



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ELIZANETE MACIEL DA SILVA

**ACETILCOLINESTERASES DO CÉREBRO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DO
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
ENZIMA CEREBRAL**

João Pessoa-PB

2016

ELIZANETE MACIEL DA SILVA

**ACETILCOLINESTERASES DO CÉREBRO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DO
PEIXE-ZEBRA (*Danio Rerio*) – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
ENZIMA CEREBRAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como requisito obrigatório para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

João Pessoa-PB

2016

S586a Silva, Elizanete Maciel da.
Acetilcolinesterases do cérebro e músculo esquelético do peixe-zebra (*Danio Rerio*) - purificação e caracterização da enzima cerebral / Elizanete Maciel da Silva.- João Pessoa, 2016.
42f. : il.
Orientador: Ian Porto Gurgel do Amaral
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Peixe-zebra. 3. Bioindicador.
4. Colinesterase. 5. Enzima cerebral.

UFPB/BC

CDU: 62(043.2)

ELIZANETE MACIEL DA SILVA

**ACETILCOLINESTERASES DO CEREBRO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DO
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
ENZIMA CEREBRAL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biotecnologia.

Aprovado em: 18 / 03 / 2016

BANCA EXAMINADORA:

Ian Porto Gurgel do Amaral

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

(Orientador-UEPB)

Adna Cristina Barbosa de Sousa

Profª Drª Adna Cristina Barbosa de Sousa

(Examinadora-UEPB)

Andréa Farias de Almeida

Profª Drª Andréa Farias de Almeida

(Examinadora-UEPB)

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais,
por todo apoio, amor e confiança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela minha vida e por sempre iluminar o meu caminho. Sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, **Maria Auxiliadora e Paulo Marcelino**, por toda educação, preocupação, carinho, dedicação, confiança e por se sacrificarem todos os dias por mim e pelas minhas irmãs. Vocês são meus maiores exemplos.

As minhas irmãs, **Eliziane e Vitória**, apesar de todas as brigas, vocês são minhas eternas companheiras.

Aos meus primos e tios, por se preocuparem comigo e me encorajarem a seguir em frente. Gostaria de agradecer especialmente a minha prima **Gabriela**, por ser como uma irmã para mim e estar comigo em todos os momentos.

Ao meu namorado, **Joewerton Oliveira**, pela amizade, confiança, compreensão e companheirismo em todas as horas, principalmente nas horas mais difíceis. Obrigada por sempre estar me incentivando e ficar do meu lado. Te amo!

Ao meu orientador, professor **Ian Porto de Amaral**, por ser o melhor orientador, por toda paciência, competência, oportunidade, incentivos e ensinamentos. Obrigada por ter me orientado durante todos os períodos da minha graduação. O senhor é um exemplo de profissional!

À toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Organismos Aquáticos (LABOrA), dentre eles, **Anna Julyana, Cayro Mendes, Lucas Alecrim, Marcia Dantas, Jucilene Pereira e Rafael Goulart**, local onde fiz grandes amigos, toda ajuda e ensinamentos que vocês me proporcionaram foram fundamental.

Ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Parasitas e Vetores (Lapavep), por todo o suporte fornecido durante os experimentos.

Aos meus colegas do Curso de Biotecnologia, em especial, **Araucana Lima, Olivia Costa e Palloma Farias**. Vocês são as melhores amigas que alguém poderia ter. Obrigada por toda a risada, companhia, desespero, amor e por estarem ao meu lado todas as manhãs durante esses 4 anos.

À **todos os meus professores de Biotecnologia**, por transmitirem seus ensinamentos. Apesar de todas as dificuldades, vocês sempre foram presentes e essenciais para a minha formação. Agradeço também ao professor Lindomar Pena, por ele ser um exemplo de professor e de profissional, foi com o senhor o meu primeiro contato com o mundo universitário. A vocês, minha gratidão sem tamanho.

À todos os meus amigos e professores do ensino médio. Vocês foram essenciais para chegar onde estou e a base para o meu conhecimento. As minhas amigas do Evolução e os amigos do Líder, obrigada por estarem na torcida por mim, em especial a **Renatha Veríssimo**, por acreditar no meu potencial e me incentivar sempre.

Aos membros da Banca Examinadora, **Adna Cristina Barbosa de Sousa e Andréa Farias de Almeida**, por aceitarem fazer parte e contribuírem para o enriquecimento desse trabalho. Além disso, por serem pessoas e professoras maravilhosas.

Ao **Centro de Biotecnologia** (CBiotec), por ser um ambiente acolhedor e incentivador.

À **Universidade Federal da Paraíba** (UFPB), por possibilitar minha formação profissional e pela infraestrutura necessária para execução dos experimentos.

E a todos que não citei, mas que contribuíram diretamente ou indiretamente para esta conquista.

Muito obrigada!

*“Comece onde você está, use o que você tem
e faça o que você pode”*

Arthur Robert Ashe Jr.

RESUMO

A acetilcolinesterase é uma enzima capaz de clivar a acetilcolina nas fendas sinápticas e na placa motora em diversos organismos, e é considerada boa indicadora de contaminação por metais pesados e inseticidas. Desta forma, o presente trabalho objetivou extrair e caracterizar a acetilcolinesterase do cérebro e músculo do peixe-zebra (*Danio rerio*) e avaliar se o *status* alimentar produz modificação na atividade desta enzima. Espécimes (n=36) do peixe-zebra foram aclimatados em laboratório a 27°C em dois tanques separados (n=18 por tanque) por 14 dias, sendo 7 dias com alimentação *ad libitum* (12 animais coletados com o *status* “saciedade”) e alimentação suspensa nos 7 dias restantes, ao final dos quais 12 animais foram coletados com o *status* “jejum”. Após os 14 dias, eles foram realimentados *ad libitum* por 2h e 12 animais foram coletados com o *status* “realimentado”. Em cada ponto os animais foram eutanasiados, e o cérebro e músculo esquelético foram dissecados e colocados em gelo para análise da atividade enzimática. Em relação ao *status* alimentar não houve diferença estatística na atividade da enzimática nos dois tecidos. Posteriormente, o extrato de cérebro foi utilizado para a purificação da enzima utilizando os métodos de precipitação com etanol (frações 0-30%, 30-60% e 60-90% de etanol) e cromatografia de troca iônica com DEAE-celulose. A fração 0-30% de etanol, por possuir maior grau de purificação em relação ao extrato bruto (cerca de 7 vezes), foi aplicada numa coluna DEAE-celulose e a enzima foi eluída com uma concentração crescente de NaCl num fluxo de 1mL/min. Após a cromatografia, a enzima foi caracterizada quanto à sua temperatura e pH ótimos, cinética enzimática e quanto à susceptibilidade em relação aos cloretos de sódio, cálcio, alumínio, cádmio e mercúrio. O pH e temperatura ótimos desta enzima foram 9,0 e 30°C, respectivamente e a constante de Michaelis-Mentem (K_m) de 0,24 mM. Os cloretos de sódio e de cálcio não foram capazes de modular a atividade da acetilcolinesterase do peixe-zebra, mesmo em concentrações elevadas (10mM). Por outro lado, ocorreu inibição por alumínio e cádmio. O alumínio a 10mM foi capaz de inibir 50% da atividade da enzima, enquanto que o cádmio mostrou maior capacidade de inibição (40% para 1mM e 80% para 10mM do cloreto de cádmio). Este trabalho demonstrou que a atividade da acetilcolinesterase não é influenciada pelo *status* alimentar. Também foi observado sua inibição por alumínio e cádmio, e características físico-química importantes foram determinadas, contribuindo com mais informação sobre esta enzima.

Palavras chave: Bioindicador. Biotecnologia. Colinesterase.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase is an enzyme capable of cleaving acetylcholine in the synaptic clefts and endplate in various organisms, and is considered a good indicator of contamination by heavy metals and pesticides. Thus, this study aimed to extract and characterize the brain and muscle acetylcholinesterase from the zebrafish (*Danio rerio*) and evaluate whether the food *status* produces changes in the activity of this enzyme. Specimens (n = 36) of the zebrafish were acclimated in the laboratory at 27 ° C in two separate tanks (n = 18 per tank) for 14 days, being 7 days with ad libitum feeding (12 animals collected with the "satiety" *status*) and food suspended in the remaining 7 days at the end of which 12 animals were collected with the "fasting" *status*. After 14 days, they were refed ad libitum for 2 hours and 12 animals were collected with the "refed" *status*. At each point the animals were euthanized, and the brain and skeletal muscle were dissected and placed on ice for analysis of enzymatic activity. Regarding food *status* there were no statistical difference in enzymatic activity in both tissues. Subsequently, the brain extract was used for the purification of the enzyme using ethanol precipitation methods (0-30%, 30-60% and 60-90% ethanol fractions) and ion exchange chromatography with DEAE-cellulose. The 0-30% ethanol fraction for having higher degree of purification compared to crude extract (about 7 times) was applied to a DEAE-cellulose column and the enzyme was eluted with an increasing NaCl concentration in a 1 ml flow/min. After the chromatography, the enzyme was characterized as to its optimum temperature and pH, enzymatic kinetics and for its susceptibility in relation to sodium, calcium, aluminum, cadmium and mercury chlorides. The optimum pH and temperature of this enzyme were 9.0 and 30 ° C respectively and a Michaelis-Menten constant (K_m) of 0.24 mM. The sodium and calcium chlorides were not able to modulate the zebrafish's acetylcholinesterase activity, even at high concentrations (10 mM). Furthermore, inhibition occurred with aluminum and cadmium. Aluminum 10mM was able to inhibit 50% of the enzyme activity, while cadmium showed higher inhibitory capacity (40% inhibition to 1mM and 80% inhibition to 10mM of cadmium chloride). This work demonstrated that the activity of acetylcholinesterase is not influenced by food *status*. It was also observed its inhibition by aluminum and cadmium, and relevant physico-chemical characteristics were determined, providing more information on this enzyme.

