

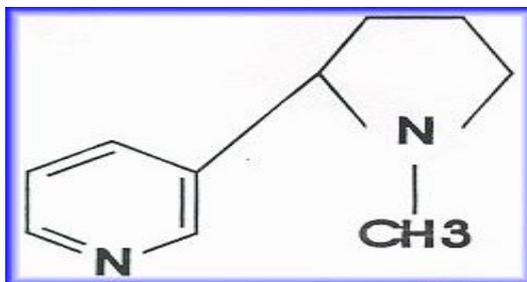
O alcatrão caracteriza-se por ser uma substância particulada, inalada quando o fumante traga o cigarro. Cada partícula de alcatrão é composta por uma enorme variedade de produtos químicos orgânicos e inorgânicos, destes os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos tem ação carcinogênica oncoincidiadora comprovada. Destacam-se: o benzopireno, dibenzopireno e o benzantraceno (LARINI, 1999).

Constituinte	Concentração/cigarro
FASE GASOSA	
Monóxido de carbono	17mg
Amônia	60µg
Acroleína	70µg
Acetaldeído	800µg
Dimetilnitrosamina	13µg
Acetonitrila	123µg
Ácido cianídrico	110µg
FASE PARTICULADA	
Nicotina	1,5mg
Fenol	85µg
Cresóis (3 compostos)	70µg
Benz(a)pireno	20µg
Benz(a)antraceno	40µg
Nitrosanicotina	250µg
Nitrosoanatabina	1,5µg
Cádmio	0,1µg

Quadro 1 – Constituintes mais importantes da fumaça do tabaco (SALGADO, 1996).

O alcatrão contém ainda alguns tipos de íons metálicos, tais como: chumbo, cádmio, níquel e arsênio. No organismo, os metais citados concentram-se principalmente no fígado, rins e pulmões, tendo uma meia vida biológica de 10 a 30 anos (KALCHER et al., 1993). Existem substâncias que são adicionadas ao tabaco para melhorar suas características organolépticas (flavorizantes). Outros compostos podem aparecer na fumaça como contaminantes, por exemplo, o agrotóxico 2,2-bis (p-clorofenil) 1,1,1-tricloroetano (DDT) (SALGADO, 1996).

2.2 Nicotina



De acordo com o relato do *pool* químico existente na fumaça do cigarro, ainda tem-se os compostos alcalóides. Um deles, a nicotina, tem alto poder de induzir à dependência (NAKAIAMA, 1993). O nome é derivado do gênero *Nicotiana*, cuja concentração varia em amplos limites (0,5 a 0,8%) (SALGADO, 1996).

A nicotina é um alcalóide vegetal líquido, sintetizado nas raízes da planta, subindo pelo caule até as folhas. Trata-se de uma base volátil ($pK_a = 8,5$), que embora seja incolor, fica acastanhada e adquire o odor do tabaco quando exposta ao ar. É uma amina terciária, composta por anéis de piridina e de pirrolidina, existindo formas estereoisômeras, ou seja, diferença de orientação espacial dos átomos de sua molécula (GUYTON, 1985).

A nicotina é, em termos farmacológicos, o princípio ativo mais potente da fumaça do cigarro e uma das substâncias mais fatal conhecida. A dose letal média para o homem situa-se entre 40 a 60 mg (1 cigarro contém de 0,3 a 1 mg) (ROSEMBERG, 1981).

A nicotina é absorvida com avidéz pela pele, mucosas e pulmões. A via

pulmonar produz efeitos no sistema nervoso central perceptíveis em pouco menos de sete segundos (NAKAIAMA, 1993).

Como a fumaça do cigarro tem caráter ácido, a nicotina permanece na forma não protonada, não sendo absorvida pela mucosa bucal e, sim pelos alvéolos. Já o charuto e o cachimbo, que possuem fumaça alcalina, este alcalóide é absorvido pela mucosa oral, isto pode explicar a incidência de câncer de boca em fumantes de cachimbo e charutos (ROSEMBERG, 1981).

Ao fumar um cigarro, o fumante inala de 20 a 25% da quantidade total de nicotina através da corrente primária; a porção restante é destruída pela pirólise e perdida na corrente secundária. Da quantidade tragada, 90% da nicotina são absorvidos rapidamente, de forma progressiva, atingindo um valor máximo dentro de 10 minutos, possuindo uma meia vida biológica de 2 horas para o tabagista crônico (NAKAIAMA, 1993).

A nicotina liga-se fracamente a proteínas plasmáticas, o que favorece sua distribuição sistêmica, atravessa a placenta e é encontrada no leite materno, sofre metabolização hepática e sua excreção renal é dependente do pH urinário, sendo favorecida pela urina ácida (LARINI & SALGADO, 1997). O alcalóide nicotina induz sintomatologias de natureza cardiovascular como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial com vasoconstrição, especialmente dos capilares (GYTON, 1985).

2.3 Cádmi

O cádmio está presente em cigarros e assemelhados, pois as folhas de fumo o concentram (KOYAMA et al., 1992; KALCHER et al., 1993). O consumo de cigarros é uma forma de intoxicação não ocupacional significativa, pois uma unidade contém de 1-2 µg de metal (SALGADO, 1996).

A absorção pulmonar é maior do que a gastrintestinal, chegando a uma taxa de 50% do que é inalado, enquanto que em torno de 5% do que é ingerido é absorvido pela via gastrintestinal (GOYER, 1996). A excreção do metal é lenta e sua meia-vida biológica é longa, cerca de três décadas, por esta razão seu efeito é

cumulativo. No sangue encontra-se principalmente nas hemácias, a concentração plasmática é muito pequena estando ligado a proteínas de alto peso molecular como a albumina (GOYER, 1996). O cádmio também inibe sistemas enzimáticos, pois tem a capacidade de deslocar metais de metaloenzimas devido ao fato de ter afinidade por grupamentos sulfidrílicos (MITCHEL et al., 1977; FURST et al., 1998; PEIXOTO et al., 2003). O metal interfere na fosforilação oxidativa, nos canais de cálcio da membrana plasmática, nas Ca^{2+} -ATPases, impede o reparo do DNA (provável mecanismo de indução de tumores) e, num primeiro momento inibe a atividade da catalase depois passa a ativá-la (FURST et al., 1998).

2.4 Monóxido de carbono (CO): uma visão bioquímica-toxicológica

O CO é um gás incolor, inodoro e insípido, muito difusível, resultante da combustão incompleta da matéria orgânica, ou seja, de qualquer material que contenha carbono (WHO, 1989). Este gás é rapidamente absorvido ao nível de alvéolo pulmonar, tem alto poder de difusão plasmática e avidamente se fixa à hemoglobina (Hb). A conseqüente formação da COHb altera o transporte de O_2 . A intoxicação por CO produz hipóxia tissular, resultante do transporte diminuído de O_2 (GYTON, 1985).

Outros mecanismos de toxicidade do gás provêm da ligação do mesmo a outras proteínas, como: mioglobina, citocromos e enzimas respiratórias tetrapirrólicas (GOYER, 1996). Além da ingestão do CO através de fontes exógenas, a produção de CO endógena pode ocorrer durante a degradação do heme à bilirrubina. Esta última responde por, aproximadamente, 0,5% da COHb sérica. A Hb tem alta afinidade molecular pelo CO, isso significa que o CO se ligará a Hb mesmo se sua concentração for extremamente baixa (MONTGOMERY, 1994).

O CO é um anti-metabólito do O_2 , o qual, quimicamente, se liga ao íon ferroso da Hb, deslocando o O_2 . Esta reação é reversível e o seu sentido depende da proporção dos gases e do pH sangüíneo. A ligação de uma ou mais moléculas de CO aos grupamentos heme da Hb aumenta a afinidade dos sítios remanescentes para o O_2 gerando a incapacidade da Hb em liberar O_2 para os tecidos (LEHNINGER et al.,

1993). A conseqüência final do processo é anoxia tecidual.

A COHb desloca a curva de dissociação do O₂ para a esquerda. Quando o CO liga-se em um dos quatro sítios heme, a Hb muda para sua conformação relaxada, fazendo com que os sítios heme restantes liguem-se ao O₂ com alta afinidade. Isto, além de deslocar a curva, altera sua forma para hiperbólica, resultando em uma incapacidade da COHb em liberar o O₂ (MONTGOMERY, 1994). A concentração de CO por cigarro pode chegar a 8mg, dependendo do nível de exposição, a redução do conteúdo de O₂ sanguíneo pode ultrapassar a 30% (ROSEMBERG, 1981).

2.5 Monitorização biológica

Segundo a toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, tais como: dose administrada ou absorvida, tempo e freqüência de exposição e vias de administração (AITIO, 1994). A caracterização da exposição pode ser feita pela determinação da quantidade do xenobiótico absorvido, através da medida de sua concentração ao nível de órgãos, células ou moléculas alvos (BERNARD & LAUWERYS, 1987).

A monitorização biológica é extremamente útil quando o xenobiótico apresenta meia-vida biológica muito longa (DELLA ROSA, 1981). Se for conhecida a relação entre a dose interna e os efeitos tóxicos, a medida de um parâmetro biológico pode prover uma avaliação direta do risco à saúde, pois um parâmetro biológico que reflete a dose interna pode estar relacionado aos efeitos biológicos tóxicos, que se quer prevenir (DELLA ROSA, 1981; BERNARD & LAUWERYS, 1987).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados como conseqüência da interação entre o agente químico e o organismo, entretanto, apenas alguns dentre esses são usados como indicadores biológicos. Assim, o indicador biológico compreende o alvo celular, onde o produto de biotransformação do tóxico irá atuar, e também qualquer alteração bioquímica precoce cuja

determinação nos fluídos biológicos avalie a intensidade da exposição (ALESSIO, 1993).

Nesta dissertação, os indicadores biológicos usados estão relacionados em seus objetivos e podem ser classificados como indicadores biológicos de dose interna, os quais se referem à quantidade do toxicante ligado aos seus sítios alvos, ou seja, a dose verdadeira e, ainda podem ser classificados como indicadores biológicos de dose interna de exposição, cuja medida permite avaliar se o indivíduo está ou não exposto a um agente tóxico (ALESSIO, 1993).

É importante enfatizar que um mesmo indicador biológico pode ser usado na prevenção, detecção precoce ou diagnóstico de intoxicação por dado xenobiótico (AITIO, 1994). A seguir apresentam-se os bioindicadores usados na parte prática desta dissertação:

- a) Análise da COHb: este indicador fica na linha divisória entre a monitorização biológica e a monitorização biológica de efeito, apresentando correlação significativa com a exposição ao monóxido de carbono e com a intensidade da anóxia (BEUTLER, 1984);
- b) Colinesterase em sangue: a análise da colinesterase sérica é válida para o diagnóstico da exposição a inseticidas e o tratamento das intoxicações. Porém, a relação entre as atividades enzimáticas e os sintomas não é igualmente significativa em exposições leves e moderadas (PANEMANGALORE, 1999).
- c) PBG-sintase: esta enzima é inibida na exposição aos compostos inorgânicos de chumbo (GOYER, 1996), e a outros metais pesados, esta inibição precede o aumento do δ -ALA no sangue ou na urina. Como na medula óssea existe um excesso de enzima, quando a exposição é mantida abaixo de certo limite não há inibição significativa da biossíntese do heme (GOYER, 1996, GOERING, 1993). Este efeito é evidenciado indiretamente pela determinação da atividade da enzima nos eritrócitos periféricos, refletindo bem os níveis de enzima medular (SALGADO, 1996).

2.6 Porfobilinogênio sintase (PBG-sintase)

A PBG-sintase é classificada, segundo a *Enzyme Commission* ((E.C.) União Internacional de Bioquímica), como E.C.: 4.2.1.24. Refere-se a uma liase (4), que catalisa a adição de grupos a uma dupla ligação carbono-oxigênio (2) através de uma clivagem hidrolítica (1), seguida por ciclização (DIXON & WEBB, 1964).

As porfirinas (estrutura tetrapirrólica em forma de anel) podem se combinar com muitos íons metálicos; as metaloporfirinas biológicas mais importantes são as que contém ferro e magnésio (SMITH et al., 1985). Todas as células necessitam de derivados do heme e outras porfirinas para servirem como grupo prostético para vários citocromos ou como grupo prostético de proteínas transportadoras de oxigênio como a hemoglobina e a mioglobina (JAFFE, 1995). A respiração celular, a geração de energia e as oxidações químicas são dependentes de heme-proteínas. O heme é a porfirina mais abundante no corpo, apresenta-se complexado com proteínas formando hemoglobina, mioglobina e citocromos. Dentre os citocromos, o citocromo P450 é de importância fundamental na metabolização de substâncias endógenas e exógenas como drogas, hormônios, inseticidas, carcinogênicos e poluentes ambientais (MAINES & KAPPAS, 1977). As enzimas envolvidas na biossíntese do heme foram encontradas em todos os tecidos animais examinados, com exceção do eritrócito anucleado e maduro de mamíferos, que, devido a falta de mitocôndrias, não possui algumas das enzimas necessárias para a via (SMITH et al., 1985).

A PBG-sintase é uma enzima citosólica (peso molecular de aproximadamente 280.000 Da) que requer zinco (metaloenzima), catalisa a segunda reação da síntese do heme, condensa duas moléculas de ácido aminolevulínico (δ -ALA) para formar o pirrol porfobilinogênio (PBG) (SMITH et al., 1985; JAFFE, 1995).

A biossíntese do heme ocorre parcialmente na mitocôndria (primeira e três últimas etapas) e no citosol. O δ -ALA é sintetizado mitocondrialmente e transportado para o citosol para sua conversão em PBG. As alterações na via biossintética do heme têm como conseqüências a superprodução e o acúmulo de porfirinas circulantes, essas geram espécies de oxigênio reativas que podem causar, *in vitro*,

alterações nas estruturas protéicas e inativação da enzimas como a PBG-sintase e porfobilinogênio desaminase (AFONSO et al., 1997), o que acarreta um prejuízo nas concentrações de heme.

As porfirias são um grupo de desordens inatas que resultam da deficiência da atividade enzimática na via de biossíntese do heme. Os intermediários da via acumulam-se, o que ocorre no caso de intoxicações por metais pesados, então chamadas porfirias não-genéticas e podem causar efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso, causando sintomas neuropsiquiátricos. Quando os porfirinogênios acumulam-se no plasma, eles podem ser convertidos, através da luz, em porfirinas, as quais reagem com o oxigênio molecular para formar radicais de oxigênio, que, por sua vez, são capazes de causar sérios danos à pele. Sendo assim, indivíduos com excessiva produção de porfirinas são fotossensíveis (SMITH et al., 1985; LEHNINGER et al., 1993).

A PBG-sintase de mamíferos contém dois sítios que ligam Zn^{2+} , denominados sítios ZnA e ZnB, os quais ligam Zn^{2+} com alta ($K_d=0,1 \mu M$) e baixa afinidade ($K_d=5 \mu M$), respectivamente. A presença de sítios diferentes para a ligação do metal pode indicar mais de uma função para os íons metálicos, possivelmente catalítica e estrutural (DENT et al., 1990).

MITCHELL et al. (1977) verificaram que a PBG-sintase de eritrócitos humanos requer íons zinco e grupamentos SH para a sua completa ativação. *In vitro*, a enzima é ativada por baixas concentrações e inibidas por altas concentrações de Hg^{2+} , Cd^{2+} e etilenodiaminotetracetato (EDTA). DESPAUX et al. (1977), usando a enzima purificada, além de terem verificado esse efeito para essas substâncias já citadas, também demonstraram o mesmo efeito para o zinco, alumínio e estanho, e, classificaram o manganês como um fraco inibidor e o chumbo e o cobre como potentes inibidores da enzima. Foi constatado que a inibição da atividade da enzima eritrocitária humana provocada pelo EDTA é causada pela quelação de íons metálicos ligados à mesma (BORDER et al., 1976).

A presença de íons metálicos em excesso prejudica as funções oxidativas das células, principalmente aquelas dependentes de citocromo P450, o que determina

um acúmulo em relação às substâncias que são detoxificadas ou transformadas metabolicamente pelo mesmo (MAINES & KAPPAS, 1977).

2.6.1 Índice de Reativação Enzimática

O índice de reativação enzimática é empregado como forma de reverter a atividade da enzima cujo decréscimo tenha sido consequência da oxidação da mesma durante a preparação e incubação do material enzimático ou decorrente de qualquer outro fator que determine alterações na atividade enzimática (EMANUELLI et al., 1996).

No caso de experimentação *in vivo* é utilizado para excluir diferenças individuais já que este índice é a diferença entre as atividades enzimáticas da mesma amostra com e sem ditiotreitol (DTT), o que, do ponto de vista experimental, fornece um resultado mais exato (RODRIGUES, 1987; 1996). A inibição e o índice de reativação por DTT da atividade da PBG-sintase de eritrócitos humanos são indicadores sensíveis de envenenamento por chumbo, sendo, portanto usados como parâmetro para verificar o estado geral de intoxicação pelo metal (MITCHELL et al., 1977; MEREDITH et al., 1979).

2.7 Colinesterases

As colinesterases (ChE) são enzimas que desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas. São divididas em pelo menos duas famílias principais, de acordo com as suas propriedades catalíticas, especificidade de inibidores e a distribuição nos tecidos: a) colinesterase específica, verdadeira ou acetilcolinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7), encontrada principalmente nas sinapses do sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, junção neuromuscular e células sanguíneas como eritrócitos, linfócitos e plaquetas; b) pseudocolinesterase ou butirilcolinesterase (BuChE; E.C. 3.1.1.8), produzida em grandes quantidades no fígado e é encontrada no plasma, intestino e, em menor

concentração em outros tecidos. Diversas similaridades têm sido observadas entre as duas famílias: mecanismo de ação, formas moleculares, natureza do sítio ativo e organização das subunidades (MAUSSOULIÉ & BON, 1982).

2.7.1 Acetilcolinesterase (AChE, E. C. 3.1.1.7)

A AChE pode se apresentar em diversas formas moleculares, que diferem quanto à solubilidade, modo de ligação e atividade catalítica. A AChE existe como duas classes gerais de formas moleculares: oligômeros homoméricos simples de subunidades catalíticas e associações heteroméricas das subunidades catalíticas (MASSOULIÉ & BON, 1982).

A classe de formas moleculares que se apresenta como uma montagem homomérica de subunidades catalíticas aparece como monômeros, dímeros ou tetrâmeros. Essas formas também diferem quanto ao grau de hidrofobicidade e suas características anfífilas conseqüentes à adição pós-transducional de um glicofosfolípido no aminoácido carboxi-terminal. O glicofosfolípido permite a ligação da enzima à superfície externa da membrana celular como na enzima eritrocitária (MASSOULIÉ et al., 1993).

