



UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

CLAUDIANE DOS SANTOS MARINHO

Caracterização de acetilcolinesterase e sua aplicação como biomarcador de nanopartícula de prata ao usar Zebrafish e Tilápia do Nilo como espécie sentinela

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

CLAUDIANE DOS SANTOS MARINHO

Caracterização de acetilcolinesterase e sua aplicação como biomarcador de nanopartícula de prata ao usar Zebrafish e Tilápia do Nilo como espécie sentinela

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) como requisito para obtenção do título de doutora em Química e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Carmem Lúcia de Paiva e Silva Zanta

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Sonia Salgueiro Machado

Maceió
Outubro/2019

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Marcelino de Carvalho

- M338c Marinho, Claudiane dos Santos.
Caracterização de acetilcolinesterase e sua aplicação como biomarcador de nanopartícula de prata ao usar Zebrafish e Tilápia do Nilo como espécie sentinela / Claudiane dos Santos Marinho. – 2019.
102 f. : il.
- Orientadora: Carmem Lúcia de Paiva e Silva Zanta.
Co-orientadora: Sonia Salgueiro Machado.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2019.
- Inclui bibliografias.
Apêndices: f. 101-102.
1. Acetilcolinesterase. 2. Nanopartículas metálicas. 3. Toxicologia ambiental. 4. Peixe-zebra. 5. Biomarcadores. I. Título.

CDU: 574.64:577.15



FOLHA DE APROVAÇÃO

CLAUDIANE DOS SANTOS MARINHO

“Caracterização de acetilcolinesterase e sua aplicação como biomarcador de nanopartícula de prata ao usar Zebrafish e Tilapia do Nilo como espécie sentinela”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Tese aprovada em 16 de Outubro de 2019.

COMISSÃO JULGADORA:

Carmem Lucia Zanta

Profa. Dra. Carmem Lucia de Paiva e Silva Zanta
(Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL)

Sônia Salgueiro Machado

Profa. Dra. Sônia Salgueiro Machado
(Coorientadora - IQB/UFAL)

João Xavier de Araújo Júnior

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
(PPGQB/ESENFAR/UFAL)

Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
(PPGQB/IQB/UFAL)

Luciano Aparecido Meireles Grillo

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
(ESENFAR/UFAL)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer a Deus por nunca me deixar desistir, pela renovação de forças, sabedoria e amor atribuído.

Aos meus familiares: esposo Ravnian Jorge, mãe Cleide Maria, irmã Claudiene, primas Shirley e Tamires que me apoiaram e incentivaram todos esses anos e pela minha filha Allana pela realização e felicidade.

A professora Dra. Carmem Lúcia de Paiva e Silva Zanta, pela oportunidade de realizar este trabalho e por acreditar na minha capacidade.

A professora Dra. Sonia Salgueiro Machado, que norteou meus passos nesta pesquisa, sempre presente e cobrando para me transformar em uma pesquisadora de qualidade.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) e ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Aos professores do IQB que contribuíram diretamente ou indiretamente para a construção do meu conhecimento desde a graduação até hoje.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Enzimologia (LBE) que contribuíram fortemente para a realização deste projeto e na minha autoestima em todos os dias de trabalho: Me. Milena, Marcos, Kaline, Me. Fábio, Me. Gabriela, Wanderson, Alvaro, Edson, Alana Myrele, Mark, Allana, Iago, Prof. Vitor e Prof. Zé Maria

Aos funcionários Anderson, Aldy, Cícero e Dona Geruza.

Ao órgão de fomento CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O aumento da comercialização de nanopartícula de prata (AgNP), devido sua ampla atividade antimicrobiana, torna sua exposição no meio ambiente preocupante, pois seu risco potencial é em grande parte desconhecido. Essa nanopartícula possui várias vias de exposição ao organismo vivo, podendo interagir com macromoléculas. O uso de biomarcadores enzimáticos tem recebido destaque, pois refletem os efeitos tóxicos de xenobióticos em ambientes naturais. Dentre estes, as colinesterases (ChEs) têm tomado espaço em pesquisas ecotoxicológicas e farmacológicas, pois atua no sistema nervoso central e periférico. Diante disto, o objetivo deste estudo foi purificar e caracterizar a acetilcolinesterase (AChE) de Zebrafish (*Danio rerio*) e avaliar seu efeito, juntamente com a catalase, como biomarcador de nanopartícula de prata, através de ensaios sub-letais utilizando como organismo alvo, o Zebrafish e a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A caracterização da colinesterase cerebral e muscular de Zebrafish apresentou parâmetros físicos-químicos (pH básico e temperatura ~ 30°C) e cinéticos (K_m^{app} de 0.191 e 0.230 mM, respectivamente) próximos, exceto para a especificidade por inibidores, na qual identificou que apenas o tecido cerebral tem a AChE, enquanto o muscular possui as duas colinesterases: a AChE e BuChE (butirilcolinesterase). A purificação de AChE cerebral de Zebrafish apresentou fator de recuperação de 3.86 e uma subunidade representativa de 76 kDa. Os estudos ecotoxicológicos apresentaram alterações na atividade da ChE e Catalase (CAT) de Tilápia do Nilo e Zebrafish após exposição de 96h de diferentes concentrações de AgNP e alterações morfológicas na brânquias de Zebrafish também foram observados. A AChE muscular foi mais sensível a AgNP que a AChE cerebral, apresentando redução de 37.3% na atividade para Zebrafish e 52% para Tilápia, após exposição a maior concentração de AgNP. E a CAT de brânquias também foi mais sensível a AgNP que a CAT hepática, com redução de 67.4% na atividade para Zebrafish e 50% para Tilápia. Estes resultados mostram que essas espécies podem ser usada como bioindicador eficiente para investigar a toxicidade de AgNP a nível molecular e histopatológico. Este trabalho pode esclarecer e orientar estudos de purificação e aplicação de AChE como biomarcador de nanopartícula.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Nanopartícula de prata. Ecotoxicidade. *Danio rerio*.

ABSTRACT

The increasing commercialization of silver nanoparticle (AgNP), due wide antimicrobial activity, makes its exposure in the environment of concern, as its potential risk is largely unknown. This nanoparticle has several pathways of exposure to a living organism and can interact with macromolecules. The use of enzymatic biomarkers has been highlighted because it reflects the toxic effects of xenobiotics in natural environments. Among these, cholinesterases (ChEs) have taken place in ecotoxicological and pharmacological research, as it acts on the central and peripheral nervous system. Therefore, the aim of this study is to purify and characterize acetylcholinesterase (AChE) of Zebrafish and to evaluate its effect, together with catalase, as an AgNP biomarker, through sublethal assays using as target organism, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Zebrafish (*Danio rerio*). The characterization of brain and muscle ChEs Zebrafish showed similar physicochemical (basic pH and temperature $\sim 30^{\circ}\text{C}$) and kinetic parameters (K_m^{app} of 0.191 e 0.230 mM, respectively), except for inhibitor specificity, in which it identified that only brain tissue has AChE, while muscle has both cholinesterases, AChE and BuChE (butyrylcholinesterase). Purification of brain AChE of Zebrafish showed a recovery factor of 3.86 and a representative subunit of 76 kDa. The ecotoxicological studies showed changes in ChEs and catalase (CAT) activity of Nile Tilapia and Zebrafish, after 96h exposure of different AgNP concentrations and morphological changes Zebrafish gills were also observed. Muscle AChE was more sensitive to AgNP than brain AChE, showing a 37.3% reduction in activity for Zebrafish e 52% for Tilapia, after exposure to higher AgNP concentration. And gill CAT was also more sensitive to AgNP than hepatic CAT, showing a 67.4% reduction in activity for Zebrafish and 50% for Tilapia. These results show that these species can be used as an efficient bioindicator to investigate the toxicity of AgNP in molecular and histopathology level. This work can clarify and guide studies of purification and application of AChE as nanoparticle biomarker.

Keywords: Acetylcholinesterase. Silver Nanoparticle. Ecotoxicity. *Danio rerio*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de produtos associados a materiais específicos.	18
Figura 2 - Categorias de produtos que contêm nanopartículas de prata.	19
Figura 3 - Possíveis interações de nano e íons de prata na célula bacteriana.	20
Figura 4 - Representação do mecanismo de repulsão eletrostáticas das nanopartículas.	21
Figura 5 - Possíveis interações de NPs com proteínas causando mudanças anormais.	23
Figura 6 - Levantamento bibliográfico no banco de dados do Scienc Direct (2016-2018) com as palavras chaves ‘Silver nanoparticle’, ‘Toxicity silver nanoparticle’ e ‘Aquatic toxicity silver nanoparticle’.	24
Figura 7-Exposição e potencial tóxico de nanopartículas(em amarelo)no ambiente aquático.	25
Figura 8 - Exemplar de <i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822).	26
Figura 9 - Crescentes publicações com <i>Danio rerio</i> (2010-2018). A palavra-chave (" <i>Danio rerio</i> ") foi pesquisada pelo banco de dados PUBMED, NCBI.	27
Figura 10 - Alevino de <i>O. niloticus</i>	28
Figura 11- Crescentes publicações com <i>Oreochromis niloticus</i> (2010-2018). A palavra-chave (" <i>Oreochromis niloticus</i> ") foi pesquisada pelo banco de dados PUBMED, NCBI.	29
Figura 12 - Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes.	30
Figura 13 - Síntese e reciclagem da ACh na Sinapse: (1) a ACh é sintetizada a partir de colina e acetil-CoA; (2) na fenda sináptica, a ACh é rapidamente hidrolisada pela enzima AChE; (3) a colina é transportada de volta para o terminal axiônico e utilizada para a síntese de mais ACh.	31
Figura 14 - Sítio ativo de AChE em humano (HuAChE) (PDBID1B41).	32
Figura 15 - Mecanismo de reação da hidrólise de ACh em etapas de acilação e desacilação.	32
Figura 16 - Formas de AChE e sua ancoragem na membrana. (a) formas solúveis (mono-, di- e tetramérica) de AChE (G1 e G2 anfífilicos e G4 não anfífilico, respectivamente) e a forma monomérica (AChE _R). (b) formas ligadas à membrana de AChE são representadas pela forma G4 globular não anfífilico ancorada na membrana por meio da proteína rica em prolina (PRiMA) ou pela subunidade do colágeno Q.(2). Nos eritrócitos e no cérebro de Torpedo, uma forma dimérica hidrófoba (G2) de AChE ligado à membrana celular por meio de uma âncora de GPI (3).	33

Figura 17 - Estrutura molecular da catalase de fígado de vaca, representado pelas subunidades A-D e pelo hemo central em destaque.	35
Figura 18 - Efeito do pH (A), temperatura (B) e termoestabilidade (C) na atividade de ChE cerebral (- ● -) e muscular (- Δ -) de Zebrafish.	54
Figura 19 - Atividade da ChE cerebral e muscular de Zebrafish na presença das concentrações crescentes (0-1 μM) de inibidores seletivos: fisostigmina (A), BW284c51 (B) e Iso-OMPA (C). * Indica diferenças significativas, quando comparado ao controle (p <0.05).	56
Figura 20 - Cinética enzimática da ChE cerebral (- ● -) e muscular (- Δ -) de Zebrafish em função da concentração do substrato acetilcolina. Os dados reportados representam média ± desvio de três repetições.	58
Figura 21 - Gráficos Lineweaver-Burke da ChE cerebral (A) e muscular (B) de Zebrafish na ausência (- □ -) e presença (- ● -) de fisostigmina.	60
Figura 22- Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) do extrato cerebral e muscular de Zebrafish: A) SDS-PAGE corado com CBB. Linha M: marcador, linha Ee: 25 μg de AChE da enguia elétrica. Linha 1 e 2: 60 μg de proteína do extrato cerebral e muscular, respectivamente; B) Gel nativa corados com CBB e C) Zimograma corados para atividade de AChE; na linha Ee: 5 μg AChE de enguia elétrica; linha 1 e 2: 60 μg de proteína do extrato cerebral e muscular, respectivamente.	61
Figura 23 - Fluxograma do protocolo de purificação de AChE cerebral de Zebrafish.	71
Figura 24 - Perfil de eluição para a cromatografia de AChE cerebral de <i>Danio rerio</i> em Sephacryl S-100 (1x60 cm) equilibrado com Tris-HCl (20mM, pH 7.5 com 0.02% de triton) com uma taxa de fluxo de 0.1 mL/min e 2 mL por fração. Absorbância a 280nm (-●-) e atividade AChE (-■-).	72
Figura 25 - Eletroforese SDS-PAGE a 10%. Gel corado com: Comassie (A) e com prata (B). As canaletas abaixo: (M) Marcador, (E _e) 25 μg da enzima de enguia elétrica e (F13) 15 μg da fração correspondente do extrato cerebral purificado de Zebrafish.	74
Figura 26 - Caracterização da suspensão de AgNP. (A) Diagrama da frequência e distribuição normal da contagem das partículas. (B) Imagem da microscopia eletrônica de transmissão apresentando a morfologia da AgNP.	82
Figura 27 - Atividade específica de AChE cerebral (A) e muscular (B) de Zebrafish após exposição à diferentes concentrações de AgNP por 96 h. As letras indicam	

diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.....	83
Figura 28 - Atividade específica de CAT hepática (A) e CAT de brânquias (B) de Zebrafish após exposição à diferentes concentrações de AgNP por 96 h. A letra indica diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.....	85
Figura 29. Fotomicrografias representativas da brânquias de Zebrafish do grupo controle (a) e (c), indicando histologia normal e do grupo exposto a $5\mu\text{g L}^{-1}$ de AgNP (b) e (d), na objetiva de 40x e 100x, respectivamente. Peixes expostos a AgNP apresentou alterações na morfologia branquial, como fusão na lamela secundária (Lf), curvatura (Cu), canal marginal dilatado (MC) e elevação epitelial (EL).	86
Figura 30 - Distribuição de tamanhos por intensidade de AgNPs por DLS.....	94
Figura 31 - Espectro de EDX exibindo a composição química da água do aquário após 96h de exposição de 40mg L^{-1} de AgNP. O eixo vertical exibe o número de raios-x e o eixo horizontal exibe energia em KeV.	95
Figura 32 - Efeito das AgNP na atividade específica da AChE cerebral (A), AChE muscular (B) e BuChE muscular (C). As letras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.	96
Figura 33 - Efeito das AgNP na atividade da CAT hepática (A) e CAT de brânquias (B) de <i>O. niloticus</i> . As letras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais técnicas usadas na caracterização de nanopartículas.....	22
Tabela 2 - Concentração de fisostigmina que inibe 50% da atividade da colinesterase em diferentes tecidos.	58
Tabela 3 - Comparação das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima de hidrólise (V_{max}) reportadas para AChE de Zebrafish e outros vertebrados.	59
Tabela 4 - Quantidade de sulfato de amônio para precipitação da proteína.....	69
Tabela 5 - Precipitação salina com $(NH_4)_2SO_4$ do extrato cerebral de Zebrafish.	72
Tabela 6 - Dados da purificação de AChE cerebral de Zebrafish.	73
Tabela 7- Massa molecular de subunidades de AChE de diferentes fontes.	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
ACTh	Acetiltiocolina
AgNP	Nanopartícula de prata
BuChE	Butirilcolinesterase
BCTh	Butiriltiocolina
BW284c51	1,5-Bis(4-alildimetilamôniofenil)3-pentanona dibrometo
ChE	Colinesterase
CBB	Azul de Coomassie
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
Fisostigmina	(3a <i>R</i> ,8a <i>S</i>)- 1,3a,8-trimetil- 1 <i>H</i> ,2 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,3a <i>H</i> ,8 <i>H</i> ,8a <i>H</i> - pirrolo [2,3- <i>b</i>] indol-5-il <i>N</i> -metilcarbamato
Iso-OMPA	Tetraisopropyl pyrophosphoramide
<i>Tc</i> AChE	Acetilcolinesterase Torpedo californica
<i>Hu</i> BuChE	Butirilcolinesterase Humana
SNC	Sistema nervoso central
NP	Nanopartícula

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Nanomateriais	17
2.1.1	Nanopartícula de prata	18
2.1.2	Efeito tóxico das nanopartículas	22
2.2	Uso de bioindicadores	25
2.2.1	A espécie <i>Danio rerio</i>	26
2.2.2	A espécie <i>Oreochromis niloticus</i>	28
2.3	Biomarcadores enzimáticos	29
2.3.1	Colinesterases	31
2.3.2	Catalase	35
3.	OBJETIVOS	38
3.1	Geral	38
3.2	Específicos	38
	REFERÊNCIAS	39
4.	CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CINÉTICO DE ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL E MUSCULAR DE <i>DANIO RERIO</i>	50
4.1	Materiais e métodos	50
4.1.1	Reagentes	50
4.1.2	Aclimação dos peixes e preparação do extrato livre de células	50
4.1.3	Atividade enzimática e concentração proteica	51
4.1.4	Determinação do pH e da temperatura ótimos	51
4.1.5	Ensaio de inibidores seletivos	52
4.1.6	Parâmetros cinéticos	52

4.1.7	Efeitos inibitórios da fisostigmina.....	52
4.1.8	Eletroforese em gel de Poliacrilamida (PAGE).....	53
4.1.9	Análises estatísticas	53
4.2	Resultados	53
4.2.1	pH e temperatura ótimos.....	54
4.2.2	Ensaio inibidores seletivos.....	55
4.2.3	Parâmetros cinéticos	58
4.2.4	Efeitos inibitórios da fisostigmina.....	59
4.2.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	60
4.3	Discussão	61
4.4	Conclusão	64
	REFERÊNCIAS	65
5.	PURIFICAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE <i>DANIO RERIO</i>	68
5.1	Materiais e métodos	68
5.1.1	Reagentes.....	68
5.1.2	Aclimação dos peixes e preparação do extrato livre de células.....	68
5.1.3	Atividade enzimática e concentração proteica	69
5.1.4	Precipitação salina	69
5.1.5	Cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100).....	70
5.1.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	71
5.2	Resultados e discussão	71
5.3	Conclusão	75
	REFERÊNCIAS	76
6.	EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA EM DIFERENTES TECIDOS DE <i>DANIO RERIO</i>	78
6.1	Materiais e métodos	78
6.1.1	Reagentes.....	78

6.1.2	Síntese e caracterização da AgNP	78
6.1.3	Obtenção da espécie e aclimatação	79
6.1.4	Ensaio de toxicidade sub-letal	79
6.1.6	Atividade de catalase	80
6.1.7	Concentração proteica	81
6.1.8	Estudo histopatológico	81
6.1.9	Análise estatística	81
6.2	Resultados e discussão	81
6.3	Conclusão	87
	REFERÊNCIAS	88
7.	AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DE TECIDOS DE TILÁPIA DO NILO EXPOSTO À NANOPARTÍCULA DE PRATA EM PÓ	91
7.1	Materiais e métodos	91
7.1.1	Reagentes.....	91
7.1.2	Caracterização da AgNP.....	91
7.1.3	Obtenção da espécie e aclimatação	92
7.1.4	Ensaio de toxicidade sub-letal	92
7.1.5	Atividade da colinesterase	92
7.1.6	Atividade de catalase	93
7.1.7	Concentração proteica	93
7.1.8	Análise estatística	93
7.2	Resultados e discussão	94
7.3	Conclusão	98
	REFERÊNCIAS	99
	APÊNDICE A	101
	APÊNDICE B	102

1. INTRODUÇÃO

O termo "nanotecnologia" refere-se às tecnologias que têm uma dimensão da ordem de ≤ 100 nm e estão presentes no nosso dia-a-dia. Essas tecnologias foram introduzidas a década buscando aumentar a eficiência de vários processos físicos e químicos. As nanopartículas de prata (AgNPs) têm recebido atenção considerável devido suas propriedades antimicrobianas, sendo amplamente utilizadas em tecidos e vestuários (PERELSHTEIN et al., 2008), catalisadores (DONG et al., 2015), sensores (HOYOS et al., 2017) e como carreadores de fármacos (IVANOVA et al., 2018).

Devido a gama aplicação de AgNP como agente antimicrobiano, há uma expansão de sua síntese seja na forma de pó, incorporada a outros materiais ou em suspensão. A forma e o tamanho dessas nanopartículas (NPs) podem influenciar na sua ação bactericida. A depender de seu tamanho podem penetrar em membrana celular de bactérias como *Escherichia coli* e devido a reação de oxidação causada por AgNP, prata livre pode ser gerada continuamente, podendo causar desnaturação, inibição de proteínas e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO'S) (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004).

Quina (2004) destaca a crescente preocupação em relação às potencialidades negativas da nanotecnologia para o meio ambiente e/ou para a saúde humana. O impacto ambiental causado por NPs ainda é pouco conhecido e pesquisas sobre as possíveis consequências ambientais resultante de sua produção e descarte são importante para contribuir no estabelecimento de legislação pertinente (JONER et al., 2008). Como o ambiente aquático é o mais propenso a ser afetado por NPs, há uma necessidade crescente em identificar e avaliar o potencial tóxico desses xenobióticos através de organismos aquáticos (PASCHOALINO et al., 2010).

Diante deste cenário, vem se tornando importante caracterizar os efeitos de AgNPs visto que dependendo de suas características físico-químicas, essas partículas induzem diferentes efeitos ecotoxicológicos em espécies não-alvos. Em termos ecotoxicológicos, os biomarcadores são definidos como alteração a uma resposta biológica, desde mudanças moleculares a comportamentais que reflete os efeitos tóxicos dos xenobióticos em ambientes naturais. Dentre a classificação do biomarcadores como forma de monitoramento de ambientes aquáticos, os enzimáticos têm se destacado, pois visa à quantificação da atividade catalítica de enzimas que desempenham papel-chave em processos fisiológicos podendo estas terem suas atividades aumentadas, induzidas ou inibidas após a exposição a xenobióticos (OLIVEIRA, 2014).

As Colinesterases (ChEs) são serina hidrolases que envolvem dois tipos: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8). AChE tem seletividade para acetilcolina (ACh), enquanto BuChE é menos seletiva, hidrolisando acetilcolina e butirilcolina. A AChE é a enzima chave do sistema nervoso central (SNC) e catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (VENTURA et al., 2010; ČOLOVIĆ et al., 2013). Os inibidores da AChE podem causar bioacumulação do neurotransmissor, alterar a homeostase do sistema neural e interromper a transmissão nervosa (FULTON; KEY, 2001). As formas moleculares da AChE também possuem papéis catalíticos e não-catalíticos (SOREQ; SEIDMAN, 2001). Estudos mostraram que as diferentes isoformas da AChE podem ter diferentes propriedades catalíticas (KRAČMAROVÁ et al., 2015).

As enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) que também são utilizadas como biomarcadores, controlam o estresse oxidativo para manter a homeostase celular, com reações consecutivas de degradação de espécies reativas, causado principalmente por excesso de radicais peróxido (H_2O_2) e superóxido ($\bullet O_2$) (VIEIRA et al., 2009; TEE et al., 2016; PRADHAN et al., 2016; IGHODARO; AKINLOYE, 2017).

O uso do peixe como modelo experimental tem aumentado em muitos campos de pesquisa, como toxicologia ambiental, pesquisas genéticas, biomedicina, neurobiologia, endocrinologia e ecologia por serem sensíveis. NPs são tóxicos para os animais aquáticos, como peixes, *Daphnia* e para os organismos unicelulares (NOWACK; BUCHELI, 2007). Informações limitadas demonstram que AgNPs causam citotoxicidade, estresse oxidativo e respostas inflamatórias em organismos aquáticos (KALBASSI et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é utilizada como um modelo bem estabelecido para pesquisas toxicológicas, pois é uma espécie introduzida em 1971 no Nordeste brasileiro, e difundido no mercado consumidor em todo país (AYROZA, 2009; ALMEIDA et al., 2002; YEŞILBUDAK; ERDEM, 2014).

O Zebrafish (*Danio rerio*) é outro modelo também utilizado em muitos campos de pesquisa, como biologia do desenvolvimento, neurobiologia, imunologia e toxicologia. Uma característica importante desta espécie é o fato de que seu genoma tem sido totalmente sequenciado e apresenta cerca de 70% de homologia com o genoma humano (HOWE et al., 2013). Também foi demonstrado que os principais tecidos e órgãos do Zebrafish compartilham muitas características com os humanos em níveis anatômicos, fisiológicos e

moleculares, incluindo cérebro, coração, músculos, rins e fígado (DUBIŃSKA-MAGIERA et al., 2016).

Assim, o presente estudo teve dois objetivos sendo um enzimológico e outro toxicológico. O primeiro foi caracterizar e purificar a AChE de Zebrafish, pois, os tecidos apresentam esterases inespecíficas que podem contribuir para a atividade da enzima e levar a erros de interpretação em estudos de ecotoxicologia e também para cooperar em estudos de aplicação de ChEs em processos terapêuticos e de biomarcadores. O segundo foi avaliar o efeito toxicológico de AgNP, utilizando como espécie sentinela Tilápia do Nilo e Zebrafish para avaliar parâmetros bioquímicos e histopatológicos, visto que o efeito das nanopartículas no ambiente aquático ainda não está completamente elucidado.

Desta forma, este trabalho foi organizado em quatro seções assim distribuídas: Revisão bibliográfica e referências da revisão (Seção 2), objetivos gerais e específicos do trabalho (Seção 3), e as demais seções foram escritas na forma de artigos, apresentando cada um seu objetivo, metodologia, resultados e discussões e referência: Caracterização e estudo cinético da acetilcolinesterase cerebral e muscular de *Danio rerio* (Seção 4); Purificação da acetilcolinesterase cerebral de *Danio rerio* (Seção 5); Efeito da nanopartícula de prata coloidal em diferentes tecidos de *Danio rerio* (Seção 6) e Avaliação enzimática de tecidos de Tilápia do Nilo exposto à nanopartícula de prata em pó (Seção 7).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanomateriais

As nanopartículas (NPs) são uma ampla classe de materiais com dimensão de 1 a 100nm e área de superfície específica com volume superior à $60 \text{ m}^2.\text{cm}^{-3}$, evidenciando a importância da reatividade superficial dos nanomateriais (YAH et al., 2013). Segundo a Business Communications Company, o mercado da nanotecnologia foi de US \$ 7,6 bilhões em 2003 e deverá ser de US \$ 1 trilhão em 2020 (SABOURIN; AYANDE, 2015).

A classificação das NPs é dada de acordo com sua origem, sendo naturais, acidentais ou não intencional, fabricada ou manipulada. De acordo com sua composição, são orgânicas ou inorgânicas, e de acordo com suas características físicas e químicas, pode ser à base de carbono, metálicas, de cerâmica, semicondutores, poliméricas e à base de lipídeos (KHAN et al., 2017; TEJAMAYA, 2014).

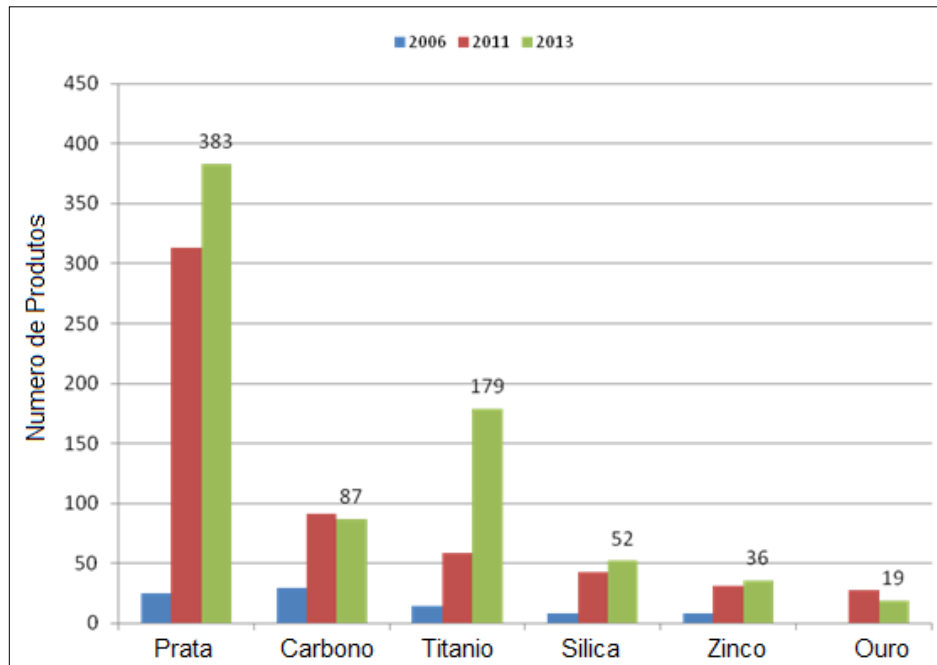
As propriedades mecânica, térmicas, magnéticas, antimicrobiana são atribuídas as nanopartículas devido ao seu tamanho nano, composição, estrutura de superfície, solubilidade, forma e agregação que as distingue dos seus equivalentes em massa que proporciona aplicações nas ciências ambientais, saúde e segurança. Na área de saúde, os nanomateriais são utilizados devido às propriedades bactericidas e fungicidas, sendo as mais conhecidas as nanopartículas Ag e CuO (SURESH et al., 2013).