Keywords: Bioindicator. Biotechnology. Cholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estrutura tridimensional da AChE. São evidenciados: as extremidades C-terminal e N-terminal, e o sítio ativo (região rosa). Triptofano, serina e fenilalanina fazem parte do sítio catalítico e são mostrados em roxo, vermelho e preto, respectivamente.. 18
- Figura 2-** Exemplo de um peixe-zebra (macho), modelo experimental utilizado neste trabalho. 22
- Figura 3-** Temperatura da água *versus* dias do experimento. Após aclimação, os animais (n=18 para cada tanque) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA (p=0,04). 28
- Figura 4-** Biometria dos grupos saciedade, jejum e realimentação. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação. Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,58). 29
- Figura 5-** Efeito do *status* alimentar na atividade da acetilcolinesterase do músculo do peixe-zebra. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,58). 30
- Figura 6-** Efeito do *status* alimentar na atividade da acetilcolinesterase do cérebro do peixe-zebra. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,58). 30
- Figura 7-** Atividade da acetilcolinesterase do peixe-zebra em função da temperatura de reação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA (p<0,001) seguido do teste post-hoc de Tukey. 32
- Figura 8-** Atividade da acetilcolinesterase cerebral do peixe-zebra em função do pH do meio de reação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey (p<0,001). 33

Figura 9- Atividade da acetilcolinesterase cerebral do experimentais segundo a equação de Michaelis-Mentem ($V_{max} = 4,17\text{mU}$, $K_m = 0,24\text{mM}$, $r^2=0,98$)..... 34

Figura 10- Efeito de íons na atividade da AChE do peixe-zebra (A - NaCl, B - CaCl₂, C - AlCl₂, e D - CdCl₂). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. *A concentração de NaCl em 0,1 mM foi desconsiderada, pois não apresentou resultados confiáveis. 36

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Classificação taxonômica do peixe-zebra	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
BSA	Albumina de Soro Bovino
CB	Carbamatos
ChEs	Colinesterases
DEAE-C	Dietilaminoetil celulose
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
K_m	Constante de Michaelis e Menten
OF	Organofosforado
pH	Potencial Hidrogeniônico
SF	Sobrenadante Final
Tris-HCl	Hidrocloridrato de 2-Amino-2-(Hidroximetil)-1,3-Propanodiol
U	Unidade de atividade enzimática
V_0	Velocidade inicial da reação
V_{max}	Velocidade máxima

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções que seguem o Sistema Internacional de Unidades (S.I.)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Enzimas colinesterases	17
2.1.1 FUNÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AChE	17
2.2 Aplicações da AChE.....	19
2.2.1 AChE COMO BIOMARCADOR	19
2.3 Peixe-zebra	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivos Gerais	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1 Aclimação e modificação do status alimentar	25
4.2 Preparação de extratos	25
4.3 Determinação da atividade de AChE e dosagem de proteínas	25
4.4 Purificação da AChE	26
4.5 Caracterização da enzima	26
4.6 Análises estatísticas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Efeito do status alimentar na atividade da acetilcolinesterase.....	28
5.2 Purificação da AChE do peixe-zebra.....	31
5.3. Caracterização da AChE.....	31
5.3.1 pH E TEMPERATURA ÓTIMOS	31
5.3.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	33
5.3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE ÍONS	35
6. CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, existe uma necessidade crescente de encontrar fontes alternativas para a obtenção de biomoléculas como colágeno, enzimas, e polissacarídeos biologicamente ativos. Diversos estudos indicam que os subprodutos do processamento de pescados podem ser utilizados para este fim, uma vez que essas biomoléculas possuem uma ampla aplicabilidade tecnológica e podem agregar valor ao processamento industrial do pescado além de propiciar a criação de novos setores industriais, contribuindo assim com a sustentabilidade econômica e ambiental da indústria pesqueira. Sendo assim, uma das possibilidades que podem ser empregadas é a utilização da acetilcolinesterase de animais aquáticos.

A acetilcolinesterase pertence à família das hidrolases, é especializada na quebra de ésteres de colina (maior afinidade por acetilcolina) e atua em processos de transmissão de impulsos nervosos. Acetilcolinesterases de peixes são utilizadas como biomarcadores devido ao fato de poluentes de diversas fontes chegarem aos recursos hídricos e também à sua alta posição nas cadeias alimentares, o que aumenta detecção de anticolinesterásicos bioacumuláveis. Entre os poluentes mais utilizados e causadores de intoxicações estão os organofosforados e os carbamatos, pertencentes à classe dos inibidores das colinesterases. Além de carbamatos e organofosforados, os metais pesados também inibem a atividade desta enzima.

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é explorado comercialmente pela aquariofilia, não sendo utilizado para consumo. É um peixe teleósteo de água doce que atualmente desponta com um importante modelo experimental em diversas áreas. Seu uso como modelo experimental na aquicultura, no entanto, tem sido limitado, apesar de também possuir potencial para experimentos nesta área.

Neste contexto, a construção desta pesquisa emergiu diante da necessidade de investigar enzimas que possam ser empregadas como bioindicadores de compostos tóxicos como os metais pesados.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Enzimas colinesterases

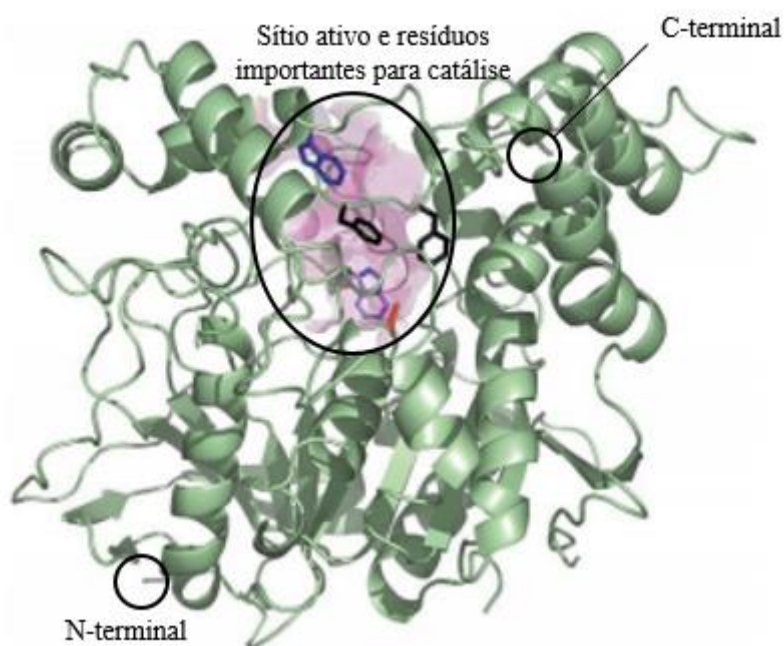
As colinesterases (ChEs) são enzimas abundantes na natureza produzidas por invertebrados e vertebrados. Existem dois tipos de ChEs: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE, também conhecida como pseudocolinesterase). São diferenciadas quanto ao substrato e função, já que a AChE hidrolisa principalmente a acetilcolina (ACh) e tem como função modular os impulsos nervosos, enquanto a BChE hidrolisa em maior quantidade a butirilcolina. Ao passo que a função biológica da AChE é bem definida, a importância da BChE não está bem esclarecida. Acredita-se a BChE esteja envolvida em processos de desintoxicação de compostos exógenos (ASSIS, 2011; JEBALI et al., 2013). Além disso, são encontradas em vários tecidos: a AChE é encontrada no tecido nervoso, no sangue, nas fibras pré e pós-ganglionares, nos músculos, linfócitos e plaquetas; a BChE é sintetizada pelo tecido hepático, mas também está presente em outros órgãos como fígado e pâncreas. Embora ambas estejam evolutivamente relacionadas, são codificadas por genes diferentes, apresentando suas próprias características como parâmetros cinéticos e especificidade ao substrato (BEHRA et al., 2002). Apesar dessas ChEs serem encontradas em vários tecidos, a atividade da AChE é mais abundante no cérebro, fígado e músculo quando comparada à BChE (LETICIA; GERARDO, 2008).

2.1.1 FUNÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS DA AChE

A AChE pertence à família de serino-hidrolases e seu principal papel biológico é catalisar rápida e eficientemente a hidrólise de ACh (neurotransmissor excitatório) na junção sináptica, clivando em colina e acetato. A colina é reabsorvida pelo neurônio e o acetato atravessa a barreira hematoencefálica para posteriormente metabolização em outros tecidos (COLOVIC et al., 2013). A rápida degradação da ACh pela AChE desativa este neurotransmissor após sua ligação ao receptor, de modo a impedir seu acúmulo nas sinapses e evitar a produção de estímulos contínuos por interações repetitivas. Como resultado, a despolarização produzida por ligação da acetilcolina ao receptor é finalizada com o objetivo de restabelecer a estabilidade da membrana pós-sináptica e a sua permeabilidade por mecanismos de repolarização (DVIR et al., 2010; ROEX; KEIJZERS; GESTEL, 2003).

