCNT dependent of the circulatory system. Lack of effect of the positive control at MB is discussed in the context of a natural decay of pyknotic cells with time and different patterns of adult neurogenesis among insects. Our results showed that f-MWCNT had negative effects in the neurosecretory region of the brain, and even no mortality was observed, further studies are needed to assess the potential effects of this f-MWCNT on growth and reproduction of crickets.

*Key-words: Carbon nanotubes; Pyknotic cells; Pars intercerebralis; Mushroom bodies; Fipronil; Gryllus assimilis*

## 1. Introduction

The diverse and increasing use of nanomaterials (NM) in new technologies such as fabrics, medicines, electronics and water purification could represent an unavoidable presence of NM in aquatic and terrestrial environments (Klaine et al., 2008), which safety range is not completely known. These NM can be found as nanoparticles, nanofilms, and nanowires, formed by silver, zinc, copper oxide or carbon.

Carbon nanotubes (CNTs) are among the most known NM, characterized by cylinder-shaped structures, which have been brought in the spotlight in the 1990s after a publication describing its synthesis (Iijima, 1991). These structures can be formed either by a unique graphene sheet (single-walled) or multiple graphene sheets (multi-walled), the last reaching diameters up to 100 nm (Balasubramanian & Burghard, 2005). Because multi-walled tubes are cheaper to produce in large scale they are the most common kind (Osswald et al., 2007). In addition, called "green" alternative, living organisms have been used to synthesize NM (Athanassiou et al., 2017), as it has been reported the capacity of living organisms to produce non-organic materials, including plant-synthesized NM as arthropods pest controls (Benelli, 2016; Benelli et al., 2017).

Among the available carbon NM, functionalized multi-walled carbon nanotube (f-MWCNT) has been extensively utilized in plastic, cement (Portland) and electronics, as this NM improves electrical and mechanic properties of the materials (De Volder et al., 2013, Zeng et al., 2014, Gdoutos et al., 2016). Research assessing the safety and toxicity of NM typically uses aquatic model organisms (Freixa et al., 2018). For instance, Weber et al. (2014) report deleterious effects of CNTs on the nervous systems and development parameters of *Danio rerio*. For this model species a histopathological study indicated injury and inflammation of gut and nervous tissues (Souza et al., 2017). Conversely, there is a scarcity of studies regarding effects of CNTs on terrestrial animals. Some studies concerning the toxicity of nanoparticles in general have shown increased cellular death and negative effects on development and reproduction in insects (Benelli, 2018). In crickets, it has been reported oxidative stress effects of graphene oxide nanoparticles when injected into the hemolymph (Dziewięcka et al., 2016). In moths, a study showed significant effect of graphene oxide on larval development time and fecundity, but no effect of MWCNTox on any developmental parameters (Martins et al., 2019). Regarding the control systems, no reports on potential deleterious effects of this NM on nervous system of insects is available.

Cricket nervous system is composed by a ganglionar nerve cord and two anterior ganglia, the sub-oesophageal ganglion and the supra-oesophageal ganglion (brain). The brain has some conspicuous regions, such as the Mushroom Bodies neuropile and its associated Kenyon Cells, and a neurosecretory region called *Pars intercerebralis* (Bullock & Horridge, 1965). Histological detrimental effects of CNT have not been studied in insects, but they have been observed in a range of cell types of vertebrates, in which an increase in pyknotic profiles (chromatin condensation) has been found, such as in human neurons (Fraczek-Szczypta et al., 2018), lung epithelial cells (Visalli et al., 2015), and *in vitro* T lymphocytes (Bottini et al., 2006).

The present investigation uses a terrestrial invertebrate, the Jamaican Field Cricket, *Gryllus assimilis*. Studies in this model are important in the context of the unknown risks of f-MWCNT on terrestrials habitats and biota. In this regard, use of crickets is relevant as these bugs have been emerging as an insect model organism (Horch et al., 2017). Therefore, this investigation used *Gryllus assimilis* to assess morphological effects of f-MWCNT on two regions of the brain of this specie.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Experimental animals**

Females at the 4th and 5th nymphal instar (Jamaican Cricket, *Gryllus assimilis*) were used for the experiments. Animals were kept in the laboratory, in plastic boxes (41x29x13 cm) under controlled temperature ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ), humidity ( $65\pm 10\%$ ), and photoperiod conditions (12D:12L). Crickets were fed with cat food (Golden®) *ad libitum*. Water was provided with damp pieces of cotton.

### **2.2. Preparation of Multi-walled Carbon Nanotubes Dispersion**

Multi-walled carbon nanotubes functionalized with carboxylic groups (f-MWCNT) with 95% of purity, length less than  $1\mu\text{m}$  and average diameter of 9.5nm (data from the supplier) produced by Nanocyl (Belgium) were provided by the Multicomponent Polymeric Materials group of the Department of Chemistry/Institute of Exact Science/Federal University of Minas Gerais. Briefly, an initial dispersion of f-MWCNT was prepared according to the procedure described by Trigueiro et al. (2016), where the nanotubes were dispersed in deionized water at a nominal concentration of 0.3 mg/mL in a bath ultrasound for 2h. Before use, the system was centrifuged at 16,000



rpm to prepare a stable dispersion. Working dispersions were prepared in concentrations of 30 mg / mL (stock), 3 mg / mL (10x dilution) and 0.3 mg / mL (100x dilution). All dispersions were sonicated in a bath ultrasound for 30 min before being administered to the animals.

### **2.3. Characterization of f-MWCNT**

The morphological characteristics of the sample was investigated by transmission electron microscopy (TEM) (FEI Tecnai, Oregon, USA, G2Spirit at 120 kV). For TEM analysis, the f-MWCNT was dispersed in water using a low-power ultrasonic bath and drops of the dispersion were deposited onto holey carbon-coated copper grids.

### **2.4. f-MWCNT and Fipronil toxicity**

Fifth instar crickets were used to investigate MWNCTs and fipronil toxicity. MWNCTs toxicity was estimated by the LT50 96h for nominal concentrations of 30 mg/mL (stock), 3.0 mg/mL (10x diluted) and 0.3 mg/mL (100x diluted). Each group was composed by 10 animals. A saline group was used as control. Exposure to f-MWNCT was done by microinjection (10 $\mu$ L dose) using a Hamilton syringe in cold anesthetized (20 min on ice) 4th instar crickets. Microinjection puncture was performed on the anterodorsal surface of the pronotum (membrane) to allow injected solution to reach the dorsal vessel, and subsequently the brain. For Fipronil toxicity, LT50 96h tests were applied for eight concentrations based on the previous publication on the toxicity of this compound (Jacob et al., 2013), as follows: 0.036 mg/L, 0.054 mg/L, 0.108 mg/L, 0.216 mg/L, 0.24 mg/L, 0.27 mg/L, 0.43 mg/L, 1.08 mg/L and 2.16 mg/L. An acetone group was used as control. Exposure to fipronil was topic with 1 $\mu$ L of solution dropped on the pronotum of each cricket. Both toxicity tests were analyzed by probitos approach.

After three weeks, the brains of exposed animals to different concentrations of f-MWNCT and Fipronil, and controls, were dissected on an insect saline and fixed overnight in Paraformaldehyde (4%), and transferred to ethanol 70% until histological processing. Standard dehydration — increasing ethanol series — and Paraplast embedding procedures were applied. Brains were orientated to allow horizontal sectioning on the microtome (6  $\mu$ m thickness). Sections on slides were stained with hematoxylin and eosin (HE) and mounted in Entellan. Insect brain has an anterior region (protocerebrum) which has a conspicuous cell mass (*Pars intercerebralis*, PI)

and the neuropiles of the Mushroom Bodies, which contain small globuli cells called Kenyon Cells (KC). Pyknotic cells were identified by condensation of nuclear chromatin and shrunken eosinophilic cytoplasm. A total of 75 brains were used in histological analysis, as follows: 15 control, 15 Fipronil, and 45 f-MWNCT (15 each concentration). Images of these regions were acquired with an Olympus BX50 photomicroscope. For each brain analyzed, between 10 to 15 images were taken. For each image, the total number of cells and the number of pyknotic cells were counted and the percentage of pyknotic cells calculated. Average % of pyknotic cells by brain was estimated and used in statistical analysis to compare groups.

### **2.5. Statistics**

Data were transformed for analysis and either parametric ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA were applied. Pos-hoc comparison were done used either Tukey or Mann-Whitney (with Bonferoni correction).

## **3. Results**

### **3.1. Characterization of f-MWCNT**

The sample of carbon nanotubes used in this work was previously characterized by Trigueiro et al. (2016) and Oliveira et al. (2018). Data obtained by thermogravimetric analysis (TG) in an atmosphere of synthetic air at 5 ° C / min in the range of 25 ° C to 1000 ° C indicated a degree of functionalization of 5.8% due to the loss of mass related to the thermal degradation of oxygenated groups between 100-400°C (most carboxylic groups, according to the supplier) present on the surface of the nanotubes (Figure 1). The residue obtained from the thermogravimetric curve (TG curve) of only 0.5% indicates a small amount of metal oxides originating from the particles of the catalysts, which confirms the purity reported by the supplier of 95%.

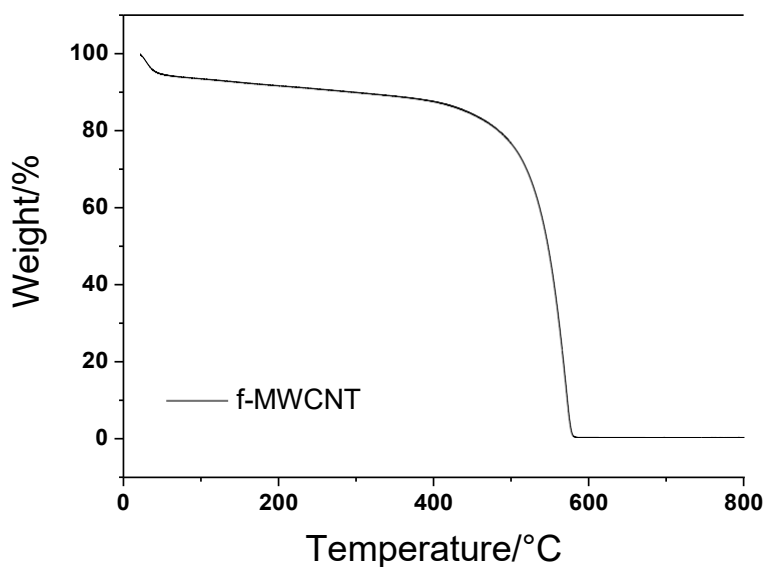


Figure 1- TGA curve of f-MWCNT. Adapted with permission from Trigueiro et al. (2016)

Also according to Trigueiro and collaborators (2016), evaluating about 80 nanotubes from different transmission electron microscopy images, these nanotubes have an average length of  $2.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$  and an average diameter of  $13.8 \pm 1.7 \text{ nm}$ , higher than those values informed by the supplier. TEM images typical of these nanotubes are shown in Fig. 2. It can be seen that the nanotubes have several walls, from 10 to more walls (Fig. 2 b) and defects, probably originating from the surface modification process (functionalization) to generate the oxygenated functional groups. Through the images there is no evidence of large amounts of catalyst particles (in agreement with the TG data) nor the presence of amorphous carbon, indicating the material high purity.

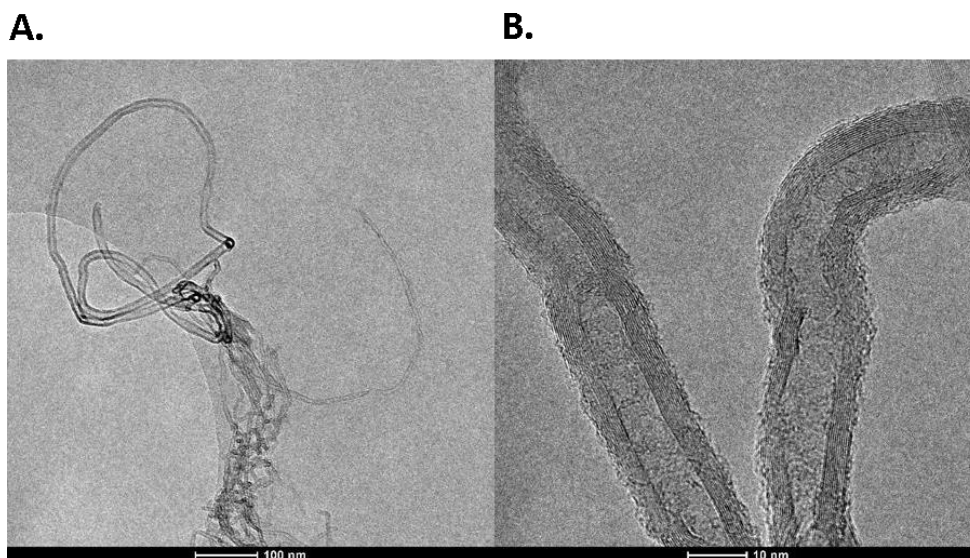


Figure 2 - Transmission electron microscopy images (120 kV) of f-MWCNT at different magnifications. Images provided by the Multicomponent Polymeric Materials group of the Department of Chemistry /Institute of Exact Science/Federal University of Minas Gerais.

### 3.2. Toxicity of f-MWCNT and fipronil

Ninety six hours LC tests for Fipronil showed 90-100% mortality at the six highest concentrations (from 2.16 to 0.216 mg/L). LC50% estimated was  $0.123 \pm 0.04$  mg/L. For f-MWCNT, regardless the concentration used, no mortality was found (data not shown).

