

Aliesterase no sôro de alguns animais de laboratório

por

Maria Isabel Mello (*)

Os termos "lipase" e "esterase" são empregados indistintamente na literatura, ainda que estas enzimas sejam entidades separadas.

Em 1932, Cherry e Crandall propuseram o termo "lipase" para a enzima (ou enzimas) capaz de desdobrar as gorduras verdadeiras e os óleos, e o termo "esterase" para a enzima (ou enzimas) que agem sôbre ésteres simples. O emprêgo de substratos sintéticos e inibidores específicos trouxe um grande impulso na caracterização destas enzimas (1), (2), (3), (4), (5).

Recentemente, Adams e Whittaker conseguiram demonstrar que as enzimas que catalizam a hidrólise dos ésteres alifáticos tais como o butirato de metila e a tributirina, são "esterases alifáticas" ou "aliesterases". Diferem das "lipases" que ainda que possam hidrolizar triglicerides mais simples hidrolizam ácidos graxos de cadeias longas (6).

A "esterase", "aliesterase" é um constituinte normal do sôro, enquanto que a "lipase" não o é (Richter e Croft) (7).

Têm sido propostos para a determinação da lipase métodos biológicos, físicos e químicos (8), (9), (10).

Em 1947, Huggins e Lapidés publicaram um novo método químico para a determinação da "esterase" do sôro, "aliesterase". A enzima tamponada em pH ótimo, age sôbre o substrato, que é no caso um éster incolôr de para nitrofenol. A ação enzimática é determinada colorimetricamente baseada no teôr de para-nitrofenol libertado (11). No presente trabalho foi usado como substrato o propionato de para-nitrofenol.

É difícil encontrar na literatura valores normais para a "esterase" do sôro de animais de laboratório. Huggins e Moulton investigaram o modo de distribuição da esterase nos vários tecidos e no sangue do rato (12).

Procuramos então determinar os valores normais não só para o sôro do rato, como do hamster, cobaia e coelho.

(*) Laboratório de Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz.

MÉTODOS

Tôdas as amostras foram obtidas por punção cardíaca. A determinação da aliesterase foi feita pelo método de Huggins e Lapidés já descrita por nós em trabalho anterior ligeiramente modificado (13). O substrato usado foi o propionato de para-nitrofenol preparado pela técnica de Spasov (14) (§), e o sôro tamponado em pH 7.0. As leituras foram feitas no espectrofotômetro de Beckan e no comprimento de onda de 400 m μ . Tôdas as determinações foram feitas em 0.1 ml de sôro e em duplicata.

RESULTADOS

Foram encontrados dois padrões diferentes para a atividade esterásica do sôro do rato de acôrdo com o sexo.

É interessante notar que os valores obtidos com sôro de ratas fêmeas normais apresentam flutuações ligadas ao ciclo estral.

A média global foi de 11.6 ± 4.01 com um $E = 0.83$. O estudo em separado dos vários grupos evidencia a influência da fase estral sôbre o teôr da esterase no sôro. Os valores mais altos foram obtidos de ratas em proestro enquanto os animais em diestro apresentaram os menores valores. Estas variações poderão ser melhor observadas nos quadros I e II.

QUADRO II

ALIESTERASEMIA E FASE ESTRAL

FASES DO CICLO	N.º DE ANIMAIS	M	σ	E_M
Diestro.....	8	7.35	1.82	0.64
Proestro.....	7	15.54	2.25	0.86
Estro.....	4	14.75	1.25	0.65
Metaestro.....	4	10.075	1.00	0.50
TOTAL.....	23	11.6	4.01	0.83

Com se pode observar há uma diferença acentuada nos valores para a esterasemia nas várias fases do ciclo. Isto demonstra que a concentração da esterase no sôro encontra-se intimamente ligada à produção ou metabolismo

(*) Agradecemos ao Dr. Augusto Cid de Mello Perissé a preparação deste substrato.

