

## ATIVIDADE DE COLINESTERASE SÉRICA COMO FATOR PROGNÓSTICO EM CÃES COM CÂNCER – DADOS PRELIMINARES

AZEVEDO, C. B. G.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, R. T.<sup>2</sup>; OLIVEIRA, L. O.<sup>3</sup>; BECKER, T. M.<sup>4</sup>; KOLLER, P. R.<sup>5</sup>; YAMAZAKI, P.<sup>6</sup> TOURRUCOO, A.C.<sup>6</sup>

### RESUMO

A colinesterase é uma enzima encontrada de duas formas no organismo. A colinesterase verdadeira é encontrada nos eritrócitos, dendritos, pericárdio e axônios dos neurônios colinérgicos. A colinesterase presente no soro ou plasma é a pseudocolinesterase (PCHE). Foi demonstrada em humanos, a redução da atividade de PCHE em pacientes oncológicos em relação a grupos controle sadios (KHAN et al., 1991; CHOUGULE et al., 2008), assim como, níveis inferiores em pacientes acometidos de tumores de maior malignidade em relação a acometidos com tumores benignos ou menos agressivos (KHAN et al., 1991). Também foi demonstrado em humanos, o aumento da sua atividade quando a terapia instituída é adequada (CHOUGULE et al., 2008), tornando-se assim, um fator prognóstico usual (MALTONI et al., 1997; BESSMEL'TSEV et al., 1999; HAMAMOTO et al., 2004). No presente trabalho, foram coletadas, 61 amostras de sangue de cães, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, apresentando diferentes tipos de tumores malignos e dosadas as PCHE pelo método cinético, usando como substrato a butirilcolina, a fim de traçar um perfil prognóstico. Os valores de referência estão entre 2195 e 4143U/L (Saccaro, 2007). Foi observada uma redução deste valor em 21 casos (34,42%) e 40 casos (65,57%) tiveram os níveis de colinesterase dentro da normalidade em um período de dois meses. O trabalho tem como objetivo instituir a dosagem de colinesterase na rotina da clínica oncológica para fins de estimativa do prognóstico do animal.

### ABSTRACT

The enzyme cholinesterase is found in two forms in the body. The cholinesterase true is found in red blood cells, **dendrites**, pericardium and **axons** of cholinergic neurons. The cholinesterase present in serum or **plasma** is the pseudo-cholinesterase (PCHE). It has been demonstrated in humans, the reduction in activity of PCHE in cancer patients regarding healthy control groups (KHAN et al., 1991; CHOUGULE et al., 2008), as well as lower levels in patients with greater malignancy compared with carriers of benign tumors or less aggressive types (KHAN et al., 1991). It was also demonstrated in humans, the increased activity when the established therapy is appropriate (CHOUGULE et al., 2008), thus becoming a prognostic factor usual (MALTONI et al., 1997; BESSMEL'TSEV et al., 1999; HAMAMOTO et al., 2004). In this work, were

---

<sup>1</sup> Acadêmica da Faculdade de Veterinária da UFRGS

<sup>2</sup> Professora Adjunta das Disciplinas de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS

<sup>3</sup> Médica Veterinária do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS

<sup>4</sup> Acadêmica da Faculdade de Veterinária da UFRGS

<sup>5</sup> Acadêmica da Faculdade de Veterinária da UFRGS

<sup>6</sup> Veterinária Residente do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS

collected, 61 blood samples from dogs, attended at the **Hospital de Clínicas Veterinárias** from UFRGS, featuring different types of malignant tumors and dosed the PCHE by kinetic method, using as a substrate butirilcolina in order to draw a profile prognosis. The reference values are between 2195 and 4143U / L (Saccaro, 2007). There was a reduction of this figure in 21 cases (34.42%) and 40 cases (65.57%) had levels of cholinesterase within the normal range in a period of two months. The work aims to establish the dosage of cholinesterase in the routine of clinical oncology for estimating the prognosis of the animal.