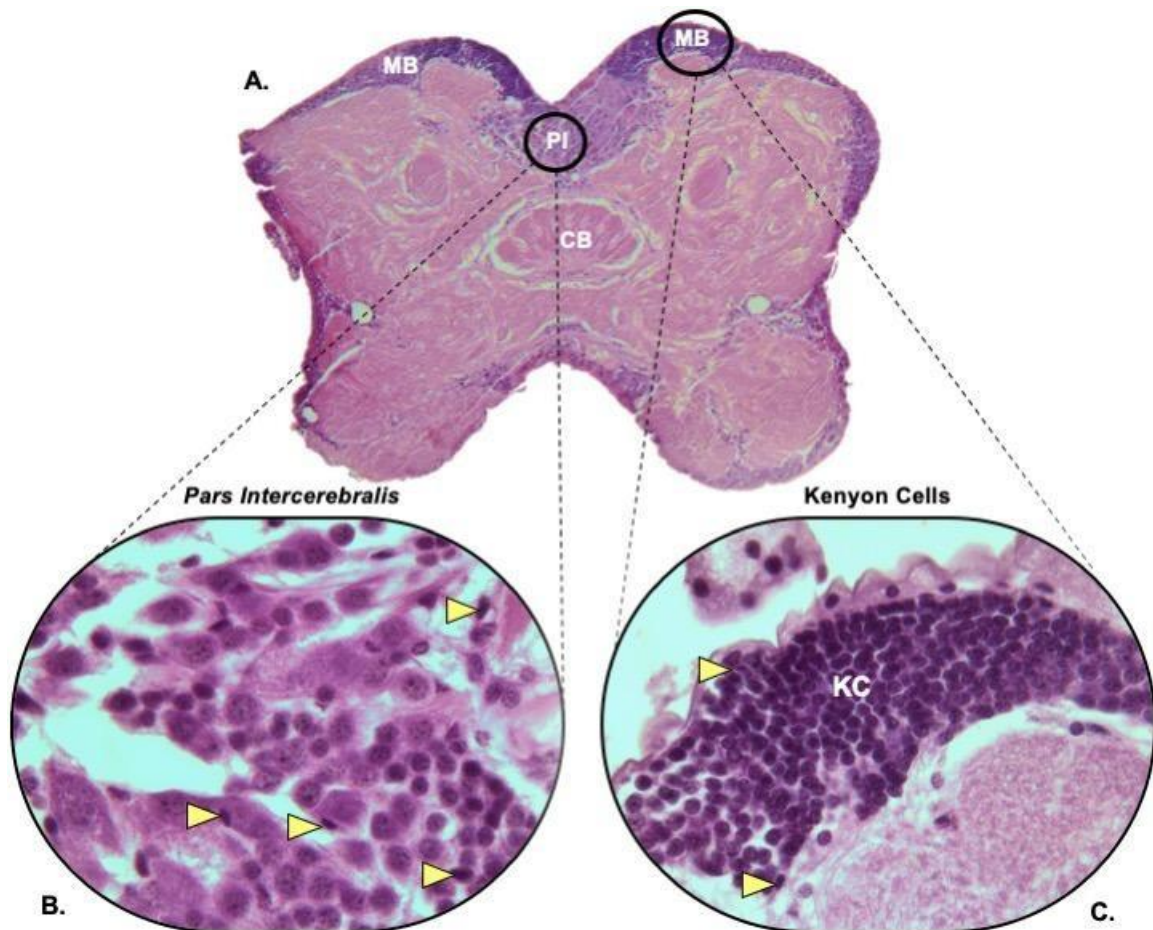


Figure 3- Brain of *G. assimilis* exposed to Fipronil 2,16 mg/L stained with HE. A: Longitudinal section of hole brain and the main structures. MB: Mushroom body; PI: *Pars intercerebralis*; CB: Central body (Magnification 10x. Scale: 200  $\mu$ m). B: *Pars intercerebralis* and pyknotic cells (yellow setae). (Magnification 100x. Scale: 10  $\mu$ m). C: Kenyon Cells (KC) of the mushroom body and pyknotic cells (yellow setae). (Magnification 10x. Scale: 200  $\mu$ m).

### 3.3 Morphological effects

Pyknotic profiles were found in the two regions analyzed (Fig. 3). At PI ANOVA demonstrated an effect of the treatment ( $F_{\text{calc}}=5.73 > F_{\text{crit. } 0.05 \text{ } 4,61}=2.52$ ;  $p < 0.001$ ). Pos-hoc comparison (Tukey) indicated a significant increase of these profiles for 3 mg/mL MWNCT ( $p < 0.001$ ) relative to the control. The other two MWNCT concentrations did not show difference when compared to saline ( $p = 0.76$  and  $p = 0.60$ , for 0.3 mg/ml and 30 mg/ml, respectively). Fipronil did also increased significantly the percentage of pyknotic profiles ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4A).

For Kenyon cells, data did not meet normality and homogeneity of variances assumptions. Kruskal-Wallis analysis demonstrated no significant effect of the treatment

( $H_{\text{calc}}=4.83 > H_{\text{crit. } 0.05 \text{ } 12}=9.27$ ;  $p = 0.30$ ) (Fig. 4B)

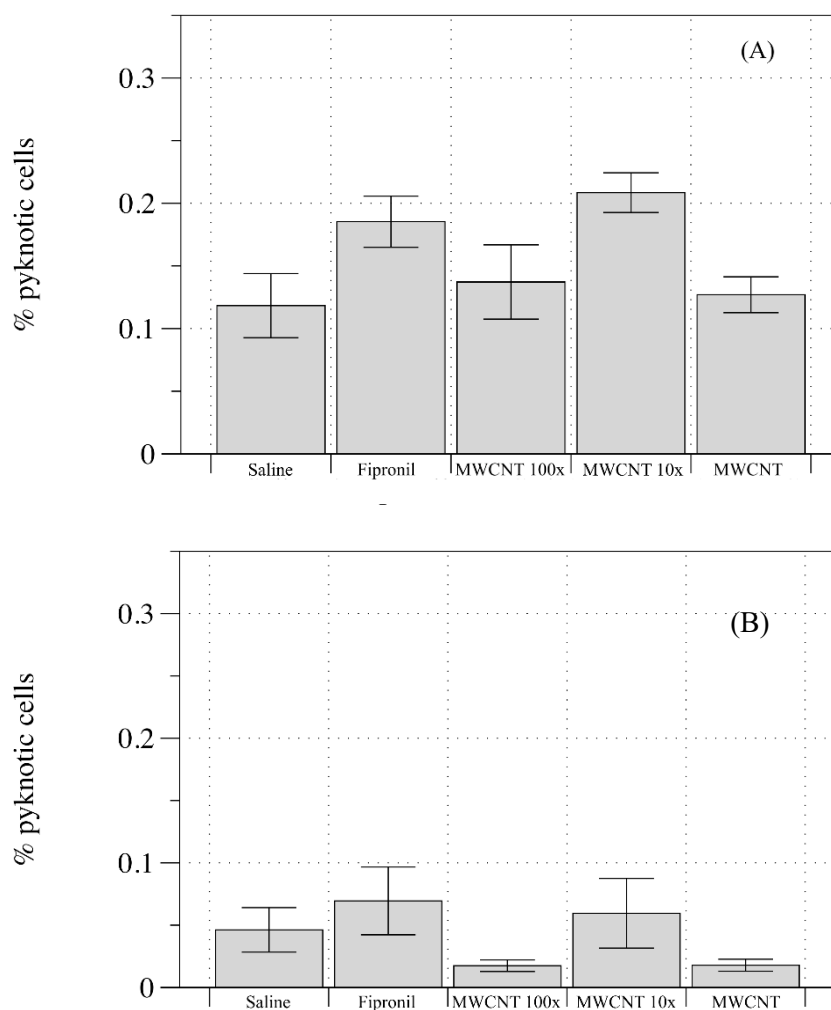


Figure 4- Mean percentage  $\pm$  SEM of pyknotic cells at two regions of the brain of *Gryllus assimilis*. (A) *pars intercerebralis*. Test Tukey: Fipronil ( $p < 0.05$ ); 100x ( $p = 0.76$ ); 10x ( $p < 0.001$ ); f-MWCNT ( $p = 0.60$ ); and (B) Kenyon cells — condensed. Test Kruskal-Wallis ( $p = 0.30$ )

#### 4. Discussion

f-MWNCT did not lead to any mortality of *G. assimilis*. In general, MWCNTs are less harmful than single-walled (Jia et al., 2005). Larvae of the harlequin fly (*Chironomus riparius*) exposed for 24h to MWCNT diluted in culture medium show no mortality during exposure. However, sublethal effects of f- MWNCT were reported such as decrease in transcription of DNA repairing gene and an increase of mRNA levels of a gene related to apoptosis, suggesting that MWCNT activates programmed cell death (Martínez-Paz et al., 2019). In fruit flies larvae (*Drosophila melanogaster*) injection of MWCNT did not change the hatching rate (viability) of larvae, but intracellular presence of MWCNTs increased cell death of ectodermal stem cells, but

not of neural stem cells (Liu et al., 2014). In moths (*Spodoptera frugiperda*), none of the experiments performed showed significant effects of diet provided f-MWCNT, including growth rate, adult longevity, and activity of digestive enzymes (Martins et al., 2019). Therefore, while sublethal effects of f-MWNCT have been reported in insects, no clear effect on mortality/survival has been found in the literature.

Pyknotic cells was the sublethal effect observed in the present investigations. Pyknotic nuclei is a characteristics nuclear trait in necrotic tissues and apoptotic cells, in which DNA condenses into a solid shrunken mass (Hou et al., 2016; Kumar et al., 2012). Sublethal effects have been observed in brains of crickets in the present investigation, but these effects were different among brain regions.

The *pars intercerebralis* has been understood for a long time as an important neurosecretory region of insects (Bullock and Horridge, 1966). In crickets as in other insects this structure is composed by large cells (circa 30  $\mu\text{m}$  of diameter) in which the chromatin is not compact. Among the functions, cells of this structure secrete PTTH (Agui et al., 1979), and important neuropeptide related to insect growth. It has been also reported that some behaviours are related with this structure. For instance, PI removal disrupted circadian and circatidal rhythms in mangrove crickets (Takekata et al., 2018). That the PI has a role in circadian rhythms of crickets has been reported for almost 50 years ago (Sokolove and Loher, 1975). Additionally, PI has also a role regulating diapause (Denlinger et al., 2012).

*Pars intercerebralis* was the region of the brain with the most conspicuous effects of both Fipronil and MWCNT. The observed effect of MWCNT was not concentration-dependent, but it had an inverted-U shape pattern in which only the intermediate concentration resulted in significant increase of pyknotic cells. We argue that this differential effects are related to the higher bioavailability of MWCNT to the cells, as the effect of a toxicant is dependent of its physical-chemical characteristics (Lanone et al., 2013) which also affect the way of internalization (Ursini et al., 2015). For instance, experiments with lung cells showed that pristine MWCNT were internalized by endocytosis and disruption of cellular membrane, while MWCNTs-OH were found inside cells without damaging cellular membrane, and MWCNTs-COOH entered the cell by endocytosis (Ursini et al., 2015).

Inside the cell, the chemical nature of MWCNT also affects where this material is preponderantly found. Pristine MWCNTs are found in free in the cytoplasm, in cytoplasm vacuoles and even inside de nucleus. MWCNTs-OH are found in the cytoplasm as single nanotubes and typically enter the nucleus at ease, while MWCNTs-COOH were found only in the cytoplasm, inside large vesicles (Ursini et al. 2015). Therefore, the main effects on the nucleus are elicited by MWCNTs-OH including genotoxic damage seem in comet assays (Ursini et al., 2012). Pyknosis is a phenomenon that occurs at both necrosis and apoptosis (Hou et al., 2016). It has been found in HeLa cells that MWCNTs even present only in the cytoplasm, in association with microtubules (Rodriguez-Fernandez et al., 2012), led to an increase in apoptosis in MWCNT-treated cells when compared to controls.

While it is not understood which mechanism of uptake is operating for f-MWCNT we have used, we propose that the intermediate concentration allows this nanomaterial to be more toxic to these cells, when compared to the highest concentration. Intermediate concentration of f-MWCNT are likely better dispersed and less agglomerated than the highest concentration. A study with tadpoles showed a smaller lethal rate at the highest concentration of MWCNTs, and MWCNT characterization indicated that this concentration was more susceptible to agglomeration resulting in a smaller intake of the MWCNT (Zhao et al., 2020). In HeLa cells, most agglomerated MWCNT-ox did not increase cytotoxicity, such as membrane integrity, apoptosis and necrosis (Song et al., 2016). On the other hand, it is fair to say that contrary evidence has also been found in the literature, as more cytotoxic effects of agglomerated-SWCNT were found in a mesothelioma cell line (Wick et al., 2007). Regarding the smallest concentration of f-MWCNT, it seems plausible to assume that this concentration was not high enough to stimulate a significant increase of pyknotic cells.

The other region analysed in the present investigation was the cluster of cells (Kenyon cells) found in the calyx of the Mushroom Bodies. Mushroom Bodies are a very important associative region which gets inputs from the antennal lobe (olfactory) and optic lobe (visual) (Strausfeld, 2001). The calyx is a neuropile in which the cellular bodies of the anterior — condensed — Kenyon cells sit (Malaterre et al., 2002). As an associative region, it was reported in crickets that MBs play a pivotal role in associative olfactory memory (Matsumoto and Mizunami, 2002, 2004).

No significant effect of f-MWCNT was observed in condensed Kenyon cells. A



reason to explain it is related to the contact with f-MWCNT solution. It is important to note that f-MWCNT solution was injected into the haemolymph. Considering the circulatory system of insects, the dorsal vessel (heart) terminates anteriorly behind the brain, and haemolymph reaches the frontal head region by a sinus between the brain and esophagus (Wirkner et al., 2013). Brain neurosecretory cells have typically more contact with the circulatory system as they compose the neuroendocrine system and these cells project axons to neurohemal organs as the corpora cardiaca. While the whole brain is bathed by haemolymph, it is important to note that this organ has a connective tissue sheath which does not allow the direct contact between brain structures — like MBs — and haemolymph.

Fipronil was used as a positive control, a previous study demonstrated the formation of pyknotic cells as result of exposure to this insecticide (Jacob et al., 2015). However, a significant increase of pyknotic cells was not observed in Kenyon cells. Two reasons could explain this lack of a significant effects. First, the period between exposure to fipronil and the analysis of the histological sections was three weeks. It has been shown in stingless bees (Jacob et al., 2015) that at some concentration a significant decrease of the number of pyknotic cells was observed after 12 hours. Second, in crickets it has been found persistent neurogenesis in adult life (Fahrbach, 1996), and continuous neurogenesis in MB has been reported for Gryllidae with approximately 20 new Kenyon cells added daily (Cayre et al., 1996). On the other hand, for bees it has been reported no adult neurogenesis of Kenyon cells. Added cells during adulthood could have “diluted” the percentage of pyknotic cells. Therefore, the lack of effect of fipronil found in Kenyon cells of crickets could be related to both reasons listed above.

