AVALIAÇÃO DE ACETILCOLINESTERASE EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO CAVEIRAS.

Alice da Cruz Machado[1], Lucas de Oliveira Bandieri,[2] Beatriz Antunes de Souza[3.], Alaíde Cristina de Bem Matos[4], Carla Ivane Ganz Vogel[5].

[1] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PIVIC/UDESC
[2] Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV
[3] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV
[4] Acadêmica do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária - CAV
[5] Orientador, Departamento de Produção Animal e Alimentos - CAV– carla.vogel@udesc.br

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Zebrafish. Biomarcador.

A análise de biomarcadores de estresse oxidativo em peixes é de suma importância, pois através dessa, pode-se saber se a água em que estes peixes estavam situados causa alguma alteração no genoma ou no organismo animal como um todo, além de ser analisada sua qualidade e consequentemente a possibilidade de ser utilizada pelas comunidades residentes das proximidades do rio. Mais especificamente, a enzima acetilcolinesterase (AChE), cuja função no organismo é hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina em sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periférico é um excelente biomarcador da exposição de organismos aquáticos a agrotóxicos.

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa é analisar se existem mudanças significativas na atividade de acetilcolinesterase em peixes Zebrafish (*Danio rerio*), em situação de presença da água de afluentes do rio Caveiras, através da coleta dos músculos destes animais comparando-se com peixes criados em água controle, filtrada e tratada devidamente.

Para que a pesquisa e a análise da atividade da acetilcolinesterase pudessem ser realizadas, foi necessário separar as mesmas quantidades de peixe de cada aquário (controle com água tratada e outro com água do rio) e posteriormente eutansiá-los com Tricaína. Após a eutanásia, os músculos dos animais eram coletados, pesados, armazenados em tubos cônicos com dez vezes mais solução de tampão de fosfato em relação ao peso (1:10) e em seguida colocados em aparelho agitador até obter a homogeneidade líquida.

O método, cujo objetivo é determinar a taxa de produção de tiocolina pelo substrato criado através do músculo do Zebrafish, é o de Ellman *et al.* (1961). Para que se possa realizar a leitura da amostra no espectofotômetro é necessária a utilização de algumas soluções como o tampão de fosfato, o reagente de cor e a de substrato (Iodeto de acetilcolina). Para o reagente de cor, é utilizado ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico), também conhecido como DTNB, que reage com a tiocolina produzindo ânion âmarelho, o 5-tio-2-nitrobenzoato. Para a solução, é colocado uma quantidade proporcional de DTNB com o tampão de fosfato.

Para o substrato da enzima, cuja função é fazer a reação de acetilcolinesterase com acetilcolina acontecer, utiliza-se iodeto de acetilcolina em conjunto com água miliQ. Após o preparo das substâncias, coloca-se 50µL de tampão de fosfato, com 50µL do DTNB e mais 50µL de substrato em uma cubeta de quartzo, para que a leitura possa ser realizada. Para isto, o

comprimento de onda do espectofotômetro deve ser ajustado para 412nm e com base em nove resultados de absorbância para a mesma amostra, é feita uma média, cujo valor será utilizado para se descobrir a atividade da enzima acetilcolinesterase nos músculos do peixe selecionado (para cada peixe, será feito este procedimento).

O valor de proteínas totais é descoberto através do Método de Biureto, onde são utilizadas três cubetas, todas contendo a mesma quantidade de proteínas totais, uma das cubetas com água miliQ, além das proteínas, a fim de zerar o espectofotômetro, outra com a amostra do músculo do Zebrafish e a outra com um padrão advindo em conjunto com as proteínas totais. Para esta leitura, ajusta-se o comprimento de onda em 545nm, colocando-se uma cubeta de cada vez, assim obtendo-se nove valores de absorbância para cada cubeta, devendo-se fazer a média individual.

Para saber o valor da proteína total, pega-se a média do valor da absorbância da amostra, dividindo pela média do valor da proteína padrão, multiplicando por quarenta. Assim como, para saber o valor de atividade da enzima acetilcolinesterase, usa-se a média da enzima, multiplicando-se por 73,03, dividindo-se pela atividade da proteína total.

A acetilcolina está intimamente relacionada à manutenção do funcionamento muscular e condições normais em peixes, podendo ser inibida (pouca ou nenhuma atividade) quando exposta a organofosforados e carbamatos, substâncias ligadas à intoxicação. A inibição ocorre quando estas substâncias competem com a acetilcolinesterase por seu sítio ativo, fazendo com que a acetilcolina não seja hidrolisada, causando uma hiperestimulação colinérgica que traz as situações de estresse oxidativo.

Ainda, casos de atividade aumentada da enzima podem ocorrer devido ao sistema imunológico estar tentando retirar acetilcolina do sítio ativo, por haver a ligação das substâncias (carbamatos e organofosforados), fazendo a abertura de mais sítios ativos em relação ao normal, por onde a acetilcolina poderia se ligar.