

“NÍVEIS FISIOLÓGICOS DAS COLINESTERASES SÉRICA E PLASMÁTICAS DE VACAS LEITEIRAS DA RAÇA HOLANDEZA”

ROMEO ERNESTO RIEGEL

I — INTRODUÇÃO

Já foi evidenciado que a acetilcolina é liberada nas terminações dos nervos parassimpáticos e que atua como transmissor sobre o órgão efetor a ser, especificamente, funciona como agente de propagação do impulso. Antes que outro impulso seja transmitido, a acetilcolina é hidrolizada pela acetilcolinesterase (Colinesterase) (TE et col., 1968).

“As colinesterases são sintetizadas e distribuídas largamente nos tecidos do sistema circulatório da maioria dos animais (TE et col., 1962).

“A importância da determinação da acetilcolinesterase no sêro, na clínica, vem sendo evidenciada por grande número de trabalhos existentes na literatura” (HARGREAVES & VA 1959); A este respeito — GORINA (1964), p. e., informa que há elevação da colinesterase em casos de miastenia grave, miotonia congênita e valores subnormais nas hipoproteinemias, hepatopatias e intoxicações por inseticidas do tipo alcoil-fosfato.

Notadamente as últimas duas situações teriam interesse em Clínica Veterinária, devido ao fato de os animais serem frequentemente objeto de medicação antiparasitária fosforada e estarem sujeitos a eventual ingestão de plantas hepatotóxicas. Todavia, para que este aspecto possa ser valorizado, é indispensável o conhecimento do nível da colinesterase que ocorre em condições fisiológicas.

Com este objetivo passou-se a executar o presente estudo visando determinar o nível fisiológico de colinesterase sérica de vacas leiteiras da Raça Holandesa, fixando não apenas a variável espécie mas, também, raça, sexo, idade, manejo, alimentação, forma de desfrute do animal e clima.

Quanto ao aspecto enzimológico, propriamente dito, existem provas irrefutáveis de que não se pode mencionar a atividade de uma enzima sem acrescentar sua origem por tecido e por espécie (SCRUTTON & UTTER, 1968).

(*) Professor Adjunto do Departamento de Química da UFSM.

II — MATERIAL E MÉTODOS

O material usado foi plasma ou sôro de homens — 21 a 23 anos de idade — e de vacas leiteiras da raça Holandesa, clinicamente sadias.

O sangue bovino — por punção da jugular — foi colhido em frascos esterilizados e deixado coagular à temperatura ambiente sendo, logo depois, acondicionado (caixa de estiropor contendo gelo). Dêste modo foi efetuado o transporte para o laboratório, distante 18 Km do local da coleta. Em se tratando de utilizar plasma, o sangue era heparinizado e pôsto, também, em caixa de estiropor contendo gelo. Qualquer que fosse a origem do plasma ou do sôro êles eram submetidos à centrifugação não refrigerada de 2 min. a 2.000RPM.

Para a dosagem titimétrica foi usada a seguinte técnica:

- A) Em Erlenmeyer de 125 ml colocar 20 ml de substrato (20 ml de Cl_2Mg 0,05 M + 20 ml de acetado de sódio 0,1 M + cloreto de acetilcolina 1,10 M + água destilada q. s. p. 200ml). Imergir o recipiente em Banho-Maria 38°C, deixando a temperatura equilibrar.
- B) Em 3 Erlenmeyer de 50ml colocar 5ml de acetona em cada. Marcá-los com as letras T_0 , T_4 e T_8 . *
- C) Adicionar ao Erlenmeyer de 125 ml, 1 ml de sôro e cronometrar o tempo. No fim de quatro minutos retirar 10 ml da mistura e adicionar ao Erlenmeyer T_4 . No fim de 8 minutos verter o conteúdo restante do Erlenmeyer de 125 ml no outro de 50 ml e marcado com T_8 .
- D) Ao Erlenmeyer marcado com T_0 adicionar 10 ml de substrato e por último, 0,5 ml de sôro.
- E) Titular os 3 Erlenmeyer com OHNa 0,01 N até a viragem da fenoftaleína.
- * F) Cálculo das unidades: $\frac{(T_4 - T_0) + (T_8 - T_0) \times 16,2}{2}$

T_0 , T_4 e T_8 = ml de OHNa gastos na titulação de cada Erlenmeyer de 50 NaOH ml marcado com T_0 , T_4 e T_8 respectivamente.