In short, this investigation has shown that f-MWCNT has not led to any mortality in crickets, and a significant increase in pyknotic cells has been observed in the main neurosecretory region of the brain, but it was not observed in an important associative region. As a terrestrial species, *Gryllus assimilis* was not lethally affected f-MWCNT injected in the haemolymph, which is an important piece of information to evaluate the potential harm of this nanomaterial in the environment. However, as f-MWCNT led to deleterious morphological effects in a neurosecretory region further research is needed to assess whether growth and reproductive could result from the exposure to f-MWCNT.

## Acknowledgments

This work was partially supported by the Brazilian Institute of Science and Technology (INCT) in Carbon Nanomaterials and the Brazilian agencies. We would like to thank to the Grupo de Materiais Poliméricos Multicomponentes do DQ/ICEX/UFMG for the collaboration. Daniela M. Barros was sponsored with productivity research fellowships from the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq). Gisele Bruch fellowship of PDJ program CNPQ, Aline Maciel Bueno Zacouteguy and Guilherme Martins Limberger received a graduate scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance code 001.

## 5. References

- Agui, N.; Granger, N.A.; Gilbert, L.I. and Bollenbacher, W.E. 1979. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: In vitro assay of a single neurosecretory cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 5694–5698, doi:10.1073/pnas.76.11.5694.
- Allegri, M.; Perivoliotis, D.K.; Bianchi, M.G.; Chiu, M.; Pagliaro, A.; Koklioti, M.A.; Trompeta, A.-F.A.; Bergamaschi, E.; Bussolati, O. and Charitidis, C.A. 2016. Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: The relationship between functionalization and agglomeration. *Toxicology Reports*, 3: 230–243, doi:10.1016/j.toxrep.2016.01.011.
- Athanassiou, C.G.; Kavallieratos, N.G.; Benelli, G.; Losic, D.; Usha Rani, P. and Desneux, N. 2018. Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives. *Journal of Pest Science*, 91: 1–15, doi:10.1007/s10340-017-0898-0.
- Balasubramanian, K. and Burghard, M. 2005. Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. *Small*, 1: 180–192, doi:10.1002/sml.200400118.
- Benelli, G. 2016. Plant-mediated biosynthesis of nanoparticles as an emerging tool against mosquitoes of medical and veterinary importance: a review. *Parasitology Research*, 115: 23–34, doi:10.1007/s00436-015-4800-9.
- Benelli, G. 2018. Mode of action of nanoparticles against insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 12329–12341, doi:10.1007/s11356-018-1850-4.

- Benelli, G.; Pavela, R.; Maggi, F.; Petrelli, R. and Nicoletti, M. 2017. Commentary: Making Green Pesticides Greener? The potential of plant products for nanosynthesis and pest control. *Journal of Cluster Science*, 28: 3–10, doi:10.1007/s10876-016-1131-7.
- Bottini, M.; Bruckner, S.; Nika, K.; Bottini, N.; Bellucci, S.; Magrini, A.; Bergamaschi, A. and Mustelin, T. 2006. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letters*, 160: 121–126, doi:10.1016/j.toxlet.2005.06.020.
- Bullock, T. and Horridge, G.A. 1966. Structure and function in the nervous systems of invertebrates.
- Calabrese, E.J. and Baldwin, L.A. 2001. U-Shaped dose-responses in biology, toxicology, and public health. *Annual Review of Public Health*, 22: 15–33, doi:10.1146/annurev.publhealth.22.1.15.
- Cayre, M.; Strambi, C.; Charpin, P.; Augier, R.; Meyer, M.R.; Edwards, J.S. and Strambi, A. 1996. Neurogenesis in adult insect mushroom bodies. *The Journal of Comparative Neurology*, 371: 300–310, doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960722)371:2<300::AID-CNE9>3.0.CO;2-6.
- de Oliveira, P. S., Alexandre, S. A., Silva, G. G., Trigueiro, J. P. C., & Lavall, R. L. 2018. PIL/IL gel polymer electrolytes: The influence of the IL ions on the properties of solid-state supercapacitors. *European Polymer Journal*, 108, 452-460, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.09.024
- De Volder, M.F.L.; Tawfick, S.H.; Baughman, R.H. and Hart, A.J. 2013. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*, 339: 535–539, doi:10.1126/science.1222453.
- Denlinger, D.L.; Yocum, G.D. and Rinehart, J.P. 2012. Hormonal Control of Diapause. p. 430–463, *Insect Endocrinology*, Elsevier.
- Donoughe, S. and Extavour, C.G. 2016. Embryonic development of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Developmental Biology*, doi:10.1016/j.ydbio.2015.04.009.

- Fahrback, S.E. 2006. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annual Review of Entomology*, 51: 209–232, doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.150954.
- Fraczek-Szczypta, A.; Jantas, D.; Ciepela, F.; Grzonka, J.; Bernasik, A. and Marzec, M. 2018. Carbon nanomaterials coatings – Properties and influence on nerve cells response. *Diamond and Related Materials*, 84: 127–140, doi:10.1016/j.diamond.2018.03.017.
- Freixa, A.; Acuña, V.; Sanchís, J.; Farré, M.; Barceló, D. and Sabater, S. 2018. Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Science of The Total Environment*, 619–620: 328–337, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.095.
- Gdoutos, E.E.; Konsta-Gdoutos, M.S. and Danoglidis, P.A. 2016. Portland cement mortar nanocomposites at low carbon nanotube and carbon nanofiber content: A fracture mechanics experimental study. *Cement and Concrete Composites*, 70: 110–118, doi:10.1016/j.cemconcomp.2016.03.010.
- Horch, H.W.; Mito, T.; Popadić, A.; Ohuchi, H. and Noji, S. (eds). 2017. *The Cricket as a Model Organism*. Tokyo, Springer Japan.
- Hou, L.; Liu, K.; Li, Y.; Ma, S.; Ji, X. and Liu, L. 2016. Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *Journal of Cell Science*, 129: 3084–3090, doi:10.1242/jcs.184374.
- Iijima, S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354: 56–58, doi:10.1038/354056a0.
- Jacob, C.R.; Soares, H.M.; Nocelli, R.C. and Malaspina, O. 2015. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest Management Science*, 71: 114–122, doi:10.1002/ps.3776.
- Jia, G.; Wang, H.; Yan, L.; Wang, X.; Pei, R.; Yan, T.; Zhao, Y. and Guo, X. 2005. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental Science & Technology*, 39: 1378–1383, doi:10.1021/es048729l.

- Klaine, S.J.; Alvarez, P.J.J.; Batley, G.E.; Fernandes, T.F.; Handy, R.D.; Lyon, D.Y.; Mahendra, S.; McLaughlin, M.J. and Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 1825, doi:10.1897/08-090.1.
- Kumar, V.; Abbas, A. and Aster, J. 2012. *Robbins Basic Pathology*. Saunders.
- Lanone, S.; Andujar, P.; Kermanizadeh, A. and Boczkowski, J. 2013. Determinants of carbon nanotube toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 2063–2069, doi:10.1016/j.addr.2013.07.019.
- Liu, B.; Campo, E.M. and Bossing, T. 2014. *Drosophila* embryos as model to assess cellular and developmental toxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in living organisms. *PLoS ONE*, 9: e88681, doi:10.1371/journal.pone.0088681.
- Liu, Y.; Maas, A. and Waloszek, D. 2010. Early embryonic development of the head region of *Gryllus assimilis* Fabricius, 1775 (Orthoptera, Insecta). *Arthropod Structure and Development*, doi:10.1016/j.asd.2010.05.008.
- Liu, Y.; Zhao, Y.; Sun, B. and Chen, C. 2013. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, 46: 702–713, doi:10.1021/ar300028m.
- Malaterre, J.; Strambi, C.; Chiang, A.-S.; Aouane, A.; Strambi, A. and Cayre, M. 2002. Development of cricket mushroom bodies. *The Journal of Comparative Neurology*, 452: 215–227, doi:10.1002/cne.10319.
- Martínez-Paz, P.; Negri, V.; Esteban-Arranz, A.; Martínez-Guitarte, J.L.; Ballesteros, P. and Morales, M. 2019. Effects at molecular level of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in *Chironomus riparius* (DIPTERA) aquatic larvae. *Aquatic Toxicology*, 209: 42–48, doi:10.1016/j.aquatox.2019.01.017.
- Martins, C.H.Z.; de Sousa, M.; Fonseca, L.C.; Martinez, D.S.T. and Alves, O.L. 2019. Biological effects of oxidized carbon nanomaterials (1D versus 2D) on *Spodoptera frugiperda*: Material dimensionality influences on the insect development, performance and nutritional physiology. *Chemosphere*, 215: 766–774, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.09.178.

- Matsumoto, Y. and Mizunami, M. 2002. Lifetime olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 188: 295–299, doi:10.1007/s00359-002-0303-0.
- Matsumoto, Y. and Mizunami, M. 2004. Context-dependent olfactory learning in an insect. *Learning & Memory*, 11: 288–293, doi:10.1101/lm.72504.
- Osswald, S.; Havel, M. and Gogotsi, Y. 2007. Monitoring oxidation of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38: 728–736, doi:10.1002/jrs.1686.
- Rodriguez-Fernandez, L.; Valiente, R.; Gonzalez, J.; Villegas, J.C. and Fanarraga, M.L. 2012. Multiwalled carbon nanotubes display microtubule biomimetic properties in vivo , enhancing microtubule assembly and stabilization. *ACS Nano*, 6: 6614–6625, doi:10.1021/nm302222m.
- Sokolove, P.G. and Loher, W. 1975. Rôle of eyes, optic lobes, and *pars intercerebralis* in locomotory and stridulatory circadian rhythms of *Teleogryllus commodus*. *Journal of Insect Physiology*, 21: 785–799, doi:10.1016/0022-1910(75)90009-8.
- Song, Z.-M.; Wang, L.; Chen, N.; Cao, A.; Liu, Y. and Wang, H. 2016. Biological effects of agglomerated multi-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142: 65–73, doi:10.1016/j.colsurfb.2016.02.032.
- Souza, J.P.; Baretta, J.F.; Santos, F.; Paino, I.M.M. and Zucolotto, V. 2017. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 186: 11–18, doi:10.1016/j.aquatox.2017.02.017.
- Takekata, H.; Numata, H. and Shiga, S. 2018. Effects of *pars intercerebralis* removal on circatidal rhythm in the mangrove cricket, *Apteronemobius asahinai*. *Journal of Comparative Physiology A*, 204: 801–810, doi:10.1007/s00359-018-1281-1.
- Trigueiro, J. P. C., Figueiredo, R. C., Rojo, J., Viana, R. M., Schnitzler, M. C., & Silva, G. G. 2016. Carbon nanotube/dendrimer hybrids as electrodes for supercapacitors. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 20(7), 1991-2000, doi: 10.1007/s10008-016-3205-8.

- Ursini, C.L.; Cavallo, D.; Fresegna, A.M.; Ciervo, A.; Maiello, R.; Buresti, G.; Casciardi, S.; Tombolini, F.; Bellucci, S. and Iavicoli, S. 2012. Comparative cytogenotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 26: 831–840, doi:10.1016/j.tiv.2012.05.001
- Visalli, G.; Bertuccio, M.P.; Iannazzo, D.; Piperno, A.; Pistone, A. and Di Pietro, A. 2015. Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 29: 352–362, doi:10.1016/j.tiv.2014.12.004.
- Weber, G.E.B.; Dal Bosco, L.; Gonçalves, C.O.F.; Santos, A.P.; Fantini, C.; Furtado, C.A.; Parfitt, G.M.; Peixoto, C.; Romano, L.A.; Vaz, B.S. and Barros, D.M. 2014. Biodistribution and toxicological study of PEGylated single-wall carbon nanotubes in the zebrafish (*Danio rerio*) nervous system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280: 484–492, doi:10.1016/j.taap.2014.08.018.
- Wick, P.; Manser, P.; Limbach, L.; Dettlaffweglikowska, U.; Krumeich, F.; Roth, S.; Stark, W. and Bruinink, A. 2007. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 168: 121–131, doi:10.1016/j.toxlet.2006.08.019.
- Wirkner, C.S.; Tögel, M. and Pass, G. 2013. The Arthropod Circulatory System. p. 343–391, *Arthropod Biology and Evolution*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Zeng, W.; Shu, L.; Li, Q.; Chen, S.; Wang, F. and Tao, X.-M. 2014. Fiber-based wearable electronics: a review of materials, fabrication, devices, and applications. *Advanced Materials*, 26: 5310–5336, doi:10.1002/adma.201400633.
- Zhao, J.; Xie, G.; Xu, Y.; Zheng, L. and Ling, J. 2020. Accumulation and toxicity of multi-walled carbon nanotubes in *Xenopus tropicalis* tadpoles. *Chemosphere*, 257: 127205, doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127205.

Manuscrito: **OLFATORY LEARNING IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES OF *GRYLLUS ASSIMILIS***

Manuscrito submetido ao periódico:

*Journal of Zoology*



## **OLFACTORY LEARNING IN DIFFERENT DEVELOPMENT STAGES OF *GRYLLUS ASSIMILIS*.**

Aline Maciel Bueno Zacouteguy(1); Guilherme Martins Limberger(1); Duane Barros Fonseca(2); Gisele Eva Bruch(3) and Daniela Martí Barros(1)(\*).

(1) FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas; (2) FURG, Instituto de Ciências Biológicas; (3) Departamento de Física/ICEx - Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, CEP 31270-901, Belo Horizonte - MG, Brazil.