## INTRODUÇÃO

As colinesterases são enzimas que por hidrólise inativam acetilcolina, propionilcolina e butirilcolina. Existem dois tipos de colinesterases, a colinesterase verdadeira, específica ou eritrocitária, encontrada nos dendritos, pericárdio e axônios dos neurônios colinérgicos (FANTONI, 2002). Tem atividade sobre acetilcolina e propionilcolina, mas não hidrolisa butirilcolina (TECLES, 2000). A outra variedade de colinesterase é a pseudocolinesterase, esterase sérica, colinesterase inespecífica ou butirilcolinesterase. Esta, hidrolisa butirilcolina em taxas maiores que propionilcolina e ainda age sobre acetilcolina, porém em baixa velocidade (TECLES, 2002). É encontrada em células gliais, no plasma ou soro e no fígado. Seu papel fisiológico ainda não foi totalmente esclarecido (FANTONI, 2002).

Foi demonstrada em humanos, a redução da atividade de PCHE em pacientes oncológicos em relação a grupos controle sadios (KHAN et al., 1991; CHOUGULE et al., 2008). Pacientes portadores de tumores malignos tinham a atividade de PCHE inferior à atividade de pacientes com tumores benignos (KHAN et al., 1991), sendo o baixo nível de PCHE relacionado a um pior prognóstico (MITSUNAGA et al., 2008). Foi constatado também, que os níveis de PCHE aumentam nos pacientes oncológicos em que foi instituída uma terapia adequada (CHOUGULE et al., 2008) e permanecem os mesmos ou aumentam em casos de resistência a quimioterapia por exemplo (BESSMEL'TSEV et al., 1999). Assim sendo, a dosagem de colinesterase é hoje, em humanos, um fator prognóstico (MALTONI et al., 1997; BESSMEL'TSEV et al., 1999).

O presente trabalho tem como objetivo, analisar o comportamento da atividade de PCHE em cães portadores de tumores malignos e observar se ocorre aumento da sua atividade no caso de instituição de terapias eficazes e como em humanos, instituir a dosagem de PCHE como um marcador prognóstico bioquímico na clínica oncológica de cães.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foi coletado sangue de 61 cães portadores de diferente tipos de tumores malignos na ocasião das consultas no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS. Entre os tipos tumorais que acometiam os animais havia fibrossarcomas, mastocitomas, hemangiossarcomas, condrossarcomas, carcinomas, linfomas, melanomas e osteossarcomas, sendo eles nas mais diversas localizações, graus de estadiamento e tempos de existência.

As amostras foram coletadas em frascos sem anticoagulante na quantidade mínima de um ml e levadas ao **laboratório**, onde, após formação de coágulo,

foram centrifugadas **durante** cinco minutos em centrífuga de 3000 RPM, modelo Quimis 222T18, com posterior separação do soro da amostra em eppendorfs.

Para determinação de atividade de colinesterase foi utilizado o método cinético de Ellman, que é baseado na taxa de hidrólise de substrato pela colinesterase presente na amostra. Foi utilizado o kit comercial do laboratório argentino Wiener, com espectofotometria em uma longitude de onda de 405 nm e butirilcolina como substrato.

O kit fornece um frasco de solução de tampão fosfato para pH final de 7,7 e frascos individuais para cada mensuração contendo iodeto de S-butilcolina e como catalizador o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) dessecados, que são reconstituídos na ocasião da utilização com a solução tampão. Estes reagentes são estáveis sob refrigeração de 2 a 10°C para seu armazenamento. Em uma cubeta mantida a uma temperatura de 25°C é colocado 1,5 ml do substrato reconstituído e 10 µl da amostra. Mistura-se e imediatamente lê-se a absorbância. O cronômetro é disparado e em 30, 60 e 90 segundos após a primeira leitura, lêem-se novamente as absorbâncias. Os valores de cada absorbância são subtraídos dos valores anteriores e é feita a média aritmética que é multiplicada pela constante 22.710. Este cálculo fornece a concentração de colinesterase no soro em U/l.

