

ADRIANA CECÍLIA PINTO DINIZ

**CARACTERIZAÇÃO DAS BANDAS C_{4/5} E C₅ DA BUTIRILCOLINESTERASE
HUMANA FRENTE A DETERMINADOS TRATAMENTOS**

Trabalho de conclusão de curso para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas, desenvolvido
no Departamento de Genética da
Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Prof.^a Dra. Eleidi A.
Chautard Freire Maia.

CURITIBA

1996

Agradecimentos

"A competência é causa e não efeito; ela nasce da perfeita identificação do profissional com a natureza de sua profissão.

A isso chamamos vocação."

À Mestra Eleidi:

Envolvida fui pela sua sabedoria, amizade e ternura.

A meus Pais:

É mesmo milagre e sonho.

Ontem, hoje e amanhã...

É o esforço o mais soberbo,

É o trabalho o mais belo.

Aos doutorandos e amigos, Prof^a Vânia M. Alcântara e Ricardo L. R. de Souza, pela orientação no desenvolvimento das técnicas, e pela paciência no campo da computação.

Ao CNPq, pela bolsa de Iniciação Científica e à FUNPAR por auxílios dados aos projetos do Laboratório de Polimorfismo e Ligação do Departamento de Genética da UFPR.

Ao Laboratório de Química e Biotecnologia de Biomassa, do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo empréstimo de reagentes.

Aos amigos.

Ao Paulinho.

SUMÁRIO

1.0 - INTRODUÇÃO.....	01
1.1 - Aspectos Gerais.....	01
1.2 - Estrutura Bioquímica da BChE.....	02
1.2.1 - Estrutura Primária.....	02
1.2.2 - Estrutura Secundária e Terciária.....	03
1.2.3 - Estrutura Quaternária.....	03
1.2.4 - Centro Ativo da BChE.....	03
1.3 - Variantes Genéticas.....	04
1.3.1 - Loco <u>BCHE</u>	04
1.3.2 - Loco <u>CHE2</u>	05
1.4 - Bandas Eletroforéticas.....	05
1.4.1 - Microheterogeneidade.....	05
1.4.2 - C ₂ : um conjugado entre C ₁ e albumina.....	07
1.4.3 - Banda C ₅	08
1.4.4 - Banda eletroforética C _{4/5}	09
1.4.5 - Outras variações detectadas por eletroforese.....	10
1.5 - BChE submetida a alguns tratamentos.....	11
1.5.1 - Tripsina.....	11
1.5.2 - Neuraminidase.....	12
1.5.3 - Pressão e Agentes redutores.....	12
1.5.4 - Solução Salina.....	13
1.5.5 - Fosfolipase.....	13
2.0 - OBJETIVOS.....	14
3.0 - JUSTIFICATIVAS DOS OBJETIVOS.....	15

4.0 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 - Amostras.....	16
4.2 - Materiais.....	16
4.2.1 - Reagentes.....	16
4.3 - Metodologia.....	18
4.3.1 - Métodos eletroforéticos.....	18
4.3.2 - Teste de Atividade da Tripsina.....	19
4.3.3 - Experimentos com Tripsina.....	20
4.3.4 - Experimentos com Cloreto de Sódio (NaCl).....	24
4.3.5 - Experimentos com Metanol.....	26
5.0 - RESULTADOS.....	27
5.1 - Experimentos com Tripsina.....	27
5.1.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução de Tripsina em Tampão Tris/ácido cítrico, pH 8,1 e Solução Inibidora de Proteases.....	27
5.1.2 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5- submetidas à Solução de Tripsina em Tampão Tris/ácido cítrico, pH 8,1.....	29
5.1.3 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-, com intensidade das bandas (C₅ e C_{4/5}) forte e fraca, submetidas à Solução de Tripsina em Tampão Tris/HCl, pH 7,4.....	29
5.2 - Experimentos com Cloreto de Sódio.....	33
5.2.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas a altas concentrações de Solução de Cloreto de Sódio.....	33
5.2.2 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução Saturada de Cloreto de Sódio.....	33
5.2.3 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à alta concentração de Cloreto de Sódio (NaCl)....	35

5.3 - Experimento com Metanol.....	35
5.3.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução de Metanol.....	35
6.0 - DISCUSSÃO.....	36
6.1 - Experimentos com Tripsina.....	36
6.1.1 - Solução Inibidora de Proteases (Fenil-metil-sulfonil-fluoreto)...	36
6.1.2 - Efeito da Tripsina sobre a banda C₅.....	37
6.1.3 - Efeito da Tripsina sobre a banda C_{4/5}.....	38
6.2 - Experimentos com Cloreto de Sódio.....	39
6.2.1 - Efeito do Cloreto de Sódio sobre a banda C₅.....	39
6.2.2 - Efeito do Cloreto de Sódio sobre a banda C_{4/5}.....	40
6.3 - Experimento com Metanol.....	40
6.3.1 - Efeito do Metanol sobre as bandas C₅ e C_{4/5}.....	40
7.0 - CONCLUSÕES.....	42
8.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

RESUMO

O presente trabalho se refere a estudos com a enzima butirilcolinesterase humana (BChE; EC 3.1.1.8), feitos com métodos de eletroforese e utilizando-se soro ou plasma. Foram feitos alguns experimentos, a fim de caracterizar o comportamento da banda $C_{4/5}$ da BChE, em diferentes condições, comparando-o ao da banda C_5 . As bandas C_5 e $C_{4/5}$ foram submetidas a tratamentos com tripsina, cloreto de sódio e metanol. A partir dos resultados obtidos foi possível verificar o desaparecimento da banda C_5 pela ação da tripsina. Por outro lado, quanto à banda $C_{4/5}$ não houve nenhuma alteração, o que nos permite concluir que a banda $C_{4/5}$ não é a banda C_2 (conjugado de C_1 com albumina), assim como não é BChE associada à α_2 -macroglobulina. Altas concentrações de cloreto de sódio não demonstraram efeito sobre as bandas C_5 e $C_{4/5}$. As bandas C_5 e $C_{4/5}$ após serem tratadas com solução de metanol não mostraram nenhuma alteração no que se refere à resolução e mobilidade.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 - Aspectos Gerais

As esterases encontradas no soro de animais podem ser classificadas em três tipos principais: as esterases aromáticas que hidrolisam ésteres aromáticos, as aliesterases que hidrolisam preferencialmente ésteres alifáticos e as colinesterases que hidrolisam ésteres de colina com mais eficiência que ésteres alifáticos ou ésteres aromáticos e são inibidas pela fisostigmina 10^{-5} M (Augustinsson, 1963).

O sangue humano contém dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) presente nos eritrócitos, quase que específica para ésteres de colina tendo como substrato preferencial a acetilcolina, e a butirilcolinesterase (BChE) enzima sérica, que hidrolisa outros ésteres além dos ésteres de colina. A BChE, também conhecida como colinesterase do soro, segundo a Comissão Internacional de Enzima recebeu a denominação de acetilcolina-acilhidrolase (EC 3.1.1.8.).

Uma diferença entre as colinesterases é que somente a BChE é inibida pelo bambuterol (bisdimetilcarbamato de terbutalina) em doses terapêuticas. Uma outra maneira de discriminar a AChE (acetilcolinesterase) da BChE, é que a AChE é inibida em altas concentrações de acetilcolina, o que não ocorre com a BChE.

A função e substrato natural da BChE ainda são desconhecidos, porém existem algumas hipóteses que relacionam a BChE com o metabolismo de lipídeos; condução nervosa lenta; regulação dos níveis de colina e acetilcolina no plasma; proteção da acetilcolinesterase através da remoção de ésteres de colina, formados durante o metabolismo, que podem inibir a AChE e controle de permeabilidade e transporte de sódio e outros íons pela membrana (revisão em Kutty, 1980; Whittaker, 1980; Whittaker, 1986).

A BChE é sintetizada no fígado, sendo encontrada no plasma e também em músculo liso, adipócitos, pâncreas, pele, massa branca do cérebro e coração (Wescoe e cols., 1947).

Com relação à variedade molecular, ambas as enzimas apresentam diversas formas moleculares presentes no mesmo organismo. A BChE consiste de quatro formas moleculares principais, designadas por Harris e cols. (1962) como C₁, C₂, C₃ e C₄ em ordem decrescente de mobilidade eletroforética, embora outros componentes tenham sido descritos (Harris e cols., 1962 e 1963; Van Ros e Druet, 1966; Ashton e Simpson,

1966; Juul, 1968; Joshi e cols., 1979; Yamamoto e cols. , 1986 e 1987), alguns dependendo das condições de armazenamento (Harris e cols., 1962; Joshi e cols., 1979) ou eletroforese (Juul, 1968). As formas C_1 e C_3 correspondem, respectivamente, ao monômero e dímero, enquanto que C_2 é uma associação através de ponte dissulfeto, entre o monômero da BChE e a albumina sérica. O componente C_4 , responsável por 95% da atividade sérica da BChE, é um tetrâmero constituído por quatro subunidades idênticas, cada uma apresentando um sítio ativo (Lockridge e cols., 1979, 1987; Lockridge e La Du, 1982; Masson, 1979). As formas C_1 , C_3 e C_4 são parcialmente interconvertíveis. As formas C_1 e C_3 podem ser precursores e/ou produtos de degradação de C_4 (La Motta e cols., 1968; Masson, 1979).

Em soro, uma forma adicional de mobilidade intermediária entre C_3 e C_4 é observada. Esta forma é progressivamente formada às custas de C_4 por ação da tripsina, plasmina e certas proteases (Saeed e cols., 1971; *apud* Masson 1991). A mesma foi reportada por Masson (1989) como um trímero. Contudo, outra nomenclatura pode ser utilizada: ChE₁ para C_1 ; ChE₂ para C_2 ; ChE₃ para C_3 ; ChE₄ para a forma citada acima (o trímero) e ChE₅ para C_4 . Segundo Masson (1989) uma outra nomenclatura, baseada na estrutura molecular seria mais conveniente do que de acordo com suas mobilidades eletroforéticas. Recomendam-se as designações G_1 , G_2 e G_4 de acordo com o número de subunidades, pois C_1 , C_2 e C_4 são formas globulares monomérica, dimérica e tetramérica da enzima. A forma C_2 é referida como G_1 -ALB, e o trímero como G_3 .

1.2 - Estrutura Bioquímica da BChE

1.2.1 - Estrutura Primária

A sequência de aminoácidos da BChE humana, presente no plasma (Lockridge e cols., 1987), consiste de uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos à qual estão ligadas 9 cadeias de oligossacarídeos a resíduos de asparagina. A estrutura das cadeias de oligossacarídeos não foi ainda determinada, porém as informações disponíveis parecem indicar cadeias do tipo complexo terminadas em ácido siálico, correspondendo a 24% do peso da BChE (Haupt e cols., 1966). O peso molecular calculado a partir da sequência de aminoácidos e oligossacarídeos é de 85.534.

1.2.2 - Estrutura Secundária e Terciária

A estrutura terciária da BChE humana, devido às dificuldades na obtenção de cristais de uma glicoproteína com altos teores de açúcares, ainda não foi determinada.

Devido à grande homologia entre a BChE e a AChE, Millard e Broomfield (1992) propuseram um modelo para a BChE humana derivado por análise computacional. Este modelo teórico também prevê para a BChE que as 9 cadeias de oligossacarídeos estão dispostas longe da entrada do sítio ativo e parece não haver interações entre elas e as moléculas do substrato.

1.2.3 - Estrutura Quaternária

A BChE existe sob várias formas moleculares no plasma (Harris e cols., 1962), sendo as principais: as formas C₁ a C₄ já apresentadas no item anterior. Cabe ressaltar que C₄ é formado por um dímero de dímeros, cada qual formado pela união entre dois monômeros através de uma ligação dissulfeto entre os resíduos Cys571. Estes dímeros unem-se entre si para formar o tetrâmero através de interações não covalentes (Lockridge e cols., 1987).