Para medir a atividade da Colinesterase pelo método de Michel incubou-se a 25°C, em um Becker de 10 ml, 1 ml de plasma diluído a 1/50 em água destilada + 1 ml de tampão Barbitol I. Depois de 10 minutos no Banho-Maria determinou-se potenciomêtricamente o pH. A êste valor chamou-se pH_1 . Em seguida foi acrescentado 0,2 ml de cloreto de acetilcolina 0,165 M. Uma hora mais tarde tornou-se a verificar o pH cujo valor designou-se pH_2 . A atividade da enzima é fornecida em $\Delta \text{pH/hora}$ calculado conforme a equação:

$$\Delta \text{pH/hora} = \frac{\text{pH}_2 - \text{pH}_1 - b}{t}$$

f, onde b e f são fatores de correção e t o tempo de incubação.

III — RESULTADOS

Por ambos os métodos tentou-se efetuar uma comparação entre os valores da colinesterase plasmática ou sérica presentes em homens e vacas leiteiras.

Antes procurou-se evidenciar os efeitos da centrifugação (2.000 rpm 2') e do transporte sôbre a colinesterase humana, uma vez que a centrifugação não era refrigerada e o material para dosagem em bovinos tinha que ser transportado desde uma distância considerável. Para isto, usando método titimétrico, dosou-se a enzima de sôros humanos submetidos e não submetidos à centrifugação e coletados no laboratório ou no local em que seriam coletadas as amostras bovinas. Os resultados estão na Tabela I.

* 1 — Unidade = 1 mg de acet. hidrolizada em 60 minutos.

TABELA I

MEDIDA DA COLINESTERASE DE SÔRO HUMANO SUBMETIDO OU NÃO À CENTRIFUGAÇÃO NÃO REFRIGERADA (2.000 RPM/2'). EFEITO DO TRANSPORTE.

Tipo de sôro	N.º de amostras	Atividade média	Valores extremos
Sem centrifugação	20	8,6 U	6,0—13,0
Com centrifugação	20	9,6 U	6,5—11,5
Com centrifugação coletado no laboratório	20	9,1 U	7,0—11,5
Com centrifugação coletado a distância	20	9,8 U	7,0—11,0

Aceitando-se que nem o transporte nem a centrifugação não refrigerada prejudicavam a atividade da enzima no sôro humano, extrapolou-se esta propriedade para o sôro bovino e passou-se a comparar os resultados de 24 amostras humanas com 27 amostras bovinas (TABELA II).

Por motivo de ser muito menor o resultado obtido no ruminante em estudo, procurou-se uma técnica que limitasse mais os possíveis erros de natureza pessoal. Para isto empregou-se o método de Michel e os resultados obtidos estão na TABELA II.

TABELA II

VALORES COMPARATIVOS DA COLINESTERASE PLASMÁTICA OU SÉRICA EM HOMENS E BOVINOS.

ESPÉCIE	Método	N.º de Amostras	Valor médio	Limites extremos
Humana	Titimétrico	24	8,55 U	6,35—11,20
Bovina	Titimétrico	27	1,63 U	0,00—3,67
Humana	Potenciométrico	20	Δ pH 0,956	0,556—1,53
Bovina	Potenciométrico	23	Δ pH 0,034	0,03—0,13

Como os índices obtidos foram, também, muito baixos suspeitou-se da inexistência da enzima no plasma bovino. A substituição do sôro por plasma, em bovinos, no método de Michel, não alterou, significativamente, o resultado expresso na Tabela II. Então trabalhando apenas com plasma, verificou-se a variação do pH em meios de incubação diferentes (TABELA III).

TABELA III

VERIFICAÇÃO DA COLINESTERASE PLASMÁTICA DE VACAS LEITEIRAS DA RAÇA HOLANDEZA EM VÁRIOS MEIOS DE INCUBAÇÃO MÉTODO DE MICHEL.

