

**Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Ano Lectivo 2007/2008**

**Disciplina de BIOQUÍMICA I
Curso de MEDICINA
1º Ano**

ENSINO PRÁTICO E TEORICO-PRÁTICO

8ª AULA PRÁTICA

Determinação da actividade enzimática de colinesterases

Cinética enzimática

As enzimas catalizam a maior parte das reacções das vias metabólicas celulares (anabólicas e catabólicas) que permitem a manutenção da sobrevivência dos organismos. Com a excepção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com actividade catalítica, todas as enzimas são proteínas.

As enzimas catalizam as reacções celulares, aumentando a sua velocidade, sem no entanto afectarem o equilíbrio da reacção (a constante de equilíbrio da reacção, K_{eq} , é mantida). Para tal, as enzimas diminuem a energia de activação das reacções. As reacções catalizadas pelas enzimas ocorrem em locais específicos como o centro activo, um processo energeticamente favorável. Geralmente, o substrato liga-se à enzima (por interacções não-covalentes) ao nível do centro activo. A formação de um complexo substrato-enzima é fundamental para a actividade enzimática.

Assim, uma reacção enzimática simples pode representar-se por:



em que, E, S e P, representam, respectivamente, a enzima, o substrato e o produto.

A actividade das enzimas pode ser regulada através de cofactores ou coenzimas, componentes que se ligam à enzima (em locais diferentes do centro activo) e sem os quais a enzima não funciona. Um cofactor que se liga à enzima covalentemente designa-se por grupo prostético.

A velocidade inicial (V_0) de uma reacção pode ser relacionada com a concentração de substrato, tal como representado pela curva hiperbólica da Fig. 1A e pela **equação de Michaelis-Menten**:

$$(i) \quad V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

em que, V_0 é a velocidade inicial da reacção, $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima da reacção, $[S]$ é a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten. K_m é definido pelo valor da concentração de substrato para o qual a V_0 é metade da $V_{m\acute{a}x}$. A um valor de K_m mais baixo corresponde uma maior afinidade da enzima pelo substrato, uma vez que é necessária uma menor concentração do substrato para se obter o mesmo valor de V_0 .

A equação de Michaelis-Menten (i) pode ser transformada na equação de Lineweaver-Burk, e respectivo gráfico (Fig. 1B), permitindo determinar com precisão os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de uma determinada reacção enzimática.

Assim, a partir do inverso da equação de Michaelis-Menten (i) teremos:

$$(ii) \quad 1/V_0 = \frac{K_m + [S]}{V_{max}[S]} \quad , \text{ em que}$$

$$(iii) \quad 1/V_0 = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]} \quad e$$

$$(iv) \quad 1/V_0 = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (y = ax + b)$$