1.2.4 - Centro Ativo da BChE

No caso da BChE humana, estudos de inibição das colinesterases por DFP (diisopropilfluorofosfato) mostraram que o nucleófilo presente no sítio esterásico está representado por um resíduo de serina, Ser198. A presença de histidina neste sítio foi proposta por Krupka (1966) a partir de estudos de cinética dependente de pH e de reagentes específicos para este aminoácido.

Estudos de mutagênese sítio-dirigida identificaram Ser198, His438 e Glu325 como a tríade catalítica que forma o sítio esterásico da BChE (Shafferman e cols., 1992). O sítio ativo encontra-se no interior da molécula. Seu contato com o exterior ocorre através de um tipo de túnel. As colinesterases apresentam um sítio ativo complexo e novos estudos são necessários para o melhor entendimento de suas atividades catalíticas.

1.3 - Variantes Genéticas

Arpagaus e cols. (1990) além de fornecerem indícios da existência de um único gene que codifica a BChE, estabeleceram a estrutura do gene da BChE humana. O gene possui aproximadamente 73 quilobases e contém quatro exons, que somam 2.416 pares de bases. O loco da BChE apresenta polialelismo, e é responsável pela síntese da maioria das variantes genéticas da BChE. O uso da succinilcolina como relaxante muscular pré-operatório na década de 50, possibilitou a descoberta da variabilidade genética da BChE. Observou-se que nem todos os pacientes recuperavam-se dos efeitos da droga, tão rapidamente como era previsto, e foram registrados episódios como paralisia muscular e apnéia prolongada. A resposta exagerada frente a uma dose padrão de succinilcolina é uma característica hereditária, não devida a uma baixa concentração da enzima normal, mas a uma enzima variante menos efetiva em hidrolisar substratos. Este foi o primeiro passo para a detecção das variantes genéticas da BChE.

1.3.1 - Loco BCHE

As variantes genéticas determinadas pelo loco BCHE, que resultam numa atividade média inferior à observada nos homozigotos para o alelo BCHE*U, são determinadas pelos alelos BCHE*K, BCHE*A, BCHE*F, BCHE*J, BCHE*H, BCHE*NFDL e vários silenciosos (Primo-Parmo e cols., 1996).

Este loco foi atribuído ao cromossomo 3, através de análise de ligação e hibridização *in situ* (Robson e cols., 1966; Yang e cols., 1984).

Os alelos do loco BCHE são identificados por inibição enzimática (Kalow e Staron, 1957). Vários alelos podem ser identificados usando-se uma combinação de inibidores. Obtém-se boa separação entre os diferentes fenótipos utilizando-se os inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 (dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil) trimetil amônio), e de acetato de alfa-naftila como substrato (Alcântara e cols., 1991; Picheth e cols., 1994). Outros inibidores podem ser utilizados para evidenciar variantes, tais como dibucaína e fluoreto de sódio.

Mais recentemente, foram identificadas as mutações responsáveis pela síntese de algumas das variantes genéticas da BChE, através de sequenciamento de DNA.

1.3.2 - Loco CHE2

Harris e cols. (1962) e Harris e Robson (1963) observaram em eletroforese bidimensional, em papel e gel de amido, além das bandas C₁ a C₄, uma banda denominada C₅, presente em 4,6% de sua amostra. No mesmo trabalho, demonstraram o não alelismo entre esta variante e as do loco BCHE. Considera-se que o componente C₅ da BChE é resultante da interação dos genes BCHE e CHE2. Este último loco apresenta os alelos CHE2*C5+ e CHE2*C5-, sendo o primeiro responsável pelo condicionamento da banda C₅, e o outro pela sua ausência. Foi demonstrado que os indivíduos CHE2C5+ são menos sensíveis à succinilcolina que os indivíduos CHE2C5- (Sugimori, 1986).

O padrão de herança proposto por Harris e cols. (1962) para a determinação da banda C₅ foi de autossômico dominante. Porém há relatos de famílias em que casais CHE2 C5- apresentaram filhos CHE2 C5+ (Harris e Robson, 1963; Simpson, 1972; Singh e cols., 1974; Guerreiro e cols., 1989).

Também verificou-se que os indivíduos que apresentam fenótipo CHE2 C5+ possuem em média 30% a mais de atividade da BChE que os CHE2 C5- (Harris, 1980).

1.4 - Bandas Eletroforéticas

1.4.1 - Microheterogeneidade da banda C₄

Embora C₄ migre em géis não desnaturantes como uma única espécie há evidência estrutural e cinética que ela não é homogênea. C₄ é uma enzima altamente estável (Masson e Goasdoué, 1986; **apud** Masson, 1991). As quatro subunidades estão juntas por fortes ligações não covalentes e o conjunto está estabilizado pelas pontes de dissulfeto inter-cadeias de dímeros (Lockridge e cols., 1979). Contudo, trabalhos anteriores mostraram que uma parte de C₄ pode se dissociar espontaneamente em C₁ e C₃ (Masson, 1979 e La Motta e cols., 1965; **apud** Masson, 1991). Além disso, tratamento físico drástico de plasma ou de C₄ purificado por pressão hidrostática (3,5 Kbar) ou ultrasons resultam em progressivas perdas da atividade da BChE gerando monômero e dímeros. Entretanto, dissociação de C₄ nunca é completa, sem a adição de agente desnaturante. Isto sugere que uma parte da população de tetrâmero está

fragilizada. Foi mostrado que o tratamento de C_4 com tripsina cliva o peptídeo C-terminal [< 5 KDa (quilodaltons)] que contém a ligação dissulfeto entre cadeias (Lockridge e La Du, 1982 e Lockridge e cols., 1987). A perda das pontes diminui a estabilidade de C_4 e acarreta sua dissociação em monômeros, dímeros e trímeros ativos (G'_1 , G'_2 e G'_3). Estas formas têm propriedades moleculares de mobilidade similares às formas C_1 e C_3 de ocorrência natural e de ChE_4 (trímero citado no item 1.1) que é gerada sob a ação de enzimas de coagulação, respectivamente. Evidência direta de C_4 desprovida de ponte dissulfeto em preparações altamente purificadas do tetrâmero é dada pela presença de uma banda de monômero em gel de SDS (dodecil sulfato de sódio), em condições não redutoras. Cortes internos no eixo principal dos polipeptídeos da BChE têm sido encontrados (Lockridge e La Du, 1986; **apud** Masson, 1991), entretanto estes podem ser também devidos à ação limitada de peptidases.

Além da proteólise outras reações alteram a forma de C_4 . Após a desnaturação do tetrâmero da BChE altamente purificado e marcado com [3H]DFP (diisopropilfluorofosfato), uma minoria (10%) de dímero não marcado aparece sempre em gel de SDS na presença de um agente redutor (Lockridge e La Du, 1986; **apud** Masson, 1991; Chatonnet e Masson, 1986). Não há explicação para este dímero covalente. Pode ser o produto de ligação cruzada de algumas subunidades monoméricas mas, até o presente nem o grupo relacionado com a ligação (aminoácido de cadeia lateral ou açúcar) nem o mecanismo de formação dessa espécie são conhecidos.

A cinética das reações catalizadas da BChE mostram várias complexidades que poderiam refletir microheterogeneidade (Kalow, 1964; Christian, 1968; Eriksson, 1979; Soylemez, 1985; **apud** Masson, 1991). Além disso, apesar de haver quatro sítios ativos por tetrâmero, números mais baixos de sítios ativos têm sido descritos. As discrepâncias observadas, neste caso, podem ser explicadas quer pela presença de uma grande quantidade de BChE inativa no plasma ou pela inativação da enzima durante a purificação (Masson e Goasdoué, 1986; **apud** Masson, 1991).

A outra indicação da microheterogeneidade procede da inativação pelo calor. A inativação termo-irreversível da BChE segue uma cinética complexa que pode ser descrita pela soma de dois processos aparentes de primeira ordem. Não se sabe se os resultados que indicam microheterogeneidade provém de modificações epigenéticas de C_3 e C_4 e/ou reações secundárias durante a purificação e armazenamento (Masson, 1991).

1.4.2 - C₂ : um conjugado entre C₁ e albumina

A natureza de C₂ já foi elucidada (Masson, 1989). C₂ parecia não ter tamanho da família de isômeros. A análise de Ferguson, baseada nos padrões de amostras em gel de eletroforese, permitiu a estimativa da sua massa molecular aparente ser de 150 KDa, porém mostrou que sua razão carga/massa foi diferente daquela das formas C₁, C₃ e C₄ (Masson, 1979).

Além disso, seu ponto isoelétrico (Masson, 1979) bem como a sua mobilidade em tampões alcalinos (Harris e cols., 1962 e Masson e Anguille, 1980; *apud* Masson, 1991) foram verificados como sendo ligeiramente maiores que aqueles dos isômeros de tamanho.

A redução de C₂ em condições suaves liberou C₁ ativo. Por esta razão foi concluído que C₂ era um dímero formado pela associação de C₁ com uma proteína com 61 KDa por meio de uma ponte dissulfeto, exposta por solvente, e que a menor subunidade era responsável por suas propriedades elétricas específicas.

A purificação de C₂ foi conseguida por cromatografia de afinidade usando procainamida e um anticorpo monoclonal para BChE foi usado como ligante. A subunidade de 65 KDa não pode ser marcada com [³H] DFP e sua massa molecular aparente não mudou após o tratamento com endoglicosidase F.

C₂ e C₁ foram submetidas a eletroforese em geis hidrofóbicos próprios para eletroforese de afinidade de proteínas hidrofóbicas. Foi descoberto que C₂ (mas não C₁) liga-se fortemente a ligantes imobilizados e que sua constante de dissociação aparente foi similar à da albumina do soro humano.

Demonstração da fração de 65 KDa com a albumina foi completada por adsorção específica de C₂ em um imunoadsorvente para albumina. Por esta razão, C₂ é referida como C₁ - ALB.

É muito provável que a ligação dissulfeto seja entre os tióis livres: albumina Cys - 34 e BChE Cys - 571. A subunidade da albumina exerce impedimento estérico na subunidade da BChE e mascara parcialmente o seu centro ativo. Além disso, a albumina protege C₂ desializado contra sua auto-associação. Provavelmente, a albumina age pela interação com uma área hidrofóbica que promoveria a auto-associação da BChE privada do ácido siálico (Masson, 1991).

1.4.3 - Banda C₅

A banda eletroforética C₅ tem peso molecular de 400 kDa, e sua estrutura ainda não foi elucidada. Scott e Powers (1974) propõem que o loco CHE2 codificaria uma outra proteína que se associaria com a BChE para formar a banda C₅. Tortolero e Medina (1978) supõem que a banda C₅ seja derivada de C₄ através de uma modificação, não alterando significativamente o peso molecular. Outros autores propõem que a banda C₅ seja resultante da associação da BChE com lipídeo (Ohkawa e cols., 1988).

