

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA
Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

NÍVEIS DE TRANSAMINASE GLUTÂMICO-OXALACÉTICA
(TGO), TRANSAMINASE GLUTÂMICO-PIRÚVICA (TGP) E
ACETILCOLINESTERASE EM LÍQUIDO CÉFALO-RAQUIDIANO
DE *Canis familiaris*

(NORMAL LEVELS OF GLUTAMIC-OXALACETIC AND GLUTAMIC-
PYRUVIC TRANSAMINASES AND ACETYLCHOLINESTERASE IN
SPINAL FLUID FROM *CANIS FAMILIARIS*)

MARINA T. R. MOURA
Instrutor

INTRODUÇÃO

A composição do líquido céfalo-raquidiano muito se assemelha à da plasma no que diz respeito às moléculas de baixo peso molecular, fato que não ocorre com as proteínas cuja concentração é muito mais alta no plasma do que no liquor, o que determina, em acôrdo com o equilíbrio de Gibbs-Donan, que maior concentração de cloretos no liquor substitua as proteínas plasmáticas.

Merecem especial discussão certos aspectos que dizem respeito às propriedades isosmóticas dos fluidos intra e extra celular do cérebro, onde a soma dos ânions simples e dos cátions é da ordem de 250 μ equiv., dentre o total de 300 μ equiv., mas, de acôrdo com o que assinala MCILWAIN (11), a distribuição entre ânions e cátions não é regular. Vê-se, assim, por exemplo, que entre o cérebro e o plasma ou o liquor, a concentração total de cátions, especialmente na forma de Na^+ e K^+ é o maior no cérebro, enquanto que a concentração de ion cloreto corresponde no plasma e no liquor a cerca de 65 a 85% dos ânions, fato que não ocorre com o cérebro. Dos ânions, os que em maior concentração se encontram no cérebro são os fosfatos orgânicos e os ácidos orgânicos, entre os quais o ácido N-acetil-L-aspartico (12). Do ponto de vista das proteínas é importante assinalar 40 μ equiv. do deficit é coberto pelas proteínas cerebrais.

É evidente que o problema do nível de proteínas liquóricas implica na importante questão da origem de tais proteínas, já que a circulação do líquido céfalo-raquidiano é ainda assunto controverso. Segundo as antigas observações de WEED (19), a maior absorção de líquido céfalo-raquidiano ocorre diretamente para o seio venoso dural por meio das "villi" aracnóides ou das granulações Pachionianas, situação que seria comum não só ao homem, mas a cães, gatos e macacos. Esse fato foi contestado por HASSIN (1947, 1958) (8, 9), que admite que a absorção do liquor se faz principalmente pelos espaços perineurais dos nervos cranianos e das raízes espinhais, enquanto que RASMUSSEN (1932) (16) admite que a absorção do líquido céfalo-raquidiano se faz ao nível dos vasos sangüíneos de paredes finas da membrana aracnóide.

Segundo CORNELIUS (1963) (5), a absorção do liquor em animais domésticos é problema que necessita maiores esclarecimentos. Entretanto, ao que se supõe de estudos comparativos conhecidos, o plexo coróide, formado pelos vasos meningeos ou da pia, é considerado a principal fonte de liquor, enquanto que os vasos cerebrais suprem o tecido nervoso propriamente dito. Segundo CORNELIUS (1963) (4), já que não há verdadeiramente sistema linfático no cérebro, qualquer excesso do fluido intersticial retorna ao fluido subaracnoideano por intermédio dos canais perivasculares que deixam a pia, acreditando-se que tais espaços perivasculares tenham continuidade com os espaços perineurais.

No presente trabalho são apresentados estudos em cães referentes a dois grupos de enzimas de reconhecida existência no plasma, as transaminases e a acetilcolinesterase.

No que se refere a enzimas liquóricas em animais domésticos, há raras referências, como a da pesquisa da diástase, fosfatase ácida e de fosfatase alcalina em bovinos e eqüinos procedidas por KOLB e HIEPPE (1955) (10), o que por si só justificaria ampla investigação sobre o assunto.

