



## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE FRENTE AO ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PARAQUAT EM CÉREBRO DE RATOS.**

Bruna Morgan da Silva<sup>1</sup>, Mariana Migliorini Parisi<sup>2</sup>, Viviane Cecília Kessler Nunes  
Deuschle<sup>3</sup>, Gabriela Bonfanti Azzolin<sup>4</sup>, Josiane Woutheres Bortolotto<sup>5</sup>.

**Palavras-chave:** Acetilcolinesterase. Paraquat. Rutina. Estresse Oxidativo.

### **1 INTRODUÇÃO**

O Paraquat (Pq; 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo dicloreto) é um herbicida muito utilizado na agricultura em todo o mundo devido sua eficácia e seu baixo custo. No entanto ele oferece alto risco à saúde devido à grande quantidade de espécies reativas (ER) formadas (GAWARAMMANA, BUCKLEY, 2011). Esta grande quantidade de ER no organismo leva a um processo chamado de estresse oxidativo, neste processo haverá danos aos lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (MARTINS, 2013). Além disso, a ingestão de pequenas quantidades de paraquat pode causar danos severos a fígado, pulmão e efeito tóxico em sistema nervoso central (SARAVU *et al.*, 2013).

A acetilcolinesterase responsável pela hidrólise de ésteres com grupamento acetil é predominante no cérebro, junção neuromuscular, linfócitos e eritrócitos (COKUGRAS, 2003). O sistema colinérgico é um dos mais importantes caminhos de modulação do sistema nervoso central (SNC) desempenhando um papel fundamental no aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM *et al.*, 2002). Evidências vem mostrando que a diminuição da expressão da enzima acetilcolinesterase induz a morte de neurônios dopaminérgicos (ZHANG *et al.*, 2013). Além disso, estudos também mostram que a acetilcolinesterase é um importante biomarcador da exposição a herbicida, como o Pq (ROJAS-GARCIA *et al.*, 2011)

<sup>1</sup> Discente do curso de farmácia, da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: bruna.morgan@outlook.com

<sup>2</sup> Pesquisadora do Grupo de Pesquisa em Atenção Integral a Saúde - GPAIS, Docente da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: mparisi@unicruz.edu.br.

<sup>3</sup> Pesquisadora do Grupo de Pesquisa em Atenção Integral a Saúde - GPAIS, Docente da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: vdeuschle@unicruz.edu.br.

<sup>4</sup> Pesquisadora do Grupo de Pesquisa em Atenção Integral a Saúde - GPAIS, Docente da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: gbonfanti@unicruz.edu.br.

<sup>5</sup> Pesquisadora do Grupo de Pesquisa em Atenção Integral a Saúde - GPAIS, Docente da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: bortolotto@unicruz.edu.br.



O consumo de compostos fitoquímicos com atividade antioxidantes, provenientes de plantas, tem ganhado importância nos últimos anos, e isso é atribuído a sua atividade no organismo (ACHKAR, *et al.*, 2013). Dentre os antioxidantes que estão presentes nos vegetais, os mais frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, como os flavonóides, sendo os mais estudados e consumidos a quercetina e a rutina (BEHLING *et al.*, 2004).

A rutina, um derivado da quercetina, é um flavonoide encontrado em várias fontes alimentares. (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009). Possui propriedades antioxidantes, e vaso protetor, promovendo uma melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, diminuindo a fragilidade capilar (ABE *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* indicam a eficácia de flavonóides como antioxidantes (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Considerando a relevância do uso acentuado do Pq em lavouras no Brasil, o presente estudo tem como objetivo realizar a avaliação da enzima acetilcolinesterase sobre a oxidação induzido pelo Pq em cérebro de ratos *in vitro* e verificar o possível efeito protetor do flavonóide rutina.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animal experimental**

Foram utilizados sete ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*), pesando cerca de 200g  $\pm$  50g, obtidos no biotério da Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ mantidos a 22  $\pm$  2 °C, com 12 h de ciclo claro e escuro, com água e alimento *ad libitum*. Os ratos foram eutanaziados e o cérebro rapidamente dissecado, pesado e colocados em gelo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade de Cruz Alta - UNICRUZ

### **Preparo do Homogenato e exposição ao Pq**

Os cérebros foram homogeneizados em Tris-HCl, e posteriormente centrifugados. O sobrenadante foi submetido a uma pré-incubação com rutina (R, 80  $\mu$ M) por 30 min. Após, uma dose de Pq de 1 mM foi adicionada aos tecidos e incubados por 2 horas adicionais. Um grupo sem qualquer tipo de tratamento foi considerado o grupo controle (C). Também foram feitos os grupos controle paraquat (PQ), controle rutina (R) e rutina + exposição ao paraquat (R+PQ). Após a incubação, as amostras foram utilizadas para medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Além disso, o teor de proteína foi medido pelo método de Peterson (1977).