A demonstração de que a isoenzima C₂ é formada pela associação da BChE com a albumina (Masson, 1989) sugere que a variante C₅ possa ser uma banda híbrida composta pelo produto do loco BCHE associado a outra proteína. Um trabalho mais recente (Masson, 1991) considera C₅ como uma enzima híbrida formada pela associação não covalente do tetrâmero da BChE com uma proteína desconhecida (X). Esta proteína "X" apresenta peso molecular de 60 kDa, e não é a AChE, albumina, fragmento de colágeno, fragmento de imunoglobulina, nem de fibronectina. A hipótese de que C₅ poderia ser um híbrido BChE/AChE similar a tetrâmeros híbridos descrito por (Tsim e cols., 1988; **apud** Masson, 1991), foi rejeitada após eletroforeses, de plasmas CHE2 C5+, incubados por 30 minutos em soluções tamponadas de bambuterol (10^{-8} - 10^{-4} M), um inibidor específico da BChE (Tunek e Svensson, 1988; **apud** Masson, 1991), e análises densitométricas. Análise dos géis corados mostrou curvas de inibição paralelas para C₄ e C₅. Quanto a C₅ ser um agregado de C₂, experimentos por imunoadsorção e imunodeteção descartaram a possibilidade de "X" ser albumina. Desde que a presença de C₅ foi descrita em sangue de pacientes com mieloma (Gallango, 1969), considerou-se a possibilidade de que "X" poderia ser um fragmento de imunoglobulina: anticorpos contra cadeias κ e λ de imunoglobulina não detectaram tal fragmento. Outra hipótese de que "X" poderia ser um fragmento de colágeno foi rejeitada, pois C₅ apresentou-se insensível à collagenase. Desde que o gene da fibronectina foi mapeado no cromossomo 2 (Koch e cols., 1982; **apud** Masson, 1991) próximo à região designada por Eiberg e cols. (1989) para CHE2, se achou que "X" poderia ser fragmento de fibronectina. Esta possibilidade foi descartada em virtude de C₅ não ter sido reconhecido por anticorpos policlonais para fibronectina humana.

1.4.4 - Banda eletroforética C_{4/5}

Souza (1995) introduziu modificações na técnica eletroforética de gel de ágar em pH ácido de Robinson e cols. (1957), com modificações de Van Ros e Vervoort (1973) e Fadel-Picheth (1991), objetivando padronizar a técnica para uma posterior quantificação da banda C₅. Ao diminuir o pH do gel de ágar, verificou a presença de uma banda na posição da banda C₅ em indivíduos anteriormente fenotipados como CHE C₅-, pela técnica padrão.

A nova banda se posiciona como a banda C₄ em eletroforese em gel de ágar de pH 6,7, e como a banda C₅, em gel de ágar, de pH 5,3. Em vista disso recebeu a denominação de C_{4/5}.

Testou-se a possibilidade da banda C_{4/5} ter atividade de paraoxonase, enzima sérica também capaz de hidrolisar o acetato de alfa-naftila. Como essa banda não foi inibida pelo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), inibidor da paraoxonase, foi excluída a hipótese de C_{4/5} ser paraoxonase. Ficou demonstrado que a atividade da BChE da banda C_{4/5} é determinada pelo loco BCHE, uma vez que plasma de fenótipo atípico (BCHE A), submetido à eletroforese não apresentou a banda C_{4/5} inibida pelo inibidor da BChE, o Ro2-0683, enquanto a banda C_{4/5} de plasma BCHE U foi inibida por este inibidor (Souza, 1995).

Souza (1995), em sua tese de mestrado, verificou que a banda C_{4/5}, após determinado experimento de isolamento, teve o mesmo comportamento já verificado com relação à C₅, ou seja, produziu duas bandas. Esse autor sugeriu que a banda C_{4/5} também possa ser BChE ligada a outra substância (como outros heterodímeros da BChE), por ligações não covalentes, como é o caso de C₅. Através do mesmo raciocínio, este resultado exclui a possibilidade de ser C₂, um monômero ligado à albumina, já que no caso de C₂ a ligação é covalente (Masson, 1989). Souza (1995) considerou que a metodologia empregada em seus experimentos não seria capaz de desfazer tal ligação, caso fosse covalente. O mesmo excluiu a possibilidade da banda C_{4/5} ser C₁ ou C₃, uma vez que estas formas não estão associadas a nenhuma outra substância não podendo produzir duas bandas após determinado experimento de isolamento, como foi o caso da banda C_{4/5}.

Souza (1995) também testou as hipóteses de que as substâncias ligadas à BChE para formar C₅ e C_{4/5} fossem condicionadas por alelos do mesmo loco (CHE2) ou por locos diferentes. Seus resultados, neste sentido, não foram conclusivos. Verificou que a

banda $C_{4/5}$ estava presente em uma amostra de 311 indivíduos de Curitiba e 67 de índios Guarani, de fenótipo CHE2 C5-, sem apresentar qualquer variabilidade na mobilidade, nas condições adotadas, e que além disso a banda estava presente em 71 índios Guarani de fenótipo CHE2 C5+, indicando que se $C_{4/5}$ for condicionada por outro loco, a banda $C_{4/5}$ poderá ser considerada monomórfica.

1.4.5 - Outras variações detectadas por eletroforese

Além das bandas C_1 , C_2 , C_3 , C_4 e $C_{4/5}$, presentes em todos os indivíduos, e da banda polimórfica C_5 , presente em cerca de 10% das populações caucasóides, outras bandas têm sido identificadas através de eletroforese. Duas bandas, denominadas S1 e S2, aparecem após a estocagem das amostras de soro, tendo sido descritas por Harris e cols. (1962).

Van Ros e Druet (1966) encontraram dois novos padrões eletroforéticos em eletroforese bidimensional em papel e gel de amido em pH 8,6, e também em gel de ágar, pH 8,4. Uma das bandas, denominada C_6 , foi encontrada em 0,5% de uma amostra de 734 africanos. O outro padrão eletroforético, que se mostra em duas bandas, C_{7a} e C_{7b} , foi encontrado em dois indivíduos da mesma amostra. Ashton e Simpson (1966) também encontraram uma banda extra, que apareceu em um indivíduo de uma amostra de 2102 nordestinos brasileiros. Ashton e Simpson (1966) encontraram uma banda extra igualmente chamada de C_6 , com mobilidade eletroforética menor que a de C_5 , em gel de amido em pH 5,3.

Usando gel de poliacrilamida e um densitômetro, Juul (1968) verificou 12 bandas da BChE. A presença de uma banda extra ocorreu em dois entre seis indivíduos normais e cinco entre sete pacientes com glaucoma crônico.

Gallango e Arends (1969) encontraram outra banda que foi chamada de C_{56} , devido a sua mobilidade intermediária entre a banda C_5 e C_6 (descrita por Ashton e Simpson, 1966). Essa banda foi encontrada apenas em pacientes com mieloma com uma frequência de 12%. As tipagens foram feitas por eletroforese em gel de amido em pH 5,3.

Através da técnica eletroforética de Juul (1968) modificada, uma banda extra associada à hiper-colinesterasemia foi encontrada por Yamamoto e cols. (1986 e 1987).

No laboratório de Polimorfismo e Ligação do Departamento de Genética da

UFPR (dados não publicados) foi observada uma nova banda que aparece numa posição abaixo da banda C₄ em eletroforese de gel de ágar 1,4%, pH 5,3 ou 6,7, em uma frequência relativamente baixa (cerca de 2 em 3.000 indivíduos).

Nem sempre é possível uma comparação entre todas as bandas já detectadas devido às diferentes técnicas utilizadas.

1.5 - BChE submetida a alguns tratamentos

1.5.1 - Tripsina

As proteínas podem ser clivadas especificamente em peptídeos pequenos por métodos químicos ou enzimáticos. Uma clivagem altamente específica é feita através da tripsina, uma enzima proteolítica do suco pancreático. A tripsina cliva as cadeias polipeptídicas no lado carboxílico de radicais de arginina e lisina. Resíduos de cisteína aminoetilada são também susceptíveis à hidrólise pela tripsina. A presença de resíduos de ácido aspártico ou resíduos de lisina vizinhos inibe parcialmente a ação da tripsina. Digestões com tripsina são executadas entre pH 8 a 9, a 25 °C ou 37 °C, em 2 a 12 horas. A razão de enzima para proteína geralmente é de 1:100 ou 1:50.

A fim de caracterizar a substância "X" ligada à banda C₅, citada no item 1.4.3, Masson (1991) mostrou que a tripsina converte C₅ na forma C₄. Masson, 1995 (comunicação pessoal) mostrou ainda que a tripsina age sobre a banda C₂ e sobre o complexo formado pela BChE (provavelmente C₁) e alfa-2-macroglobulina, desfazendo estes complexos da BChE. Dependendo do tempo de exposição da BChE à tripsina, pode acarretar o desaparecimento dessas bandas. O desaparecimento é concomitante ao aumento na intensidade do monômero, dímero e trímero da BChE.

1.5.2 - Neuraminidase

A enzima neuraminidase é uma glicoproteína tetramérica transmembrânica. Esta enzima catalisa as hidrólises da junção que une o resíduo terminal de ácido siálico com um resíduo de D-galactose e/ou um de D-galactosamina. A endoglicosidase F remove o componente de açúcar da BChE. Entretanto, C₄ e C₅ parcialmente deglicosilados existem em diferentes estados moleculares. A remoção de unidades do ácido siálico pela neuraminidase induz auto-associação das duas enzimas. Por outro lado, o tratamento feito com uma mistura de neuraminidase, galactosidase e fucosidase não permitiu a formação de agregados de C₅, enquanto agregados de C₄ apareceram. Isto pode refletir pequenas diferenças de glicosilações entre C₅ e C₄ ou pode ser devido à presença da substância "X" em C₅ (Masson, 1991).

Com o mesmo propósito de caracterizar C₅, a neuraminidase foi utilizada por Ohkawa e cols. (1988). A partir da cromatografia de afinidade ConA (concanavalina A), que separou a BChE em duas: ConA-reativa e não reativa, C₅ relacionou-se com a fração Con-reativa, retornando para o cátodo do mesmo modo como a outra fração da enzima, quando tratada com neuraminidase. Isto indicou que cada fração da enzima é uma glicoproteína.

1.5.3 - Pressão e Agentes redutores

Masson (1991) utilizou de muitos métodos, a fim de caracterizar C₅, entre eles uma pressão de 3,5 Kbar, a qual é usada para desfazer ligações hidrofóbicas e dissociar proteínas oligoméricas. Nem a pressão de 3,5 Kbar, nem o uso de agentes redutores tiveram efeito sobre C₅.

1.5.4 - Solução Salina

Masson (1991) após tratar C_5 com altas concentrações de soluções salinas (NaCl 1,5 a 4 M), obteve dissociação da substância “X”, dando origem à banda C_4 . Isto indicou que “X” está ligada não covalentemente a C_4 e que as interações dominantes são iônicas.

1.5.5 - Fosfolipase

Masson (1991) relatou que a subunidade “X”, associada à banda C_4 , no caso do complexo C_5 , é insensível às fosfolipases A_2 , C e D. Por outro lado, Ohkawa e cols. (1988) relataram que após o tratamento de C_5 com a fosfolipase C/D, ocorreu o aparecimento de uma banda com atividade e mobilidade da banda C_4 .

2.0 - OBJETIVOS

1 - Caracterizar o comportamento da banda $C_{4/5}$ em diferentes condições, comparando-o ao da banda C_5 .

2 - Através dos experimentos do item 1, verificar a possibilidade da banda $C_{4/5}$ não ser uma associação da BChE com albumina ou com alfa-2-macroglobulina.

3.0 - JUSTIFICATIVAS DOS OBJETIVOS

Objetivo 1) Masson e cols. (1991) bem como Ohkawa e cols. (1988), com o objetivo de caracterizarem a banda C_5 , verificaram que o tratamento de C_5 com tripsina produziu uma banda com a atividade e mobilidade da banda C_4 , ou seja, a tripsina converte C_5 na forma C_4 . Por outro lado, altas concentrações de sal (NaCl 1,5 a 4 M) são capazes de dissociar o complexo C_5 em C_4 e substância "X", indicando que esta associação não é covalente (Masson, 1991). Desta maneira achamos interessante verificar o comportamento da banda $C_{4/5}$ frente a esses tratamentos (tripsina e diferentes concentrações de cloreto de sódio) para que possamos compará-lo com o da banda C_5 .