Existem poucos estudos a respeito dos níveis de referência da atividade de colinesterase em cães. Os valores de referência utilizados na análise estão entre 2195 e 4143U/L segundo Saccaro (2007) que utilizou o mesmo método em dez cães do sexo masculino, sem raça definida com idade entre 2 e 5 anos, peso entre 5 e 15Kg e que nunca tivessem entrado em contato com agentes anticolinesterásicos como os organofosforados por exemplo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra em quantos dos 61 animais portadores de tumores malignos tiveram inicialmente a atividade de colinesterase abaixo do valor normal para cães (2195 U/L) (Saccaro, 2007), que foram 21 casos (34,42%) e destes, quantos estão em bom estado geral e com regressão das neoplasias, e quantos estão piores, vieram a óbito ou foram eutanasiados. A tabela também revela os pacientes com nível de colinesterase normal, que foram 40 casos (65,57%), e destes, quantos realmente estão bem e quantos pioraram, vieram a óbito ou foram eutanasiados.

Em 9 casos (14,75%) não houve retorno do paciente e os proprietários não mantiveram contato com a equipe, por isso, não se tem conhecimento sobre o estado de saúde e tampouco sobre a evolução das neoplasias destes animais. É importante ressaltar que o tempo decorrido entre as coletas e o relato do presente trabalho é de dois meses, o que provavelmente seja um período muito curto para avaliar as respostas aos tratamentos, as pioras e os tempos de sobrevida. Este curto período talvez seja a razão pela qual os dados da tabela divergem dos dados propostos na literatura, uma vez que, pacientes com baixos níveis de colinesterase possuem um pior prognóstico (MITSUNAGA et al., 2008). Até o momento, 42,85% dos animais com baixa atividade de colinesterase estão em bom estado geral e tendo a redução das neoplasias. Por essa razão, existe a necessidade de continuidade deste estudo em ir avaliando o estado clínico destes animais por um período maior de tempo.

No caso dos pacientes com atividade normal de colinesterase, 67,50% estão em bom estado geral e com boa resposta às terapias instituídas, o que era esperado, segundo a literatura (MALTONI et al., 1997; BESSMEL'TSEV et al., 1999; HAMAMOTO et al., 2004)..

Tabela 1

	<i>Bom estado/redução da neoplasia</i>	<i>Pioras no quadro clínico/desenvolvimento das neoplasias/óbitos/eutanásias</i>	<i>Sem retorno</i>
Animais com baixa atividade de colinesterase Total=21 casos	9 casos (42,85%)	7 casos (33,33%)	5 casos (23,80%)
Animais com atividade de colinesterase normal Total=40 casos	27 casos (67,50%)	9 casos (22,50%)	4 casos (10%)

Até o presente momento, a dosagem da colinesterase foi repetida após instituição de tratamento em cinco pacientes. A tabela 2 revela a evolução destes casos. Os tratamentos realizados nestes casos foram cirurgia e/ou quimioterapia.

Tabela 2

	<i>Nível de colinesterase na 1ª coleta</i>	<i>Nível de colinesterase na segunda coleta</i>	<i>Estado clínico</i>
Paciente 1	baixo	baixo	Manteve-se bem/redução da neoplasia
Paciente 2	Normal	Normal	Submetido à eutanásia
Paciente 3	baixo	Normal	Manteve-se bem/redução da neoplasia
Paciente 4	Normal	Normal	Manteve-se bem/redução da neoplasia
Paciente 5	Normal	Baixo	Manteve-se bem/redução da neoplasia

A Tabela 2 também revela que é necessário um maior período de tempo para análise do comportamento da atividade de colinesterase, visto que o esperado, segundo a literatura (CHOUGULE et al., 2008) é que o paciente 1, como está respondendo bem à terapia instituída, deve ter seus níveis de colinesterase

normalizados, e até então, continuam abaixo no nível normal. Esta normalização que é esperada, ocorreu no paciente 3, que também respondeu bem ao tratamento.