Assim, é objetivo do presente trabalho mostrar resultados iniciais obtidos com a pesquisa sobre enzimas liquóricas de animais domésticos, no caso o cão. Foram feitos ainda, determinação de proteínas totais e de alfacetoácidos, dada a pertinência de ambos com os estudos procedidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 30 cães, machos e fêmeas, sem raça definida, com diferentes idades.

Para a obtenção do liquor, os cães eram anestesiados, empregando-se para tal Pentobarbital sódico em solução aquosa a 3%, na dose de aproximadamente 1 ml/kg de peso. A punção para ex-

tração do líquor foi através a cisterna magna, com agulha de 45 x 10. O animal colocado em decúbito lateral, depilada a área compreendida entre o limite posterior da crista do occipital e segunda e terceira vértebra cervical. Com a mão engloba-se o nasal e com a agulha procura-se o ponto de cruzamento entre a linha que parte na direção da crista do occipital e outra situada transversalmente entre a protuberância externa do occipital e o corpo do atlas. Ao mesmo tempo em que a agulha é introduzida, desloca-se a cabeça na direção ventral. As quantidades de líquor obtidas variaram de 1,6 a 9,0 ml.

TABELA I — Níveis de proteínas totais no líquor.

Método de Bücher				Método do Biureto	
Animal	Líquor (mg/ml)	Animal	Líquor (mg/ml)	Animal (mg/ml)	Líquor
1	0,36	16	0,33	2	0,25
2	0,41	17	0,21	3	0,25
3	0,29	18	0,20	6	0,45
4	0,31	19	0,25	7	0,45
5	0,20	20	0,25	9	0,45
6	0,24	21	0,18	12	0,48
7	0,18	22	0,28	27	0,15
8	0,29	23	0,28	28	0,60
9	0,27	24	0,33	29	0,15
10	0,20	25	0,22	30	0,48
11	0,19	26	0,28	—	—
12	0,24	27	0,24	—	—
13	0,30	28	0,25	—	—
14	0,28	29	0,20	—	—
15	0,30	30	0,18	—	—

$\bar{x} = 0,24$
 $s = 0,011$

$r = - 0,517$
 $z = - 0,33$

$\bar{x} = 0,371$
 $s = 0,1092$

Para a elaboração do método do biureto foi estabelecida uma curva padrão a partir da determinação de um "pool" de soro de cão (10 amostras). A padronização do "pool" de soro foi feita pelo método do MicroKjeldahl. Para cada um dos 6 pontos da curva, usou-se quantidades decrescentes de soro padronizado: 0,2; 0,1; 0,05; 0,02; 0,01; 0,005 cm de água destilada: 0,8; 0,9; 0,95; 0,98; 0,99; 0,995. Pelo que foi obtido na padronização do "pool" de soro, foi possível estabelecer as quantidades de proteínas totais na tomada de amostras, assim, para cada tubo tivemos: 19,2; 9,6; 4,8; 1,92; 0,96; 0,48 mg. As leituras das absorbâncias, após adicionamento de reativo do biureto, foi feita no Eletrofotômetro de Fisher, com os seguintes valores: 0,194; 0,199; 0,081; 0,058; 0,051 e 0,041.

1) *Determinação de proteínas totais* — Proteínas totais foram determinadas pelo método do biureto, segundo as indicações de BACILA e FARIA (1956) (3) e de BACILA *et col.* (1962) (2).

O método do biureto foi padronizado mediante o uso de um "pool" de sôro de cães, pelo método do microkjeldahl, usando-se, para tanto, um "pool" de 10 amostras de sôro de cão. A curva padrão foi constituída em base ao conteúdo de proteínas totais de amostra, medida pelo microkjeldahl (tabela I).

As proteínas totais foram também determinadas pelo método de BUCHER (1947) (1), procedendo-se à seguinte adaptação.