Em 1991 foi elucidada a estrutura tridimensional da AChE utilizando cristalografia de raio-x (Figura 1), a partir de estudos com *Torpedo californica* (arraia elétrica do Pacífico). Esta enzima pesa cerca de 320kDa, contém 537 aminoácidos e dois tipos de cadeia polipeptídicas, cada uma das quais presentes em dímeros ($\alpha_2\beta_2$) (SUSSMAN & SILMAN, 1992).

Figura 1- Estrutura tridimensional da AChE. São evidenciados: as extremidades C-terminal e N-terminal, e o sítio ativo (região rosa). Triptofano, serina e fenilalanina fazem parte do sítio catalítico e são mostrados em roxo, vermelho e preto, respectivamente.



Fonte: Adaptada de SILMAN & SUSSMAN, 2005.

O seu sítio ativo possui dois subsítios, um esterásico e um da ligação da colina chamado de subsítio periférico (um sítio aniônico), que se ligam, respectivamente, ao grupo carbonílico e amônio quaternário da acetilcolina. O sítio ativo da AchE está localizado na parte inferior de uma cavidade estreita e profunda denominada cavidade aromática, neste sítio, os aminoácidos serina, histidina e glutamato são considerados essenciais para a atividade catalítica enzimática e formam a tríade catalítica (ALMEIDA, 2011; HAREL et al., 1993; STODDARD; HAMANN; WADKINS, 2014).

2.2 Aplicações da AChE

As duas aplicações da AChE estão relacionadas com sua atuação farmacológica (busca de inibidores) e sua utilização como biomarcador de toxicidade.

O uso de seus inibidores, também conhecidos como agentes anticolinesterásicos, são capazes de impedir que a enzima degrade a Ach, aumentando assim, o nível e a duração da ação deste neurotransmissor. Estes agentes pode ser classificados de acordo com seu mecanismo de inibição em inibidores reversíveis ou irreversíveis. Inibidores reversíveis desempenham um papel importante na medicina, e são usados no tratamento de várias doenças, tais como: miastenia grave, mal de *Alzheimer* e glaucoma. Sendo assim, um dos exemplos, de interesse para a indústria farmacêutica é a busca por inibidores de AChE que possam ser usados como medicamentos contra doenças neurodegenerativas (COLOVIC et al., 2013; POHANKA, 2011).

Além desta aplicação, tem sido bastante investigado seu uso como biomarcador de toxicidade, em especial em corpos de água.

2.2.1 AChE COMO BIOMARCADOR

Os inseticidas são produtos químicos utilizados para combater insetos e pragas, sendo classificados em três grupos de acordo com a sua classe química: os inibidores da AChE, organoclorados e piretroides. Devido à grande preocupação em evitar a poluição do ambiente com inseticidas que não são degradados nos ambientes onde são utilizados, buscam-se alternativas como os organofosforados (OF) e carbamatos (CB), esses apresentam baixa persistência no ambiente (PEREIRA et al., 2012).

Os OFs são ésteres, amidas, ou derivados de tiois de qualquer ácido fosfórico ou ácido tiofosfórico, apresentam baixa solubilidade em água e são facilmente hidrolisáveis em ambientes alcalinos. Já os CBs fazem parte de um grande grupo de praguicidas sintéticos, são ésteres ou derivados N-substituídos do ácido carbâmico (FULTON & KEY, 2001). Esses compostos apresentam abundantes aplicações, como por exemplo, na pecuária, saúde, em indústrias, no uso doméstico e na agricultura. Atualmente, OFs e CBs estão entre os mais produzidos e usados no mundo, devido ao fato de não se acumularem na natureza e por serem de decomposição relativamente rápida após aplicação. Embora ofereçam menor risco para o meio ambiente, contém alta toxicidade para muitas espécies de vertebrados e invertebrados. Assim, muitos organismos terrestres e aquáticos podem

estar em risco de intoxicação causados pela exposição a esses compostos no meio (CAPKIN; BORAN; ALTINOK, 2014).

Embora a natureza das estruturas químicas desses inseticidas seja diferentes, OFs e CBs apresentam como mecanismo de ação a ligação ao sítio ativo da AChE (resíduo de serina) inibindo sua atividade, com fosforilação e inibição irreversível para OFs e carbamilação e inibição reversível no caso dos CBs. Devido à esta inibição, a ACh não é mais hidrolisada, ocorrendo conseqüentemente a acumulação deste neurotransmissor nas terminações nervosas (KOENIG et al., 2016; ROEX; KEIJZERS; GESTEL, 2003). Sua acumulação causa um maior efeito colinérgico e interrupção de transmissão nervosa, resultando em sérias disfunções em organismos aquáticos, como mudanças de comportamento, paralisia e morte (FULTON & KEY, 2001).

A AChE também é afetada pela presença de metais pesados nos corpos de água, alguns desses metais, como cádmio, chumbo e mercúrio, estão geralmente associados a problemas de poluição e contaminação do meio ambiente, eles podem ser biocumulados e são considerados neurotóxicos por inibirem a atividade da AChE (SABULLAH et al., 2014).

Para detectar a presença de íons e de pesticidas a enzima pode ser utilizada na forma solúvel (enzima livre), sendo uma técnica considerada eficiente, pois já foi elucidado que esses compostos inibem a AChE mesmo em concentrações bem abaixo dos níveis mínimos recomendados (ASSIS et al., 2015). O ensaio de detecção também pode ser realizado com a enzima na forma imobilizada, sendo esta a fixação em um sistema analítico e é bastante utilizada para construção de biossensores. Esses dispositivos são amplamente estudados para detecção de substâncias potencialmente tóxicas no ambiente (HANSEN, 2008). Sendo assim, já desenvolveram um biossensor de AChE baseado em em um compósito de aerogéis de carbono e platina com o objetivo de determinar pesticidas OF, este apresentou uma alta sensibilidade e boa reprodutibilidade (LIU; ZHENG; LI, 2013). Também foi desenvolvido um biossensor com a AChE imobilizada em um compósito de nanotubo de carbono e polianilina com o propósito de determinar CBs em frutas e vegetais, este foi satisfatório, pois pode identificar baixas concentrações de analito (CESARINO et al., 2012). Então, observa-se que biossensores com a enzima AChE imobilizadas estão sendo construídos, com o propósito de identificar, através da inibição enzimática, a presença dos pesticidas OF e CB, na água, no solo e em alimentos (DHULL et al., 2013).

A imobilização enzimática visa a substituição da forma solúvel em ensaios em que o uso da enzima solúvel não é viável, como na análise de corpos de água bastante turvos ou com cor. Este método pode também diminuir o custo da análise, aumentar a rapidez e a exatidão do processo (MOHAZMAD et al., 2014). A imobilização de AChEs em diversos suportes sólidos já foi demonstrada, a exemplo de sua fixação em sílica porosa (SALEEM et al., 2016), sílica mesoporosa, filmes poliméricos, filmes de náfion, glutaraldeído, álcool polivinílico, gel de poliacrilamida, membrana de celofane, membrana de nitrato de *nylon* e celulose (PUNDIR; CHAUHAN, 2012) e em nanopartículas (CABRAL et al., 2013).

Desta forma, o uso de ensaio da atividade da AChE para detecção de compostos inibidores é uma aplicação importante para esta enzima, sendo a família das ChEs consideradas um valioso biomarcador de exposição à inseticidas, já que está é sensível a exposição a OFs, CBs e de metais pesados (CAJARAVILLE et al., 2000). Deste modo, a dosagem da sua atividade é frequentemente utilizada para a verificação de contaminação e da qualidade da água em diversos organismos, incluindo peixes (HAGGER et al., 2006).

2.3 Peixe-zebra

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo da Família *Cyprinidae*, conhecido pela comunidade científica como *zebrafish* (NASIADKA & CLARK, 2012; MCCLURE; MCINTYRE; MCCUNE, 2006). Devido às listras horizontais de cor azul-escuro presentes no corpo cinza, o peixe-zebra também é conhecido em algumas regiões do Brasil como paulistinha. Em relação a sua anatomia (Figura 2), o peixe-zebra possui um corpo alongado e apresenta 3-5 cm de comprimento, sendo o corpo dos machos mais longo e as fêmeas possuem um volume característico na região abdominal (SCHNEIDER et al., 2009). Este peixe tropical é nativo do subcontinente indiano, habita riachos de água doce e rio, onde são frequentemente encontrados em águas rasas, perto da borda de córregos ou em valas (SPENCE et al., 2006). Além disso, eles se reproduzem o ano todo, apresentam tempo de geração curto, já que os seus embriões eclodem após 3 dias de desenvolvimento e atingem a maturidade sexual em 10 a 12 semanas (WESTERFIELD, 2007). A classificação taxonômica do peixe zebra está representada na Tabela 1.

Figura 2- Exemplo de um peixe-zebra (macho), modelo experimental utilizado neste trabalho.



