



XII Salão de Iniciação
Científica PUCRS

Exposição aguda à Microcistina-LR aumenta a atividade da AChE via ativação transcricional da *ache* em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*)

Rachel Seemann Fritsch¹², Luiza Wilges Kist², Maurício Reis Bogo¹² (orientador)

¹Faculdade de Biociências, PUCRS, ²Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS

Resumo

Microcistinas (MC) são toxinas conhecidas por induzir principalmente hepatotoxicidade, através da inibição das proteínas fosfatases PP1 e PP2A e geração de estresse oxidativo. Neste trabalho testamos os efeitos *in vitro* e *in vivo* de diferentes concentrações de MC-LR sobre a atividade da AChE em cérebro de zebrafish. Os ensaios *in vitro* não revelaram alteração da AChE. Já os ensaios *in vivo* mostraram um aumento de 27% quando zebrafish foram expostos à toxina dissolvida na água, mas não causou alteração significativa quando injetada por via intraperitoneal. Além disso, a análise de RT-PCR semi-quantitativa demonstrou um aumento nos níveis de mRNA de *ache* no cérebro de zebrafish.

Introdução

Cianobactérias são produtoras de uma grande variedade de toxinas que são hepatotoxinas frequentemente detectadas em água doce dentre estas a MC-LR (uma das formas mais comuns em florações de cianobactérias). Microcistinas podem acumular em diferentes tecidos de espécies de peixes, regulam a atividade das quinases por inibição direta das fosfatases PP1 e PP2A e induzem estresse oxidativo e apoptose. Além disso, mudanças no comportamento locomotor de zebrafish (*Danio rerio*) e *Leucaspilus delineatus* depois da exposição à MC-LR, e a indução de peroxidação lipídica no cérebro de *Corydoras paleatus* após exposição à MC-RR indicam efeitos neurotóxicos das MCs.

O Zebrafish é considerado um modelo ideal devido ao seu pequeno tamanho, sensibilidade às drogas e por absorver rapidamente produtos químicos da água e acumulá-los em diversos tecidos.

Na neurotransmissão colinérgica, colina acetiltransferase é responsável pela síntese de acetilcolina (ACh) no neurônio pré-sináptico. Após sua liberação na fenda sináptica, colinesterases rapidamente decompõe ACh em colina e acetato. Existem dois tipos de colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE). Tem sido demonstrado que BuChE não é codificada em zebrafish, entretanto AChE é codificada por um único gene (*ache*) que já foi clonado, sequenciado e funcionalmente detectado em cérebro de zebrafish. Do mesmo modo, sua atividade tem sido amplamente utilizada como bioindicador de exposição ambiental. Por exemplo, a inibição

da AChE como biomarcador para avaliação da exposição de organismos aos inseticidas organofosforados e carbamatos é bem conhecida, inclusive em peixes.

A inibição da AChE cerebral em zebrafish por substâncias tóxicas como o metanol e metais pesados como mercúrio e chumbo também tem sido bem estabelecida. Por outro lado, a ativação da AChE tem sido demonstrada como consequência da exposição a compostos neurotóxicos como alumínio e etanol. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos *in vivo* e *in vitro* de concentrações de MC-LR na atividade da AChE em cérebro de zebrafish e; determinar o nível de expressão do gene *ache* quando identificadas alterações cinéticas.

Metodologia

Para a realização dos experimentos foram utilizados zebrafish adultos. Nos experimentos *in vivo* os animais foram expostos a concentrações de MC-LR (50 e 100 µg/L) dissolvida em água e então foram sacrificados após 24 horas. Nos ensaios *in vitro* MC-LR em concentrações finais de 10, 25, 50, 100, 500, 1000 e 5000 µg/L foi adicionado ao meio antes da pré-incubação com a enzima contendo homogenato de cérebro de zebrafish e mantida durante os ensaios enzimáticos. As injeções intraperitoneais seguiram o protocolo estabelecido por Phelps et al. (2009). Para determinar a atividade da AChE e dosar proteína foram utilizados os métodos de Ellman (1961) e Bradford (1976) respectivamente. Posteriormente foram feitas análises de RT-PCR semi-quantitativas, a partir de cérebros das exposições *in vivo*, para obter a expressão do gene *ache*.