As NPs também podem ser empregadas em diagnóstico e terapia do câncer (BAETKE et al., 2015), protetores solares (SMIJS; PAVEL, 2011), detecção química e biológica (Barrak et al., 2016), sensor de gás (WANG et al., 2016), têxteis e fibras (RIVERO et al., 2015), captação de CO₂ (RAMACHARYULU et al., 2015), cosméticos (RAJ et al., 2012), remediação de ambientes contaminados (ANJUM et al., 2016) e outras aplicações (KHAN et al., 2017).

Dentre os nanomateriais, as nanopartículas metálicas em geral se destacam por sua versatilidade de aplicações e ampla variação de tamanho que se consegue pelo controle da síntese utilizada. As AgNPs representam 56% da produção global de NPs e têm se destacado por ser o nanomaterial mais presente nos produtos de consumo, como ilustra a Figura 1 (GONG et al., 2007). O banco de dados de Woodrow Wilson (<http://www.nanotechproject.org>) listou 1015 produtos de consumo onde são incorporadas

nanopartículas, sendo que 259 apresentam nanopartículas de prata (CASANOVA, 2010; MATHIAS et al., 2014).

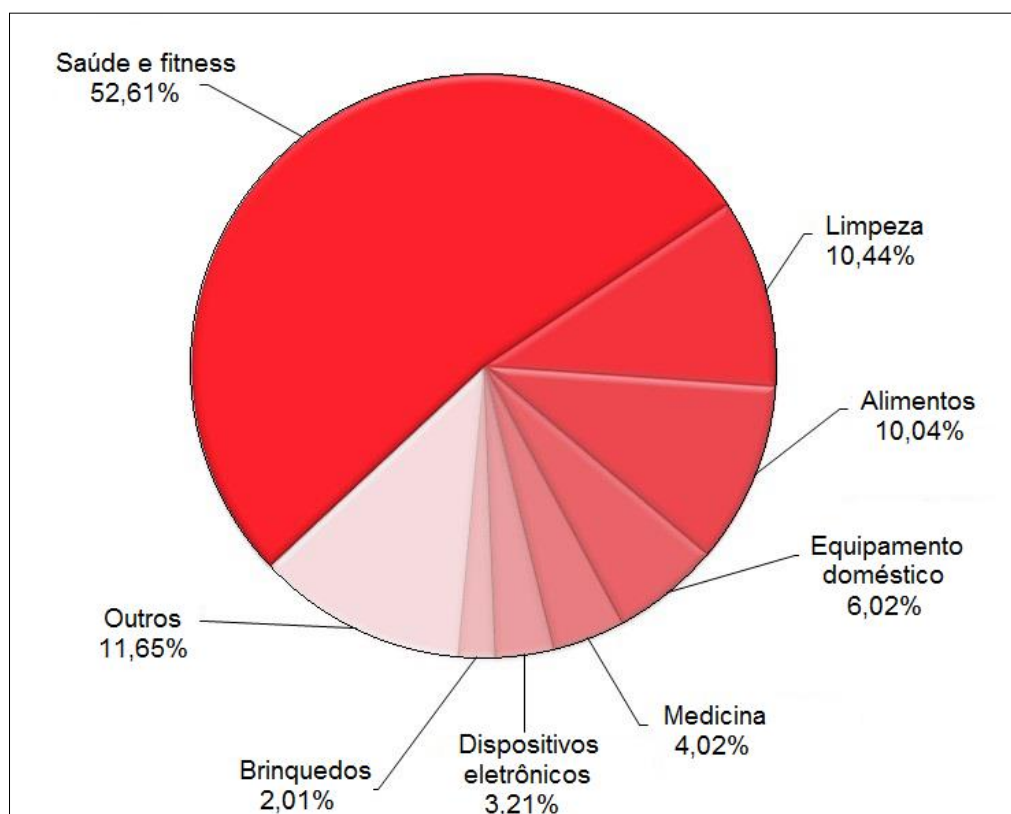
Figura 1 - Número de produtos associados a materiais específicos.



Fonte: Project on Emerging Nanotechnologies, 2013

2.1.1 Nanopartícula de prata

As nanopartículas de prata são um dos nanomateriais mais importantes e fascinantes entre várias nanopartículas metálicas, por serem facilmente incorporadas em diversos materiais, em curativos para promover cicatrização, no interior de refrigeradores de alimentos para retardar deterioração, em purificadores de ar, em roupas, têxteis, recipientes de comida, dispositivos biomédicos, sistema de purificação de água (SOUZA et al., 2013; LI et al., 2010; IRAVANI et al., 2014). A figura 2 ilustra as diferentes categorias de aplicação de nanopartículas de prata.

Figura 2 - Categorias de produtos que contêm nanopartículas de prata.

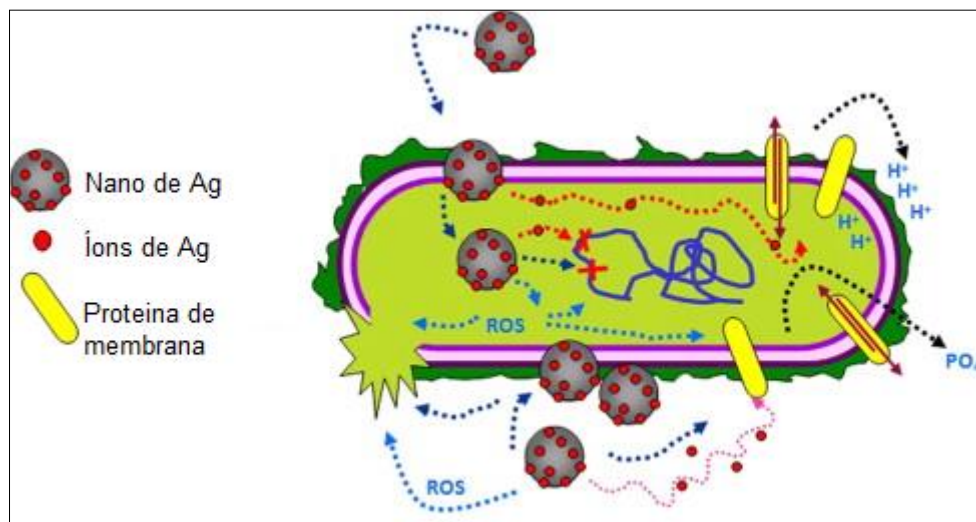
Fonte: adaptado de Pulit-prociak; Banach , 2016

Recentes estudos mostram que os íons e as nanopartículas de prata têm uma elevada atividade antimicrobiana. As nanopartículas de prata são eficazes contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (PRASAD et al., 2017; SALOMONI et al., 2017), vírus (LARA et al., 2010; LIN et al., 2017; PANGESTIKA et al., 2017) e fungos (PULIT et al., 2013; VILLAMIZAR-GALLARDO et al., 2016; XIA et al., 2016).

Segundo Rai et al. (2009), o mecanismo de ação da prata está vinculado à sua interação com compostos do grupo tiol encontrados nas enzimas respiratórias de células bacterianas na qual inibe o processo de respiração. Enquanto, as AgNP atacam de preferência a cadeia respiratória, a divisão celular, finalmente levando à morte celular. Além disso, as NPs liberam íons de prata nas células bacterianas, que aumentam a sua atividade bactericida.

As várias interações observadas entre as AgNPs e as células bacterianas estão ilustradas na figura 3, destacando a possibilidade de alterar a morfologia da membrana, interagir com proteínas de membrana, entrar na célula liberando prata (Ag) e gerar espécies reativas de oxigênio (ZIBAI et al., 2014).

Figura 3 - Possíveis interações de nano e íons de prata na célula bacteriana.



Fonte: Zibaii et al., 2014.

2.1.1.1 Síntese e caracterização da AgNP

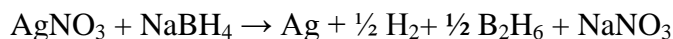
As nanopartículas metálicas podem ser preparadas por diversos métodos. A estabilidade, o tamanho e as propriedades dessas NPs dependem do método de síntese, dos agentes redutores e dos estabilizadores (ABOU EL-NOUR et al., 2010). Geralmente, as NPs são sintetizadas por métodos físicos, químicos ou biológicos.

Ao contrário dos métodos físicos, o método químico se destaca por ser mais simples, econômico e por possuir alto rendimento e maior controle na morfologia das NPs (SARKAR et al., 2009).

De acordo com Zhang et al. (2016), os métodos químicos utilizam técnicas como: síntese crioquímica (MOROZOV et al., 2017), ablação à laser (KIM et al., 2017), litografia (HAYNES et al., 2001), redução eletroquímica (TAKEUCHI et al., 2009), irradiação à laser (NAKAMURA et al., 2015), decomposição térmica (GOUDARZI et al., 2016) e redução química (SHENAVA, 2013). No entanto, a técnica mais simples e versátil é a redução química.

A síntese de AgNP a partir da redução do metal na presença de borohidreto de sódio (NaBH_4) é interessante pois seu uso em excesso em relação ao sal de prata atua tanto como agente redutor como estabilizante das nanopartículas (SOLOMON et al. 2007).

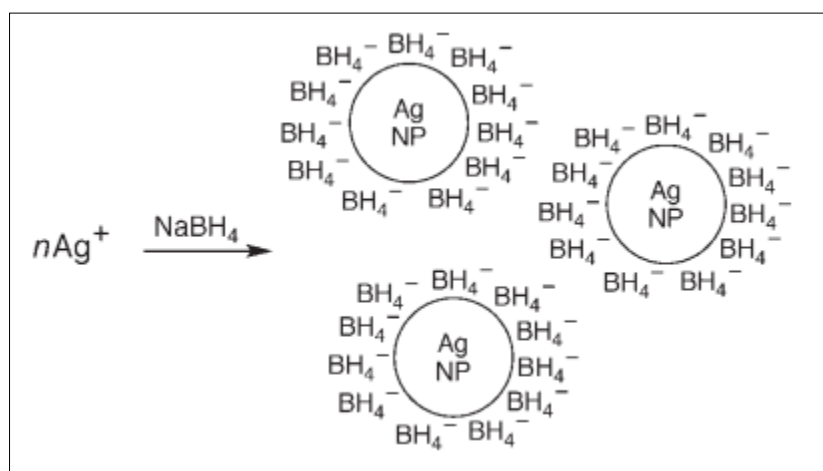
A reação ocorre pelo consumo do NaBH_4 pela redução de prata iônica a prata metálica, por meio da reação:



O NaBH_4 em excesso adere a superfície do metal reduzido fornecendo uma camada elétrica carregada negativamente e, por conseguinte, gerando repulsões eletrostáticas entre as NPs formadas, como ilustrado na figura 4 (SOLOMON et al. 2007).

Geralmente, o tamanho das nanopartículas é controlada pela remoção da energia de ativação do sistema e um resfriamento prévio do agente redutor limita o crescimento das nanopartículas (MELO et al., 2012).

Figura 4 - Representação do mecanismo de repulsão eletrostáticas das nanopartículas.



Fonte: Solomon et al., 2007.

Para evitar a agregação das nanopartículas, a síntese tem sido efetuada com estabilizadores que se adsorvem sobre as superfícies, formando uma camada que impede a coalescência. Os estabilizadores mais eficazes são os polímeros, polivinilpirrolidona (PVP) (SLISTAN-GRIJALVA et al., 2008), polivinílico (PVA) (MONTASER et al, 2016) e ácido poliacrílico (PAA) (DETSRI et al., 2015) que possuem cadeias orgânicas que criam um impedimento estérico entre as NPs.

As propriedades físico-químicas das nanopartículas são importantes para o seu comportamento, bio-distribuição, segurança e eficácia. Portanto, a caracterização de AgNPs é importante para avaliar os aspectos funcionais das partículas sintetizadas (ZHANG et al., 2016).

A tabela 1 resume as principais técnicas utilizadas para determinar o tamanho, a área superficial, composição e as características morfológicas das nanopartículas.

Tabela 1 - Principais técnicas usadas na caracterização de nanopartículas.

Técnica	Aplicação/Característica
Difração de raios-X	Estrutura cristalina, tamanho da partícula
Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	Tamanho de partículas (suspensão), distribuição por tamanhos
Sedimentação por centrifugação	Distribuição dos tamanhos das partículas/complexo
Cromatografia de exclusão por tamanho	Boa resolução, pequeno volume de amostra/lenta
Microscopia de força atômica	Boa resolução/imagens 3D, só analisa a superfície
Área superficial específica (BET)	Tamanho das partículas, área superficial, simples, considera as partículas como esferas monodispersas
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Morfologia da superfície, tamanho das partículas/boa resolução
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	Estrutura local e morfologia
Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)	Composição da superfície e mapeamento elementar
Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)	Análise química da superfície

Fonte: Paschoalino et al., 2010.

2.1.2 Efeito tóxico das nanopartículas

Devido às distintas aplicações das NPs, em 2004, a Academia Real de Engenharia descreveu que há necessidade de investigar os impactos ambientais do emprego de nanopartículas (RS; RAE, 2004). A crescente utilização dessas NPs levantou preocupações devido ao conhecimento limitado de sua biocompatibilidade, seu impacto causado à organismo vivos quando liberado ao meio ambiente, seus riscos de exposição e por seu mecanismo de ação não estar completamente elucidado em sistemas biológicos.

A exposição de NPs pode ocorrer por várias vias que incluem a inalação, injeção (subcutânea, intraperitoneal e intravenosa), a ingestão oral e pela derme (VALAVANIDIS ET AL., 2014).

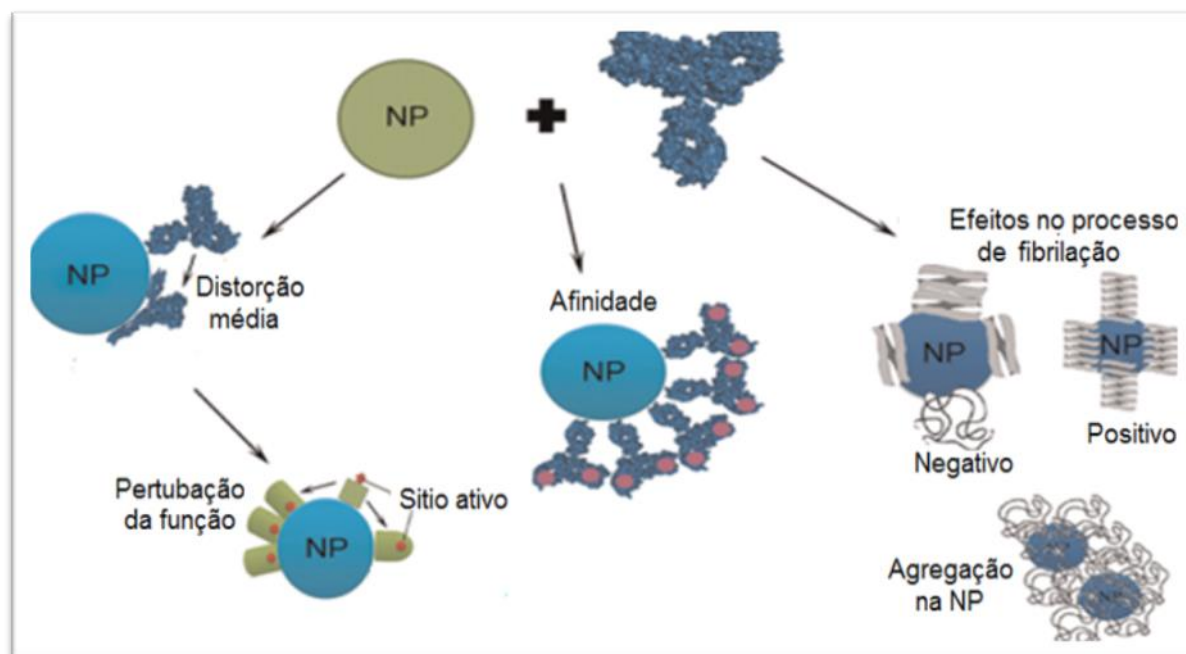
A depender da via de exposição, as nanopartículas podem desencadear uma série de respostas como, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO'S), inflamação no tecido, apoptose e necrose celular (FOLDBJERG et al., 2009; COLVIN, 2003; SAYES et al. 2004).

As ERO'S podem inibir a atividade de enzimas, oxidar proteínas e ser genotóxico (PULIT-PROCIAK; BANACH, 2016; SUN et al., 2013).

Segundo Saptarshi et al. (2013), em um meio biológico, as NPs podem interagir com biomoléculas devido sua relação superfície-massa. Essa interação resulta em um revestimento proteico nas NPs, forma complexos conhecido como proteína corona e causam impacto na estrutura de proteínas adsorvidas e implicação geral nas funções celulares.

Em alguns casos, a interação de NPs com proteínas leva a consequências perigosas, como afinidade por proteínas não-alvo e mudanças de conformação da proteína causadas por modificações estruturais, como descrito na figura 5.

Figura 5 - Possíveis interações de NPs com proteínas causando mudanças anormais.



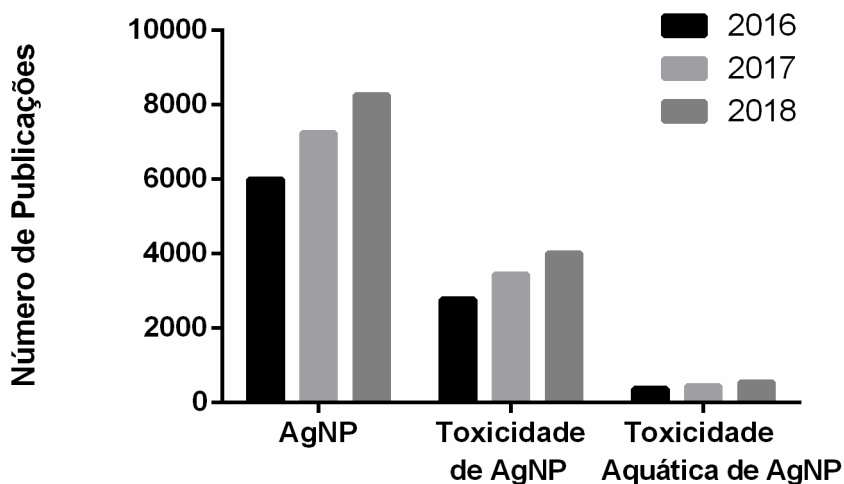
Fonte: adaptado de Shemetov et al., 2012.

A literatura fornece um número crescente de estudos sobre toxicidade (KUMAR et al., 2012), comportamentos ambientais, ecotoxicidade e efeitos biológicos (KAHRU; DUBOURGUIER, 2010; RAY et al., 2009; LANONE et al., 2009), particularmente nas NPs mais usadas, como nanotubo de carbono (GIRARDELLO et al., 2015), dióxido de titânio (ZHU et al., 2011) e NPs de Prata (VAZQUEZ-MUÑOZ et al., 2017).

Diante deste cenário, a AgNP se torna muito atraente para estudos toxicológicos/ecotoxicológicos e a depender de suas características físicas-químicas, fornece diferentes respostas quanto aos efeitos tóxicos. A figura 6 corresponde a um levantamento

bibliográfico sobre os recentes estudos desde o benefícios da AgNP até o efeito toxico em ambientes aquáticos, mostrando a importância da continuidade da investigação dos possíveis efeitos desse nanomaterial em organismos aquáticos.

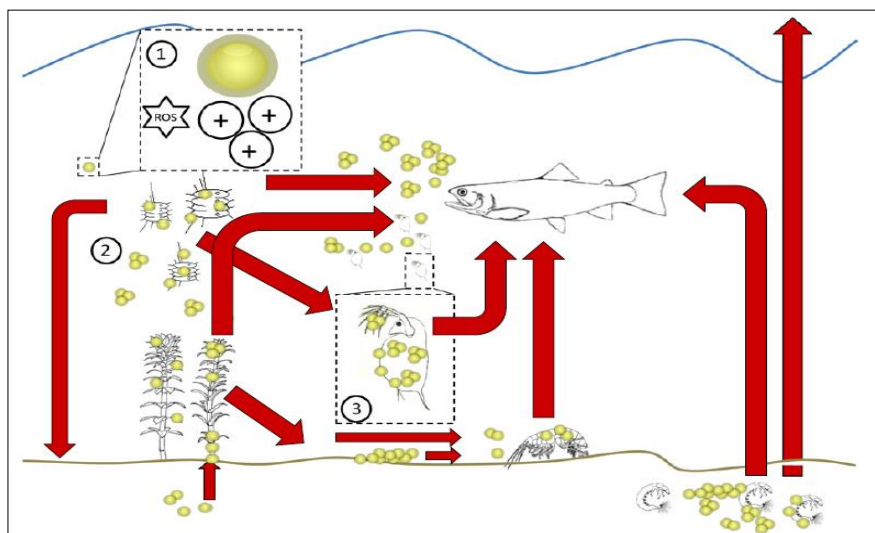
Figura 6 - Levantamento bibliográfico no banco de dados do Scienc Direct (2016-2018) com as palavras chaves ‘Silver nanoparticle’, ‘Toxicity silver nanoparticle’ e ‘Aquatic toxicity silver nanoparticle’.



Fonte: Autor, 2019.

Segundo Hyseni (2016) o impacto tóxico dos nanomateriais podem ser avaliados em organismos aquáticos, pois a maioria dos contaminantes liberados no ambiente são consumidos por esses organismos. A figura 7 ilustra possíveis comportamentos de NPs em ambientes aquáticos, promovendo bioacumulação em organismos não-alvos. Muitos estudos relatam a toxicidade das NPs envolvendo diferentes organismos aquáticos, tais como fungos, algas, animais invertebrados e peixes (Baun et al., 2008; BECARO et al., 2015; THWALA et al., 2013; SUBASHKUMAR; SELVANAYAGAM, 2014).

Figura 7- Exposição e potencial tóxico de nanopartículas (em amarelo) no ambiente aquático.



Fonte: Bundschuh et al., 2016.

Diferentes efeitos tóxicos causados por NPs em ambiente aquático têm sido reportados. Segundo Lodeiro et al. (2017), a exposição de fitoplâncton à AgNP resultou em comprometimento fotossintético e perda de biomassa. Jayaseelan et al. (2014) verificaram o efeito tóxico de nanopartículas de níquel em *Oreochromis mossambicus* com a redução da atividade de enzimas antioxidantes, apresentando possível estresse oxidativo e alterações histopatológicas em diferentes tecidos do peixe.

Ulm et al. (2015) concluíram que a AgNP induziu toxicidade e respostas ao estresse oxidativo em neonatos de *Daphnia magna* ao observar alterações nas atividades de enzimas antioxidantes. Zhu et al. (2012) demonstraram que nanopartículas de óxido de ferro provocaram toxicidade no desenvolvimento de embriões de *Danio rerio*, causando mortalidade, atraso de incubação e má formação. Yue et al. (2017) mostrou que proteínas extracelulares da alga *Euglena gracilis* e as proteínas intracelulares ou ligada à membrana do peixe *Oncorhynchus mykiss*, tais como Na^+/K^+ -ATPase, são suscetíveis à ligação de AgNP.

2.2 Uso de bioindicadores

Existe atualmente uma necessidade crescente de monitorar continuamente nos recursos hídricos, o teor e o efeito tóxico de contaminantes químicos e efluentes industriais descarregados nestes, visto que a biota aquática está constantemente exposta (AKAISHI et al., 2004). O estudo com bioindicadores aquáticos é dado por espécies sentinelas, tais como algas, peixes, moluscos, plantas aquáticas e crustáceos que são utilizadas para monitoramento

ambiental, pois vem acrescentar informações a respeito da resposta biológica que aquele determinado ambiente sofreu na presença de xenobióticos advindos das atividades antropogênicas.

Os peixes representam o mais diversificado grupo de animais vertebrados, pois ocupam um importante papel na cadeia trófica, são amplamente documentados como bioindicadores sensíveis à contaminação ambiental e usados como modelo experimental em ecotoxicologia (LINS et al., 2010; SIQUEIRA, 2016).

Diferentes espécies de peixe têm sido usadas como modelos dos diferentes níveis tróficos e diferentes estratégias de alimentação para avaliar a toxicidade de nanopartículas metálicas (GRIFFITT et al., 2008).

2.2.1 A espécie *Danio rerio*

Nos anos de 1970, um novo vertebrado foi introduzido no cenário científico: o Zebrafish (*Danio rerio*) também conhecido como paulistinha (Figura 8). É um pequeno peixe tropical nativo dos rios da Índia e do sul da Ásia (COVERDALE et al., 2004).

Segundo Westneat e Campbell (2013), a taxonomia dessa espécie é:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Cypriniformes

Família: Cyprinidae

Genero: *Danio*

Espécie: *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

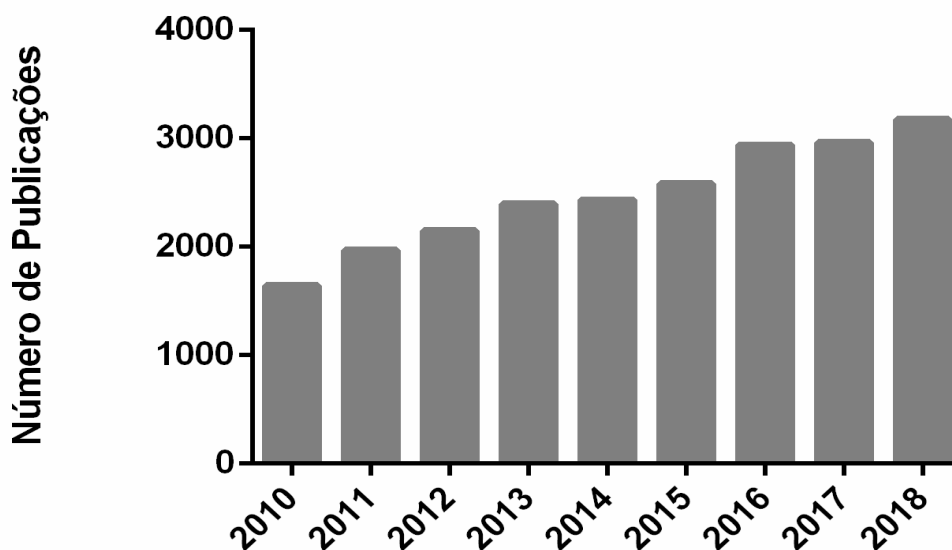
Figura 8 - Exemplo de *Danio rerio* (Hamilton, 1822).



Fonte: Avdesh et al. 2012.

A aceitação global do Zebrafish como modelo experimental está aumentando gradualmente nos campos da toxicologia, ecologia, fisiologia, pesquisas biológicas e genéticas tanto em adultos quanto em estágios embrionários (CHAKRABORTY et al., 2016; COVERDALE, et al. 2004), como ilustrado na figura 9.

Figura 9 - Crescentes publicações com *Danio rerio* (2010-2018). A palavra-chave ("*Danio rerio*") foi pesquisada pelo banco de dados PUBMED, NCBI.



Fonte: Autor, 2019.

Segundo Chakraborty et al. (2016), o Zebrafish possui características excepcionais, tais como, pequeno tamanho, alta fecundidade, rápido desenvolvimento, transparência do embrião, sistema cardiovascular, nervoso e digestivo semelhantes aos mamíferos (RUBINSTEIN, 2006) e genoma totalmente sequenciado com homologia de 70% com o genoma humano (HOWE et al., 2013). Também foi demonstrado que os principais tecidos e órgãos do Zebrafish compartilham muitas características com os humanos em níveis anatômicos, fisiológicos e moleculares, incluindo cérebro, coração, músculos, rins e fígado (KALUEFF et al., 2014; SANTORIELLO; ZON, 2012).

O potencial do Zebrafish para modelar doenças humanas está se tornando cada vez mais evidente e a disponibilidade desses modelos permite uma maior compreensão do papel da exposição química em doenças humanas. Ao longo dos últimos anos, os pesquisadores demonstraram que o Zebrafish adulto é adequado para medir os efeitos da exposição a uma variedade de produtos químicos, incluindo medicamentos terapêuticos e tóxicos ambientais, observando mudanças na morfologia, fisiologia, comportamento e expressão gênica do peixe (DUBIŃSKA-MAGIERA et al., 2016).

Muitos autores têm realizado estudos de ecotoxicologia com *Danio rerio*. Wang et al. (2017) realizaram um estudo de biomonitorização, onde os índices de estresse enzimático e resposta bioquímica foram utilizados para avaliar os efeitos do pesticida e do metal pesado no Zebrafish. Huang et al. (2014) observou alterações comportamentais do Zebrafish exposto ao pesticida deltametrina. Chen et al. (2011a) avaliaram a toxicidade crônica de TiO₂ NP em *Danio rerio* e observou mortalidade, lesões de órgãos e alterações histopatológicas nas brânquias.