Fonte: Aquaa3

Tabela 1- Classificação taxonômica do peixe-zebra

Peixe-zebra	
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Acrinopterygii</i>
Ordem	<i>Cypriniformes</i>
Família	<i>Cyprinidae</i>
Gênero	<i>Danio</i>
Espécie	<i>Danio rerio</i>

Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Inicialmente, o peixe-zebra foi utilizado no mundo científico pela sua transparência durante as fases embrionária e larval, o que fez dele um modelo excelente para estudos de embriologia e desenvolvimento de órgãos em vertebrados. Posteriormente, foi utilizado em estudos de patologias, como por exemplo, no câncer (KARI; RODECK; DICKER, 2007). Atualmente, é um modelo experimental de vertebrados utilizados em todos os campos das biociências por apresentar vantagens que o tornam importante em pesquisas experimentais. Apresenta fácil manipulação, se reproduzem rapidamente em cativeiro, com baixo custo de cultivo, já que por serem pequenos necessitam de pouco espaço, também apresentam alta fecundidade, facilidade de criação e desenvolvimento rápido. A existência de bancos de dados com conhecimentos acerca de genes e transcritos também é considerada de grande importância para seu uso com modelo experimental. Por exemplo, seu genoma foi completamente sequenciado e caracterizado, o que facilita a realização de estudos de expressão gênica nestes organismos e, portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na

toxicidade causada por contaminantes de corpos de água (HENTIG & JACOBS, 2016; HOO et al., 2016; NASIADKA & CLARK, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Extrair, purificar e caracterizar AChE do peixe-zebra em diferentes *status* alimentares, e investigar a possibilidade do uso desta enzima como bioindicador de metais pesados.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito do *status* alimentar na atividade da AChE no tecido muscular e cerebral;
- Extrair e purificar a AChE do peixe-zebra através de métodos de precipitação com etanol e cromatografia de troca iônica;
- Caracterizar a AChE purificada quanto ao seu pH e temperatura ótimos, e cinética enzimática;
- Investigar o efeito de íons de metais pesados na atividade da AChE.

4. METODOLOGIA

4.1 Aclimação e modificação do *status* alimentar

Espécimes macho de *Danio rerio* foram cultivados em salinidade entre 0,2 e 0,5g/L, temperatura entre 25 e 28°C, e pH entre 6,2 e 7,8. Os peixes (n=36) foram aclimatados a 27°C em dois tanques separados (n=18 por tanque) por 14 dias, sendo 7 dias com alimentação *ad libitum* e os 7 dias restantes sem alimentação. Ao final dos 14 dias, os animais foram realimentados *ad libitum* por 2h. Os pontos de coleta dos animais (n=6 animais por tanque) ocorreram ao final do período de aclimação (considerado o *status* alimentar de saciedade), ao final do período de jejum (considerado o *status* alimentar de jejum) e após as 2 horas de realimentação (considerado o *status* alimentar realimentado). Em cada ponto de coleta os animais foram eutanasiados por decapitação, de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia (CEUA/CBiotec) sob o número 05/06. Após a eutanásia o cérebro e o músculo esquelético foram imediatamente dissecados e colocados em gelo para preparação do extrato enzimático.

4.2 Preparação de extratos

Os tecidos muscular esquelético e cerebral foram homogeneizados com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 na proporção 1g de tecido para 40mL de tampão, com o auxílio de um homogeneizador manual de vidro. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 10min a 4°C (centrífuga Hermle, modelo Z326K). Após a centrifugação o precipitado foi descartado e o sobrenadante, chamado de extrato bruto, foi utilizado para as determinações de atividade enzimática e purificação da enzima.

4.3 Determinação da atividade de AChE e dosagem de proteínas

Os ensaios foram realizados em triplicata em placas de fundo chato de 96 poços. A atividade da AChE foi determinada utilizando 10 µl da enzima (extrato do cérebro ou do músculo), 50 µL de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 5mM, 5 µL de acetilcolina 5mM e 185 µL de tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. A leitura da absorbância a 405nm foi feita em diferentes tempos em um leitor de microplacas (Mindray 96-A).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como o incremento de 0,001 de absorvância por minuto.

O método colorimétrico de Sedmak (1977) foi utilizado para determinação da concentração de proteínas nas soluções, utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA).

4.4 Purificação da AChE

Para realização da purificação da enzima utilizamos os métodos de precipitação com etanol e cromatografia de troca iônica. Primeiramente etanol gelado foi adicionado ao extrato bruto refrigerado e sob agitação até ser obtida uma concentração final de 30% (v/v) de etanol, quando o sistema foi mantido em repouso por 24h. A solução de enzima contendo etanol foi centrifugada a 10.000 x g por 10min a 4°C e o precipitado foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, e chamado fração 0-30%. Ao sobrenadante foi adicionado etanol até a concentração de 60% e a mesma metodologia utilizada para obter a fração 0-30% foi repetida para obter a fração 30-60% e 60-90%. O sobrenadante da fração 60-90% foi chamado de sobrenadante final (SF).

Os melhores resultados de atividade específica foram observados na fração 0-30% e esta foi aplicada na cromatografia de troca iônica, onde utilizamos como fase estacionária DEAE-C (Dietilaminoetil celulose) e o tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 como fase móvel em um fluxo de 1mL/min. Proteínas adsorvidas à resina de troca iônica foram eluídas da coluna com concentrações crescentes de NaCl (Cloroeto de sódio) (0,1M, 0,2M, 0,3M e 1M preparado em Tris-HCl 0,1M pH 8,0). Frações de 1mL foram coletadas e a atividade de acetilcolinesterase foi medida em cada fração. A eluição das proteínas durante a cromatografia foi seguida por espectrofotometria a 280nm.

4.5 Caracterização da enzima

A AChE foi caracterizada quanto à sua temperatura ótima, pH ótimo, cinética enzimática e efeito de íons de metais pesados na sua atividade. Para determinar a temperatura ótima, a atividade enzimática foi realizada em faixas de temperatura entre 25 e 45°C, com incremento de 5°C para cada ponto experimental.

Nos experimentos de pH ótimo, a atividade enzimática foi avaliada em faixas de pH de 5,5 a 10,0. Neste procedimento utilizamos os tampões citrato-fosfato (pH de 5,5 a 7), Tris-HCl (pH de 7,0 a 9,0) e glicina-NaOH (pH de 8,5 a 10,0).

A cinética enzimática foi avaliada utilizando diferentes concentrações do substrato acetiltiocolina (de 0,01mM a 0,8mM). As velocidades de reação foram modeladas com auxílio do software Origin Pro 8.0 para determinar o V_{max} e K_m da enzima, utilizando o modelo de Michalis-Menten.

Para investigar o efeito de alguns íons na atividade da AChE do peixe-zebra, amostras da enzima (15µl) foram aplicadas em uma placa de 96 poços somado a 15µl de NaCl, CaCl₂ (cloreto de cálcio), AlCl₃ (cloreto de alumínio), HgCl₂ (cloreto de mercúrio) e CdCl₂ (cloreto de cádmio) nas concentrações de 0,001mM a 10mM as quais foram incubadas durante 15 minutos e em seguida adicionados DTNB e substrato como descrito anteriormente para determinação da atividade residual (atividade comparada à reação sem a adição de íons) (Assis et al., 2010).

4.6 Análises estatísticas

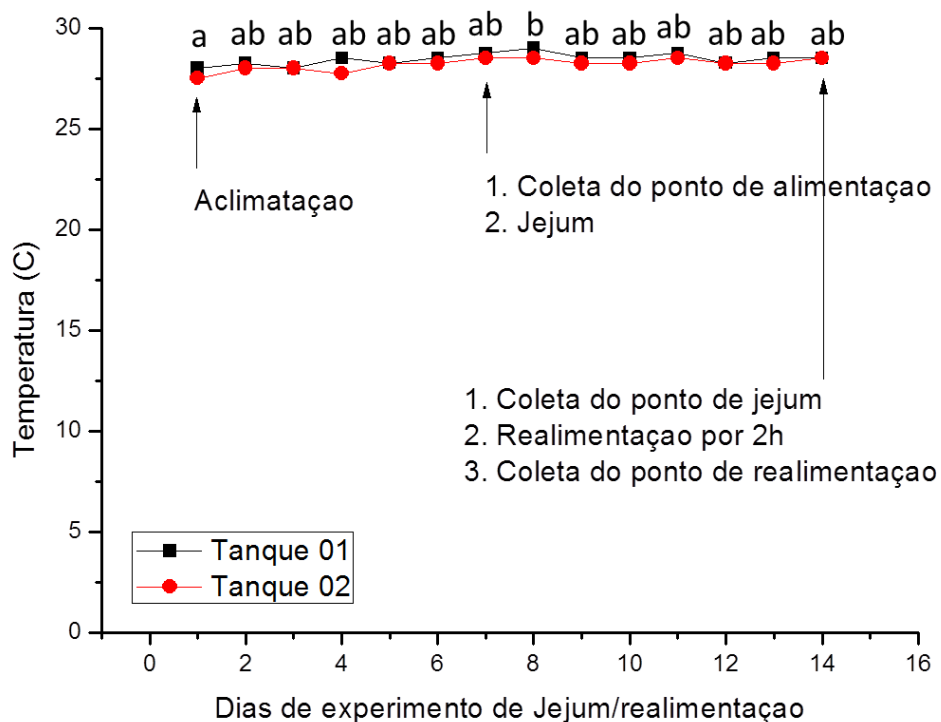
Todos os dados foram analisados para determinar o tipo de distribuição (normal ou diferente da normal) pelo teste Kolmogorov-Smirnov com nível de significância de 0,05. Todos os dados analisados seguiram uma distribuição normal, e a diferença entre as médias de cada ponto experimental foram analisadas com o teste ANOVA (Análise de variância). Após o teste de ANOVA o teste *post-hoc* de Tukey foi utilizado para analisar grupos com médias estatisticamente diferentes. Os testes estatísticos foram realizados no programa IBM SPSS Statistics V21.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do *status* alimentar na atividade da acetilcolinesterase