(\*) Author for correspondence: danielamartibarrosgmail.com

### **Abstract**

Insects form an animal group with the highest biodiversity contribution on the planet, inhabiting aquatic and terrestrial habitats. Crickets can use spatial reference points to find hiding places and food sources and the neural and molecular mechanisms related to this learning have been studied, as visual and olfactory memory are the main traits for this purpose. This investigation explores the odor preference, conditional learning and memory retention of age-groups of both genders of *Gryllus assimillis*. Females and males at the 5th nymphal instar, and males and female adults were utilized for the experiments. Olfactory preference was defined based on the availability of two odors: vanilla and mint. For conditioning, protocol utilized was a modification of the differential procedure using vanilla paired with an aversive stimulus (salted or bitter solution) (V-) and mint paired with an appetitive stimulus (water) (M+). A significant natural preference for vanilla was found. After conditioning, 5th instar males and females showed a significant shift in odor preference. No conditioning response was found in adults. Differences found in conditioning response are discussed in the context of ontogeny, type of aversive stimulus and type of conditioning procedure. These results are promising because they indicate young individuals of this species can learn, and that further adjustments of the methodology, such as applying absolute conditioning, can improve the learning abilities of *G. assimillis*.

*Key-words: Behavior; Olfactory learning; Differential conditioning; Memory; Insects*

## 1. Introduction:

Insects form an animal group with the highest biodiversity contribution on the planet, inhabiting aquatic and terrestrial habitats (Stork et al., 2015). Their irradiation success is explained, among other reasons, by the sensorial capacity of finding safe places to live and to seek food, and to recognize predators as well (Barnes, 2005). Crickets can use spatial reference points to find hiding places and food sources (Wessnitzer et al., 2008), and the neural and molecular mechanisms related to this learning have been studied (Matsumoto & Mizunami, 2002a), as visual and olfactory memory are the main traits for this purpose (Matsumoto et al., 2004).

The nervous system of insects is composed by a ganglionic nerve cord and two anterior ganglia, the sub-oesophageal ganglion and the supra-oesophageal ganglion (brain). The brain has some conspicuous regions, one of those is called Mushroom Body (MB) neuropile, which is located at the anterior brain (protocerebrum) and it is an associative area with olfactory and visual inputs from the antennal lobe and optic ganglia, respectively (Bullock & Horridge, 1965; Schildberger, 1983; Strausfeld, 2001). Structurally the MB has a large number of interneurons — circa 50,000 in crickets (Malaterre et al., 2002) — called Kenyon Cells (KC). These are globular cells which cell bodies are found on the calyx of the MB, and the calyxes are the neuropiles formed by dendrites of KC, which get the multimodal inputs (Strausfeld, 2001). Axons of the KC project to form the stalk of the MB, and these axons are the output to other regions of the protocerebrum (Fig. 1).

Crickets may have preference for odors. When vanilla and mint are tested, crickets significantly prefer vanilla (Matsumoto and Mizunami, 2000). In adults of *Gryllus bimaculatus*, when a preferred odor is associated to an aversive stimulus (e.g., NaCl solution for a thirsty animal) and an odor less preferred is paired with water, it has been observed a shift — after a conditioning session — in the odor preference of the animal (Matsumoto et al., 2002a). After several sessions of conditioning, this memory could be retained up to four days. Molecular studies have shown that this memory is related to the synthesis of the neurotransmitter nitric oxide, which ultimately activate the pathway adenyl cyclase-cAMP- PKA-CREB (Mizunami & Matsumoto, 2017) in regions of the MB (Matsumoto et al., 2006).

Some studies on insects point to differences in learning performance among age in holometabolous (Mery, 2007; Münch and Amdam, 2013; Cammaerts e Gosset, 2014), while this putative difference are unknown for *Gryllus assimilis*, a characteristic hemimetabolous organism. In addition, information regarding the possible effects of sexual dimorphism and the use of different substances as aversive stimulus (salted solution or Denantonium Benzoate) during conditioning sessions are absent for Grylloidea, which is important in order to understand, manipulate, interpret and even design researches on this subject.

This investigation explores the odor preference, conditional learning and memory retention of age-groups of both genders of *Gryllus assimillis*. Modifications of an available paradigm (Matsumoto et al., 2017) were employed and suggestions for future investigations are provided.

## **2. Material and Methods:**

### **2.1. Experimental animals**

Females and males at the 5th nymphal instar, and males and female adults were utilized for the experiments. Animals were kept in the laboratory, in plastic boxes (41x29x13cm) under controlled temperature ( $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humidity ( $65\pm 10\%$ ), and photoperiod conditions (12D:12L). Crickets were fed with cat food (Golden®) ad libitum. Water was provided with damp pieces of cotton.

### **2.2. Olfactory preference and conditioning**

Olfactory preference was defined based on the availability of two odors: vanilla and mint. These two odors were obtained using a commercial essential oil (LASZLO Aromatologia Ltda). Each oil was diluted 5x before using in trial. Pieces of filter paper were utilized, on which a 160  $\mu\text{L}$  was dropped. Only 5th instar males were utilized for olfactory preference tests.

An arena measuring 25 cm length x 15.5 cm wide x 7.0 cm height (Matsumoto et al., 2017) was utilized for the preference test. At one end of the arena the two filter papers were placed and a cricket allowed to enter the arena. Each animal was allowed to explore the arena (Fig. 2) for five minutes, and trial was filmed (.avi file) for subsequent analysis. Video analysis was done using the software EthoVision XT. For the analysis, and the time spent over the filter paper was recorded. To consider a valid exploration of

an odor, the animal had to flick its antennae while over the filter paper.

With time spent (in seconds) at each odor it was calculated the preference index (in %,  $PI_{\text{odour}}$ ) for each one, as follows:

$$PI_{\text{vanilla}} = (\text{time exploring vanilla} / \text{time exploring vanilla} + \text{time exploring mint}).$$

$$PI_{\text{mint}} = 1 - PI_{\text{vanilla}}.$$

PI for all trials were compared by a chi-square test, assuming equal chance (50%) for each odor, and a p-value of 0.05.

For olfactory conditioning tests, the rationale was to train crickets in an attempt to change their natural odor preference. Each cricket was individually placed in glass Beaker (200 mL). A piece of filter paper was pierced on the needle of a hypodermic syringe. Odor was presented to the cricket by dropping the essence on the filter paper. Syringe was filled either with water (appetitive stimulus) or with an aversive solution (aversive stimulus). Two kinds of aversive solutions were used. The first was a salted solution at two concentrations (20 and 40%) and the second was a bitter solution of denatonium benzoate commercially named Bitter Max. For the tests, water solution was paired with mint odor, and the aversive solution were paired with the vanilla odor.

The protocol used was a modification of the differential procedure (Matsumoto et al., 2017), applied to *Gryllus bimaculatus*. During four days before trials, crickets were fed normally but deprived from water. After this, trials began, described as follows. First, syringe with preferred odor was presented to the animal. Cricket was allowed to explore and to flick antennae on the filter paper. After 5-10 seconds of exploration, a drop of the aversive stimulus was presented to the thirsty animal, so vanilla (V) was paired an aversive stimulus (V-). This procedure was carried out four times for each animal, at intervals of five minutes between each. Thereafter, the less preferred odor (mint, M) was presented to the animal and cricket was allowed to explore it from 5-10 seconds, and a drop of water was presented to the animal (M+). Time of exploration was not fixed because it was noted that many animals did not interact with the odor in 3 seconds, and we want to be sure to observe cricket flicked antennae at least once on the filter paper.

### **2.3 Memory retention**

Test was performed immediately post training. Similarly, to preference tests, mint and vanilla odors were provided on the arena and cricket was allowed to explore the arena for five minutes. For the analysis, the time spent over the filter paper was recorded. To consider a valid exploration of an odor, the animal had to flick its antennae while over the filter paper. Each animal was allowed to explore the arena for five minutes, and trial was filmed (.avi file) for subsequent analysis. Video analysis was done using the software EthoVision XT. With time spent (in seconds) at each odor it was calculated the preference index for mint (PI<sub>mint</sub>) and for vanilla (PI<sub>vanilla</sub>). PI for all trials were compared by a chi-square test, assuming equal chance (50%) for each odor, and a p-value of 0.05.

## **3. Results**

### **3.1. Exploratory behaviour during preference tests**

During tests most of the animals explored the arena between 1 and 3 minutes, usually walking on the edges of the arena. Some crickets did not explore the arena, standing still for the whole time. Others, after interacting with odor sources went walking on the edges, not returning to odors. Odors sources were usually alternated visited. First contact typically with antennae, followed by mouth parts (palps and mandibles). Sometimes an odor was explored for long time (i.e. more than a minute). Even bites on the filter paper were observed in some cases. In most cases, after exploring the odors for a couple of minutes crickets lost attentiveness and remained near to the arena entrance.

### **3.2. Behaviour during conditioning training**

Routinely crickets avoided the syringe at the two steps of conditioning (V- and M+) when the first time it was presented. From the 2nd presentation, most of the crickets got used to it. However, on occasions crickets kept agitated for the whole time of conditioning avoiding all attempts of syringe approach. When salted solution was offered, crickets rapidly got away from it after first sip, and they never returned to try it again. Not surprisingly, these animals did not respond during conditioning tests, maybe they not learned the conditioned task. When water was offered, after drink it usually crickets wanted to keep interacting with the syringe, sometimes even hanging on the

needle seeking water. In these cases, on the remaining repetitions crickets anticipated water would be offered and they sought promptly the drop.

Fifth instar male nymphs were generally more agitated needing more time to interact with odor source on the syringe and to drink, either water or salted solution. Sometimes they even climbed Becker walls and escaped. Conversely, fifth instar female nymphs were much calmer than males, usually interacting easily with odor source on the syringe. They never escaped a Becker. Adult males and females typically behaved similar to nymphs.

### **3.3. Olfactory preference**

A significant preference for vanilla was found (Mann-Whitney, N=20,  $p < 0.001$ ) (**Fig. 3**).

### **3.4. Conditioning experiments using denatonium benzoate**

After conditioning training, 5th instar males showed a significant shift in odor preference (Mann-Whitney, N=24,  $p < 0.05$ ) (**Fig. 4**). However, for adult males it was not found a shift in preference after conditioning. Actually, adult males kept preferring vanilla even in the present of denatonium benzoate (Mann-Whitney, N=32,  $p < 0.01$ ) (**Fig. 5A**). On the other hand, adult females showed a higher preference for mint, but it was not significant (Mann-Whitney, N=6,  $p = 0.46$ ) (**Fig. 5B**).

### **3.5. Conditioning experiments using salted solution (20%)**

After conditioning training, 5th instar males did not show a significant shift to mint preference (Mann-Whitney, N=6,  $p = 0.57$ ) (**Fig. 6A**). For 5th instar females a significant shift in odor preference was found (t-test, N=37,  $p < 0.001$ ) (**Fig. 6B**). For adult females, no significant shift was found towards mint was observed (Mann-Whitney, N=11,  $p = 0.43$ ) (**Fig. 7**).

## **4. Discussion**

Our investigation confirmed the natural preference of *G. assimilis* on vanilla over mint confirming earlier reports for a species of the same genus *G. bimaculatus* (Matsumoto and Mizunami, 2000). It is not surprising this less preference for mint, because mint has been reported in the literature as an insect repellent (Eisner et al.,

2000; Erler et al., 2006). Menthol is the main compound of it (Kumar et al., 2011). However, it is interesting to note that crickets are known as pests in eucalyptus plantations (Masson et al., 2020), and essential oils of eucalyptus are natural insecticides (Batish et al., 2008; Dhakad et al., 2018). Moreover, depending on the species, composition of eucalyptus oil has some substances also found in mint oils, such as alpha-pirene, beta-pirene and 1,8-cinole (Batish et al., 2008; Kumar et al., 2011). Therefore, it is interesting this natural avoidance of mint shown in laboratory experiments because in the wild crickets prey on plants containing compounds which may be also aversive. Better understanding regarding the natural odors preferences of crickets are needed to improve olfactory conditioning procedures, for instance, testing eucalyptus essential oil against mint and vanilla oils.

Associative learning can be considered an important ability to increase survival, as animals use it to find food (Das et al., 2016; Kandori and Yamaki, 2012), to keep away from predators (Hedrick and Kortet, 2004; Tamai and Choh, 2019), and toxic compounds (Simões et al., 2012). Invertebrates have been very important in associative learning and conditioning investigations, with classical studies on the marine snail *Aplysia californica* (Walters et al., 1979; 1981) demonstrating learning in behaviours such as escape locomotion, inking, and siphon withdrawal. In insects, associative learning has been demonstrated, among others, in flies (Tomchik and Davis, 2013), ants (D'Etorre, 2013), bees (Sandoz, 2013), locusts (Simões et al., 2011), and coachroaches and crickets (Mizunami et al., 2013).

In crickets, olfactory conditioning procedures have been reported. For instance, based on the natural preference of animals to explore a particular odor, crickets deprived from water shifted odor preference when the less preferred odor (conditioning stimulus, CS) is paired with water (unconditioned stimulus, US) (Mizunami and Matsumoto, 2000). Maxillary palpi extension response is enhanced when vanilla and maple odors is presented near the antennae, and this behaviour significantly declines when this preferred odor (CS) is paired with an aversive US (salted solution), with a significant retention 1-day after conditioning (Matsumoto et al., 2015).

Two patterns of conditioning have been applied in crickets. The first, called differential conditioning, is based on the training using of appetitive and aversive stimulus paired with odors. The second, called absolute conditioning is based on the training using only appetitive stimulus paired with the less preferred odor (Matsumoto et al., 2018). Our investigation has followed adapted procedures of differential

conditioning (Matsumoto et al., 2017) used in many publications elsewhere (reviewed in Mizunami and Matsumoto, 2017). However, differently we have performed trials using two aversive stimulus (either salted solution or bitter compound), males and females, and nymphs and adults. Studies reviewed in Mizunami and Matsumoto (2017) have consistently used salted solution as the aversive stimulus and used adult male crickets.

Different from results consistently reported for *G. bimaculatus* (Mizunami and Matsumoto, 2017), we did not find significant conditional response for adults males (Fig. 5), who actually still preferred vanilla even though it was paired with a bitter aversive stimulus in training. One possibility is that this difference found could be related to divergence in conditioning procedures used. We used differential conditioning with four repetitions of V- and M+ using inter-trial intervals (ITI) of five minutes. Significant conditioning reported elsewhere has been done using both absolute and differential procedures, and actually a comparison between both procedures showed that differential conditioning induced a stronger retention than absolute conditioning (Matsumoto and Mizunami, 2002; Matsumoto et al., 2017).