2.2.2 A Espécie *Oreochromis niloticus*

A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie originária da bacia do rio Nilo, no leste da África, encontrada em Israel, Ásia, América do Sul e Central. Introduzida em 1971 no Nordeste brasileiro, posteriormente difundida pelo resto do país e bem aceita no mercado consumidor (AYROZA, 2009). Essa espécie (figura 10) apresenta um grande potencial devido à sua fácil reprodução, carne branca e de alta qualidade, baixos custos de produção podendo inclusive ser cultivada em locais com alta salinidade e baixas temperaturas (VICENTE et al., 2014).

Segundo Luna e Kesner-Reyes (2017), a taxonomia da espécie é:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Perciformes

Família: Cichlidae

Genero: *Oreochromis*

Espécie: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

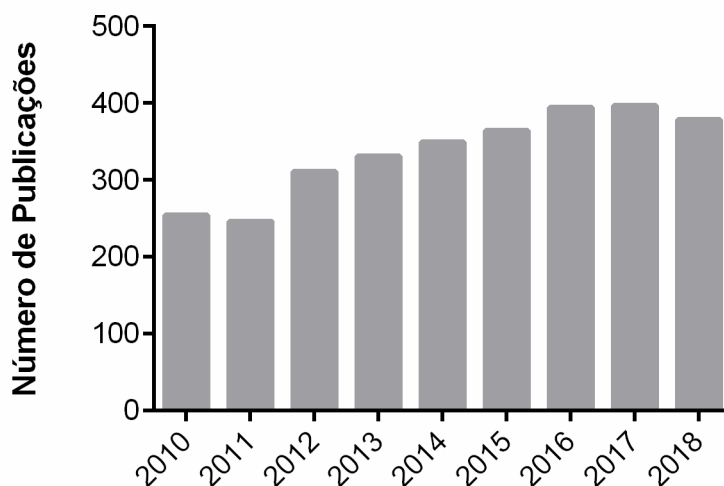
Figura 10 - Alevino de *O. niloticus*.



Fonte: Autor, 2017.

A figura 11 ilustra as crescentes publicações com *O. niloticus*. Esse peixe é utilizado como um modelo bem estabelecido para pesquisas toxicológicas (YOUNIS et al., 2012; ALMEIDA et al., 2002; YEŞILBUDAK ; ERDEM, 2014; GARCIA-SANTOS et al., 2006). Omar et al. (2015) utilizaram *Oreochromis niloticus* como bioindicador no Rio Nilo e identificou bioacumulação de metais no tecido muscular. Segundo Kaya et al. (2015), as nanopartículas de ZnO causou estresse oxidativo em *Oreochromis niloticus* e bioacumulação nos diferentes tecidos, fígado, brânquia, intestino, rim, cérebro e músculo.

Figura 11- Crescentes publicações com *Oreochromis niloticus* (2010-2018). A palavra-chave ("*Oreochromis niloticus*") foi pesquisada pelo banco de dados PUBMED, NCBI.



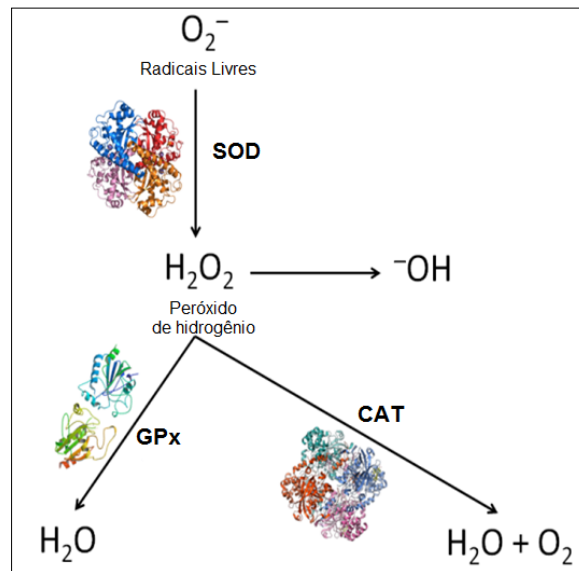
Fonte: Autor, 2019.

2.3 Biomarcadores enzimáticos

Em termos ecotoxicológicos, os biomarcadores são definidos como alteração a uma resposta biológica, desde mudanças moleculares a comportamentais que reflete os efeitos tóxicos dos xenobióticos em ambientes naturais. Dentre a classificação do biomarcadores como forma de monitoramento de ambientes aquáticos, os enzimáticos têm se destacado, pois visa a quantificação de enzimas que desempenham papel-chave em processos fisiológicos e podem ser induzida ou inibida após a exposição a xenobióticos (OLIVEIRA, 2014). Estudos demonstram grande interesse por biomarcadores enzimáticos (FAROMBI, et al., 2007; OSMAN et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013; ZANETTE et al., 2008; SABULLAH et al., 2015; TILTON, et al., 2011).

As enzimas antioxidantes, Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), e Glutathiona Peroxidase (GPx) controlam o estresse oxidativo para manter a homeostase celular, com reações consecutivas de degradação de ERO's, como mostrado na figura 12 (PRADHAN et al., 2016; VIEIRA et al., 2009). E também são usadas como biomarcadores para avaliar este estresse, que é causado principalmente por excesso de radicais peróxido (H_2O_2) e superóxido ($\bullet\text{O}_2$) (IGHODARO; AKINLOYE, 2017; TEE et al., 2016). A CAT é a única entre as enzimas degradantes de peróxido que não consome equivalentes redutores celulares (MALLICK; MOHN, 2000).

Figura 12 - Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes.



Fonte: Leslie et al., 2013.

As colinesterases (ChEs) também têm assumido destaque visto que assumem relevância nas funções neurais e tem sido inibida efetivamente por pesticidas como, organofosforados e carbamatos (FUKUTO, 1990; LIONETTO et al., 2013; MARTINEZ; CASTRO, 2006). Cajaraville et al. (2000) afirmam que a quantificação da atividade de acetilcolinesterase é considerada de grande interesse na avaliação dos efeitos de exposição para compostos neurotóxicos em animais aquáticos.

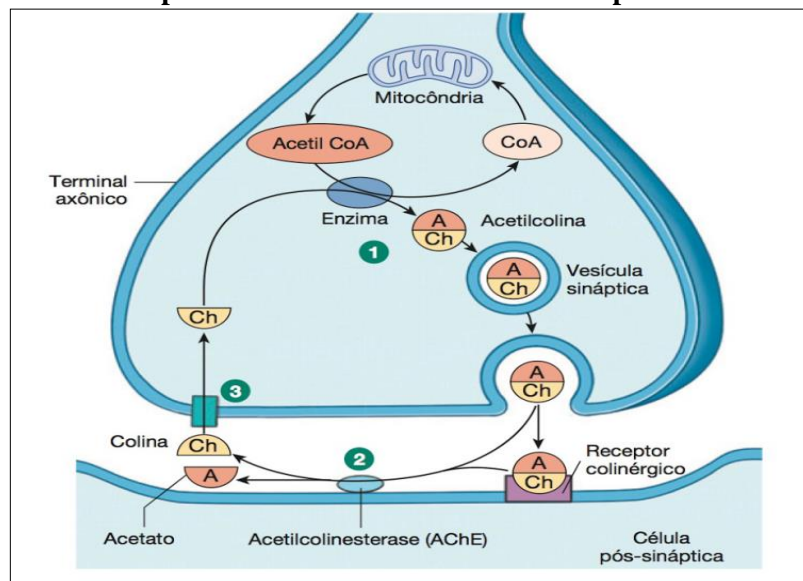
Alguns estudos apresentam o efeito tóxico de NPs sobre a atividade de ChEs em espécies aquáticas. Xia et al. (2013) observou alterações na atividade de acetilcolinesterase cerebral em *Carassius auratus* expostos à NP metálica. Myrzakhanova et al. (2013) observou inibição da atividade da acetilcolinesterase de larva de Zebrafish exposto à NP de prata e sugeriu que esta inibição poderia prejudicar o sistema imune da larva.

2.3.1 Colinesterases

As colinesterases são serina hidrolases que envolvem dois tipos: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8). AChE tem seletividade para acetilcolina (ACh) enquanto BuChE é menos seletiva, hidrolisando acetilcolina e butirilcolina. O grau de homologia de AChE e BuChE apresentam aproximadamente 50% dos aminoácidos e das estruturas terciárias globais semelhantes. BuChE tem o dobro do volume de AChE no sítio ativo periférico (PEZZEMENTI, et al. 2011; BENNION et al., 2013).

A AChE é a enzima chave do sistema nervoso central (SNC) e catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. ACh é sintetizada no corpo da célula neural ou no axônio a partir de três fontes de colina: a glicerofosforilcolina, a fosforilcolina e a fosfatidilcolina. Como ilustrado na figura 13, uma vez sintetizada a partir da colina e acetil-Coenzima A (acetil-CoA) em um processo catalisado pela colina acetiltransferase (ChAT) no terminais axonais e devido a um fluxo de prótons, esta é transportada e armazenada em vesículas sinápticas. A elevação da $[Ca^{2+}]$ citoplasmático desencadeia a mobilização das vesículas e a direciona ao terminal sináptico, seguido de fusão das vesículas e exocitose de ACh na fenda sináptica que difunde-se para célula pós-sináptica se ligando aos seus receptores específicos. A finalização da sinapse colinérgica ocorre pela ação de AChE, essencial no sistema nervoso, que termina rapidamente a ação de ACh liberada na fenda através da hidrólise, gerando como produtos colina e ácido acético (VENTURA et al., 2010; BERG et al., 2014).

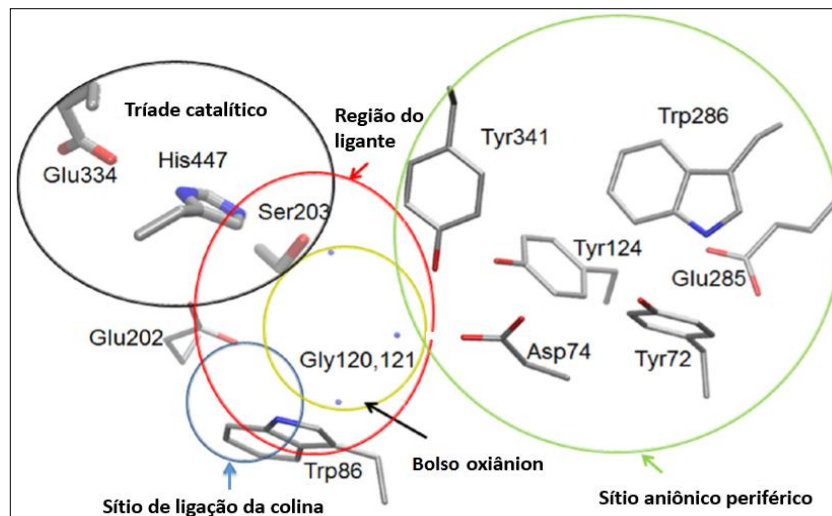
Figura 13 - Síntese e reciclagem da ACh na Sinapse: (1) a ACh é sintetizada a partir de colina e acetil-CoA; (2) na fenda sináptica, a ACh é rapidamente hidrolisada pela enzima AChE; (3) a colina é transportada de volta para o terminal axiônico e utilizada para a síntese de mais ACh.



Fonte: Henrique, 2013.

A estrutura de AChE em mamíferos é muito semelhante ao da arraia elétrica *Torpedo californica* (TcAChE), e esta se localiza a uma cavidade de 20 Å de profundidade. O sitio ativo da AChE consiste de subsítios, tais como: bolso oxiânion, bolso hidrofóbico (sítio de ligação acil), sítio cátion- π (sítio de ligação da colina) e sítio aniônico catalítico (tríade catalítico) como mostrado na figura 14 (ZHOU et al., 2010; LEGLER et al., 2015).

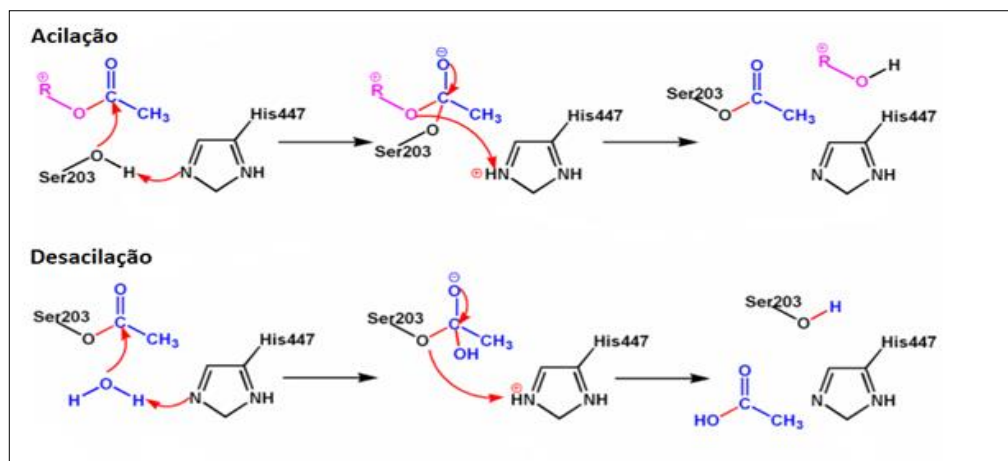
Figura 14 - Sítio ativo de AChE em humano (HuAChE) (PDBID1B41).



Fonte: Adaptado de Bennion et al., 2013.

A tríade catalítica, serina (Ser203), histidina (His447) e glutamato (Glu334) é responsável pela catálise do substrato ACh em etapas de acilação e desacilação (Figura 15) que só é possível pela estabilidade fornecida pelo bolso oxiânion e o sítio de ligação acil (ZHOU et al., 2010).

Figura 15 - Mecanismo de reação da hidrólise de ACh em etapas de acilação e desacilação.



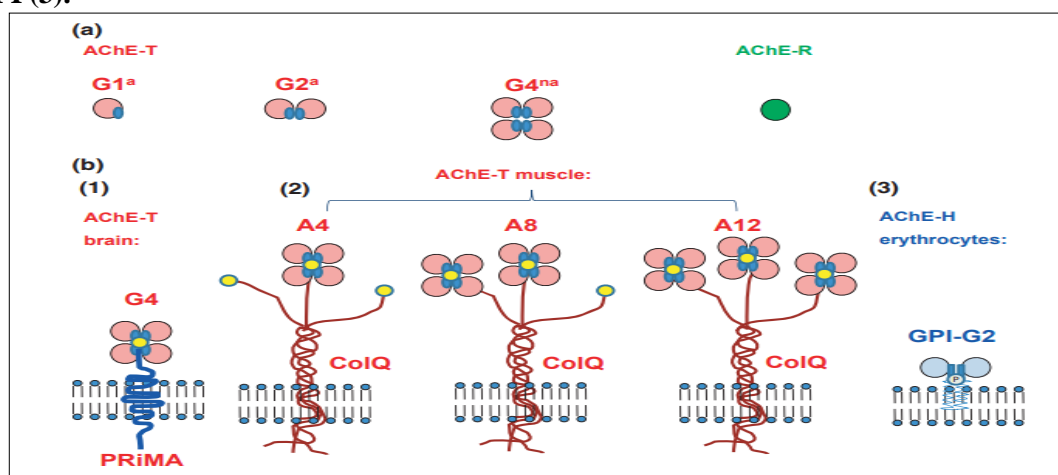
Fonte: Zhou et al., 2010.

As propriedades catalíticas dessas enzimas variam de espécie para espécie (MASSOULIÉ et al., 1993). AChE é predominante nos músculos e no sistema nervoso central na forma tetramérica e nos eritrócitos na forma dimérica, onde geralmente é acompanhado por um nível mais baixo de BuChE, e esta última tem atividade mais expressiva no fígado e no plasma. Essas enzimas estão distribuídas em diferentes tecidos e em diferentes formas moleculares solúveis ou anfifílicas.

A molécula de AChE é composta por dois domínios: um grande domínio catalítico de aproximadamente 500 resíduos e um pequeno peptídeo C-terminal com menos de 50 resíduos. A AChE é um produto de um único gene que é expresso em diferentes tecidos e em diferentes formas de splicing, como mostra a figura 16. O splicing alternativo no terminal 3' da AChE no pré-mRNA produz três variantes: a AChE_S ou AChE_T ('synaptic' ou 'tailed', principal enzima multimérica no cérebro e músculo), a AChE_R ('readthrough', forma solúvel, monomérica e é induzida sob estresse) e a variante AChE_E nos eritrócitos (dímero ligado a glicofosfatidilinositol (GPI)). Essas isoformas compartilham um domínio catalítico similar mas diferem em seu domínio C-terminal, que influencia na sua forma e localização molecular e confere características específicas (LIONETTO et al, 2013).

Moléculas de estrutura quaternária são descritas como, formas de cauda ligadas a colágeno e moléculas globulares sem cauda, designados como forma G e A, respectivamente, no qual o subscrito indica o número de subunidades catalíticas (ex. A4, A8, A12).

Figura 16 - Formas de AChE e sua ancoragem na membrana. (a) formas solúveis (mono-, di- e tetramérica) de AChE (G1 e G2 anfifílicos e G4 não anfifílico, respectivamente) e a forma monomérica (AChE_R). (b) formas ligadas à membrana de AChE são representadas pela forma G4 globular não anfifílico ancorada na membrana por meio da proteína rica em prolina (PRiMA) ou pela subunidade do colágeno Q.(2). Nos eritrócitos e no cérebro de Torpedo, uma forma dimérica hidrófoba (G2) de AChE ligado à membrana celular por meio de uma âncora de GPI (3).



A sequência traduzida de AChE de Zebrafish é 60-80% idêntica a acetilcolinesterases de outros vertebrados e é muito específica para os teleósteos (Bertrand et al., 2001; Howe et al., 2013). A literatura relata estudos cinéticos e inibidores de AChE utilizando extratos celulares do organismo inteiro e larvas de Zebrafish, no entanto, como na raia elétrica, a expressão de formas moleculares da AChE em Zebrafish é específica do tecido (BERTRAND et al., 2001; TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2008). As formas moleculares da AChE também possuem papéis catalíticos e não-catalíticos (SOREQ; SEIDMAN, 2001). Estudos mostraram que as diferentes isoformas da AChE podem ter diferentes propriedades catalíticas (KRAČMAROVÁ et al., 2015).

Bertrand et al. (2001) sequenciaram o gene da acetilcolinesterase de Zebrafish e encontraram apenas um gene (*ache*) sem splicing alternativo nas extremidades 5' ou 3', onde um exon T está disponível. Em outras AChEs de vertebrados, o terminal C é codificado por exons processados alternativamente, exons T, H ou S. O Exon H codifica um peptídeo hidrofóbico, enquanto o exon T codifica um peptídeo altamente conservado entre as espécies. Os monômeros solúveis (G1), dímeros (G2) e tetrâmeros (G4) são compostos de subunidades T. Estes resultados indicam que Zebrafish tem um único gene de *ache* que codifica apenas subunidades T e não possui um gene *BuChE*.

No cérebro dos mamíferos, a maior parte da AChE está presente na forma G4 ligada à membrana. BuChE é expresso em células da glia e em áreas selecionadas dos sistemas nervoso central e periférico (WEINSTOCK; GRONER, 2008). Estas duas enzimas são distinguidas com base a especificidade do substrato e a sensibilidade por inibidores específicos (CHEN et al., 2011b).

Os inibidores de AChE podem resultar na acumulação de neurotransmissores e mudar a homeostase do sistema neural. Os inibidores irreversíveis modulam os efeitos tóxicos, enquanto que os inibidores reversíveis desempenham um papel importante na manipulação farmacológica e contêm compostos com grupos funcionais distintos (carbamato, grupo amônio quaternário ou terciário) e também são utilizados no tratamento de várias doenças como a miastenia gravis, a doença de Alzheimer (DA), glaucoma, entre outros (ČOLOVIČ et al., 2013).

Os carbarmatos e organofosforados são os inibidores mais utilizados para AChE, ambos provocam efeitos tóxicos agudos semelhantes, com diferença na estabilidade do complexo formado e ambos contribuem para caracterização de ChE's em estudos de purificação (FORGET et al., 2002; HSIAO et al., 2004; GRIFFITHS; PRITCHARD, 1994).

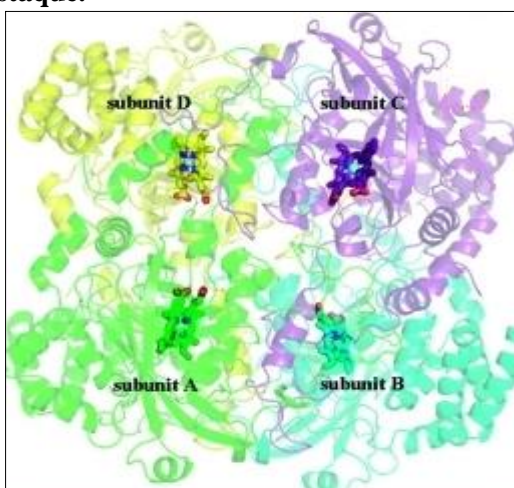
Os organofosforados são capazes de fosforilar o resíduo de serina em AChE de forma irreversível, enquanto a serina carbamilada tem menor estabilidade, pois o radical carbamil formado pode ser separado de AChE por hidrólise espontânea. Da classe dos carbamatos, a fisostigmina (ou eserina), uma amina terciária, é um inibidor não específico das colinesterases AChE e BuChE. Inibidores reversíveis como a fisostigmina e a rivastigmina modulam os efeitos tóxicos e estão sendo usados na terapia de várias doenças, como miastenia gravis, doença de Alzheimer (DA) e glaucoma (ČOLOVIČ et al., 2013).

Da classe do organofosforados, o Iso-OMPA (Tetraisopropilpirofosforamida) tem alta especificidade para BuChE e da classe dos ambenônios, o BW284c51 (1,5-Bis(4-alildimetilamôniofenil)3-pentanona dibrometo) é o inibidor específico de AChE (MOHAMED et al., 2016). As colinesterases podem ser distinguidas pela afinidade ou reatividade com uso desses inibidores seletivos.

2.3.2 Catalase

A catalase (oxidorreductase, E.C. 1.11.1.6) é uma enzima intracelular tetramérica com 4 subunidades idênticas de 60 kDa cada, e em seu sítio ativo cada subunidade tem um grupo heme (cadeias polipeptídicas) e NADPH, como mostrado na figura 17 (ŚCIBIOR; CZECZOT, 2006).

Figura 17 - Estrutura molecular da catalase de fígado de vaca, representado pelas subunidades A-D e pelo hemo central em destaque.

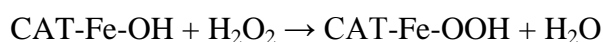


Fonte: Purwar et al., 2011.

As oxidorreductase desempenham um papel importante na proteção do organismo contra os efeitos nocivos das ERO'S, que são altamente reativas como o H₂O₂ quando

acumulado, e acredita-se que contribuem para ocorrência de doenças como o câncer, aterosclerose e no processo de envelhecimento. A CAT é uma enzima antioxidante que catalisa a quebra de H_2O_2 e está presente quase em todos organismos aeróbicos, que tem como função proteger a célula contra a oxidação, esta é encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, nos rins, no fígado e presente em todos peroxissomos (RODWELL et al., 2016). A enzima usa ferro ou manganês como cofator e catalisa a degradação ou redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água e ao oxigênio molecular, completando conseqüentemente o processo de desintoxicação pela SOD. Uma enzima catalase pode quebrar 5.6 milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto. Quando o H_2O_2 entra no centro ativo da catalase, interage com dois aminoácidos da cadeia polipeptídica da enzima: uma histidina e uma asparagina (IGHODARO; AKINLOYE, 2017).

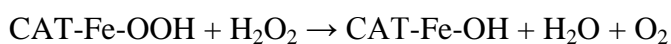
As evidências sugerem que a CAT utiliza um mecanismo de dois estágios tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas. No primeiro passo, o ferro heme da catalase interage com H_2O_2 para formar um peróxido de ferro rico em oxigênio.



Este peróxido de ferro intermediário (CAT-Fe-OOH) é referido como composto I. Com baixas concentrações de H_2O_2 ($<10^{-6}$ M), o composto I pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol ou ácido ascórbico):



E em altas concentrações de H_2O_2 , o composto I reage com um segundo H_2O_2 para produzir água e O_2 molecular.



A catalase está presente quase em todos os organismos aeróbicos, mas o tipo de catalase encontrado difere de organismo para organismo. A CAT humana possui semelhanças estruturais à catalase de cães, ratos, Zebrafish e apontam para mecanismos fortemente conservados (PATNAIK et al., 2013).

Em vertebrados, a catalase é mais concentrado no fígado, contida dentro dos peroxissomos, pois é o local onde a maioria dos processos metabólicos e anabólicos ocorrem e devido a maior quantidade de peróxidos serem gerados nesse tecido, por isso a catalase está mais presente no fígado para anular os peróxidos produzidos (CHATTOPADHYAY et al.,

2007). Como a disponibilidade de oxigênio difere entre os ambientes aquáticos e terrestres, os peixes têm se destacado por apresentarem maior variação da atividade de catalase quando comparado a outros vertebrados, pois vive na condição de maior estresse de oxigênio (PATNAIK et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Purificar e caracterizar a acetilcolinesterase de Zebrafish (*Danio rerio*) e avaliar o efeito dessa enzima como biomarcador de nanopartícula de prata, através de ensaios sub-letais utilizando como organismo alvo, o Zebrafish e a Tilápia do Nilo.

3.2 Específicos

- ✓ Caracterizar a enzima AChE cerebral e muscular do Zebrafish;
- ✓ Determinar os parâmetros cinéticos da AChE cerebral e muscular;
- ✓ Purificar a AChE cerebral de Zebrafish;
- ✓ Sintetizar e caracterizar a AgNP;
- ✓ Verificar o efeito sub-letal na exposição de Zebrafish e Tilápia à diferentes concentrações de AgNP;
- ✓ Analisar as enzimas AChE e BuChE (cerebral e muscular), CAT (hepática e de brânquias) da exposição sub-letal;
- ✓ Realizar estudo histológico da brânquia de Zebrafish após exposição à AgNP;

REFERÊNCIAS

- ABOU EL-NOUR, K. M. M. A. *et al.* Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 135–140, 2010.
- AKAISHI, F. *et al.* Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of environmental contamination and toxicology**. v. 46. n. 2. p. 244-253, 2004.
- ALMEIDA, J. A. *et al.* The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to *in vivo* cadmium contamination. **Environ. Int.**, 27, pp. 673-679, 2002.
- ANJUM, M. *et al.* Remediation of wastewater using various nano-materials. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.
- AVDESH, A. *et al.* Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. **J. Vis. Exp.** (69), e4196, 2012.
- AYROZA, L. M. S. Criação de tilápia-do-nilo, *oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de chavantes, rio paranapanema, SP/PR. Tese - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.
- BAETKE, S. C. *et al.* Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. **British Journal of Radiology**, v. 88, n. 1054, 2015.
- BARRAK, H. *et al.* Synthesis, characterization, and functionalization of ZnO nanoparticles by N-(trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid (TMSEDTA): investigation of the interactions between phloroglucinol and ZnO@TMSEDTA. **Arab. J. Chem.**, 2016.
- BAUN, A. *et al.* Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**.17(5):387-95, 2008.
- BECARO, A. A. *et al.* Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring ; Management**, v. 3, pp 22-29, 2015.
- BENNION. B. J. *et al.* Modeling the binding of CWAs to AChE and BuChE. **Mil. Med. Sci. Lett.**, v. 82(3), p. 102-114, 2013.
- BERG, J. M. *et al.* **Bioquímica 7ª edição**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2014.
- BERTRAND, C. *et al.* Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. **J. Biol. Chem.** 276, 464–474, 2001.
- BUNDSCHUH, M. *et al.* Effects of nanoparticles in fresh waters: risks, mechanisms and interactions. **Freshwater Biology**, v. 61, n. 12, p. 2185–2196, 2016.

CAJARAVILLE, M. P. *et al.* 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, p. 295-311, 2000.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. Dissertação, Instituto de Química, Universidade Federal de São Paulo, p. 1–87, 2010.

CHAKRABORTY, C. *et al.* Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.

CHATTOPADHYAY, S. *et al.* Differential expression profiles of antioxidant enzymes and glutathione redox status in hyperthyroid rats: a temporal analysis. **Comp Biochem Physiol C**, 146. 383-391, 2007.

CHEN, J. *et al.* Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of Zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure. **Aquatic Toxicology**. V 101: 3–4, pp 493-499, 2011a.

CHEN, V. P. *et al.* Molecular Assembly and Biosynthesis of Acetylcholinesterase in Brain and Muscle: the Roles of t-peptide, FHB Domain, and N-linked Glycosylation. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, p. 1–8, 2011b.

ČOLOVIĆ, M. B. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

COLVIN, V. L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. **Nature Biotechnol**, 21:11661170, 2003.

COVERDALE, L. *et al.* Not Just a Fishing Trip - Environmental Genomics Using Zebrafish. **Current Genomics**, v. 5, n. 5, p. 395–407, 2004.