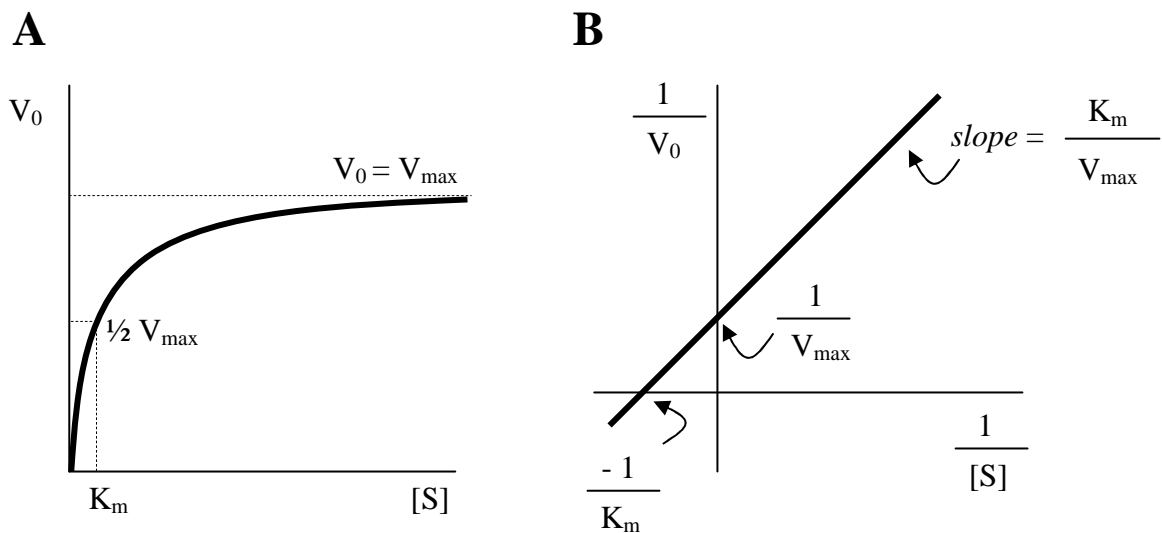


Fig. 1- Representação da cinética enzimática de acordo com a equação de Michaelis-Menten (A) e através do gráfico de Lineweaver-Burk ou de duplos inversos (B).

As colinesterases

Nos tecidos dos mamíferos existem múltiplas colinesterases (enzimas que catalizam a hidrólise de ésteres de colina) que não são específicas. Curiosamente, o interesse da sua utilização clínica não tem tido um paralelismo com o conhecimento da sua função fisiológica, tal como acontece com a enzima fosfatase alcalina.

Nos vertebrados têm sido definidas duas actividades hidrolíticas da acetilcolina:

1. Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (colinesterase 'verdadeira' ou esterase I da colina) é responsável pela degradação da acetilcolina nas junções neuromusculares ou nos terminais nervosos de neurónios da matéria cinzenta do cérebro e, ainda, em tecidos reconhecidos como não-colinérgicos, tais como as estruturas hematopoiéticas, os eritrócitos, os pulmões e o baço, onde se desconhece a sua função.

A biossíntese da acetilcolina faz-se a partir da colina e da acetil-CoA por acção da enzima colina acetiltransferase. A degradação da acetilcolina faz-se por hidrólise catalizada pela acetilcolinesterase, de que resulta a colina e o ácido acético (acetato). Na **Fig. 2** está representada a neurotransmissão colinérgica.

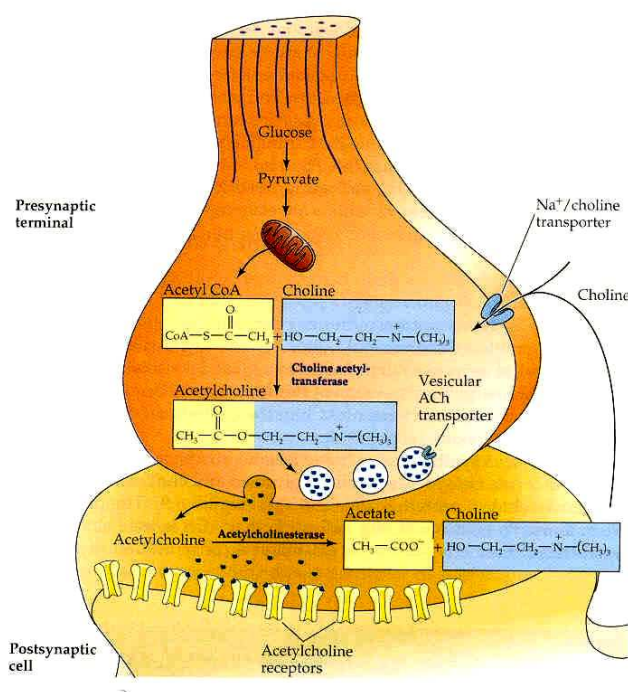


Fig. 2- Terminal nervoso colinérgico ao nível do sistema nervoso central. A enzima colina acetiltransferase é responsável pela síntese da acetilcolina, enquanto a acetilcolinesterase cataliza a hidrólise daquele neurotransmissor.

2. Butirilcolinesterase

A butirilcolinesterase (acil-hidrolase das acilcolinas ou esterase II da colina) encontra-se no plasma sanguíneo, no fígado, no pâncreas, no coração, na matéria branca do cérebro e em quase todos os tecidos, excepto nos eritrócitos.

