

DETERMINAÇÃO DE COLINESTERASE EM SANGUE

1 - MÉTODO DE SÍLVA & MÍDIO (DE CAMPO)

Amostra

2,0 mL de sangue heparinizado

Material

- 1- Solução aquosa de acetilcolina 0,02 mol/L (de preparo recente)
- 2- Solução aquosa de ácido acético glacial 0,01 mol/L. Preparar solução de ácido acético 0,1 N e, a partir desta, a solução à 0,01 mol/L.
- 3- Solução de azul de bromotimol, pH 7,0 . Pesar 0,0454g de azul de bromotimol e dissolver em um máximo de 100 mL de água destilada e fervida ou Milli-Q. Ajustar o pH $7,05 \pm 0,02$ com solução de hidróxido de sódio à 0,1 mol/L .

Método

a) Preparação da escala de comparação de cores

1. Em um tubo de ensaio de 15 mL, adicionar 1,0 mL de solução alcalina de azul de bromotimol e 0,02 mL de sangue.
2. Em seguida adicionar ao tubo, volumes variados de solução de ácido acético (0,02 - 0,04 - 0,06 - 0,08 - 0,10 - 0,11 - 0,12 - 0,14 mL) .
3. Completar o volume da mistura com água destilada para 2,02 mL.
4. Cada diluição corresponde a uma diferente porcentagem de atividade enzimática, conforme tabela abaixo:

TUBOS	ÁC. ACÉTICO 0,01 mol/L	COR DA SOL.	% de ATIV. ENZIMÁTICA
1	0,00	azul amarelado	0,00
2	0,02		0,0 - 12,5
3	0,04		12,5 - 25,0
4	0,06		25,0 - 37,5
5	0,08		37,5 - 50,0
6	0,10	verde amarelado	50,0 - 62,5
7	0,11		62,5 - 75,0
8	0,12		75,0 - 87,5
9	0,13		87,5-100,0
10	0,14	Alaranjado	100,00

5. Recomenda-se a preparação no dia da análise.

b) Procedimentos para amostra

1. Colocar em um tubo de ensaio, 1,0 mL de azul de bromotimol, 0,02 mL de sangue de indivíduo não exposto e 1,0 mL de acetilcolina.
2. Marcar o tempo necessário para a solução atingir a coloração amarelada equivalente a 100 % de atividade enzimática.
3. O tempo obtido deve ser referência para indivíduos expostos, cujas amostras são

tratadas pelo mesmo procedimento.

4. É necessário considerar a temperatura local.

Interpretação

Se a porcentagem de atividade for menor que 75%, promover confirmação laboratorial.

2 - MÉTODO DE ELLMAN et al (espectrofotométrico)

Amostra

2,0 mL de sangue total heparinizado

Material

- Espectrofotômetro (comprimento de onda 430 nm); Microcentrífuga para hematócrito; Cronômetro.

Reagentes

- Tampão-fosfato pH $7,4 \pm 0,02$. Pesar 18,0g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 2,0g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e completar com água destilada até 500 mL.
- Substrato : 0,174g de **acetiltiocolina** em tampão-fosfato até 10 mL.
- Ditiobisnitrobenzoato (DTNB) : 0,099g de DTNB em tampão fosfato até 25 mL.

Método

a) Técnica para sangue total

1. Pipetar 9,0 mL de tampão fosfato pH 7,4 para um tubo de ensaio de 15 mL.
2. Juntar 10 μL de sangue total e homogeneizar.
3. Transferir 3,0 mL da suspensão acima para uma cubeta de amostra.
4. Adicionar 100,0 μL de DTNB à cubeta e, homogeneizar e zerar o aparelho.
5. Adicionar 50,0 μL de substrato à cubeta e cronometrar o tempo. Homogeneizar por inversão; obter a 1ª leitura após 30 segundos e a 2ª leitura após 3 minutos da primeira.

b) Técnica para o plasma

1. Pipetar 9,0 mL de tampão-fosfato pH 7,4 , para 1 tubo de ensaio de 15 mL.
2. Juntar 40 μL de plasma ao tubo. Homogeneizar.
3. Transferir 3 mL dos tubo para uma cubeta de amostra.
4. Adicionar 100 μL de DTNB à cubeta, homogeneizar e zerar o aparelho.
5. Adicionar 50 μL de substrato à cubeta da amostra, cronometrar o tempo, homogeneizar e realizar a primeira leitura em 30 segundos e a segunda após 3 minutos da primeira.