A outra classe de AChE se apresenta como uma montagem heteromérica das subunidades estrutural e catalítica. Uma das formas da AChE consiste em tetrâmeros de subunidades catalíticas ligadas por pontes dissulfeto a cada um dos três filamentos de uma subunidade estrutural contendo colágeno (MASSOULIÉ et al., 1993). Essa espécie molecular, cuja massa molecular aproxima-se de 10^6 Da, associa-se com a lâmina basal externa da sinapse. É abundante nas áreas juncionais da musculatura esquelética. Essas formas são freqüentemente denominadas assimétricas, uma vez que a subunidade de “cauda” confere uma considerável assimetria dimensional à molécula. Outro tipo de subunidade estrutural, ao qual um tetrâmero de subunidades catalíticas se encontra ligada por pontes dissulfeto, tem sido caracterizado no cérebro. Essa subunidade contém lipídio ligado covalentemente, possibilitando que essa forma da enzima se associe à membrana plasmática. As diferentes conformações das subunidades e as modificações pós-

traducionais levam a localizações distintas da AChE na superfície celular, mas parecem não afetar sua atividade catalítica intrínseca (DIXON & WEBB, 1964).

A forma molecular da AChE contida em plasma humano e de ratos é a forma globular tetramérica. Esta forma globular também está presente nos tecidos do sistema nervoso e muscular e pode ser liberada destes tecidos para o sangue. Os eritrócitos contêm a forma dimérica (MASSOULIÉ et al., 1993).

O centro ativo da acetilcolinesterase é constituído de dois subsítios principais. O primeiro é um sítio aniônico, carregado negativamente, que recebe a cabeça catiônica da acetilcolina (grupo quaternário) $[-N^+ (CH_3)_3]$, e o segundo, a cerca de 5 Å de distância é um sítio esterásico que aloja o grupamento éster e carbonila da acetilcolina (ACh) (TIMBRELL, 1991).

O mecanismo catalítico assemelha-se ao de outras hidrolases, onde o grupamento hidroxila de serina torna-se altamente nucleofílico por um sistema de reposição de carga que envolve o grupamento carboxila do glutamato, o imidazole da histidina e a hidroxila da serina (MARCEL et al., 1998).

Existem evidências de que AChE de vertebrados possuem um sítio secundário de ligação do substrato, o sítio aniônico periférico (PAS), que regula a catálise de modo alostérico (MARCEL et al., 1998). Recentemente, tem sido sugerido que esse sítio periférico possa estar envolvido na ação de determinados inibidores da enzima ou na inibição por excesso de substrato.

A primeira etapa da ligação enzima-substrato se dá pelo ataque nucleofílico da hidroxila da serina do local esterásico sobre o grupamento éster-carbonila do substrato, promovendo a quebra da ligação éster. Durante o ataque enzimático sobre o éster, é formado um intermediário tetraédrico entre a enzima e o éster, que entra em colapso e forma um conjugado acetil-enzima, com liberação concomitante da colina. O complexo acetil-enzima é passível de hidrólise e essa resulta na formação do acetato e da enzima ativa. Dessa forma a enzima é totalmente regenerada. A acetil-enzima formada tem vida curta, o que determina a alta eficiência catalítica da enzima. A AChE é uma das enzimas mais eficientes e têm a capacidade de hidrolisar 6×10^5 moléculas de acetilcolina por molécula de enzima

por minuto; isso indica um tempo de renovação de 150 microssegundos (RADICZ & TAYLOR, 1994).

2.7.2 AChE e inibição por organofosforados

Três domínios distintos na acetilcolinesterase constituem os locais de ligação para ligantes inibitórios e formar a base para as diferenças de especificidade entre a AChE e a BuChE: o bolso acil do centro ativo, o subsítio colina do centro ativo e o local aniônico periférico (RADICZ & TAYLOR, 1994).

Os compostos organofosforados atuam como hemi-substratos verdadeiros, uma vez que o conjugado resultante com a serina fosforilada ou fosfonilada é extremamente estável. O grupo P=O se liga ao grupo hidroxil da serina do sítio esterásico da enzima de uma maneira análoga ao grupo C=O do substrato fisiológico acetilcolina. Normalmente, o complexo formado entre a enzima e o substrato (acetilcolina (ACh)) é clivado, deixando a enzima acetilada, que é então rapidamente hidrolisada para regenerar o grupo hidroxil da serina e assim a funcionalidade da enzima. No caso dos compostos organofosforados, o composto ligado também sofre clivagem para liberar o grupo correspondente tiol ou álcool, deixando a enzima fosforilada. Essa enzima fosforilada, diferentemente do intermediário acetilado da enzima produzido quando o substrato é a ACh, é hidrolisada muito lentamente, quando isso ocorre. Conseqüentemente, o sítio ativo da enzima é efetivamente bloqueado. Se a enzima fosforilada sofrer uma alteração conhecida como “envelhecimento”, no qual um dos grupos ligados ao átomo de fósforo é perdido, então a inibição pode se tornar permanente. Entretanto, a toxicidade vai depender basicamente da afinidade da enzima pelo inibidor e da taxa de hidrólise do intermediário fosforilado, sendo que isso está na dependência da natureza dos grupos substituintes no átomo de fósforo. Além disso, as taxas do metabolismo que leva ao metabólito ativo também serão determinantes da toxicidade do composto (TIMBRELL, 1991).

Apesar dos compostos organofosforados poderem ser rapidamente metabolizados e por essa razão não acumularem nos tecidos, doses crônicas podem

causar um efeito tóxico cumulativo devido à lenta reversão da inibição. Por isso, em alguns casos, a ressíntese da enzima pode se tornar o fator limitante. Então, repetidas doses não-tóxicas podem eventualmente causar intoxicação quando uma quantidade suficiente de colinesterase estiver inibida (TIMBRELL, 1991).

Os efeitos farmacológicos característicos dos agentes inibidores da AChE devem-se basicamente, à prevenção da hidrólise da acetilcolina pela AChE em locais de transmissão colinérgica. O transmissor, assim se acumula e a resposta a ACh é liberada pelos impulsos colinérgicos. Com a maioria dos agentes organofosforados, praticamente todos os efeitos agudos provocados por doses moderadas podem ser atribuídos a essa ação (ASHFORD et al., 1989).

A inibição da AChE nos eritrócitos é dependente da cinética de cada composto e no sistema nervoso, de sua capacidade ou de seus produtos de biotransformação em atravessar a barreira hemato-encefálica. Além deste mecanismo de inibição da AChE, os compostos organofosforados, bem como os carbamatos, podem interagir diretamente com os receptores colinérgicos, atuando como agonistas ou antagonistas (LARINI & SALGADO., 1997).

Os compostos organofosforados são de grande importância toxicológica e por isso merecem aqui uma maior atenção, basicamente por dois motivos: suas relações com a AChE e porque são amplamente utilizados na cultura do tabaco desde o plantio até a safra, além de serem responsáveis por um grande número de casos de intoxicação em plantadores de fumo (LARINI & SALGADO., 1997).

Estes compostos, face à elevada lipossolubilidade que apresentam, são absorvidos pelo organismo humano através de todas as vias possíveis, incluindo o trato gastrointestinal, a via respiratória, a via dérmica e as membranas mucosas. (BARDINI et al., 1994). Depois da absorção, os compostos organofosforados são distribuídos no organismo concentrando-se especialmente no tecido adiposo, no fígado, nos rins, glândulas salivares, tireóide, pâncreas, pulmões, parede do estômago e intestinos e, em menor proporção, no sistema nervoso central e músculos (LARINI, 1999).

Em casos suspeitos de intoxicação aguda mais branda ou de intoxicação crônica, a dosagem da atividade da AChE nos eritrócitos e plasma costuma definir o

diagnóstico. Apesar desses valores variarem consideravelmente na população normal, costumam apresentar uma redução para níveis bem inferiores à taxa normal antes de surgir a sintomatologia característica da intoxicação (BARDINI et al., 1994).

O diagnóstico clínico ou químico das intoxicações apresenta dificuldades não só em razão da diversificação dos sinais e sintomas observados, mas, também, devido a outros fatores de fundamental importância que devem ser considerados como, por exemplo, à inibição da atividade da AChE que pode se desenvolver sem nenhum significado clínico de intoxicação por inseticida organofosforado (LARINI, 1999).

2.7.3 Butirilcolinesterase (BuChE E. C. 3.1.1.8)

A função da ChE transportada pelo sangue não foi totalmente elucidada, mas parece improvável que ela tenha um efeito hidrolítico na acetilcolina circulante, sugerindo que ela possa participar na maturação e/ou degradação de neuropeptídeos e xenobióticos, já que têm sido demonstradas outras atividades catalíticas além da atividade esterásica (MASSOULIÉ et al., 1993).

A atividade da colinesterase de plasma humano é representada principalmente pela atividade da BuChE, enquanto que plasma de ratos contém aproximadamente iguais quantidades das duas enzimas, AChE e BuChE (TRAINA & SERPIETRI, 1984).

A pseudocolinesterase humana é um homotetrâmero com quatro subunidades catalíticas por molécula, a forma tetramérica tem peso molecular de 340.000 daltons, sendo a principal esterase humana sérica, distinguindo-se das lípases por hidrolisar acetilcolina (PAYNE & KUTTY, 1994).

A função fisiológica da BuChE ainda não está perfeitamente esclarecida, no sistema nervoso central, no entanto, sabe-se através de estudos recentes que ela se faz presente em células gliais (O'NEILL, 1998). Não há substrato natural específico para ela, embora seja capaz de hidrolisar a ACh. MASSOULIÉ et al. (1993) sugerem

que a BuChE seja uma enzima de varredura natural responsável pela detoxificação de compostos naturais.

A BuChE é responsável pela hidrólise de ésteres da colina hidrofílicos e hidrofóbicos. Dentre os compostos naturais hidrolisados pela BuChE, inclui-se ésteres como a cocaína, apresenta também um papel importante no metabolismo de lipoproteínas e na hidrólise de outros ésteres provenientes da dieta (O'NEILL et al., 1998)

2.8 Hemoterapia: breve consideração

Os serviços de hemoterapia no Brasil são normatizados segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC-154/2004). Segundo esta regulamentação, o indivíduo candidato à doação passa primeiramente por uma triagem chamada Triagem Clínica, a qual engloba dados clínicos e físicos. O candidato responde a questões referentes à sua condição de saúde, esta etapa ainda consta de verificação de pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura corporal.

Os doadores considerados aptos nesta fase passam para uma segunda fase chamada Triagem Hematológica, a qual aceita ou exclui o candidato à doação; nesta etapa são realizados os exames de hematócrito e hemoglobina. Questões relativas ao hábito de fumar não são realizadas. Isto é, possíveis alterações em parâmetros hematológicos como Hb, HT e COHb induzidas pelo cigarro, as quais são conhecidas na literatura (HODGSON, 1997; LEVI, 1997) não são avaliadas.

O sangue doado é fracionado em quatro hemocomponentes: concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, plasma fresco e concentrado de fator VIII; portanto, uma doação de sangue envolve quatro receptores diferentes. O público alvo do serviço de hemoterapia caracteriza-se por pacientes anêmicos, debilitados, hemodializados, pacientes pediátricos, neonatos, cirúrgicos, isto é, todos necessitando da melhora imediata em sua oxigenação sistêmica. Portanto, hemocomponentes com qualidade e eficazes devem estar disponíveis nos referidos serviços.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Ácido acético glacial PA - Synth;
Ácido fosfórico 85% PA - Merck;
Ácido nítrico PA - Pró Analysis;
Ácido perclórico 70% PA - Merck;
Ácido tricloroacético (TCA) PA - Nuclear;
Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) – Sigma;
Cloreto de mercúrio (HgCl₂) PA - Reagen;
Cloreto de sódio PA - Ecibra;
p-Dimetilaminobenzaldeído PA - Vetec;
Ditionito de sódio P.A. – Synth;
Ditiotreitól (DTT) - Sigma;
Fosfato de potássio dibásico P. A - Reagen;
Fosfato de potássio monobásico PA - Reagen;
Hidroclorato do ácido δ-aminolevulínico (δ-ALA) 98% - Sigma;
Hidroclorato de etopropazina - Sigma;
Iodeto de acetiltiocolina - Sigma;
Iodeto de butiriltiocolina - Sigma;
Nicotina – Aldrich.

3.2 Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix AP 50;
- Agitador magnético Quimis mod. Q-241-2;
- Balança Analítica Sartorius 2432;
- Banho-Maria Biomatic;
- Centrífuga Fanen 216;

- Centrífuga para microhematócrito - Microlab;
- Deionizador de água Permution;
- Espectrofotômetro Coleman 295;
- Espectrofotômetro U 2001 - Hitachi;
- pHmetro TPH2 - Testa;
- Tubos capilares para microhematócrito sem Heparina, 1x 75 mm - Micron Glass;
- Tubos para a coleta de amostras de sangue, em sistema a vácuo Becton - Dickinsom: capacidade 4,5 mL de amostra.

3.3 Material biológico

O material biológico usado nesta dissertação foram amostras de sangue total obtido de doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do HUSM, com a devida aprovação do Comitê de ética em pesquisa desta universidade; Sendo que a obtenção destas amostras obedeceu aos seguintes critérios:

a) Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de doadores do sexo masculino que possuíam de 18 a 60 anos. Os procedimentos para coleta das amostras seguiram aqueles empregados na rotina do Serviço de Hemoterapia do HUSM.

A coleta foi acompanhada, para efeito dos experimentos realizados para esta dissertação, do preenchimento de uma ficha com os seguintes dados:

- Data da doação;
- Número da doação;
- Sexo;
- Idade;
- Hematócrito;
- Hemoglobina;
- Fumante há quanto tempo?

- Quantidade de cigarros fumados diariamente?
- Fumou antes da doação? () até uma hora antes () até cinco horas antes
- Fumante passivo? () trabalho () família

As amostras foram coletadas em tubos com sistema a vácuo e o anticoagulante usado foi o citrato de sódio. O sistema de coleta possui capacidade de 4,5 mL de sangue total para 0,5 mL de citrato de sódio 0,129 M. O citrato de sódio é de uso rotineiro em Hematologia e não mostrou interferências nas atividades das enzimas em estudo (dados não mostrados), além de ser o anticoagulante de uso nas bolsas de coletas de sangue, as quais permanecem estocadas em temperatura de 2° a 6° por quarenta e cinco dias.

MITCHEL e col. (1977) constataram que inibição da δ -ALA-D eritrocitária pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), por esta razão o EDTA não foi usado como anticoagulante.

Para o estudo *in vitro*, as amostras foram coletadas de doadores não fumantes. Para o estudo *in vivo*, as amostras, em número de 30, foram coletadas e divididas em três grupos experimentais (10 amostras cada) de acordo com o hábito de fumar: grupo 1 (NF): não fumantes (controles), grupo 2 (F10): aqueles que fumavam em média 10 ± 5 cigarros diários, e grupo 3 (F20): aqueles que fumavam uma (1) carteira (20), ou mais, de cigarros por dia. Após a coleta, as amostras foram refrigeradas imediatamente a uma temperatura de 2° a 6° C e transportadas até o laboratório de pesquisa em Bioquímica Toxicológica, Departamento de Química (UFSM), acondicionadas em caixa térmicas com gelo reciclável. No laboratório as amostras foram processadas para as análises dos seguintes parâmetros: determinação do Hb, HT e COHb, determinação da atividade e do índice de reativação da PBG-sintase eritrocitária; determinação da atividade da enzima AChE de sangue total e BuChE sérica.

As técnicas utilizadas nestas determinações estão descritas a seguir.

3.4 Determinação do hematócrito (HT)

A determinação do hematócrito ou volume globular seguiu originalmente o método descrito por WINTROBE (1929), o qual consiste em centrifugar a amostra de sangue num tubo padrão com diâmetro interno uniforme e medir a proporção da altura total da coluna de sangue que representa a altura da coluna das hemácias. Este método é de uso rotineiro em Hematologia, pois utiliza pequeno volume de sangue, duração mínima para a execução, precisão e exatidão. Porém, se faz necessário o uso de centrífugas com alta rotação, com força centrífuga de aproximadamente 15.000g, que fornece após 3 a 5 minutos, sedimentação constante para o volume hematócrito.

Foram aceitos, como doadores, indivíduos que tinham valores de hematócrito acima de 38%, que é o valores de referência para o sexo masculino (RDC-153/2004).

3.5 Determinação da hemoglobina (Hb)

Para a dosagem da hemoglobina foi escolhido como ensaio padrão o método da cianometemoglobina (CARVALHO, 1994).

Nesta reação, as várias formas de hemoglobina, incluindo a oxihemoglobina e carboxihemoglobina são convertidas a um único composto, a cianometemoglobina, que é produzida pela oxidação do Fe^{2+} da hemoglobina para Fe^{3+} . Esta conversão é pronta e completamente obtida misturando-se uma quantidade pré-determinada de sangue com uma solução contendo ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$) e cianeto de potássio (KCN), chamada de solução de Drabkin (CARVALHO, 1994).

Todas as formas de Hb, exceto a sulfemoglobina, que raramente está presente em quantidades significativas, são convertidas quantitativamente ao derivado de cianeto. Depois de completa a reação, a concentração de cianometemoglobina é medida em espectrofotômetro a 540nm, através da comparação da absorbância das amostras com padrões conhecidos. A quantidade

de Hb é calculada, sendo expressa como gramas por decilitro (g/dL) de sangue total. Utilizou-se para as dosagens o “Kit” Labtest.

Foram aceitos como doadores indivíduos que tinham valores de hemoglobinometria de 13,9 g/dL, que é o valor de referência para o sexo masculino (RDC-153/2004).

3.6 Determinação da carboxihemoglobina (COHb)

A COHb foi quantificada seguindo a metodologia de BEUTLER & WEST (1984). Este método espectrofotométrico é considerado padrão para a dosagem da COHb uma forma simples e eficaz sem a necessidade de automações de laboratório.

A metodologia é baseada nas faixas de absorção características da hemoglobina e de seus derivados na região da luz visível, as quais podem ser utilizadas para a medida do nível de COHb. A oxihemoglobina e a COHb têm faixas duplas de absorção semelhantes em solução alcalina. Se uma diluição fracamente alcalina de sangue for tratada com hidrossulfito de sódio, a oxihemoglobina e a metahemoglobina serão transformadas em hemoglobina desoxigenada ou reduzidas. A COHb não é afetada por este tratamento (BEUTLER & WEST, 1984).

As amostras eram analisadas rapidamente após a coleta, da seguinte forma: 25 µL de sangue era hemolizado em 3 mL da solução hemolizante (tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L, pH 6,85; diluído 1/10 com água destilada). Após 5 minutos, era pipetado 200 µL deste hemolizado em 2,3 mL da solução diluente (25 mg de hidrossulfito de sódio em 20 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 6,85) preparada antes do uso.

Após 10 minutos a temperatura ambiente, as absorbâncias eram lidas em 420 nm e 432 nm, contra um branco (solução diluente). O resultado é expresso em porcentagem de COHb através do cálculo usando a seguinte equação:

$$COHb = \frac{1 - (Ar \times F_1)}{Ar(F_2 - F_1) - F_3 + 1}$$

Sendo: $F_1 = 1,3330$

$F_2 = 0,4787$

$F_3 = 1,9939$

Ar = absorvância da amostra a 420 nm dividida pela absorvância da amostras a 432 nm.