DETSRI, E. *et al.* UV-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles Using Poly(Acrylic Acid) for Colorimetric Ammonia Sensing. **Advanced Materials Research**, v. 1105, p. 225–230, 2015.

DONG, X. Y. *et al.* Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals. **Catal. Sci. Technol.**, 5, 2554-2574, 2015.

DUBIŃSKA-MAGIERA, M. *et al.* Zebrafish: A model for the study of toxicants affecting muscle development and function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, 2016.

FAROMBI, E. O. *et al.* Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 4, n. 2, p. 158–165, 2007.

FOLDBJERG, R. *et al.* PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species. apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicol Lett.**,190(2):156–162, 2009.

FORGET, J. *et al.* Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). **Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology ; Pharmacology**, 132(1):85-92, 2002. 9

FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 245–254, 1990.

Fulton, M. H.; Key, P. B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates and indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.20, p.37-45, 2001.

GARCIA-SANTOS, S. *et al.* Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ion regulatory parameters. **Environ. Toxicol.**, 21, pp. 33-46, 2006.

GIRARDELLO, R. *et al.* Effects of Carbon Nanotube Environmental Dispersion on an Aquatic Invertebrate. **Hirudo medicinalis**. PLoS One. 10(12):e0144361, 2015.

Gong P. *et al.* Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. **Nanotechnology**, 18:604–11, 2007.

GOUDARZI, M. *et al.* Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. **Sci Rep.**, 6:32539, 2016.

GRIFFITT, R. J. *et al.* Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environ Toxicol Chem.**, 27(9):1972-8, 2008.

GRIFFITHS, G.; PRITCHARD, DI. Purification and biochemical characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis*. **Parasitology**, v 108:5, pp. 579-586, 1994.

HAYNES, C. L. *et al.* Nanosphere lithography: synthesis and application of nanoparticles with inherently anisotropic structures and surface chemistry. **MRS Online Proceeding Library Archive** 635:6, 2001.

HENRIQUE, R. Arquivo BioQui. 2013. Disponível em: <http://arquivobioqui.blogspot.com.br/2015/11/sintese-e-reciclagem-da-acetilcolina-na.html>. Acesso: 27 fev. 2018

HICKS, D. *et al.* Membrane targeting, shedding and protein interactions of brain acetylcholinesterase. **Journal of neurochemistry**, v.116, p 742-746, 2011.

HYSENI, S. Toxicological Effects of Nanomaterials on Aqueous and Terrestrial Ecosystems. **Center for development and strategy**, 2016.

HOWE, K. *et al.* The Zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HOYOS, L. E. S. *et al.* Biogenic Silver Nanoparticles as Sensors of Cu²⁺ and Pb²⁺ in Aqueous Solutions. **Universal Journal of Materials Science**, 5(2): 29-37, 2017.

HSIAO, Y.M. *et al.* Purification and characterization of acetylcholinesterase from oriental fruit fly [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] (Diptera: Tephritidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 5340–5346, 2004.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, 54:4, p. 287-293, 2017.

IRAVANI, S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles : chemical, physical and biological methods. **Research in pharmaceutical sciences**, 9(6):385-406. p. 1–17, 2014.

IVANOVA, N. *et al.* **Silver Nanoparticles as Multi-Functional Drug Delivery Systems**. Nanomedicines. Muhammad Akhyar Farrukh, IntechOpen, 2018. doi: 10.5772/intechopen.80238. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/nanomedicines/silver-nanoparticles-as-multi-functional-drug-delivery-systems>>. Acesso em: 19 jul. 2019

JAYASEELAN, C. *et al.* Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 220–228, 2014.

JONER, E.J. *et al.* Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. Norwegian Pollution Control Authority (TA 2304/2007). **Bioforsk**, Ås. 64 pp, 2008.

KAHRU, A.; Dubourguier, HC. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, 269:105–119, 2010.

KALBASSI, M. R. *et al.* Toxicity of Silver Nanoparticles in Aquatic Ecosystems : Salinity as the Main Cause in Reducing Toxicity. **Iranian Journal of Toxicology**, v. 5, n. 1;2, p. 436–443, 2011.

KALUEFF, A.V. *et al.* Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends Pharmacol Sci**. 35(2):63-75, 2014.

KAYA, H. *et al.* Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 936–947, 2015.

KHAN, I. *et al.* Nanoparticles : Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

KIM, M. *et al.* Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 2017, n. 34, p. 80–90, 2017.

KRAČMAROVÁ, A. *et al.* Possibility of acetylcholinesterase overexpression in alzheimer disease patients after therapy with acetylcholinesterase inhibitors. **Acta Medica (Hradec Králové)**; 58(2): 37–42, 2015.

KUMAR, V. *et al.* Evaluating the toxicity of selected types of nano chemicals. **Rev. Environ.Contam.Toxicol.**, 215:39–121, 2012.

LANONE, S. *et al.* Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. **Particle and Fibre Toxicology**, 6:14, 2009.

LARA, HH. *et al.* Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 8, p. 1–10, 2010.

LEGLER, P.M. *et al.* A conformational change in the peripheral anionic site of Torpedo californica acetylcholinesterase induced by a bis-imidazoliumoxime. **Biological Crystallography**. v. 71, p 1788-1798, 2015.

LESLIE, J.B. *et al.* Essential Oxygen Oil for Treatment of Sport-Related Injuries. **American Journal of Sports Science and Medicine.**, Vol. 1. No. 1. 7-12, 2013. doi:10.12691/ajssm-1-1-2

LI, W.R. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V 85:4, pp 1115–1122, 2010.

LIN, Z. *et al.* The inhibition of H1N1 influenza virus-induced apoptosis by silver nanoparticles functionalized with zanamivir. **RSC Adv.**, 7, 742-750, 2017.

LINS, J. A. P. N. *et al.* Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár Ambient**, v. 8, n. 4, p. 469–484, 2010.

LIONETTO, M.G. *et al.* Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 8, 2013.

LODEIRO, P. *et al.* Mechanisms of silver nanoparticle toxicity to the coastal marine diatom *Chaetoceros curvisetus*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

LUNA, S.M.; KESNER-REYES, K. FishBase 2017. Disponível em: <http://www.fishbase.org/summary/Oreochromis-niloticus.html>. Acesso: 08 dez. 2017

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 183-193, 2000.

MATHIAS, F.T. *et al.* Assessment of toxic and environmental effects of silver salt nanoparticles [Avaliação dos efeitos toxicológicos e ambientais de nanopartículas de sais de prata]. **Revista de ciencias farmaceuticas basica e aplicada**, v. 35, n. 2, p. 187–193, 2014.

MARTINEZ, A.; CASTRO, A. Novel cholinesterase inhibitors as future effective drugs for the treatment of Alzheimer's disease. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2006.

MASSOULIÉ, J. *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31–91, 1993.

MELO, M.A. *et al.* Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.

MOHAMED, M. A. *et al.* The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of Heterorhabditis bacteriophora strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 180, p. 11–22, 2016.

MONTASER, A. S. *et al.* Facile way for synthesis silver nanoparticles for obtaining antibacterial textile fabrics. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 6, p. 139–144, 2016.

MOROZOV, Y. *et al.* Cryochemical Synthesis of Polymorphous Nanostructures of a Steroid Neurohormone. **Molecules**, 22(8), pii: E1378, 2017. doi: 10.3390/molecules22081378

MYRZAKHANOVA, M. *et al.* Effects of Nanosilver Exposure on Cholinesterase Activities, CD41, and CDF/LIF-Like Expression in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. **BioMed Research International**, 2013.

NAKAMURA, T. *et al.* Synthesis of gold nanoparticle colloids by highly intense laser irradiation of aqueous solution by flow system. **Applied Physics A**, v 120: 3, pp.881-888, 2015.

NOWACK, B.; BUCHELI, T D. Occurrence. behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environ. Pollut.**, 150, 5–22, 2007.

OLIVEIRA, L. L. D. **Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos**. 2014. 279 f. Tese - Universidade de São Paulo, São Carlos.

OMAR, W. A. *et al.* Ecological Risk Assessment of Metal Pollution along Greater Cairo Sector of the River Nile, Egypt, Using Nile Tilapia, Oreochromis niloticus, as Bioindicator. **Journal of Toxicology**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

OSMAN, A. G. M. *et al.* Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. **Natural Science**, v. 2, n. 11, p. 1302–1311, 2010.

PANGESTIKA, R. *et al.* Antiviral activity effect of silver nanoparticles (AgNPs) solution against the growth of infectious bursal disease virus on embryonated chicken eggs with elisa test. **KnE Life Sciences**, pp 536-548, 2017.

PASCHOALINO, M. P. *et al.* Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PATNAIK, S. C. *et al.* A Comparative Study of Catalase Activities in Different Vertebrates. **Webmed Central Zoology**, 4(6):WMC004270, 2013.

PERELSHTEIN, I. *et al.* Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity. **Nanotechnology**; 19(24):245705, 2008. doi: 10.1088/0957-4484/19/24/245705.

PEZZEMENTI, L. *et al.* Evolution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the vertebrates: An atypical butyrylcholinesterase from the medaka oryzias latipes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

PRADHAN, A. *et al.* Enzymatic biomarkers can portray nanoCuO-induced oxidative and neuronal stress in freshwater shredders. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 227–235, 2016.

PRASAD, K. *et al.* Synergic bactericidal effects of reduced graphene oxide and silver nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Sci Rep**. 7:1591, 2017.

Project on Emerging Nanotechnologies. 2013. Disponível em <<http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>>. Acesso: 20 jan. 2018.

PULIT, J. *et al.* Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. **Acta Biochim Pol.**, 60(4): 795-8, 2013.

PULIT-PROCIAK, J. ; BANACH, M. Silver nanoparticles - A material of the future...? **Open Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 76–91, 2016.

PURWAR, N. *et al.* Interaction of nitric oxide with catalase: structural and kinetic analysis. **Biochemistry**, 2011.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Quím. Nova**. São Paulo. v. 27, 6, 1028-1029, 2004.

RAI, M. *et al.* Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RAJ, S. *et al.* Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **J Pharm Bioallied Sci**. 4(3): 186–193, 2012.

RAMACHARYULU, P. V. *et al.* Iron phthalocyanine modified mesoporous titania nanoparticles for photocatalytic activity and CO₂ capture applications. **Phys Chem Phys**. 21; 17(39):26456-62, 2015.

RAY, P. C. *et al.* Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**. 27(1): 1–35, 2009.

RIBEIRO, C. A. O. *et al.* Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of paranaguá bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 1, p. 1–11, 2013.

RIVERO, P. J. *et al.* Nanomaterials for Functional Textiles and Fibers. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1–22, 2015.

RODWELL, V. W. *et al.* **Bioquímica Ilustrada de Harper**. McGraw Hill Brasil, 30ª edição, 832p, 2016.

RS; RAE - United Kingdom Royal Society and Royal Academy of Engineering (2004). Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. Science Policy Section. The Royal Society. London. UK. SW1Y 5AG: Disponível em: <<http://www.raeng.org.uk/publications/reports/nanoscience-and-nanotechnologiesopportunities>>. Acesso: 11 jan. 2018.

RUBINSTEIN, A. L. Zebrafish assays for drug toxicity screening. **Expert Opinion on Drug Metabolism ; Toxicology**, 2006.

SABOURIN, V.; AYANDE, A. Commercial opportunities and market demand for nanotechnologies in agribusiness sector. **Journal of Technology Management and Innovation**, v. 10, n. 1, p. 40–51, 2015.

SABULLAH, M. K. *et al.* Heavy metal biomarker: Fish behavior, cellular alteration, enzymatic reaction and proteomics approaches. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 2, p. 435–454, 2015.

SALOMONI, R. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 10, p. 115–121, 2017.

SANTORIELLO, C.; ZON, L. Hooked! Modeling human disease in Zebrafish. **J Clin Invest.**, 122(7):2337-43, 2012. doi: 10.1172/JCI60434

SAPTARSHI, S. R. *et al.* Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 1, 2013.

SARKAR, P. *et al.* Synthesis and photophysical study of silver nanoparticles stabilized by unsaturated dicarboxylates. **Journal of Luminescence**, v. 129, n. 7, p. 704–709, 2009.

SAYES, C.M. *et al.* The differential cytotoxicity of water soluble fullerenes. **Nanoletters**, 4:18811887, 2004.

ŚCIBIOR, D.; CZECZOT, H. Catalase : structure , properties , functions. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, 60:170-80, 2006.

SIQUEIRA, P. R. **Efeitos da exposição à nanopartícula de dióxido de titânio em hepatócitos de peixe zebra (*Danio rerio*, hamilton, 1822). uma abordagem in vitro.** 2016. Tese – Universidade Federal de São Carlos- SP.

SHEMETOV, A. A. *et al.* Molecular interaction of proteins and peptides with nanoparticles. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p. 4585–4602, 2012.

SHENAVA, A. Synthesis of Silver Nanoparticles By Chemical Reduction Method and Their Antifungal Activity. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 10, p. 111–113, 2013.

SLISTAN-GRIJALVA, A. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles in a polyvinylpyrrolidone (PVP) paste, and their optical properties in a film and in ethylene glycol. **Materials Research Bulletin**, v. 43:1, 2008.

Smijs, T. G.; Pavel, S. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: Focus on their safety and effectiveness. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, n. 1, p. 95–112, 2011.

SOLOMON, S. D. *et al.* Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **J. Chem. Educ.**, 84(2), 322-325, 2007.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E coli as a model for Gram-negative bacteria. **J Colloid Interface Sci.**, 275:177-182, 2004.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci.**, 2(4):294-302, 2001.

SOUZA, G.D. *et al.* Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. **Educación Química**. V. 24: 1, p14-16, 2013.

SUBASHKUMAR, S.; SELVANAYAGAM, M. First report on: Acute toxicity and gill histopathology of fresh water fish *Cyprinus carpio* exposed to Zinc oxide (ZnO) nanoparticles. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 4, n. 3, p. 10–13, 2014.

SUN, W. *et al.* Assessing protein oxidation by inorganic nanoparticles with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Biotechnol Bioeng.** 110(3):694-701, 2013. doi: 10.1002/bit.24754.

SURESH, A.K. *et al.* Relating nanomaterial properties and microbial toxicity. **Nanoscale**. 5:463-474, 2013.

TAKEUCHI, E. S. Electrochemical Reduction of Silver Vanadium Phosphorus Oxide, Ag₂VO₂PO₄: The Formation of Electrically Conductive Metallic Silver Nanoparticles. **Chem. Mater.**, 21 (20), pp 4934–4939, 2009.

TEE, J. K. *et al.* Oxidative stress by inorganic nanoparticles. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.** 8(3):414-38, 2016.

TEJAMAYA, M. **Synthesis, characterization and stability test of silver nanoparticles in ecotoxicology media**. 2014. Thesis - University of Birmingham.

THWALA, M. *et al.* The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. **Environ Sci Process Impacts**.15(10):1830-43, 2013.

TILTON, F. A. *et al.* Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in Zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately or as mixtures. **Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.** 153. 9–16, 2011.

TRIPATHI, A.; SRIVASTAVA, UC. Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. **Annals of Neurosciences**, v.15, 2008

ULM, L. *et al.* Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 24, p. 19990–19999, 2015.

VALAVANIDIS, A. *et al.* Nanomaterials and nanoparticles in the aquatic environment: Toxicological and ecotoxicological risks. **Science advances on Environment, Toxicology Ecotoxicology issues**, p. 1–10, 2014.

VAZQUEZ-MUÑOZ, R. *et al.* Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? **Toxicol Lett.**, 276:11-20, 2017.

VENTURA, A.L.M. *et al.* Sistema colinérgico: Revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 2, p. 74–80, 2010.

VICENTE, I. *et al.* Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392–398, 2014.

VIEIRA, L.R. *et al.* Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. **Chemosphere** 76. 1416–1427, 2009.

VILLAMIZAR-GALLARDO, R. *et al.* Fungicidal effect of silver nanoparticles on toxigenic fungi in cocoa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 12, p. 1929–1936, 2016.

WANG, F. *et al.* A highly sensitive gas sensor based on CuO nanoparticles synthesized via a sol–gel method. **RSC Adv.**, v. 6, n. 83, p. 79343–79349, 2016.

WANG, L. *et al.* Biochemical Changes in the Tissues of Zebrafish (*Danio rerio*) Exposed to Organophosphorous Pesticides and Heavy Metal Cadmium. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 8, n. 10, p. 707–714, 2017.

WEINSTOCK, M.; GRONER, E. Rational design of a drug for Alzheimer's disease with cholinesterase inhibitory and neuroprotective activity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 175, n. 1–3, p. 216–221, 2008.

WESTNEAT, M.; CAMPBELL, D. Species 2000 ; ITIS Catalogue of Life: April 2013. Disponível em: <http://eol.org/pages/204011/hierarchy_entries/52620562/overview>. Acesso em: 11 de jan. 2018

XIA, Z. K. *et al.* The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 2, p. 182–188, 2016.

XIA, J. *et al.* Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus*. **Biomed Environ Sci**, 26(9): 742-749, 2013.

Yah, CS. The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. **Biomedical Research**, V. 24: 3, 2013.

Yeşilbudak, B.; Erdem, C. Cadmium Accumulation in Gill, Liver, Kidney and Muscle Tissues of Common Carp, *Cyprinus carpio*, and Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 92. 546–550, 2014.

Younis, E. M. *et al.* Hematological and enzymatic responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* during short and long term sublethal exposure to zinc. **Afr. J. Biotechnol.** 11, p. 4442-4446, 2012.

YUE, Y. *et al.* Interaction of silver nanoparticles with algae and fish cells: A side by side comparison. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2017.

ZANETTE, J. *et al.* Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. **Marine Environmental Research**, 66:196-198, 2008.

ZIBAIL, M. I. *et al.* Nonadiabatic tapered optical fiber sensor for measurement of antimicrobial activity of silver nanoparticles against *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. V 135, pp 55-64, 2014.

ZHANG, X. F. *et al.* Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1534, 2016.

ZHOU, Y. *et al.* Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born-Oppenheimer Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations. **J. Phys. Chem. B**, v. 114, n. 26, p. 8817–8825, 2010.

ZHU, X. *et al.* TiO₂ Nanoparticles in the Marine Environment: Impact on the Toxicity of Tributyltin to Abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) Embryos. **Environ. Sci. Technol.**, 45 (8), pp 3753–3758, 2011.

ZHU, X. *et al.* Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Early Life Stages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–6, 2012.

4. CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO CINÉTICO DE ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL E MUSCULAR DE *DANIO RERIO*

Esta seção consiste do artigo, de autoria própria, publicado na Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.04.005

Esta seção objetiva caracterizar os efeitos físico-químico, cinéticos e inibitórios das atividades cerebrais e musculares da ChE de Zebrafish, pois, diferentes isoformas de AChE podem ter diferentes propriedades catalíticas e se os tecidos apresentarem esterases inespecíficas podem contribuir para a atividade dessa enzima e levar a erros de interpretação em estudos de ecotoxicologia.

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Reagentes

Ditiotreitol (DTT, $\geq 98\%$), ácido 5.5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, 98%), iodeto de acetiltiocolina (ACTh, 97%), iodeto de butiriltiocolina (BCTh, 99%), albumina de soro bovino (BSA), dodecil sulfato de sódio (SDS, 99%), dibrometo de 1,5-bis- (4-alildimetilamonofenil) pentan-3-ona (BW284c51), tetraisopropilpirofosforamida (Iso-OMPA), fisostigmina (eserina, 99%) e AChE de enguia elétrica (*Electric eel*, Tipo VI-S 500U, C3388) foram compradas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e usadas como recebidas. Marcador de peso molecular de proteínas (Amersham/RPN756E, GE Healthcare).

4.1.2 Aclimação dos peixes e preparação do extrato livre de células

Todos os procedimentos utilizados na manutenção e sacrifício dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) [Protocolo nº 42/2017, segue em anexo no Apêndice A] da Universidade Federal de Alagoas.

Os zebrafish (2.5 ± 0.6 cm; 0.9 ± 0.3 g) foram obtidos de uma piscicultura comercial e aclimatados às condições laboratoriais por 7 dias em tanques de 50 L contendo água desclorada, à temperatura ambiente ($26.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$) sob um fotoperíodo de 12 h (SILVA et. al.,

2015). A água do tanque foi continuamente aerada de acordo com as especificações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 15088/2016) e normativas da OCDE (203/1992), e os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 48% de proteína bruta, 3 vezes por dia. Depois disso, os peixes foram sacrificados; Cérebros e músculos foram removidos, imersos em nitrogênio líquido e armazenado a -20°C até serem necessários para os ensaios enzimáticos.

Os extratos livre de células, de cérebro e músculo, foram preparados de acordo com Golombieski et al. (2008) com pequenas modificações. O tecido foi suspenso em 150 mM de cloreto de sódio a uma proporção de 80 mg de tecido:1mL solução e foram e homogeneizadas em Potter-Elvehjem. Em seguida, os homogenatos foram submetidos à sonicação (5 ciclos de 15 segundos cada) utilizando um disruptor ultrassônico de células (ThermoFisher Scientific, modelo D100, Waltham). No caso do extrato muscular, o mesmo procedimento acima foi realizado com duas etapas adicionais: a. antes de homogeneizar em Potter, o tecido foi macerado em um almofariz, b. Após a etapa de sonicação, o extrato livre de células foi centrifugado (Sigma model 3K30, Osterode, Alemanha) a 10000 g durante 10 min a 4°C .

4.1.3 Atividade enzimática e concentração proteica

A atividade de ChE foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961). Os substratos ACTh e BCTh foram empregados nos ensaios de AChE e BuChE, respectivamente. A mistura reacional (1.5 mL) continha tampão de fosfato de potássio (0.1 M, pH 8), 0.34 mM de DTNB, 50 μL de extrato livre de células diluído e 0.5 mM de substrato. A atividade enzimática foi determinada pela verificação da formação do tiolato de DTNB a 412 nm por 3 min, utilizando um espectrofotômetro UV/VIS (Perkin Elmer, modelo Lambda 2).

A concentração proteica foi determinada de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.4 Determinação do pH e da temperatura ótimos

O pH ótimo para a atividade de ChE foi determinado numa faixa de pH de 4.0-9.0 utilizando tampões de fosfato de potássio (4.0-8.5) e Tris-HCl (9.0 e 9.5). A hidrólise não enzimática do substrato (em pH básico) foi corrigida pela subtração de seus valores das atividades. A temperatura ideal foi determinada numa faixa de 20-45 $^{\circ}\text{C}$ incubando durante 10

min. A estabilidade térmica foi determinada incubando o extrato celular na mesma temperatura por 20 min seguido por 10 min de equilíbrio à temperatura ambiente.

4.1.5 Ensaio de inibidores seletivos

OS inibidores de colinesterases incluindo fisostigmina, BW284C51 e Iso-OMPA, foram testados. O extrato livre de células foi incubado com inibidores (0.05-1 μM) durante 15 min em tampão fosfato (0.1 M, pH 8.0) à temperatura ambiente. A concentração de fisostigmina causando 50% de inibição da hidrólise da acetilcolina (IC50) foi determinada a partir da curva dose-resposta (log [inibidor] vs. [percentagem de inibição]) com o GraphPad Prism 6.

4.1.6 Parâmetros cinéticos

A taxa de hidrólise da ACTh no cérebro e músculo foi medida em uma faixa de concentrações de 0.01-3.5 mM. As constantes cinética aparente (K_m^{app} , V_{max}^{app} , K_i^{app}) foram calculadas usando a equação Michaelis-Menten modificada de GraphPad Prism 6 (San Diego, EUA), quando a inibição foi observada:

$$V^{app} = \frac{V_{max}^{app} * [S]}{K_m^{app} + [S] * (1 + \frac{[S]}{k_i^{app}})}$$

onde,

V^{app} = velocidade aparente ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ de proteína);

K_m^{app} = constante aparente de Michaelis (mM);

[S] = concentração do substrato (mM);

k_i^{app} = constante de dissociação do substrato aparente (mM).

4.1.7 Efeitos inibitórios da fisostigmina

Para determinar o tipo de inibição causada pela fisostigmina na AChE cerebral e muscular, a atividade enzimática da AChE foi quantificada usando concentrações de ACTh na faixa de 0.1-1.5 mM (onde não foi observada a inibição pelo substrato) e fisostigmina na concentração final de 0.2 μM . O inibidor foi incubado por 15 min com o extrato livre de

células no meio tamponante, para posterior quantificação. Os dados foram lotados em um gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burke ($1/[\text{velocidade}]$ vs. $1/[\text{substrato}]$), e as constantes cinéticas k_i e k_i' (constantes de equilíbrio para ligar a enzima e o complexo enzima-substrato na presença do inibidor, respectivamente) foram determinadas.

4.1.8 Eletroforese em gel de Poliacrilamida (PAGE)

Os extratos livres de células, de cérebro e músculo, foram submetidos em PAGE para verificar a presença de bandas correspondentes às proteínas de interesse (ChEs). Foi preparado o extrato livre de células utilizando fosfato de potássio 0.1 M (pH 8) contendo Triton X-100 a 0.5% (v/v) e centrifugou-se a 10000 g durante 10 min a 4 °C. O PAGE sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizado utilizando gel de acrilamida 10% com tampão de amostra contendo 5 mM de DTT, como descrito por Silva et al. (2015). Os géis foram corados com a solução Coomassie Brilliant Blue (CBB, G-250). O PAGE sob condições não-desnaturantes (nativa) foi realizado utilizando gel de acrilamida 8%, como descrito por Sagane et al. (2005) com modificações adicionando 0.5% de triton X-100 aos géis e ao sistema tampão tris-glicina de acordo com Kim et al. (2012), e corrida em banho de gelo a 90 V. A nativa foi dividida em duas partes: uma delas foi corada com CBB-G250, enquanto a outra foi corada para atividade de AChE por incubação com 6 mM ACTh e 3 mM DTNB no tampão de fosfato de potássio 0.1 M (pH 8.0) à temperatura ambiente com agitação suave até se desenvolverem bandas de proteína coloridas como descrito por Sagane et al. (2005). Os pesos moleculares de proteínas foram estimados por comparação com bandas produzidas pelo marcador (RPN756E, Amersham). A AChE de enguia elétrica (*Electric eel*) também foi usada para o padrão de acetilcolinesterase para o SDS-PAGE e nativa.

4.1.9 Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos com média±desvio e os valores médios foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, com nível de significância de 0.05 ($p \leq 0.05$).

