

### CARACTERIZAÇÃO DE UM MÉTODO DE DISSOCIAÇÃO DE TECIDO CEREBRAL DE PEIXE-ZEBRA ADULTO PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL.

Amanda Martins Linazzi<sup>1</sup>, Diogo Losch de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### Introdução

O processo essencial para a manutenção da vida ocorre nas mitocôndrias durante a biossíntese de ATP através da fosforilação oxidativa. Atualmente é possível medir o consumo de  $O_2$  e inferir o estado da fosforilação oxidativa em tempo real pela técnica de Respirometria de Alta Resolução, já que alterações nessa via podem estar relacionadas a várias disfunções e doenças neurológicas.

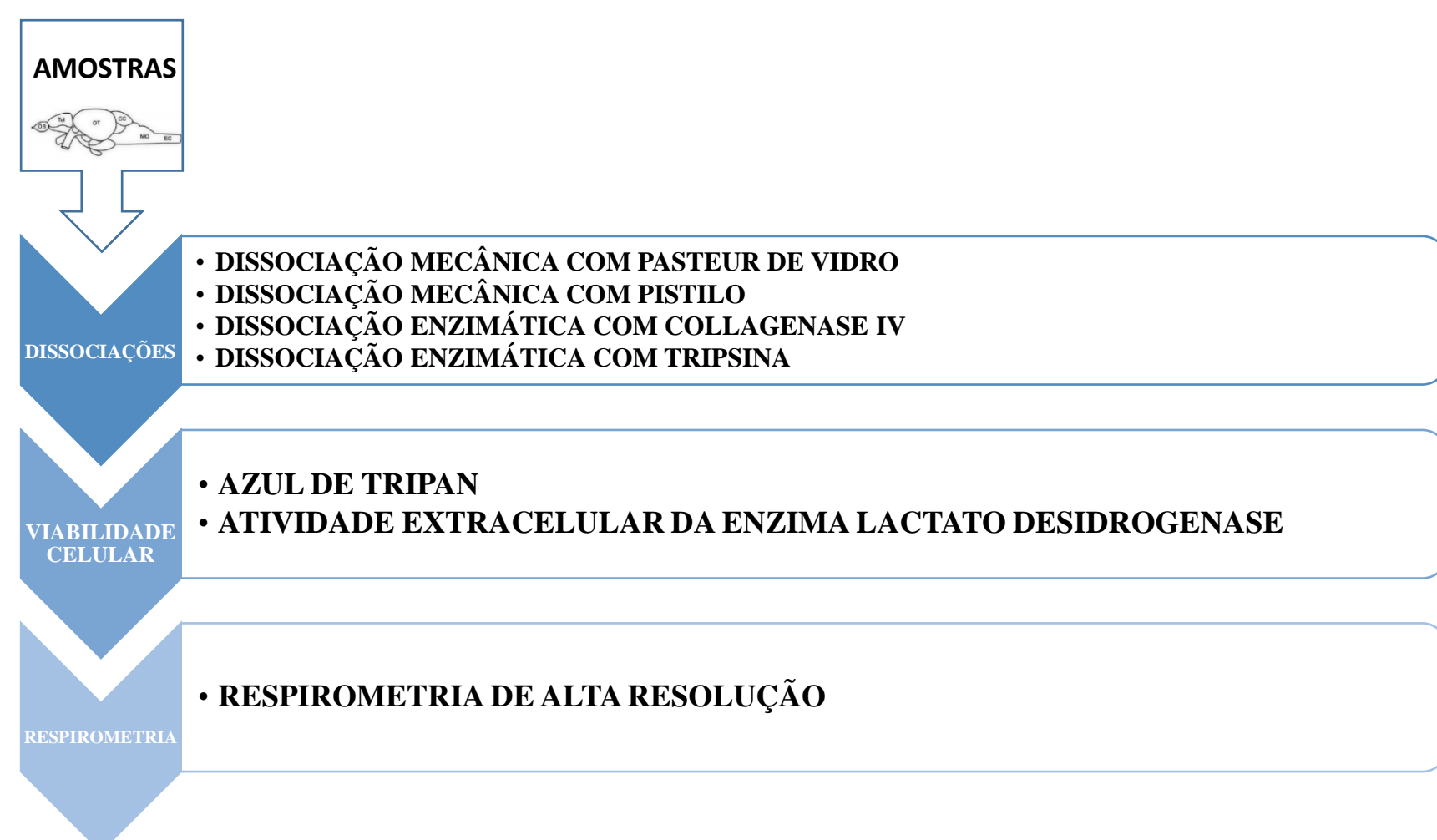
#### Objetivo

O objetivo desse trabalho foi caracterizar um método de dissociação tecidual para uso na respirometria de alta resolução em cérebros de peixes-zebra adultos

#### Métodos

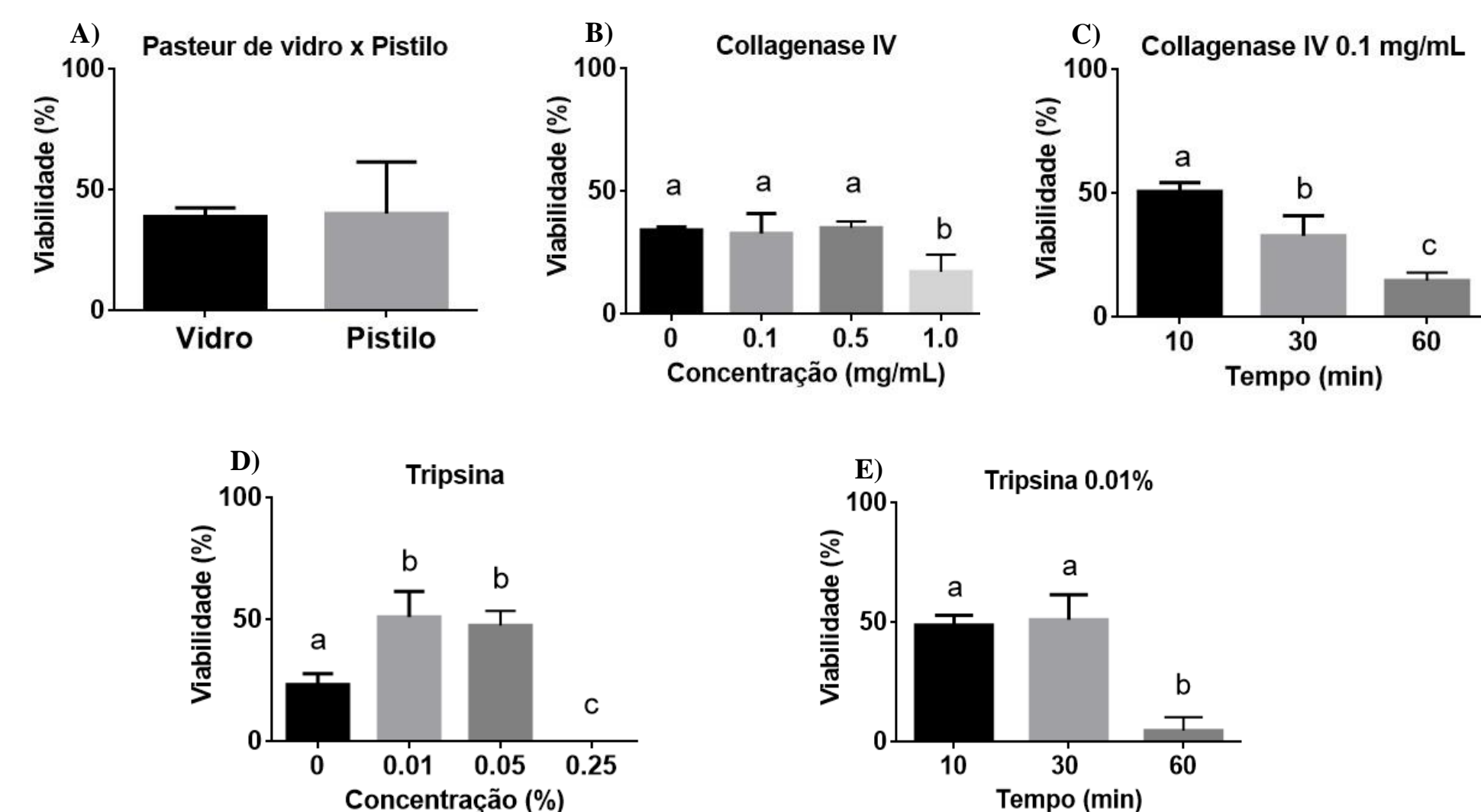
**Comitê de ética:** Experimentos aprovados pelo CEUA (protocolo 33922)