3.7 Determinação da atividade da enzima PBG-sintase

A atividade da PBG-sintase foi determinada no mesmo dia da coleta. As amostras eram coletadas pelo turno da manhã e analisadas a tarde. A quantificação da atividade desta enzima seguiu o European Standardized Method (BERLIM & SCHALLER, 1974).

Esta metodologia é baseada na incubação do material enzimático com o δ -ALA. O porfobilinogênio (PBG) formado durante um tempo de incubação reage como reagente de Ehrlich modificado (reagente de cor); a cor desenvolvida é medida fotometricamente a 555 nm contra um branco de reagente de cor.

Para o ensaio enzimático, o meio de incubação continha tampão fosfato de potássio 76,4 mmol/L, pH 6,4 e δ -ALA 0,4 mmol/L. O tempo de incubação foi de 60 min. (ver Quadro 2). A reação era iniciada pela adição de 200 μ L de material enzimático (sangue hemolisado em água deionizada na proporção 1:6,5, v/v) e interrompida com 200 μ L de TCA 10% contendo 0,05 mol/L de $HgCl_2$. O coeficiente de absorção molar do produto da reação do PGB com o reagente de Ehrlich modificado é $6,2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

	Branco (mL)	Ensaio (mL)	DTT (mL)
H ₂ O deionizada	0,4	0,2	0,1
Tampão fosfato de potássio (76,4 mmol/L, pH 6,4).	0,05	0,05	0,05
Material enzimático	-	0,2	0,2
DTT 38,5 mmol/L	-	-	0,1
Pré-incubação – 37 °- 5 minutos			
δ-ALA 0,84 mmol/L	0,1	0,1	0,1
Incubação – 37°- 60 minutos			
TCA 10 g% HgCl ₂ 0,05 mol/L	0,2	0,2	0,2
Centrifugação 3.000 g - 10 minutos			
Alíquota do sobrenadante	0,5	0,5	0,5
H ₂ O deionizada	0,5	0,5	0,5
Reagente de Ehrlich (cor)	1,0	1,0	1,0
Desenvolvimento de cor – 5 minutos.			
Absorbância – 555 nm			

Quadro 2 - Fluxograma do ensaio para a determinação da atividade da Porfobilinogênio sintase eritrocitária humana

3.7.1 Cálculo e expressão dos resultados

A atividade da PBG-sintase foi expressa em nmoles de PBG formado por mL de eritrócitos por hora a 37°C. Foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{Abs.}(555\text{nm}) \times 15 \times 100 \times 1000}{\varepsilon \times 0,02667 \times \text{Ht}} = \text{nmoles PBG/h/mL eritrócitos}$$

ε = coeficiente de extinção molar do produto da reação do PBG com o reativo de Ehrlich a 555 nm ($6,2 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$);

15 = fator de diluição;

Ht = hematócrito;

0,02667 = volume de sangue em mL.

O efeito da nicotina *in vitro* sobre a atividade da PBG-sintase foi analisado adicionando-se o alcalóide ao meio de reação de maneira a se obter as seguintes concentrações finais: 10, 50, 100, 150 e 200 mmol/L. O efeito da nicotina foi analisado sem e com pré-incubação do meio de reação.

3.7.2 Determinação da reativação da enzima PBG-sintase

Foi determinada a reativação da atividade enzimática pela adição de 7 mM de ditioneitol (DTT) ao meio de incubação sob as mesmas condições previamente padronizadas e citadas anteriormente. Com esta concentração final de DTT, obteve-se o máximo de aproveitamento enzimático, conforme figura 3. O DTT se caracteriza por ser um agente redutor protetor dos grupamentos sulfidrílicos (KORGE & CAMPBELL, 1993). A percentagem de reativação obtida na presença desse agente redutor foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ reativação} = \frac{\text{atividade PBG-sintase c/ DTT} - \text{atividade da PBG-sintase s/ DTT}}{\text{Atividade PBG-sintase c/ DTT}} \times 100$$

3.8 Determinação da atividade da enzima AChE

A determinação da atividade da AChE seguiu a metodologia de WOREK e cols. (1999). Esta metodologia é adequada para a quantificação da atividade da AChE eritrocitária, aferindo a atividade enzimática em sangue total.

A metodologia em questão é uma adaptação do método original de ELLMAN (1961), que utiliza comprimento de onda de 412 nm, o qual coincide com o espectro de absorção máximo da hemoglobina. A adaptação consiste em usar o comprimento de 436 nm, reduzindo assim a absorção da hemoglobina para 25%.

As amostras de sangue foram processadas no mesmo dia da coleta. Estas eram diluídas 1:100 (v/v) em solução de lise (tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L, pH 7,0, contendo 0,03 % Triton X-100). Após, eram congeladas a -18°C até o momento das dosagens. A atividade da AChE foi ensaiada em um sistema de reação formado por tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, DTNB 0,30 mM, etopropazina 0,02 mM e hemolizado 1:100 (v/v). Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio 0,1 mmol/L, pH 7,4.

Este sistema era pré-incubado por 10 minutos a 37°C, e a reação era iniciada pela adição de acetilcolina (ATC) 0,45 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de varredura por 3 minutos a 436 nm ($\epsilon = 10,6 \times 10^{-3} \times M^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata e a atividade enzimática expressa em μmol de ATC hidrolisada por minuto por grama de hemoglobina ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g Hb}$).

Para verificar o efeito *in vitro* da nicotina sobre atividade da AChE, a nicotina era adicionada ao meio totalizando as seguintes concentrações finais: 0, 0.5, 1.25, 2.5 and 5.0 mmol/L.

3.9 Determinação da atividade da enzima BuChE

As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 min. a 1.000 g, e o plasma foi congelado até o momento das análises. A atividade enzimática foi ensaiada em um sistema de reação contendo tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L, pH 7,4; DTNB

0,30 mM e 0,010 mL de plasma. Este meio foi pré-incubado por 10 min. a 37°C e a reação era iniciada pela adição de butirilticolina (BuTC) 1 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de varredura por 3 min. a 412 nm ($\epsilon = 13,6 \times 10^{-3} \times M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As amostras foram analisadas em triplicata e a atividade enzimática da BuChE foi expressa em μmol de BuTC hidrolisada por minuto por mL de plasma ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$).

Para verificar o efeito *in vitro* da nicotina sobre atividade da BuChE a nicotina era adicionada ao meio totalizando as seguintes concentrações finais: 25, 50 , 75 e 100 mmol/L.

3.10 Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma, duas ou três vias (ANOVA), seguidas pelo teste *pos hoc* Duncan ou teste *t* de Student, quando apropriado. Para isto foi utilizado o programa SPSS/PC (*Statistical Package for Social Sciences*). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação estão apresentados em três partes.

Primeiramente estão apresentados os resultados obtidos dos experimentos de padronização e determinação de alguns parâmetros para dar continuidade à execução dos objetivos. A seguir, estão apresentados os resultados dos experimentos realizados em amostras de sangue de doadores do Serviço de Hemoterapia do HUSM, isto é, doadores de sangue fumantes e não fumantes. Estes resultados estão apresentados na forma de um artigo que foi publicado em um periódico nacional (REVISTA BRASILEIRA DE ANALISES CLINICAS). Neste estudo tem-se o efeito do tabagismo sobre diversos parâmetros hematológicos e enzimáticos. E finalmente, encontram-se os resultados referentes aos efeitos da nicotina *in vitro*, os quais estão apresentados na forma de um manuscrito. Neste estudo, determinou-se a influência da nicotina, em diferentes concentrações, sobre a atividade das enzimas PBG-sintase eritrocitária, AChE de sangue total e BuChE plasmática.

4.1 Padronização de alguns parâmetros da técnica usada para a determinação da atividade da PBG-sintase eritrocitária

O ensaio para determinação da atividade da enzima PBG-sintase eritrocitária humana não era um experimento de rotina no laboratório de pesquisa em Bioquímica Toxicológica onde foram desenvolvidos os experimentos desta dissertação. Por isso, foi conveniente a validação da técnica com a padronização de alguns parâmetros tais como: tempo de incubação dos sistemas, concentração de material enzimático e concentração de DTT a ser utilizada como reativador.

Na figura 1 estão apresentados os resultados referentes à curva de tempo de incubação da PBG-sintase. Observa-se que a atividade da enzima aumentou

proporcionalmente com o aumento do tempo de incubação, isto é, a reação enzimática foi linear para todos os tempos estudados (30, 60, 90 e 120 min.). Optou-se, então, pelo tempo de 60 minutos de incubação.

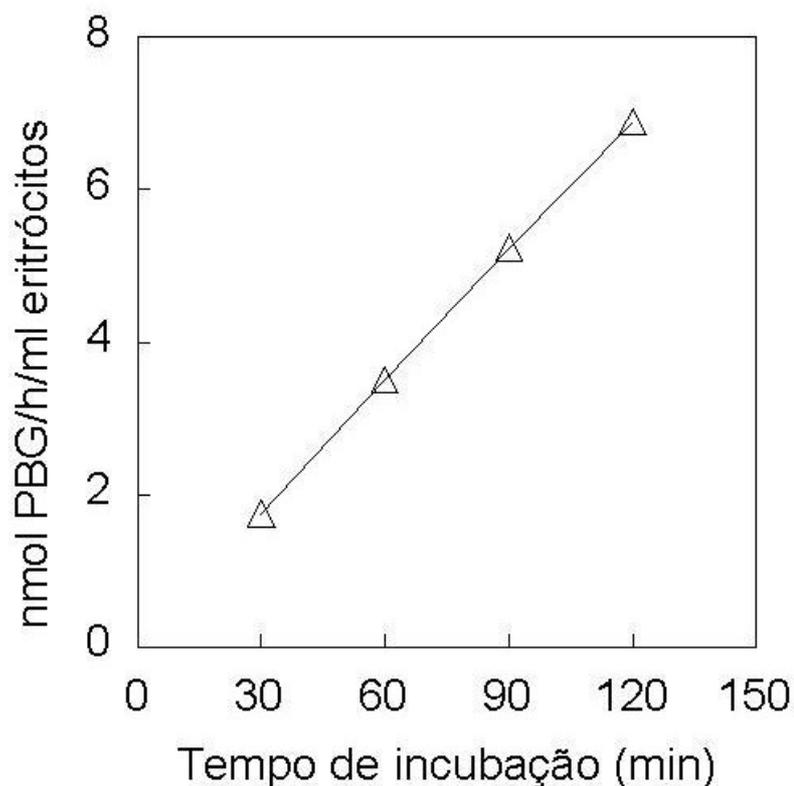


Figura 1 - Curva de tempo de incubação dos sistemas de ensaio da PBG-sintase. Os resultados estão expressos em nmol de PBG/h/mL eritrócitos e apresentados como a média de três ensaios enzimáticos

A figura 2 mostra os resultados referentes à curva de material enzimático. Constatou-se a linearidade da reação para todos os volumes testados, isto é, a formação de produto PBG como consequência da reação enzimática foi aumentada proporcionalmente pela concentração de enzima. Dessa forma, escolheu-se o volume de 200 μ L de hemolisado (1:6,5; sangue:água), o qual fornece uma atividade enzimática, a 37°C, de 3,51 nmol de PBG/h/mL eritrócitos.

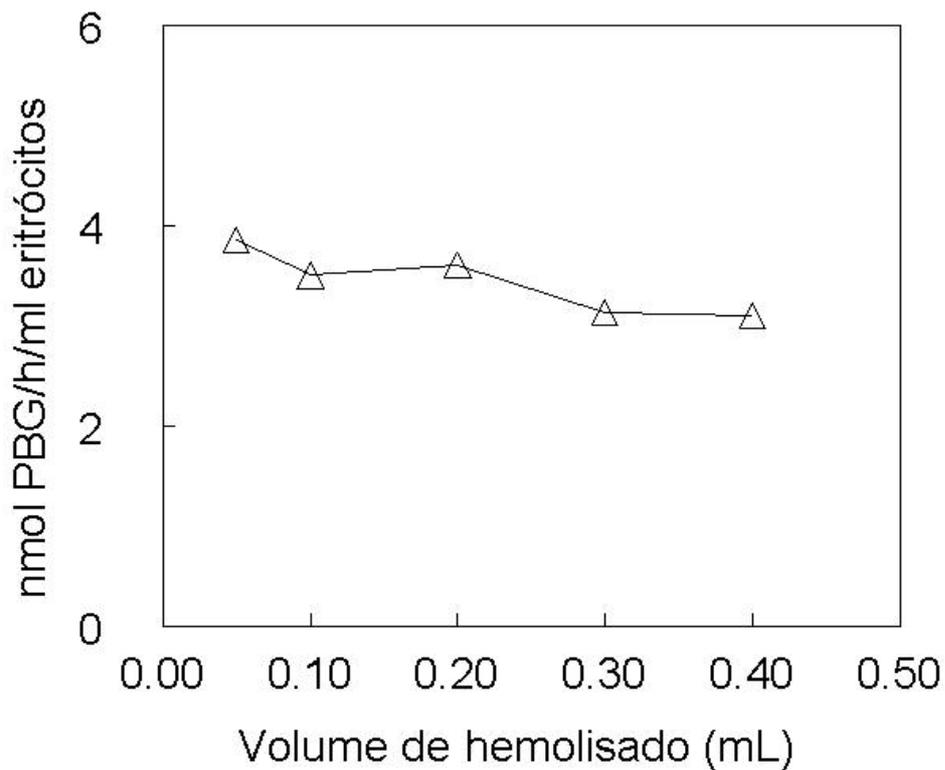


Figura 2 - Curva de material enzimático da PBG-sintase. Os resultados estão expressos em nmol de PBG/h/mL de eritrócitos e apresentados como média de três ensaios enzimáticos

A figura 3 mostra o efeito de concentrações crescentes de DTT sobre a atividade da PBG-sintase. Observa-se que as atividades enzimáticas não aumentaram a partir de 7 mM de DTT. Optou-se, então, por utilizar a concentração de 7 mM de DTT, como aquela que induz o máximo de reativação enzimática, para estes experimentos.

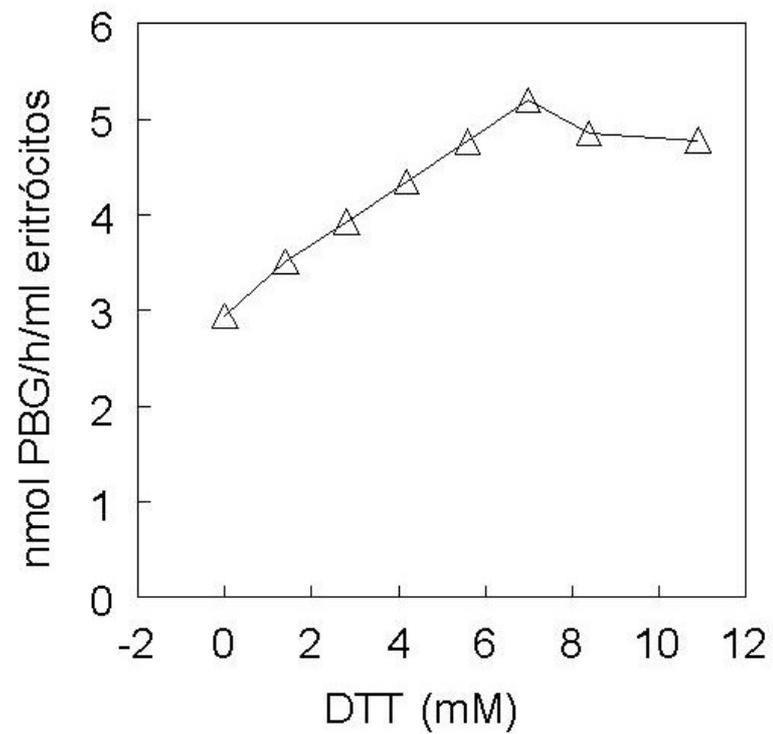


Figura 3 - Atividade da PBG-sintase na presença de DTT (0, 1,4, 2,8, 4,2, 5,6, 7,0, 8,4 ou 10mM). Os resultados estão expressos em nmol de PBG/h/ml de eritrócitos e apresentados como média de três ensaios enzimáticos

4.2 Artigo 1: Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de sangue de doadores fumantes

Hematologics and toxicologics parameters in blood samples of smoker donators

Valério B. M. Silva¹; Maria E. Pereira²

¹ Serviço de Hemoterapia, Banco de Sangue, Hospital Universitário de Santa Maria

² Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria RS

Correspondência: Maria Ester Pereira

Departamento de Química, CCNE, UFSM.

Campus Universitário - Camobi

97105-900 – Santa Maria, RS

Fone/Fax: (0xx) 55 2208799

Email: pereirame@yahoo.com.br

RESUMO

Os serviços de hemoterapia no Brasil são, atualmente, regulamentados segundo a RDC-343. Indivíduos fumantes apresentam, em geral, níveis de HT e Hb dentro dos valores de referência para doação de sangue. Considerando que estes valores estão em uma faixa ampla, o presente trabalho avaliou a qualidade do sangue utilizado para doação quanto a estes parâmetros hematológicos e quanto à atividade das enzimas sanguíneas PBG-sintase e colinesterase, as quais têm sido utilizadas como biomarcadores de exposição e/ou intoxicação por agentes oxidantes e inseticidas, respectivamente. Estes parâmetros foram analisados em 30 amostras, divididas em três grupos: NF – não fumantes; F10 – fumantes de 10±5 cigarros/dia e, F20 – fumantes de 20 ou mais cigarros/dia. Os resultados demonstram que os níveis de HT e Hb apresentaram-se significativamente aumentados no grupo F20, e os níveis de COHb, aumentados em ambos os grupos fumantes (F10 e F20). Quanto às enzimas em estudo, o tabagismo não alterou suas atividades. O grupo F20 apresentou atividade da PBG-sintase e índice de reativação ligeiramente diminuídos. A atividade colinesterásica apresentou um aumento de 18% no grupo F20, porém não significativo. De acordo com os resultados obtidos faz-se necessário aprofundar os estudos sobre a qualidade do sangue utilizado nos serviços de hemoterapia brasileiro.

Unitermos – parâmetros hematológicos, colinesterase, tabagismo, PBG-sintase.

ABSTRACT

Hemotherapy services in the Brazil are regulated according the RDC-343. In general, smokers presented HT and Hb levels inside of the reference values to blood donations. Considering that reference values are in ample zone, this work studied the quality of blood utilized to donation in relations to hematologic parameters and two blood enzyme activities, PBG-synthase and cholinesterase, which have been used as biomarkers to exposition and/or intoxication for oxidant agents and insecticides, respectively. Thirty blood samples were divided in three groups: NF – non smoker, F10 – smoker of 10 ± 5 cigarettes/day and F20 – smoker of 20 or more cigarettes/day. The results demonstrated that HT and Hb levels in the F20 group were significantly higher than other. The COHb levels were significantly higher in the smoker groups, F10 and F20, than control group (NF). In relation to PBG-synthase and cholinesterase, smoke habit did not alter their activities. The F20 group presented a little decrease in PBG-synthase activity and in reactivation index. The cholinesterase activity of F20 group was higher (18%) than other groups, but not significantly. According to theses data, it is necessary to investigate in detail the quality of blood utilized in the hemotherapy services in the Brazil.