4.2 Resultados

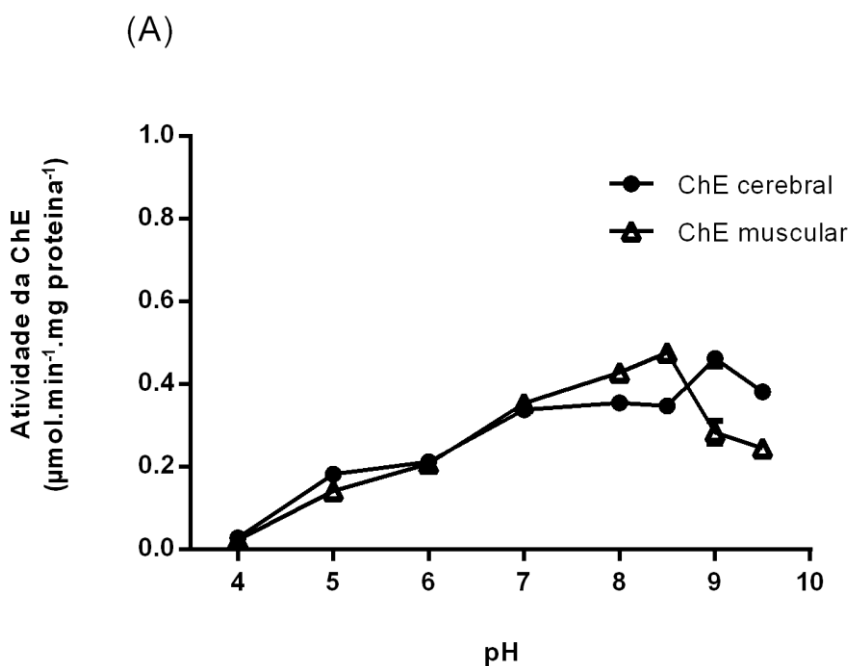
A análise da atividade de ChE em função dos substratos acetiltiocolina e butiriltiocolina mostrou que a ChE cerebral só exibiu atividade na presença de acetiltiocolina

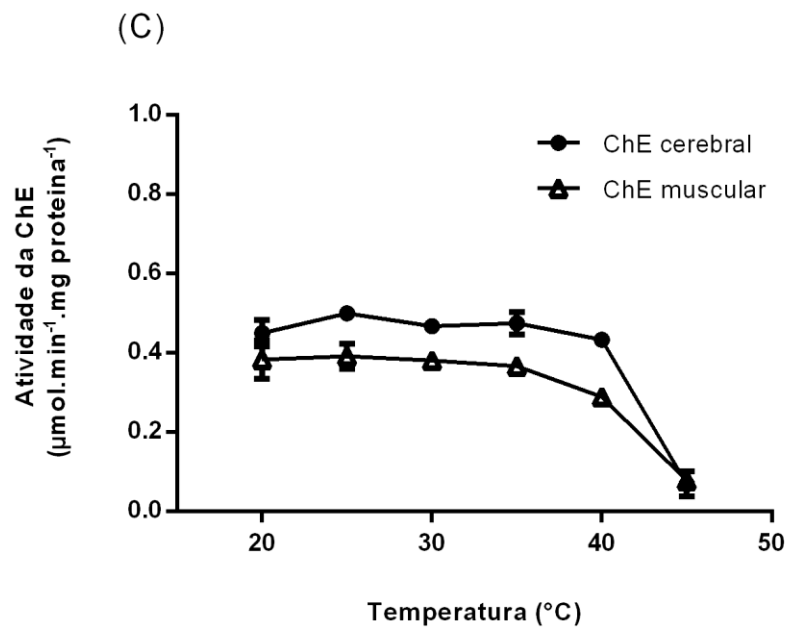
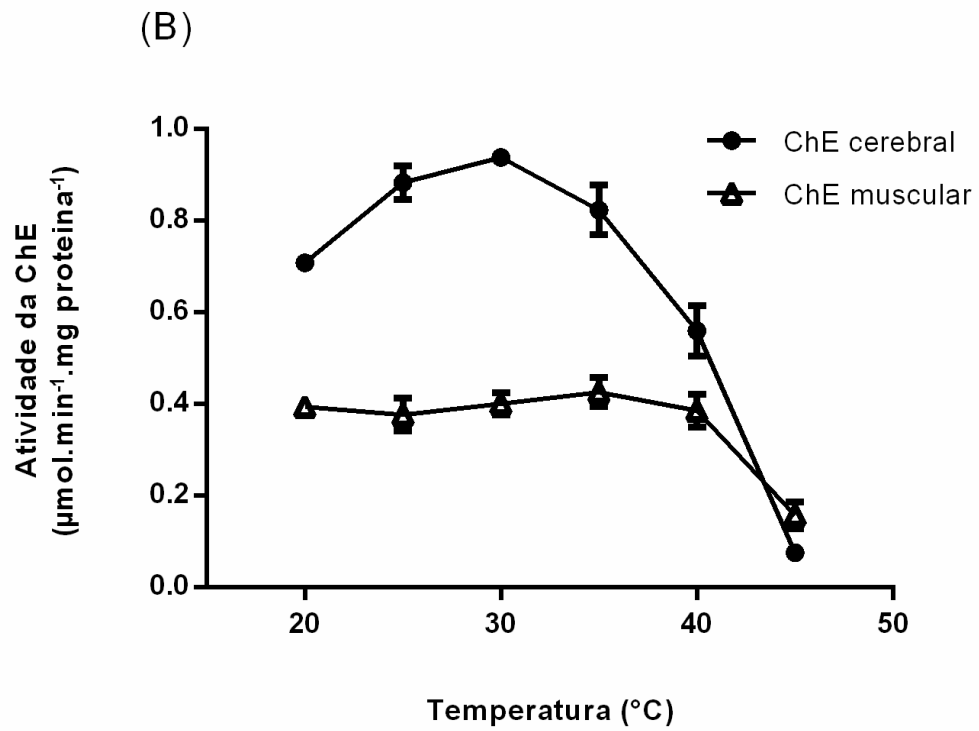
($0.379 \pm 0.023 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\u00edna}^{-1}$) e a ChE muscular na presen\u00e7a de ambos os substratos com valores de atividade de 0.124 ± 0.003 e $0.011 \pm 0.001 (\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg de prote\u00edna}^{-1})$, respectivamente.

4.2.1 pH e temperatura \u00f3timos

A influ\u00eancia do pH, temperatura e termoestabilidade da atividade de ChE no c\u00e9rebro e m\u00fasculo de Zebrafish s\u00e3o mostrados na figura 18. Os maiores valores de atividade para a ChE cerebral e muscular foram obtidos em pH alcalino 9.0 e 8.5, respectivamente (figura 18A). A temperatura \u00f3tima para a atividade da ChE cerebral foi a 30 \u00b0C, enquanto a ChE muscular apresentou maiores valores de atividade no intervalo de 20-35\u00b0C (Figura 18B). O estudo de termoestabilidade (Figura 18C) mostra que a atividade da ChE cerebral permanece ativa at\u00e9 40\u00b0C e acima dessa temperatura houve uma queda acentuada nos valores de atividade (85.3%). A atividade da ChE muscular permanece ativa at\u00e9 35\u00b0C e ap\u00f3s esta temperatura, os valores diminuiram acentuadamente.

Figura 18 - Efeito do pH (A), temperatura (B) e termoestabilidade (C) na atividade de ChE cerebral (- \u2022 -) e muscular (- \u25b2 -) de Zebrafish.



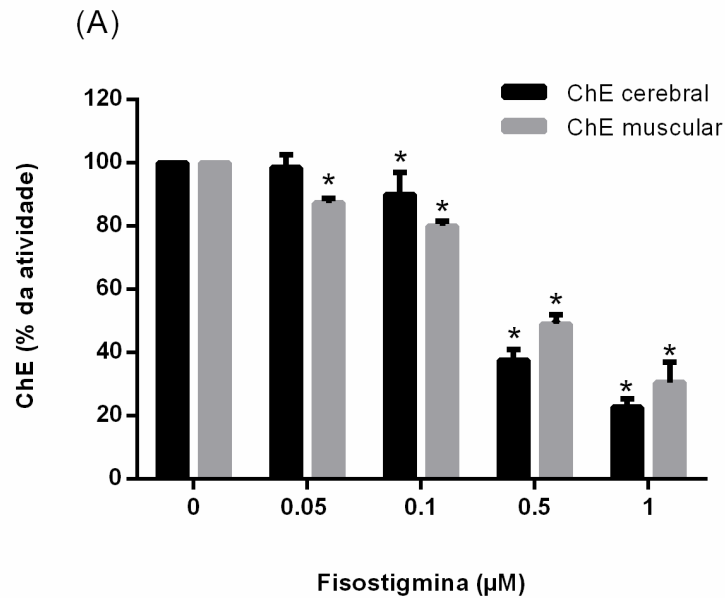


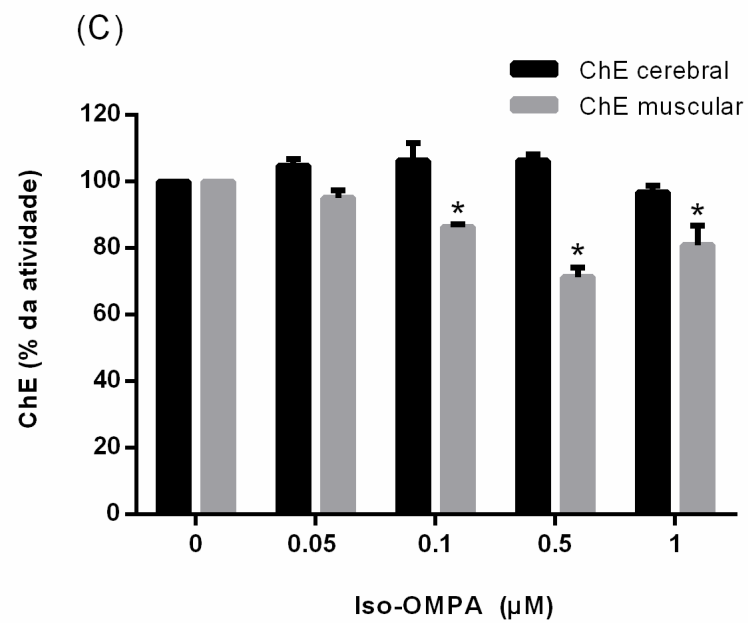
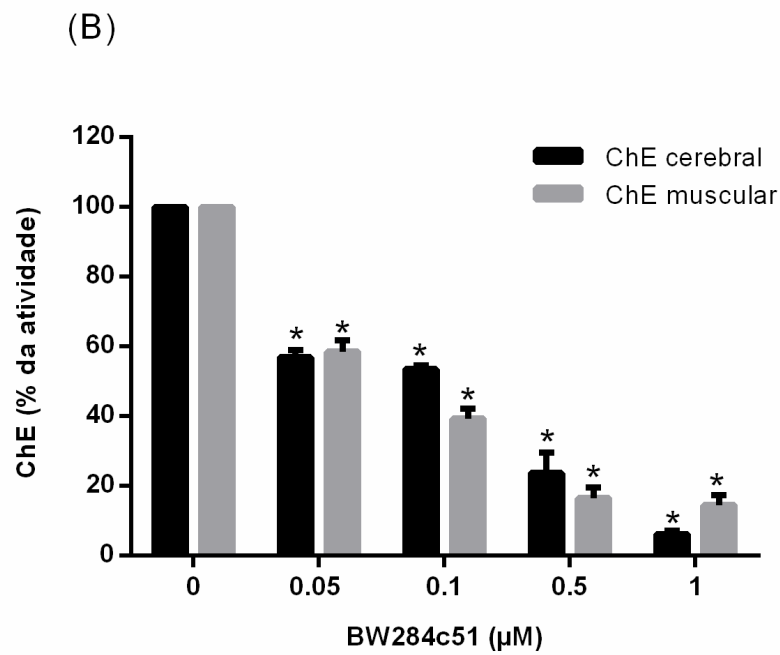
4.2.2 Ensaio inibidores seletivos

A figura 19 mostra os efeitos de diferentes concentrações de inibidores seletivos (fisostigmina, BW284c51 e Iso-OMPA) na atividade da ChE cerebral e muscular de Zebrafish. A figura 19A mostra que a fisostigmina tem um efeito inibitório significativo na

atividade de ChE cerebral de 0.1 a 1 μM , enquanto a atividade de ChE muscular apresentou efeito inibitório significativo em todas as concentrações testadas. A figura 19B mostra que o BW284C51 tem um efeito inibitório significativo na atividade de ChE cerebral e muscular em todas as concentrações testadas. A 1 μM de BW284c51, a atividade de ChE no cérebro e músculo foi inibida em 94% e 85%, respectivamente. A atividade de ChE cerebral não foi afetada significativamente pelo Iso-OMPA (Figura 19C), enquanto a atividade da ChE muscular apresentou uma diminuição significativa nas concentrações de Iso-OMPA de 0.1 a 1 μM .

Figura 19 - Atividade da ChE cerebral e muscular de Zebrafish na presença das concentrações crescentes (0-1 μM) de inibidores seletivos: fisostigmina (A), BW284c51 (B) e Iso-OMPA (C). * Indica diferenças significativas, quando comparado ao controle ($p < 0.05$).





A tabela 2 compara os valores de IC50 de fisostigmina obtidos para a ChE cerebral e muscular de Zebrafish com AChE de outras espécies.

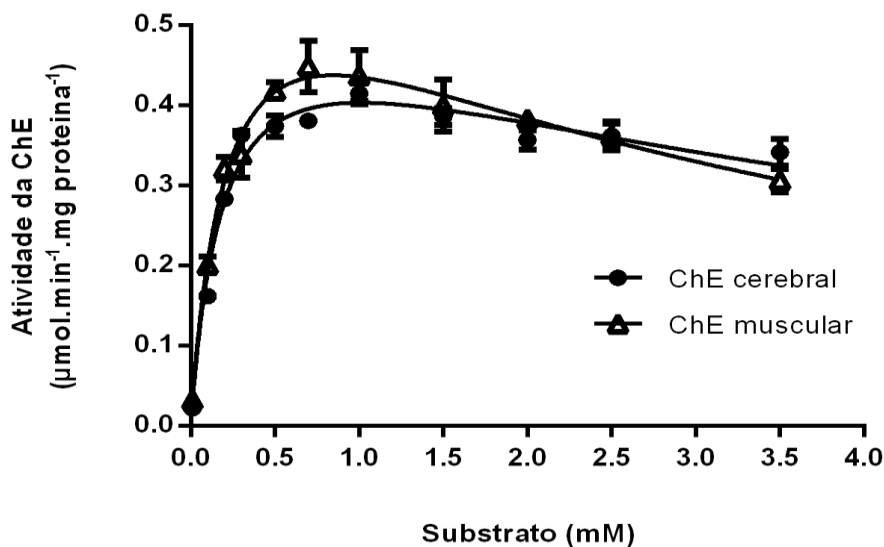
Tabela 2 - Concentração de fisostigmina que inibe 50% da atividade da colinesterase em diferentes tecidos.

Espécie	Tecidos	IC50 (μM)	Referência
<i>Danio rerio</i>	Cérebro	0.61 ± 0.09	Estudo atual
<i>Danio rerio</i>	Músculo	0.37 ± 0.14	Estudo atual
<i>Oreochromis niloticus</i>	Cérebro	9.76×10^{-4}	Rodríguez-Fuentes; Gold-Bouchot (2004)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Músculo	1.221	Rodríguez-Fuentes; Gold-Bouchot, (2004)
<i>Colossoma macropomum</i>	Cérebro	0.158	Silva et al. (2015)
<i>Cichla ocellaris</i>	Cérebro	1.400	Silva et al. (2013)
<i>Homo sapiens</i>	Sangue	0.117	Bitzinger et al. (2016)
<i>Rat</i>	Sangue	0.075	Bitzinger et al. (2016)

4.2.3 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de ChE foram medidos utilizando acetilcolina como substrato, nas concentrações de 0.01 a 3.5 mM. A figura 20 exibe um padrão não hiperbólico de atividade enzimática.

Figura 20 - Cinética enzimática da ChE cerebral (- ● -) e muscular (- Δ -) de Zebrafish em função da concentração do substrato acetilcolina. Os dados reportados representam média \pm desvio de três repetições.



As constantes cinéticas aparentes para os extratos cerebrais e musculares são mostradas na tabela 3 comparado com outros vertebrados. Os valores para as constantes de Michaelis-Menten, K_m^{app} para ChE cerebral (0.191 ± 0.024 mM) e muscular (0.230 ± 0.030 mM) foram similares, enquanto V_{max}^{app} para a ChE muscular (0.677 ± 0.039 U / mg.proteína) foi maior que a ChE cerebral (0.566 ± 0.028 U / mg de proteína). A constante de dissociação k_i^{app} para a ChE muscular (3.082 ± 0.448 mM) foi menor que a ChE cerebral (5.341 ± 0.922 mM), indicando que a ChE muscular é inibida em concentrações de substrato inferiores a ChE cerebral.

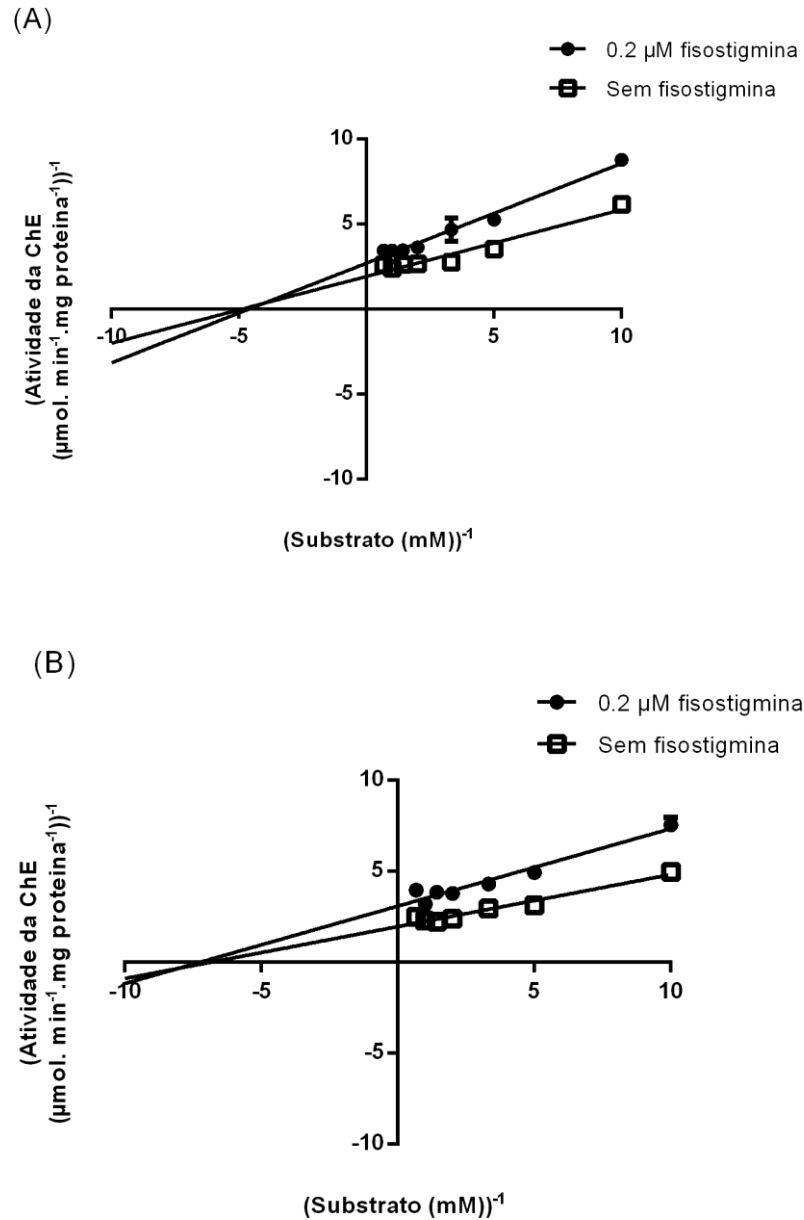
Tabela 3 - Comparação das constantes de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima de hidrólise (V_{max}) reportadas para AChE de Zebrafish e outros vertebrados.

Espécie	Extrato	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)	Referência
<i>Oreochromis niloticus</i>	Cérebro	0.390 ± 0.200	0.218 ± 0.010	Assis et al. (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Músculo	0.499 ± 0.100	0.411 ± 0.020	Rodríguez-Fuentes ; Gold-Bouchot (2004)
<i>Pleuronichthys verticalis</i>	Músculo	0.303 ± 0.070	0.524 ± 0.030	Rodríguez-Fuentes et al. (2008)
<i>Wistar-derived rats</i>	Cerebelo	0.077	0.026	Rocha et al. (1993)
<i>Carassius auratus</i>	Cérebro	0.112 ± 0.020	0.262 ± 0.020	Shaonan et al. (2004)
<i>Danio rerio</i>	Cérebro	0.191 ± 0.024	0.556 ± 0.028	Estudo atual
<i>Danio rerio</i>	Músculo	0.230 ± 0.030	0.677 ± 0.039	Estudo atual

4.2.4 Efeitos inibitórios da fisostigmina

A figura 21 mostra o mecanismo de inibição da fisostigmina da ChE cerebral e muscular com um padrão típico de inibição mista. Os valores das constantes de equilíbrio na presença de fisostigmina para a ChE cerebral (k_i 0.406 ± 0.089 μ M e k_i' 0.494 ± 0.046 μ M) e ChE muscular (k_i $= 0.409 \pm 0.029$ μ M e k_i' 0.351 ± 0.009 μ M) foram obtidos pelo gráfico de Lineweaver-Burke.

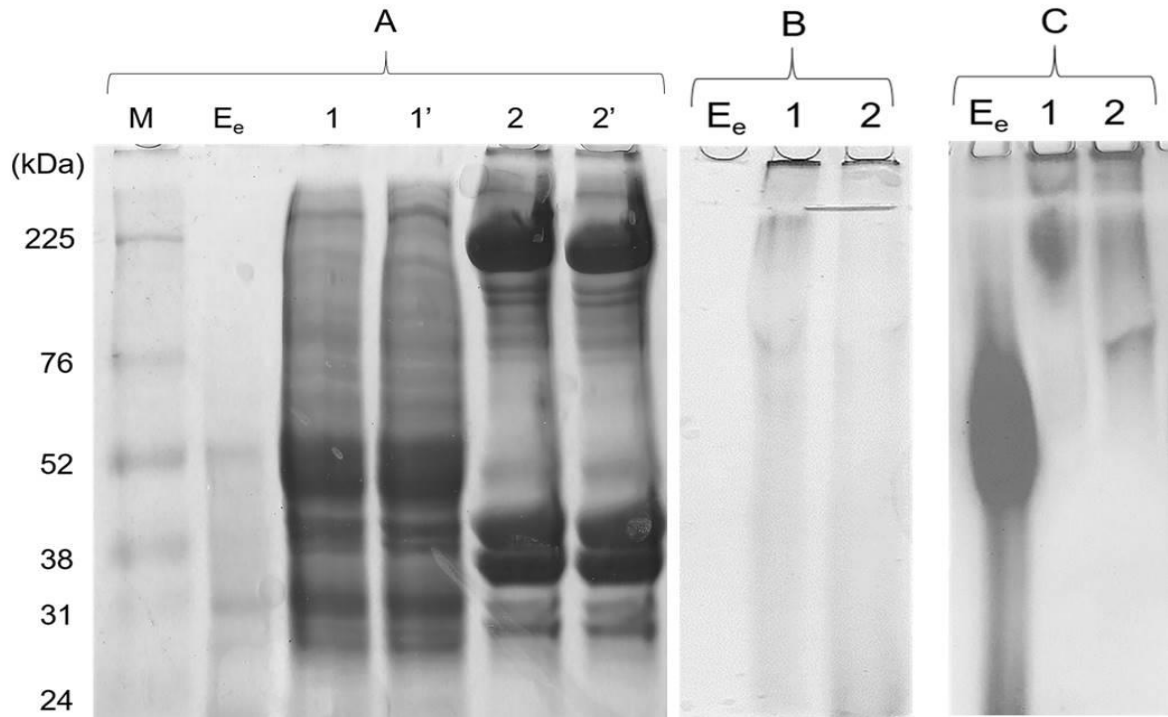
Figura 21 - Gráficos Lineweaver-Burke da ChE cerebral (A) e muscular (B) de Zebrafish na ausência (- □ -) e presença (- ● -) de fisostigmina.



4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A revelação do SDS-PAGE obtidas a partir de extratos cerebrais e musculares de Zebrafish (figura 22A) foram típicas de extratos cerebrais e musculares que apresentam uma banda em torno de 50-75 kDa correspondente a ChEs de peixes. O gel nativo corados com CBB (figura 22B) exibiram bandas nas mesmas áreas que as bandas reveladas pela atividade de ChE (figura 22C).

Figura 22- Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) do extrato cerebral e muscular de Zebrafish: A) SDS-PAGE corado com CBB. Linha M: marcador, linha Ee: 25 µg de AChE da enguia elétrica. Linha 1 e 2: 60 µg de proteína do extrato cerebral e muscular, respectivamente; B) Gel nativa corados com CBB e C) Zimograma corados para atividade de AChE; na linha Ee: 5 µg AChE de enguia elétrica; linha 1 e 2: 60 µg de proteína do extrato cerebral e muscular, respectivamente.



4.3 Discussão

Quando se utiliza uma enzima como biomarcador é necessário caracterizá-la através da determinação dos parâmetros cinéticos e físico-químicos de sua atividade. A ChE dos dois tecidos aqui estudados mostra uma preferência por acetiltiocolina como substrato e a ChE cerebral não apresenta atividade na presença de butiriltiocolina.

A ChE cerebral e muscular de Zebrafish apresentaram valores aproximados para pH ótimo. A ChE cerebral foi 9.0 enquanto para ChE muscular foi 8.5. Esses valores são similares com o valor da AChE cerebral recombinante de humano encontrado por Ceylan e Erdoğan (2017) (pH ótimo em torno de 9.0). Em uma faixa de pH de 4.0 a 9.5, a atividade na presença de acetiltiocolina mostra dependência de pH para as ChEs de ambos os tecidos de Zebrafish. O mesmo é observado para a AChE de *Electric eel* que mostra a dependência do pH para a atividade em uma faixa de 4.8 a 9.5 (KOMERSOVÁ et al., 2018). Nos extremos da faixa de pH, a atividade da ChE cai, indicando que o complexo enzima-substrato é influenciado pelo pH e alterações de protonação na AChE e/ou ACTh podem ser responsáveis por esse efeito (SABULLAH et al., 2014; KOMERSOVÁ et al., 2018).

Em pH baixo, altas concentrações de prótons estão envolvidas na protonação do grupo imidazol da histidina (resíduo chave na tríade catalítica) presente no sítio ativo da ChE que pode dificultar a interação do substrato com a ChE. Em pH elevado podem ocorrer modificações na carga do substrato que influenciam a ligação da enzima e do substrato. Conseqüentemente, o pH baixo ou alto pode levar à inativação da ChE cerebral e muscular de Zebrafish.

Relacionando a temperatura ótima para a atividade, a ChE cerebral e muscular apresentaram padrões diferentes. ChE cerebral exibe atividade máxima em torno de 30 °C e após essa temperatura diminui acentuadamente (inibição de 40% a 40 °C). AChE cerebral recombinante de humano mostra atividade máxima no intervalo de 20-30 °C (CEYLAN; ERDOĞAN, 2017) e AChE cerebral de *Oreochromis niloticus* em 35 °C (ASSIS et al., 2012). Por outro lado, a atividade muscular do ChE atinge atividade máxima dentro de um intervalo maior (20-40 °C). No que diz respeito à estabilidade da temperatura, a ChE cerebral e muscular de *D. rerio* apresentam um padrão semelhante e não mostra alterações na atividade no intervalo de 20 a 40°C. Ambas as enzimas retiveram cerca de 16 e 27% de sua atividade, respectivamente, após incubação a 45°C por 20 min. Assis et al. (2012) relataram que a AChE cerebral de *Arapaima gigas* e *Oreochromis niloticus* reteve cerca de 81 e 66% de sua atividade após incubação a 50°C por 30 min, respectivamente.

Os inibidores seletivos são muito úteis para caracterizar as colinesterases, onde a fisostigmina é inibidor específico das colinesterases. O BW284c51 é inibidor específico da AChE e o Iso-OMPA é inibidor da BuChE. Extratos cerebrais e musculares de Zebrafish expostos à fisostigmina mostram uma relação proporcional entre concentração e inibição, confirmando que a atividade é devido a presença de colinesterases e não a outros tipos de esterases. O efeito inibitório do BW284c51 confirma que a principal atividade da colinesterase no cérebro e no músculo é devido a AChE. Os resultados obtidos na presença de Iso-OMPA não mostram nenhum efeito sobre a ChE cerebral, enquanto para a ChE muscular foi observado uma diminuição moderada na atividade (13 a 29%), indicando a presença de BuChE no tecido muscular de Zebrafish. A ChE de *Dicentrarchus labrax* também apresenta um efeito inibitório significativo de Iso-OMPA na ChE muscular, mas não na ChE cerebral (VARÓ et al., 2003).

A fisostigmina é um inibidor reversível da ChE amplamente utilizado na terapia da doença de Alzheimer, resultando no acúmulo de ACh e aumento da transmissão colinérgica (COELHO FILHO; BIRKS, 2001). Este estudo mostra as diferenças na sensibilidade das ChEs de Zebrafish à fisostigmina no tecido cerebral e muscular. A ChE muscular apresenta

maior sensibilidade à fisostigmina do que a ChE cerebral, conforme indicado pelo menor valor de IC50. Como observado na tabela 2, a AChE muscular tem 5 e 3 vezes menos sensibilidade à fisostigmina do que a AChE do sangue do rato e AChE do sangue humano, respectivamente. Schmidt et al. (2015) também relataram que AChE de Zebrafish tem menor sensibilidade à inibição de organofosforados quando comparada à AChE humana e hipotetizou que ambas as enzimas apresentam diferenças significativas nos resíduos próximos na entrada da gorge.

O gráfico de Lineweaver-Burke da cinética enzimática da ChE cerebral e muscular de Zebrafish na presença de fisostigmina mostra diferentes valores para a constante de equilíbrio, para a ligação do inibidor à enzima e ao complexo ES (enzima-substrato), indicando tipo de inibição mista. A ação da fisostigmina na AChE de *Electric eel* mostra o mesmo tipo de inibição (PEROLA et al., 1997).

A ChE cerebral e muscular de Zebrafish adulto apresentaram valores similares para K_m^{app} (0.191 ± 0.024 e 0.230 ± 0.030 mM, respectivamente) e diferentes valores de V_{max}^{app} (0.556 ± 0.028 e 0.677 ± 0.039 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹, respectivamente).

Valbonesi et al. (2011) observaram um padrão semelhante para os parâmetros cinéticos da ChE cerebral e muscular de *Anguilla Anguilla*. Como mostra a Tabela 3, a ChE cerebral de Zebrafish apresentou K_m próximo ao valor de AChE cerebral de *Carassius auratus*, que também é da família Cyprinidae. A constante cinética K_m para AChE humana é de 0.16 mM (COCHRAN et.al, 2011), que é próximo ao valor de K_m obtido para ChE cerebral de Zebrafish.