Another possibility is the number of trials, as the number of trials in differential conditioning has an effect on memory retention 2 h after training (Matsumoto and Mizunami, 2002). However, four-trial conditioning led to a higher learning performance than two-trial, and that six-trial did not increase this performance (Matsumoto and Mizunami, 2002). Regarding ITI, it was reported that the interval we used (5 minutes) resulted in significantly higher performance than 30s, 1 minutes and 10 minutes (Matsumoto and Mizunami, 2002). In using a salted solution as aversive stimulus, Matsumoto and Mizunami (2002) speculated that the use of other substances could cause illness and reduce the motivation of the crickets to search for water, but authors did not present experimental evidence to support it. Moreover, the same substance (denatonium benzoate) was used successfully in studies on aversive learning of both sexes of praying mantis (Carle et al., 2015, 2018), corroborating with our findings on aversive learning in *G. assimilis*, at least for females from 5th instar.

Therefore, considering that all possibilities related to methodology have been discarded, we propose that natural variability in learning related to the ontogeny is the most plausible explanation, in which we were not able to elicit a conditioned response in adults of *G. assimilis* using these procedural methodologies. Actually, it is important to note that adult females did not show learning toward mint either using denatonium



benzoate (Fig. 4) or salted solution (Fig. 6) as aversive stimulus. Studies with holometabolous insect species has shown impaired learning in older animals. In fruit flies (Mery, 2007), older animals tested 20 minutes after the training session had significantly lower memory score than younger flies. In honeybees (reviewed in Münch and Amdam, 2013) it has been shown heterogeneity in age-related decline learning, with no significant effect on gustatory learning but significant decline in olfactory learning of foragers bees. Matsumoto and Mizunami (2000) speculated that ontogeny may affect crickets motivation, and reported preliminary observations (data not shown) which indicated that nymphs (no gender specified) form memory for at least six weeks. Our investigation is one of the few studies on a hemimetabolous species in which olfactory learning procedures have been performed in nymphs and adults.

It is important to note that these procedures of differential conditioning have failed to produce olfactory learning in another cricket species (*Acheta domesticus*) (Cayre et al., 2007), and even researchers who proposed these procedures have recognised “differential conditioning may be a rather complicated learning task...we are switching the conditioning paradigm to the simpler absolute conditioning” (Matsumoto et al., 2018). Nevertheless, we have found promising results using differential conditioning in 5th instar males and females (Fig. 2 and 5), using DB and salted solution, respectively. Due to logistical reasons we were not able to test 5th instar females using DB as aversive stimulus, and after conditioning of 5th instar males using a salted solution as aversive stimulus no shift in preference was found (Fig. 7). This latter result is unfortunate to establish a pattern of responsiveness of the salted solution for conditioning, but a higher preference for mint was found which could be not significant due to the low number of trials performed (n=6). It is important to keep in mind that the ability to learn can also be affected by genetic variability (Brandes, 1991). In short, this investigation was the first to apply olfactory differential conditioning procedures in *Gryllus assimilis* in both males and females, and in adults and nymphs as well. Significant conditioning was found in nymphs of males and females, but no significant conditioning was observed in adults. These results are promising because they indicate individuals — at least, the youngest — of this species can learn, and that further adjustments of the methodology, such as applying absolute conditioning, can improve the learning abilities of *G. assimilis*.

## Acknowledgments

This work was partially supported by the Brazilian Institute of Science and Technology (INCT) in Carbon Nanomaterials and the Brazilian agencies. Daniela M. Barros, was sponsored with productivity research fellowships from the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (CNPq). Gisele Bruch fellowship of PDJ program CNPQ , Aline Maciel Bueno Zacouteguy and Guilherme Martins Limberger received a graduate scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance code 001.

## 5. References

- Batish, D.R.; Singh, H.P.; Kohli, R.K. and Kaur, S. 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256: 2166–2174, doi:10.1016/j.foreco.2008.08.008.
- Brandes, C. (1991). Genetic differences in learning behavior in honeybees (*Apis mellifera capensis*). *Behavior Genetics*, 21(3), 271-294.
- Cammaerts, M. C., & Gosset, G. (2014). Impact of age, activity and diet on the conditioning performance in the ant *Myrmica ruginodis* used as a biological model (Hymenoptera, Formicidae). *International Journal of Biology*, 6(2), 10.
- Carle, T.; Horiwaki, R.; Hurlbert, A. and Yamawaki, Y. 2018. Aversive learning in the praying mantis (*Tenodera aridifolia*), a sit and wait predator. *Journal of Insect Behavior*, 31: 158–175, doi:10.1007/s10905-018-9665-1.
- Carle, T.; Yamashita, T. and Yamawaki, Y. 2015. Aversion for bitter taste reveals sexual differences in alimentation strategies in a praying mantis. *Animal Behaviour*, 106: 79–87, doi:10.1016/j.anbehav.2015.05.010.
- Cayre, M.; Scotto-Lomassese, S.; Malaterre, J.; Strambi, C. and Strambi, A. 2007. Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: contribution from an insect model, the House Cricket. *Chemical Senses*, 32: 385–395, doi:10.1093/chemse/bjm010.
- D’Ettorre, P. 2013. Chapter 38 - Learning and Recognition of Identity in Ants. p. 503–

513. In: R. Menzel and P.R.B.T.-H. of B.N. Benjamin (eds), *Invertebrate Learning and Memory*, Elsevier.
- Das, G.; Lin, S. and Waddell, S. 2016. Remembering components of food in *Drosophila*. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 10, doi:10.3389/fnint.2016.00004.
- Dhakad, A.K.; Pandey, V. V; Beg, S.; Rawat, J.M. and Singh, A. 2018. Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 833–848, doi:10.1002/jsfa.8600.
- Eisner, T.; Eisner, M.; Aneshansley, D.J.; Wu, C.-L. and Meinwald, J. 2000. Chemical defense of the mint plant, *Teucrium marum* (Labiatae). *Chemoecology*, 10: 211–216, doi:10.1007/PL00001825.
- Erler, F.; Ulug, I. and Yalcinkaya, B. 2006. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*, 77: 491–494, doi:10.1016/j.fitote.2006.05.028.
- Hedrick, A. and Kortet, R. 2004. Detection of the spider predator, *Hololena nedra* by naïve juvenile field crickets (*Gryllus integer*) using indirect cues. *Behaviour*, 141: 1189–1196, doi:10.1163/1568539042664597.
- Kandori, I. and Yamaki, T. 2012. Reward and non-reward learning of flower colours in the butterfly *Byasa alcinous* (Lepidoptera: Papilionidae). *Naturwissenschaften*, 99: 705–713, doi:10.1007/s00114-012-0952-y.
- Kumar, P.; Mishra, S.; Malik, A. and Satya, S. 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34: 802–817, doi:10.1016/j.indcrop.2011.02.019.
- Masson, M.V.; Tavares, W. de S.; Alves, J.M.; Ferreira-Filho, P.J.; Barbosa, L.R.; Wilcken, C.F. and Zanuncio, J.C. 2020. Bioecological aspects of the common black field cricket, *Gryllus assimilis* (Orthoptera: Gryllidae) in the laboratory and in Eucalyptus (Myrtaceae) plantations. *Journal of Orthoptera Research*, 29: 83–89, doi: 10.3897/jor.29.48966.
- Matsumoto, Y. and Mizunami, M. 2000. Olfactory learning in the cricket *Gryllus*

bimaculatus. *The Journal of experimental biology*, 203: 2581–8.

Matsumoto, Y. 2004. Context-dependent olfactory learning in an insect. *Learning & Memory*, 11: 288–293, doi:10.1101/lm.72504.

Matsumoto, Y. and Mizunami, M. 2005. Formation of long-term olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Chemical Senses*, 30: i299–i300, doi:10.1093/chemse/bjh233.

Matsumoto, Y.; Hatano, A.; Unoki, S. and Mizunami, M. 2009. Stimulation of the cAMP system by the nitric oxide-cGMP system underlying the formation of long-term memory in an insect. *Neuroscience Letters*, 467: 81–85, doi:10.1016/j.neulet.2009.10.008.

Matsumoto, Y.; Matsumoto, C.S. and Mizunami, M. 2018. Signaling pathways for long-term memory formation in the cricket. *Frontiers in Psychology*, 9, doi:10.3389/fpsyg.2018.01014.

Matsumoto, Y.; Matsumoto, C.S. and Mizunami, M. 2017. Protocols for Olfactory Conditioning Experiments. p. 273–284, *The Cricket as a Model Organism*, Tokyo, Springer Japan.

Matsumoto, Y.; Matsumoto, C.-S.; Wakuda, R.; Ichihara, S. and Mizunami, M. 2015. Roles of octopamine and dopamine in appetitive and aversive memory acquisition studied in olfactory conditioning of maxillary palpi extension response in crickets. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, doi:10.3389/fnbeh.2015.00230.

Matsumoto, Y. and Mizunami, M. 2002. Temporal determinants of long-term retention of olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Experimental Biology*, 205: 1429 LP – 1437.

Mery, F. 2007. Aging and its differential effects on consolidated memory forms in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 42: 99–101, doi:10.1016/j.exger.2006.06.004.

Mizunami, M.; Hirohata, S.; Sato, A.; Arai, R.; Terao, K.; Sato, M. and Matsumoto, Y. 2019. Development of behavioural automaticity by extended Pavlovian training in an insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286:

20182132, doi:10.1098/rspb.2018.2132.

Mizunami, M. and Matsumoto, Y. 2017. Roles of octopamine and dopamine neurons for mediating appetitive and aversive signals in Pavlovian conditioning in crickets. *Frontiers in Physiology*, 8, doi:10.3389/fphys.2017.01027.

Mizunami, M. and Matsumoto, Y. 2017. *Learning and Memory*. p. 129–140, *The Cricket as a Model Organism*, Tokyo, Springer Japan.

Mizunami, M.; Matsumoto, Y.; Watanabe, H. and Nishino, H. 2013. Chapter 41 - Olfactory and Visual Learning in Cockroaches and Crickets. p. 549–560. In: R. Menzel and P.R.B.T.-H. of B.N. Benjamin (eds), *Invertebrate Learning and Memory*, Elsevier.

Münch, D. and Amdam, G. V. 2013. Brain aging and performance plasticity in honeybees. p. 487–500.

Sandoz, J.-C. 2013. Chapter 30 - Neural Correlates of Olfactory Learning in the Primary Olfactory Center of the Honeybee Brain: The Antennal Lobe. p. 416–432. In: R. Menzel and P.R.B.T.-H. of B.N. Benjamin (eds), *Invertebrate Learning and Memory*, Elsevier.

Simoës, P.M. V.; Ott, S.R. and Niven, J.E. 2012. A long-latency aversive learning mechanism enables locusts to avoid odours associated with the consequences of ingesting toxic food. *Journal of Experimental Biology*, 215: 1711–1719, doi: 10.1242/jeb.068106.

Simoës, P.; Ott, S.R. and Niven, J.E. 2011. Associative olfactory learning in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, 214: 2495–2503, doi:10.1242/jeb.055806.

Tamai, K. and Choh, Y. 2019. Previous exposures to cues from conspecifics and ladybird beetles prime antipredator responses in pea aphids *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology*, 54: 277–283, doi: 10.1007/s13355-019-00623-3.

- Tomchik, S.M. and Davis, R.L. 2013. Chapter 27 - *Drosophila* Memory Research through Four Eras: Genetic, Molecular Biology, Neuroanatomy, and Systems Neuroscience. p. 359–377. In: R. Menzel and P.R.B.T.-H. of B.N. Benjamin (eds), *Invertebrate Learning and Memory*, Elsevier.
- Unoki, S.; Matsumoto, Y. and Mizunami, M. 2005. Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *European Journal of Neuroscience*, 22: 1409–1416, doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04318.x.
- Walters, E.T.; Carew, T.J. and Kandel, E.R. 1979. Classical conditioning in *Aplysia californica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 6675–6679, doi: 10.1073/pnas.76.12.667.
- Walters, E.; Carew, T. and Kandel, E. 1981. Associative learning in *Aplysia*: evidence for conditioned fear in an invertebrate. *Science*, 211: 504–506, doi:10.1126/science.7192881.

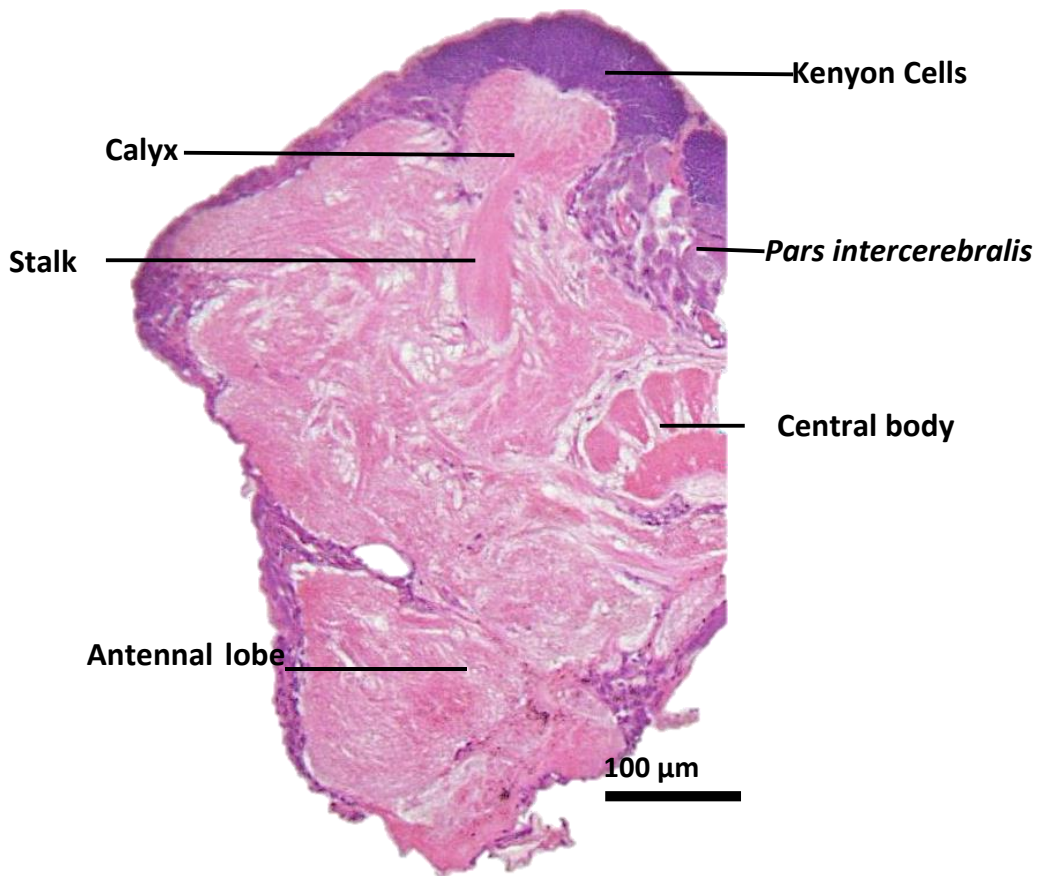


Figure 1. Longitudinal section showing a half brain of *Gryllus assimilis* stained with HE. Magnification 10x.