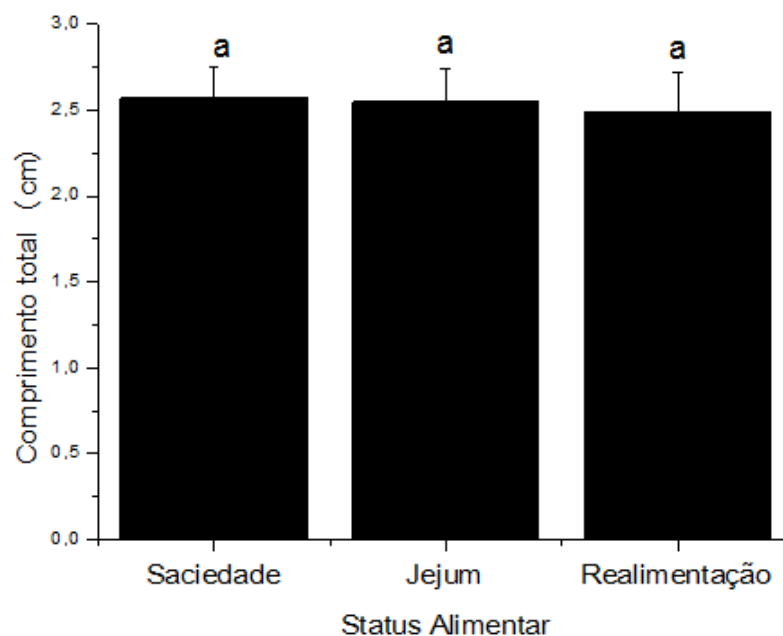
A temperatura e pH foram aferidos durante todo o experimento para assegurar que estas condições não seriam variáveis que interferissem. Constatou-se que não houve mudanças significantes na temperatura durante o experimento (Figura 3). Apesar do pH ter sido estimado, os dados não puderam ser analisados devido ao fato de que o pH-metro portátil não ter apresentado dados confiáveis ao final do experimento.

Figura 3- Temperatura da água *versus* dias do experimento. Após aclimatação, os animais (n=18 para cada tanque) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA (p=0,04).



Outro fator analisado foi a biometria dos animais (Figura 4), não tendo sido observadas diferenças significativas neste parâmetro entre os grupos saciedade, jejum e realimentação. Estes resultados permitiriam separar o efeito do *status* alimentar nas atividades enzimáticas, excluindo a possibilidade da temperatura ou biometria serem fatores importantes.

Figura 4- Biometria dos grupos saciedade, jejum e realimentação. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação. Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,58).



Da mesma forma, não verificou-se diferenças significantes na atividade da acetilcolinesterase no músculo esquelético (Figura 5) ou no cérebro (Figura 6) nos diferentes grupos de *status* alimentar (saciedade, jejum e realimentação).

Figura 5- Efeito do *status* alimentar na atividade da acetilcolinesterase do músculo do peixe-zebra. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,58).

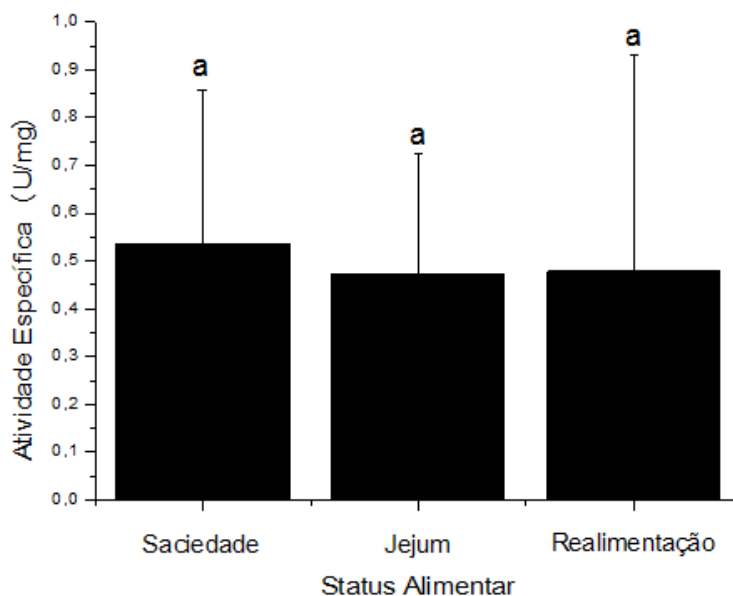
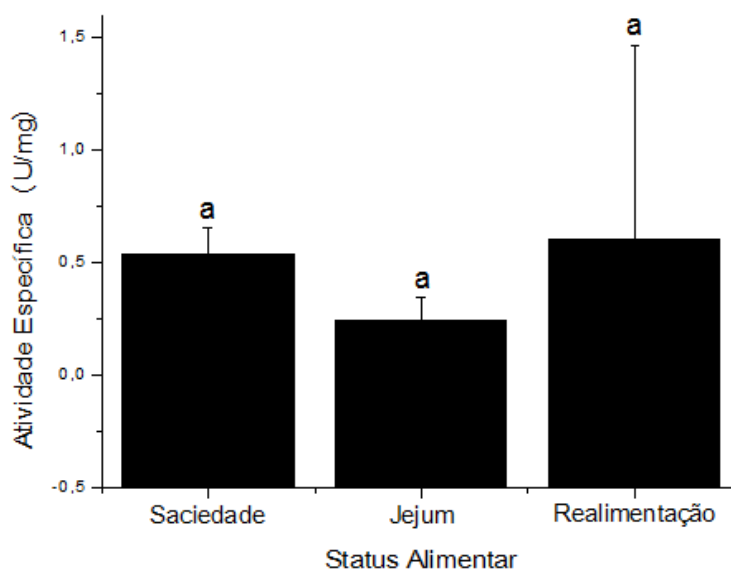


Figura 6- Efeito do *status* alimentar na atividade da acetilcolinesterase do cérebro do peixe-zebra. Após aclimação, os animais (n=12 para cada grupo) foram submetidos a 7 dias de jejum seguidos de 2h de realimentação Não houve diferença entre os grupos segundo o teste ANOVA (p=0,58).



5.2 Purificação da AChE do peixe-zebra

Os extratos do tecido cerebral dos grupos saciedade, jejum e realimentação foram agrupados em um único extrato e utilizados nos experimentos de purificação da AChE. O primeiro passo de purificação foi realizado por precipitação com etanol. Neste experimento, a enzima foi purificada cerca de 6 vezes (0-30%) com rendimento de 26%.

A cromatografia de troca iônica na coluna DEAE-C apresentou resultados muito aquém do esperado, sendo a enzima eluída em todas as frações de 0,1, 0,2 e 0,3 M de NaCl. Não foi possível repetir este experimento devido à baixa quantidade de extrato disponível para análise. Desta forma, reunimos as frações da cromatografia com maior atividade enzimática em um *pool* e o utilizamos nos experimentos de caracterização.

O método de cromatografia de troca iônica já tinha sido aplicado na purificação de AChE com bons resultados (DUHAIMAN et al., 1996). Como é mostrado no estudo desenvolvido por Ding, Wu e Fang (2011), onde foi avaliado a purificação da AChE em *Oreochromis aurea* (tilápia azul) utilizando cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose, neste a atividade específica da enzima purificada foi 20,628 U/ mg de proteína, com um fator de purificação de 139 vezes e recuperação de 22,1%.

Estratégias de purificação com cromatografia de afinidade empregando a proliacrilamida resultam em preparações mais puras com menos passos de purificação (SON et al., 2002).

5.3. Caracterização da AChE

Os experimentos de caracterização físico-química de enzimas permitem o estabelecimento de condições ótimas para catálise enzimática, otimizando a quantidade de enzima utilizada nos ensaios e reduzindo os custos dos processos que envolvam passos enzimáticos.