SISTEMA DE INCUBAÇÃO	N.º de amostras	Δ pH/h Médio
Tampão + H ₂ O + Substrato	10	0,060
Tampão + Sôro + H ₂ O	6	0,080
Tampão + Tampão + H ₂ O	6	0,030
Tampão + Tampão + Substrato	10	0,021
Tampão + Tampão + Tampão	7	0,025

IV — COMENTÁRIOS

A técnica titimétrica, inicialmente usada por ser simples e dispensar maior aparelhagem, demonstrou muito menores valores para a colinesterase de origem bovina em relação aquela existente no sôro humano. Por êste processo constatou-se que, em algumas amostras, o índice encontrado, para a enzima em estudo, tinha valor igual a zero. Se outro método confirmasse êste fato a dosagem da colinesterase, em vacas leiteiras da raça Holandesa, não teria finalidade clínica, uma vez que os valores baixos são os significativos nas hepatopatias. Por êste motivo passou-se a usar a técnica de Michel que, em relação à titimétrica, apresenta a vantagem de determinar a atividade da enzima por diminuição do pH medido em potenciômetro ao passo que a última técnica citada baseava-se na mudança de cor de uma solução, mudança esta determinada visualmente e, então, sujeita a erro pessoal.

Como no caso da dosagem por alcalimetria, pelo método potenciométrico compararam-se os índices da mesma enzima em plasma humano e bovino. Para plasma humano encontrou-se um Δ pH/hora de 0,956 contra 0,753 obtido pelo idealizador do método. Em bovinos foram, como na investigação precedente, muito mais baixos os valores achados, porém sem nenhum resultado nulo.

Como a média obtida foi muito baixa procurou-se verificar se mudando o esquema de incubação, omitindo algumas variáveis fundamentais, mudava também a média dos valores encontrados. (Tabela IV).

TABELA IV

VERIFICAÇÃO DA COLINESTERASE PLASMÁTICA DE VACAS LEITEIRAS DA RAÇA HOLONDEZA. EFEITOS DA [E], DA DESNATURAÇÃO E DOS ÍONS Mg ++ (Cl₂ Mg 0,05 M).

MATERIAL INCUBADO	N.º de Amostras	Δ pH/hora Médio
Plasma Normal	8	0,051
*_ Plasma Fervido	8	0,050
Plasma 1/50	9	0,118
Plasma com Cl ₂ Mg	6	0,097
Plasma sem Cl ₂ Mg	6	0,097

As tabelas III e IV mostram que há uma variação de pH semelhante em casos em que há falta de enzima ou de substrato e que a desnaturação térmica da enzima, do mesmo modo, não modificou o resultado. Foram, também, sem efeito o aumento da concentração da enzima ou a adição de cloreto de magnésio (limitante na determinação titimétrica).

* Em amostras de plasma humano: desnaturado Δ pH/hora = 0,10 e normal Δ pH/hora = 0,895.

V — CONCLUSÃO

Baseando-se nos dados expostos pode-se afirmar que nas amostras de sôro ou plasma, de vacas leiteiras da raça Holandeza, que foram examinadas, a colinesterase não foi observada ou, se desenvolvida, sua atividade foi baixa para ser detectada pelos métodos empregados.

VI — RESUMO

O autor investigou a presença de colinesterase em sôro e plasma de vacas leiteiras da raça Holandeza empregando os métodos de Michel e Titimétrico. Usando como padrão a atividade da enzima em homens, concluiu pela inexistência da mesmas nas amostras examinadas pelos métodos citados.

SUMMARY

Investigation was made about presence of colinesterase in serum and plasma of milk cattle (Dutch Race) by utilizing the methods of Michel and Titimetric.

Based on the activity of the enzyme in human bodies, what was utilized as standard, the auctor concluded on the inexistence of the enzyme in the samples examined by the indicated methods.

VII — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BACILA, M. et. col. — *Técnicas Atualizadas de Bioquímica Clínica*. Universidade do Paraná, 47, 1962.
- 2 — GORINA, B. A. — *La Clínica y El Laboratorio* — Editora Marin, Barcelona, 5.ª Edição, 1964, 437.
- 3 — HARGREAVES, A. B. & SILVA, M. G. — *Determinação Titimétrica da Colinesterase do Sôro Sanguíneo*. O hospital, 55, 100 (1959).
- 4 — SCRUTTON, M. C. & UTTER, M. F. — *The Regulation of Glicolysis and Gluconeogenesis in Animal Tissues*. Annual Review of Biochemistry, 37, 249 (1968).
- 5 — WHITE, A. et col. — *Principles of Biochemistry*. Editôra McGraw-Hill, New York, 4.ª Ed., 1968, 865.