TABELA II — Níveis de TGO e TGP no liquor de *Canis familiaris*

Animal	TGO	TGP	Animal	TGO	TGP
1	18,0	3,0	16	40,0	1,0
2	30,0	5,0	17	36,0	8,0
3	25,0	3,0	18	64,0	10,0
4	27,0	12,0	19	14,0	8,0
5	50,0	5,0	20	33,0	8,0
6	46,0	3,0	21	25,0	8,0
7	28,0	11,0	22	32,0	3,0
8	80,0	6,0	23	32,0	3,0
9	25,0	6,0	24	41,0	3,0
10	91,0	10,0	25	28,0	8,0
11	36,0	10,0	26	23,0	32,0
12	10,0	12,0	27	30,0	3,0
13	36,0	6,0	28	33,0	12,0
14	36,0	11,0	29	36,0	6,0
15	32,0		30	24,0	11,0

$\bar{x} = 34,89$
s = 12,13

$\bar{x} = 7,93$
s = 7,32

z = 2,46
r = 8,8

Para a determinação de TGO e TGP foi estabelecida uma curva da seguinte maneira: em 5 tubos de ensaio adicionou-se em quantidades decrescentes de sub-tractos de TGO e TGP, respectivamente; as quantidades foram de 1,0 ml a 0,5 ml; a seguir, com exceção do 1.º tubo, adicionou-se em quantidades crescentes de 0,1 a 0,5 ml uma solução de piruvato de sódio 2 ml, em todos os tubos colocou-se 0,2 ml de água destilada e 1,0 ml do reativo 2-4-dinitrofenilhidrazina, agitou-se, os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 20 minutos; após este tempo, adicionou-se 10,0 ml de NaOH 4N a todos os tubos. A medida de absorbância foi feita no Eletrofotômetro de Fischer com filtro verde.

A uma alíquota de líquido (0,2 ml), adiciona-se água destilada até volume final de 1,5 ml de uma solução de 0,6 M de sulfato de amônio. Determina-se a densidade óptica a 340 m μ . Adiciona-se, então, 0,05 ml de solução a 5% de ácido tricloroacético e após repouso de 10 minutos, determina-se novamente a densidade óptica a 340 m μ . Toma-se, então, a densidade óptica e emprega-se a expressão.

$$\text{mg/ml} = \frac{\text{D.O.} \times 0,33}{\text{volume da amostra}}$$

2) *Determinação de transaminases* — Transaminases glutâmico-oxalacética (TGO) e glutâmico pirúvia (TGP) foram determinadas em líquido segundo a técnica de REITMAN e FRANKEL (1957) (15).

3) *Determinação de alfa-ceto-ácidos* — A fim de determinar a concentração de alfa-ceto-ácidos em líquido foi usado sistema contendo 0,2 ml de líquido, 1,0 ml de reativo de 2-4-dinitrofenilhidrazina e 10,0 ml de solução de NaOH 0,4 N. Após a adição do reativo 2-4-dinitrofenilhidrazina, seguiu-se repouso de 20 minutos à temperatura ambiente e 10 minutos após a adição de NaOH, a cor desenvolvida foi lida em eletrofotômetro de Fischer com filtro verde.

4) *Determinação de Acetilcolinesterase* — Foi usado o método proposto por MITCHEL (1949) (12). Os reativos usados foram o Tampão barbital e o substrato constou de solução de cloreto de acetilcolinesterase a 3,0% (0,165 M).

5) *Métodos e análise estatística* — De todos os dados obtidos foi procedida análise estatística para cálculo das médias (\bar{x}), desvio padrão (s), índice de correlação (r) e teste de significância (z).

DISCUSSÃO

A análise estatística dos dados apresentados demonstra que os valores da média e do desvio padrão para proteínas totais nos métodos de Bucher e do Biureto são respectivamente

$$\begin{array}{ll} \bar{x} 0,26 \text{ mg/ml} & \text{e } \bar{x} 0,371 \text{ mg/ml.} \\ s 0,011 & s 0,1092 \end{array}$$

É evidente que tal discrepância é puramente acidental e se relaciona à sensibilidade de cada método, já que segundo as determinações de VOGEL, RUSSO e SILVA (1951) (18) corresponderam a 27,5 mg/100 ml, o que está de acordo com o obtido pelo método de Bucher no presente caso e que é da ordem de 26 mg/100 ml.