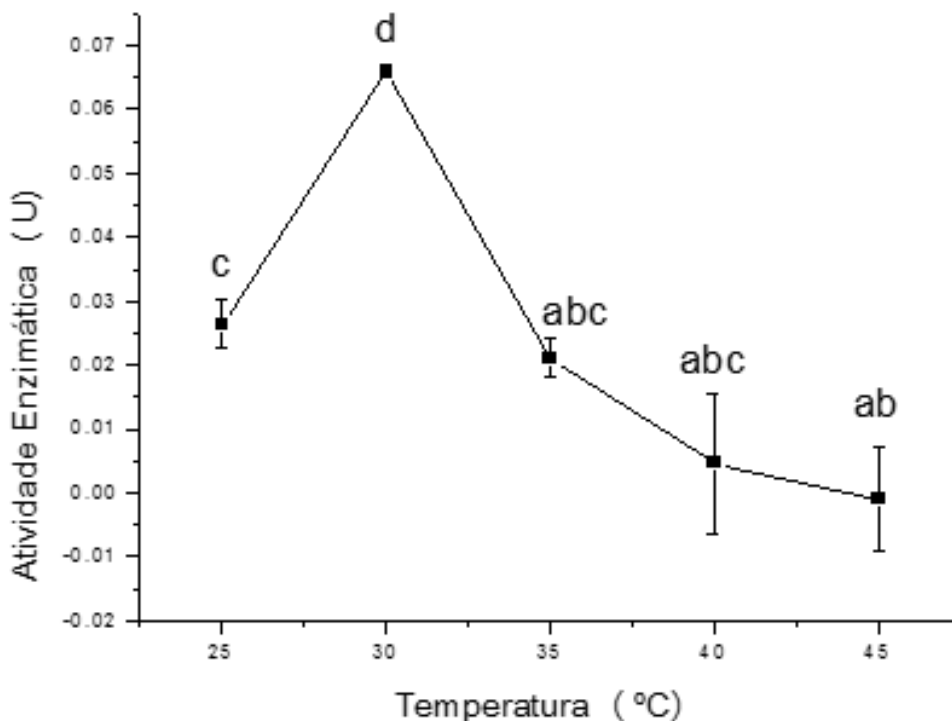
Como mencionado anteriormente, a AChE foi caracterizada quanto ao seu pH e temperatura ótimos, quanto à sua cinética de reação e quanto à susceptibilidade de inativação por íons metálicos.

5.3.1 pH E TEMPERATURA ÓTIMOS

A AChE cerebral do peixe-zebra mostrou temperatura ótima de 30°C. Tendo em vista, que em 25°C a 30°C a atividade enzimática foi crescente e a partir dos 30°C a atividade foi decrescendo consideravelmente até chegar a 45°C, quando a atividade foi

próxima de zero. Este parâmetro é consideravelmente baixo quando comparada à temperatura ótima de outros peixes de ambientes tropicais como o *Colossoma macropomum* (tambaqui) e o *Arapaima gigas* (pirarucu), cuja temperatura ótima é observada a 45°C (ASSIS; BEZERRA; JÚNIOR, 2010). Já em comparação com outro organismo aquático, o *Lepomis macrochirus* (bluegill), pode ser considerada semelhante, por este apresentar 25°C (BEAUVAIS et al., 2002). Ainda, esta temperatura se assemelha a peixes de ambiente temperado como *Pleuronectes platessa* (plaice), que exibem faixa ótima de 32 a 34°C (BOCQUENÉ; GALGANI; TRUQUET, 1990). Também é equivalente aos peixes: *Carassius auratus* (peixe-japonês), *Rachycentron canadum* (cobia), *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo) e tilápia-azul, que apresentam temperatura ótima de 35°C (ASSIS; BEZERRA; JÚNIOR, 2010; DING; WU; FANG, 2011).

Figura 7- Atividade da acetilcolinesterase do peixe-zebra em função da temperatura de reação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA ($p < 0,001$) seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

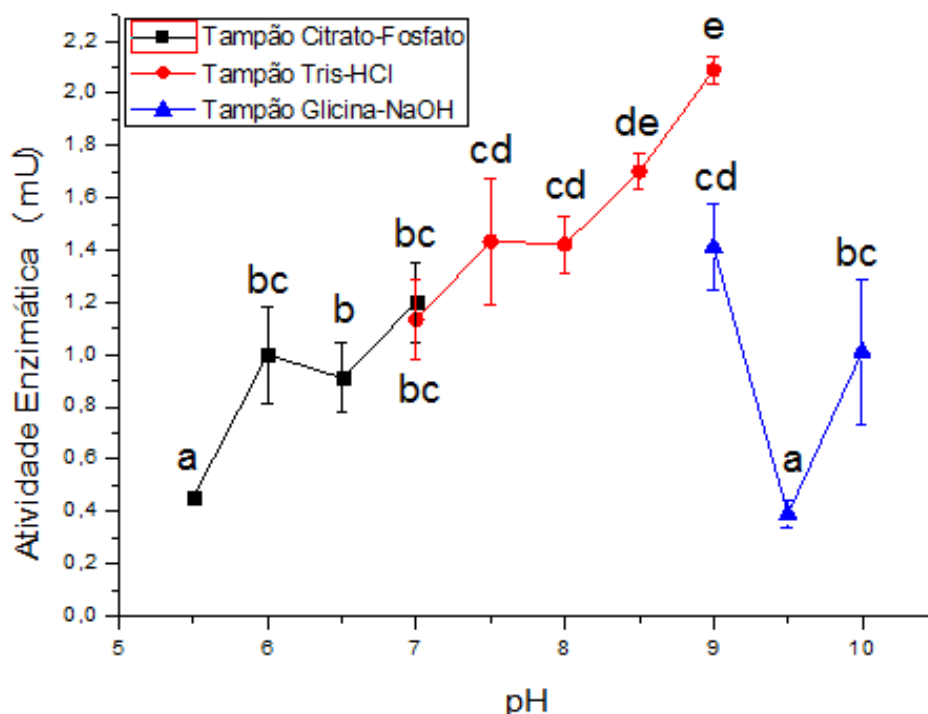


Em relação ao pH, os maiores valores enzimáticos foram observados na faixa entre 8,5 e 9,0 utilizando o tampão Tris-HCl (Figura 8). A enzima AChE mostrou o

comportamento típico de perda considerável de sua atividade em pH levemente ácido (5,5-6,5). Resultados foram semelhantes ao estudo realizado por Assis et al. (2010), onde a enzima do tambaqui demonstrou pH de 7,0-8,0. Esta atuação é compatível a *Scomber Scomber* (sarda), *Clarias gariepinus* (peixe-gato Africano), pirarucu e cobia (8,0) (ASSIS; BEZERRA; JÚNIOR, 2010), também a peixes de regiões temperadas, como exemplo, o plaice, que exibiu faixa ótima de 8,5 (BOCQUENÉ; GALGANI; TRUQUET, 1990; BEAUVAIS et al., 2002). Ainda, foi similar ao pH ótimo da tilápia azul, que apresentou entre 7,5 a 8,0 (DING; WU; FANG, 2011).

Em contraponto, o pH ótimo da AChE do peixe-zebra foi considerado alto em comparação a outros peixes que apresentaram pH neutro, como a *Solea Solea* (lingado) (7,0), *Cymatogaster aggregate* e *Hypostomus punctatus* (cascudo) (entre 7,0 e 7,2), (ASSIS et al., 2010).

Figura 8- Atividade da acetilcolinesterase cerebral do peixe-zebra em função do pH do meio de reação. Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,001$).



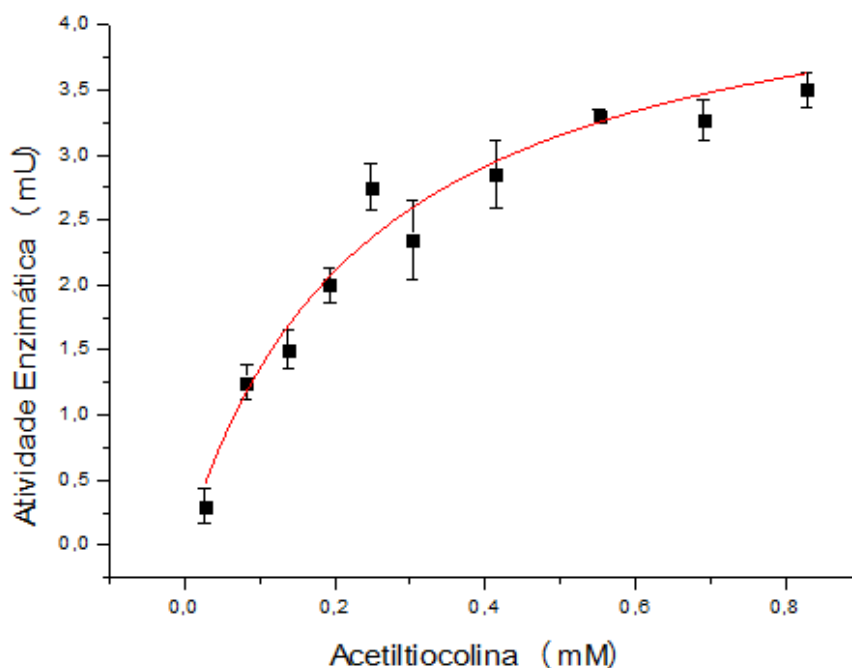
5.3.2 CINÉTICA ENZIMÁTICA

A constante de Michaelis-Mentem (K_m) é tida como um importante parâmetro que reflete a afinidade da enzima pelo substrato testado, sendo a afinidade inversamente

proporcional ao K_m . Os parâmetros cinéticos da AChE cerebral do peixe-zebra apresentaram velocidade máxima (V_{max}) e K_m de 4,71mU e 0,24 mM, respectivamente, utilizando como substrato a acetiltiocolina (Figura 9). Relacionando com outras espécies, a AChE do *zebrafish* mostrou um K_m cerca de 4,5 vezes menor do que um peixe utilizado como modelo biológico, o *goldfish* ou japonês e menor que o da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), peixe explorado comercialmente para consumo humano (SHAONAN et al., 2004). Comparando com o tabaqui, o K_m foi cerca de 6,7 vezes menor (ASSIS, 2010). Já em outros estudos foi mostrado que os valores de K_m de 0,085 em cérebro da truta arco-íris), enquanto V_{max} variaram de 0,116 em cérebro pirarucu até 0,524 U/mg de proteína.