QUADRO I
ALIESTERASE NO SORO DE RATOS NORMAIS (FEMEAS)

N.º	PESO	ALIESTERASE EM 1 ml DE SÔRO EM	d	d²
<i>Diestro</i>				
1.....	112	5.2	6.4	40.96
2.....	114	6.8	4.8	23.04
3.....	115	6.8	4.8	23.04
4.....	120	6.5	5.1	26.01
5.....	122	5.2	6.4	40.96
6.....	193	7.9	3.7	13.69
7.....	220	9.9	1.7	2.89
8.....	220	10.5	1.1	1.21
<i>Proestro</i>				
9.....	110	10.5	1.1	1.21
10.....	113	16.2	4.6	21.16
11.....	118	14.4	2.8	7.84
12.....	123	16.5	4.9	24.01
13.....	126	16.5	4.9	24.01
14.....	135	17.2	5.6	31.36
15.....	157	17.5	5.9	34.81
<i>Estro</i>				
16.....	120	16.2	4.6	21.16
17.....	124	15.5	3.9	15.21
18.....	127	13.5	1.9	3.61
19.....	137	13.8	2.2	4.84
<i>Metaestro</i>				
20.....	120	10.1	1.5	2.25
21.....	233	10.5	1.1	1.21
22.....	247	9.2	2.4	5.76
23.....	253..	10.5	1.1	1.21

$$M = \frac{\sum(x)}{N}$$

371.45

$$M = 11.6 \pm 4.01$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(d)^2}{N}} = 4.01$$

$$E_M \parallel \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0.83$$

dos estrogênios. Uma análise destes valores pela aplicação do test da significância demonstrará melhor essas variações:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{1/N_1 \pm 1/N_2}}$$

onde: M = valores médios
t = soma dos desvios
N = números de casos analisados,

$$\text{logo, } t = \frac{15,54 - 2,25}{2,19 \sqrt{1/8 + 1/7}} = 7,3$$

Calculado o *t* verifica-se então que a diferença é muito significativa demonstrando-se assim a influência da fase estral sobre a esterase do soro. Foi calculada também a variância total, variância entre os grupos e a variância dentro dos grupos. O quadro abaixo apresenta os resultados em resumo:

VARIANCIA

FONTE DA VARIAÇÃO	SOMA DE QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	VARIANCIA
Entre as médias dos grupos.....	302.3125	3	100,77083
Dentro dos grupos.....	69,1375	19	3.63881
TOTAL.....	371.45	22	—

$$F = \frac{100,77083}{3,638816} = 27,6$$

INTERPRETAÇÃO

Para $V_1 = 3$ e $V_2 = 19$, as tábuas de Snedecor dão um valor de *F* entre 3,10 e 3,16 no ponto de significância de 5%. O valor observado, ficando muito acima, é altamente significativo.

Tendo as ratas sido classificadas nos quatro grupos segundo o critério da fase do ciclo estral, conclue-se que as divergências entre as diversas médias da esterasesmia estão ligadas ao metabolismo estrogênico.

Os ratos machos normais apresentam valores mais baixos e uniformes como se pode vêr no quadro III.

QUADRO III
ALIESTERASE NO SORO DE RATOS NORMAIS MACHOS

N.º	PESO	ALIESTERASE EM 1 ml DE SORO	d	d ²
1.....	220	7.1	0.2	0.04
2.....	230	7.9	1.0	1.00
3.....	250	9.1	2.2	4.84
4.....	220	6.7	0.2	0.04
5.....	210	6.3	0.6	0.36
6.....	210	7.3	0.4	0.16
7.....	214	7.3	0.4	0.16
8.....	220	7.3	0.4	0.16
9.....	220	6.3	0.6	0.36
10.....	227	8.1	1.2	1.44
11.....	237	6.3	0.6	0.36
12.....	234	7.3	0.4	0.16
13.....	250	5.2	1.7	2.89
14.....	273	5.2	1.7	2.89
15.....	280	6.7	0.2	0.04