TABELA III — Níveis de alfa-ceto-ácidos em liquor de *Canis familiaris*

Animal	Ácido pirúvico (mg/100 ml)	Animal	Ácido pirúvico (mg/100 ml)
1	7,0	16	11,5
2	7,5	17	8,5
3	10,0	18	9,0
4	12,0	19	11,5
5	8,0	20	10,5
6	3,0	21	7,0
7	14,0	22	10,0
8	7,5	23	11,0
9	2,0	24	10,0
10	11,0	25	10,5
11	8,5	26	8,0
12	7,0	27	11,0
13	8,5	28	7,5
14	6,0	29	12,5
15	12,0	30	5,0

$\bar{x} = 8,91$	$r = 8,8$	alfacetoácido/TGO
$s = 8,48$	$z = 2,46$	$r = - 6,9$
		$z = - 2,66$
		alfacetoácido/TGP
		$r = 0,0119$
		$z = 0,21$

Para a determinação de alfa-cetoácidos foi estabelecida uma curva da seguinte maneira: em 6 tubos de ensaio adicionou-se em quantidades decrescentes de água destilada os valores: 1,15, 1,10, 1,00, 0,90, 0,80 e 0,70 ml; de piruvato de sódio 2 mM, foram adicionados 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 e 0,50 ml a cada um dos 6 tubos. Em todos os tubos foi colocado 1,00 ml de 2-4-dinitrofenilhidrazina; foi feita agitação dos tubos e deixado repousar à temperatura ambiente por 20 minutos; após este tempo adicionou-se 10,0 ml de NaOH 4N a cada tubo e feita a leitura de absorvância no Eletrofotômetro de Fischer com filtro verde; os resultados obtidos foram os seguintes: 0,043; 0,083; 0,152; 0,237; 0,323; 0,392.

O fato das concentrações de alfa-ceto-ácidos no liquor e no sôro — 8,91 mg e 9,21 mg — serem muito próximas, permite admitir que os alfa-ceto-ácidos são livremente difusíveis, de modo que uma possível hipercetoacidorraquia deve ocasionar elevação da taxa

dos referidos compostos no sangue, o reverso desta observação sendo, também, verdadeiro. É importante considerar o caso do ácido fenilpirúvico, cuja concentração no sangue aumenta muito na chamada oligofrenia fenilpirúvica. No que diz respeito às proteínas enzimáticas, no nosso caso — transaminases e acetilcolinesterase — merece destaque a discussão referente à origem destas enzimas. Segundo MOURA (1967) (14), há sensível diferença entre os níveis de TGO e TGP no soro e no liquor, onde a relação de TGO soro/liquor é de 2,7 e para TGP é de 1,7; sendo que para a acetilcolinesterase a relação é de 1,4. Haveria então uma possível partição destas enzimas entre soro e liquor.

TABELA IV — Níveis de acetilcolinesterase em liquor de *Canis familiaris*

Animal	pII/hr	Animal	pH/hr
1	0,023	16	0,046
2	0,021	17	0,052
3	0,033	18	0,039
4	0,033	19	0,041
5	0,031	20	0,041
6	0,031	21	0,028
7	0,037	22	0,039
8	0,033	23	0,041
9	0,038	24	0,043
10	0,048	25	0,039
11	0,043	26	0,023
12	0,046	27	0,047
13	0,029	28	0,047
14	0,037	29	0,047
15	0,037	30	0,033
$\bar{x} = 0,038$		$s = 0,044$	

Para o caso da desidrogenase láctica, WROBLEWSKI, DECKER e WROBLEWSKI (1957) (20) haviam afirmado que não há padrão definido para a porção dessa enzima pelo menos entre liquor e soro. Por outro lado, a observação de FLEISHER e WAKIN (1956)

(7) da não transferência de transaminases do sôro para o liquor em casos de necrose hepática e que transferência de variáveis quantidades dominam no caso de enfarte cerebral, falam a favor da possibilidade de que as transaminases liquóricas se originam do sistema nervoso central, possibilidade que já havia sido aventada para o caso da colinesterase em líquido céfalo-raquidiano por TOWER e MCEACHERN (1949) (17) e COLLING e ROSSITER (1949) (6) para acetilcolinesterase. Essa dúvida, entretanto, persiste para o caso das transaminases, apesar da observação de FLEISHER e WAKIN (1956) (7), já que as relações são apreciáveis, considerando que para TGO é de 2,7 e TGP 1,7, o que sugere que pelo menos no primeiro caso se conte a possibilidade de que a enzima liquórica se interrelacione com a do sôro.