Bertrand et al. (2001) relataram um valor de K_m para AChE a partir de extratos de todo corpo do Zebrafish (K_m de 0.23 mM) que está próximo do valor de K_m encontrado neste trabalho. Eles também descrevem a predominância de formas assimétricas juntamente com formas G4 nos tecidos musculares de Zebrafish e em tecidos cerebrais predomina a forma G2 e tetrâmeros anfifílicos. Os vertebrados possuem diferentes isoformas de AChE, denominadas AChE_R, AChE_H e AChE_T, presentes em diferentes tecidos. Em todas essas formas, o domínio catalítico é conservado, mas está associado aos peptídeos de C-terminais distintos (MASSOULIÉ et al., 2005).

A inibição pelo substrato acetilcolina é uma característica comum das AChEs. Em concentrações mais altas, a inibição pelo substrato é observada (JOHNSON et al., 2003). Neste estudo, a ChE cerebral e muscular seguiram o mesmo padrão inibitório. Estudos estruturais com AChE de *Torpedo californica* mostram dois mecanismos inibitórios distintos para concentrações moderadas e altas de substrato (COLLETIER et al., 2006). Sob graus

moderados de inibição do substrato, a acetiltiocolina liga-se ao topo do gorge impedindo a saída rápida da colina. Sob altas concentrações de substrato, a presença de substrato impede a liberação de moléculas de acetato do sítio ativo.

As revelações de SDS-PAGE obtidas de extrato cerebral de Zebrafish apresentaram um perfil semelhante ao relatado por Begam Shamshad et al. (2016) que também fez SDS-PAGE com extrato cerebral de Zebrafish, incluindo bandas em torno de 60 kDa, que é típico para AChEs de peixes. Bandas em torno de 50-75 kDa foram observadas no extrato muscular de Zebrafish. As mesmas bandas também foram observadas na ChE do cerebelo humano (Yang et al., 2013), AChE de *Schizaphis graminum* (Gao ; Zhu, 2001) e na AChE cerebral de *Bactrocera dorsalis* (Hsiao et al., 2004). O tecido cerebral e muscular mostraram perfis distintos das bandas ativas da colinesterase quando o gel nativa foi corado com DTNB na presença do substrato ACTh. O tecido cerebral apresentou uma única faixa ativa de colinesterase, enquanto o tecido muscular apresentou duas bandas ativas de colinesterase. Como o extrato livre de células musculares de Zebrafish apresentou atividades de AChE e BuChE, as bandas ativas podem estar associadas às duas colinesterases.

4.4 Conclusão

Os resultados de inibidores seletivos indicam que a AChE é a principal colinesterase presente no cérebro de Zebrafish adulto, enquanto que em seu tecido muscular a AChE e a BuChE parecem estar presentes. A colinesterase muscular apresenta maior sensibilidade à fisostigmina do que a AChE cerebral, confirmando a possibilidade de diferença molecular entre as colinesterases presentes nos tecidos cerebrais e musculares. Neste estudo, a atividade da AChE proveniente do cérebro de Zebrafish apresenta valores de pH, temperatura ótimo e constantes catalíticas para a hidrólise da acetiltiocolina próximos aos valores da AChE humana. Devido à importância de Zebrafish como organismo modelo para estudos em diversas áreas, como biologia e genética de vertebrados, desenvolvimento embrionário, doenças e triagem de fármacos, mais estudos são necessários visando a purificação e caracterização de suas ChEs cerebrais e musculares.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, C.R.D. *et al.* Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Sci. Total Environ.** 441, 141–150, 2012. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.09.058
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA (ABNT), NBR15088. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae), 2016.
- BEGAM SHAMSHAD, S. *et al.* Protein profile in tissues of Zebrafish exposed to deltamethrin. **J. Bio. Innov.** 5, 914–922, 2016.
- BERTRAND, C. *et al.* Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. **J. Biol. Chem.** 276, 464–474, 2001.
- BITZINGER, D. I. *et al.* Species- and concentration-dependent differences of acetyl- and butyrylcholinesterase sensitivity to physostigmine and neostigmine. **Neuropharmacology** 109, 1–6, 2016. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.01.005
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, 1976.
- CEYLAN, H.; ERDOĞAN, O. Cloning, expression, and characterization of human brain acetylcholinesterase in *Escherichia coli* using a SUMO fusion tag. **Turk J Biol.**, 41: 77-87, 2017.
- COCHRAN, R. *et al.* Oxime-assisted Acetylcholinesterase Catalytic Scavengers of Organophosphates That Resist Aging. **Journal of Biological Chemistry** 286(34):29718-24, 2011.
- COLLETIER, J. P. *et al.* Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. **EMBO J.** 25, 2746–2756, 2006.
- Coelho Filho, J. M. J. M. C ; Birks, J. Physostigmine for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database Syst. Rev.** Issue 2, 2001.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88–95, 1961.
- GAO, J. R.; ZHU, K. Y. An acetylcholinesterase purified from the greenbug (*Schizaphis graminum*) with some unique enzymological and pharmacological characteristics. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 31:1095–1104, 2001.
- GOLOMBIESKI, J. I. *et al.* Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Sci. Agric.**, 65: 340-345, 2008.

HSIAO, Y. M. *et al.* Purification and characterization of acetylcholinesterase from oriental fruit fly [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] (Diptera: Tephritidae). **J Agric Food Chem.** 52, 5340–5346, 2004.

JOHNSON, J. L. *et al.* Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. **Biochemistry**, 42: 5438–5452, 2003.

KIM, Y. H. *et al.* Molecular and kinetic properties of two acetylcholinesterases from the Western honey bee, *Apis mellifera*. **PLoS One** 7(11): e48838, 2012.

KOMERSOVÁ, A. *et al.* Why is the hydrolytic activity of acetylcholinesterase pH dependent? Kinetic study of acetylcholine and acetylthiocholine hydrolysis catalyzed by acetylcholinesterase from electric eel. **Z Naturforsch C.**; Sep 25;73 (9-10):345-351, 2018.

MASSOULIÉ, J. *et al.* The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. **Chem. Biol. Interact.** 157–158, 3–14, 2005.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for testing of chemicals 203. Fish, Acute Toxicity Test, 1992.

PEROLA, E. *et al.* Long chain analogs of physostigmine as potential drugs for Alzheimer's disease: new insights into the mechanism of action in the inhibition of acetylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.** 1343, 41–50, 1997.

ROCHA, J. B. T. *et al.* Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. **Acta Neurobiol. Exp.** 53, 431–437, 1993.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G. *et al.* Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 69, 466–471, 2008.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Mar. Environ. Res.** 58, 505–509, 2004.

SABULLAH, M. K. *et al.* The assessment of cholinesterase from the liver of *Puntius Javanicus* as Detection of Metal Ions. **The Scientific World Journal**, 2014.

SAGANE, Y. *et al.* Molecular characterization of maize acetylcholinesterase: a novel enzyme family in the plant kingdom. **Plant Physiol**, 138(3): 1359–1371, 2005.

SCHMIDT, H.R. *et al.* Quaternary and tertiary aldoxime antidotes for organophosphate exposure in a Zebrafish model system. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 284, 197–203, 2015.

SILVA, K. C. *et al.* Kinetic and physicochemical properties of brain acetylcholinesterase from the peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in vitro effect of pesticides and metal ions. **Aquat Toxicol.**, 126:191-7, 2013.

SILVA, J. M. *et al.* In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. **Ecotoxicol. Environ. Contam.** 10, 23–30, 2015.

SHAONAN, L. *et al.* Kinetic characters and resistance to inhibition of crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphates. **Aquat. Toxicol.** 68, 293–299, 2004.

VALBONESI, P. *et al.* Cholinesterase activities and sensitivity to pesticides in different tissues of silver European eel, *Anguilla Anguilla*. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** 154, 353–359, 2011.

VARÒ, I. *et al.* Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 75, 61–72, 2003.

YANG, Y. X. *et al.* Purification and studies on characteristics of cholinesterases from *Daphnia magna*. **J. Zhejiang Univ.-Sci. B**, 14, 325–335, 2013.

5. PURIFICAÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE *DANIO RERIO*

Esta seção objetiva desenvolver um protocolo para purificação de acetilcolinesterase cerebral de Zebrafish e caracterizar por eletroforese ao comparar com AChE de *Electric eel*.

5.1 Materiais e métodos

5.1.1 Reagentes

Ditiotreitol (DTT, $\geq 98\%$), ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, 98%), iodeto de acetiltiocolina (ACTh, 97%), albumina de soro bovino (BSA), dodecil sulfato de sódio (SDS, 99%), sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), AChE de enguia elétrica (*Electric eel*, Tipo VI-S 500U, C3388) e marcador de peso molecular de proteínas (Amersham/RPN756E, GE Healthcare) foram compradas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e usadas como recebidas.

5.1.2 Aclimação dos peixes e preparação do extrato livre de células

Todos os procedimentos utilizados na manutenção e sacrifício dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) [Protocolo nº 42/2017, segue em anexo no Apêndice] da Universidade Federal de Alagoas.

Os Zebrafish (2.5 ± 0.6 cm; 0.9 ± 0.3 g) foram obtidos de uma piscicultura comercial e aclimatados às condições laboratoriais por 7 dias em tanques de 50 L contendo água da torneira desclorada livre de pesticidas, à temperatura ambiente ($26.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$) sob um fotoperíodo de 12 h (SILVA et. al., 2015). A água do tanque foi continuamente aerada de acordo com as especificações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 15088/2016) e normativas da OCDE (203/1992), e os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 48% de proteína bruta, 3 vezes por dia. Depois disso, os peixes foram sacrificados, o tecido cerebral foi removido, imersos em nitrogênio líquido e armazenado a -20°C até serem utilizados para quantificação e purificação.

O extrato livre de células, de 40 cérebros, foi preparado de acordo com Golombieski et al. (2008) com pequenas modificações. O extrato foi preparado com o tampão de suspensão

(20mM Tris-HCl, pH 7.5 com 0.1% de Triton) a uma proporção de 80 mg de tecido:1mL solução e foi homogeneizado em Potter-Elvehjem. Em seguida, o homogenato foi submetido à sonicação (3 ciclos de 15 segundos cada) utilizando um disruptor ultrassônico de células e centrifugação a 10000 x g durante 10 min a 4°C.

5.1.3 Atividade enzimática e concentração proteica

A atividade de ChE foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961). A mistura reacional (1.5 mL) continha tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 8), 0.34 mM de DTNB, 50µL de extrato livre de células diluído e 0.5 mM de substrato (ACTh). A atividade enzimática foi determinada pela verificação da formação do tiolato de DTNB a 412 nm por 3 min utilizando um espectrofotômetro UV/VIS.

A concentração proteica foi determinado de acordo com Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

5.1.4 Precipitação salina

Após o preparo do extrato livre de células mediu-se o volume da amostra para adição de sulfato de amônio de acordo com a tabela 4:

Tabela 4 - Quantidade de sulfato de amônio para precipitação da proteína.

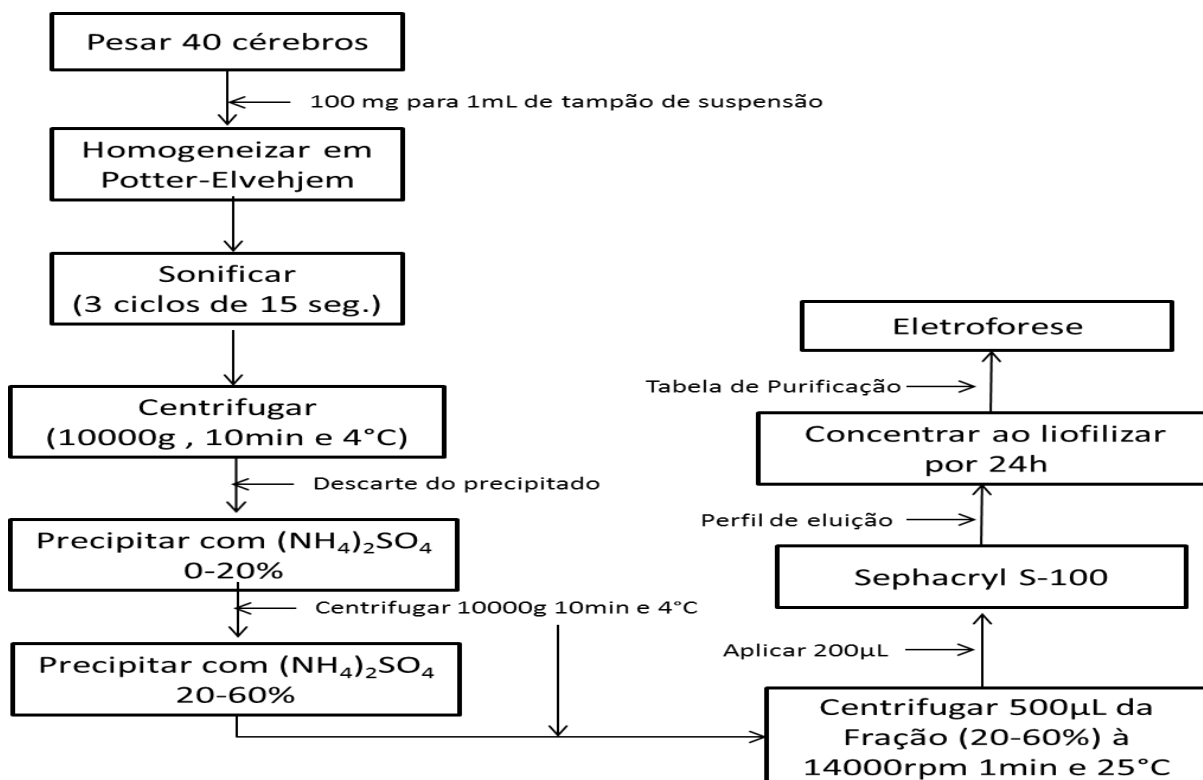
Initial concentration of ammonium sulfate	Percentage saturation at 0°																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 1 liter of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Foi adicionado sulfato de amônio em quantidade proporcional ao fracionamento de 0-20%. O sal foi adicionado lentamente na amostra em banho de gelo até a solubilização, seguido de agitação em banho de gelo por 2 horas. Durante 10 minutos, a amostra foi centrifugada a 10000 x g e 4°C. O sobrenadante (20-100%) foi submetido novamente ao mesmo procedimento para um fracionamento subsequente de 20-60%. O precipitado foi ressuspenso no tampão de suspensão para quantificação proteica e enzimática.

5.1.5 Cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100)

A coluna cromatográfica foi empacotada com a resina Sephacryl S-100 e lavada com 3 volumes de coluna de água deionizada (18 MΩ cm). Equilibrou-se com 3 volumes de coluna com Tris-HCl (20 mM, pH 7.5, com 0.02% de triton X-100) a uma taxa de fluxo de 0.1 mL/min. A coluna foi carregada com 200μL de amostra (volume da resina = 47 mL) previamente submetido a um pico de centrifugação (HT, MCD 2000) de 14000 rpm por 1min à 25°C. A taxa de fluxo foi 0.1 mL/min programado no equipamento AKTA Pure M1 (GE), as proteínas foram identificadas por absorção a 280 nm. Cada tubo coletou 2 mL, totalizando 30 tubos mantidos em banho de gelo. Por fim, as amostras coletadas foi quantificadas para construção do perfil de eluição. As frações que continham maior atividade de AChE foram concentradas ao liofilizar (TERRONI, LS3000) por 24h para posterior identificação das bandas proteicas na eletroforese. O fluxograma abaixo (figura 23) mostra de uma forma resumida, o protocolo usado para purificação de AChE cerebral de Zebrafish.

Figura 23 - Fluxograma do protocolo de purificação de AChE cerebral de Zebrafish.



Fonte: Autor, 2019.

5.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As amostras proteicas concentradas foram submetidas à SDS-PAGE para verificar a presença de bandas correspondentes a proteína de interesse (AChE). O PAGE sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizado utilizando gel de acrilamida 10% com tampão da amostra com 5 mM de DTT, como descrito por Silva et al. (2015) e aplicado uma voltagem de 90 V. Os géis foram corados com a solução Coomassie Brilliant Blue (CBB, G-250). Os pesos moleculares de proteínas foram estimados por comparação com bandas produzidas pelo marcador (RPN756E, Amersham) e AChE de *Electric eel* (enguia elétrica) também foi usada para o padrão de acetilcolinesterase para o SDS-PAGE e nativa.

5.2 Resultados e discussão

Devido ao seu significado biológico, na neurofisiologia e como biomarcador de xenobióticos no meio ambiente, a AChE atrai muita atenção. A sequência traduzida de AChE

de Zebrafish foi 60-80% idêntica a acetilcolinesterases de outros vertebrados (BERTRAND et al. 2001). Como o Zebrafish é um modelo experimental muito promissor, pois além de ter 70% de homologia do genoma humano ainda modela doenças humanas (HOWE et al., 2013; SIMONETTI et al., 2015), este estudo purificou a AChE cerebral de Zebrafish adulto, visto que a AChE é a colinesterase principal presente no cérebro (MARINHO et al., 2019).

O extrato cerebral de zebrafish foi submetido a precipitação salina com sulfato de amônio, pois é um método de solubilidade simples e de baixo custo para a purificação e posteriormente feito cromatografia líquida na coluna Sephacryl S-100. A tabela 5 apresenta o perfil de precipitação salina do fracionamento de 20-60%.

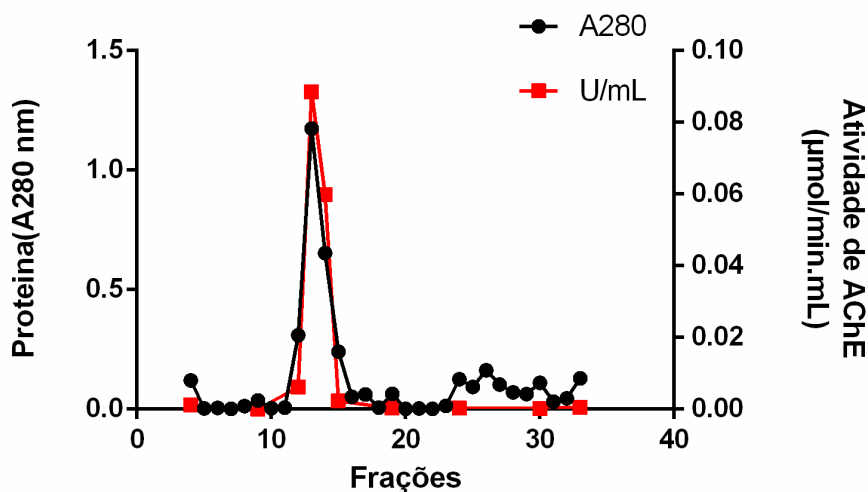
Tabela 5 - Precipitação salina com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do extrato cerebral de Zebrafish.

Solução proteica	Ativ. total (U)	Proteína (mg)	Ativ. Específica (U/mg)*	Fator de recuperação	Recuperação (%)
Ext Bruto	3.43	11.48	0.29	1	100
Fração 20-60%	0.99	3.28	0.30	1.01	64.58

*U = $\mu\text{mol}/\text{min}$

A fração 20-60% apresentou atividade específica de 0.3 U/mg, fator de purificação de 1.01 e 64.5% de recuperação. Esta fração foi aplicada na coluna de gel filtração (Sephacryl S-100) e apresentou perfil de eluição com a formação de apenas um pico, como mostra a Figura 24.

Figura 24 - Perfil de eluição para a cromatografia de AChE cerebral de *Danio rerio* em Sephacryl S-100 (1x60 cm) equilibrado com Tris-HCl (20mM, pH 7.5 com 0.02% de triton) com uma taxa de fluxo de 0.1 mL/min e 2 mL por fração. Absorbância a 280nm (-●-) e atividade AChE (-■-).



Foi possível separar com a coluna Sephacryl S-100 um único pico entre as frações 12 a 15 e com boa resolução por ser um pico estreito. A fração com maior atividade e proteína foi do tubo 13 que permaneceu com atividade específica de 0.92 U/mg, fator de purificação de 3.09 e recuperação de apenas 5.15 %, como apresentado na tabela 6.

Tabela 6 - Dados da purificação de AChE cerebral de Zebrafish.

Solução proteica	Ativ. total (U)	Proteína (mg)	Ativ. Específica (U/mg)*	Fator de recuperação	Recuperação (%)
Ext Bruto	3.43	11.48	0.29	1	100
Fração 20-60%	0.99	3.28	0.30	1.01	64.58
Fração 13	0.17	0.19	0.92	3.09	5.15

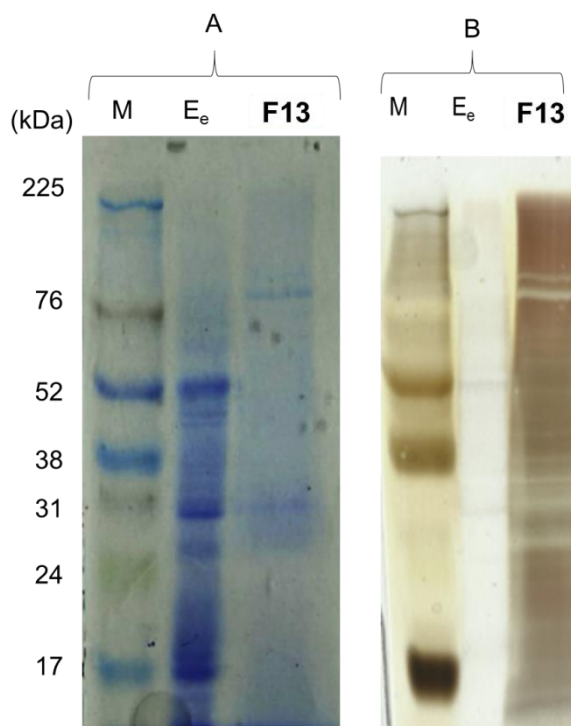
*U = $\mu\text{mol} / \text{min}$

A fração 13 referente ao pico do cromatograma foi aplicada em gel de eletroforese (SDS-PAGE) e apresentou duas bandas, uma de aproximadamente 76 kDa e outra banda difusa na região dos 31 kDa, como ilustrado na figura 25. O gel corados com CBB (figura 25A) exibiram bandas nas mesmas áreas que as bandas reveladas com prata (figura 25B).

Segundo Rosenberry et al. (1974), a AChE de enguia elétrica (*Electric eel*) é um tetrâmero composto de subunidades com pesos moleculares de 70 kDa. As subunidades contêm um sítio ativo e são idênticas, exceto pela variabilidade dos locais de clivagem. Os padrões de bandas polipeptídicas resultante da SDS-PAGE após a redução com DTT resultam em 4 polipeptídeos que surgem da fragmentação de uma cadeia polipeptídica única e diminuem em peso molecular de 75 a 23 kDa. Como mostrados na figura 24A (Ee), a variação aparente no peso molecular da AChE (peso molecular de 52 a 17 kDa) foi devido a autólise ou proteólise que pode dar origem a diferentes tamanhos de subunidades e os polipeptídeos menores derivam da clivagem de uma única subunidade de 70 kDa (CHEN et al., 1974).

As bandas observadas da AChE cerebral de Zebrafish (F13), de 76 e 31 kDa, foram próximas as bandas apresentadas por Rosenberry et al. (1974), na qual apresenta na SDS-PAGE com uso de DTT, 4 bandas da AChE de enguia elétrica (23, 27, 50 e 75 kDa).

Figura 25 - Eletroforese SDS-PAGE a 10%. Gel corado com: Comassie (A) e com prata (B). As canaletas abaixo: (M) Marcador, (E_e) 25 µg da enzima de enguia elétrica e (F13) 15 µg da fração correspondente do extrato cerebral purificado de Zebrafish.



A tabela 7 mostra dados da literatura com a faixa de massa molecular de 60 a 85 kDa para colinesterases purificadas de diferentes tecidos e espécies, acredita-se que a banda (76 kDa) observada na SDS-PAGE (figura 24A) seja a subunidade representativa da AChE cerebral de Zebrafish, pois essa massa é consistente com os valores apresentados na tabela 7.

Tabela 7- Massa molecular de subunidades de AChE de diferentes fontes.

Espécie	Fonte	Massa molecular da subunidade (kDa)	Referências
<i>Aphis gossypii</i>	Corpo todo	63.5	Li ; Han, 2002
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Cérebro	61	Hsiao et al. 2004
<i>Homo sapiens</i>	Cerebelo	67	Zhang et al., 1999
<i>Homo sapiens</i>	Eritrócito	70	Kaya et al., 2013
<i>Scomberomorus niphonus</i>	Cérebro	85	Zhu et al., 2006
<i>Prochilodus brevis</i>	Cérebro	67	Leoncini et al., 2016
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Corpo todo	68	Mohamed et al. 2016
<i>Clarias batrachus</i>	Cérebro	74	Perumal, 2006
<i>Japanese quail</i>	Cérebro	62.5	Son et al. 2002

5.3 Conclusão

Os resultados apresentam que a purificação de AChE cerebral de Zebrafish obteve fator de recuperação de 3.09 e uma subunidade representativa de 76 kDa, próximo a banda específica para colinesterases de outros vertebrados. Devido à importância de Zebrafish como modelo experimental em diferentes áreas, mais estudos são necessários visando a caracterização da AChE cerebral purificada.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA (ABNT), NBR15088. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae), 2016.
- BERTRAND, C., *et al.* Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. **J. Biol. Chem.** 276, 464–474, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, 1976.
- CHEN, Y. T. *et al.* Subunit heterogeneity of acetylcholinesterase. **Arch Biochem Biophys.**, 161(2):479-87, 1974.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88–95, 1961.
- GOLOMBIESKI, J. I. *et al.* Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Sci. Agric.**, 65: 340-345, 2008.
- HOWE, K., *et al.* The Zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature** 496, 498–503, 2013
- HSIAO, Y. M. *et al.* Purification and characterization of acetylcholinesterase from oriental fruit fly [*Bactrocera dorsalis* (Hendel)] (Diptera: Tephritidae). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 5340–5346, 2004.
- KAYA, H. B. *et al.* Purification of acetylcholinesterase by 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine from Human Erythrocytes. **Appl Biochem Biotechnol**, 170:198-209, 2013.
- LEONCINI, G. O. **Purificação parcial de colinesterase de *Prochilodus brevis* para emprego biotecnológico.** Dissertação – Universidade Federal de Alagoas, 2016.
- LI, F.; HAN, Z. Purification and Characterization of Acetylcholinesterase From Cotton Aphid (*Aphis gossypii* Glover). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 51:37–45, 2002.
- MARINHO, C. S., *et al.* Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 222:11-18, 2019.
- MOHAMED, M. A. *et al.* The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 180 11–22, 2016.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for testing of chemicals 203. Fish, Acute Toxicity Test, 1992.

PERUMAL, N. **Purification and characterization of acetylcholinesterase from *Clarias batrachus* and *Oreochromis mossambica* brain tissues.** Thesis - Universiti Putra Malaysia, 2006.

ROSENBERRY, T. L. Structure of 1 IS Acetylcholinesterase. Subunit Composition. **Biochemistry**, v. 13:15, 1974.

SILVA, J. M. *et al.* In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. **Ecotoxicol. Environ. Contam.** 10, 23–30, 2015.

SIMONETTI, R. B., *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*): the future of animal model in biomedical research. **Journal of Fisheries Sciences**, 9, 039–045, 2015.

SON, J. Y. *et al.* Purification of soluble acetylcholinesterase from Japanese quail brain by affinity chromatography. **Int J Biochem Cell Biol.**, 34(2):204-10, 2002.

WENK, M. R.; FERNANDIS, A. Z. Manuals in biomedical research: a manual for biochemistry protocols Vol. 3. **World Scientific Publishing Co.** Pte. Ltd. Singapore. p 2-7, 2007.

ZHANG, X. *et al.* A preliminary study of the purification acetylcholinesterase from human cerebellum by immuno-affinity chromatography. **J. First Mil. Med. Univ.**, 19(2):165-167 (in Chinese), 1999.

ZHU, X. S. *et al.* Purification and partial biochemical characterization of acetylcholinesterase from *Scomberomorus Nipponius* (Cuvier). **J. Qingdao Univ.**, 21(2):35-40 (in Chinese), 2006.

6. EFEITO DA NANOPARTÍCULA DE PRATA EM DIFERENTES TECIDOS DE *DANIO RERIO*

Este capítulo objetivou avaliar a ecotoxicidade da suspensão de nanopartícula de prata através de efeitos sub-letais utilizando como organismo alvo Zebrafish (*Danio rerio*) avaliando alterações em biomarcadores enzimáticos e histológicas.

6.1 Materiais e métodos

6.1.1 Reagentes

Iodeto de acetiltiocolina (ACTh; 97%), ácido 5.5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB; 98%), albumina de soro bovino (BSA; 98%), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 35%), borohidreto de sódio ($NaBH_4$), nitrato de prata ($AgNO_3$) e polivinilpirrolidona (PVP, WT 10000) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA) e usado como recebido.