Key Words – hematologic parameters, cholinesterase, PBG-sintase, smoker.

INTRODUÇÃO

O tabaco é uma planta da família das solanáceas, sendo a espécie *Nicotiana tabacum* a mais usada. Durante o desenvolvimento da planta são usados vários tipos de inseticidas, incluindo os organoclorados e organofosforados. Após a confecção, o cigarro apresenta-se constituído por várias substâncias tóxicas e após a sua combustão incompleta, encontra-se na fumaça do cigarro, entre outras substâncias nocivas, o monóxido de carbono (CO), a nicotina e o cádmio (ANDREI, 1996).

CO é rapidamente absorvido ao nível de alvéolo pulmonar, difunde-se no plasma e fixa-se à hemoglobina (Hb). A conseqüente formação de carboxihemoglobina (COHb) altera o transporte de O₂ (LARINI & SALGADO, 1997; SMITH et al., 1996). A nicotina é um alcalóide líquido produzido nas raízes da planta que sobe pelo caule até as folhas. Farmacologicamente é o princípio ativo mais potente da fumaça do cigarro, sendo absorvido pela pele, mucosas e pulmões. A via pulmonar produz os efeitos perceptíveis no SNC e cardiovascular (LARINI, 1999), causando dependência em seus usuários. O cádmio está presente em cigarros e assemelhados (KALCHER et al., 1993). O consumo de cigarros é uma forma de intoxicação não ocupacional significativa; um cigarro contém de 1 a 2 µg do metal. A excreção do cádmio é lenta e sua meia-vida chega há três décadas (SALGADO, 1996; GOYER, 1996).

Os serviços de hemoterapia no Brasil são regulamentados segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (2004), RDC-153: Regulamento Técnico para a Obtenção, Testagem e Controle de Qualidade de Sangue e Hemocomponentes para o uso Humano. Segundo esta regulamentação, o indivíduo candidato à doação passa por duas triagens, clínica e hematológica, mas nenhuma questão relativa ao ato de fumar é avaliada. Alterações em parâmetros hematológicos como Hb, hematócrito (HT) e COHb em indivíduos fumantes são evidentes e bem conhecidos na literatura (HODGSON, 1997; LEVI, 1997). Assim, o presente trabalho visa investigar alguns parâmetros hematológicos e enzimáticos em amostras de sangue de indivíduos fumantes considerados aptos à doação. Como parâmetros hematológicos foram analisados HT, Hb, COHb e correlação entre HT e COHb. Quanto às enzimas foram estudadas as atividades da porfobilinogênio sintase (PBG-

sintase, E.C.: 4.2.1.24.) eritrocitária e da colinesterase (ChE) (AChE; E.C. 3.1.1.7 e BuChE: E.C.3.1.8) sanguínea total. A PBG-sintase é uma enzima sulfidrílica, o que a torna extremamente sensível a agentes oxidantes e metais pesados (ROCHA et al., 1995; EMANUELLI et al., 1996; PEIXOTO, 2000; PEIXOTO et al., 2003; 2004; ROZA, 2001), sendo então considerada como indicador biológico de intoxicação e/ou exposição a estes agentes (GOYER, 1996). As ChEs são enzimas extremamente sensíveis a organofosforados e organoclorados (LARINI & SALGADO, 1997; LARINI et al., 1999; TAYLOR, 1996). Além disso, ambas as enzimas são inibidas *in vitro* pela nicotina (JOSÉ et al., 2003; SILVA et al., 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 30 amostras de sangue total de doadores de sangue do Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM/UFSM). As amostras foram coletadas de indivíduos do sexo masculino, em tubos com sistema a vácuo contendo citrato de sódio como anticoagulante. Somente foram utilizadas amostras coletadas de doadores aptos à doação (triagem clínica e hematológica, RDC-343). As amostras foram divididas em três grupos de 10 de acordo com o hábito de fumar: grupo 1 – não fumantes (NF), grupo 2 - fumantes de 10±5 cigarros por dia (F10), e grupo 3 - fumantes de 20 ou mais cigarros por dia (F20). Após a coleta e triagem do material realizada no Banco de Sangue (HUSM), as amostras foram encaminhadas para o laboratório de pesquisa e processadas de acordo com o parâmetro a ser analisado: HT, Hb e COHb, atividade e índice de reativação da enzima PBG-sintase eritrocitária e atividade ChE sangüínea total. Os níveis de HT foram determinados segundo o método de WINTROBE (1929). As concentrações de Hb foram quantificadas de acordo como o método descrito por CARVALHO (1994). As quantidades de COHb nas amostras foram analisadas segundo a metodologia descrita por BEUTLER & WEST (1984). A atividade da enzima PBG-sintase foi ensaiada em sangue total segundo BERLIM & SCHALLER, 1974. Quanto à atividade da ChE sangüínea total, os ensaios enzimáticos seguiram o método descrito por WOREK et al. (1999).

Os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan, quando apropriado.

RESULTADOS

Parâmetros Hematológicos

Neste estudo, para todos os parâmetros analisados, foram utilizadas amostras de doadores de sangue que possuíam HT e Hb dentro dos valores de referência para doação de sangue (RDC-153). Os resultados referentes aos níveis de HT, Hb e COHb dos três grupos estudados, NF, F10 e F20 estão apresentados na Tabela 1.

Embora todos os indivíduos apresentassem HT dentro dos critérios anteriormente citados, a análise de variância (ANOVA) de uma via mostra diferença significativa entre os grupos [$F(2,27) = 12,0594$; $p < 0,0002$]. O teste *post hoc* de Duncan revela que o grupo F20 apresenta HT significativamente maior que os demais grupos ($p < 0,01$). Entre o grupo NF (controle) e o grupo F10 não houve diferença significativa.

Para os níveis de Hb, a ANOVA de uma via [$F(2,27) = 7,2958$; $p < 0,003$] mostra diferença significativa entre os grupos. Embora a diferença entre o grupo F20 e os demais grupos seja muito pequena, a concentração de Hb deste grupo é significativamente maior que as dos grupos NF e F10 (teste de raio múltiplo de Duncan, $p < 0,01$).

Os resultados dos níveis de COHb estão expressos como porcentagem de COHb em relação a Hb total por decilitro de sangue (% COHb). A análise de variância de uma via revela diferença significativa entre os grupos [$F(2,27) = 45,5553$; $p < 0,0001$]. O teste *post hoc* de Duncan demonstra que os grupos F10 e F20 diferem significativamente do NF e que o grupo F10 também difere significativamente do grupo F20 (Tabela 1).

Analisando estes três parâmetros em conjunto, verifica-se uma relação direta entre o aumento do HT e o da Hb apresentada pelo grupo F20. Observa-se também que as alterações induzidas pelo tabagismo sobre os níveis de COHb foram acentuadas. Com o objetivo de tentar relacionar os níveis de HT com os de COHb, construiu-se gráficos com esta correlação. A figura 1 A a C apresenta a correlação entre os resultados individuais de HT (ordenada) e COHb (abscissa) para os grupos de 1 a 3, respectivamente.

Verifica-se no gráfico B, e principalmente no C, um deslocamento dos pontos para cima e para a direita em relação ao gráfico A. Estes resultados demonstram que, embora o HT do grupo F10 não tenha se apresentado elevado, verifica-se um pequeno deslocamento da correlação para direita, devido ao aumento significativo da COHb apresentada por este grupo. No gráfico C, que representa a correlação entre o HT e COHb do grupo F20, verifica-se uma associação mais forte entre estes dois parâmetros como consequência de um aumento concomitante do HT e da COHb. A correlação está significativamente deslocada para a direita e para cima, mostrando claramente que para um aumento no HT verificou-se um aumento nos níveis de COHb, porém este último em magnitude muito maior (Figura 1).

Atividade da enzima PBG-sintase e índice de reativação

Os resultados referentes à atividade da PBG-sintase dos três grupos de doadores de sangue são apresentados no Tabela 2. Também neste quadro está apresentado o efeito do ditiotreitol (DTT), um agente protetor de grupamentos sulfidrilas, sobre a atividade da enzima e o índice de reativação (I.R.). O I.R. é calculado como: $I.R. (\%) = \frac{\text{atividade PBG-sintase com DTT} - \text{atividade da PBG-sintase sem DTT}}{\text{atividade da PBG-sintase com DTT}} \times 100$ (RODRIGUES et al., 1996). A ANOVA de uma via revelou que não há diferença significativa entre os grupos quanto a nenhum dos três parâmetros enzimáticos analisados [PBG-sintase, $F(2,27) = 0,88$, $p = 0,4246$; DTT, $F(2,27) = 0,98$, $p = 0,3887$; e I.R., $F(2,27) = 1,5755$, $p = 0,2253$].

Estes resultados demonstram que o tabagismo não alterou estes parâmetros, embora o índice de reativação apresentado pela enzima de doadores do grupo F20 seja ligeiramente inferior ao grupo controle (Tabela 2).

Atividade Colinesterásica

Os resultados referentes à atividade colinesterásica de sangue total são mostrados na Tabela 3. Embora a atividade do grupo F20 apresentou-se aumentada em torno de 10% em relação ao grupo NF, a ANOVA de uma via revela diferenças não significativas entre os grupos [$F(2,27) = 2,1756$; $p = 0,1330$] (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Parâmetros Hematológicos

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo principal de analisar alguns parâmetros relacionados à qualidade do sangue de doadores fumantes. Com este objetivo, amostras de sangue de doadores não fumantes e fumantes foram analisadas quanto aos parâmetros HT, Hb, COHb e quanto à atividade das enzimas PBG-sintase eritrocitária e ChE sangüínea total.

Quanto aos parâmetros hematológicos, verificou-se aumentos significativos do HT e da Hb no grupo F20 (10%). Para a COHb, ambos os grupos fumantes, F10 e F20, apresentaram aumento significativo de 79% e 190%, respectivamente. A correlação entre HT e COHb mostra uma associação acentuada para o grupo F20 e moderada para o grupo F10.

A determinação do HT é bastante valiosa, pois, informa, facilmente, possíveis alterações nas hemácias e no plasma. O aumento neste índice, como aquele apresentado pelo grupo 3 (F20), tem sido descrito na literatura como “policitemia do fumante” ou ainda policitemia relativa adquirida (SMITH & LANDAW, 1978). Esta discrasia sangüínea tem sido descrita na literatura em amostras de sangue coletadas de indivíduos fumantes (SMITH & LANDAW, 1978). Além disso, aumento do HT tem sido descrito em indivíduos expostos a baixas concentrações de CO, sugerindo que o CO é o responsável direto por esta alteração hematológica. A diminuição do volume plasmático associado a uma elevação na contagem celular sugere que o hábito de fumar é a causa da policitemia (SMITH & LANDAW, 1978).

Embora todos os doadores tivessem valores de HT dentro das exigências do Ministério da Saúde ($47\% \pm 7$), como os valores de referência estão dentro de uma faixa muito ampla, é possível perceber que fumantes, os quais possuem HT significativamente maior que os indivíduos não fumantes (47,7% versus 43,0%), são livremente aceitos, em relação a este critério, como doadores de sangue nos serviços de hemoterapia.

A Hb é uma proteína exclusivamente eritrocitária, portanto um aumento no número de eritrócitos acarreta uma elevação das taxas de Hb em condições fisiológicas normais. Sendo assim, indivíduos que apresentam níveis de HT altos, também demonstram elevações em suas hemoglobinometrias. SMITH & LANDAW

(1978) descreveram que indivíduos fumantes que apresentavam o HT, a Hb e a contagem de células vermelhas elevados, sofrem redução destes valores quando os mesmos pararam de fumar. A partir dos resultados obtidos, verifica-se uma relação direta entre estes dois parâmetros, isto é, um aumento no HT implica em um aumento da concentração de Hb. Quanto à COHb, os resultados deste estudo estão de acordo com aqueles apresentados na literatura (MADANY, 1992; BEUTLER & WEST, 1984) os quais relatam taxas elevadas de COHb em indivíduos fumantes; e ainda, uma relação entre o aumento dos níveis de COHb e a quantidade de tabaco inalada (SMITH & LANDAW, 1978). MADANY (1992) em uma pesquisa envolvendo uma população de 107 indivíduos, constatou um aumento significativo da COHb em doadores de sangue que residiam na zona rural e possuíam o hábito de fumar tabaco quando comparado a doadores que não possuíam este hábito.

A exposição ao CO pode ser diretamente possível pelo hábito de fumar (MADANY et al., 1992, BEUTLER & WEST, 1984). Um estado de anemia funcional não patológica é produzido sempre que houver exposição ao CO, pois este gás tem como molécula-alvo os grupamentos heme da Hb, formando então a COHb. Quando ocorre uma ligação de uma ou mais moléculas de CO aos grupamentos heme da Hb, tem-se um aumento na afinidade dos sítios remanescentes para o oxigênio e isso dificulta a sua liberação para os tecidos (RODWELL, 1998). A consequência final do processo é uma hipóxia tecidual, caracterizando um estado de anemia funcional. Com o objetivo de compensar a hipóxia tecidual causada pela disfunção da hemoglobina, o fumante crônico apresenta um aumento no número de células sangüíneas vermelhas, já que o mesmo convive com uma progressiva hipoxemia proporcional aos níveis de COHb sérica (SMITH & LANDAW, 1978).

Atividade da enzima PBG-sintase e índice de reativação

Os resultados do presente estudo mostram que a atividade da enzima PBG-sintase apresentou-se não modificada em amostras de sangue de doadores fumantes quando comparada à de não fumantes. As amostras coletadas de doadores fumantes (F20) apresentaram atividade da PBG-sintase ligeiramente menor (12%), assim como o índice de reativação (21%). Considerando que um dos componentes do cigarro é a nicotina, estes resultados diferem daqueles obtidos *in*

vitro, onde se verificou inibição significativa da enzima pelo alcalóide (DOWLA et al., 1996; SILVA et al., 2003) e também diferem daqueles relatados na literatura que mostram inibição da PBG-sintase em indivíduos fumantes (SALLE & ZIELHUIS, 1977; OKUNO, 1973; HEINEMANN, 1982; PANEMANGALORE et al., 1999).

HEINEMANN (1982) verificou que, embora a enzima PBG-sintase apresentava-se inibida em amostras de indivíduos fumantes, esta inibição não era suficiente para inibir a síntese do heme, o que concorda com o aumento nos níveis de HT apresentados pelos doadores fumantes. Ainda, é sabido que apenas 20% da capacidade enzimática total é necessária para manter a síntese do heme e os níveis de Hb normais (PETRUCCI et al., 1982).

A PBG-sintase, por ser uma enzima sulfidrílica, é extremamente sensível a metais pesados como o cádmio, chumbo e mercúrio (PEIXOTO, 2000; PEIXOTO et al., 2003; 2004; ROCHA et al., 1995; RODRIGUES et al., 1996) assim como a agentes oxidantes (EMANUELLI et al., 1996; ROZA, 2001). Um dos metais citados, o cádmio, está presente em cigarros e assemelhados por estar previamente concentrado nas folhas de fumo (KALCHER et al., 1993). O consumo de cigarros é uma forma de intoxicação não ocupacional significativa, pois uma unidade contém 1-2 μg do metal. Assim, o consumo de 20 cigarros diariamente levaria a uma dose aproximada de 1 mg do metal por mês (SALGADO, 1996; GOYER, 1996). Embora o cádmio seja um potente inibidor *in vitro* da PBG-sintase (Peixoto et al., 2004), *in vivo* seus efeitos são mais sutis (PEIXOTO, 2000). Além disso, o cádmio, assim como alguns outros metais divalentes, induzem a síntese de metaloproteínas, proteínas estas que funcionariam como um mecanismo de destoxificação ao se ligarem ao metal tóxico, tornando-o indisponível para exercer seus efeitos nocivos (ROMERO-ISART & VASÁK, 2002; PEIXOTO et al., 2003). Assim, os níveis de cádmio necessários para inibir a enzima, teriam que ser superiores a aqueles necessários para induzir a síntese de metaloproteínas e permanecerem ligados a ela.

No presente estudo, verificou-se que as atividades da PBG-sintase são semelhantes entre os grupos estudados. Ainda pode-se observar que, na presença de DTT, um agente redutor, o índice de reativação entre os grupos foi semelhante, descartando a possibilidade de um efeito oxidativo induzido pelo cigarro sobre a enzima e conseqüente reativação pelo DTT. Estas diferenças em relação à literatura

podem ser conseqüência de outros fatores inerentes ao hábito de fumar como o tipo e composição do cigarro, número e tempo de uso, idade do indivíduo, etc.

Atividade da enzima ChE sangüínea total

Além de vários constituintes tóxicos no cigarro, é conhecida a freqüência com que contaminantes como os agrotóxicos do tipo 2,2-bis (p-clorofenil) e o 1,1,1-tricloroetano (DDT), estão presentes no fumo e na fumaça do cigarro.

Inibições de colinesterases por organofosforado têm sido bem estudadas e revistas extensivamente (DEN TONKELAAR, 1990). Embora a função das colinesterases circulantes não esteja bem esclarecida, a inibição desta enzima é usada como um bioindicador de exposição, mas não como indicador de intoxicação por estes compostos, até porque alterações nas atividades plasmáticas podem preceder aos sintomas de intoxicação (LOTTI, 1995).

O sangue total contém duas fontes de material enzimático: o soro, que é rico em atividade do tipo butirilcolinesterase (BuChE), e o eritrócito, que é rico em atividade do tipo acetilcolinesterase (AChE) (YEATO et al., 1998). Neste estudo avaliou-se a atividade colinesterásica total em sangue total, utilizando como substrato a acetiltiocolina. Desta forma, favoreceu-se a atividade esterásica dos eritrócitos (AChE), com a participação, em menor grau, da enzima sérica (BuChE) que também hidrolisa o substrato ATC, porém com menor especificidade.

Assim, o propósito deste experimento foi analisar a atividade da ChE sangüínea total de doadores fumantes. Verificou-se que a atividade da ChE não apresentou-se alterada nos indivíduos fumantes (F10 e F20). Resultados prévios deste laboratório têm demonstrado que a atividade ChE sangüínea total é significativamente inibida pela nicotina *in vitro* (JOSÉ et al., 2003). Porém, considerando-se o procedimento técnico de preparação da amostra (é diluída 100 vezes) e a quantidade de nicotina que deveria estar presente e ligada à enzima *in vivo* e permanecer ligada à mesma até o momento da análise da atividade enzimática (*ex-vivo*), pressupõe-se que esta deveria ser grande.

A literatura é escassa quanto à atividade da ChE total em sangue de indivíduos fumantes do sexo masculino. YEARLY et al. (1993), por meio de um

programa de monitorização biológica desenvolvido durante dez anos (1981 a 1991), estudaram as atividades das ChEs em amostras de sangue de trabalhadores urbanos (manipulavam inseticidas). De um número de 38.000 amostras, 167 indivíduos (0,44%) foram removidos do grupo por apresentarem uma diminuição na atividade da ChE sanguínea total. Estes autores demonstraram também que o decréscimo na atividade da ChE plasmática sempre é precedido pela diminuição na atividade da enzima eritrocitária.