### **Atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada em tecido cerebral pelo método de Ellman *et al.* (57), o qual utiliza-se da reação da acetilcolina (ACh) com DTNB. O



cromógeno formado é então medido espectroscopicamente a 412 nm e os resultados expressos em  $\mu\text{mol ACh/h/mg}$  de proteína.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse estudo a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi analisada. Os resultados mostraram que a atividade da AChE teve uma diminuição significativa no grupo Paraquat ( $4,3 \pm 0,5 \mu\text{mol ACh/h/mg}$  de proteína,  $p < 0,01$ ) comparado ao grupo controle ( $6,5 \pm 0,9 \mu\text{mol ACh/h/mg}$  de proteína). Além disso, o pré-tratamento com R não alterou os níveis da atividade enzimática ( $3,3 \pm 1,0 \mu\text{mol ACh/h/mg}$  de proteína), ou seja, a rotina não protegeu contra a diminuição da atividade enzimática causada pelo Paraquat.

A acetilcolinesterase inativa a ação do neurotransmissor acetilcolina hidrolisando em acetato e colina. O neurotransmissor Ach é bastante difundido por todo o sistema nervoso. No sistema nervoso periférico, essa enzima é liberada por todos os neurônios motores do sistema nervoso somático e também no sistema autônomo. A inibição da acetilcolinesterase leva à perda de homeostase colinérgica, podendo causar inúmeros distúrbios neuroquímicos, neurocomportamentais e neuromorfológicos. (NUNES *et al.*, 2015)

Estudos vêm mostrando que o aumento das atividades da acetilcolinesterase pode resultar em uma rápida degradação da acetilcolina, que pode ser desencadeada devido ao estresse oxidativo. Um estudo realizado em animal experimental onde o Pq foi administrado pela via intraperitoneal não mostrou diferença significativa nos níveis da acetilcolinesterase (NUNES *et al.*, 2015). Um segundo estudo realizado com animais experimentais, do tipo ratos wistar, também mostraram resultados não significativos em relação a atividade da enzima acetilcolinesterase. (DEL PINO *et al.*, 2017)

Nossos dados, porém, mostraram que o Pq diminuiu a atividade da enzima, e que o pré-tratamento com a rotina não modificou os níveis enzimáticos quando comparado ao grupo controle, ou seja, a rotina não teve ação protetora ao efeito do Pq *in vitro*.

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS OU CONCLUSÃO

Os dados obtidos, neste estudo, demonstraram que a rotina não possui efeito protetor contra o estresse oxidativo gerado pelo paraquat em cérebro de ratos mantendo assim o mesmo perfil de atividade enzimática que o grupo induzido pelo paraquat. Conclui-se que ainda é necessário mais estudos sobre a atividade da enzima frente ao processo oxidativo.

### REFERÊNCIAS

ABE, L. T. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L.** Ciênc. Tecnol. Aliment., v.27, p. 394-400 2007.



ACHKAR, M.T *et al.* **Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos.** Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. RUTINA – **Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico.** Rev. Interd. de Est. Exper., v.1, p.21-25, 2009.

BEHLING, E. V. *et al.* **Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas.** Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

CERQUEIRA, F. M. *et al.* **Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.

COKUGRAS, A. N. **Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance.** Turkish Journal of Biochemistry, v. 28, p. 54-61, 2003.

DEL PINO, Javier *et al.* **Primary hippocampal neuronal cell death induction after acute and repeated paraquat exposures mediated by AChE variants alteration and cholinergic and glutamatergic transmission disruption.** Toxicology, v. 390, p. 88-99, 2017.

GAWARAMMANA, I. B.; BUCKLEY, N. A. **Medical management of paraquat ingestion.** British journal of clinical pharmacology, v. 72, n. 5, p. 745-757, 2011.

MARTINS, T. **Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 34, n. 2, p. 175-186, 2013.

MESULAM, M. M. *et al.* **Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine.** Neuroscience, v. 110, p. 627-639, 2002.

NUNES, Mauro E. *et al.* **Chronic treatment with paraquat induces brain injury, changes in antioxidant defenses system, and modulates behavioral functions in zebrafish.** Molecular neurobiology, v. 54, n. 6, p. 3925-3934, 2017.

NUNES, Mauro Eugênio Medina *et al.* **Exposição crônica ao herbicida paraquat promove desequilíbrio no sistema antioxidante e alterações comportamentais em peixe zebra (Danio rerio).** 2015.

ROJAS-GARCIA AE, *et al.* **Pesticide Biomarkers, Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment,** Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), 2011. Available from: <https://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-pests-control-and-pesticides-exposure-and-toxicity-assessment/pesticide-biomarkers>

SARAVU K, SEKHAR S, PAI A, BARKUR AS, RAJESH V, EARLA JR, *et al.* **Paraquat - A deadly poison: Report of a case and review.** Indian J Crit Care Med. 17:182-84. 2013.

ZHANG, X., *et al.* **Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease.** Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 265-272, 2013.