14.90

$$M = \frac{\sum(x)}{N}$$

$$M = 6.9 \pm 0.99$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(d)^2}{N}} = 0.99$$

$$E_M = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0.26$$

Afim de evidenciar melhor a influência do sexo sôbre a esterasemia, calculamos também o *t* com a média global obtida para as fêmeas tabeladas no quadro I e a média dos valores obtidos para os machos do quadro III:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{1/N_1 \pm 1/N_2}} = \frac{11.6 - 6.9}{\sqrt{3,27 / 1/15 + 1/23}} = 4.4$$

Donde se deduz que o valôr de *t* comparando os grupos macho e fêmea também é significativo.

Na cobaia notam-se diferenças nas médias. Os valores para as fêmeas foram mais ou menos constantes. Deve-se assinalar entretanto serem as

fêmeas usadas para estas dosagens, de apenas dois meses de idade e de procedências diversas. Os machos eram animais de 3 e 4 meses e todos pertencentes à mesma colônia.

Nos quadros IV e V encontram-se tabelados os valores obtidos.

QUADRO IV

ALIESTERASE NO SORO DE COBAIAS NORMAIS (FEMEAS)

N.º	PESO	ALIESTERASE EM 1 ml DE SÔRO EM	d	d ²
		<i>Diestro</i>		
1.....	230	4.52	0.02	0.0004
2.....	294	4.22	0.28	0.0784
		<i>Proestro</i>		
3.....	190	4.63	0.13	0.0169
4.....	199	4.57	0.07	0.0049
5.....	204	4.47	0.03	0.0009
6.....	206	4.47	0.03	0.0009
7.....	209	4.84	0.34	0.1156
8.....	211	4.52	0.02	0.0004
9.....	220	4.63	0.13	0.0169
10.....	227	4.30	0.20	0.0400
11.....	278	4.57	0.07	0.0049
12.....	178	4.73	0.23	0.0529
		<i>Estro</i>		
13.....	245	4.42	0.08	0.0064
14.....	247	4.52	0.02	0.0004
15.....	257	4.30	0.20	0.0400
16.....	280	4.42	0.08	0.0064
		<i>Metaestro</i>		
17.....	292	4.52	0.02	0.0004

0.3867

$$M_1 = \frac{\sum(x)}{N}$$

$$M_1 = 4.50 \pm 0.15$$

$$\sigma_1 = \sqrt{\frac{\sum(d)^2}{N}} = 0.15$$

$$E_{M_1} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0.036$$

QUADRO V

ALIESTERASE NO SORO DE COBAIAS NORMAIS (MACHOS)

N.º	PESO	ALIESTERASE EM 1 ml DE SORO	d	d²
1.....	377	3.94	0.34	0.1156
2.....	410	3.97	0.31	0.0961
3.....	410	4.00	0.28	0.0784
4.....	417	3.94	0.34	0.1156
5.....	444	4.42	0.14	0.0196
6.....	450	3.84	0.44	0.1936
7.....	468	4.31	0.03	0.0009
8.....	500	3.90	0.38	0.1444
9.....	185	4.21	0.07	0.0049
10.....	248	4.34	0.06	0.0036
11.....	268	4.31	0.03	0.0009
12.....	295	4.57	0.29	0.0841
13.....	300	4.52	0.24	0.0576
14.....	312	4.73	0.45	0.2025
15.....	315	4.47	0.19	0.0361
16.....	316	4.42	0.14	0.0196
17.....	376	4.90	0.62	0.3844

1.5579

$$M_2 = \frac{\sum x}{N}$$

$$M_2 = 4.28 \pm 0.30$$

$$\sigma_2 = \sqrt{\frac{\sum (d)^2}{N}} = 0.30$$

$$E_{M_2} = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0.073$$

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{1/N_1 \pm 1/N_2}} = \frac{4,50 - 4,23}{0,24 \times 0,34} = 2.6$$

Apesar dos valores apresentados pelas fêmeas serem pouco mais elevados, calculando-se o t verifica-se ser esta diferença significativa.