Em artigo de Hanahan (1992) cita-se o uso de metanol para separar frações proteicas de frações lipídicas. Utilizamos este procedimento para verificar se haveria alguma alteração de mobilidade ou de intensidade das bandas $C_{4/5}$ e C_5 , principalmente porque a banda $C_{4/5}$ não forma claramente uma banda, como C_5 , deixando um rastro tênue. Em trabalho de Todrich e cols. (1950), é estudado o efeito de alcoóis sobre as colinesterases e esses autores mostram que a inativação da BChE de cavalo, com n-butanol, começa a ocorrer a partir de cerca de 0,4 M.

Objetivo 2) Embora já se tenha tentado demonstrar que a banda $C_{4/5}$ não seja uma associação entre a BChE e a albumina (Souza, 1995), julgamos interessante testar novamente essa hipótese, através de outras metodologias, uma vez que o experimento de Souza (1995) forneceu resultado incompleto. Além disso, Masson (comun. pess., 1995) verificou em gel de poliacrilamida, em gradiente de 3 a 30%, uma banda eletroforética da BChE associada à alfa-2-macroglobulina. Devido à hipótese de que a banda $C_{4/5}$ seja um complexo formado pela associação da BChE com outra substância (Souza, 1995), o presente trabalho pretende pesquisar se $C_{4/5}$ poderia ser resultado da união da BChE com a alfa-2-macroglobulina. Com os experimentos do **objetivo 1**, além de caracterizar melhor a banda $C_{4/5}$, esperamos ainda obter alguma indicação dela não resultar de associação com a albumina ou alfa-2-macroglobulina, uma vez que a tripsina age sobre a banda C_2 e sobre o complexo da BChE com a alfa-2-macroglobulina, dependendo do tempo de exposição da BChE, levando ao desaparecimento progressivo das bandas.

4.0 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Amostra

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de plasma estocadas a -20°C de voluntários do Departamento de Genética da UFPR (Universidade Federal do Paraná) e outras cedidas pelo HEMEPAR (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná).

As amostras utilizadas nos experimentos apresentaram fenótipo CHE2 C5+ e fenótipo CHE2 C5-. Estas amostras foram fenotipadas pela técnica de eletroforese em gel de ágar ácido originalmente desenvolvida por Robinson e cols. (1957), seguindo-se modificações de Van Ros e Vervoort (1973), Fadel-Picheth (1991) e Souza (1995).

4.2 - Materiais

4.2.1 - Reagentes

a) Tampão citrato de sódio 500 mM, pH 6,2 (solução estoque).

b) Tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7.

O ajuste do pH é feito com ácido cítrico 1,56 M.

c) Tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,3.

O ajuste do pH é feito com ácido cítrico 1,56 M.

d) Tampão fosfato de sódio, pH 7,1:

Solução A: Fosfato de sódio bibásico anidro 200 mM;

Solução B: Fosfato de sódio monobásico anidro 230 mM.

Adiciona-se a solução B em A até ajustar o pH em 7,1.

e) Cromógeno- substrato: Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 e solução de alfa-naftilacetato 30 mM (2,5% v/v).

f) Tampão tris (0,076 M) e ácido cítrico (0,005 M) - pH 8,1.

g) Tampão tris/ HCl (0,15 M) - pH 7,4.

h) Solução de tripsina (tipo III - origem bovina) em tampão tris/ácido cítrico, pH

8,1:

h.1- 1000 μg de tripsina por ml de tampão tris/ácido cítrico, pH 8,1.

h.2 - 333 μg de tripsina por ml de tampão tris/ácido cítrico, pH 8,1.

i) Solução de tripsina (tipo III - origem bovina) em tampão tris/HCl (0,15 M) - pH 7,4 ($2,08 \times 10^{-5}$ M):

i.1 - 1000 μg de tripsina por ml de tampão tris/HCl - pH 7,4.

i.2 - 333 μg de tripsina por ml de tampão tris/HCl - pH 7,4.

j) Solução salina (1 a 3M) e solução salina saturada.

l) Solução Inibidora de Proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto)- 2×10^{-3} M (SIGMA -P 7626).

l.1 - 2,7 mg de fenil-metil-sulfonil-fluoreto em 5ml de solução preparada com 0,5 ml de álcool isopropílico e 4,5 ml de água destilada.

4.3 - Metodologia

4.3.1 - Métodos eletroforéticos

4.3.1.1 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7

Essa técnica foi desenvolvida originalmente por Robinson e cols. (1957) e seguimos modificações de Van Ros e Vervoort (1973), Fadel Picheth (1991) e Souza (1995).

Preparam-se 50 ml de uma solução de bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,7 (item 4.2.1 - b). Aquece-se a solução, cerca de sete minutos, até dissolver totalmente o ágar tendo-se o cuidado de não deixar ferver. Verte-se sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. Após o resfriamento completo do gel, este é colocado na geladeira, em repouso, durante no mínimo 12 horas (a fim de diminuir o efeito da eletroendosse).

Em seguida as amostras de plasma são aplicadas com auxílio de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) em cuja extremidade colocam-se 2 microlitros (μ l) de plasma e insere-se a lâmina no gel.

A placa é então submetida à eletroforese, usando-se tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7 nas cubas.

A corrida eletroforética é feita por quatro horas, a 4°C, com aplicação de cerca de 25 mA e de 58 V.

Após a corrida eletroforética, verte-se sobre a placa o cromógeno-substrato (item 4.2.1 - e), preparado no momento do término da corrida, e incuba-se por uma hora, a 37°C. Após a revelação das bandas lava-se a placa com água para retirar o excesso de corante.

A secagem do gel se faz através de uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, entre as quais se coloca o gel. Esse conjunto deve ser posto entre duas placas de vidro. Em seguida leva-se o conjunto à estufa a 37°C até secar. A folha de papel filtro deve ser trocada após 10 minutos.

4.3.1.2 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,3

Igual ao item anterior, porém a preparação da solução de bacto ágar é feita em tampão citrato de sódio pH 5,3 (item 4.2.1 - c).

4.3.2 - Teste de Atividade da Tripsina

Figueiredo (1982), em sua tese de mestrado a respeito da deficiência da alfa₁-antitripsina (α_1 AT), verificou indiretamente a atividade da α_1 AT contida no soro, a partir da corrosão feita por tratamento do soro com tripsina, sobre superfície proteica de chapa de raios X, velada e revelada. A corrosão é devida à não inativação total da tripsina pela α_1 AT do soro. Caso contrário, se houver α_1 AT suficiente no soro, esta proteína irá inativar toda a tripsina, permanecendo intacta a superfície da chapa de raios X. A média da capacidade sérica inibitória da tripsina foi igual a $1,51 \pm 0,25$ mg/ml. Isto significa que 1 ml de soro consegue inibir cerca de 1,51 mg de tripsina.

Assim sendo, utilizamos deste meio, como um experimento prévio para verificar a atividade da tripsina, que tínhamos estocada a -20°C , e seria usada no tratamento de C_3 e $C_{4/5}$.

As soluções de tripsina, cujas concentrações eram de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ e 333 $\mu\text{g/ml}$, em tampão tris/ácido cítrico, pH 8,1 (itens 4.2.1-f, h) e em tampão tris/HCl, pH 7,4 (itens 4.2.1-g, i) foram testadas da seguinte maneira:

a) Amostras

① 5 μl de plasma com fenótipo CHE2 C5+ ou CHE2 C5-, eram submetidos a 5 μl de solução de tripsina, em condições iguais às que seriam utilizadas no tratamento posterior, e colocados em “eppendorfs” de capacidade para 0,5 ml, na temperatura ambiente.

② Como controle, 5 μl dos mesmos plasmas com fenótipo CHE2 C5+ ou CHE2 C5- eram juntados a 5 μl de tampão tris/ácido cítrico ou tampão tris/HCl (utilizado na preparação da solução de tripsina) e colocados em “eppendorfs” de capacidade para 0,5 ml, na temperatura ambiente.

b) Após 10 minutos, 5 μl da amostra① e 5 μl da amostra② foram colocados sobre a superfície da chapa de raios X, velada e revelada.

- c) A chapa foi, em seguida, incubada a 37°C, em banho maria, por 1 hora.
- c') Outra chapa também foi submetida, em câmara úmida a 4°C, temperatura em que é feita a corrida eletroforética.
- d) A seguir, as chapas foram lavadas em água corrente.

4.3.3 - Experimentos com Tripsina

4.3.3.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução de Tripsina em Tampão Tris/ácido cítrico, pH 8,1 (item 4.2-h) e Solução Inibidora de Proteases (Fenil-metil-sufonil-fluoreto)

Amostras com fenótipo CHE2 C5- foram submetidas à solução de tripsina (1.000 µg/ml) e solução inibidora de proteases, cuja concentração final foi de aproximadamente 2×10^{-3} M. O procedimento foi o seguinte :

a) Foram colocados 5 µl de plasma CHE2 C5- em 5 µl de solução de tripsina (1.000 µg/ml). Estas amostras foram tratadas com tripsina, a 37°C, em tempos de incubação diferentes (10, 20, 30, 40 e 60 minutos). Ao término da incubação foram acrescentados às amostras 5 µl de solução inibidora de proteases.

b) Foram preparadas as seguintes amostras controles: 1) 5 µl de plasma CHE2 C5- em 10 µl de tampão tris/ácido cítrico pH 8,1; 2) 5 µl de plasma CHE2 C5- em 5 µl de tampão tris/ácido cítrico pH 8,1 mais 5 µl de solução inibidora de proteases (acrescentada logo antes da aplicação das amostras no gel de ágar) e 3) 5 µl de plasma CHE2 C5- em 5 µl de solução de tripsina 1.000 µg/ml, incubados a 37°C (60 min) e mais 5 µl de tampão tris/ácido cítrico pH 8,1, no momento da aplicação das amostras no gel de ágar.

c) Após estes procedimentos, as amostras foram aplicadas no gel de ágar 1,4%, pH 5,3 (item 4.3.1.2).

4.3.3.2 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ submetidas à solução de Tripsina em Tampão Tris/ácido cítrico, pH 8,1 (item 4.2.1-h)

Uma das concentrações da solução de tripsina (333 µg/ml), usada no experimento, corresponde à concentração (200 µg/ml) usada por Masson (comunicação pessoal, 1996). Este pesquisador usou plasma diluído 1/6 (1 plasma : 5 tripsina). Em nosso experimento a diluição do plasma foi de 1/2 (1 plasma : 1 tripsina). A outra concentração de tripsina foi de 1.000 µg/ml.

As amostras de fenótipo CHE2 C5+ foram submetidas ao tratamento com solução de tripsina 333 µg/ml e 1.000 µg/ml.

Em tubos “eppendorfs” de capacidade para 0,5 ml foram colocados 5 µl de solução de tripsina (333 µg/ml) e mais 5 µl de plasma CHE2 C5+ em diferentes tempos. No primeiro tubo o plasma foi tratado com tripsina durante um período de 60 minutos, no segundo tubo durante 30 minutos, no terceiro durante 20 minutos e no último durante 10 minutos. Essas amostras testes foram incubadas a 37°C em banho maria, durante os respectivos tempos. Um tubo conteve 5 µl de solução de tripsina (1.000 µg/ml), três vezes mais concentrada que a concentração usada por Masson (comunicação pessoal, 1996) e 5 µl de plasma CHE2 C5+. Este tubo foi tratado com tripsina e incubado a 37°C, durante 60 minutos. Foram preparados dois tubos controles: a) **Tubo 1**- 5 µl de tampão tris/ácido cítrico pH 8,1 e 5 µl de plasma CHE2 C5+, b) **Tubo 2**- 5 µl de solução de tripsina (333 µg/ml) e 5 µl de plasma CHE2 C5+. Os tubos controles foram preparados logo antes do início da aplicação das amostras testes no gel de ágar, sem incubação a 37°C (ver o procedimento na tabela 1).

Tabela 1- Procedimento adotado no teste de tripsina.