Os resultados obtidos no presente trabalho, em adição à escassez de dados na literatura em relação à qualidade do sangue usado em serviços de hemoterapia, sugerem que mais estudos devam ser realizados para melhor conhecer os possíveis efeitos da contaminação do sangue usado em serviços de hemoterapia, oriundos de indivíduos fumantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERLIM, A.; SCHALLER, K.H. European Standardized Method For The Determination Of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity In Blood. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 12: 389-390, 1974.
- BEUTLER, E.; WEST, C. Simplified determination of Carboxihemoglobin. *Clinical Chemistry*, 30(6): 871-874, 1984.
- CARVALHO, W. *Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia*. 6. ed. Belo Horizonte: Coopmed, cap 44, p. 235-250, 1994.
- DEN TONKELAAR, E.M. Pesticide Residues. In: *Food*. World Health Organization. Geneva, p.114, 1990.
- DOWLA, H.A.; PANEMANGALORE, M.; BYERS, M.E. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma in vitro by agricultural chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31: 107-114, 1996.
- EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; PORCIÚNCULA, L.O.; MORSCH, V.M.; MARTINS, A.F.; SOUZA, D.O. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on δ -aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacology and Toxicology*, 79: 136-143, 1996.
- GOYER, R.A. In: KLAASSEN, C.D. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1111 p. Cap. 23, p. 691-712: *Toxic effects of metals*, 1996.
- HEINEMANN, G. Effect of cigarette Smoking on White Blood Cells and Erythrocyte Enzymes. *Archives of Environmental Health*, 37: 261 – 265, 1982.
- HODGSON, E. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (eds). A textbook of modern toxicology. 2 ed. Stamford, Connecticut: Appleton e Lange, 496 p. Cap. 14, p. 373-388. *Diagnosis and Treatment of Toxicity*, 1997.
- KALCHER, K.; KERN, W.; PIETSCH, R. Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. *Science of the Total Environment*, 128: 21-35, 1993.
- JOSÉ, A.S.; DA SILVA, F.O.; DALCIN, T.M.; SANTOS, E.R.; PEREIRA, M.E. In vitro effect of nicotine on total cholinesterase activity from human blood. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 16: 202, 2003.
- LARINI, L.; SALGADO, P.E.T. In: LARINI, L. *Toxicologia*. 3. ed. São Paulo: Manole, 301 p. Cap. 5, p.59-72: *Gases*, 1997.
- LARINI, L. In: LARINI, L. *Toxicologia dos Praguicidas*. São Paulo: Manole, 230 p. Cap. 4, p.93-98: *Inseticidas de Origem Vegetal*, 1999.
- LEVI, P.E. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (eds). A textbook of modern toxicology. 2 ed. Stamford, Connecticut: Appleton e Lange, 496 p. Cap. 10, p. 228-284. *Classes of Toxic Chemicals*, 1997.

- LOTTI, M. Mechanisms of toxicity and risk assesment. *Toxicology Letter*, 77: 9-14, 1995.
- MADANY, I.M. Carboxyhemoglobin levels in blood donors in Bahrain. *Science of the Total Environmental*, 116: 53 - 58, 1992.
- OKUNO, T. Smoking and blood changes. *Journal of the American Medical Association*, 234: 500 - 506, 1973.
- PANEMANGALORE M.; DOWLA H. A.; BYERS M. E. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. *Interaction Archives Occupational Environmental Health*, 72: 84 – 88, 1999.
- PEIXOTO, N.C. Atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (E.C.:4.2.1.24) como indicador da intoxicação de ratos jovens com metais pesados nas três principais fases de crescimento cerebral rápido pós-natal. *Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (2000)*.
- PEIXOTO, N.C.; ROZA, T.; FLORES, E.M.M.; PEREIRA, M.E. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and hg levels in tissues of suckling rats. *Toxicology Letters*, 83: 95-113, 2003.
- PEIXOTO, N.C.; ROZA, T.; PEREIRA, M.E. Sensitivity of δ -ALA-D of rats to metals *in vitro* depends on the stage of postnatal growth and tissue. *Toxicology in vitro*, in press, 2004.
- PETRUCCI, R.A.; LEONARDI, A.; BATTISTUZZI, G. The genetic polymorphism of δ -ALA-D in Italy. *Human Genetics*, 60: 289 - 290, 1982.
- PROLL, Y.G.; GAMBRIR, K.K.; AMPY, F.R. Acetylcholinesterase: an enzymatic marker of human red blood cell aging. *Life Science*, 63: 177-184, 1998.
- RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - R.D.C. n. 343, 13 de dezembro de 2002. Publicada no D.O.U. de 17/01/2003.
- ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R.S.; SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology*, 100: 27-37, 1995.
- RODRIGUES, A.L.S.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; SOUZA, D.O. δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57: 47-53, 1996.
- RODWELL, V.W. In: HARPER, R.H.; MURRAY, I.; MAYNES P.A.; RODWELL, V.W. *Bioquímica*. 8 ed. São Paulo: Atheneu Editora, 860 p. Cap. 7, p. 53-63: *Proteínas: Mioglobina e Hemoglobina*, 1998.
- ROMERO-ISART, N.; VASÁK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88: 388-396, 2002.
- ROZA, T. Ação do HgCl₂ e do 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) sobre a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (E.C.4.2.1.24) de fígado, rim e cérebro total de

ratos jovens. *Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.*

SALGADO, P.E.T. In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 515 p. 153 - 172: Toxicologia dos Metais, p. 135: *Monitorização Biológica*, 1996.

SALLE, H.I.A.; ZIELHUIS, R.L. Influence of smoking on aminolevulinic acid dehydratase activity, haematocrite and lead in blood in adult urban women. *Interaction Archives Occupational Environmental Health*, 40: 111-15, 1977.

SILVA, V.B.M.; DA SILVA, F.O.; DALCIN, T.M.; SANTOS, E.R.; PEREIRA, M.E. Effect of nicotine on δ -aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocyte. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 16 (1): 201, 2003.

SMITH, R.P. In: Klaassen, C.D. *Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1111 p. Cap. 11, p. 335-354: *Toxic response of the blood*, 1996.

SMITH, J.R.; LANDAW, A. Smoker's polycythemia. *The New England Journal of Medicine*, 298: 6 – 10, 1978.

TAYLOR, P. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. (Eds). *Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9. ed. New-York: McGraw-Hill, 1.905 p. Cap. 8, p. 161-176: *Anticholinesterase agents*, 1996.

WINTROBE, M.M. A simple and accurate hematocrit. *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 15: 287, 1929.

WOREK, F.; MOST, V.; KIDERLEN, D.D.; DIEPOLD, C.; EYER, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 288: 73 - 90, 1999.

YEARLY, R.A.; EATON, J.; GILMORE, J.; NORTH, B.; SINGELL, J. A multiyear study of blood cholinesterase activity in urban pesticide applicators. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 39: 11 - 25, 1993.

Tabela 1 - Valores de HT, Hb e COHb das amostras coletadas dos três grupos experimentais: grupo 1 - não fumantes (NF); grupo 2 - fumantes de 10 ± 5 cigarro/dia (F10); e, grupo 3 - fumantes de 20 ou mais cigarros/dia (F20)

PARÂMETRO	Grupo NF	Grupo F10	Grupo F20
Hematócrito (%)	43,0 ± 0,64	43,6 ± 0,73	47,7 ± 0,81*
Hemoglobina (g/dL)	14,5 ± 0,17	14,6 ± 0,28	15,8 ± 0,29*
COHb (%)	4,1 ± 0,29	7,3 ± 0,41**	11,7 ± 0,85*

Os resultados estão apresentados como média ± e.p.m. de uma amostragem de dez indivíduos para cada grupo.

*Difere dos demais grupos para $p < 0,01$;

**Difere do grupo NF para $p < 0,01$.

Tabela 2 - Atividade da PBG-sintase eritrocitária e índice de reativação (I.R.) de amostras coletadas de doadores não fumantes (NF), fumantes de 10 ± 5 cigarros por dia (F10) e de fumantes de 20 ou mais cigarros por dia (F20)

GRUPOS	Atividade específica da PBG-sintase		I.R.
	0 mM DTT	7 mM DTT	
NF	3,41 ± 0,48	4,80 ± 0,60	29,48 ± 4,46
F10	2,78 ± 0,20	4,20 ± 0,42	32,22 ± 3,24
F20	3,01 ± 0,30	3,89 ± 0,35	23,33 ± 2,30

A atividade da PBG-sintase é expressa como nmol de porfobilinogênio formado por hora por ml de eritrócitos e apresentada como média ± e.p.m. O I.R. (índice de reativação) é calculado como $I.R. (\%) = \frac{\text{atividade PBG-sintase com DTT} - \text{atividade da PBG-sintase sem DTT}}{\text{atividade da PBG-sintase com DTT}} \times 100$ e apresentado como média ± e.p.m. Não há diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3 - Atividade da ChE sangüínea total em amostras de sangue coletadas de doadores não fumantes (NF), fumantes de 10 \pm 5 cigarros por dia (F10) e fumantes de 20 ou mais cigarros por dia (F20)

GRUPOS	Atividade específica da ChE total
NF	53,74 \pm 3,60
F10	53,87 \pm 4,54
F20	63,53 \pm 3,52

A atividade enzimática está expressa como μ mol de acetilcolina hidrolisada por min por g de hemoglobina e apresentada como média \pm e.p.m. de 10 amostras analisadas por grupo.

Não há diferença significativa entre os grupos.

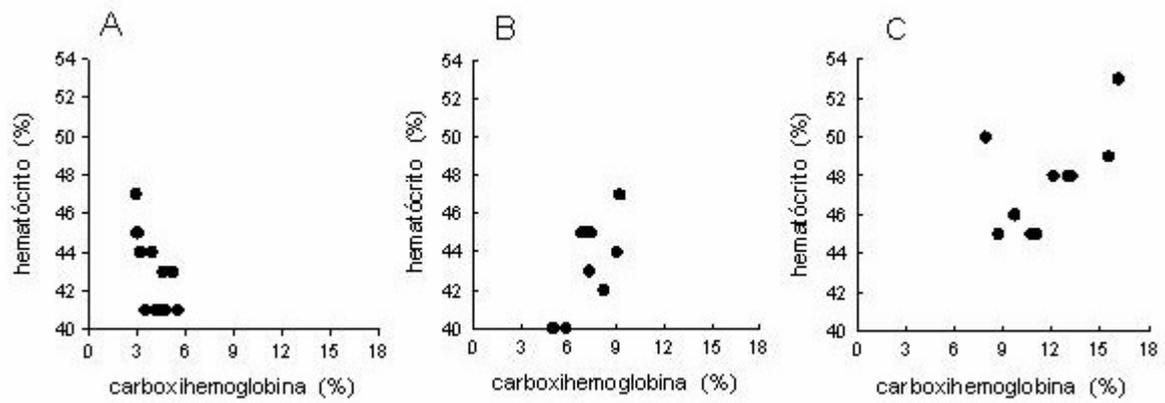


Figura 1 - Correlação entre os parâmetros COHb e hematócrito. Gráfico A – grupo NF; gráfico B – grupo F10 e gráfico C – grupo F20

4.3 Manuscrito 2: Nicotine inhibits human blood porphobilinogen synthase and cholinesterases activities *in vitro*

Maria Ester Pereira^{a,b,*}, Valério Baptista Melo da Silva^b and Nilce Coelho Peixoto^{a,b}.

^aDepartamento de Química

^bPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

Correspondence to:

*Maria Ester Pereira

Departamento de Química, CCNE, UFSM

Campus Universitário, Camobi,

97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Tel/fax: +55 55 32208799

Email: pereirame@yahoo.com.br

ABSTRACT

Nicotine is widely available in tobacco products and in certain pesticides. At binding to a subset of cholinergic receptors, it has diverse pharmacological actions and may be a source of considerable toxicity. Of remarkable importance, due to easy access and by provide essential health information, are the enzymes from blood: the porphobilinogen synthase (PBG-synthase), due to high oxidative sensibility and object of several studies, and the cholinesterases (ChEs), due to high sensitivity to organophosphates. Thus, the present work investigated the sensitivity of these enzymes to nicotine *in vitro* as possible biomarkers to this agent. The results demonstrated that to the PBG-synthase, only concentrations higher than 10 mM were able to inhibit its activity, although the mechanism involved in these inhibition seems to be not related to oxidative effects since the DTT was not able to recover the inhibition. As to ChEs, the blood acetylcholinesterase (AChE) source is much more sensitive to nicotine than the plasma ChE, since the IC_{50} were 3 and 22 mM, respectively. These results show the low sensitivity of these enzymes to nicotine. However, it is need to consider that all experiments were conducted with substrate concentration at levels of saturation and this is not a physiologic condition. This fact is important mainly in relation to blood AChE since the competitive component is involved in this inhibition; thus, the endogenous inhibition can occur even when this not appear in the *in vitro* assays. Then, we suggest that the human blood AChE deserves more attention.

Key words: porphobilinogen synthase, blood cholinesterases, nicotine, smokers.

INTRODUCTION

Nicotine [3-(1-methyl-2-pyrrolidiny)-pyridine] is widely available in tobacco products and in certain pesticides. At binding to a subset of cholinergic receptors, it has diverse pharmacological actions and may be a source of considerable toxicity (ANTHONY et al., 1995; YILDIZ, 2004). Whereas the acute poisoning is uncommon, long-term exposure to alkaloid is very common and of considerable epidemiological concern (ANTHONY et al., 1995). Nicotine binding weakly to plasmatic proteins, which facilitate its systemic distribution; its metabolism occurs in the liver and the renal excretion is dependent of urinary pH (LARINI, 1999; YILDIZ, 2004). The highest blood concentration, ranging from 15 to 50 ng/mL, is reached in few min after to smoking and fall to about 5 – 15 ng/mL after 120 min (DOMINO et al., 2004; SOHN et al., 2003; MALSON et al., 2003). Smokers usually present hematological alterations such as increase of hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb) and carboxi-hemoglobin (COHb) (HODGSON, 1997; LEVI, 1997; SILVA & PEREIRA, 2005). The maintenance of blood cell entirety and, consequently, of heme metabolism is of fundamental importance to gases transport (LEHNINGER et al., 1993). Thus, alterations in the heme biosynthesis can have as consequence the overproduction of circulating porphyrins, which produce reactive oxygen species (AFONSO et al., 1997). The more frequents targets of this metabolism alteration are central nervous system, by presence of neuropsychiatric disorders, and skin, by to present photosensitivity (LEHNINGER et al., 1993). Of remarkable importance due to high oxidative sensibility and object of several studies is the porphobilinogen synthase (PBG-synthase; E.C. 4.2.1.24) (GIBBS et al., 1985; ROCHA et al., 1993, 1995; EMANUELLI et al., 1996, 1998; FARINA et al., 2002; PEIXOTO et al., 2003; ROZA et al., 2005). This enzyme, also known as δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D), is a sulfhydrylic enzyme that catalyzes the formation of porphobilinogen (PBG) from two molecules of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) (GIBSON et al., 1955; BARNARD et al., 1977). PBG is the key monopyrrolic compounds, building block that is utilized for the biosynthesis of all porphyrins, chlorophylls and corrins (JAFFE, 1995, 2000).

Another important class of blood enzymes are the cholinesterases (ChEs). These activities, due to high inhibitory sensitivity to organophosphates, are clinically investigated in cases of suspicion of exposure to them (TAYLOR & BROWN, 1993;

TAYLOR, 1996). The ChEs are widely found in several tissues and in all vertebrate species, playing a crucial role in cholinergic neurotransmission and in other physiological events. Mammals have two main classes of ChEs: acetylcholinesterase (AChE; E.C.3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C.3.1.1.8) (MASSOULIÉ et al., 1993; LEFKOWITZ et al., 1996). In human blood, ChEs activities are represented mainly by BuChE in the plasma (also as AChE in lower quantity), and by AChE in the erythrocyte (MASSOULIÉ et al., 1993). In general, both activities are investigated as blood total ChE when of suspicion of intoxication (TAYLOR & BROWN, 1993; TAYLOR, 1996).

The human blood is a material of easy access and provides essential health information. It is an important source of ChEs and PBG-synthase enzymes, widely used as biomarker of the intoxication and/or exposure to several toxic agents. Thus, considering these features in association with the amplitude of human effects induced by nicotine, the present work was conducted with objective of to study the sensitivity of these enzymes to nicotine *in vitro* as possible biomarkers to this agent.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Acetylthiocholine (ATC), butyrylthiocholine (BuTC), ethopropazine, 5,5-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), Tris (hydroxymethyl-d₃)amino-d₂-methane, Coomassie brilliant blue G, δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) and dithiothreitol (DTT) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); bovine serum albumin (fraction V), *para*-dimethylaminobenzaldehyde, glacial acetic acid, trichloroacetic acid (TCA), HgCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄ and Na₂HPO₄ were obtained from Reagen (Rio de Janeiro, Brazil); nicotine was obtained from Aldrich (Germany); perchloric acid 70% and Triton X-100 were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All the others were of analytical grade.

PBG-synthase assay

Whole human blood samples from not smoking donator collected in citrated tubes were hemolyzed in deionized water (1:6.5, v/v) and the diluted samples were

immediately used to enzymatic assays. PBG-synthase activity was assayed according to BERLIM & SCHALLER (1974) by measuring the rate of product (PBG) formation, except that 76 mmol/L of potassium phosphate buffer (pH 6.4) and 2.2 mmol/L of δ -ALA were used. The reaction product was determined using the modified Ehrlich's reagent at 555 nm ($\varepsilon = 6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The incubation was initiated by adding 200 μL of hemolyzed sample and was carried out for 60 min at 37°C. The reaction was stopped by addition of TCA 10% containing 0.05 mol/L of HgCl_2 . The activity was expressed as nmol of PBG formed per hour per mL of erythrocytes. Aliquots of whole blood were used to determine the hematocrites by Wintrobe method (1929). The nicotine was included in assay medium to obtain the following concentrations: 0, 10, 50, 100, 150, and 200 mmol/L.

In another experiment, nicotine was tested at 0, 10, 50, and 100 mmol/L, and the effects were analyzed with or without pre-incubation of it with the enzyme for 5 min at 37°C before of incubation (substrate addition) for 60 min in the same temperature. Simultaneously, a set of tubes was assayed using a similar incubation medium, except that 7 mmol/L of DTT was also added in order to obtain the possible recuperation of enzymatic activity, case the inhibition would be related to oxidative effects on enzyme (KORGE & CAMPBELL, 1993; RODRIGUES et al., 1996). The inhibitor concentration necessary to reduce the enzymatic activity to half (IC_{50}) was calculated by Dixon plot (DIXON & WEBB, 1964).