Deve-se lembrar, entretanto, que as reações de transaminases que se desenvolvem no cérebro são extremamente ativas e, dentre elas, a que se realiza entre o ácido glutâmico, e o ácido pirúvico apresenta velocidade de reação da ordem de 7000 moles rúvico apresenta velocidade de reação da ordem de 7000 moles/g tecido/hora. A concentração elevada de enzimas no cérebro induz a prever que, pelo menos no caso da acetilcolinesterase, a principal fonte para o liquor está na matéria celular do cérebro.

SUMÁRIO

São estudadas as concentrações de proteínas totais e determinados os níveis de transaminase glutâmico-oxalacética, transaminase, glutamic-pyruvate transaminase and α -ketoacids were de líquido céfalo-raquidiano de cão.

SUMMARY

The author has studied the total protein concentration of spinal fluid from dogs. The levels of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvate transaminase and α -ketoacids were determined.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUCHER, T. — 1947 — Ueber ein phosphatuebertragendes gaerungsferment. *Biochim. biophys.*, Amsterdam, 1:292.
2. BACILA, M. & col. — 1962 — Técnicas atualizadas de bioquímica clínica. Curitiba, Imprensa da Universidade do Paraná.

3. BACILA, M. & FARIA, A. M. — 1956 — Guia de trabalhos práticos de bioquímica e patologia geral. Curitiba, Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade do Paraná.
4. CORNELIUS, C. E. & KANEKO, J. J. — 1963 — Clinical biochemistry of domestic animals. New York, Academic Press.
5. CORNELIUS, C. E. — 1963 — Cerebrospinalfluid. In CORNELIUS, C. E. & KANEKO, J. J. — Clinical biochemistry of domestic animals. New York, Academic Press.
6. COLLING, K. G. & ROSSITER, R. J. — 1949 — Cholinesterases of cerebrospinal fluid-data for normal fluids and fluid from patients with syphilis, meningitis, or poliomyelitis. *Canad. J. Res., V. E.*, 27:327-340.
7. FLEISHER, G. A. & WAKIN, K. G. — 1956 — Proc. staff meetings Mays Clin. 31, 1964. In CORNELIUS, C. E. & KANEKO, J. J. — 1963 — Clinical biochemistry of domestic animals. New York, Academic Press. p. 397.
8. HASSIN, G. B. — 1947 — *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 6:172.
9. HASSIN, G. B. — 1948 — *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 7:162.
10. KOLB, E. & HIEPPE, T. — 1955 — Zentr. Veterinarmed. 2:583. In CORNELIUS, C. E. & KANEKO, J. J. — 1963 — Clinical biochemistry of domestic animals. New York, Academic Press.
11. McILWAIN, H. — 1966 — Biochemistry and the central nervous system. 3rd. ed. London, Churchill.
12. MICHEL, H. O. — 1949 — An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. clin. Med.*, 34:1564.
13. MOURA, M. T. R. — 1967 — Estudo sobre a correlação entre constituintes enzimáticos do soro e do líquido céfalo-raquidiano de *Canis familiaris*: 21-22. Tese apresentada para concorrer ao título de Mestre. São Paulo.
14. MOURA, M. T. R. — 1967 — Estudo sobre a correlação entre constituintes enzimáticos do soro e do líquido céfalo-raquidiano de *Canis familiaris*: 23-24. Tese apresentada para concorrer ao título de Mestre. São Paulo.
15. REITMAN, S. & FRANKEL, S. — 1957 — A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Amer. J. clin. Path.*, 28:56.
16. RASMUSSEN, A. T. — 1932 — The principal nervous pathway. New York, MacMillan.

17. TOWER, D. B. & McEACHERN, D. — 1949 — The content and characterization of cholinesterases in human cerebrospinal fluid. *Canad. J. Res. E.*, 27:132-145.
18. VOGEL, J.; RUSSO, E. & SILVA, M. I. — 1951 — Preliminary note on the cerebrospinal fluid of the dog. *Rev. Milit. Remonta Vet.*, Rio de Janeiro, 11:19-26.
19. WEED, L. H. — 1923 — *Am. J. Anat.*, 31:191.
20. WROBLEKSKI, F.; DECHER, B. & WROBLEWSKI, R. — 1957 — *Am. J. clin. Path.*, 28:269.