Amostra	Incubação (minutos)	Plasma	Tampão	Tripsina 1.000µg/ml	Tripsina 333µg/ml
controle 1	zero	5µl	5µl	–	–
controle 2	zero	5µl	–	–	5µl
teste	10	5µl	–	–	5µl
teste	20	5µl	–	–	5µl
teste	30	5µl	–	–	5µl
teste	60	5µl	–	–	5µl
teste	60	5µl	–	5µl	–

Após este procedimento, as amostras testes e as controles foram aplicadas no gel de ágar 1,4%, pH 6,7 e submetidas à eletroforese (item 4.3.1-a).

4.3.3.3 - Amostras com fenótipo CHE2 C5- submetidas à solução de Tripsina em tampão Tris/ácido cítrico, pH 8,1 (item 4.2.1-h)

Para o experimento com o fenótipo CHE2 C5- repetiram-se os mesmos procedimentos (item 4.3.3.2 - ver tabela 1), substituindo-se o plasma CHE2 C5+ por plasma CHE2 C5-. As amostras testes e as controles foram aplicadas em gel de ágar 1,4%, pH 5,3 (item 4.3.1.2).

4.3.3.4 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ submetidas à solução de Tripsina em tampão Tris/HCl , pH 7,4 (item 4.2.1-i)

Duas amostras com fenótipo CHE2 C5+, uma com banda C₅ de intensidade forte e outra com banda C₅ de intensidade fraca, foram submetidas tanto a soluções de tripsina de 333 µg/ml como de 1.000 µg/ml.

As amostras teste foram preparadas em tubos “ependorfs” de capacidade para 0,5ml : a) 5 µl de plasma CHE2 C5+ (forte) em 5 µl de solução de tripsina (333 µg/ml) e em solução de tripsina (1.000 µg/ml), respectivamente. Estas amostras foram tratadas com tripsina, a 37°C, em tempos de incubação diferentes (10, 30, 60 minutos), b) 5 µl de plasma CHE2 C5+ (fraco) em 5 µl de solução de tripsina (333 µg/ml) e em solução de tripsina (1.000 µg/ml) em tubos diferentes. Seguiu-se o procedimento citado acima.

As amostras teste foram também tratadas, do mesmo modo acima citado, sem serem submetidas a 37°C em tempos de incubação diferentes.

Como controle do experimento, foram preparados os seguintes tubos: a) 5 µl de plasma CHE2 C5+ (forte) em tampão tris/HCl , pH 7,4 (item 4.2.1-i). b) 5 µl de CHE2 C5+ (fraco) em tampão tris/HCl , pH 7,4 (item 4.2.1-i).

Após este procedimento as amostras testes e controles foram aplicadas em gel de ágar 1,4%, pH 6,7 e em seguida submetidas à eletroforese (item 4.3.1-a).

Sempre que nos referirmos a amostra de fenótipo forte e fraco, o estamos fazendo baseando-nos em classificação feita por densitometria, de acordo com Alcântara e cols. (1995).

4.3.3.5 - Amostras com fenótipo CHE2 C5- submetidas à solução de Tripsina em tampão Tris/HCl, pH 7,4 (item 4.2.1-i)

Para o experimento com o fenótipo CHE2 C5- repetiram-se os mesmos procedimentos (item 4.3.3.3), substituindo-se o plasma CHE2 C5+ por plasma CHE2 C5-. As amostras testes e controles foram aplicadas em gel de ágar 1,4%, pH 5,3 (item 4.3.1.2).

4.3.4 - Experimentos com Cloreto de Sódio (NaCl)

4.3.4.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ submetidas a altas concentrações de Solução de Cloreto de Sódio

As amostras CHE2 C5+, uma com banda C₅ de intensidade forte e outra com banda C₅ de intensidade fraca, foram submetidas à solução salina da seguinte maneira:

a) Foram preparadas soluções salinas cujas concentrações eram de: 1 , 1,5 , 2 e 3 M.

b) As amostras teste continham: 5 µl de plasma CHE2 C5+ (forte) em 10 µl de solução salina (1 a 3 M) e 5 µl de plasma CHE2 C5+ (fraco) em 10 µl de solução salina (1 a 3M).

c) As amostras controle foram as seguintes: 5 µl de plasma CHE2 C5+ (forte) em 10 µl de água destilada e 5 µl de plasma CHE2 C5+ (fraco) em 10 µl de água destilada.

d) As amostras, teste e controle, foram agitadas e, em seguida, incubadas a 37°C, por 1 hora.

e) A seguir, as amostras teste e controle foram submetidas à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7 (item 4.3.1.1).

4.3.4.2 - Amostras com fenótipo CHE2 C5- submetidas a altas concentrações de Solução de Cloreto de Sódio

Para o experimento com fenótipo CHE2 C5- repetiram-se os mesmos procedimentos, substituindo-se o plasma CHE2 C5+ por plasma com fenótipo CHE2 C5-. As amostras teste e controle foram submetidas à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,3 (item 4.3.1.2).

4.3.4.3 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução Saturada de Cloreto de Sódio

Cinco amostras com fenótipo CHE2 C5+ e três amostras com fenótipo CHE2 C5- de indivíduos diferentes foram tratadas com solução salina saturada da seguinte maneira:

a) Foi preparada uma solução salina saturada, cuja concentração era de aproximadamente 4 M.

b) As amostras teste constavam de 5 µl de plasma CHE2 C5+ em 5 µl de solução salina saturada e 5 µl de plasma CHE2 C5- em 5 µl de solução salina saturada.

c) As amostras controle constavam de 5 µl de plasma CHE2 C5+ em 5 µl de água destilada e 5 µl de plasma CHE2 C5- em 5 µl de água destilada.

d) As amostras, teste e controle, foram agitadas durante um período de 15 minutos e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7 (item 4.3.1.1).

4.3.4.4 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à alta concentração de sal (NaCl)

Duas amostras com fenótipo CHE2 C5+ e três amostras com fenótipo CHE2 C5- de indivíduos diferentes foram tratadas com cloreto de sódio, em uma concentração superior a 4 M, da seguinte maneira:

a) As amostras teste continham: 46,8 mg de cloreto de sódio em 20 µl de plasma CHE2 C5+ ou em 20 µl de plasma CHE2 C5-.

b) Os controles foram o plasma total das respectivas amostras CHE2 C5+ e CHE2 C5- testes, sem diluição.

c) Em seguida, as amostras teste e as respectivas amostras controle foram agitadas e submetidas à temperatura de 0°C, por 7 dias.

d) A seguir, foram submetidas à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7 e 5,3 (item 4.3.1.1 e 4.3.1.2).

4.3.5 - Experimento com Metanol

4.3.5.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução de Metanol (CH₃OH)

Amostras de plasma CHE2 C5+ e CHE2 C5- foram tratadas com solução de metanol, da seguinte forma:

- a) Preparou-se uma solução de metanol (0,5 M).
- b) As amostras teste foram 5 µl de plasma CHE2 C5+ em 5 µl de solução de metanol (0,5 M) e 5 µl de plasma CHE2 C5- em 5 µl de solução de metanol (0,5 M).
- c) As amostras controle foram 5 µl de plasma CHE2 C5+ em 5 µl de água destilada e 5 µl de plasma CHE2 C5- em 5 µl de água destilada.
- d) As amostras teste e controle, após 48 horas, foram agitadas e a seguir submetidas à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7 (item 4.3.1.1) e pH 5,3 (item 4.3.1.2).

5.0 - RESULTADOS

5.1 - Experimentos com Tripsina

Antes dos experimentos, foi testada a atividade da tripsina através do teste da chapa de raios X. Uma vez que houve corrosão na superfície desta chapa (item 4.3.2), concluiu-se que a tripsina estava ativa.

5.1.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução de Tripsina em Tampão Tris/ácido cítrico, pH 8,1 e Solução Inibidora de Proteases (Fenil-metil-sufonil-fluoreto) (item 4.3.3.1)

Foi utilizado o plasma de um indivíduo de fenótipo CHE2 C5-. Foram feitas 8 aplicações desse plasma em eletroforese (Figura 1), sendo 3 controles e 5 testes. Todos os testes mostraram que o inibidor de tripsina também inibe a BChE na concentração utilizada (cerca de 2×10^{-3} M). Estes testes (Figura 1; 4-8) diferiram, respectivamente, apenas no tempo de incubação (10, 20, 30, 40 e 60 minutos) da amostra com solução de tripsina (1.000 µg/ml), sendo que o inibidor foi adicionado em todos ao término da incubação. As amostras controles que não continham o inibidor (Figura 1; 1 e 3) mostraram atividade normal da BChE, tanto a que continha solução de tripsina (Figura 1; 3) como a que não continha (Figura 1; 1). A amostra controle com o inibidor e sem tripsina (Figura 1; 2) mostrou a ação do inibidor sobre a BChE.

Logo, neste experimento, as amostras que continham inibidor tiveram as bandas da BChE inibidas.

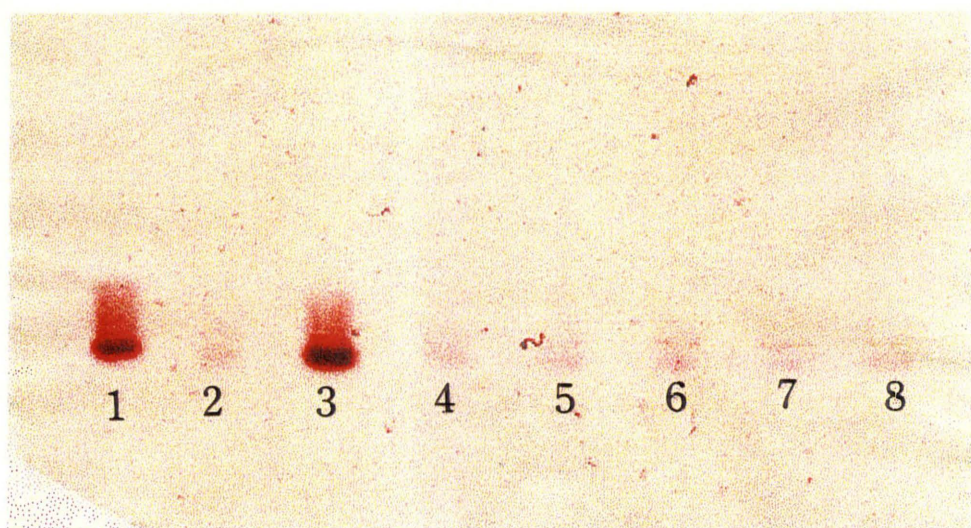


FIGURA 1. Ação do inibidor de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto) sobre a BChE. As amostras CHE2 C5- 1 e 3 não apresentam o inibidor, enquanto as amostras CHE2 C5- 2, 4, 5, 6, 7 e 8 o apresentam.

5.1.2 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5- submetidas à Solução de Tripsina em Tampão Tris/ácido cítrico, pH 8,1 (itens 4.3.3.2 e 4.3.3.3)

O plasma de um indivíduo com fenótipo CHE2 C5+ foi submetido a soluções de tripsina (333 e 1.000 µg/ml) em tampão tris/ácido cítrico pH 8,1 e incubado a 37°C, em tempos diferentes (10, 20, 30 e 60 minutos), seguindo-se posterior eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7. Foi possível verificar que a tripsina parece diminuir a intensidade da banda C₅ com o tempo maior de incubação (Figura 2). Em relação ao conjunto C₁-C₄ nada parece ter ocorrido. Por outro lado, o efeito da tripsina foi maior sobre a banda C₅ quando submetida à tratamento com solução de tripsina na concentração de 1.000 µg/ml. Neste caso, a banda C₅ desapareceu (Figura 2; 3).

Em relação às amostras com fenótipo CHE2 C5-, submetidas às mesmas condições acima (com pH 5,3), verificou-se que a banda C_{4/5} não sofreu qualquer alteração (Figura 3). O mesmo resultado foi obtido no tratamento com as duas concentrações da solução de tripsina (333 e 1.000 µg/ml).