Cholinesterase assay

Whole blood samples were collected in heparinized tubes and diluted 1:100 (v/v) with 0.1 mmol/L of phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$), pH 7.4, containing 0.03% of Triton X-100. AChE activity was determined in a medium containing 0.1 mmol/L of potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.32 mmol/L of DTNB, 0.02 mmol/L of ethopropazine (in order to inhibit BuChE), 50 μL of hemolysate and ATC. After 10 min of pre-incubation, the reaction was initiated by adding 0.45 mmol/L of ATC and the product formed was measured at 37°C by the increase of absorbance at 436 nm ($\varepsilon = 10.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (WOREK et al., 1999) during 2 min. The nicotine was tested in the following concentrations: 0, 0.5, 1.25, 2.5 and 5.0 mmol/L. All samples were

run in duplicate or triplicate. The specific activity was expressed as μmol of substrate hydrolyzed per min per g of hemoglobin. The hemoglobin was determined according to CARVALHO method (1994).

The plasma BuChE activity was determined by a modification of the spectrophotometric method of ELLMAN et al. (1961) as previously described (PEREIRA et al., 2004). Heparinized blood samples were centrifuged at 1,000 g per 10 min and the plasma were frozen until day of enzymatic assay. The BuChE activity was assayed in a medium containing 0.1 mol/L of potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.32 mmol/L of DTNB and 0.01 mL of plasma. The nicotine was added to assay medium to obtain 0, 25, 50, 75 and 100 mmol/L. The tubes were pre-incubated at 37 °C for 2 min and the reaction was initiated by adding 1 mmol/L of BTC; the velocity was measured by the increase of absorbance during 3 min at 412 nm ($\epsilon = 13.6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) at 37°C. The assays were carried out in triplicates and the enzymatic activity was expressed in μmol of BTC hydrolyzed per min per mL of plasma ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$). The IC_{50} for both activities was calculated by Dixon plot (DIXON & WEBB, 1964).

Statistical analysis

The data were analyzed by ANOVA (one or three way) followed by *post hoc* Duncan's multiple range test or by Student *t* test when appropriated. Differences between groups were considered significant when, at least, $p \leq 0.05$. All analyses were performed using the Statistical Package for Sciences (SPSS) software.

Ethics

This study was performed in accordance with the University Ethic Committee for experiments with human blood.

RESULTS

Effects of nicotine on PBG-synthase activity

The PBG-synthase activity in presence of 10 to 200 mmol/L of nicotine is presented in figure 1. The statistical analyses, oneway ANOVA, revealed that the nicotine significantly inhibits the enzyme activity in concentrations higher than 10 mmol/L [$F(5,18) = 13.55$; $p < 0.001$].

In figure 2 are exposed the effects of the nicotine and of pre-incubation on the PBG-synthase activity in the presence of 7 mmol/L of DTT. The three-way ANOVA (pre-incubation x DTT x nicotine) revealed significant effect of DTT [$F(1,8) = 44.45$; $p < 0.001$], of nicotine [$F(3,24) = 75.79$; $p < 0.001$] and of DTT x nicotine interaction [$F(3,24) = 20.76$; $p < 0.001$]. The interaction effect was due to fact that the DTT only increased the enzymatic activity when was used 0 or 10 mmol/L of nicotine.

Effects of nicotine on erythrocyte AChE and plasma BuChE activities

AChE activity is presented in figure 3A. The one-way ANOVA revealed significant effects of nicotine [$F(4,10) = 5.26$; $p < 0.02$]. The *post-hoc* Duncan's multiple range test demonstrated that 1.25 mmol/L or more of nicotine inhibited significantly the enzyme activity. The inhibitions were 22%, 39%, 54% and 68% to 0.5, 1.25, 2.5 and 5.0 mmol/L of nicotine, respectively.

The one-way ANOVA revealed significant effect of nicotine on plasmatic BuChE activity [$F(4,10) = 8.86$; $p < 0.003$]. The *pos-hoc* Duncan's multiple range test demonstrated that all the alkaloid concentrations significantly inhibited the enzymatic assay: 36%, 59%, 74% and 80% to 25, 50, 75 and 100 mmol/L, respectively (Figure 3B).

DISCUSSION

The aim of this work was to investigate the sensibility of blood enzymes to nicotine *in vitro*. This compound binding weakly to plasma proteins and easily can reach the entire organism in a short time interval (LARINI, 1999; YILDIZ, 2004). Both, PBG-synthase and ChEs, are important blood enzymes and their sensitivities to several xenobiotics have suggested them as a fundamental biomarker of exposition

to these compounds (GOYER, 1996; LARINI, 1999; TAYLOR & BROWN, 1993; TAYLOR, 1996; WOREK et al., 1999). Thus, the study of nicotine effects *in vitro* can help to understand the weak sensitivity of these enzymes when organisms are submitted to chronic exposition of nicotine (HEINEMANN, 1982; SILVA & PEREIRA, 2005; SALLE & ZIELHUIS, 1977).

The PBG-synthase enzyme is very sensitive to several oxidants and pro-oxidants agents (ROCHA et al., 1993, 1995; EMANUELLI et al., 1996, 1998; FARINA et al., 2002; PEIXOTO et al., 2003; ROZA et al., 2005). The decrease of its activity by oxygen, and then per extension, by pre-incubation procedure is widely related in literature to more variable sources of enzyme (ROCHA et al., 1995; EMANUELLI et al., 1996). However, in this work we verified that the pre-incubation *per se* did not decrease the enzyme activity either without or with nicotine in the assay medium. Enhance of inhibitor effect with pre-incubation is waited due to increase of contact time between enzyme and inhibitor before substrate addition. However, nicotine concentrations higher than 10 mmol/L decreased the enzyme activity for both sets of incubation. Moreover, beyond the pre-incubation did not increase the inhibition by nicotine, the IC₅₀ of nicotine obtained by assay without pre-incubation was slightly lower than that with pre-incubation, 120 mmol/L and 190 mmol/L, respectively. Another interesting result was the DTT effect. This compound is widely used to reactivate and/or to prevent the enzymatic activity loss by manipulation procedure of biological material or the enzyme inhibition by heavy metal or other oxidant agents (KORGE & CAMPBELL, 1993; RODRIGUES et al., 1996; EMANUELLI et al., 1998). Our results showed that the DTT was only effective in to reactivate the enzymatic activity when the assay was carried out in the absence of inhibitor or in the presence of smallest concentration of it (0 and 10 mmol/L, respectively). Besides, the DTT recovered the lost activity by pre-incubation but not by nicotine inhibition, suggesting that the inhibitory effects of nicotine probably do not involve oxidative alterations in the enzyme molecule, or the binding of nicotine is sufficiently strong to be modified by this agent. Previous results of this laboratory have demonstrated a little decrease in PBG-synthase activity from blood of smoker donators. This inhibition was not reverted by DTT *in vitro*. Still, of the similar way to *in vitro* effects, the enzymatic reactivation index was lightly lower (21%) to blood from smoker than from not smoker donators (SILVA & PEREIRA, 2005).

The blood ChEs activities were inhibited by nicotine and the inhibitory potential of this compound depended of the activity analyzed. The blood AChE activity was approximately 7 fold more sensitive to nicotine than plasma BuChE; the IC_{50} were 3.0 and 22 mmol/L, respectively.

To determine these activities the assays were conducted of way to minimize the influence of other serine hydrolases. AChE assay medium contained ethopropazine in enough concentration to inhibit the BuChE but not to inhibit the AChE activity; and, the tiocoline formed by enzymatic hydrolyze of ATC was read at 436 nm to minimize the influence of hemoglobin present in preparation of total blood (WOREK et al., 1999). In regard to BuChE, the esterase activity predominantly found in the human plasma (98%) (MASSOULIE et al., 1993), the assay was conducted using BTC, a substrate very little hydrolyzed by AChE (SILVER, 1974). However, to both activities, the assay contained substrate enough to saturate enzyme molecules. It is very important when considered that the enzymatic inhibition by nicotine involve the competitive component. In fact, although low nicotine concentrations are not enough to inhibit the AChE enzyme, it is enough to significantly increase the K_m in, at least 25% in the presence of 0.1 mmol/L of nicotine: the K_m to blood AChE enzyme are around 0.116 and 0.144 mM of acetylthiocholine to absence and presence of inhibitor, respectively (PEREIRA et al., 2006, submitted).

The nicotine is the main addictive component from tobacco and then, it has became the object of the more variety studies (CHANG et al., 1973; PABST et al., 1995; DOMINO et al., 2004; YILDIZ, 2004). The sensibilities of PBG-synthase and ChEs to a great diversity of toxic agents have suggested their use as useful biomarker to exposure and/or intoxication to these agents (DOWLA et al., 1996; PANEMANGALORE et al., 1999; NIGG & KNAAK, 2000). Although no mechanism of nicotine effects was here elucidate, our results demonstrated that the both enzymes, PBG-synthase and ChEs, are sensitive to nicotine *in vitro*, and the human blood AChE deserves more attention in relation to nicotine and biomarkers.

References

- Afonso, S. G., De Salamanca, R. E., Battle, A., 1997. Folding and unfolding of delta-aminolevulinic acid dehydratase and porphobilinogen deaminase induced by uro-and protoporphyrin, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 493-503.
- Anthony, D. C., Montine, T. J., Graham, D. G., 1995. Toxic responses of the nervous system. *In: Klaassen C.D. (Ed.), Casarett e Doull's toxicology the basic science of poisons.* New York: McGraw-Hill, pp. 463-486.
- Berlim, a.; Schaller, k. h., (1974) European Standardized Method For The Determination Of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity In Blood. *Journal Of Clinical Chemistry And Clinical Biochemistry.* 12: 389-390.
- Barnard, G. F., Itoh, R., Hohberger, L. H., Shemin, D., 1977. Mechanism of porphobilinogen synthase: Possible role of essential thiol groups, *Journal of Biological Chemistry* 252, 8965-8974.
- Carvalho, W., 1994. *Técnicas Médicas de Hematologia e Imunohematologia*, 6° ed., Coopmed, Belo Horizonte, pp. 235-250.
- Chang, P., Bhagat, B., Taylor, J. J., 1973. Effect or chronic administration of nicotine on acetylcholinesterase activity in the hypothalamus and medulla oblongata of the rat brain an ultrastructural study, *Brain Research* 54, 75-94.
- Dixon, M., Webb, E.C., 1964. *Enzymes.* Longmans, London, p 950.
- Domino, E. F., Ni, L., Xu, Y., Koeppe, R. A., Guthrie, S., Zubieta, J., 2004. Regional cerebral blood flow and plasma nicotine after smoking tobacco cigarettes, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28, 319-327.
- Dowla, H. A., Panemangalore, M., Byers, M. E., 1996. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma *in vitro* by agricultural chemicals, *Archives of Environmental Contamination e Toxicology* 31, 107-114.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr., V., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology* 7, 88-95.
- Emanuelli, T., Rocha, J. B. T., Pereira, M. E., Porciúncula, L. O., Morsch, V. M., Martins, A. F., Souza, D. O., 1996. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on δ -aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice, *Pharmacology & Toxicology* 9, 136-143.

- Emanuelli, T., Rocha, J. B. T., Pereira, M. E., Nascimento, P. C., Souza, D. O. G., Beber, F. A., 1998. δ -Aminolevulinatase dehidratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state, *Pharmacology e Toxicology* 83, 95-103.
- Farina, M., Barbosa, N. B. V., Nogueira, C. W., Folmer, V., Zeni, G., Andrade, L. H., Braga, A. L., Rocha, J. B. T., 2002. Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinatase dehidratase from rat liver and cucumber leaves, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 623-631.
- Gibbs, P. N. B., Gore, M. G., Jordan, P. M., 1985. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinatase dehidratase, *Biochemical Journal* 225, 573-850.
- Gibson, K. D., Neuberger, A., Scott, J. J., 1955. The purification and properties of δ -aminolevulinic acid dehidratase, *Biochemical Journal* 61, 618-629.
- Goyer, R.A. Toxic effects of metals. *in* Klaassen, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1111 p. Cap. 23, p. 691-712, 1996.
- Heinemann, G., 1982. Effect of cigarette Smoking on White Blood Cells and Erythrocyte Enzymes. *Archives of Environmental Health*, 37: 261 – 265,.
- Hodgson, E. Diagnosis and Treatment of Toxicity. *In* Hodgson, E.; Levi, P.E. (Eds). A textbook of modern toxicology. 2 ed. Stamford, Connecticut: Appleton e Lange, 496 p. Cap. 14, p. 373-388, 1997.
- Jaffe, E.K., 1995. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. *Journal Bioenergy Biomembrane*, 27, 169-179
- Jaffe, E. K., 2000. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes, *Acta Crystallographica* 56, 115-128.
- Korge, P., Campbell, K. B., 1993. The effects of changes in iron redox state on the activity of enzymes sensitive to modification of SH groups, *Archives of Biochemistry & Biophysics* 30, 420-428.
- Larini, L. Inseticidas de origem vegetal. *In: Larini, L.*, ed. Toxicologia dos Praguicidas, 1ª ed. São Paulo: Manole, p. 93-98, 1999
- Lefkowitz, R. J., Hoffman, B. B., Taylor, P. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. *in: Hardman J. G., Gilman A. G., Limbird L. E.*,

- eds. Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. New York: McGraw-Hill, p. 105-139, 1996.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Principles of Biochemistry, 2nd ed. New York: Worth, 1993.
- Levi, P.E. Classes of Toxic Chemicals. *In* Hodgson, E.; Levi, P.E. (Eds). A textbook of modern toxicology. 2 ed. Stamford, Connecticut: Appleton & Lange, 496 p. Cap. 10, p. 228-284, 1997.
- Malson, J. L., Lee, E. M., Murty, R., Moolchan, E. T., Pickworth, W. B., 2003. Clove cigarette smoking: biochemical, physiological, and subjective effects, *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 74, 739-745.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F. M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases, *Progress in Neurobiology*. 41, 31-91.
- Nigg, H. N., Knaak, J. B., 2000. Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure, *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 163, 29-111.
- Pabst, M. J., Pabst, K. M., Collier, J. A., Coleman, T. C., Lemons-Prince, M. L., Godat, M. S., Waring, M. B., Babu, J. P., 1995. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine, *Journal of Periodontology* 66, 1047-1055.
- Panemangalore, M., Dowla, H. A., Byers, M. E., 1999. Occupational exposure to agricultural chemicals: effects on the activities of some enzymes in the blood of farm workers, *International Archives of Occupational and Environmental Health* 72, 84-88.
- Peixoto, N. C., Roza, T., Flores, E. M. M., Pereira, M. E., 2003. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂-δ-ALA-D inhibition and Hg levels in tissues of suckling rats, *Toxicology Letters* 146: 17-25.
- Pereira, M. E., Adams, A. I. H., Silva, N. S., 2004. 2,5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro, *Toxicology Letters* 146, 269-274.
- Pereira, M.E., Figueiró, M., Sonogo, F., Dorr, F.A., Jôsé, A.S., 2006. Sensitivity of acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7) from different sources to nicotine in vitro. *Basic e Clinical Pharmacology & Toxicology* (submitted).
- Rocha, J. B. T., Freitas, A. J., Marques, M. B., Pereira, M. E., Emanuelli, T., Souza, D. O., 1993. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinat

- dehydratase of suckling rats, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26, 1077-1083.
- Rocha, J. B. T., Pereira, M. E., Emanuelli, T., Christofari, R. S., Souza, D. O., 1995. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats, *Toxicology* 100, 27-37.
- Rodrigues, A. L. S., Rocha, J. B. T., Pereira, M. E., Souza, D. O., 1996. δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in weaning and adults rats exposed to lead acetate. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 57, 47-53.
- Roza, T., Peixoto, N. C., Welter, A., Flores, E. M. M., Pereira, M. E., 2005. 2,3-Dimercapto-1-propanol does not alter the porphobilinogen synthase inhibition but decreases the mercury content in liver and kidney of suckling rats exposed to $HgCl_2$, *Basic e Clinical Pharrnacology & Toxicology* 96, 302-308.
- Salle, H. J., Zielhuis, R. L., 1977. Influence of smoking on aminolevulinic acid dehydratase activity, haematocrite and lead in blood in adult urban women, *International Archives of Occupational and Environmental Health* 40, 111-115.
- Silva, V. B. M., Pereira, M. E., 2005. Hematologic and toxicologic parameters in blood samples of smoker donators. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 37, 97-101.
- Silver, A. (Ed). *The Biology of Cholinesterases*. North Holland, Amsterdam, 1974.
- Sohn, M., Hartley, C., Froelicher, E. S., Benowitz, N. L., 2003. Tobacco use and dependence, *Seminars in Oncology Nursing*, 19, 250-260.
- Taylor, P., Brown, J. H., 1993. Acetylcholine. *In: Siegel G. J., Agranoff, B. W., Albers R. W., Molinoff P.B. (Eds.), Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York, USA, pp. 231-260.
- Taylor, P. 1996. Anticholinesterase agents; Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. *In: Hardman J. G., Gilman A. G., Limbird L. E., editors. Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 161-176; 177-197.
- Wintrobe, M. M., 1929. A simple and accurate hematocrit, *Journal of Laboratory Clinical Medicine*, 15: 287, 1929.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, *Clinica*

Chimica Acta 288, 73-90.

Yildiz, D., 2004. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects, Toxicon 43, 619-632.