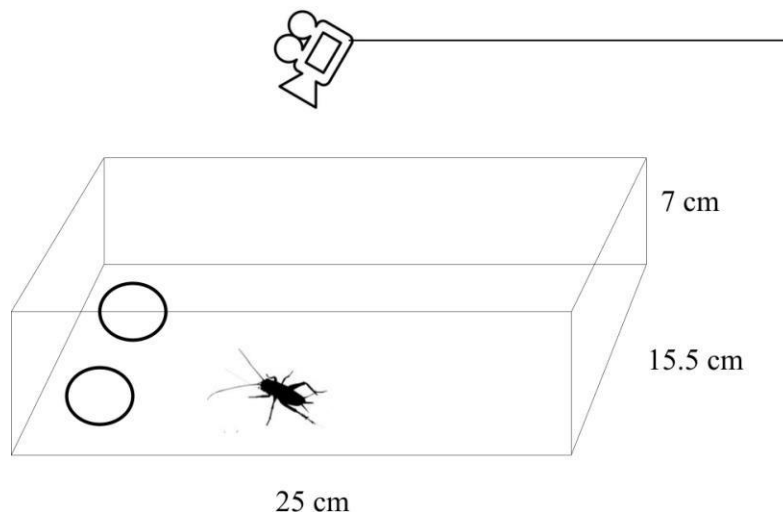


Figure 2. Schematic drawing of the arena utilized for preference and memory retention tests.

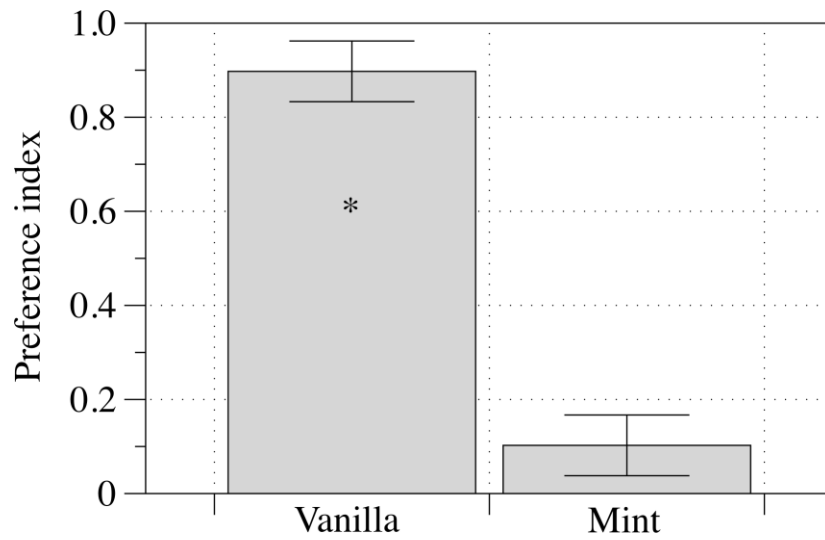


Figure 3. Odor preference for *Gryllus assimilis*. Mean preference index  $\pm$  SE; \*  $p < 0.01$ .

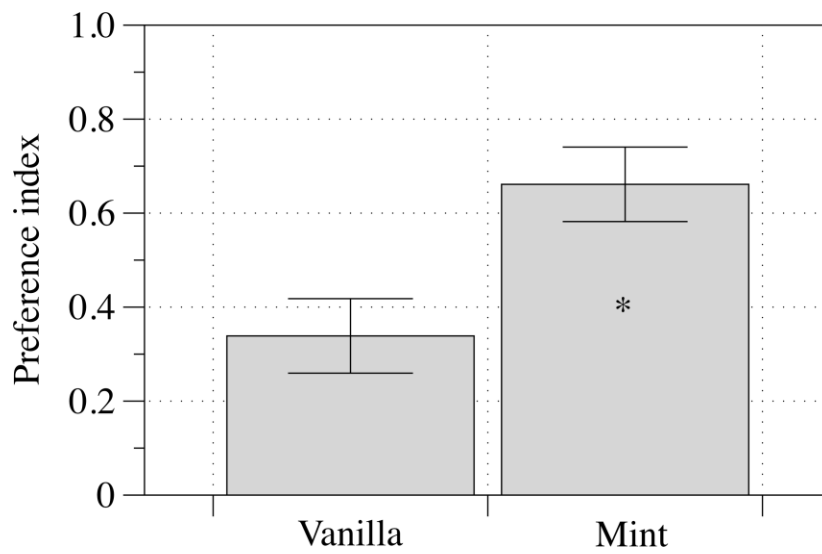


Figure 4. Preference after conditioning of 5th instar males of *Gryllus assimilis* when Denatonium benzoate was used as aversive stimulus. Mean preference index  $\pm$  SE;

\*  $p < 0.05$ .



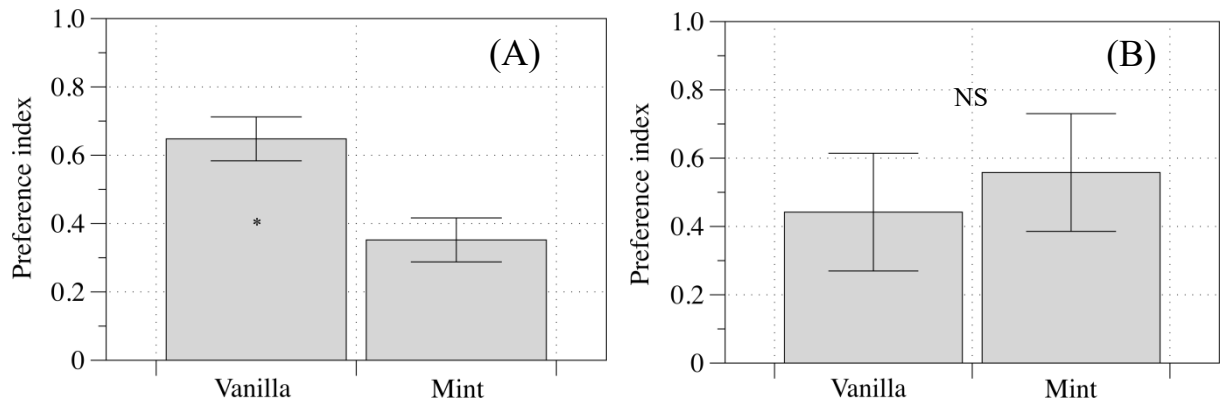


Figure 5. Preference after conditioning of (A) adult males and (B) adult females of *Gryllus assimilis* when Denatonium benzoate used as aversive stimulus. Mean preference index  $\pm$  SE; \*  $p < 0.01$  and NS ( $p = 0.46$ ).

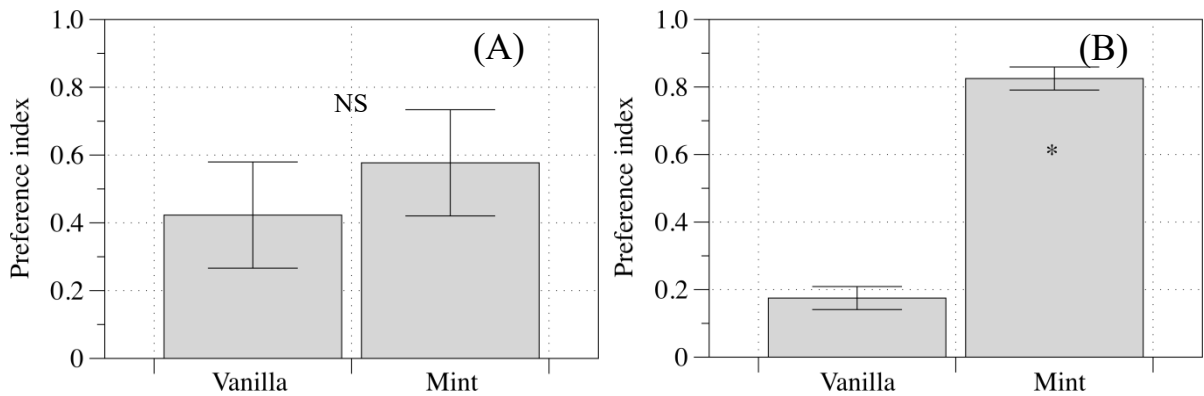


Figure 6. Preference after conditioning of 5th instar (A) males and (B) females of *Gryllus assimilis* when salted solution was used as aversive stimulus. Mean preference index  $\pm$  SE; NS ( $p = 0.57$ ) and \*  $p < 0.001$ .

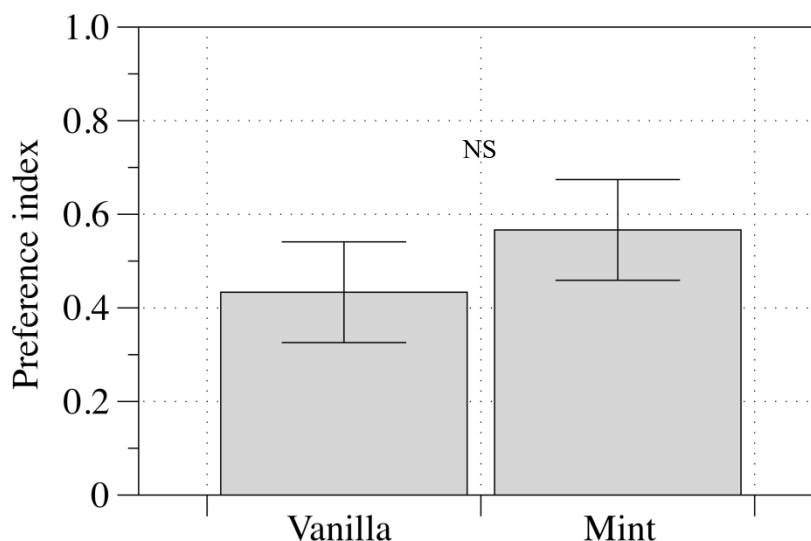


Figure 7. Preference after conditioning of adult females of *Gryllus assimilis* when salted solution was used as aversive stimulus. Mean preference index  $\pm$  SE; NS ( $p = 0.43$ ).

### 3. DISCUSSÃO GERAL

#### 3.1. Efeitos do f-MWCNT no sistema nervoso

Como já mencionado anteriormente neste trabalho, nanomateriais são compostos cada vez mais utilizados em diversas tecnologias (Klaine et al., 2008). Seu potencial em entrar em contato com meio aquático e terrestre aumenta com o uso frequente e diversos trabalhos relatam seus efeitos tóxicos principalmente em ambientes aquáticos (e.g, Freixa, et al., 2018). Buscando ampliar o conhecimento sobre este material também em organismos terrestres, nós testamos um nanotubo de carbono de parede múltipla oxidado quanto a mortalidade e aos efeitos relacionados à morte celular em duas regiões do cérebro do grilo.

#### 3.2. Mortalidade

A LC50 realizada durante três semanas não demonstrou mortalidade dos animais em nenhuma das três concentrações utilizadas. Já é relatado na literatura que os nanotubos de carbono de parede múltipla, de forma geral, são menos prejudiciais do que os nanotubos de parede simples (Jia et al., 2005). Estudos realizados com f-MWCNT

também não apontaram mortalidade em outros insetos, como na mosca arlequim, mosca da fruta e na mariposa *S. frugiperda*. No entanto, estes mesmos autores relatam efeitos subletais causados pelo f-MWCNT, como o aumento de mRNA de genes relacionados a apoptose e morte celular de células tronco ectodérmicas nas larvas de moscas arlequim e nas larvas de mosca da fruta (Liu et al., 2014; Martínez-Paz et al., 2019; Martins et al., 2019).

### **3.3. *Pars intercerebralis***

Neste trabalho, avaliamos o percentual de células com a presença de núcleos onde foi possível observar condensação da cromatina, indicando morte celular. Estes núcleos são conhecidos como núcleos picnóticos, onde o DNA se condensa e forma uma massa sólida e encurtada (Hou et al., 2016; Kumar et al., 2012). As regiões analisadas na presente investigação foram a *pars intercerebralis*, região neurosecretora do cérebro dos insetos (Bullock e Horridge, 1966) e os corpos fungiformes, os quais são amplamente conhecidos e descritos por sua função de receber informações olfativas, através do lobo antenas e informações visuais, através do lobo óptico (Strausfeld, 2001) atuando na formação da memória. A *pars intercerebralis* foi o local onde encontramos o maior efeito do f-MWCNT na concentração intermediária testada, originando um traçado gráfico em forma de uma curva em U invertido. As propriedades físico-químicas do nanomaterial podem explicar este efeito, devido a suas características de aglomeração e dispersão (Lanone et al., 2013). Os maiores efeitos da concentração intermediária podem estar relacionados a sua biodisponibilidade nas células, já que nesta condição, seu grau de dispersão está maior permitindo assim sua maior internalização nas células, permanecendo no citoplasma e núcleo (Ursini et al., 2015). Neste caso, provavelmente esta concentração intermediária estaria melhor dispersa e menos aglomerada, causando um efeito mais tóxico. Em oposto, na concentração mais alta utilizada, observamos o efeito contrário, onde o nanomaterial estaria mais aglomerado e portanto menos biodisponível para entrar em contato com os núcleos celulares, causando assim menor efeito tóxico, como demonstrado em Zhao et al (2020), Song et al (2016) e Wick et al (2007). Em relação a menor concentração utilizada de f-MWCNT é possível supor que esta concentração não foi alta o suficiente para causar um aumento significativo de núcleos picnóticos nesta região.