Ademais, a comparação da constante de Michaelis-Mentem pode revelar diferenças nas atividades da enzima produzida em órgãos distintos de um mesmo organismo. Por exemplo, a AChE hepática da tilápia-do-Nilo apresentou uma constante de 0,03, a cerebral de 0,183 mmol/L, enquanto a enzima muscular da mesma espécie apresentou uma constante três vezes maior que a do fígado (DING; WU; FANG, 2011; FUENTES & BOUCHOT, 2004; BERMAN & YOUNG, 1971).

Figura 9- Atividade da acetilcolinesterase cerebral do experimentais segundo a equação de Michaelis-Mentem ($V_{max} = 4,17\text{mU}$, $K_m = 0,24\text{mM}$, $r^2 = 0,98$).



5.3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE ÍONS

A AChE é inibida por pesticidas da classe dos organofosforados e carbamatos. Por este motivo, a enzima extraída de animais aquáticos vem sendo extensivamente estudada para sua aplicação como bioindicador *in vitro* da presença destes componentes em corpos de água. Além desta inibição, a AChE também poderia ser empregada como indicador de metais pesados, tendo em vista que eles são substâncias tóxicas para os sistemas biológicos (FUENTES & BOUCHOT, 2004; ASSIS et al., 2010).

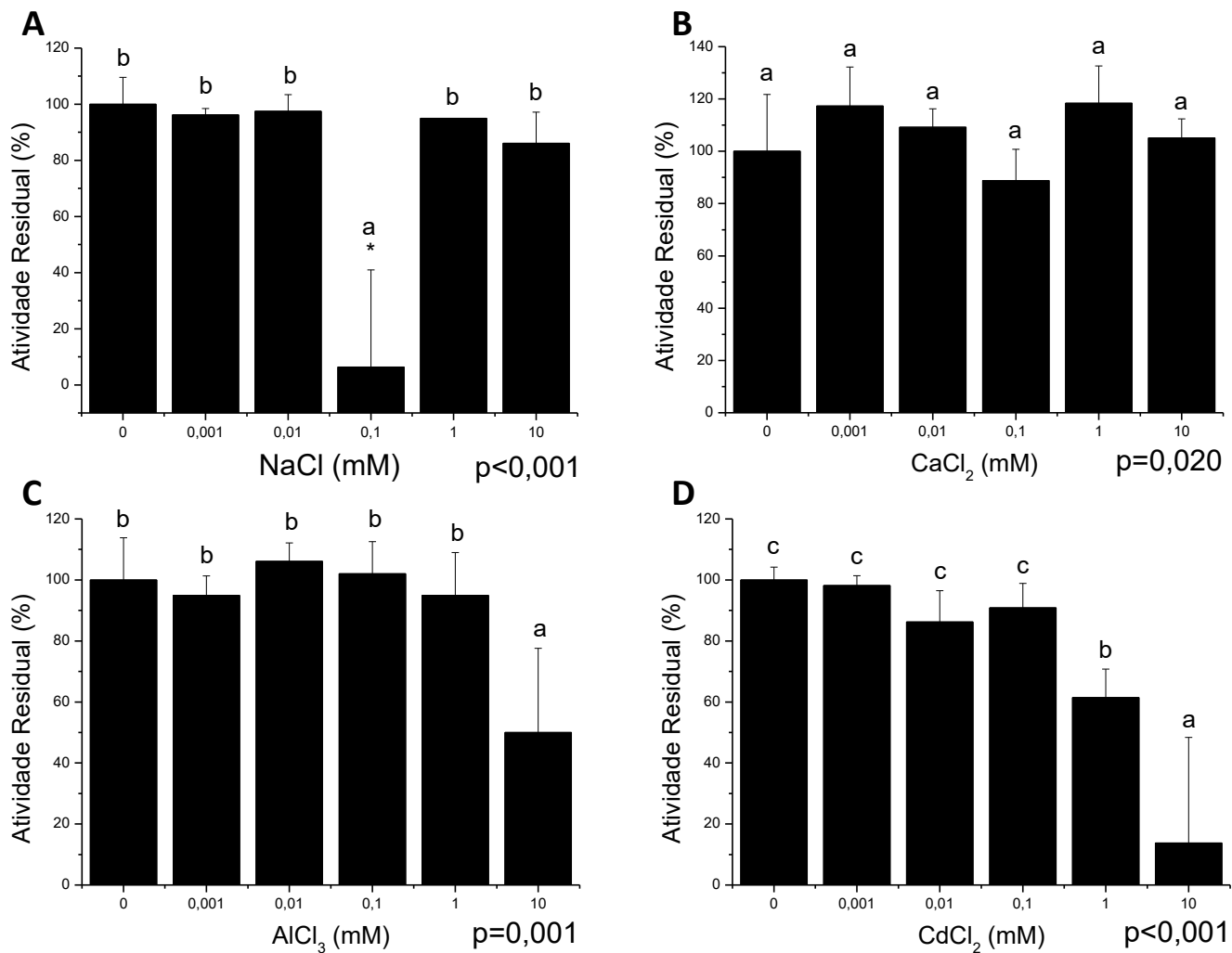
Após a incubação da AChE com os íons, observou-se os efeitos dos metais pesados na atividade enzimática. De acordo com a Figura 10 pode-se verificar que NaCl e CaCl₂ não foram capazes de inibir a AChE em nenhuma concentração. No entanto, tanto o AlCl₃ quanto o CdCl₂ possuem capacidade inibitória. O cloreto de alumínio na concentração de 10mM foi capaz de reduzir 50% da atividade da enzima. Ela é ainda mais susceptível à presença do cádmio, já que quando incubada com 1mM de CdCl₂ a atividade decaiu cerca de 40% em relação à reação controle (sem íon). Em contraposição, a incubação com 10mM do cloreto de cádmio reduziu em 90% a atividade enzimática. Neste contexto, é importante mensurar a inibição desses metais, incluindo o alumínio e cádmio, pois quando acumulados podem ocasionar doenças aos organismos marinhos devido a sua toxicidade, sendo o peixe um dos principais organismos afetados (BABY et al., 2010).

Estes resultados são similares ao estudo realizado por Assis et al. (2015), em que avaliou-se o efeito de 15 íons na atividade de AChE no cérebro em espécies de interesse econômico, nesta ocorreu inibição utilizando o CdCl₂ na concentração de 1mM em 33%, 49% e 35% nos peixes *Rachycentron canadum*, *Electrophorus electricus* e *Oreochromis niloticus*, respectivamente. Também, ocorreu inibição com AlCl₃ em 13% na cobia e em contraposição a esses metais, não houve mudança da enzima com CaCl₂.

Já em Bocquené, Galgani e Truquet (1990) foi analisado a inibição do CuSO₄, CuCl₂, Zn, CdCl₂ e As nos peixes *Scomber Scombe Pleuronectes Platessa*, *Palaemon Serratus* e *Mytilus Serratus*, entre essas quatro espécies os íons apresentaram inibição. Comparando com o CdCl₂, ocorreu perda de mais da metade na atividade da AChE.

Além disso, verificou-se em pesquisas anteriores a redução da AChE no cérebro do peixe-zebra utilizando outros compostos, como o acetato de chumbo e cloreto de mercúrio que reduziram a enzima em 18% e 25%, respectivamente, em 24h e se estabilizaram após 30 dias (RICHETTI et al., 2011).

Figura 10- Efeito de íons na atividade da AChE do peixe-zebra (A - NaCl, B - CaCl₂, C - AlCl₃, e D - CdCl₂). Letras diferentes significam valores estatisticamente diferentes segundo o teste ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Tukey. *A concentração de NaCl em 0,1 mM foi desconsiderada, pois não apresentou resultados confiáveis.



6. CONCLUSÕES

Levando em consideração os dados obtidos, conclui-se que o nível da atividade específica da enzima estudada no músculo esquelético e no cérebro não é afetado pelo *status* nutricional utilizando o protocolo empregado.

A AChE cerebral do peixe-zebra foi purificada cerca de sete vezes em relação ao extrato bruto e mostrou características físico-químicas interessantes como o pH ótimo na faixa alcalina, temperatura ótima em 30°C, e susceptibilidade a metais como alumínio e cádmio, podendo servir no futuro para ensaios de detecção destes íons em corpos de água.

É possível também concluir que a AChE cerebral do peixe-zebra mostrou uma grande afinidade pelo seu substrato sintético.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de *Alzheimer* Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de *Alzheimer*. 2011. 126f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2011.

ASSIS, C. R. D. Acetilcolinesterase cerebral e eritrocitária como biomarcador *in vitro* da exposição a pesticidas organofosforados e carbamatos. **Dissertação (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia)** – Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

ASSIS, C. R. D.; CASTRO, P.F.; AMARAL, I.P.G.; CARVALHO, E.V.M.M.; JÚNIOR, L.B.C.; BEZERRA, R.S. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (*Colossoma macropomum*) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 2243–2248, 2010.

ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; JÚNIOR, L. B.C. Fish Cholinesterases as Biomarkers of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. **Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment**, p. 253–278, 2010.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A.G.; OLIVEIRA, V.M.; FRANÇA, R.C.P.; Santos, J.F.; Carvalho, E.V.M.M; BEZERRA, R.S.; JÚNIOR, L. B.C. Effect of ions on the activity of brain acetylcholinesterase from tropical fish. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 7, p. 505–514, 2015.

AQUAA3.Câncer é observado no peixe-zebra (Danio rerio). Disponível em:<<https://www.aquaa3.com.br/2016/01/cancer-e-observado-no-peixe-zebra-danio-rerio.html>> Acesso em: 05 novembro de 2016.

BABY, J.; RAJ, J.S.; BIBY, E.T.; JEEVITHA, M.V.; AJISHA, S.U.; RAJAN, S.S. Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. **International Journal of biological and chemical sciences**, v. 4, n. 4, p. 940, 2010.

BEHRA, M.; COUSIN, X.; BERTRAND, C.; VONESCH, J.L.; BIELLMANN, D.; CHATONNET, A.; STRÄHLE, U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and

muscular development in the zebrafish embryo. **Nature neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 111–118, 2002.

BERMAN, J. D. & YOUNG, M. Rapid and Complete Purification of Acetylcholinesterases of Electric Eel and Erythrocyte by Affinity Chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 2, p. 395–398, 1971.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. **ICES Techniques in Marine Environmental Sciences**, v. 22, n. 22, p. 19, 1998.

BOCQUENÉ, G.; GALGANI, F.; TRUQUET, P. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**, v. 30, n. 2, p. 75–89, 1990.

BEAUVAIS, S.L., COLE, K.J., ATCHISON, G.J.; COFFEY, M. Factors affecting brain cholinesterase activity in Bluegill (*Lepomis macrochirus*). **Water, Air, and Soil Pollution**, v.135, p. 249-264, 2002.

CABRAL, M.F.; SGOBBI, L.F.; KATAOKA, E.M.; MACHADO, S.A.S. On the behavior of acetylcholinesterase immobilized on carbon nanotubes in the presence of inhibitors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 30–35, 2013.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO; M.J.; BLASCO, J.; PORTE, J.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. **Science of the Total Environment**, v. 247, n. 2–3, p. 295–311, 2000.

CAPKIN, E.; BORAN, H.; ALTINOK, I. Response of Acetylcholinesterase (AChE) in the Erythrocyte and Liver of Rainbow Trout Exposed to Carbosulfan. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, p. 643-650, 2014.

CESARINO, I.; MORAES, F.C.; LANZA, M.R.V.; MACHADO, S.A.S. Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 873–879, 2012.

COLOVIC, M.B.; KRSTIC, D.Z.K.; PASTI, T.D.L.; BONDZIC, A.M.B.; VASIC, V.M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, 2013.

DING, Y.; WU, X.; FANG, J. Purification and characterization of acetylcholinesterase from brain tissues of *Oreochromis aurea* and its application in environmental pesticide monitoring. **Sciences in Cold and Arid Regions**, v. 3, n. 4, p. 339–343, 2011.

DHULL, V.; GAHLAUT, A.; DILBAGHI, N.; HOODA, V. Acetylcholinesterase biosensors for electrochemical detection of organophosphorus compounds: A review. **Biochemistry Research International**, v. 2013, 2013.

DUHAIMAN, A.S.; ALHOMIDA, A.S.; RABBANI, N.; KAMAL, M.A.; AL-JAFARI, A.A. Purification and characterization of acetylcholinesterase from desert cobra (*Walterinnesia aegyptia*) venom. **Biochimie** 77, 46-50, 1996.

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERG, T.L.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chemico-Biological Interactions**, v. 187, n. 1–3, p. 10–22, 2010.

FUENTES, G.R. & BOUCHOT, G.G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environment Research**, 58, 505-509, 2004.

FULTON, M. H. & KEY, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 20, n. 1, p. 37–45, 2001.

HAGGER, J. A.; JONES, M. B.; LEONARD, D. R., OWEN, R.; GALLOWAY, T. S. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? **Integr Environ Assess Manag**, v. 2, p. 312-329, 2006.

HAREL, M.; SCHALKT, I.; SABATIERT, L.E; BOUETT, F.; GOELDNER, T.M.; HIRTHT, C.; AXELSEN, P.H; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 19, p. 9031–9035, 1993.

HANSEN, P. D. Biosensors and ecotoxicology. **Engineering in Life Sciences**, v. 8, n. 1, p. 26–31, 2008.

HENTIG, J. T.; JACOBS, C. A.B. Exposure to Zinc Sulfate Results in Differential Effects on Olfactory Sensory Neuron Subtypes in Adult Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1445, 2016.

HOO, J. Y.; KUMARI Y.; SHAIKH, M.F.; HUE, S.M. AND GOH, B.H. Zebrafish: A Versatile Animal Model for Fertility Research. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–20, 2016.

JEBALI, J; KHEDHER, S.B.; SABBAGH, M.; KAMEL, N.; BANNI, M.; BOUSSETTA, H. Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 13, n. 4, p. 525–537, 2013.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 70–80, 2007.

KOENIG, J. A.; DAO, T.L.; KAN, R.K.; SHIH, T.M. Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1374, n. 1, p. 68–77, 2016.

LETICIA, A. G.; GERARDO, G. B. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 3, p. 787–797, 2008.

LIU, S.; ZHENG, Z.; LI, X. Advances in pesticide biosensors: Current status, challenges, and future perspectives. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 1, p. 63–90, 2013.

MCCLURE, M. M.; MCINTYRE, P. B.; MCCUNE, A. R. Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 2, p. 553–570, 2006.

MOHAZMAD, N.K.; MARZUKI, N.H.C. BUANG, N.A. HUYOP, F.; WAHAB, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis

techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, 205–220, 2014.

NASIADKA, A. & CLARK, M. D. Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment. **ILAR Journal**, v. 53, n. 2, p. 161–168, 2012.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Banco de dados. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=795>> Acesso em: 25 outubro de 2016.

PEREIRA, V. M.; BORTOLOTTI, J.W.; KIST, L.W.; AZEVEDO, M.B.; FRITSCH, R.S.; OLIVEIRA, R.L.; PEREIRA, T.C.B.; BONAN, C.D.; VIANNA, M.R.; BOGO, M.R. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 469–475, 2012.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 3, p. 219–230, 2011.

PUNDIR, C. S.; CHAUHAN, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 19–31, 2012.

RICHETTI, S. K.; ROSEMBERG, D.B; LIMA, J.V.; MONSERRAT, J.M.; BOGO, M.R.; BONAN, C.D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 1, p. 116–122, 2011.

ROEX, E. W. M.; KEIJZERS, R.; GESTEL, C. A. M.V. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, v. 64, n. 4, p. 451–460, 2003.

SABULLAH, M. K.; SULAIMAN, M.R.; SHUKOR M.Y.A.; SYED, M.A.; SHAMAAN, N.A; KHALID, A.; AHMAD, S.A. The assessment of cholinesterase from the liver of *Puntius javanicus* as detection of metal ions. **Scientific World Journal**, v. 2014, p.9, 2014.

SALEEM, M.; RAFIQ, M.; SEO, S.Y.; LEE, K.H. Acetylcholinesterase immobilization and characterization, and comparison of the activity of the porous silicon-immobilized enzyme with its free counterpart. **Bioscience Reports**, v. 36, n. 2, p. e00311–e00311,

2016.

SCHNEIDER, A. C. R.; SANTOS, J.L.; PORAWSKI, M.; SCHAEFE, P.G.; MAURE, R.L.; MATTE, U.; SILVEIRA, T.R. Implementação de um novo modelo de experimentação animal - zebrafish. **Revista HCPA**, v. 29, n. 2, p. 100–103, 2009.

SEDMAN, J.J., & GROSSBERG, S.E A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. **Analytical biochemistry** 79, 544-552, 1977.

SHAONAN, L.; XIANCHUAN, X.; GUONIAN, Z.; YAJUN, T. Kinetic characters and resistance to inhibition of crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphates. **Aquatic Toxicology**, v. 68, p. 293–299, 2004.

SILMAN, I. & SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: “Classical” and “non-classical” functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 3 SPEC. ISS., p. 293–302, 2005.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; REICHARD M.; HUQ, K. A.; WAHAB, M. A.; AHMED, Z. F. AND SMITH, C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 5, p. 1435–1448, 2006.

STODDARD, S. V.; HAMANN, M. T.; WADKINS, R. M. Insights and ideas garnered from marine metabolites for development of dual-function acetylcholinesterase and amyloid- β aggregation inhibitors. **Marine Drugs**, v. 12, n. 4, p. 2114–2131, 2014.

SON, J.Y., SHIN, S., CHOI, K.H., & PARK, I.K. Purification of soluble acetylcholinesterase from Japanese quail brain by affinity chromatography. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, p. 204–210, 2002.

SUSSMAN, J. L. & SILMAN, I. Acetylcholinesterase: Structure and use as a model for specific cation-protein interactions. **Current Biology**, v. 2, p. 612, 1992.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book. **A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)**. 5th Edition, 2007.