Desconhece-se o significado fisiológico desta enzima, mas a determinação da sua actividade tem uma importância clínica muito grande ao nível, por exemplo, da detecção da inibição toxicológica (ex. por insecticidas) e como marcador de insuficiência hepática.

Interesse clínico da determinação plasmática das colinesterases

A determinação da actividade das colinesterases permite avaliar a função hepática, uma vez que o fígado é muito rico em colinesterases. Também permite avaliar a intoxicação por alguns insecticidas, pois estes diminuem não-competitivamente a sua actividade. A determinação da actividade da butirilcolinesterase pode ainda ser útil no diagnóstico de certos tumores malignos, asma brônquica e a tuberculose pulmonar.

As actividades plasmáticas da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase podem ser alteradas pelas hormonas sexuais. Na junção neuromuscular, a actividade da acetilcolinesterase é afectada pela testosterona e pela insulina.

Método de determinação da actividade das colinesterases

O iodeto de acetiltiocolina e o iodeto de butiriltiocolina são os substratos da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase, respectivamente, usados no protocolo desta aula prática. O produto corado formado (tiocolina) reage com o ácido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) ou DTNB também designado por reagente de Ellman, um reagente dos grupos tiol (-SH), formando um composto corado de amarelo (5-tio-2-nitrobenzóico ou TNB).

A actividade colinesterásica expressa-se em Unidades Internacionais (nas condições do ensaio, $1U = 1\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mL}^{-1}$) e calcula-se através da variação da absorvância ao longo do tempo em relação ao respectivo tubo referência, que contém um inibidor específico para cada uma das colinesterases.

O BW284C51 é um inibidor específico da acetilcolinesterase; a etopropazina é inibidor da butirilcolinesterase.

Ano Lectivo 2007/2008

BIOQUÍMICA I
1º Ano

PROTOCOLO DE BANCADA - 8ª AULA PRÁTICA

Procedimento experimental para determinação da actividade da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase no plasma:

Grupos 1 e 2- Determinação da actividade da **acetilcolinesterase (AcE)** no plasma:

Reagentes	Referência	Ensaio
Tampão	2,5 ml	2,55 ml
DTNB	100 µl	100 µl
Etopropazina	50 µl	50 µl
BW	50 µl	--
Amostra	200 µl	200 µl
Incubar 5 min		
Substrato	100 µl	100 µl

Seguir a variação da absorvância a 412 nm durante 5 minutos.

Absorvância t0'	Absorvância t3'	ΔA	$\Delta A/\text{min}$

Grupos 3 e 4- Determinação da actividade da **butirilcolinesterase (ButE)** no plasma:

Reagentes	Referência	Ensaio
Tampão	2,73 ml	2,78 ml
DTNB	100 µl	100 µl
Etopropazina	50 µl	--
Amostra	20 µl	20 µl
Incubar 3 min		
Substrato	100 µl	100 µl

Seguir a variação da absorvância a 412 nm durante 5 minutos.

Absorvância t0'	Absorvância t3'	ΔA	$\Delta A/\text{min}$

NOTA: A actividade plasmática da acetilcolinesterase é muito baixa comparativamente à butirilcolinesterase, pelo que não há necessidade de a inibir no ensaio da butirilcolinesterase.

CÁLCULOS

Determinar a variação de absorvância/minuto ($\Delta A/\text{min}$) para cada amostra:

$$\text{Actividade (U/l)} = \frac{\text{Vol ensaio (ml)} \times 10^9 \times \Delta A/\text{min}}{\text{Vol amostra } (\mu\text{l}) \times \epsilon}$$

Nota: $\epsilon = 13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
(coeficiente de extinção molar do 5-tio-2-nitrobenzóico, TNB, a 412 nm, pH=8,0)

VALORES NORMAIS no Plasma:

AcE: $10,4 \pm 3,0 \text{ U/l}$

ButE: $5,0 \pm 2,1 \text{ kU/l}$