Na *pars intercerebralis* também foi utilizado o Fipronil (inseticida amplamente utilizado em lavouras) como um controle positivo. Fipronil (fenil-pirazol) é uma

substância conhecida como um potencial inseticida sistêmico, apresenta a capacidade de realizar sua entrada e deslocamento por todos os tecidos das plantas, tornando-se assim um protetor eficiente contra danos para a mesma e de ação tóxica para insetos e demais organismos que possam vir a predá-la. O seu efeito sistêmico ocorre devido principalmente a suas propriedades físico-químicas, como seu coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) e sua constante de dissociação. Fipronil foi descoberto e produzido pela primeira vez entre os anos de 1985 e 1987, pela empresa então denominada Rhône-Poulenc, hoje conhecida como Bayer CropScience, sendo então disponibilizado ao mercado no ano de 1993 (Tingle et al., 2003). O mecanismo de ação do fipronil em insetos acontece com a ligação de fipronil aos receptores de GABA, neurotransmissor inibitório do sistema nervoso, e aos receptores de glutamato acoplados aos canais de cloreto dependentes de GABA, bloqueando a passagem de íons cloreto pelos respectivos canais, fazendo com que ocorra uma hiperexcitação neuronal em função do acúmulo do neurotransmissor nas fendas sinápticas. Em vista disto, fipronil atua como um inibidor do sistema nervoso, causando um efeito antagônico (El Hassani et al., 2009). Estudos que abordam os sítios de ligação de GABA e sua interação com fipronil, sugerem que a afinidade do fipronil com os canais de cloreto de receptores GABA de invertebrados é maior quando comparado com a afinidade com os mesmos canais de receptores GABA de vertebrado, reforçando desta maneira a toxicidade de fipronil relacionada mais a insetos e outros organismos invertebrados não alvos (Kuhr & Motoyama, 1998).

### **3.4. Corpos fungiformes**

Avaliamos os efeitos de f-MWCNT nos corpos fungiformes. Assim como em outros insetos, foi relatado em grilos que os corpos fungiformes desempenham um papel central na memória olfativa associativa (Matsumoto e Mizunami, 2002, 2004). Em oposto aos resultados observados na região da *pars intercerebralis*, nenhum efeito significativo foi encontrado nas células desta região em nenhuma das concentrações testadas. Este resultado pode ser explicado devido a anatomia do grilo. Durante a execução dos testes, o f-MWCNT foi injetado na hemolinfa, através do vaso dorsal (coração), de forma que fosse possível que o nanotubo entrasse em contato com todas as regiões de interesse. É importante ressaltar que o vaso dorsal termina anteriormente atrás do cérebro, e a hemolinfa atinge a região frontal da cabeça por um seio entre o cérebro e o esôfago (Wirkner et al., 2013). As células neurosecretoras cerebrais

normalmente têm mais contato com o sistema circulatório, pois elas compõem o sistema neuroendócrino e essas células projetam axônios para órgãos neurohemais, como os corpos cardíacos. Enquanto todo o cérebro é banhado por hemolinfa, é importante notar que esse órgão possui uma bainha de tecido conjuntivo que não permite o contato direto entre estruturas cerebrais - como os corpos fungiformes - e hemolinfa.

Diferente do resultado encontrado na *pars intercerebralis*, o Fipronil não causou efeito nos corpos fungiformes, como relatado em Jacob et al. (2015), que apontou em seu trabalho alterações morfológicas relacionadas ao Fipronil nas células de Kenyon dos corpos fungiformes de *Scaptotrigona postica*. Exposição tópica ao Fipronil, na região do pronoto destas abelhas, utilizando doses subletais de 0,27 ng/ $\mu$ l, 0,54 ng/ $\mu$ l e 1,08 ng/ $\mu$ l indicaram em todas as concentrações aumento no número de perfis picnóticos quando comparados ao grupo controle, sugerindo morte celular nesta região. Duas razões podem explicar essa falta de efeitos significativos. Primeiramente, o tempo de exposição que utilizamos foi diferente. O autor demonstra no seu trabalho que houve diminuição significativa no número de núcleos picnóticos após 12 horas de exposição. No presente estudo, nós realizamos exposições de 21 dias, tempo esse relativo ao crescimento do animal do quarto para o quinto ínstar. Além disso, os grilos apresentam um processo contínuo de neurogênese na vida adulta (Fahrbach. 1996), assim como a neurogênese contínua nos corpos fungiformes para Gryllidae, sendo adicionadas aproximadamente 20 novas células de Kenyon diariamente. Dessa forma pode-se sugerir que a contínua neurogênese pode contribuir para a “diluição” da porcentagem de núcleos picnóticos.

### **3.5. Paradigma olfatório**

Esta pesquisa teve como objetivo inicial compreender parâmetros comportamentais do grilo *G. assimilis* relacionadas à memória e aprendizado dentro de um paradigma olfatório e verificar a influência de um nanotubo de carbono na sua capacidade de associar um odor aversivo a uma fonte de água e seus efeitos na região do cérebro do animal responsável pelos processos de aprendizagem e formação da memória. Para este fim, nós utilizamos um protocolo com resultados consistentes para grilo *G. bimaculatus*, estabelecido por Matsumoto (2017) onde condicionamos ninfas de quinto ínstar privadas de água por quatro dias, pareando um estímulo de preferência inata do animal (baunilha) com um reforço negativo (solução salina) e um estímulo aversivo (hortelã) com um reforço positivo (água) testando posteriormente se houve

inversão da sua preferência inicial. Na busca por uma resposta efetiva de aprendizado utilizando condicionamento diferencial olfativo, optamos por utilizar diferentes grupos de grilos (adultos machos e fêmeas e ninfas machos e fêmeas) e também mais uma substância aversiva como reforço negativo, o benzoato de denatônio. Por fim, devido as variáveis encontradas durante os testes de comportamento, não foi possível avaliar, no tempo de desenvolvimento do mestrado, os efeitos do nanomaterial de carbono nos aprendizado associativo olfatório, porém resultados interessantes foram encontrados, visto ser esse o primeiro trabalho que aplica este protocolo de paradigma olfatório em *G. assimilis*.

### **3.6. Aprendizado olfatório em adultos**

Primeiramente, confirmamos a preferência de *G. assimilis* por baunilha, assim como sua clara aversão por hortelã, como relatado por Matsumoto e Mizumani (2000). A hortelã funciona como um repelente natural dos insetos (Eisner et al., 2000; Erler et al., 2006), o que corrobora com a sua repulsa por este óleo essencial, mesmo que, curiosamente, este grilo seja conhecido como praga em plantações de eucalipto (Masson et al., 2020).

Para o paradigma olfatório, são conhecidos dois padrões de condicionamentos, relatados por Matsumoto (2018). O condicionamento diferencial, utilizado no presente trabalho, baseia-se no treinamento do estímulo atrativo e aversivo, emparelhado com odores. O condicionamento descrito é chamado de condicionamento absoluto, onde são usado apenas estímulos atrativos associados a odores de menor preferência. (Matsumoto et al., 2018)

Durante nossos testes com adultos machos e fêmeas, não foi possível observar aprendizado associativo olfatório, onde a preferência destes animais permaneceu favorável a baunilha mesmo após as oito sessões de condicionamento da baunilha associada a um estímulo aversivo. É consistente na literatura que a ontogenia tem relação direta com o aprendizado, de forma que animais mais velhos demonstram muito mais dificuldade ou atraso no aprendizado e na formação da memória (Mery 2007; Munch e Amdam,2013). Formigas que foram condicionadas na busca por alimento (água açucarada) obtiveram um sucesso muito maior no aprendizado quando testadas em idades mais jovens, as quais obtiveram um escore de aprendizado de até 90% após 70 horas do condicionamento. Em comparação, as formigas mais velhas apresentaram escore de aprendizado de no máximo 65% após 43 horas do condicionamento

(Cammaerts e Gosset, 2014). Matsumo e Mizunami (2000) também trazem aspectos relacionados a ontogenia no aprendizado dos grilos, demonstrando formação de memória longa em ninfas.

Além disso, outro fator relacionado a falta de êxito no condicionamento de adultos de *G. assimilis* pode ser atribuído aos custos associados a consolidação da memória. Pesquisas com insetos apontam a priorização de um aspecto em detrimento de outro relacionando a reprodução e formação de memória em fêmeas de algumas espécies, como na borboleta *Pieris rapae*, em que os animais com alta habilidade de aprendizado produzem menos ovos que aqueles com baixa habilidade de aprendizado (Snell-Rood et al., 2011). Em moscas, *D. melanogaster*, linhagens selecionadas com alta habilidade de aprendizado também apresentam diminuição na taxa de postura quando comparadas aos grupos não selecionados (Mery & Kawecki, 2004). Os machos adultos de grilos, possuem ainda o gasto acessório do repertório para a cópula e estridulação (Hoback et al., 1997; Wagner, 2005), comportamentos e gastos energéticos extras que são ausentes em ninfas.

É importante destacar que a reprodução deste protocolo também foi falha no estudo apresentado por Cayre e colaboradores (2007) utilizando o grilo comum *Acheta domesticus*. Os autores atribuem que o insucesso com este paradigma olfatório esteja associado a ausência do comportamento aversivo para substância salina, amarga ou picante para estes animais, sugerindo o "paradigma de escape" como melhor ferramenta para avaliar o aprendizado. De fato, apesar da resposta clara aos reforços utilizados, encontramos também em *G. assimilis* o comportamento permanente da tentativa de fuga da arena de testes, percorrendo por longos minutos as laterais da arena em busca da saída, podendo também responder com melhor assertividade em testes de escape. Dentre o exposto, consideramos a sugestão dos pesquisadores responsáveis pela elaboração do protocolo utilizado, onde relatam uma maior dificuldade no condicionamento diferencial, visando estudos futuros mais aprofundados utilizando o condicionamento absoluto, mais simples (Matsumoto et al., 2018).

### **3.7. Aprendizado olfatório em ninfas**

Em oposto aos resultados obtidos com grilos adultos, verificamos aprendizado significativo em machos e fêmeas no quinto ínstar, utilizando como reforço negativo benzoato de denatônio e solução salina, respectivamente. Não foi possível executar testes utilizando fêmeas de quinto ínstar com o benzoato de denatônio devido à logística

do tempo da execução dos experimentos. Durante a execução do condicionamento diferencial nos grupos de animais testados, foi clara a diferença do comportamento em machos e fêmeas. Tanto fêmeas de quinto ínstar quanto fêmeas adultas demonstraram menor agitação e movimentação em relação aos machos dos mesmos grupos, sendo mais fácil a realização do condicionamento. Trabalhos relacionados a atividade locomotora em insetos demonstraram maior atividade nas atividades diárias em machos, relatando uma inclinação ao comportamento mais ativo nos machos de quinto ínstar do que em fêmeas (Edney, 1936; Demark e Bennet, 1994). Outro fator que pode ter contribuído para que as fêmeas apresentassem comportamento mais calmo está relacionado com seu peso corporal. É claramente relatado a presença de dimorfismo sexual com relação ao tamanho do corpo em insetos, demonstrando maior tamanho corporal em fêmeas (Stillwell et al., 2010; Chown e Gaston., 2010), o que pode implicar que fêmeas sejam mais pesadas e, portanto, mais lentas e calmas.

Além disso, estudos têm demonstrado uma eficiência maior no forrageamento nas fêmeas de insetos do que em machos, mostrando mais precisão nessas atividades. Durante atividades diárias de forrageamento, como busca por fontes de alimento e água, ninfas fêmeas de quinto ínstar da barata germânica demonstraram menor movimentação do que machos, apresentando movimentos mais diretos e certos na busca dos recursos, enquanto machos movimentavam-se mais e tinham menor eficiência no seu forrageamento (Demark et al., 1993). Em *Orius sauteri* foi demonstrado que fêmeas adultas permaneciam mais tempo em locais da planta onde tinham mais presas disponíveis, além de aumentar sua taxa de oviposição nesses locais. Em contrapartida, machos deslocavam-se muito mais entre os ambientes da planta com maior e menor quantidade de presas disponíveis, demonstrando maior atividade locomotora e menor eficiência no forrageamento (Nakashima e Hirose, 2002). Estes autores destacam que este comportamento pode estar associado a busca por melhores condições e mais recursos das fêmeas em locais de oviposição, enquanto machos buscam muito mais a presença de fêmeas no local do que alimentação. Ne'eman e colaboradores (2006) relataram que uma maior eficiência no forrageamento em abelhas solitárias é encontrada nas fêmeas. Foi observado que fêmeas visitam com mais frequência as flores que fornecem néctar e pólen e que essa visita acontece em flores que estavam mais próximas umas das outras, diminuindo assim seu gasto energético na procura de alimento. Neste mesmo estudo, machos percorrem maiores distâncias e alcançam voos mais altos do que fêmeas, tornando-os assim polinizadores inter cruzados de maior eficiência, porém com



custo energético e menor eficiência no seu forrageamento quando comparado ao comportamento das fêmeas. Esta maior eficiência nas atividades de forrageamento nas fêmeas pode corroborar com nosso estudo que indica maior facilidade no aprendizado e maior eficiência em fêmeas condicionadas com solução salina em encontrar fonte de água no paradigma olfativo testado onde há a privação de água por alguns dias.