**Animais:** 172 peixes adultos com idade entre 6 e 8 meses de idade (50:50 machos:fêmeas)



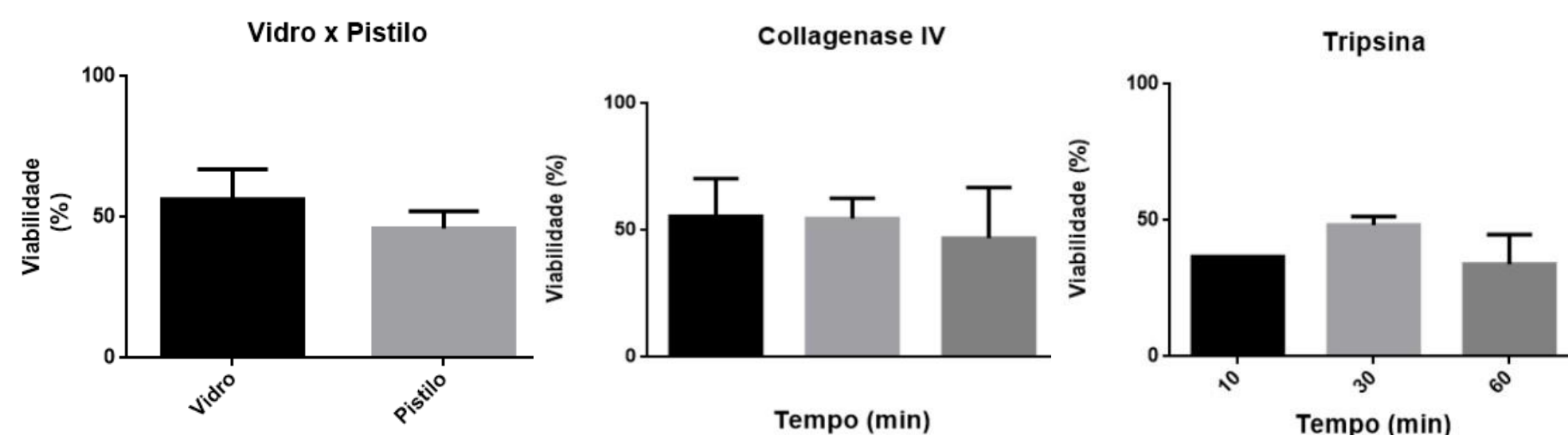
#### Resultados

##### Azul de Tripan



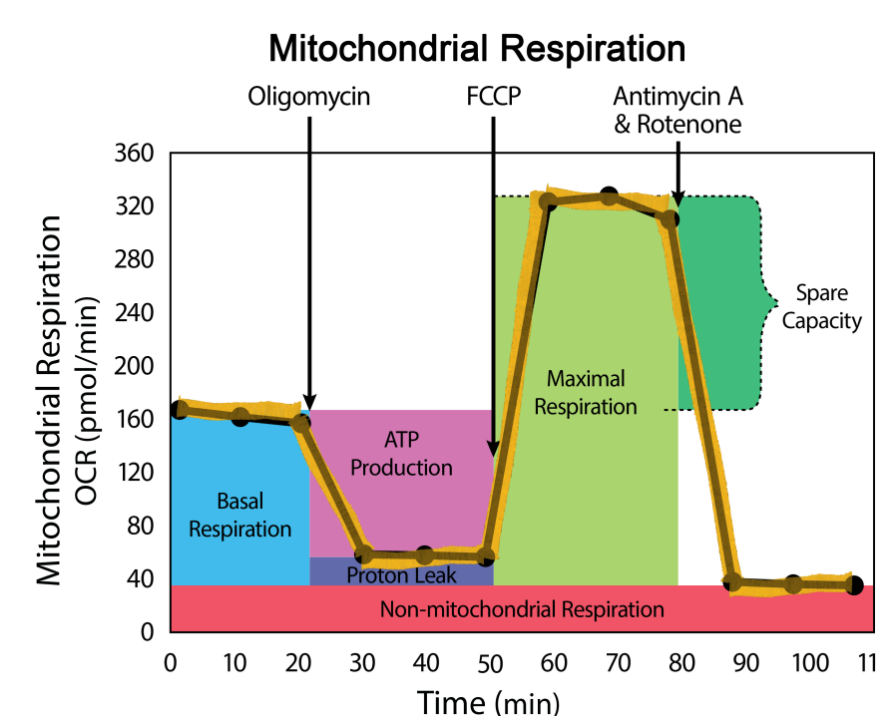
**Fig. 1.** Dissociação em cérebros de peixe-zebra adulto (ZB) usando diferentes protocolos ( $n=4-6$ ). Viabilidade celular por azul de tripan para dissociações de ZBs com A) Apenas dissociação mecânica; B) Collagenase IV durante 30 minutos com diferentes concentrações; C) Collagenase IV por 10', 30', 60' na concentração ótima da enzima; D) Tripsina-EDTA durante 30 minutos com diferentes concentrações; E) Tripsina-EDTA por 10', 30', 60' na concentração ótima da enzima. **Estatísticas:** Viabilidade das dissociações mecânicas foram analisadas por teste-t não pareado ( $p \leq 0.05$ ). Viabilidade das enzimas foram analisadas por ANOVA de uma via seguido do teste *post-hoc* de Tukey.

#### Atividade extracelular da enzima Lactato Desidrogenase



**Fig. 2.** Viabilidade celular pela atividade extracelular da lactato desidrogenase ( $n=2$ ) comparando dissociações mecânicas, collagenase IV e Tripsina-EDTA por 10', 30', 60' nas melhores concentrações enzimáticas, 0,1mg/mL e 0,01%, respectivamente.

#### Respirometria de Alta Resolução



**Fig. 3.