5.1.3 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-, com intensidade das bandas (C₅ e C_{4/5}) forte e fraca, submetidas à Solução de Tripsina em Tampão Tris/HCl, pH 7,4 (item 4.3.3.4 e 4.3.3.5)

As amostras com fenótipo CHE2 C5+ foram submetidas à solução de tripsina em tampão tris/HCl, pH 7,4, cujas concentrações foram de 333 e 1.000 µg/ml, seguindo-se eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7. Não houve uma diferença acentuada no desaparecimento da banda C₅ tratada e incubada em tempos diferentes (10, 30 e 60 minutos), quando a solução de tripsina foi de 333 µg/ml. O efeito da tripsina sobre o desaparecimento da banda C₅ foi apreciável, quando a solução de tripsina foi usada na concentração de 1.000 µg/ml (Figura 4).

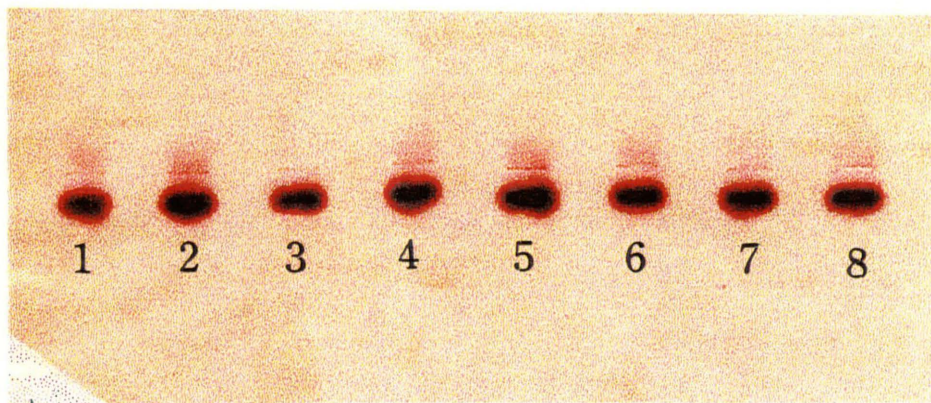


FIGURA 2. Efeito da Tripsina sobre a banda C₅. As amostras controles não foram incubadas: 1 e 2 não foram submetidas à tripsina e 4 foi submetida à solução de tripsina (333 µg/ml). A amostra 3 contém solução de tripsina (1.000 µg/ml) e foi incubada por 60 minutos. As amostras 5 a 8 foram incubadas com solução de tripsina (333 µg/ml) por 10, 20, 30, e 60 minutos, respectivamente.

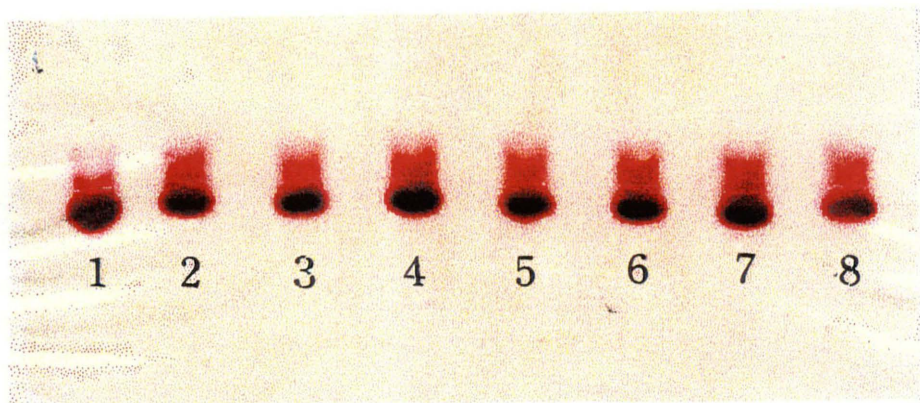


FIGURA 3. Efeito da Tripsina sobre a banda C_{4/5}. As amostras controles não foram incubadas: 1 e 2 não foram submetidas à tripsina e 4 foi submetida à solução de tripsina (333 µg/ml). A amostra 3 contém solução de tripsina (1.000 µg/ml) e foi incubada por 60 minutos. As amostras 5 a 8 foram incubadas com solução de tripsina (333 µg/ml) por 10, 20, 30, e 60 minutos, respectivamente.

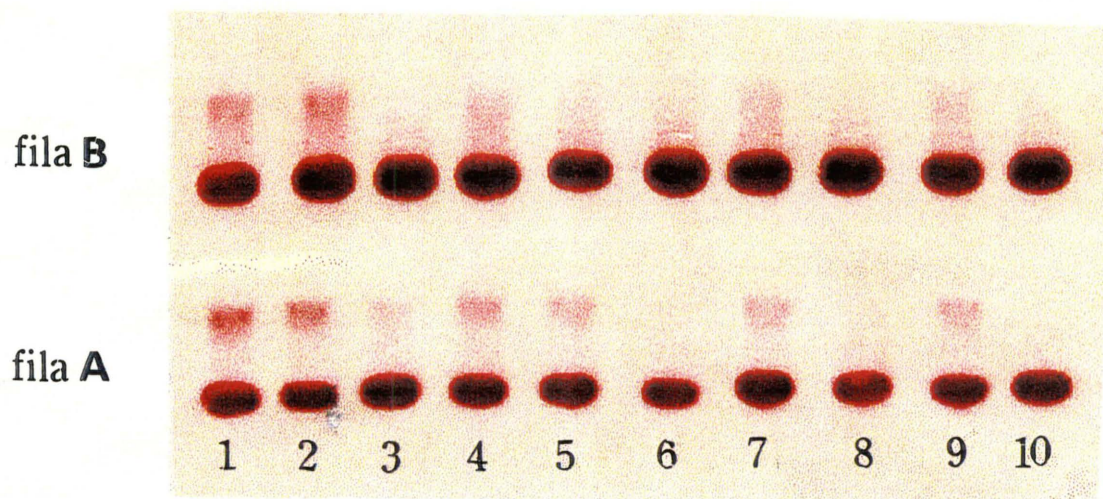


FIGURA 4. Efeito da Tripsina sobre as bandas C_5 fortes e fracas. A fila A corresponde a CHE2 C_5^+ de banda C_5 forte e a fila B corresponde a CHE2 C_5^+ de banda C_5 fraca. As amostras controles (sem tripsina) não foram incubadas previamente (1 e 2). As amostras 3 e 4 não foram incubadas e contém, respectivamente, solução de tripsina 1.000 e 333 $\mu\text{g/ml}$. As amostras 5, 7 e 9 contém solução de tripsina (333 $\mu\text{g/ml}$) e foram incubadas por 10, 30 e 60 minutos, respectivamente. A mesma incubação foi feita respectivamente para as amostras 6, 8 e 10, que continham solução de tripsina (1.000 $\mu\text{g/ml}$).

As amostras com fenótipo CHE2 C5-, submetidas às mesmas condições acima (com pH 5,3), apresentaram a banda C_{4/5} sem nenhuma alteração após serem tratadas com tripsina nas concentrações de 333 e 1.000 µg/ml (Figura 5).

A intensidade das bandas (forte e fraca) não influenciou nos resultados respectivos de C₅ e C_{4/5}.

5.2 - Experimentos com Cloreto de Sódio

5.2.1 - Amostras com fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5- submetidas a altas concentrações de Solução de Cloreto de Sódio (itens 4.3.4.1 e 4.3.4.2)

Amostras com fenótipo CHE2 C5+, com banda C₅ de intensidade forte e de intensidade fraca, tratadas com altas concentrações de solução salina (1 a 3 M) foram submetidas à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7. As amostras não mostraram dissociação do complexo C₅. As amostras submetidas à solução salina tiveram o mesmo comportamento dos controles. O mesmo ocorreu em relação às amostras com fenótipo CHE2 C5- (com banda C_{4/5} de intensidade forte e de intensidade fraca), submetidas às mesmas condições, salvo o pH do gel de ágar, que foi 5,3. As amostras não apresentaram nenhuma alteração da banda C_{4/5} após o tratamento com solução salina (1 a 3 M).

5.2.2 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução Saturada de Cloreto de Sódio (item 4.3.4.3)

Amostras de 5 indivíduos diferentes com fenótipo CHE2 C5+ e 3 com fenótipo CHE2 C5- foram submetidas à solução salina saturada e, em seguida, à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7. Verificou-se que não houve alteração no comportamento de C₅ com o tratamento feito com solução salina saturada.

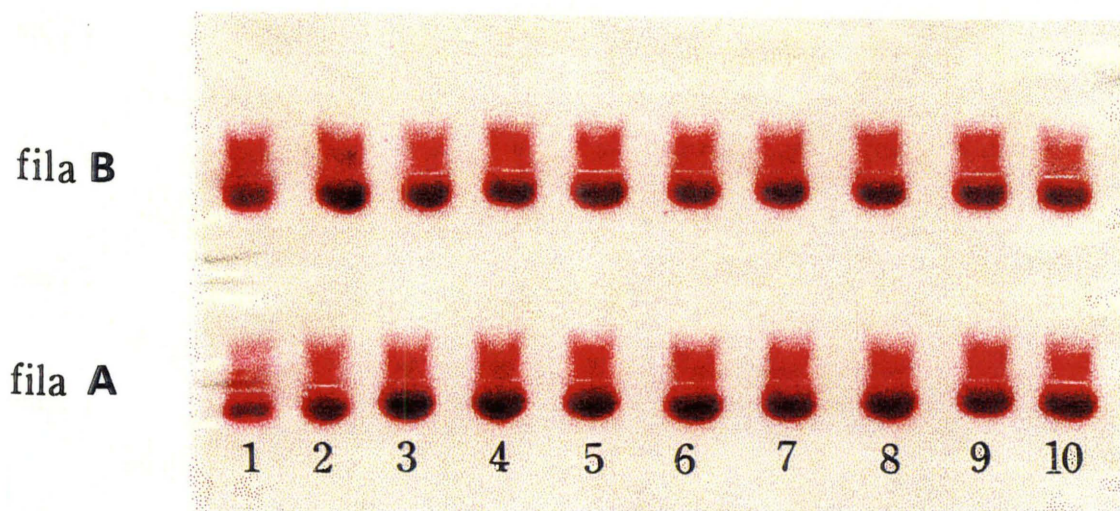


FIGURA 5. Efeito da Tripsina sobre as bandas $C_{4/5}$ fortes e fracas. A fila A corresponde a CHE2 C5- de banda $C_{4/5}$ forte e a fila B corresponde a CHE2 C5- de banda $C_{4/5}$ fraca. As amostras controles (sem tripsina) não foram incubadas previamente (1 e 2). As amostras 3 e 4 não foram incubadas e contém, respectivamente, solução de tripsina 1.000 e 333 $\mu\text{g/ml}$. As amostras 5, 7 e 9 contém solução de tripsina (333 $\mu\text{g/ml}$) e foram incubadas por 10, 30 e 60 minutos, respectivamente. A mesma incubação foi feita respectivamente para as amostras 6, 8 e 10, que continham solução de tripsina (1.000 $\mu\text{g/ml}$).

5.2.3 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à alta concentração de Cloreto de Sódio (NaCl) (item 4.3.4.4)

Amostras de 2 indivíduos diferentes com fenótipo CHE2 C5+ e 3 com fenótipo CHE2 C5- foram submetidas à alta concentração de sal e, após 7 dias, à eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,7 e 5,3. Verificou-se que as amostras CHE2 C5+ teste apresentaram a intensidade da banda C₅, mais fraca que a dos seus respectivos controles. O mesmo não ocorreu em relação à banda C_{4/5} (dados não mostrados).

5.3 - Experimento com Metanol

5.3.1 - Amostras com fenótipo CHE2 C5+ e com fenótipo CHE2 C5- submetidas à Solução de Metanol (item 4.3.5.1)

Após submeterem-se amostras com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5- à solução de metanol e eletroforese em gel de ágar 1,4% (pH 6,7 e 5,3), estas não apresentaram nenhuma alteração quanto à intensidade das bandas e mobilidade eletroforética (dados não mostrados).