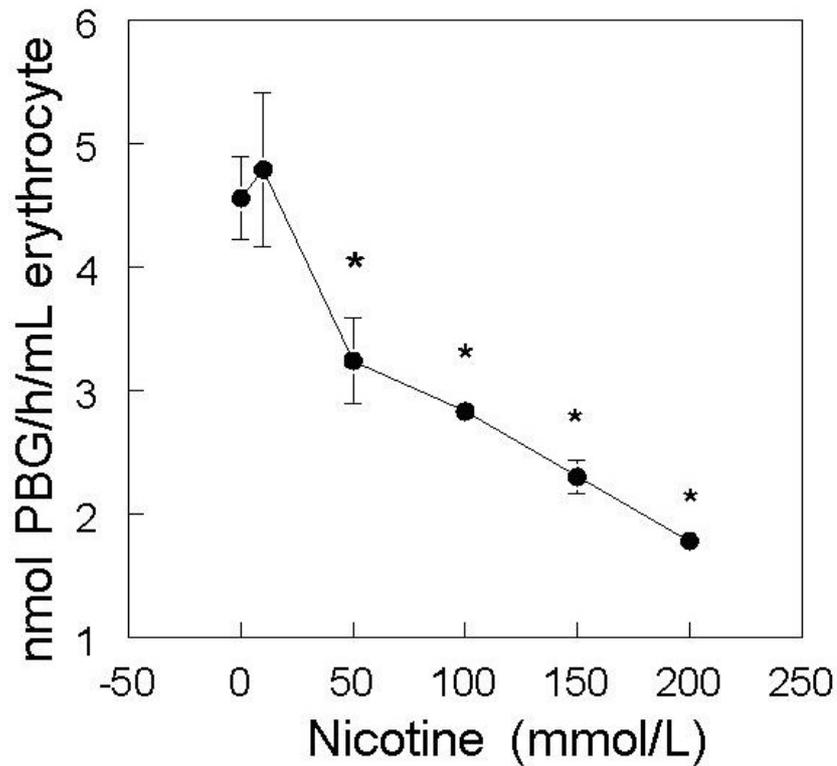


Figure 1 - Effect of nicotine on erythrocytic PBG-synthase activity. The inhibitor was incubated with blood hemolyzed by 60 min at 37°C. The results are presented as mean \pm S.E.M of three independent enzymatic assays

* Differ from 0 mmol/L at least $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

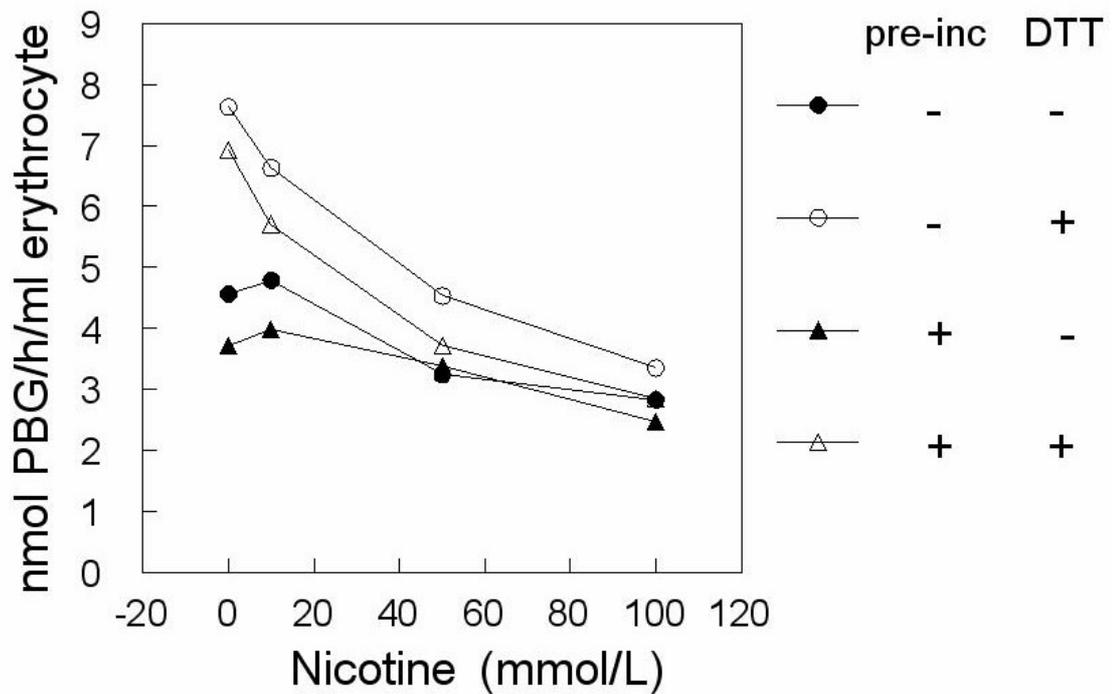


Figure 2 - Erythrocytic PBG-synthase activity. Effects of nicotine and DTT pre-incubated or not with the enzyme before addition of the substrate. The results represent the mean \pm S.E.M of three independent enzymatic assays. The statistical analysis is described in the text

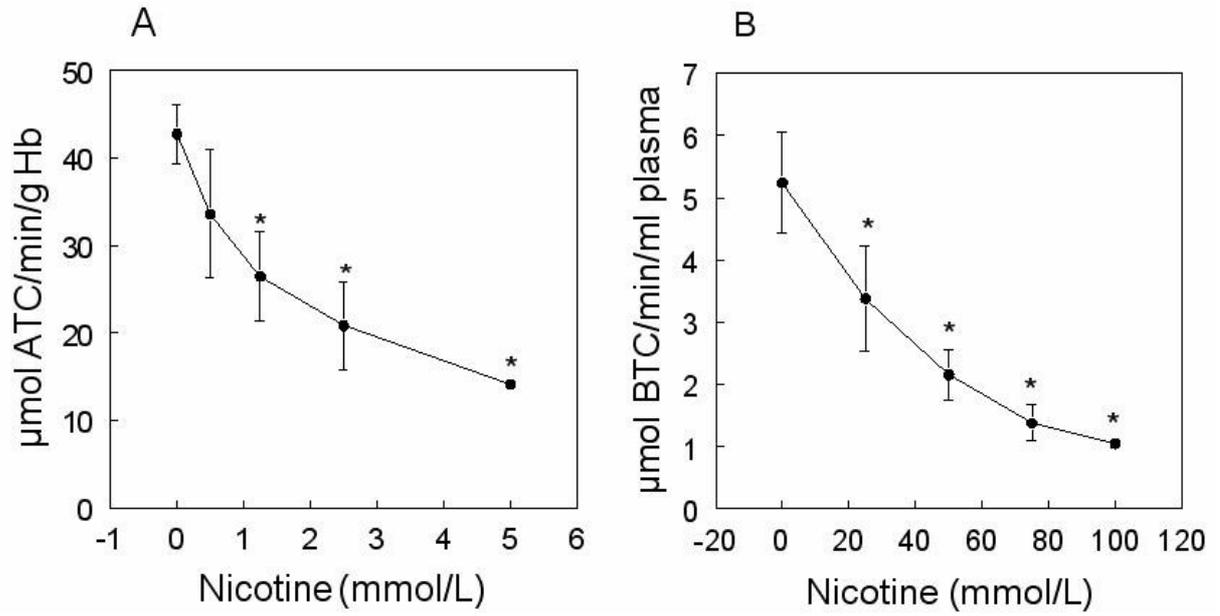


Figure 3 - Blood AChE (A) and plasma BuChE (B) activities in the presence of nicotine. The results are presented as mean \pm S.E.M. of three enzymatic assays and expressed as μmol of ATC hydrolyzed per min per g of Hb and as μmol of BTC hydrolyzed per min per mL of plasma, respectively

* Differ from 0 mmol/L to $p < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho serão discutidos da forma que foram apresentados na seção resultados, excluindo a seção de validação de técnica.

Inicialmente abordaremos os tópicos que discutem os dados obtidos nos testes realizados nas amostras coletadas de doadores de sangue do serviço de hemoterapia do HUSM. A seguir, a explanação considera os resultados obtidos nos experimentos realizados *in vitro*.

5.1 Parâmetros hematológicos e toxicológicos em amostras de doadores de sangue fumantes

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo principal de analisar alguns parâmetros relacionados à qualidade do sangue de doadores fumantes. Com este objetivo, as amostras de sangue foram analisadas quanto aos parâmetros HT, Hb, COHb e quanto à atividade das enzimas PBG-sintase eritrocitária e ChE sangüínea total.

5.1.1 Parâmetros hematológicos

Os três parâmetros hematológicos analisados foram aumentados pelo tabagismo. Verificou-se aumentos significativos do HT e da Hb no grupo F20 (10%); e, para a COHb, ambos os grupos fumantes, F10 e F20, apresentaram aumentos significativos de 79% e 190%, respectivamente. A correlação entre HT e COHb mostra uma associação acentuada para o grupo F20 e moderada para o grupo F10.

O aumento no HT, como aquele apresentado pelo grupo 3 (F20), tem sido descrito na literatura como “policitemia do fumante” ou ainda policitemia relativa

adquirida (SMITH & LANDAW, 1978). Esta discrasia sangüínea tem sido descrita na literatura para amostras de sangue coletadas de indivíduos fumantes (SMITH & LANDAW, 1978; STEWART et al., 1974). Além disso, aumento do HT tem sido observado em indivíduos expostos a baixas concentrações de CO, sugerindo que o CO é o responsável direto por esta alteração hematológica. A diminuição do volume plasmático associado a uma elevação na contagem celular sugere que o hábito de fumar é a causa da policitemia (SMITH & LANDAW, 1978).

Embora todos os doadores tivessem valores de HT de acordo com os valores de referência recomendados pela RDC-153, estes variam em uma faixa muito ampla ($47\% \pm 7$). Assim, constata-se que os fumantes, os quais possuem HT significativamente maior que os indivíduos não fumantes ($47,7\%$ versus $43,0\%$), são livremente aceitos, em relação a este critério, como doadores de sangue nos serviços de hemoterapia. A Hb é uma proteína exclusivamente eritrocitária, portanto um aumento na contagem dos eritrócitos acarreta a elevação das taxas de Hb sérica em condições fisiológicas normais. Sendo assim, indivíduos que apresentam níveis de HT altos, também demonstram elevações em suas hemoglobinometrias (RODWELL, 1998). E, segundo SMITH & LANDAW (1978), os níveis de HT juntamente com os de Hb sofrem redução nestes valores quando os mesmos param de fumar.

Quanto a COHb, os resultados deste estudo estão de acordo com aqueles apresentados na literatura (MADANY, 1992, BEUTLER & WEST, 1984, STEWART et al., 1974) a qual relata taxas elevadas de COHb sérica em indivíduos fumantes; e ainda, uma relação significativa entre o aumento dos níveis de COHb e a quantidade de tabaco inalada (SMITH & LANDAW, 1978). MADANY (1992) em uma pesquisa envolvendo uma população de 107 indivíduos, constatou níveis elevados de COHb em doadores de sangue que residiam na zona rural e possuíam o hábito de fumar tabaco.

STEWART et al. (1974) determinaram os níveis de COHb em uma população de 29.000 doadores de sangue e constataram níveis maiores em doadores fumantes. Além disso, os autores verificaram que a taxa de COHb nas bolsas de sangue coletadas de fumantes, permanece alta durante todo período de estocagem (45 dias a $2-6^{\circ}\text{C}$); caracterizando a contaminação das referidas bolsas de sangue

pelo CO oriundo do cigarro.

Exposição direta ao CO pode ser possível pelo hábito de fumar (MADANY et al., 1992, BEUTLER & WEST, 1984, STEWART et al., 1974). Um estado de anemia funcional não patológica é produzido sempre que houver exposição ao CO, pois este gás tem como moléculas-alvo os grupamentos heme da Hb, formando então a COHb. Quando ocorre uma ligação de uma ou mais moléculas de CO aos grupamentos heme da Hb, tem-se um aumento na afinidade dos sítios remanescentes para o oxigênio e assim dificultando a sua liberação para os tecidos (RODWELL, 1998). A conseqüência final do processo é uma hipóxia tecidual, caracterizando um estado de anemia funcional. Com o objetivo de compensar a hipóxia tecidual causada pela disfunção da Hb, o fumante crônico apresenta um aumento no número de células sangüíneas vermelhas, já que o mesmo convive com uma progressiva hipoxemia proporcional aos níveis de COHb sérica (SMITH & LANDAW, 1978).

5.1.2 Parâmetros toxicológicos

5.1.2.1 Atividade da enzima PBG-sintase e índice de reativação

Os resultados demonstram que a atividade da PBG-sintase não se apresentou modificada em amostras de sangue de doadores fumantes, embora a atividade dos doadores F20 foram ligeiramente menor (12%) que a dos demais grupos, e apresentou um índice de reativação de 21% menor que o grupo não fumante. Considerando que um dos componentes do cigarro é a nicotina, estes resultados discordam daqueles obtidos neste trabalho (ver adiante) e dos relatados por DOWLA et al. (1996) *in vitro*, e diferem daqueles relatados na literatura que mostram inibição da enzima em indivíduos fumantes (SALLE & ZIELHUIS, 1977; OKUNO, 1973; HEINEMANN, 1982; PANEMANGALORE et al., 1999). HEINEMANN (1982) verificou que embora a enzima apresenta-se inibida em indivíduos fumantes, é sabido que apenas 20% da capacidade enzimática total é necessária para manter a síntese do heme e os níveis de Hb normais.

A PBG-sintase por ser uma enzima sulfidrídica, é extremamente sensível a metais pesados como o cádmio, chumbo e mercúrio (PEIXOTO et al., 2003; ROCHA et al., 1995; RODRIGUES et al., 1996) assim como a agentes oxidantes (EMANUELLI et al., 1996). Um dos metais citados, o cádmio, está presente em cigarros e assemelhados por estar previamente concentrado nas folhas de fumo (KALCHER et al., 1993).

O consumo de cigarros é uma forma de intoxicação não ocupacional significativa, pois uma unidade contém 1-2 μg de metal. Assim, o consumo de 20 cigarros diariamente levaria a uma dose aproximada de 1 mg do metal por mês (SALGADO, 1996; GOYER, 1996). Embora o cádmio seja um potente inibidor *in vitro* da PBG-sintase (PEIXOTO et al., 2003), seus efeitos *in vivo* são mais sutis (PEIXOTO et al., 2004). Além disso, o cádmio, assim como alguns outros metais divalentes, induz a síntese de metaloproteínas, proteínas estas que funcionariam como um mecanismo de detoxificação ao se ligarem no metal tóxico, tornando-o indisponível para exercer seus efeitos nocivos (ROMERO-ISART & VASÁK, 2002). Assim, os níveis de cádmio necessários para inibir a enzima, teriam que ser superiores a aqueles necessários para induzir a síntese de metaloproteínas e permanecerem ligados a ela.

No presente estudo, verificou-se que as atividades da PBG-sintase são semelhantes entre os grupos estudados e que o DTT reativou, de maneira estatisticamente similar, a atividade da enzima independentemente da exposição ou não ao tabaco. Estas diferenças em relação à literatura podem ser conseqüências de outros fatores inerentes ao hábito de fumar como o tipo e composição do cigarro, número e tempo de uso, idade do indivíduo, etc.

5.1.2.2 Atividade da enzima ChE sangüínea total

Além de vários constituintes tóxicos no cigarro, é conhecida a freqüência com que contaminantes como os agrotóxicos do tipo 2,2-bis (p-clorofenil) e o 1,1,1-tricloroetano (DDT), estão presentes no fumo e na fumaça do cigarro (PEREZ, 1982).

As inibições das colinesterases por organofosforado têm sido bem estudadas e revistas extensivamente (DEN TONKELAAR, 1990; LARINI, 1999; LARINI & SALGADO, 1997; TAYLOR, 1996). Embora a função das colinesterases circulantes não esteja bem esclarecida, a inibição desta enzima é usada como um bioindicador de exposição, mas não como indicador de intoxicação por destes compostos, até porque, alterações nas atividades plasmáticas podem preceder aos sintomas de intoxicação (LOTTI, 1995).

O sangue total contém duas fontes de material enzimático: soro, que é rico em atividade do tipo butirilcolinesterase (BuChE), e eritrócito, que é rico em atividade tipo acetilcolinesterase (AChE) (YEATO et al., 1998). Neste estudo avaliou-se a atividade colinesterásica total em sangue total, utilizando como substrato a acetiltiocolina. Desta forma favoreceu-se a atividade colinesterásica dos eritrócitos (AChE), com a participação em menor grau da enzima sérica (BuChE) que também hidrolisa o substrato ATC, porém com menor especificidade (MASSOULIÉ & BOM, 1982). O propósito deste experimento foi analisar a atividade da ChE sangüínea total, e, verificou-se que esta atividade não apresentou-se alterada nos indivíduos fumantes (F10 e F20). Resultados deste laboratório têm demonstrado que atividade da ChE sangüínea total é significativamente inibida pela nicotina *in vitro* (JOSÉ et al., 2003). Porém, ao considerar-se o procedimento técnico de preparação da amostra (é diluída 100 vezes) e a quantidade de nicotina que deveria estar presente e ligada à enzima *in vivo* e permanecer ligada até o momento da análise enzimática (*ex-vivo*), pressupõe-se que esta deveria ser grande.

5.2 Efeito da nicotina *in vitro* sobre a atividade da PBG-sintase, AChE eritrocitária e BuChE plasmática

5.2.1 Atividade da PBG-sintase eritrocitária com e sem pré-incubação: efeitos da nicotina e do DTT *in vitro*

Estes resultados demonstram que a atividade da PBG-sintase é inibida pela nicotina *in vitro*; e inibição similar foi verificada mesmo quando a enzima foi pré-incubada com o inibidor por cinco minutos. Tem-se verificado que a pré-incubação

da enzima pode *per se* induzir uma pequena inibição desta devido ao aumento do tempo de exposição da enzima ao meio externo (RODRIGUES et al., 1996; ROCHA et al., 1995). Entretanto, neste estudo, a pré-incubação não reduziu a atividade da enzima e o efeito da nicotina não se apresentou mais pronunciado como consequência da pré-incubação.

O DTT é um composto redutor que tem a capacidade de manter os grupamentos SH íntegros, ou seja, no estado reduzido, uma condição essencial para a atividade enzimática da PBG-sintase. Portanto, inibições revertidas por este composto estão relacionadas com a integridade e funcionalidade dos grupamentos sulfidrílicos da molécula enzimática (ABEL, 1994). Entretanto, neste estudo, DTT não reativou a inibição da atividade da PBG-sintase pela nicotina. Quando o DTT consegue reverter à inibição causada por um determinado composto, sugere-se que este inibidor tem seu alvo-molecular situado na região β da molécula da enzima e pode oxidar resíduos do aminoácido lisina (EMANUELLI et al., 1996). Assim, este parece não ser o mecanismo inibitório da nicotina sobre a PBG-sintase.

5.2.2 Efeito da nicotina sobre as atividades das colinesterases

O tabagismo está caracterizado por ser um hábito que acarreta inúmeros efeitos de relevâncias clínicas, farmacológicas e toxicológicas no tabagista.

As colinesterases são enzimas que desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas (MASSOULIÉ et al., 1993). Este bloco de experimentos determinou a atividade da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase em presença do principal alcalóide do tabaco, que é a nicotina, *in vitro*.

Ambas as atividades enzimáticas, AChE e BuChE foram significativamente inibidas pela nicotina *in vitro*. Entretanto, a sensibilidade das atividades à nicotina é bastante diferente. A AChE eritrocitária é aproximadamente 7 vezes mais sensível que a BuChE plasmática à nicotina.

A modificação dos parâmetros cinéticos e sistema de inibição podem envolver, entre outros aspectos, a existência de resíduos que diferem na homologia entre as colinesterases, como a sensibilidade ao tamanho do grupamento acil do substrato pelas colinesterases ou da interação dos fármacos com outros domínios hidrofóbicos, como o sítio aniônico periférico; ou o “bolso de acil” resultando em modificações dos sistemas de inibição (MASSOULIÉ, 1993; RADICZ et al., 1994).

Os substratos endógenos podem ser usados como auxiliares na distinção entre as colinesterases, uma vez que estes diferem quanto a afinidade ao sítio ativo das enzimas. A AChE hidrolisa mais rápido a acetilcolina que a butirilcolina, propionilcolina ou tributirina, e o contrário acontece com a BuChE (AMITAI, 1998). Outro aspecto que pode ser utilizado para distinguir as atividades é a sensibilidade diferente que AChE e a BuChE apresentam em relação a inibição pelo excesso de substrato, uma vez que, enquanto a AChE é inibida por concentrações de acetiltiocolina superiores a 1 mmol/L (PEREIRA et al., 2004), a butirilcolinesterase, dependendo da fonte, pode apresentar um K_m em torno de 10 mmol/L (PAGE et al., 1985).