Para os hamsters e coelhos, foram calculados apenas as médias e desvios. Entretanto, nos quadros VI, VII e VIII podem ser apreciados os valores registrados para estes animais.

QUADRO VI

ALIESTERASE NO SORO DE COELHOS NORMAIS (MACHOS)

N.º	PESO	ALIESTERASE EM 1 ml DE SÔRO	d	d ²
1.....	1.800	4.34	0.07	0.0049
2.....	1.800	4.31	0.10	0.0100
3.....	1.880	4.71	0.30	0.0900
4.....	2.000	4.57	0.16	0.0256
5.....	2.120	4.15	0.26	0.0676
6.....	2.230	4.36	0.05	0.0025
7.....	2.420	4.34	0.07	0.0049
8.....	3.200	4.52	0.11	0.0121
				0.2176

$$M = \frac{\sum(x)}{N}$$

$$M = 4.41 \pm 0.16$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(d)^2}{N}} = 0.16$$

$$E_M = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0.058$$

QUADRO VII

ALIESTERASE NO SÔRO DE HAMSTERS NORMAIS (MACHOS)

N.º	PESO	ALIESTERASE EM 1 ml DE SÔRO	d	d ²
1.....	102	4.10	0.0	
2.....	103	4.21	0.11	0.0121
3.....	103	4.00	0.10	0.0100
				0.0221

$$M = \frac{\sum(x)}{N}$$

$$M = 4.10 \pm 0.085$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(d)^2}{N}} = 0.085$$

$$E_M = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0.049$$

QUADRO VIII

ALIESTERASE NO SORO DE HAMSTERS NORMAIS (FEMEAS)

N.º	PESO	ALIESTERASE EM 1 ml DE SORO	d	d ²
1.....	110	3.94	0.13	0.0169
2.....	76	3.49	0.32	0.1024
3.....	65	4.00	0.19	0.0361
				0.1554

$$M = \frac{\sum(x)}{N}$$

$$M = 3.81 \pm 0.227$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(d)^2}{N}} = 0.227$$

$$E_M = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} = 0.133$$

SUMÁRIO

A esterase, aliesterase, foi determinada no soro de 38 ratos de ambos os sexos, 6 hamsters, 34 cobaias e 8 coelhos, pela técnica de Huggins e Lapidés. Os resultados obtidos para os machos e fêmeas foram tabelados em separado. As fêmeas apresentaram uma esterasemia maior que os machos, com uma média global de 11.6 U/ml \pm 4.01 e um erro padrão de 0.83 enquanto que para os machos a média foi de 6.9 U/ml \pm 0.99 com um erro padrão de 0.26. A significância calculada pelo *t* foi de 4.4 Isto demonstra a interferência da aliesterase na produção ou no metabolismo dos estrogênios.

Os valores médios encontrados para as cobaias foram 4.50 U/ml \pm 0.15, com um erro padrão de 0.036 para as fêmeas e 4.28 U/ml \pm 0.30 com um erro padrão de 0.073 para os machos, sendo a significância (*t*) de 2.6.

Para os coelhos (machos) a média foi de 4.41 U/ml \pm 0.16, com um erro padrão de 0.058 enquanto para os hamsters os valores foram de 4.01

U/1 \pm 0.085, erro padrão de 0.049 para os machos e 3.81 U/ml \pm 0.227, erro padrão de 0.133 para as fêmeas.

Os animais castrados mostram uma diminuição progressiva da esterase no sôro, enquanto que nos castrados e tratados com estrogênios, êstes valores atingem o teôr normal. Os resultados obtidos nestes casos serão objeto de publicação ulterior.

Agradecemos ao Dr. Washington de Almeida a análise estatística do presente trabalho.