6.1.2 Síntese e caracterização da AgNP

Para evitar que qualquer sujeira possa servir como local de nucleação e promover a agregação de NPs, todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com potassa alcoólica. A síntese da AgNP, por método frio, consistiu em: 75 mL de borohidreto de sódio (2mM), resfriado por 15min em banho de gelo e no escuro, em seguida 25 mL de nitrato de prata (1mM) foi adicionado gota a gota no borohidreto, finalizando com a adição de 7mL de PVP (0.3% m/v) e deixado agitar por mais 30min ainda no banho de gelo.

A caracterização qualitativa dos AgNPs foi realizada no espectrofotômetro (UV-Vis, Perkin Elmer, modelo Lambda 2) numa varredura entre 200-800nm. Depois disso, a solução da AgNP sintetizada foi centrifugada e o AgNP precipitada foi ressuspensa com água deionizada em banho ultrassônico e o procedimento foi repetido por mais duas vezes para lavagem completa das NPs e remoção de qualquer produto solúvel. Assim, qualquer produto restante de prata solúvel na suspensão é considerado desprezível.

A concentração da suspensão de AgNP foi determinada usando um Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial da marca Spectro, modelo Arcos).

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizado para caracterização do diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta (ζ) da AgNP sintetizada foi realizado usando o Zetasizer (Malvern Instruments). A forma e o tamanho das partículas foram determinados pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), que analisou utilizando o Tecnai G2 Spirit TWIN. As medições de partículas foram realizadas no programa ImageJ com uma média de pelo menos 200 contagens

6.1.3 Obtenção da espécie e aclimação

Todos os procedimentos utilizados na manutenção e sacrifício dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) [Protocolo nº 42/2017, segue em anexo no Apêndice] da Universidade Federal de Alagoas. A aclimação e o ensaio toxicológico foram realizados de acordo com as especificações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 15088/2016) e normativas da OCDE (203/1992).

Os zebrafish (2.5 ± 0.6 cm; 0.9 ± 0.3 g) foram obtidos de uma piscicultura comercial e aclimatados às condições laboratoriais por 15 dias em tanques de 100 L contendo água da torneira desclorada livre de pesticidas, continuamente aerada, à temperatura ambiente ($26.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$) e sob um fotoperíodo de 12 h (SILVA et. al., 2015). Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 48% de proteína bruta, 3 vezes por dia.

6.1.4 Ensaio de toxicidade sub-letal

Após a aclimação, os peixes foram transferidos para os aquários de 20L (volume útil de 8 L) e distribuídos em quatro grupos de dez animais cada, de acordo com a concentração de AgNP (0, 1, 3, 5 $\mu\text{g L}^{-1}$), em triplicata. Não houve renovação da água do aquário, afim de se avaliar o efeito natural causado apenas com a exposição inicial da AgNP. Após 96 h de exposição, os peixes foram sacrificados; cérebro, músculo, fígado e brânquia foram removidos, imersos em nitrogênio líquido e armazenados no freezer a -20°C até serem necessários para ensaios enzimáticos.

6.1.5 Atividade de acetilcolinesterase

Os extratos livre de células, de cérebro e músculo foram preparados de acordo com Golombieski et al. (2008) com pequenas modificações. O tecido foi suspenso em 150 mM de cloreto de sódio a uma proporção de 80 mg de tecido:1mL solução e foram homogeneizados em Potter-Elvehjem. Em seguida, os homogenatos foram submetidos à sonicação (5 ciclos de 15 segundos cada) utilizando um disruptor ultrassônico de células (ThermoFisher Scientific, modelo D100, Waltham). No caso do extrato muscular, o mesmo procedimento acima foi realizado com duas etapas adicionais: a. antes de homogeneizar em Potter, o tecido foi macerado em um almofariz. b. Após a etapa de sonicação, o extrato livre de células foi centrifugado (Sigma model 3K30, Osterode, Alemanha) a 10000 g durante 10 min a 4°C.

A atividade de AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961). A mistura reacional (1.5 mL) continha tampão de potássio (0.1 M, pH 8.0), 0.34 mM de DTNB, 50 µL do extrato diluído e 0.5 mM de substrato ACTh. A atividade enzimática foi determinada pela verificação da formação do tiolato de DTNB a 412 nm por 3 min, utilizando um espectrofotômetro UV/VIS (Perkin Elmer, modelo Lambda 2).

6.1.6 Atividade de catalase

Os tecidos hepáticos e de brânquias foram homogeneizadas em Potter-Elvehjem com tampão de fosfato de potássio (20 mM, pH 7.4 com 0.1% de Triton X-100 e 150 mM NaCl) em uma proporção de 1 g de tecido por 20 mL de tampão. O homogenato foi então centrifugado (Sigma modelo 3K30) a 10000 x g durante 10 min a 4 ° C. A atividade da CAT foi determinada no espectrofotômetro a 240 nm de acordo com Miron et al. (2008). A mistura reacional (3 mL) continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7.0), 7.2 mM de H₂O₂ e 72 µL do extrato diluído. A atividade da CAT foi calculada em termos de µmol H₂O₂ consumido / min / mg de proteína.

6.1.7 Concentração proteica

A concentração proteica foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.1.8 Estudo histopatológico

Após o sacrifício dos peixes, tecidos de brânquias (n=5), do grupo controle ($0 \mu\text{g L}^{-1}$) e do grupo com AgNP ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) foram coletados e colocados em 10% formalina, imediatamente. As amostras foram desidratadas e embebidas em parafina. Foram feitos cortes de $5 \mu\text{m}$ no micrótomo e em seguida foram corados em hematoxilina-eosina (HE). As alterações induzidas pela AgNP foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico (Labomed Lx400).

6.1.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância one-way (ANOVA) no GraphPad 6. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett e expressas como média \pm desvio padrão. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

6.2 Resultados e discussão

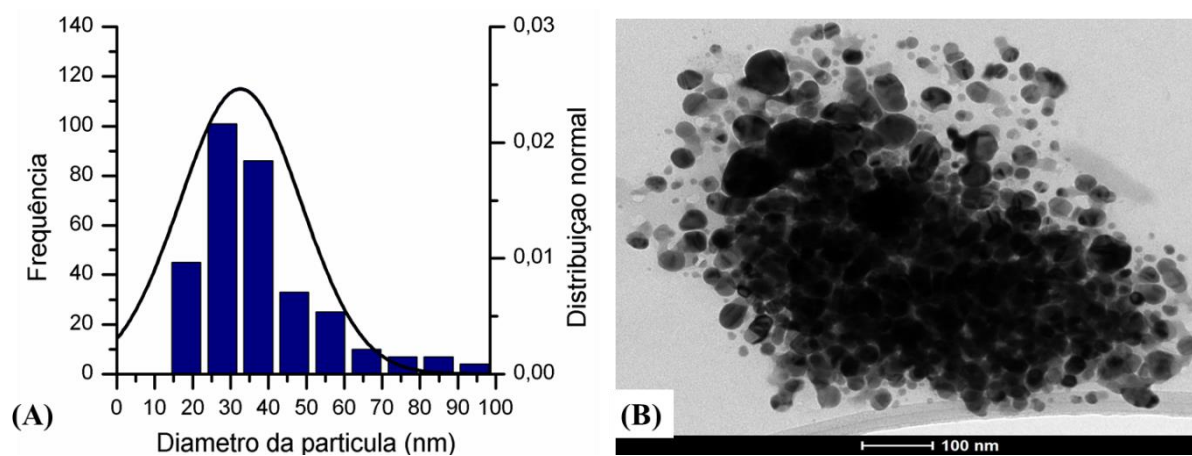
A caracterização das NPs é importante pois seu comportamento e efeito no ambiente são regidos por suas propriedades intrínsecas. O espectro da AgNP sintetizada exibiu absorvância máxima (λ_{max}) à 400 nm, indicando a formação das AgNPs na suspensão. A concentração total de prata da suspensão de AgNP determinada pelo ICP OES foi de 6.5 mg L^{-1} .

O diâmetro médio do AgNP (DLS) da suspensão foi de 98 nm e, de acordo com o MET, a maior frequência observada para o tamanho nominal da AgNP foi de aproximadamente 30 nm (figura 26A), menor que o obtido na medição do DLS. Esses resultados podem estar relacionados ao fato de que o DLS fornece o tamanho hidrodinâmico

de qualquer substância em fase de solução, enquanto o MET oferece o tamanho em condições secas (SHARMA; ILANCHELIAN, 2014). A imagem MET (figura 26A) indica a forma esférica da AgNP.

O potencial zeta foi de -26,8 mV, esse potencial indica que a AgNP foi estabilizada através da repulsão estérica causada pela camada do polímero (PVP) na superfície da NP. Valor semelhante também foi relatado por Tejamaya (2014) e sugeriu que esse valor se deve a um revestimento de PVP espesso. A AgNP revestida por esse polímero é mais estável em solução do que as NPs revestidas com outra substância, como o citrato (FARKAS et al., 2011). O efeito toxicológico da AgNP sintetizada no Zebrafish adulto após 96 horas de exposição não causou mortalidade dos peixes e nem mudanças no comportamento, na natação e fluutuabilidade.

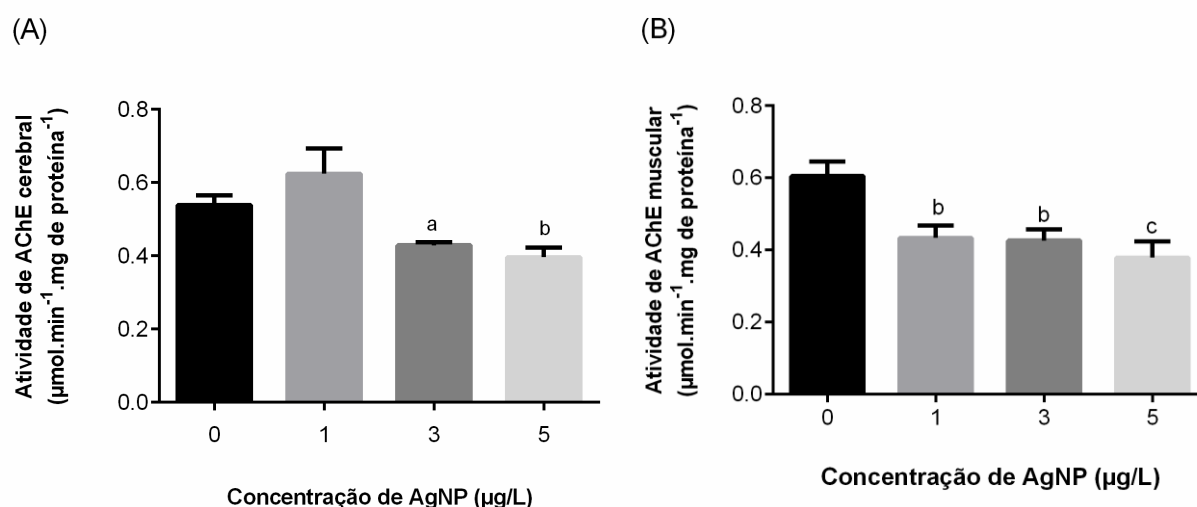
Figura 26 - Caracterização da suspensão de AgNP. (A) Diagrama da frequência e distribuição normal da contagem das partículas. (B) Imagem da microscopia eletrônica de transmissão apresentando a morfologia da AgNP.



Como a AChE regula os níveis do neurotransmissor acetilcolina nos vertebrados (LIONETTO et al. 2013), as alterações da atividade enzimática da AChE podem alterar muitas funções fisiológicas em organismos aquáticos, como locomoção e orientação (ZHANG et al. 2017). Este estudo quantificou e comparou pela primeira vez a atividade da AChE no tecido cerebral e muscular do Zebrafish adulto após exposição a diferentes concentrações de AgNP (figura 27). Comparado ao controle, foi observada uma diminuição significativa (20.4 e 26.4%) na atividade cerebral de AChE para as concentrações de 3 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de AgNP, respectivamente, como mostra a figura 27A. Para a atividade da AChE muscular, houve diminuição significativa (28.3, 29.5 e 37.3%) para todas as concentrações testadas (1, 3, 5 μg

L^{-1}), respectivamente, como mostra a Figura 27B. Estes resultados mostram que a AChE muscular foi mais inibida pela AgNP que a AChE cerebral. Isso pode estar relacionado ao fato do músculo ser um tecido exposto diretamente ao meio do que o cérebro que é protegido pela barreira hematoencefálica.

Figura 27 - Atividade específica de AChE cerebral (A) e muscular (B) de Zebrafish após exposição à diferentes concentrações de AgNP por 96 h. As letras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.



Alguns estudos indicam que o potencial tóxico da AgNP pode ser atribuído pelo efeito da composição química (liberação de íons Ag^+) ou pelo efeito desencadeado da morfologia das NPs. No entanto, alguns autores sugerem diferenças no mecanismo inibitório da AChE na presença de Ag^+ livre e AgNP. No caso da prata livre (Ag^+), o mecanismo pode ser descrito como inibição irreversível do tipo misto (VINKOVIĆ VRČEK; ŠINKO, 2013), enquanto as AgNPs podem causar inibição reversível (ŠINKO et al., 2014). Gagné et al. (2012) revelaram que a toxicidade da AgNP e Ag^+ também possui diferentes tipos de ação. A Ag^+ envolve a mobilização de metais e causa estresse oxidativo, enquanto a AgNP pode envolver outras vias metabólicas, incluindo inflamação e desnaturação de proteínas.

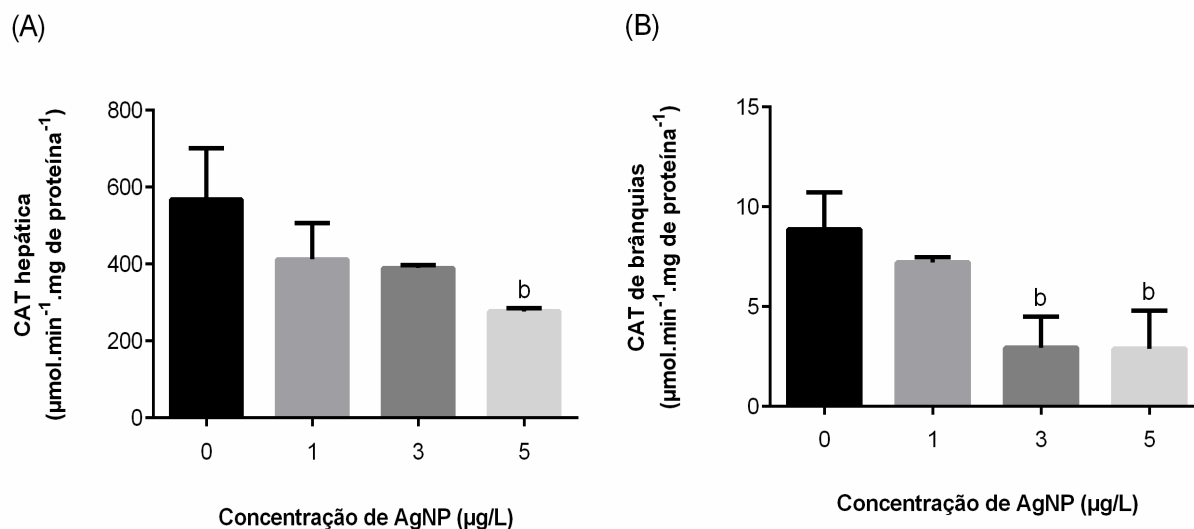
Os efeitos inibitórios de outras nanopartículas metálicas foram descritos na atividade da AChE em peixes. Ng et al. (2019) observaram diminuição da atividade da AChE no cérebro de *Oryzias latipes* quando expostas a nanopartículas de dióxido de chumbo (PbO_2 NP) por 7 dias e especularam que diferentes tamanhos de NPs estão envolvidos em complexa biointeração com a enzima. Eles também concluíram que o PbO_2 NP pode afetar o mecanismo cinético e dinâmico nos corpos dos peixes, causando efeitos de neurotoxicidade. Ghais et al.

(2019) também relataram diminuição da atividade da AChE em diferentes tecidos de *Oreochromis mossambicus* expostos a nanopartículas de cobre (15 mg L^{-1}) por 6 dias e concluíram que as NPs causavam alterações na homeostase e efeitos deletérios. Liu et al (2017) relataram que *Carassius Carassius* exposto por mais de 6 dias a nanopartículas metálicas, diminuiu a atividade da AChE no cérebro e sugeriu que as NPs podem estar reduzindo a síntese da AChE nos neurônios, consequentemente obtendo acumulação do neurotransmissor na fenda sináptica e causando efeitos neurotóxicos.

Embora, o mecanismo de inibição das esterases pelo AgNP não seja totalmente elucidado. Estudos *in vitro* indicaram possíveis mecanismos inibitórios para a AChE. Wang et al. (2009) mostraram que diferentes nanopartículas metálicas causaram variações na atividade da AChE e sugeriram que a inibição enzimática se deve à adsorção ou interação da enzima com a nanopartícula. A AgNP proveniente de síntese verde pode causar neurotoxicidade devido a um efeito inibitório na atividade da AChE (IC_{50} de 150 nM), mostrando um tipo misto de inibição. O estudo cinético mostrou que as AgNPs foram capazes de se ligar à enzima livre (AChE), bem como ao complexo enzima-substrato (KHATOON et al. 2018). Por outro lado, como já mencionado, outro estudo observou inibição reversível da AChE por AgNPs sintetizados quimicamente (ŠINKO et al. 2014). Estudos de dicroísmo circular em moléculas de BuChE e sua interação com a AgNP observaram distúrbios estruturais e alterações conformacionais, levando a uma possível desnaturação parcial da enzima (ŠINKO et al., 2014).

A catalase é a enzima chave no sistema de defesa antioxidante em tecidos como o fígado. No presente estudo, foram observadas as atividades de CAT no fígado e nas brânquias de Zebrafish após exposição a diferentes concentrações de AgNP por 96 h (figura 28). Comparado ao controle, uma redução significativa na atividade hepática (51.2%) foi observada apenas na concentração mais alta usada no ensaio de exposição ($5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ AgNP), como mostra a figura 28A. Enquanto, a atividade de CAT na brânquia apresentou uma diminuição significativa nas concentrações de exposição de 3 e $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNP (66.8% e 67.4%, respectivamente), como mostra a figura 28B. Esses resultados mostram que a CAT branquial foi mais inibida pela AgNP que a CAT hepática, devido ao fato das brânquias terem contato direto com o ambiente aquático.

Figura 28 - Atividade específica de CAT hepática (A) e CAT de brânquias (B) de Zebrafish após exposição à diferentes concentrações de AgNP por 96 h. A letra indica diferença significativa ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.



Alguns estudos também destacam efeitos inibitórios de outras nanopartículas metálicas na atividade de CAT de peixes. Karthigarani e Navaraj (2012) reportaram que *Oreochromis Mossambicus* exposto à 100 mg L⁻¹ de TiO₂ NPs causou uma redução significativa na atividade da CAT em diferentes tecidos e sugeriu que houve estresse oxidativo, devido a possível acúmulo de ERO'S e inibição da enzima. Valerio-García et al. (2017) revelaram que as AgNPs produziram estresse oxidativo em *Chapalichthys pardalis* após 21 dias de exposição, evidenciado por uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes e que as NPs também diminuíram os níveis de macromoléculas.

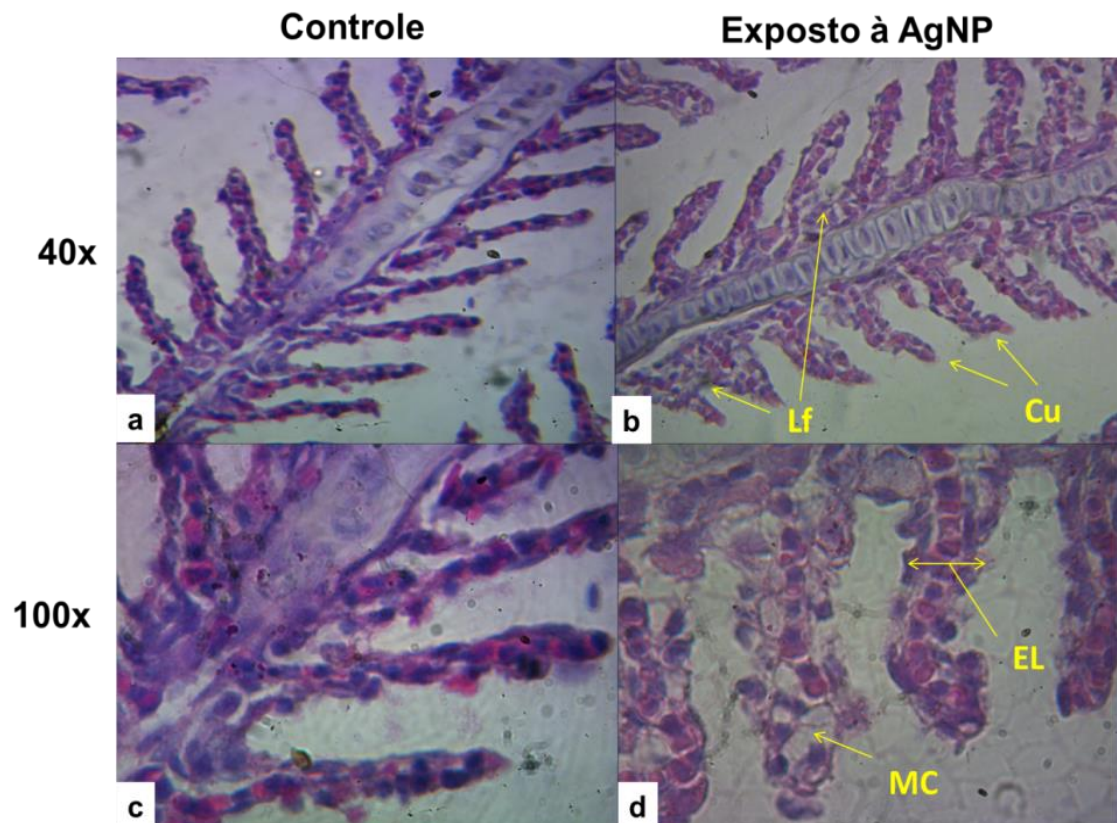
Estudos *in vitro* revelam que AgNPs causam estresse oxidativo em células de peixes pelo aumento dos níveis de ERO'S e redução das atividades de enzimas antioxidantes (ROSARIN et al., 2012). Estudo de difração circular avaliou o efeito de AgNP na catalase e observou uma diminuição na quantidade de α -hélice e aumento na estrutura da β -folha, levando à perda da estrutura do esqueleto e à exposição dos aminoácidos de anel aromático hidrofóbico interno a solução (ZHANG et al. 2015).

Em geral, o tamanho da nanopartícula influencia a absorção de proteínas, levando a uma maior perturbação estrutural que causa alterações na função da proteína (VERTEGEL; SIEGEL; DORDICK, 2004).

As brânquias participam de muitas atividades fisiológicas, incluindo excreção de metabólitos, equilíbrio da permeabilidade aos fluidos corporais e regulação do equilíbrio ácido-base. No presente estudo, a figura 29 mostra a morfologia das brânquias de Zebrafish

na ausência e presença de AgNP. O grupo controle mostrou uma morfologia branquial normal, onde foram observados os filamentos branquiais suportados internamente por elementos esqueléticos e a lamela branquial revestida com um epitélio pavimentado simples e uma rica rede capilar (Figura 4 a, c). Por outro lado, peixes expostos a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de AgNP mostraram alterações na morfologia branquial, como fusão na lamela secundária (Lf), curvatura (Cu), canal marginal dilatado (MC) e elevação epitelial (EL) pelo acúmulo de líquido intersticial (Figura 4 b, d). As alterações morfológicas observadas nas lamelas branquiais do Zebrafish podem afetar as trocas gasosas e iônicas, e o aumento das células mucosas no epitélio pode comprometer a autodefesa dos peixes. Essas alterações também podem ser devidas a uma resposta de adaptação dos peixes para impedir a entrada de poluentes na superfície branquial e a permeabilidade capilar pode ser responsável por alterações patológicas (OLURIN et al., 2006). Subashkumar e Selvanayagam (2014) demonstraram que a fusão da lamela secundária pode causar uma diminuição na captação de oxigênio para atividades metabólicas.

Figura 29. Fotomicrografias representativas da brânquias de Zebrafish do grupo controle (a) e (c), indicando histologia normal e do grupo exposto a $5\mu\text{g L}^{-1}$ de AgNP (b) e (d), na objetiva de 40x e 100x, respectivamente. Peixes expostos a AgNP apresentou alterações na morfologia branquial, como fusão na lamela secundária (Lf), curvatura (Cu), canal marginal dilatado (MC) e elevação epitelial (EL).



Alguns autores também relatam os efeitos de diferentes NPs metálicos nas brânquias de peixes. Rahmani et al. (2016) mostraram que Zebrafish exposto a diferentes concentrações de dióxido de titânio NP apresentou patologias nas brânquias, como hiperplasia, edema, curvatura, fusão de lamelas, aumento da secreção mucosa. *Oreochromis mossambicus* exposto à Níquel NP mostrou hiperplasia no epitélio branquial, fusão lamelar de lamelas secundárias, canal marginal dilatado, elevação epitelial e ruptura epitelial na morfologia branquial (JAYASEELAN et al. 2014). Aghamirkarimi et al. (2017) relataram que os tecidos branquiais de *Rutilus caspicus* exibiram uma redução no comprimento das lamelas secundárias e degeneração dos tecidos epiteliais, após exposição à NP de cobre. Zebrafish exposto à suspensão de nanocobre (0.25 mg L^{-1}) apresentou danos nas lamelas branquiais por proliferação de células epiteliais, bem como edema de filamentos branquiais primários e secundários após 48 horas de exposição (GRIFFITT et al. 2007).

Estudo com concentrações mais altas de AgNP (10 e $25 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) que o presente estudo, apresentou acúmulo de prata no tecido branquial de *Piaractus mesopotamicus* seguindo um padrão de resposta dependente da dose (BACCHETTA et al. 2017). O acúmulo de NPs na brânquia está relacionado à adsorção nas superfícies epiteliais da brânquia, dependendo do tempo de exposição, concentração e tamanho da NP (KAYA et al., 2015).

6.3 Conclusão

Este estudo mostra o efeito toxicológico de baixas concentrações (inferiores a $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) de AgNP em Zebrafish, induzindo danos subletais a nível molecular, como inibição da acetilcolinesterase e catalase em diferentes tecidos, juntamente com alterações morfológicas na brânquia. Embora a acetilcolinesterase e a catalase tenham sido inibidas pela AgNP, o efeito inibitório foi maior na catalase branquial, indicando o potencial dessa enzima como biomarcador de AgNP. Esses achados também destacam a toxicidade das nanopartículas para organismos aquáticos e possivelmente para a saúde humana, devido ao fato que a espécie estudada apresenta cerca de 70% de homologia com o genoma humano.

REFERÊNCIAS

- AGHAMIRKARIMI, S. *et al.* Sublethal effects of copper nanoparticles on the histology of gill, liver and kidney of the Caspian roach, *Rutilus rutilus caspicus*. **Global J. Environ. Sci. Manage**, 3(3): 323-332, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA (ABNT), NBR15088. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae), 2016.
- BACCHETTAA, C. *et al.* Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles. **Ecological Indicators**, 76:230–239, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, 1976.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88–95, 1961.
- FARKAS, J. *et al.* Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 117–125, 2011.
- GHAIS, A. S. *et al.* Effect of copper nanoparticles and organometallic compounds (dibutyltin) on tilapia fish. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, 80:32, 2019.
- GAGNÉ, F. *et al.* Toxicity of silver nanoparticles to rainbow trout: A toxicogenomic approach. **Chemosphere**, 89:615–622, 2012.
- GOLOMBIESKI, J. I. *et al.* Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Sci. Agric.**, 65: 340-345, 2008.
- GRIFFITT, R. J. *et al.* Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in Zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Sci. Technol.** 41:23, 8178-8186, 2007.
- JAYASEELAN, C. *et al.* Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 107:220–228, 2014.
- KAYA, H. *et al.* Effects of zinc oxide nanoparticles on bioaccumulation and oxidative stress in different organs of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 40:936–947, 2015.
- KARTHIGARANI, M.; NAVARAJ, PS. Impact of Nanoparticle On Enzymes Activity In *Oreochromis Mossambicus*. **International journal of scientific ; technology research**, v 1:10, 2012.
- KHATOON, A. *et al.* Silver nanoparticles from leaf extract of *Mentha piperita*: Eco-friendly synthesis and effect on acetylcholinesterase activity. **Life Sciences**. V. 209, p 430-434, 2018.

LIONETTO, MG. *et al.* Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. **BioMed Res. Int.**, article id 321213, 2013.

LIU, Y. Potential Toxicity in Crucian Carp Following Exposure to Metallic Nanoparticles of Copper, Chromium, and Their Mixtures: A Comparative Study. **Pol. J. Environ. Stud.**, 26(5):2085–2094, 2017.