Neste estudo utilizou-se o substrato específico para a atividade enzimática em questão, isto é, para a análise da atividade da AChE eritrocitária (AChE sangüínea total), a mesma hidrolisou o substrato acetiltiocolina na presença de etopropazina em concentrações suficientes para inibir o percentual de BuChE presente de origem plasmática. Para os ensaios da BuChE plasmática, foi utilizado o substrato butiriltiocolina, uma vez que as pseudolinesterases podem hidrolizar eficientemente outros substratos. Devido à sensibilidade pequena da BuChE ao inibidor, necessitou-se usar concentrações de nicotina 20 vezes maior nos ensaios da BuChE para que se atingisse uma redução na hidrólise da butiriltiocolina similar à verificada para a enzima eritrocitária.

A caracterização cinética da inibição das ChE por nicotina pode ser um aliado para melhor entender a baixa sensibilidade desta atividades, uma vez que o efeito inibitório pode ser verificado e concentrações de substratos e inibidores mais próximos aos encontrados fisiologicamente.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

Experimentos *in vivo*

- O hematócrito e a hemoglobina apresentaram-se aumentados no grupo F20, isto é, em doadores de sangue que fumam 20 ou mais cigarros diariamente;
- Os níveis de carboxihemoglobina apresentaram-se aumentados em ambos os grupos fumantes, F10 e F20, sendo que este último mostrou um aumento de 190% em relação ao controle e de 60% em relação ao grupo F10 (10 ± 5 cigarros por dia), demonstrando que este parâmetro é mais sensível ao tabagismo que o hematócrito e a hemoglobina;
- A atividade da enzima PBG-sintase não foi alterada significativamente pelo hábito de fumar; entretanto, a pequena inibição apresentada pelo grupo F20 não foi reativada por DTT, apresentando este grupo uma reativação menor que os demais;
- A atividade da colinesterase sangüínea total de doadores fumantes (F10 e F20) não apresentou alteração.

Experimentos *in vitro*

- A nicotina inibiu a atividade da PBG-sintase *in vitro*, porém, em concentrações relativamente elevadas;
- O DTT não reverteu à inibição da PBG-sintase causada pela nicotina *in vitro*, sugerindo que o mecanismo envolvido nesta inibição não esteja relacionado a

uma alteração nos grupos SH da enzima;

- A nicotina inibiu a atividade das enzimas acetilcolinesterase eritrocitária e butirilcolinesterase plasmática *in vitro*; entretanto, a sensibilidade da primeira ao alcalóide foi aproximadamente sete vezes maior que a segunda.

Conclusões gerais

- Os resultados apresentados *in vitro* para as enzimas estudadas não correspondem aos verificados *in vivo*. Estas diferenças de efeitos podem estar relacionadas a grande quantidade de substâncias tóxicas encontradas na fumaça do cigarro e também a fatores implicados no metabolismo da nicotina *in vivo*, tais como a sua farmacodinâmica e farmacocinética, assim como os níveis de cotinina, principal metabólito da nicotina, cujo metabolismo hepático, catalisado pelo citocromo p450, é o primeiro passo desta rota (NAKAIAMA et al. 1993).
- Os resultados deste trabalho em adição a escassez de dados na literatura relacionados à qualidade do sangue usado em serviços de hemoterapia demonstram a necessidade de mais estudos sobre efeitos da contaminação do sangue usado em serviços de hemoterapia oriundos de indivíduos fumantes.
- Com base no presente estudo podemos sugerir que seja incluído na normatização técnica que regula a hemoterapia brasileira, os valores de referências máximos de hematócrito para a doação de sangue e assim aumentar a qualidade do sangue transfundido no território brasileiro, já que os fumantes possuem valores elevados deste parâmetro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, L. **Delta-aminolevulinato desidratase (E. C. 4.2.1.24) em cultura de tecidos de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae):** características bioquímicas e efeito de metais pesados. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.
- AFONSO, S.G.; DE SALAMANCA, R.E.; BATLLE, A. Folding and unfolding of delta-aminolevulinic acid dehydratase and porphobilinogen deaminase induced by uro-and protoporphyrin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29: 493-503, 1997.
- AITIO, A. Biological monitoring today and tomorrow. **Scandinavian Journal of Work Environment and Health**, v. 20: 46-58, 1994.
- ALESSIO, L. Reference values for the study of low doses of metals. **Interaction Archives Ocupacional Health**, v. 65: 23-27, 1993.
- AMITAI, G.; MOORAD, D.; ADANI, R. Inibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Chlorpyfos-oxon. **Biochemical Pharmacology**, v. 56: 293-9, 1998.
- ANTHONY, D.C.; MONTINE, T.J.; GRAHAM, D.G. Toxic responses of the nervous system. In: KLAASSEN C.D. (ed.), **Casarett & Doull's toxicology the basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill,. p. 463-486, 1995.
- ASHFORD, W.; SHERMAN, K.A.; KUMAN, V. Advances in Alzheimer therapy: cholinesterase inhibitors. **Neurobiology of Aging**, v. 10: 95-105, 1989.
- ASTRIN, K.H.; BISHOP, D.R.; WETMUR, J.G.; KAUL, B.; DAVIDOV, B.; DESNICK, R.L. Delta amino levulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. **Annual New York Academic Science**, v. 514: 213-29, 1987.
- BARDIN, P.G.; VAN EEDEN, S. F.; MOOLMAN, J.A.; FODEN, A.P.; JOUBERT, J.R. Organophosphate and Carbonate poisoning. **Archives of International Medicine**, v. 154:1433-1441, 1994.
- BASTONE, A.; FRONTALI, N.; MALLOZZI, C.; SBRACCIA, M.; BENOWITZ, N.L.; JACOB. Nicotine and cotinine elimination pharmacokinetic in smokers and nonsmokers. **Clinical Pharmacology**, v. 53: 316-323, 1987.
- BERLIM, A.; SCHALLER, K.H. European Standardized Method for the Determination of δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity in Blood. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.12: 389-390, 1974.
- BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Metal induced alteration of δ -aminolevulinic acid dehydratase. **New York Academic Science**, v. 514: 41-47, 1987.

- BEUTLER, E.; WEST, C. Simplified determination of Carboxihemoglobin. **Clinical Chemistry**, v.36: 871-874, 1984.
- BORDER, E.A.; CANTRELL, A.C.; KILROE-SMITH, T.A. The in vitro effect of zinc and other metal ions on the activity of human erythrocyte aminolaevulinic acid dehydratase. **Environmental Research**, v. 11, p. 319-325, 1976.
- CARL, A.; BURTIS, EDWARD R.; ASHWOOD, R.. **Fundamentos de química clínica**. 4. ed. São Paulo: Guanabara, 1998.
- CARVALHO, W. **Técnicas médicas de hematologia e imunohematologia**. 6. ed. Belo Horizonte: Coopmed, cap. 44, p. 235-250, 1994.
- DELLA ROSA, H.V. Importância do controle biológico na prevenção das intoxicações. **Revista da Saúde Ocupacional**, v. 16: 51-52, 1981.
- DEN TONKELAAR, E.M Pesticide residues in food. **WHO Geneva**, p.114, 1990.
- DEN TONKELAAR, E.M. Pesticide residues in food. **WHO Geneva**, p. 136, 1991.
- DENT, A.J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C.. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. **Biochemistry**, 29: 7822-7828, 1990.
- DESPAUX, N.; BIHUON, C.; COMOY, E.; BOUDENE, C. Postulated mode of action of metals on purified human ALA-dehydratase (E.C.4-2-1-24). **Biomedicine**, v. 27,; p. 358-361, 1977.
- DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymes**. 2. ed. London: Longmans, 1964. p. 950.
- DOMINO, E.F.; NI, L.; XU, Y.; KOEPPE, R.A.; GUTHRIE, S.; ZUBIETA, J. Regional cerebral blood flow and plasma nicotine after smoking tobacco cigarettes. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.28, p.319-327, 2004.
- DOWLA, H.A.; PANEMANGALORE, M.; BYERS, M.E. Comparative inhibition of enzymes of human erythrocytes and plasma in vitro by agricultural chemicals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.31: p.107-114, 1996.
- EISEN, M.E.; HAMMOND, E.C. The effect of smoking on packed cell volume, red blood cells counts, haemoglobin and platelets count. **Canadian Medical Association Journal**, v.75: p.520-523, 1999.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDERS, V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7: 88-95, 1961.
- EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; PORCIÚNCULA, L.O.; MORSCH, V.M.; MARTINS, A.F.; SOUZA, D.O. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on δ -aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. **Pharmacology and Toxicology**, v.9: 136-143, 1996.
- FURST, A.; RADDING, S.B.; WURZEL, K.A. In: WEXLER, P. **Encyclopedia of Toxicology**. San Diego: Academic. 1 v. 605 p. 207-209: *Cadmium*, 1998.

GOERING, P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14: 45-60, 1993.

GOYER, R.A. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, Cap. 23, p. 691-712: *Toxic effects of metals*, 1996.

GYTON. **Fisiologia humana**. 6. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.

HEINEMANN, G. Effect of cigarette Smoking on White Blood Cells and Erythrocyte Enzymes. **Archives of Environmental Health**, v. 37: 261-265, 1982.

HODGSON, E. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (eds). **A textbook of modern toxicology**. 2. ed. Stamford, Connecticut: Appleton e Lange, 496 p. Cap. 14, p. 373-388. *Diagnosis and treatment of toxicity*, 1997.

JAFFE, E.K. Porphobilinogen synthase, the first source of heme's asymmetry. **Journal of Bioenergetics and Biomenbranes**, v. 27 n. 2, p. 169-179, 1995.

JOSÉ, A.S.; SILVA, F.O; DALCIN, T.M.; SANTOS, E.R.; PEREIRA, M.E. *In vitro* effect of nicotine on total cholinesterase activity from human blood. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 16: 202, 2003.

KALCHER, K.; KERN, W.; PIETSCH, R. *Cadmium* and lead in the smoke of a filter cigarette. **The Science of the Total Environment**, 128: 21-35, 1993.

KORGE, P.E; CAMPBELL, K.B. The effects of changes in iron redox state on the activity of enzymes sensitive to modification of SH groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 304, n. 2, p. 420-428, 1993.

KOYAMA, H.; SATOH, H.; SUZUKI, S. Increased urinary cadmium excretion and its relationship to urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in smokers. **Archives of Toxicology**, v. 66, p. 598-601, 1992.

LARINI, L. In: LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. São Paulo: Manole, 230 p. Cap. 4, p. 93-98: *Inseticidas de Origem Vegetal*, 1999.

LARINI, L.; SALGADO, P.E.T. In: LARINI, L. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 301 p. cap. 5, p. 59-72: *Gases*, 1997.

LEHNIGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2. ed. New York: Worth, cap 21, p. 688-735: *Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules*, 1993.

LEVI, P.E. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (eds). **A textbook of modern toxicology**. 2 ed. Stamford, Connecticut: Appleton e Lange, 496p., cap. 10, p. 228-284. *Classes of Toxic Chemicals*, 1997.

LOTTI, M. Mechanisms of toxicity and risk assesment. **Toxicology Letter**, v.77: 9-14, 1995.

MADANY, I.M. Carboxyhemoglobin levels in blood donors in Bahrain. **Science of the Total Environmental**, v.116: 53-58, 1992.

MAINES, M.D.; KAPPAS, A. Metals as regulators of heme metabolism. **Science**, v. 198, p. 1215-1221, 1997.

MALSON, J.L.; LEE, E.M.; MURTY, R.; MOOLCHAN, E.T.; PICKWORTH, W.B.; Clove cigarette smoking: biochemical, physiological, and subjective effects, **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 74, 739-745, 2003.

MARCEL, V.; PALACIOS, L.G.; PERTUY, C.; MASSON, P.; FOURNIER, D. Two invertebrate acetylcholinesterase show activation followed by inhibition with substrate concentration. **Biochemical Journal**, v. 329, p. 329-334, 1998.

MASSOULIÉ, J.; BON, S. The molecular forms of cholinesterase in vertebrates. **Annual Vertebrate Neuroscience**, v. 5, p. 57-106, 1982.

MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterase's. **Progress in Neurobiology**, v.41: p. 31-91, 1993.

MEREDITH, P.A.; MOORE, M.R.; GOLBERG, A. Erythrocytes ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. **Clinical Science Molecular Medicine**, v.56: p.61-69, 1979.

MITCHEL, R.A.; DRAKE, J.E.; WITTLIN, L.A. Erythrocyte porphobilinogen synthase (delta-aminolaevulinatase dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. **Clinical Chemistry**, v. 23:1, p. 105-111, 1977.

MONTGOMERY, C. **Bioquímica abordagem dirigida por casos**. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1994.

NAKAIAMA, H. Nicotine metabolism in mammals. **Drugs Metabolism Interaction**, v. 6, p. 95-122, 1993.

O'NEILL, J.O.; DOUKAS, P.H. **Farmacologia clínica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

OKUNO, T. Smoking and blood changes. **JAMA**, v. 234: 500 - 506, 1973.

PAGE, J.D.; WISON, J.B.; SILMAN, I. Butyrylcholinesterase: inhibition by arsenite, fluoride, and other ligands, cooperativity in binding. **Molecular Pharmacology**, v. 27:p.437-43, 1985.

PANEMANGALORE, M.; DOWLA, H.A.; BYERS, M.E. Occupational exposure to agricultural chemicals: effect on the activities of some enzymes in the blood of farm workers. **Interaction Archives Occupational Environmental Health**, v. 72, p. 84-88, 1999.

PAYNE, R.H.; KUTTY, K.M. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 8, p. 247-250, 1994.

PEIXOTO, N.C. **Atividade da enzima Delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (E.C.:4.2.1.24) como indicador da intoxicação de ratos jovens com metais pesados nas três principais fases de crescimento cerebral rápido pós-natal.**

Dissertação de Mestrado, Ciências Biológicas – Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2000.

PEIXOTO, N.C.; ROZA, T.; FLORES, E.M.M.; PEREIRA, M.E. Effects of zinc and cadmium on HgCl₂- δ -ALA-D inhibition and hg levels in tissues of suckling rats. **Toxicology Letters**. v. 146: p.17-25, 2003.

PEIXOTO, N.C. ROZA, T. PEREIRA, M.E. Sensitivity of δ -ALA-D (E. C. 4.2.1.24) of rats to metals in vitro depends on the estage of postnatal growth and tissue. **Toxicology In Vitro**, v.18: p.805-809, 2004.

PEREZ, C.M.C. **Constituintes químicos do fumo do Tabaco**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1982.

PEREIRA, M.E.; ADAMS, A.I.; SILVA, S. 5-Hexanedione inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. **Toxicology Letter**. v. 2; 146(3):269-74, 2004.

RADICZ, Z. & TAYLOR, P. The cholinesterase from genes to protein. **Annual Review of Pharmacology & Toxicology**. V. 34: 81-320.1994.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - **R.D.C n. 153**, de 14 de junho de 2004. Publicada no D.O.U. de 24/07/2004.

ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R.S.; SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology** v.100, 27-37, 1995.

RODRIGUES, A.L.S. δ -Aminolevulinato desidratase (E.C.: 4.2.1.24) em sangue de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeito de metais pesados. 132f. Porto Alegre: UFRGS. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.

RODRIGUES, A.L.S. Efeitos comportamentais e neuroquímicos do chumbo em ratos jovens e adultos. Curitiba: UFPR, 1996. 209 f. **Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Bioquímica**. Universidade Federal do Paraná/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

RODRIGUES, A.L.S.; RUBIN, M.A.; SOUZA, D.O. Lead exposure and latent learning ability of adults female rats. **Behavioral and Neural Biology**, v. 60: p.274-279, 1993.

RODWELL, V.W. In: HARPER, R.H.; MURRAY, I.; MAYNES P.A.; RODWELL, V.W. **Bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1998. 860p. Cap. 7, p. 53-63: *Proteínas: Mioglobina e Hemoglobina*, 1998.

ROMERO-ISART, N., VASÁK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 88: p.388-396, 2002.

ROSEMBERG, J. **Tabagismo, sério problema de saúde pública**. São Paulo, ALMED/EDUSP, 1981. 370p.

ROZA, T. Ação do HgCl_2 e do 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) sobre a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (E.C. 4.2.1.24) de fígado, rim e cérebro total de ratos jovens. Dissertação Mestrado em Ciências Biológicas - Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.

SALGADO, P.E.T. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 515 p. Parte 3, p 153-172: Toxicologia dos Metais, p. 135: *Monitorização Biológica*, 1997.

SALLE, H.I.A.; ZIELHUIS, R.L. Influence of smoking on aminolevulinic acid dehydratase activity, haematocrite and lead in blood in adult urban women. *Interaction Archives Occupacional. Environmental Health*, v. 40: p.111-15, 1977.

SETTIMI, L. Cholinesterases in blood plasma and tissues of rats treated with n-hexane or with its neurotoxic metabolite 2,5 hexanedione. **Archives of Toxicology**, v. 61: p.138-144, 1987.

SMITH J. R. and LANDAW A. Smoker's polycythemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 298, p. 6 - 10, 1978.

SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R. **Bioquímica: aspectos gerais (1)**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.581-585: Metabolismo dos aminoácidos III, 1985.

SOHN, M., HARTLEY, C., FROELICHER, E. S., BENOWITZ, N. L., . Tobacco use and dependence, **Seminars in Oncology Nursing**, v.19, p.250-260. New York: Worth, 1993.

STEWART R.D.; BARETTA E.D.; M.S.; PLATTE, L.R.M.T. (ASCP); STEWART, E.B.; M.T. (ASCP); KALBFLEISCH, J.H.; YSERLOO, B.V.; RIMM, A.A. Carboxihemoglobin levels in American blood donors. **JAMA**, v. 229, p. 1187 - 1195, 1974.

SUSSMAN, J.; KRIGER, G.M.; SILMAN I. Three dimensional structure of a complex of E2020 with acetylcholinesterase from Torpedo Californica. **Journal of Physiology**, 92, p. 191-194, 1998.

TAYLOR, P. In HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. (eds). **Goodman e Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9. ed. New-York: McGraw-Hill, 1996. 1.905 p. Cap. 8, p. 161-176: Anticholinesterase agents.

TIMBRELL, J. A. **Principles of Biochemical Toxicology**. London, Taylor & Francis, p. 327-330, 1991.

TRAINA, M. E. & SERPIETRE, L. A. Changes in levels and forms of rat plasma cholinesterase during chronic diisopropylphosphofluoridate intoxications. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, p. 645- 653, 1984.

WHO (World Health Organization). In: **Environmental Health Criteria 85** (Lead: Environmental aspects). Geneva: WHO, 106 p., 1989.

WINTROBE, M. M. A simple and accurate hematocrit. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 15: p.287, 1929.

WOREK, F.; MOST, V.; KIDERLEN, D. D.; DIEPOLD, C.; EYER P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. **Clinica Chimica Acta**, v. 288: p.73 - 90, 1999.

YEARLY, R.A.; EATON, J.; GILMORE, J.; NORTH. B.; SINGELL, J. A multiyear study of blood cholinesterase activity in urban pesticide applicators. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 39:p.11 - 25, 1993.

YEATO, G. P; KANWAL, K. G; FRANKLIN, R. A. Acetylcholinesterase an enzymatic marker of human red blood cell aging. **Life Science**, v. 63:p.3-12, 1998.

YILDIZ, D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. **Toxicon** v. 43: p. 619-632, 2004.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.