6.0 - DISCUSSÃO

6.1 - Experimentos com Tripsina

6.1.1 - Solução Inibidora de Proteases (fenil- metil-sulfonil-fluoreto) - (item 5.1.1)

A fim de interromper a reação de proteólise da tripsina sobre a BChE, Masson (comun. pessoal, 1996) adicionou um inibidor de tripsina, no caso a ovomucóide (SIGMA-TIPO II-O). Com o mesmo propósito, utilizamos o inibidor de proteases fenil-metil-sulfonil-fluoreto, cuja concentração final foi de 2×10^{-3} M, cerca de 12 vezes menos concentrado que o propranolol (inibidor diferencial das variantes da BChE) utilizado em fenotipagem.

Após submeter amostras com fenótipo CHE2 C5- à solução inibidora de protease, todos os testes mostraram que ela inibiu a BChE. Uma vez que a amostra controle com o inibidor e sem tripsina (Figura 1; 2) mostrou a ação do inibidor sobre a BChE, concluímos que este inibidor, na concentração utilizada inibe a BChE, não sendo indicado para estes experimentos. Constatou-se, também, que é desnecessário o uso do inibidor para a tripsina, desde que esta não continua a agir durante a corrida eletroforética, como ficou mostrado no experimento (Figura 1; 3).

Harris e Wittaker (1961) descreveram uma variante da BChE resistente ao fluoreto de sódio, denominada de variante F e pertencente ao loco BCHE. Atualmente sabe-se que há duas mutações (F1 e F2), determinadas por análise direta do DNA (Nogueira e cols., 1992), cujas enzimas são resistentes ao fluoreto. Em vista disso, sugerimos que o inibidor de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto) possa ser de interesse como inibidor diferencial da BChE. Desconhecemos que haja trabalhos a respeito.

6.1.2 - Efeito da Tripsina sobre a banda C₅

Masson (1991), após tratar C₅ (purificado a partir de plasma) com tripsina, observou que a banda C₅ foi convertida na forma C₄. A fim de caracterizar o comportamento da banda C_{4/5} em diferentes condições e, ao mesmo tempo, compará-lo com o da banda C₅, resolvemos também verificar o efeito da tripsina sobre a banda C₅ não purificada, usando plasma.

Os resultados mostraram que a solução de tripsina (333 µg/ml), correspondente à concentração de (200 µg/ml) usada por Masson (comun. pessoal, 1996) às vezes parece levar à pouca diminuição da intensidade de C₅, com o aumento do tempo de incubação (Figura 2). Por outro lado, com a solução de tripsina mais concentrada (1000 µg/ml) foi possível constatar o desaparecimento completo da banda C₅, nos tempos de maior incubação (Figura 2). Masson (1991) afirmou que a banda C₅ converteu-se na forma C₄ por ação da tripsina, uma vez que se tratava de C₅ purificada. Em nosso experimento, em virtude de usarmos plasma como fonte de C₅, não podemos afirmar que C₅ tenha se transformado em C₄, quando tratada com a solução mais concentrada de tripsina (1000 µg/ml), uma vez que não podemos isolar a possível banda C₄ recém-formada do conjunto de bandas C₁ a C₄ já presente no plasma. Entretanto, baseando-nos nos resultados de Masson (1991), sugerimos que C₅ tenha se transformado em C₄. Podemos afirmar que C₅ do plasma sofreu o efeito da tripsina.

De início, utilizamos o tampão tris/ácido cítrico pH 8,1, baseando-nos em (Figueiredo, 1982), que o utilizou para fazer solução de tripsina. Em seguida, repetimos o experimento com o tampão tris/HCl pH 7,4, por termos então tomado conhecimento de ter sido o tampão utilizado por Masson (comun. pessoal, 1996). Em relação aos tampões utilizados (tris/ácido cítrico pH 8,1; tris/HCl pH 7,4) para preparar as soluções de tripsina (333 e 1000 µg/ml), não houve resultados diferentes. Em qualquer das duas soluções, a tripsina agiu sobre C₅.

A banda C₅ tem demonstrado heterogeneidade interindividual em sua intensidade (Harris e cols., 1963; Lourenço e cols., 1986; Chautard-Freire-Maia e cols., 1991), podendo apresentar-se desde muito fraca até muito intensa. Por esta razão julgamos interessante verificar o efeito da tripsina sobre esses dois grupos.

Entretanto, os resultados obtidos, com as amostras testadas, não apontaram nenhuma diferença entre o fenótipo CHE2 C5+ forte e fraco, após o tratamento com solução de tripsina (333 e 1000 µg/ml), no que se refere à banda C₅.

6.1.3 - Efeito da Tripsina sobre a banda C_{4/5}

Uma vez que foi verificado o efeito positivo da tripsina sobre C₅, em duas condições diferentes, os mesmos procedimentos foram repetidos para verificar o efeito desta protease sobre a banda C_{4/5}.

O resultado do efeito da tripsina sobre a banda C_{4/5} foi diferente daquele obtido para a banda C₅. Não houve nenhuma alteração da banda C_{4/5} após o tratamento em tempos diferentes de exposição às soluções de tripsina (333 e 1000 µg/ml). As soluções de tripsina preparadas em tampão tris/ácido cítrico (pH 8,1), e em solução tampão tris/HCL (pH 7,4), não mostraram efeito diferente sobre a banda C_{4/5}.

Também a banda C_{4/5} tem demonstrado heterogeneidade interindividual em sua intensidade (Alcântara e cols., 1995), podendo apresentar-se desde muito fraca até muito intensa. Com base em sua intensidade podemos ter dois fenótipos: fenótipo CHE2 C5- com banda C_{4/5} fraca, e fenótipo CHE2 C5- com banda C_{4/5} forte. Com o mesmo propósito, apresentado para C₅ (item 6.1.2), amostras com fenótipo CHE2 C5- forte e fraco, foram submetidas às soluções de tripsina (333 e 1000 µg/ml). Não se constatou nenhuma diferença entre os dois grupos, após o tratamento com tripsina.

Masson (comun. pessoal, 1995), utilizando soro total, verificou uma banda eletroforética da BChE associada à alfa-2-macroglobulina (BChE - α2MG). O mesmo verificou que a tripsina age sobre a banda C₂ e sobre o complexo BChE - α2MG. Com o aumento do tempo de exposição, estas duas bandas vão desaparecendo, ao mesmo tempo em que as bandas formadas só por BChE (monômero G₁, dímero G₂ e trímero G₃) vão aumentando de intensidade. Infere-se que estas três últimas bandas vão aumentando às expensas de C₂, BChE - α2 MG e C₄, após o tratamento com tripsina.

Em vista do exposto, podemos dizer que a banda C_{4/5} não é um conjugado de C₁ com albumina (C₂), assim como não é BChE associada à α2MG.

6.2 - Experimentos com Cloreto de Sódio

6.2.1 - Efeito do Cloreto de Sódio sobre a Banda C₅

Masson (1991), ao submeter C₅ a altas concentrações de solução salina (NaCl; 1,5 a 4 M), verificou que o complexo C₅ se dissociava em C₄ e substância "X". Isto indicou que esta associação se faz através de ligações predominantemente não covalentes, isto é, iônicas. Com base neste fato, resolvemos verificar o comportamento da banda C₅ após o tratamento com solução salina em altas concentrações, para nos servir como um controle de comparação para os experimentos com C_{4/5}, nas mesmas condições.

Quando C₅ foi submetida a altas concentrações de solução salina (1 a 3 M), não houve dissociação do complexo C₅. O mesmo resultado ocorreu em relação aos grupos com fenótipo CHE2 C5+ forte e CHE2 C5+ fraco.

Tivemos duas dúvidas que nos impossibilitaram de concluir em definitivo, neste estágio dos experimentos. Havia uma dúvida em relação a estarmos trabalhando com indivíduos heterogêneos em relação ao complexo C₅, sendo que as únicas duas amostras testadas pudessem estar tendo comportamento diferente do esperado. Assim sendo, amostras de indivíduos diferentes foram submetidas à solução salina saturada (aproximadamente 4 M). Com este experimento, esperávamos verificar a dissociação do complexo C₅, em alguns dos plasmas, fenômeno que também não ocorreu.

A outra dúvida seria com relação à banda observada e interpretada como C₅. Não seria a banda C_{4/5}, que nestas condições de tratamento, estaria com a mobilidade de C₅, enquanto C₅ já teria desaparecido pelo efeito da solução salina? Em vista disso, nestas condições de pH (6,7), também foi feita a corrida eletroforética de amostras de 3 indivíduos CHE2 C5-. Demonstrou-se que a banda C_{4/5} não aparece, nestas condições, como esperado para as amostras sem tratamento com salina. Assim, podemos concluir que a banda observada na posição de C₅ é ela própria. Quando as amostras foram submetidas diretamente ao sal (NaCl), nos pareceu que a intensidade da banda C₅ se apresentou mais fraca em relação ao controle. Este resultado sugere que o complexo C₅ esteja começando a se desfazer. Masson (1991) não descreve os procedimentos adotados no tratamento de C₅ com altas concentrações de solução salina (1,5 a 4M). Inferimos que ele utilizou C₅ após isolamento a partir de soro ou plasma. No nosso caso,

utilizamos o próprio plasma. É possível que, em nossas condições, C₅ fique mais protegido da ação do sal. Talvez, a partir do isolado de C₅, pudéssemos verificar dissociação clara do complexo C₅, quando este fosse submetido a altas concentrações de solução salina.

6.2.2 - Efeito do Cloreto de Sódio sobre a banda C_{4/5}

Os efeitos de sal (solução ou puro) sobre a banda C_{4/5} parecem ter sido iguais aos apresentados sobre a banda C₅. Isto é, apenas os experimentos com o sal puro pareceram ter tido um efeito muito leve sobre estas bandas. Como não obtivemos um efeito claramente positivo sobre C₅, que seria nosso controle, não podemos tirar uma conclusão definitiva a respeito do efeito de soluções saturadas de NaCl sobre a banda C_{4/5}.

Portanto, sugerimos que somente a partir do tratamento do isolado de C_{4/5} com altas concentrações de solução salina, talvez possamos inferir o tipo de ligação predominante entre a associação da BChE com a suposta substância "Y" (Souza, 1995).

Podemos talvez inferir que C₅ é bem mais estável no plasma ou soro do que quando isolado deste, frente a altas concentrações de NaCl. No que se refere ao comportamento de C₅ frente à tripsina, o plasma não parece ter oferecido proteção suficiente para a manutenção do complexo.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFFPR

6.3 - Experimento com Metanol

6.3.1 - Efeito do Metanol sobre as bandas C₅ e C_{4/5}

Há relatos da união física da BChE com lipoproteínas, como a LDL (Lawrence e Melnick, 1961) e HDL (Ryhänen e cols., 1982). Ohkawa e cols. (1988) comentam que a fosfolipase C/D desfaz o complexo C₅. Masson (1991) relata que C₅ tem um caráter hidrofóbico, ligando-se a derivados de ácidos graxos de cadeia longa. Sabemos que o metanol é capaz de separar proteínas de lipídeos (Hanahan, 1992), e que provavelmente não inibiria a BChE, na molaridade utilizada (0,5 M), com base em inferência feita a partir de trabalho de Todrich e cols. (1950). Assim, resolvemos verificar se a solução de

metanol teria efeitos sobre a mobilidade e resolução de C_5 e $C_{4/5}$.

Podemos concluir que, nas condições em que realizamos os experimentos, não observamos qualquer mudança no comportamento de $C_{4/5}$ e C_5 . Foi verificado, em nosso laboratório, que $C_{4/5}$ se destaca melhor quando o plasma é diluído de 1:1 em água ou solução salina (Souza e cols., 1993). Se este procedimento está separando $C_{4/5}$ de outra substância, esta deve ser solúvel em água. No caso de lípídeos, os únicos com esta propriedade são os fosfolípídeos.