MIRON, D. S. *et al.* Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**. 74 (1–5), 2008.

NG, D. Q. *et al.* In vivo evidence of intestinal lead dissolution from lead dioxide (PbO₂) nanoparticles and resulting bioaccumulation and toxicity in medaka fish. **Environmental Science: Nano**, 6, 580-591, 2019.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for testing of chemicals 203. Fish, Acute Toxicity Test, 1992.

OLURIN, B. *et al.* Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate. **African Journal of Biotechnology**. 5:2480-2487, 2006.

RAHMANI, R. *et al.* Histopathological alterations in the gill of Zebrafish (*Danio rerio*) exposed to Cr and Ba doped TiO₂ nanoparticles. **AAFL Bioflux**, v 9:4, 2016.

ROSARIN, F. S. *et al.* Antiproliferative effect of silver nanoparticles synthesized using amla on Hep2 cell line. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, 1–10, 2012.

SILVA, J. M. *et al.* In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. **Ecotoxicol. Environ. Contam.** 10, 23–30, 2015.

SHARMA AS, ILANCHELIAN M. Elucidation of photophysical changes and orientation of Acridine orange dye on the surface of borate capped gold nanoparticles using multispectroscopic techniques, **Photochem. Photobiol. Sci.** 13, 1741–1752, 2014.

ŠINKO, G. *et al.* Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. **Environ Sci Pollut Res**, 21:1391–1400, 2014.

SUBASHKUMAR, S.; SELVANAYAGAM, M. First report on: Acute toxicity and gill histopathology of fresh water fish *Cyprinus carpio* exposed to Zinc oxide (ZnO) nanoparticles. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 4, n. 3, p. 10–13, 2014.

TEJAMAYA, M. **Synthesis, characterization and stability test of silver nanoparticles in ecotoxicology media.** Thesis - University of Birmingham, 2014.

VALERIO-GARCÍA, R. C. *et al.* Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. **Science of the Total Environment**, 583: 308–318, 2017.

VERTEGEL, A.A., SIEGEL, R.W., DORDICK, J.S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. **Langmuir** 20, 6800–6807, 2004.

VINKOVIĆ VRČEK, I.; ŠINKO, G. Inactivation of cholinesterases by silver and gold ions in vitro. **Cent Eur J Chem**, 11:935–944, 2013.

WANG, Z. *et al.* Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. **Chemosphere**, 77 67–73, 2009.

ZHANG, B. *et al.* Evaluation on the Toxic Effects of NanoAg to Catalase. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.15, 1473–1479, 2015.

ZHANG, T. *et al.* Does time difference of the acetylcholinesterase (AChE) inhibition in different tissues exist? A case study of zebra fish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and deltamethrin. **Chemosphere**, 2017.

7. AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DE TECIDOS DE TILÁPIA DO NILO EXPOSTO À NANOPARTÍCULA DE PRATA EM PÓ

Este capítulo objetivou avaliar o efeito toxicológico de AgNP (forma de nanopó) através de efeitos sub-letais utilizando como organismo alvo Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) avaliando alterações em biomarcadores enzimáticos, tais como AChE e BuChE (butirilcolinesterase) cerebral e muscular, bem como a atividade de CAT no fígado e brânquias.

7.1 Materiais e métodos

7.1.1 Reagentes

Todos os produtos químicos incluindo: nanopartícula de prata em pó (AgNP), 5.5 – ácido ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), iodeto de acetiltiocolina (ACTh), iodeto de butiriltiocolina (BCTh), foram comprados na Sigma-Aldrich e utilizados como recebidos.

7.1.2 Caracterização da AgNP

A AgNP em pó (cat.nº 576832, Sigma Aldrich), com base nas especificações do fabricante tem tamanho de partícula <100 nm, área de superfície 5.0 m²/g, densidade 10.49 g/cm e pureza de 99.5%. As NPs foram dispersas diretamente em água deionizada em banho ultrassônico de acordo com Afifi et al. (2016), para realizar a caracterização das NPs e o ensaio toxicológico.

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizado para caracterização do diâmetro hidrodinâmico médio e o potencial zeta (ζ) da AgNP em forma de pó foi realizado usando o Zetasizer (Malvern Instruments).

7.1.3 Obtenção da espécie e aclimatação

Todos os procedimentos utilizados na manutenção e sacrifício dos peixes foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) [Protocolo nº 59/2016, segue em anexo no Apêndice B] da Universidade Federal de Alagoas. A aclimatação e o ensaio toxicológico foram realizados de acordo com as especificações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 15088/2016) e normativas da OCDE (203/1992).

Alevinos de Tilápia do Nilo (2.75 ± 0.92 g; 5.25 ± 0.49 cm) foram obtidos da Estação de Piscicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA/UFAL) e aclimatados às condições laboratoriais por 10 dias em tanques de 250 L, contendo água da torneira desclorada, continuamente aerada, à temperatura ambiente ($26.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$) e sob um fotoperíodo de 12 h (SILVA et. al., 2015). Os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 48% de proteína bruta, 3 vezes por dia.

7.1.4 Ensaio de toxicidade sub-letal

Após a aclimatação, os peixes foram transferidos para os aquários de 20L (volume útil de 15 L) e distribuídos em quatro grupos de dez animais cada, de acordo com a concentração de AgNP (0, 5, 10, 20 e 40 mg L^{-1}), em triplicata.

Como não houve renovação da água do aquário, após 96h, foi coletado uma amostra de água do aquário que continha concentração inicial de 40 mg L^{-1} de AgNP, e foi determinado a concentração final usando o Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial da marca Spectro, modelo Arcos) e também foi determinado a composição química por espectroscopia de raios X por dispersão de elétrons (EDX), usando o EDX-7000, Shimadzu.

Após 96 h de exposição, os peixes foram sacrificados e cérebro, músculo, fígado e brânquia foram removidos, imersos em nitrogênio líquido e armazenados no freezer a -20°C , até serem necessários para ensaios enzimáticos.

7.1.5 Atividade da colinesterase

Os extratos livre de células, de cérebro e músculo, foram preparados de acordo com Golombieski et al. (2008) com pequenas modificações. O tecido foi suspenso em 150 mM de cloreto de sódio a uma proporção de 80 mg de tecido:1mL solução e foram e homogeneizadas

em Potter-Elvehjem. Em seguida, os homogenatos foram submetidos à sonicação (5 ciclos de 15 segundos cada) utilizando um disruptor ultrassônico de células (ThermoFisher Scientific, modelo D100, Waltham). No caso do extrato muscular, o mesmo procedimento acima foi realizado com duas etapas adicionais: a. antes de homogeneizar em Potter, o tecido foi macerado em um almofariz. b. Após a etapa de sonicação, o extrato livre de células foi centrifugado (Sigma model 3K30, Osterode, Alemanha) a 10000 x g durante 10 min a 4°C.

A atividade de ChE foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961). A mistura reacional (1.5 mL) continha tampão de potássio (0.1 M, pH 8.0), 0.34 mM de DTNB, 50 µL do extrato diluído e 0.5 mM de substrato (ACTh para dosar AChE e BCTh para dosar BuChE). A atividade enzimática foi determinada pela verificação da formação do tiolato de DTNB a 412 nm por 3 min utilizando o espectrofotômetro UV/VIS.

Rodríguez-Fuentes e Gold-Bouchot (2004) caracterizou as colinesterases de *Oreochromis niloticus* e observou que a AChE é a única colinesterase presente no cérebro, enquanto no músculo identificou a presença das duas colinesterases (AChE e BuChE).

7.1.6 Atividade de catalase

Tecidos hepáticos foram homogeneizadas em um homogeneizador Potter-Elvehjem com tampão de fosfato de potássio (20 mM, pH 7.4 com 0.1% de Triton X-100 e 150 mM NaCl) em uma proporção de 1 g de tecido por 20 mL de tampão. O homogenato foi então centrifugado (Sigma modelo 3K30) a 10000 x g durante 10 min a 4 °C. A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Miron et al. (2008). A mistura reacional (3 mL) continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7.0), 7.2 mM de H₂O₂ e 72 µL do extrato diluído. As mudanças na absorbância de H₂O₂ a 240 nm em 60 s foram medidas e a atividade da CAT foi calculada em termos de µmol H₂O₂ consumido / min / mg de proteína.

7.1.7 Concentração proteica

A concentração proteica foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

7.1.8 Análise estatística

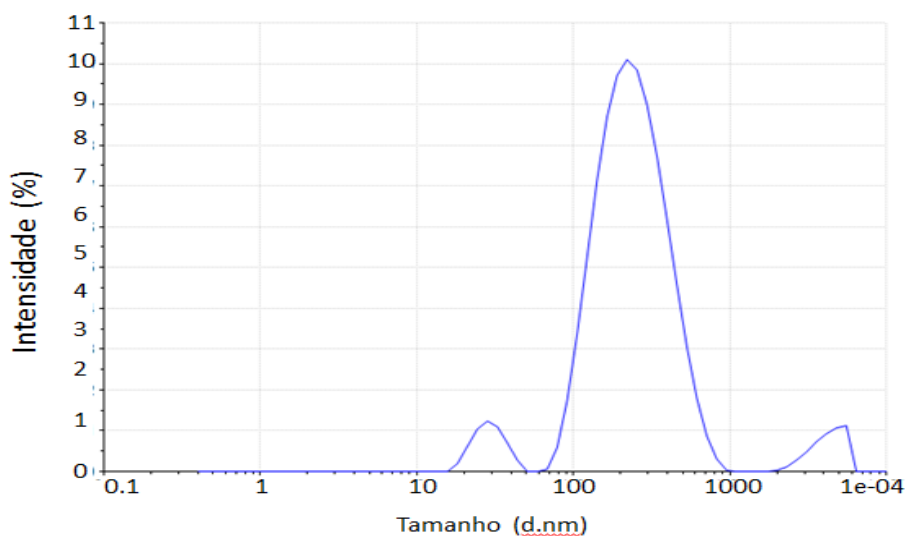
As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância one-way (ANOVA) no GraphPad 6. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnett e expressas como média ± desvio padrão. Um valor de p <0.05 foi considerado significativo.

7.2 Resultados e discussão

A nanopartícula causa efeitos tóxicos diferentes a depender do tamanho nano, revestimento, morfologia e de sua grande área superficial (NGUYEN et al., 2013), podendo penetrar profundamente em órgãos, alterando as funções metabólicas e corporais de organismos não-alvos. Diante disto, este estudo avaliou o efeito tóxico da AgNP (nanopó) comercial em biomarcadores enzimáticos de Tilápia do nilo.

As nanopartículas de prata foram caracterizadas usando DLS que é apresentado como distribuição de tamanho por intensidade resultando um tamanho médio de 191.6nm na intensidade máxima, como ilustrado na figura 30. É provável que as AgNPs revestidas com PVP, caracterizado pelo valor potencial médio de -1.64 mV foram estabilizados através da repulsão estérica causada pela camada de polímero na superfície. Este valor foi próximo das AgNP sintetizadas por Tejamaya (2014), que sugere que tal valor é devido a uma camada mais espessa de revestimento do polímero PVP.

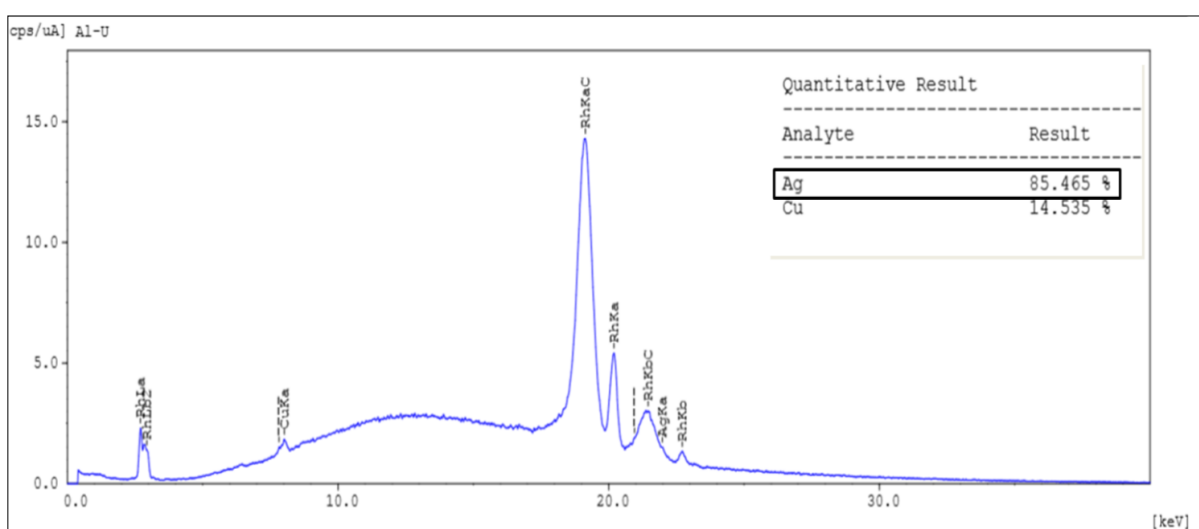
Figura 30 - Distribuição de tamanhos por intensidade de AgNPs por DLS.



As concentrações de AgNP usadas no ensaio toxicológico foram baseadas no trabalho de Afifi (2016) que encontrou uma $CL_{50}(96h)$ de 19.5 mg L^{-1} de AgNP para *O. niloticus*. Porém neste estudo, não houve morte até a maior concentração usada de 40 mg L^{-1} para alevinos de *O. niloticus*, durante às 96h de exposição, possivelmente devido a não renovação da água do aquário e depósito de AgNP no fundo do aquário (fato observado), apesar da aeração contínua.

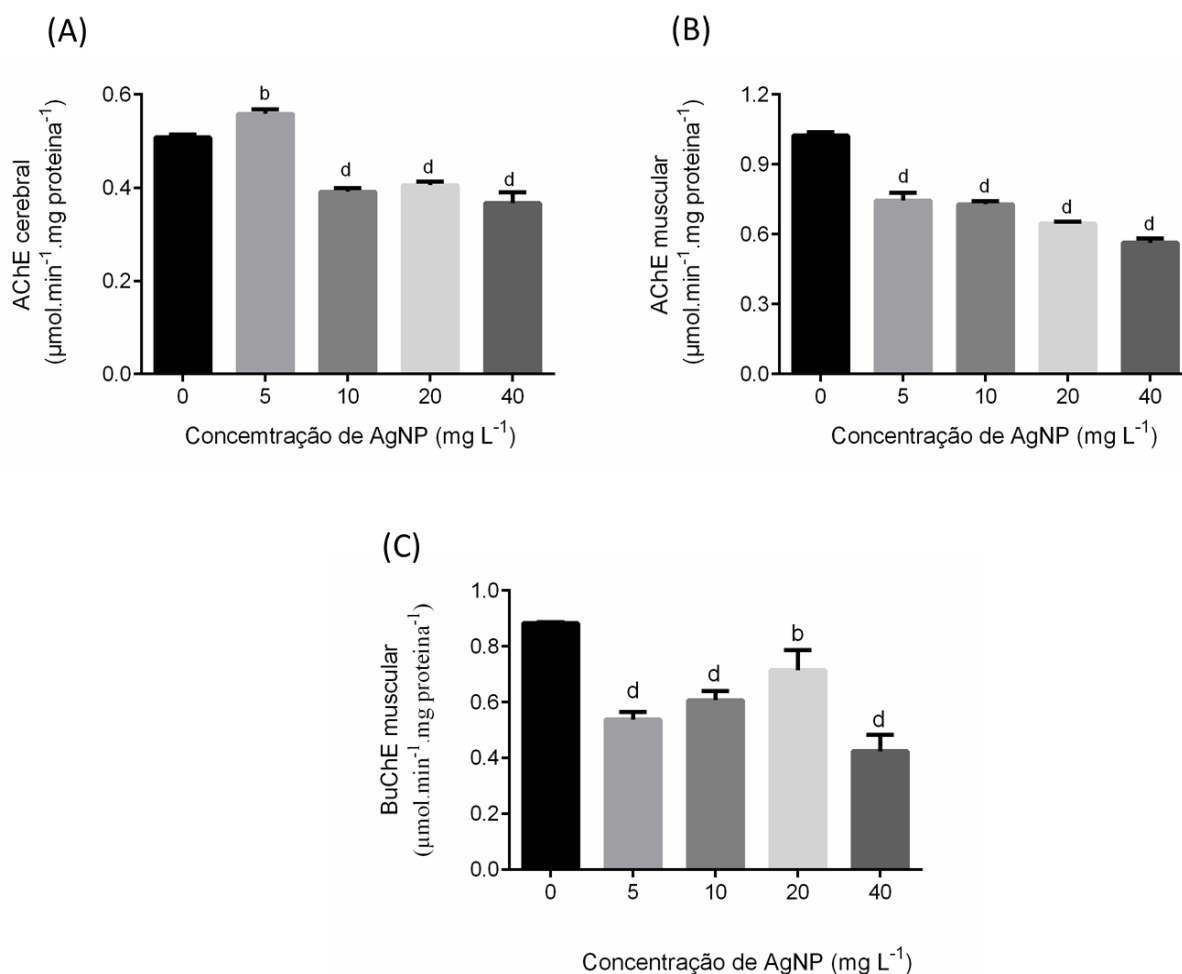
O resultado obtido pelo ICP indicou que a concentração do aquário (com concentração inicial de 40 mg L^{-1}) após 96h permaneceu com concentração final abaixo do limite de detecção do aparelho ($<0.1 \text{ mg L}^{-1}$), porém nas análises do espectrômetro EDX, linhas de identificação das principais energias de emissão para prata (Ag) foram exibidas e correspondem a picos no espectro, confirmando a presença de um sinal de prata elementar da AgNP com cerca de 85% em peso de prata, como indicado pela figura 31.

Figura 31 - Espectro de EDX exibindo a composição química da água do aquário após 96h de exposição de 40 mg L^{-1} de AgNP. O eixo vertical exibe o número de raios-x e o eixo horizontal exibe energia em KeV.



A acetilcolinesterase vem sendo empregada como biomarcador de diferentes nanopartículas (XIA et al, 2013; ZHANG et al., 2018; JIA et al., 2017; NG et al., 2019; TU et al., 2009). No presente estudo, o efeito da nanopó de prata sobre a atividade da ChE cerebral e muscular de tilapia do Nilo foram observadas. A figura 32 mostra o comportamento da atividade de AChE cerebral (figura 32A), AChE muscular (figura 32B) e BuChE muscular (figura 32C) de *O. niloticus* exposto à diferentes concentrações de AgNP.

Figura 32 - Efeito das AgNP na atividade específica da AChE cerebral (A), AChE muscular (B) e BuChE muscular (C). As letras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.



Ao comparar as atividades da colinesterase de ambos os tecidos de *O. niloticus*, observa-se alterações significativas em todas as concentrações de AgNP. A AChE cerebral apresentou decaimento na atividade a partir da concentração 10 mg L⁻¹, com redução de aproximadamente de 28% para a concentração de 40mg L⁻¹ de AgNP. A atividade de AChE muscular apresentou dose-dependente com a concentração de AgNP, com redução de 45% para a concentração de 40mg L⁻¹ de AgNP. A BuChE muscular apresentou redução na atividade de 52% para a maior concentração de AgNP. Estes resultados mostram que a AChE muscular foi mais inibida pela AgNP do que a AChE cerebral. Isso pode estar relacionado ao fato do músculo ser um tecido exposto diretamente ao meio do que o cérebro, que é protegido pela barreira hematoencefálica. Estes resultados também mostram que ambas as de *O. niloticus* mostram-se sensíveis à exposição de AgNP.

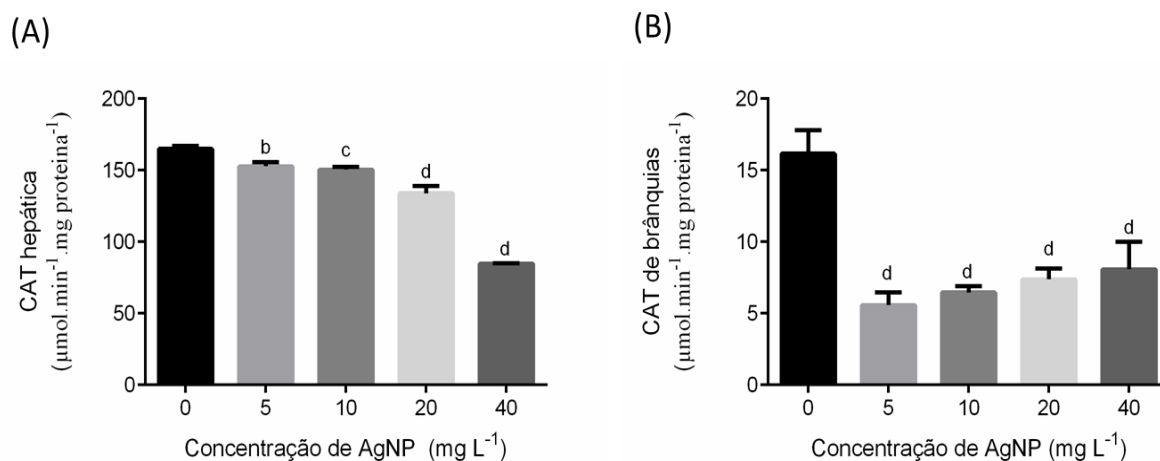
Katuli et al. (2014) também observaram diminuição na atividade de AChE eritrocitária de Zebrafish após exposições agudas e crônicas de AgNP e sugeriu respostas semelhantes no cérebro e músculo.

Estudos *in vitro* tem reportado o efeito de AgNP nas ChEs. Wang et al. (2009) observaram diferentes sensibilidades da AChE da enguia elétrica exposto à diferentes classes de nanopartículas (metálicas, óxidas e nanotubo de carbono) e observou inibição enzimática e adsorção desse nanomaterial, possivelmente por mudança conformacional.

Šinko et al. (2014) reportaram que AgNP causou inibição enzimática na AChE recombinante de humano e BuChE de cavalo. Mirzajani et al. (2017) avaliaram a interação de AChE recombinante de *Drosophila melanogaster* com AgNP e observou alterações na atividade de AChE e diminuição da estrutura secundária, indicando deformação estrutural.

A catalase é a enzima chave no sistema de defesa antioxidante e pode converter milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por segundo (EL-GENDY et al., 2009). A figura 33 apresenta a atividade específica da CAT hepática e de brânquias de *O. niloticus*, após 96h de exposição à AgNP. A catalase de ambos os tecidos apresentou reduções significativas em todas as concentrações de AgNP, quando comparado ao controle. A atividade teve redução de 43% e 50%, para a CAT hepática e de brânquias, respectivamente. Esses resultados mostram que a CAT branquial foi mais inibida pela AgNP que a CAT hepático, devido ao fato das brânquias terem contato direto com o ambiente aquático.

Figura 33 - Efeito das AgNP na atividade da CAT hepática (A) e CAT de brânquias (B) de *O. niloticus*. As letras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) quando comparado ao controle, avaliado por one-way (ANOVA) e teste de Dunnett.



Da mesma forma, Lee et al. (2012) também observou alteração na atividade de CAT hepática de *Cyprinus carpio* após exposição de AgNP por 96h. Jayaseelan et al. (2014) verificou hepatotoxicidade no fígado de *O. mossambicus* após exposição à altas concentrações de NPs de Níquel e deduziu que esse nanomaterial causou dano oxidativo no fígado alterando os níveis de CAT e tal interrupção dos sistemas antioxidantes aumentaria a geração de ERO'S e produziria danos oxidativos mais graves aos demais tecidos.

Estudo *in vitro* de AgNP afetando a estrutura da CAT tem sido reportado. Zhang (2015) realizou um estudo espectrofotométrico UV-Vis de CAT e observou que a CAT tem três picos de absorção a 215nm correspondendo às ligações peptídicas, a 286 nm e outro a 292 nm correspondendo aos aminoácidos de anel aromático; quando exposto à diferentes concentrações de AgNP houve desvio dos picos, diminuindo a absorção indicando que esse nanomaterial mudou a estrutura da CAT, fazendo sua atividade aumentar, provavelmente porque a nano entrou na cavidade do sítio ativo da enzima, levando a maior exposição do centro catalítico, assim afetando as atividades fisiológicas normais.

7.3 Conclusão

Este estudo demonstra que *O. niloticus* pode ser usado como bioindicador eficiente para investigar a toxicidade das AgNPs. Os resultados apresentados incitam a sensibilidade das colinesterases e catalase de diferentes tecidos, mostrando que AgNPs pode induzir estresse oxidativo. Portanto, a liberação desse nanomaterial ao ambiente pode representar riscos para a vida aquática e/ou humana, visto que a espécie estudada é bem difundida no Brasil e tem muita aceitação no mercado consumidor.

REFERÊNCIAS

- AFIFI, M. *et al.* Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA (ABNT), NBR15088. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (Cyprinidae), 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248–254, 1976.
- ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** 7, 88–95, 1961.
- EL-GENDY, K. *et al.* In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides. **Chemosphere**, 77: 339-344, 2009.
- GOLOMBIESKI, J. I. *et al.* Acetylcholinesterase enzyme activity in carp brain and muscle after acute exposure to diafuran. **Sci. Agric.**, 65: 340-345, 2008.
- JAYASEELAN, C. *et al.* Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 107220–228, 2014.
- JIA, X. *et al.* The potential liver, brain, and embryo toxicity of titanium dioxide nanoparticles on mice. **Nanoscale Research Letters**, 12:478, 2017.
- KATULI, K. K. *et al.* Silver nanoparticles inhibit the gill Na^+/K^+ - ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 106:173–180, 2014.
- LEE, B. *et al.* Toxicity of Citrate-Capped Silver Nanoparticles in Common Carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.
- MIRON, D. S. *et al.* Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**. 74 (1–5), 2008.
- MIRZAJANI, F. *et al.* Recombinant Acetylcholinestrse purification and its interaction with silver nanoparticle. **Protein Expression and Purification**, 2017.
- NG, D. Q. *et al.* In vivo evidence of intestinal lead dissolution from lead dioxide (PbO_2) nanoparticles and resulting bioaccumulation and toxicity in medaka fish. **Environmental Science: Nano**, 6, 580-591, 2019.
- NGUYEN, K. C. *et al.* Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles **J. Phys.: Conf. Ser.** 429:012025, 2013.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for testing of chemicals 203. Fish, Acute Toxicity Test, 1992.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Mar. Environ. Res.** 58, 505–509, 2004.

SILVA, J. M. *et al.* In vivo and in vitro inhibition of cholinesterase activity in *Colossoma macropomum* (tambaqui) fingerlings by the herbicide trifluralin. **Ecotoxicol. Environ. Contam.** 10, 23–30, 2015.

ŠINKO, G. *et al.* Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. **Environ Sci Pollut Res**, 21:1391–1400, 2014.

TEJAMAYA, M. **Synthesis, characterization and stability test of silver nanoparticles in ecotoxicology media.** Thesis - University of Birmingham, 2014.

WANG, Z. *et al.* Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. **Chemosphere**, 77:67–73, 2009.

XIA, J. *et al.* Effects of Selected Metal Oxide Nanoparticles on Multiple Biomarkers in *Carassius auratus*. **Biomed Environ Sci**, 26(9): 742-749, 2013.

ZHANG, B. *et al.* Evaluation on the Toxic Effects of NanoAg to Catalase. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.15, 1473–1479, 2015.

ZHANG, Q. *et al.* Exposure to alumina nanoparticles in female mice during pregnancy induces neurodevelopmental toxicity in the offspring. **Front Pharmacol.**, 9: 253, 2018.

APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Avaliação da exposição de zebrafish (Danio rerio) a nanopartículas de prata*”, registrada com o nº 42/2017, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Sônia Salgueiro Machado**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 22.09.2017.

Vigência da autorização	25.10.2017 a 30.11.2018
Espécie/linhagem/raça	Peixes/Zebrafish
Nº de animais	400
Peso/idade	0,70g / adultos
Sexo	200 machos e 200 fêmeas
Origem/Local de manutenção	Estação Experimental de Piscicultura do Centro de Ciências Agrárias da UFAL/LAQUA-CECA-UFAL

Maceió, 20 de outubro de 2017.

Profª. Drª. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da CEUA/UFAL

APÊNDICE B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da exposição de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) a nanopartículas de prata”, registrada com o nº 59/2016, sob a responsabilidade da pesquisadora **Sônia Salgueiro Machado**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 04.11.2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	26.12.2016 a 26.12.2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Oreochromis niloticus</i> /Tilápia do Nilo
Nº de animais	309
Peso/idade	10 gramas/juvenis
Sexo	Machos
Origem/local de manutenção	Estação Experimental de Piscicultura do Centro de Ciências Agrária (CECA)/LAQUA

Maceió, 21 de dezembro de 2016.


Prof.ª Dr.ª Silvana Ayres Martins
Coordenadora CEUA/UFAL

Prof.ª. Dra. Silvana Ayres Martins
Coordenadora da Comissão de
Ética no uso de Animais
SIAPE 1129853