O paciente 2 não teve redução nos níveis de colinesterase e seu estado geral veio se agravando e houve a necessidade de submeter o paciente à eutanásia. Este ponto abre margem para uma nova discussão, em relação à influência de cada tipo tumoral, as localizações e outras variáveis, nos níveis de colinesterase.

O paciente 4 nunca apresentou diminuição da colinesterase e a evolução do caso é favorável, o que pela literatura, indica não ser uma doença tão agressiva (KHAN et al., 1991).

O paciente 5 clinicamente está evoluindo bem, mas os níveis de colinesterase baixaram além do limite normal, o que talvez seja um indicativo de mau prognóstico (por exemplo, recidivas ou tolerância ao protocolo quimioterápico)

## CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, concluímos que, embora promissor, há a necessidade de um maior período de tempo para avaliarmos o comportamento da atividade da colinesterase em paralelo com o quadro clínico, além da necessidade de ampliar o número de casos acompanhados. Também se faz interessante a separação em grupos por tipos tumorais e seus estadiamentos, localização das neoplasias, tipos de tratamentos instituídos, entre outras variáveis, até como raça e sexo, visto que estamos trabalhando com uma espécie em que ainda não temos estudos conclusivos do comportamento desta enzima.

## REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FANTONI, D. T., CORTOPASSI, S. R. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. 389 p.

TECLES, F.; et al. **Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs**. The Veterinary Journal Murcia, v.160, 2000. p. 242-249. Disponível em: <http://www.idealibrary.com>

TECLES, F.; et al. **Effects of different variables on whole blood cholinesterase analyis in dog**. J. Vet. Diagn. Invest, Murcia, v. 14, 2002. p. 132-139. Disponível em: <http://www.idealibrary.com>

SACCARO, R. O.; **Atividade de colinesterase sérica em cães antes e durante o uso de coleira impregnada com agente anticolinesterásico**. Porto Alegre, 2007.

COUGULE, A., HUSSAIN, S., AGARWAL, D. P.; **Prognostic and diagnostic value of serum pseudocholinesterase, serum aspartate transaminase, and serum alanine transaminase in malignancies treated by radiotherapy**. Department of Radioterapy, SMS Medical College and Hospital, Jaipur, India, 2008.

KHAN, N., TYAGI, S. P., SALAHUDDIN, A.; **Diagnostic and prognostic significance of serum cholinesterase and lactate dehydrogenase en breast cancer**. Department of Patology, Jawaharlal Nehru Medical College, Aligarh Muslim University. India . 1991.

MALTONI, M., PIROVANO, M. NANNI, O., MARINARI, M., INDELLI, M., GRAMAZIO, A., TERZOLI, E., LUZZANI, M., DE MARINIS, F., CARACENI, A., LABIANCA, R.; **Biological indices predictive of survival in 519 italian terminally ill cancer patients.** Divisione di Oncologia Medica, Ospedale Pierantoni, Forli, Italy, 1997.

BESSMEL'TVEV, S. S., RYBAKOVA, L. P., GRITSKEVICH, N. L., GOLOTA, G. Z.; BLINOV, M. N., ABDULKADYROV, K. M.; **Diagnostic and prognostic significance of blood-serum ceruloplasmin, acetylcholinesterase and total proteolytic activity in patients with multiple myeloma.** Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg. Russia, 1999.

HAMAMOTO, Y., NIINO, K., ISHIYAMA, H., HOSOYA, T.; **Impact of pretreatment cholinesterase level on survival of inoperable intrahepatic or hepatic-hilar carcinomas treated with three-dimensional conformal radiotherapy.** Department of Radiology, Sikoku Cancer Center, Matsuyama City, Japan, 2004.

MITSUNAGA, S., KINOSHITA, T., HASEBE, T., NAKAGOHRI, T., TAKAHASHI, S., GOTOHDA, N., OCHIAI, A.; **Low serum level of cholinesterase at recurrence of pancreatic cancer is a poor prognostic factor and relates to systemic disorder and nerve plexus invasion.** Department of Upper Abdominal Surgery, National Cancer Center Hospital East, Kashiwa, Japan. 2008.