** Imagem ilustrativa relacionada aos parâmetros fundamentais da função mitocondrial.

Respiração basal; Produção de ATP; Respiração máxima; Vazamento de prótons; Respiração extramitocondrial; Capacidade de respiração reserva

	Vidro $n = 4$		Collagenase IV $n = 4$		Vidro $n = 4$		Tripsina $n = 4$	
Respiração Basal	13,78±	3,524*	6,998±	1,609	13,31±	2,808*	7,008±	3,273
Produção de ATP	7,311±	1,742*	2,685±	0,6960	6,403±	2,614*	2,912±	0,9269
Vazamento de prótons	6,468±	1,941	4,313±	1,040	6,910±	0,9909	4,097±	2,419
Respiração Máxima	22,76±	4,760	16,81±	3,451	24,73±	3,150	19,87±	8,807
Capacidade de respiração reserva	10,69±	0,8080	8,102±	3,008	11,41±	1,519	12,86±	5,701
Respiração extramitocondrial	2,602±	0,8261*	0,2156±	0,1046	1,803±	0,7642*	0,9070±	0,7984

**Tabela 1**

Respiração do cérebro do peixe-zebra adulto. Consumo de oxigênio foi determinado em células intactas em diferentes dissociações teciduais ( $n=4$ ).

#### Conclusão

Os resultados de viabilidade celular e da função mitocondrial indicam que o grupo de dissociação mecânica com *pasteur* de vidro apresenta menor variabilidade entre todos os grupos testados, sugerindo este como melhor opção para a dissociação celular em relação às outras testadas no peixe-zebra.

#### Apoios