7.0- CONCLUSÕES

1) A solução inibidora de proteases (fenil-metil-sulfonil-fluoreto), utilizada no experimento para inibir a tripsina, também inibiu a butirilcolinesterase. Entretanto, demonstrou-se que este tratamento não é necessário, uma vez que a tripsina não continua a agir sobre a BChE durante a corrida eletroforética.

2) Foi possível verificar o desaparecimento da banda C_5 sob o efeito da tripsina, em diferentes condições. Entretanto, como não podemos isolar a possível banda C_4 recém-formada do conjunto de bandas C_1 - C_4 presentes no plasma, sugerimos que C_5 foi convertida na forma C_4 , baseando-nos nos resultados obtidos por Masson (1991).

3) Quanto ao comportamento da banda $C_{4/5}$, após o tratamento com tripsina nas mesmas condições aplicadas para a banda C_5 , não houve nenhuma alteração. Este resultado nos permite concluir que a banda $C_{4/5}$ não é a banda C_2 (conjugado de C_1 com albumina), como também não é BChE associada à α -2-macroglobulina, uma vez que estes dois complexos sofrem a ação da tripsina.

4) Não se verificou a influência de altas concentrações de cloreto de sódio sobre o complexo C_5 e $C_{4/5}$ do plasma total. Sugere-se que se utilize isolado de $C_{4/5}$, caso se queira inferir quais as ligações predominantes na associação de BChE com a substância “Y”.

5) O tratamento com solução de metanol não mostrou nenhuma alteração no comportamento das bandas C_5 e $C_{4/5}$, nas condições do presente trabalho, no que se refere à resolução e mobilidade dessas bandas.

8.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PICHETH, G. e VIEIRA, M.M. (1991). Method for serum cholinesterase phenotyping. Rev. Brasil. Genet., 14:841-846.
- ALCÂNTARA, V.M.; RODRIGUES, L.C.; PICHETH, G. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. (1995). Metodologia para quantificar as bandas C₅ e C_{4/5} da butirilcolinesterase. Rev. Brasil. Genet., 18:566.
- ARPAGAUS, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. Biochemistry., 29:124-131.
- ASHTON, G.C. e SIMPSON, N.E. (1966). C₅ types of serum cholinesterase in a Brazilian population. Am. J. Hum. Genet., 18: 438-447.
- AUGUSTINSSON, K.B. (1963). Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: Handbook of experimental pharmacology. Koelle, G.B. (org.). Springer- Verlag, Berlim e Nova York, pp. 89-128.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; VIEIRA, M.M. e PRIMO-PARMO, S.L. (1991). A expressividade do fenótipo CHE2 C₅+, da butirilcolinesterase, em relação a peso e sexo. Rev. Brasil. Genet. (suppl.), 14:149.
- CHATONNET, A.; MASSON, P. (1986). Is the peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isozyme or a contaminating dipeptidylamino peptidase ? Biochimie., 68:657-667.

- EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N. e MOHR, J. (1989). Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. Clin. Genet., 35:313-321.
- FADEL-PICHETH, C.M.T. (1991). Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 117 p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- FIGUEIREDO, N.L. (1982). Deficiência de alfa₁-antitripsina - avaliação de técnica semiquantitativa e frequência em amostra de Curitiba. Curitiba, Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- GALLANGO, M. L. e ARENDS, T. (1969). Phenotypical variants of pseudocholinesterase in myeloma patients. Humangenetik, 7: 104-108.
- GUERREIRO, J.F.; SANTOS, S.E.B. e AGUIAR, G.F.S. (1989). Serum cholinesterase polymorphism (CHE1 and CHE2 loci) among several Indian groups from Amazon region of Brazil, and segregation of the C5 variant in families. Gene Geography, 3:11-20.
- HANAHAN, D.J. (1992). Lipids. The New Encyclopaedia Britannica., 14:916-923.
- HARRIS, H. (1980). The principles of human biochemical genetics. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 3^aed., pág. 171.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. e ROBSON, E.B. (1962). Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. Nature., 196:1296-1298.
- HARRIS, H.; ROBSON, E.B. (1963). Fractionation of human serum cholinesterase components by gel filtration. Biochim. Biophys. Acta., 73:649-652.

- HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; HOPKINSON, D.A. e WHITTAKER, M. (1963). Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by eletrophoresis. Ann. Hum. Genet., 26:359-382.
- HARRIS, H.; WHITTAKER, M. (1961). Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes. Nature., 191:496-498.
- HAUPT, H.; HEIDIE, K.; ZWISLER, O.; SCHWICK, H.G. (1966). Isolierung und physikalisch-chemische Charakterisierung der Cholinesterase aus Humanserum. Blut., 14:65-75.
- JOSHI, H. e SIVARAM, S. (1979). Persistence of Typable Activity of Pseudo-cholinesterase (E2 Locus) - C₅ Component Polymorphism in Human Bloodstains under Indian Climatic Conditions. Indian J. of Exp. Biol., 17:258-261.
- JUUL, P. (1968). Human plasma cholinesterase isoenzymes. Clin. Chem. Acta., 19: 205-213.
- KALOW, W.; STARON, N. (1957). On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. Can. J. Biochem. Physiol., 35:1305-1320.
- KRUPKA, R.M. (1966). Chemical structure and function of the active center of acetylcholinesterase. Biochemistry., 5:1988-1998.
- KUTTY, K.M. (1980). Review: biological function of cholinesterase. Clin. Biochem., 13: 239-243.
- LA MOTTA, R.V.; McCOMB, R.B.; NOLL, C.R. Jr.; WETSTONE, H. J. e REINFRANK, R.F. (1968). Multiple forms of serum cholinesterase. Arch. Biochem. Biophys., 124:299-308.

- LAWRENCE, S.H.; MELNICK, P.J. (1961). Enzymatic activity related to human serum β -lipoprotein: histological, imuno-electrophoretic and quantitative studies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107:998-1001.
- LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E.; JOHNSON, L.L. (1987). Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 262:549-557.
- LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W. e LA DU, B.N. (1979). Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 254:8324- 8330.
- LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. (1982). Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 257:12012-12018.
- LOURENÇO, M.A.C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.e VIEIRA, M.M. (1986). Variabilidade do fenótipo C5+ da colinesterase do soro. Ciênc. Cult. (supl.), 38:872.
- MASSON, P. (1979). Formes moleculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. Biochim. Biophys. Acta., 578:493-504.
- MASSON, P. (1989). A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. Biochim. Biophys. Acta., 988:258-266.
- MASSON, P. (1991). Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In Cholinesterases. Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology. J. Massoulié e cols., (eds.). American Chemical Society, Washington DC, pp 42-45
- MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. (1992). A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 189:1280-1286.

- NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; McGUIRE, M.C.; ADKINS, S.; LUBRANO, T.; RUBINSTEIN, H.M.; LIGHTSTONE, H.; van der SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. (1992). Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. Am. J. Hum. Genet., 51:821-828.
- OHKAWA, J.; FURUYA, I.; TABATA, S.; SAEKI, S.; OIMOMI, T. e BABA, S. (1988). Chemical characterization of C₅ cholinesterase isoenzyme. Enzyme (suppl.1), 40:37-38.
- PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C.; PRIMO-PARMO, S. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. e VIEIRA, M.M. (1994). An improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. Biochem. Genet., 32:83-89.
- PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L. INNIS, J.W. e LA DU, B.N. (1996). Characterization of 12 Silent Alleles of the Human Butyrylcholinesterase (BCHE) Gene. Am. J. Hum. Genet., 58:52-64.
- ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P. e ZUELZER, W.W. (1957). A new technique for differentiation of hemoglobin. J. Lab. Clin. Med., 50:745-752.
- ROBSON, E.B.; SUTHERLAND, I. e HARRIS, H. (1966). Evidence for linkage between the transferrin locus (Tf) and the serum cholinesterase locus (E1) in man. Ann. Hum. Genet., 29:325-336.
- RYHÄNEN, R.J.J.; JAUHIANEN, M.S.; LAITINEN, M.V. e PUHAKAINEN, E.V. (1982). The relationships between human serum pseudocholesterase, lipoproteins, and apolipoproteins (APOHDL). Biochem. Med., 28:241-245.
- SCOTT, E.M.; POWERS, R.F. (1974). Properties of the C₅ variant form of human serum cholinesterase. Am. J. Hum. Genet., 26:189-194.

- SHAFFERMAN, A.; KRONMAM, C.; FLASHNER, Y.; LEITNER, M.; GROSFELD, H.; ORDENTLICH, A.; GOZES, Y.; COHEN, S.; ARIEL, N.; BARAK, D.; HAREL, M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; VELAN, B. (1992). Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. J. Biol. Chem., 267:17640-17648.
- SIMPSON, N.E. (1966). Factors influencing cholinesterase activity in a Brazilian Population. Am. J. Hum. Genetic., 18: 243-252.
- SIMPSON, N.E. (1972). Polyacrylamide electrophoresis used for the detection of C5+ cholinesterase in Canadian Caucasians, Indians and Eskimos. Am. J. Human. Genet., 24:317-320.
- SINGH, S.; SATERNUS, K.; MÜNSCH, H.; ALTLAND, K.; GOEDDE, H.W. e ERIKSSON, A.W. (1974). Pseudocholinesterase polymorphism among Alanders (Finno-Sweeders), Maris (Cheremisses, USSR) and Greenland Eskimos, and segregation of some E₁ and E₂ locus types in Finnish Lapp families. Hum. Hered., 24:352-362.
- SOUZA, R.L.R. (1995). Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C_{4/5}) verificada em eletroforese. Curitiba, 73 p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SILVA, A.C.D. E KAISS, J. (1993). Nova banda da butirilcolinesterase humana detectada em fenótipos CHE2 C5-. Rev. Brasil. Genet., (suppl) 16:103.
- SUGIMORI, T. (1986). Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isozyme. Canad. Anaesth. Soc. J., 33:321-327.
- TODRICK, A.; FELLOWES, K.P. e RUTLAND, J.P. (1950). The Effect of Alcohols on Cholinesterase. Chem. Defence Exp. Establishment., 48:360-368.

- TORTOLERO, M. e MEDINA, J.R. (1978). Las isoenzimas C₄ y C₅ de la pseudocolinesterasa humana. Sangra., 23:157-162.
- VAN ROS, G. e DRUET, R. (1966). Uncommon electrophoretic patterns of serum cholinesterase (pseudocholinesterase). Nature. , 212: 543-544.
- VAN ROS, G.; VERVOORT, T. (1973). Frequencies of the "atypical" and C₅ variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C₅ variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. Ann. Soc. belge Med. trop., 53:633-644.
- WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F.; LITT, I.C. (1947). Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. Am. J. Physiol., 149:549-551.
- WHITTAKER, M. (1980). Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. Anaesthesia., 35:174-197.
- WHITTAKER, M. (1986). Cholinesterase. Karger, Basel, New York., 11:1-126.
- YAMAMOTO, K.; MORITO, F.; MOTOMURA, M.; KANEOKA, H. e SADAI, T. (1986). A case of familial hyper-cholinesterasemia associated with isozyme variant band. Gastroent. Jap., 21:379-384.
- YAMAMOTO, K.; MORITO, F.; SETOUGUCHI, Y.; FUJII, S. e KARIYA, T. (1987). Characterization of serum cholinesterase in familial hyper-cholinesterasemia associated with an isozyme variant band. Gastroent. Jap. , 22:187-193.
- YANG, F.; LUM, J.B.; MCGILL, J.R.; MOORE, C.M.; NAYLOR, S.L.; VAN BRAGT, P.H.; BALDWIN, W.D.; BOWMAN, B.H. (1984). Human Transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:2752-2756.