Os resultados enzimáticos foram avaliados pela análise de variância de uma via (one-way ANOVA), e pós teste de Tukey. Dados moleculares foram analisados pelo teste t de Student.

Resultados

A análise *in vivo* demonstrou que os peixes tratados com concentração de 100 µg/L por 24 horas apresentaram um aumento de 27% na atividade da AChE. Os resultados do RT-PCR de *ache* demonstraram que os níveis relativos de mRNA foram 17% maiores após a exposição a 100 µg/L MC-LR. No entanto, nos experimentos com injeção intraperitoneal e *in vitro*, MC-LR não provocou alteração na atividade da AChE.

Discussão

AChE tem sido bem estudada graças a sua função terminadora da neurotransmissão em sinapses colinérgicas e junções neuromusculares (Taylor and Radic, 1994) e mais recentemente foi redefinida como um importante regulador de apoptose, pois pode ser induzida por uma variedade de estímulos apoptóticos (a alta expressão da AChE é capaz de inibir a proliferação celular e promover a apoptose - Jin et al., 2004). A ativação da AChE cerebral também tem sido demonstrada como

consequência da exposição a compostos neurotóxicos. Além disso, um aumento significativo na atividade da AChE foi estabelecido após a exposição aguda de etanol (Rico et al., 2007).

A atividade da AChE aumentou na concentração 100 µg/L de MC-LR dissolvida em água. Os níveis de mRNA de *ache* aumentaram significativamente após a exposição de MC-LR, sugerindo que, MC-LR também pode modular a expressão do gene *ache*. Os resultados também mostraram que nos ensaios *in vitro* não houve alteração da AChE sugerindo que a MC-LR não age diretamente sobre a enzima. Esses resultados fornecem mais evidências de efeitos tóxicos causados pela exposição de MCs no cérebro de zebrafish.

Existem muitas evidências na literatura associando mudanças nos padrões de comportamento com efeitos neurotóxicos da exposição aos poluentes. Neste sentido, embora os efeitos da MCs no comportamento de peixes são pouco conhecidos alguns aspectos já foram abordados como, por exemplo, mudanças no comportamento locomotor. A hepatotoxicidade da MC depende da via de absorção, portanto, uma rota alternativa de exposição foi posteriormente testada para determinar se esta também pode levar a uma mudança na AChE cerebral, como ocorreu quando zebrafish foram expostos à toxina dissolvida em água. Curiosamente, quando MC-LR foi injetada por via intraperitoneal não houve alteração na atividade da AChE sugerindo que os aumentos observados na AChE cerebral dependem, pelo menos parcialmente, da absorção branquial ou ingestão. Estas descobertas parecem ser particularmente relevantes para melhor compreensão dos mecanismos moleculares da toxicidade da MC no cérebro.

Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho fornecem evidências experimentais de que AChE cerebral é outro alvo potencial de MCs, e que os aumentos observados na atividade da AChE, juntamente com os níveis de transcrição do gene *ache* depois da exposição de MC-LR dependem, pelo menos parcialmente, da absorção branquial ou ingestão. Também pode ser especulado que a neurotoxicidade resultante da exposição à MC-LR é mediada por apoptose. Apoptose induzida por microcistina em uma variedade de tipos de células não cerebrais de mamíferos já foi demonstrado (McDermott et al., 1998). Mais estudos devem ser realizados a fim de reforçar essas constatações.

Referências:

- Bradford M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218-254, 1976.
- Ellman G.L., Coutney K.D., Andrés J.V. & Feartherstone R.M.; A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity; *Biochem Pharmacol* 7:88-95, 1961.
- Jin Q.H.; He H.Y.; Shi Y.F.; Lu H.; Zhang X.J.; overexpression of acetylcholinesterase inhibited cell proliferation and promoted apoptosis in NRK cells; *Acta Pharmacol Sin* 25:1013-1021, 2004.
- Phelps H.A., Runft D.L., Neely M.N.; Adult zebrafish model of streptococcal infection; *Curr protoc microbial* 13:9D.1.1-9D.1.27, 2009.
- Rico E.P., Rosemberg D.B., Dias R.D. Bogo M.R. bonan C.D.; Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol let* 174:25-30, 2007.
- McDermott, C.M., Nho, C.W., Howard, W., Holton, B., The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types. *Toxicon* 36, 1998.
- Taylor, P., Radic, Z., The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 281-320, 1994.