Determinação das atividades enzimáticas das colinesterases:

$$\Delta \text{Abv} = \text{Abv2} - \text{Abv1}$$

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta \text{Abv}}{\Delta t} \times \frac{\text{mL}}{v}$$

ΔAbv = variação entre as Abv1 e Abv2

Abv1 = absorvância da 1ª leitura

Abv2 = absorvância da 2ª leitura

Δt = tempo decorrido entre a 1ª e a 2ª leitura

v = volume da amostra considerando diluição

Colinesterase total (ST)

$$\text{Atividade ST} = \frac{\Delta \text{Abv}}{\Delta t} \times \frac{1000}{v}$$

$$\text{Atividade ST} = \Delta \text{Abv} \times 100$$

$$v = 3,33 \quad t = 3,0$$

$$10 \mu\text{L} \text{ ----- } 9,0\text{mL} \quad X=3,33$$

$$X \text{ ----- } 3,0 \text{ mL}$$

Colinesterase plasmática (PL)

$$\text{Atividade PL} = \frac{\Delta \text{Abv}}{\Delta t} \times \frac{1000}{v}$$

$$\text{Atividade plasmática PL} = \Delta \text{Abv} \times 25$$

$$v = 13,33 \quad \Delta t = 3,0$$

$$40 \mu\text{L} \text{ ----- } 9,0 \text{ mL} \quad X=13,33$$

$$X \text{ ----- } 3,0 \text{ mL}$$

Como a reação é feita à temperatura ambiente, a atividade deve ser corrigida, de acordo com a temperatura, fornecida pela tabela, da seguinte forma:

ST : atividade ST x fc

PL: atividade PL x fc

Colinesterase eritrocitária (E)

$$E = \frac{100}{\text{Ht}} \times \text{ST} - \text{PL} \left(1 - \frac{\text{Ht}}{100} \right)$$

onde :

E = atividade eritrocitária

Ht = hematócrito (adote 40%)

St = atividade sangue total

Pl = atividade plasmática

Interpretação

Os seguintes intervalos de valores são considerados normais:

ST = atividade colinesterásica do sangue total : 15,5 - 31,0

PL = " " do plasma : 1,3 - 7,8

E = " " eritrocitária 32,0 - 58

IBMP:

Eritrocitária: 30 % de depressão

Plasmática: 50% de inibição

Total: 25% de inibição

TABELA DE FATORES DE CORREÇÃO DE TEMPERATURA		
TEMPERATURA	FATOR DE SANGUE TOTAL	FATOR DE PLASMA
19,0	1,285	1,333
19,5	1,255	1,301
20,0	1,225	1,268
20,5	1,202	1,235
21,0	1,178	1,202
21,5	1,153	1,173
22,0	1,128	1,143
22,5	1,105	1,119
23,0	1,082	1,095
23,5	1,061	1,070
24,0	1,039	1,045
24,5	1,020	1,022
25,0	1,000	1,000
25,5	0,984	0,980
26,0	0,969	0,960
26,5	0,952	0,940
27,0	0,934	0,920
27,5	0,918	0,905
28,0	0,902	0,889
28,5	0,888	0,873
29,0	0,873	0,856
29,5	0,859	0,841
30	0,845	0,825

BIBLIOGRAFIA

1. ELLMAN, G.L. et al . *A new rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity* . Biochemic Pharmacol, v. 7, p. 88-95 , 1961.
2. SILVA, S.E. & MIDIO, F.A.- *Field Method for the determination of whole blood cholinesterases*. Med. Lav., 1995.