Dentre todos os grupos testados, encontramos muita variabilidade nos padrões de comportamento dos animais. Durante o condicionamento, observamos grilos que não interagiram com os odores e com os reforços em nenhuma das tentativas e, da mesma forma, não demonstraram curiosidade com as fontes de odores presentes na arena durante o teste de preferência. Observamos também animais que, apesar de condicionados, também não procuravam os odores. Além disso, mesmo nos grupos que demonstraram aprendizado ao inverter sua preferência inicial de baunilha para hortelã, encontramos animais que não obtiveram esse aprendizado. Já é conhecido que a variabilidade genética é um fator importante que pode influenciar os resultados de trabalhos que envolvem o condicionamento e aprendizagem em insetos. Moscas que foram geneticamente selecionadas de linhagens que demonstravam bom desempenho no aprendizado, obtinham igualmente excelentes resultados nos mesmos testes de retenção de memória (Brands, 1988, Mery et al., 2007). Neste caso é possível que a variabilidade genética atue também nos grilos testados e explique a inconstância do aprendizado dentre um mesmo grupo.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em suma, esta investigação foi um dos primeiros trabalhos a aplicar um teste de condicionamento diferencial olfatório em diferentes estágios do desenvolvimento de *Gryllus assimilis*. Foi observado que indivíduos mais jovens desta espécie podem aprender uma tarefa de aprendizado associativo importante para o seu forrageamento, enquanto animais mais velhos apresentam dificuldades diante do mesmo teste. São necessário mais estudos para compreender melhor os processos de aprendizado dentro do paradigma olfatórios, buscando ajustes na metodologia relacionados a aumento no número de animais testados, principalmente em relação ao uso de benzoato de denatônio, o qual também se mostrou promissor no condicionamento diferencial juntamente com a solução salina para ninfas. Além disso, é interessante explorar o condicionamento absoluto como uma forma de melhorar a capacidade de aprendizado

dos animais adultos.

Em relação ao nanomaterial testado, f-MWCNT, com base nos resultados apresentadas pode-se concluir que não foi letal para *G. assimilis* quando injetado em via hemolinfa. Considera-se relevante esse dado a fim de avaliar o potencial efeito tóxico desse nanotubo para o ambiente terrestre. Importante salientar que se uma exposição invasiva e direta do nanomaterial (injeção na hemolinfa) não causou efeito letal, pode-se pressupor que uma exposição externa (contato do animal com o nanomaterial no ambiente) seria ainda menos danosa. Igualmente, não foram encontrados danos na região do cérebro responsável pelo aprendizado e memória do animal.

Sugerimos a continuidade dos estudos para melhor compreensão do mecanismo pelo qual os efeitos deletérios encontrados na região neurosecretora podem influenciar nos parâmetros de reprodução e crescimento dos grilos, mediante exposição ao f-MWCNT.

## 5. REFERÊNCIAS

- Alshehri R, Ilyas AM, Hasan A, Arnaout A, Ahmed F, Memic A (2016). Carbon nanotubes in biomedical applications: factors, mechanisms, and remedies of toxicity. *J. Med. Chem.*, 59, 8149–8167.
- Aubele, E., & Klemm, N. (1977). Origin, destination and mapping of tritocerebral neurons of locust. *Cell and Tissue Research*, 178(2), 199-219.
- Bethune DS, Kiang CH, Vries MS, Gorman G, Savoy R, Vazquez J, Beyers R (1993). Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature*, 363, 605–607.
- Brandes, C. H., Frisch, B., & Menzel, R. (1988). Time-course of memory formation differs in honey bee lines selected for good and poor learning. *Animal Behaviour*, 36(4), 981-985.
- Cammaerts, M. C., & Gosset, G. (2014). Impact of age, activity and diet on the conditioning performance in the ant *Myrmica ruginodis* used as a biological model (Hymenoptera, Formicidae). *International Journal of Biology*, 6(2), 10.

- Chown, S. L., & Gaston, K. J. (2010). Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biological Reviews*, 85(1), 139-169.
- Cordeiro, M. F., Girardi, F. A., Gonçalves, C. O., Peixoto, C. S., Dal Bosco, L., Sahoo, S. K., ... & Barros, D. M. (2018). Toxicological assessment of PEGylated single-walled carbon nanotubes in early developing zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 347, 54-59.
- Davis, R. L. (2005). Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annual review of neuroscience*, 28(1), 275-302.
- De Marchi, L., Neto, V., Pretti, C., Figueira, E., Chiellini, F., Soares, A. M., & Freitas, R. (2017). Physiological and biochemical responses of two keystone polychaete species: *Diopatra neapolitana* and *Hediste diversicolor* to Multi-walled carbon nanotubes. *Environmental research*, 154, 126-138.
- De Marchi L, Neto V, Pretti C, Figueira E, Chiellini F, Soares AMVM, Freitas R (2017). The impacts of emergent pollutants on *Ruditapes philippinarum*: biochemical responses to carbon nanoparticles exposure. *Aquatic Toxicology*, 187, 38-47.
- Demark, J. J., & Bennett, G. W. (1994). Diel activity cycles in nymphal stadia of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 87(4), 941-950.
- De Volder M, Sameh HT, Baughman RH, Hart AJ (2013). Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science*, 339, 536-539.
- Edney, E. B. (1937). A study of spontaneous locomotor activity in *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.) by the actograph method. *Bulletin of Entomological Research*, 28(2), 243-278.
- El Hassani, A. K., Dupuis, J. P., Gauthier, M., & Armengaud, C. (2009). Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. *Invertebrate Neuroscience*, 9(2), 91.
- Eriksson, M., Nylin, S., & Carlsson, M. A. (2019). Insect brain plasticity: effects of olfactory input on neuropil size. *Royal Society open science*, 6(8), 190875.

- Farris SM, Roberts NS (2005). Coevolution of generalist feeding ecologies and gyrencephalic mushroom bodies in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102, 17394-17399.
- Freixa A, Acuña V, Sanchís J, Farré M, Barceló B & Sabater, S. (2018) Ecotoxicological effects of carbon based nanomaterials in aquatic organisms. *Sci. Total. Environ.*, 619-620, 328-337.
- Fresquet, N., & Médioni, J. (1993). Effects of ageing on visual discrimination learning in *Drosophila melanogaster*. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 46(4), 399-412.
- Gdoutos, E, Konsta M, Danoglidis P (2016). Portland cement mortar nanocomposites at low carbon nanotube and carbon nanofiber content: A fracture mechanics experimental study. *Cement. Concrete. Comp.*, 70, 110-118.
- Girardi, F. A., Bruch, G. E., Peixoto, C. S., Dal Bosco, L., Sahoo, S. K., Gonçalves, C. O., ... & Barros, D. M. (2017). Toxicity of single-wall carbon nanotubes functionalized with polyethylene glycol in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 37(2), 214-221.
- Hansson, B. S., & Christensen, T. A. (1999). Functional characteristics of the antennal lobe. In *Insect olfaction* (pp. 125-161). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hoback, W. W., & E. WAGNER JR, W. I. L. L. I. A. M. (1997). The energetic cost of calling in the variable field cricket, *Gryllus lineaticeps*. *Physiological Entomology*, 22(3), 286-290.
- Homberg, U., Christensen, T. A., & Hildebrand, J. G. (1989). Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Annual review of entomology*, 34(1), 477-501.
- Iijima S (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56–58.
- Jefferis, G. S., Potter, C. J., Chan, A. M., Marin, E. C., Rohlfsing, T., Maurer Jr, C. R., & Luo, L. (2007). Comprehensive maps of *Drosophila* higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation. *Cell*, 128(6), 1187-1203.

- Julian, G. E., & Gronenberg, W. (2002). Reduction of brain volume correlates with behavioral changes in queen ants. *Brain, behavior and evolution*, 60(3), 152-164.
- Klaine S, Alvarez P, Batley G, Fernandes T, Handy R, Lyon D, Mahendra S, McLaughlin M, Lead J (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27, 1825-1851
- Kuhr, R. J., & Motoyama, N. (Eds.). (1998). *Pesticides and the future: minimizing chronic exposure of humans and the environment (Vol. 2)*. IOS Press.
- Li, L. I., MaBouDi, H., Egertová, M., Elphick, M. R., Chittka, L., & Perry, C. J. (2017). A possible structural correlate of learning performance on a colour discrimination task in the brain of the bumblebee. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1864), 20171323.
- Lidén G (2011). The European commission tries to define nanomaterials. *Ann. Occup. Hyg.*, 55, 1–5.
- Limberger, G. M. (2018). *Análise morfofisiológica associada à reprodução e envelhecimento de Gryllus assimilis (Fabricius, 1775)(Orthoptera: Gryllidae) (Dissertação de Mestrado)*.
- Malaterre J, Strambi C, Chiang AS, Aouane A, Strambi A, Cayre M (2002). *J. Comp. Neurol.*, 452, 215–227.
- Martínez-Paz, P., Negri, V., Esteban-Arranz, A., Martínez-Guitarte, J. L., Ballesteros, P., & Morales, M. (2019). Effects at molecular level of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in *Chironomus riparius* (DIPTERA) aquatic larvae. *Aquatic Toxicology*, 209, 42-48.
- Matsumoto, Y., Matsumoto, C. S., & Mizunami, M. (2018). Signaling pathways for long-term memory formation in the cricket. *Frontiers in psychology*, 9, 1014.
- Matsumoto Y, Mizunami M (2002a). Lifetime olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A.*, 4, 295–299.

- Matsumoto Y, Mizunami M (2002b). Temporal determinants of long-term retention of olfactory memory in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Exp. Biol.*, 205, 1429-1437.
- Matsumoto Y, Mizunami M (2004). Context-dependent olfactory learning in an insect. *Learn. Mem.*, 11, 288-293.
- Matsumoto Y, Unoki S, Aonuma H, Mizunami M (2006). Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory. *Learn. Mem.*, 13, 35-44.
- Matsumoto Y & Mizunami M (2006). Olfactory memory capacity of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Biol. Lett.*, 4, 608-610.
- Menzel R (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol.*, 4, 323-340.
- Mery, F., & Kawecki, T. J. (2004). An operating cost of learning in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, 68(3), 589-598.
- Mery, F., Pont, J., Preat, T., & Kawecki, T. J. (2007). Experimental evolution of olfactory memory in *Drosophila melanogaster*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 80(4), 399-405.
- Mizunami M., Matsumoto Y. (2017) Learning and Memory. In: Horch H., Mito T., Popadić A., Ohuchi H., Noji S. (eds) *The Cricket as a Model Organism*. Springer, Tokyo
- Mwangi, J. N., Wang, N., Ingersoll, C. G., Hardesty, D. K., Brunson, E. L., Li, H., & Deng, B. (2012). Toxicity of carbon nanotubes to freshwater aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), 1823-1830.
- Nakashima, Y., & Hirose, Y. (2003). Sex differences in foraging behaviour and oviposition site preference in an insect predator, *Orius sauteri*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 106(2), 79-86.
- Ne'eman, G., Shavit, O., Shaltiel, L., & Shmida, A. (2006). Foraging by male and female solitary bees with implications for pollination. *Journal of Insect Behavior*, 19(3), 383.

- O'Donnell, S., & Bulova, S. (2017). Development and evolution of brain allometry in wasps (Vespidae): size, ecology and sociality. *Current opinion in insect science*, 22, 54-61.
- Reichert, H., & Boyan, G. (1997). Building a brain: developmental insights in insects. *Trends in neurosciences*, 20(6), 258-264.
- Ruppert EE, Fox RS & Barnes RD (2005). *Zoologia dos Invertebrados*. 7ª ed. Editora Roca, São Paulo. 1145 p.
- Schildberger K (1984). Multimodal interneurons in the cricket brain: properties of identified extrinsic mushroom body cells. *J. Comp. Physiol.*, 154, 71-79.
- Snell-Rood, E. C., Davidowitz, G., & Papaj, D. R. (2011). Reproductive tradeoffs of learning in a butterfly. *Behavioral Ecology*, 22(2), 291-302.
- Snell-Rood, E. C., Papaj, D. R., & Gronenberg, W. (2009). Brain size: a global or induced cost of learning?. *Brain, Behavior and Evolution*, 73(2), 111-128.
- Souza J, Baretta J, Santos F, Paino I, Zucolotto V (2017). Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.*, 186, 11-18.
- Stanley, J. K., Laird, J. G., Kennedy, A. J., & Steevens, J. A. (2016). Sublethal effects of multiwalled carbon nanotube exposure in the invertebrate *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(1), 200-204.
- Stillwell, R. C., Blanckenhorn, W. U., Teder, T., Davidowitz, G., & Fox, C. W. (2010). Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insects: from physiology to evolution. *Annual review of entomology*, 55.
- Stork NE, McBroom J, Gely C, Hamilton AJ (2015). New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112, 7519-7523.
- Strausfeld, N. J. (2009). Brain and optic lobes. In *Encyclopedia of Insects* (pp. 121-130). Academic Press.
- Strausfeld, NJ (2001). Insect Brain, in *Brain Evolution and Cognition* (Gerhard Roth & Mario F Wullimann, eds., pp. 367-400.

- Tingle, C. C., Rother, J. A., Dewhurst, C. F., Lauer, S., & King, W. J. (2003). Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 1-66). Springer, New York, NY.
- Usenko C, Harper S & Tanguay R (2007). In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon*. N. Y., 45, 1891-1898.
- Vergoz V, Roussel E, Sandoz J-C, Giurfa M (2007). Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PloS. One.*, 2, e288
- Wagner JR, W. E. (2005). Male field crickets that provide reproductive benefits to females incur higher costs. *Ecological Entomology*, 30(3), 350-357.
- Weber GEB, Dal Bosco L, Goncalves COF, Santos AP, Fantini C, Furtado CA, Parfitt GM, Peixoto C, Romano LA, Vaz SB & Barros DM (2014). Biodistribution and toxicological study of PEGylated single-wall carbon nanotubes in the zebrafish (*Danio rerio*) nervous system. *Toxicol. and App. Pharm.*, 280, 484-492.
- Weissman, D. B., Rentz, D. C. F., Alexander, R. D., & Loher, W. (1980). Field crickets (*Gryllus* and *Acheta*) of California and Baja California, Mexico (Orthoptera: Gryllidae: Gryllinae). *Transactions of the American Entomological Society*, 327-356.
- Weissman, D. B., Walker, T. J., & Gray, D. A. (2009). The field cricket *Gryllus assimilis* and two new sister species (Orthoptera: Gryllidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102(3), 367-380.
- Wessnitzer J, Mangan M, Webb B (2008). Place memory in crickets. *Proc. R. Soc. B*, 275, 915–921.
- Zeng W, Shu L, Li Q, Chen S, Wang F, Tao XM (2014). Fiber-Based Wearable Electronics: A Review of Materials, Fabrication, Devices, and Applications. *Adv. Mater.*, 26, 31.
- Zhao, J., Lin, M., Wang, Z., Cao, X., & Xing, B. (2020). Engineered nanomaterials in the environment: Are they safe?. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-36.